

**Міністерство освіти і науки України
Черкаський національний університет
імені Богдана Хмельницького**

Боєчко Ф.Ф., Боєчко Л.О., Шмиголь І.В.

Лабораторний практикум з біохімії

Черкаси 2015

ББК 28.072Я73
УДК 577.1(075.8)+612.015(075.8)
Б 63

Рецензенти:

Осипенко В.В., кандидат біологічних наук, доцент кафедри біології та біохімії Черкаського національного університету імені Б. Хмельницького

Загоруйко Н.В., кандидат біологічних наук, доцент кафедри екології Черкаського державного технологічного університету

*Рекомендовано до друку Вченою радою
Черкаського національного університету
імені Богдана Хмельницького
(протокол № 7 від 17 червня 2014 року)*

Боєчко Ф.Ф., Боєчко Л.О., Шмиголь І.В.

Б63 Лабораторний практикум з біохімії : навчально-методичний посібник : Вид. 2-ге, перероб. і допов. – Черкаси : ЧНУ імені Богдана Хмельницького, 2015. – 279 с.

ISBN 978-966-353-378-0

Навчально-методичний посібник рекомендовано для студентів вищих навчальних закладів III-IV рівня акредитації, галузі знань 0401 – Природничі науки.

Посібник включає лабораторно-практичні роботи з основних розділів статичної та динамічної біохімії, а також завдання для самоконтролю знань студентів і самостійної роботи. Основна мета посібника – закріплення теоретичних знань студентів та формування практичних умінь і навичок на основі застосування досягнень сучасної біохімічної науки.

ББК 28.072Я73
УДК 577.1(075.8)+612.015(075.8)

ISBN 978-966-353-378-0

© ЧНУ ім. Б.Хмельницького, 2015
© Ф.Ф. Боєчко, Л.О. Боєчко,
І.В. Шмиголь, 2015

Передмова

Навчальний посібник «Лабораторний практикум з біохімії» є другим розширеним і доповненим виданням до якого включено теоретичний матеріал та лабораторно-практичні роботи, що стосуються головних тем статичної і динамічної біохімії, передбачених навчальною програмою. Особливістю структури посібника є те, що крім запропонованих для виконання лабораторних робіт, він містить запитання для самоконтролю знань, тестові завдання та вправи. Це забезпечить розвиток творчого мислення та раціонального підходу до розуміння питань, що стосуються складу, будови і властивостей сполук, які є основою структури та обміну речовин у живих організмах. Окрім того, до посібника включено методичні рекомендації та теоретичні питання, необхідні для опрацювання і засвоєння окремих тем, винесених на самостійне вивчення. Лабораторні роботи по кожній окремій темі підбрано з таким розрахунком, щоб була можливість компонувати і виконувати їх залежно від наявності в лабораторії відповідних реактивів та обладнання.

У текстах лабораторних робіт наведено перелік реактивів і обладнання, необхідних для їх виконання, детально описано хімізм та принцип реакцій, на яких ґрунтуються методи якісного й кількісного визначення певних сполук.

Наприкінці кожної роботи наведено контрольні питання, які дають змогу студентам зробити відповідні висновки, що сприятиме формуванню у майбутніх фахівців здатності до незалежного, самостійного і глибокого аналізу вивченого матеріалу, розвитку творчого мислення та співставлення даних експерименту з теоретичними положеннями. Окремі методики по якісному та кількісному визначенню різних складових компонентів рідин і тканин організму, можуть бути використані для проведення позанавчальної та наукової роботи студентів.

Запропонована структура посібника, у значній мірі, сприятиме покращенню засвоєння студентами теоретичного матеріалу та забезпечить формування високого рівня їх професійної компетентності.

Автори

Правила роботи в біохімічній лабораторії

- До роботи в біохімічній лабораторії допускаються студенти, які пройшли медичний огляд і засвоїли правила техніки безпеки.
- Всі студенти, які працюють у лабораторії повинні мати спецодяг (халати, гумові рукавички, тощо).
- У лабораторії виконуються роботи, передбачені навчальною та робочою програмами дисципліни.
- На робочих місцях студентів мають бути посуд та реактиви, які необхідні для виконання лабораторних робіт.
- Під час роботи з посудом, реактивами та приладами студенти повинні бути досить уважними і дотримуватися методики виконання дослідів.
- Роботи, що супроводжуються виділенням летких речовин, а також досліди з речовинами, що мають подразнюючу дію, слід проводити під витяжною шафою.
- Сипкі речовини необхідно відбирати шпателем, а рідини – піпетками або дозаторами.
- Не можна пробувати реактиви на смак, проливати і розсипати їх. Насипати або наливати реактиви треба на столі (сухі на листку паперу, рідини – в лотках). Випадково розсипаний або розлитий реактив, повертати назад у посуд із реактивами забороняється.
- При використанні для дослідів будь-яких реактивів спочатку треба уважно прочитати етикетку.
- При розведенні концентрованих кислот додають кислоту у воду, а не навпаки.
- Під час нагрівання рідини у пробірках слід використовувати тримачі із зажимами, які їх фіксують. Отвори пробірок повинні бути спрямовані від себе та осіб, що працюють поруч.
- Нагрівання необхідно проводити обережно, не допускати викидів реактивів із пробірок чи інших ємкостей. У випадку потрапляння на шкіру кислоти чи лугу, їх слід нейтралізувати та промити під інтенсивним струменем води. Луги нейтралізують 1% розчином лимонної кислоти, а кислоти – 1% розчином соди. Після нейтралізації вражену ділянку слід інтенсивно промити.
- Посуд (пробірки, стакани, колби) з рідинами, нагрітими до температури кипіння, необхідно знімати з

нагрівальних приладів спеціальними тримачами, обережно, захистивши руку рушником.

- Легкозаймисті та вогнєнебезпечні речовини нагрівають на водяній бані.

- Не можна виливати в раковину залишки кислот, лугів, органічних сполук, вогнєнебезпечних рідин, а також реакційні суміші отримані після проведення дослідів. Їх необхідно зливати у спеціальні ємкості (зливні банки).

- Користуватися приладами та обладнанням, без їх попередньої перевірки, забороняється.

- При включенні приладів у електромережу слід переконатися у наявності заземлення та відсутності пошкоджень.

- Перед включенням вимірювальних приладів, необхідно ознайомитися з інструкціями по їх експлуатації.

- Центрифуги включають у присутності викладача чи лаборанта після попереднього врівноважування пробірок із досліджуваним біоматеріалом.

- Не можна залишати без нагляду включені прилади, палаючі спиртівки, електроплитки, водяні бані, газові пальники.

- При зберіганні реактивів слід дотримуватися правил їх сумісності.

- Не можна тримати вогне- та вибухонебезпечні речовини поблизу відкритого вогню і нагрівальних приладів.

- У випадку пожежі слід використовувати первинні засоби пожежогасіння (вогнегасники, протипожежний інвентар).

- Під час перерви, обов'язково провітрювати приміщення лабораторії.

- Після закінчення роботи в лабораторії необхідно вимкнути всі електроприлади, загасити спиртівки, помити хімічний посуд, прибрати робоче місце, вимкнути воду і світло.

Абревіатурні скорочення

АДФ – аденозин дифосфорна кислота
АК – амінокислота
АКТГ – адренокортикотропний гормон
АМФ – аденозин монофосфорна кислота
цАМФ – циклічна аденозин монофосфорна кислота
АсАТ – аспартатамінотрансфераза
АТФ – аденозин трифосфорна кислота
ВТМ – вірус тютюнової мозаїки
ДАФ – діоксиацетонмонофосфат
2,4-ДНФГ – 2,4-динітрофенілгідразин
ЕДТА – етилендіамінтетраацетатна кислота
ЛК – ліпоева кислота
НАД – нікотинамідаденіндинуклеотид
НАДФ – нікотинаміддинуклеотид фосфат
ПВК – піровиноградна кислота
pI – ізоелектрична точка
 pK_{α} – негативний логарифм констант іонізації функціональних груп амінокислот
Rf – коефіцієнт розподілу амінокислот
ТДФ – тіаміндифосфат
ТМФ – тіамінмонофосфат
ТХА – трихлорацетатна кислота
УДФГК – уридиндифосфоглюкуронова кислота
УДФ-глюкоза – уридиндифосфоглюкоза
УТФ – уридин трифосфатна кислота
УХ – убіхінон
ФАД – флавінаденіндинуклеотид
ФАФС – 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфат
ФГА – фосфогліцериновий альдегід
ФЕК – фотоелектроколориметр
ФМН – флавінаденінмононуклеотид
Фн – неорганічний фосфат
ЦПХ – цитилпіридиній хлорид
ЦТК – цикл трикарбонових кислот
ЦТФ – цитидин трифосфатна кислота
ЩОК – щавлево-оцтова кислота

Список рекомендованої літератури

Основна

1. Боєчко Ф.Ф. Біологічна хімія / Ф.Ф. Боєчко. – К. : Вища школа, 1995. – 536 с.
2. Гонський Я.І. Біохімія людини : Підручник для студентів вищ. мед. навч. закладів III-IV рівнів акредитації / Я.І. Гонський, Т.Б. Максимчук. – Тернопіль : Укрмедкнига, 2001. – 735 с.
3. Губський Ю.І. Біохімія : Підручник / Ю.І. Губський. – Київ-Тернопіль : Укрмедкнига, 2000. – 508 с.
4. Кучеренко М.Є. Біохімія : підручник / М.Є. Кучеренко, Ю.Д. Бабенюк, О.М. Васильєв та ін. – К. : ВПЦ “Київ. ун-т”, 2002. – 480 с.
5. Филиппович Ю.Б. Основы биохимии : учебник / Ю.Б. Филиппович. – М. : Изд-во “Агар”, 1999. – 512 с.

Додаткова

1. Андрейчин М.А. Рациональная витаминo-профилактика и витаминотерапия / М.А. Андрейчин, Ю.Г. Антипкин, Г.Л. Апанасенко и др.; за ред. Г.В. Донченко, А.П. Викторова, О.В. Курченко. – К. : Здоров'я, 2008. – 408 с.
2. Біохімія ензимів. Ензимодіагностика. Ензимопатологія. Ензимотерапія / О. Склярoв, Я. Сольські та ін. – Львів, 2008. – 218 с.
3. Боєчко Л.О. Основи біохімії вітамінів і гормонів / Л.О. Боєчко. – Черкаси : Вид-во ЧНУ, 2005. – 294 с.
4. Боєчко Ф.Ф. Біохімічні методи дослідження : Лабораторний практикум / Ф.Ф. Боєчко, Л.О. Боєчко, Н.В. Чепчуренко, І.В. Шмиголь. – Черкаси : Вид-во ЧНУ, 2005. – 314 с.
5. Бойків Д.П. Клінічна біохімія / Д.П. Бойків, Т.І. Бондарчук, О.Л. Іванків; за ред. О.Я. Склярoва. – К.: Медицина, 2006. – 430 с.
6. Биохимия / под ред. Е.С. Северина, А.Я. Николаева. – М. : ГЭОТАР-МЕД, 2002. – 448 с.
7. Горбачев В.В. Витамины, микро- и макроэлементы / В.В. Горбачев, В.Н. Горбачева. – Минск, 2002. – 544 с.
8. Зайчик А.Ш. Основы патобиохимии / А.Ш. Зайчик, Л.П. Чурилов – СПб. : ЭЛБИ-СПб, 2001. – 688 с.
9. Кучеренко М.Є. Сучасні методи біохімічних досліджень : Учбовий посібник / М.Є. Кучеренко, Ю.Д. Бабенюк, В.М. Войціцький – К. : Фітосоціоцентр, 2001. – 424 с.
10. Практикум з біологічної хімії / За ред. О.Я. Склярoва. – К. : Здоров'я, 2002. – 298 с.

РОЗДІЛ 1

СТАТИЧНА БІОХІМІЯ

ЛАБОРАТОРНО-ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №1

ТЕМА: ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ БІЛКІВ ТА АМІНОКИСЛОТ

Опрацювати теоретичний матеріал, використовуючи літературу

Основна: [1, с. 105-118]; [2, с. 103-105]; [3, с. 78-80]; [4, с. 19-25, 33-35]; [5, с. 158-20, 35-45].

Додаткова: [4]; [5]; [6]; [8-10].

Методичні вказівки

1. При опрацюванні теоретичного матеріалу звернути увагу на питання, що стосуються: класифікації амінокислот; особливостей фізико-хімічних властивостей білків як високомолекулярних сполук; кислотно-основних властивостей білків та їх здатності до осадження.
2. Засвоїти будову протеїногенних амінокислот та хімізм кольорових реакцій, характерних для радикалів амінокислот.
3. З'ясувати різницю між осадженням та денатурацією білків. Прослідкувати за особливостями осадження білків при різних значеннях рН.
4. При виконанні практичних робіт дотримуватись правил техніки безпеки.
5. Оформити роботи, пояснити результати, записати висновки і виконати завдання для самоконтролю знань.

Теоретичні питання

1. Елементний склад білків. Білки – матеріальні субстрати життя. Функції білків в організмі.
2. Амінокислотний склад білків. Характеристика амінокислот як амфолітів.
3. Будова амінокислот, поняття про радикали.
4. Кисотно-основні властивості амінокислот, ізоелектрична точка.
5. Константи іонізації функціональних груп амінокислот ($pK\alpha_1$ і $pK\alpha_2$), їх значення.
6. Ізомерія амінокислот. Структурна ізомерія. Стереοізомерія. Енантіомери і діастереοізомери. Особливості алло-форм АК.
7. Фізико-хімічні властивості амінокислот.

8. Номенклатура амінокислот. Повні та скорочені назви (одно- та трьохлітерні).
9. Принципи та критерії класифікації амінокислот.
10. Фізико-хімічні властивості білків. Білки як амфотерні поліелектроліти.
11. Поняття про ізоелектричну точку білків.
12. Кольорові реакції на білки та амінокислоти.
13. Реакції осадження білків, фактори, що впливають на стабілізацію білків в розчинах.
14. Поняття про денатурацію та ренатурацію білків.
15. Осмотичні і колоїдні властивості білків. Ефект Тіндалля.
16. Розчинність білків.
17. Висолювання та засолювання.
18. Зворотні та незворотні реакції осадження білків.

Тестові завдання

1. **Що являють собою білки:**
 - А. Органічні високомолекулярні сполуки, які побудовані із залишків карбонових кислот;
 - Б. Органічні високомолекулярні сполуки, які побудовані із залишків амінокислот;
 - В. Органічні високомолекулярні сполуки, які побудовані із залишків оксикислот;
 - Г. Органічні високомолекулярні сполуки, які побудовані із залишків кетокислот.
2. **Похідними якого класу сполук є амінокислоти:**
 - А. Карбонових кислот; Б. Амінів; В. Вуглеводів; Г. Спиртів.
3. **До складу якої амінокислоти входить гідроксильна група:**
 - А. Аланіну; Б. Цистеїну; В. Лізину; Г. Серину.
4. **Яка амінокислота має дисульфідний зв'язок:**
 - А. Аланін; Б. Серин; В. Цистин; Г. Цистеїн.
5. **Які амінокислоти мають дві карбоксильні групи:**
 - А. Лізин, аланін; Б. Ізолейцин, валін; В. Аспарагінова кислота, глутамінова кислота; Г. Фенілаланін, цистин.
6. **Які амінокислоти мають дві аміногрупи:**
 - А. Лізин, аргінін; Б. Лейцин, тирозин; В. Гістидин, валін; Г. Триптофан, гліцин.
7. **Вкажіть за допомогою якого хімічного зв'язку сполучаються амінокислоти, при утворенні первинної структури білка:**
 - А. Водневого; Б. Йонного; В. Пептидного;

Г. Дисульфідного.

8. За участю яких функціональних груп амінокислот утворюється пептидний зв'язок:

А. Груп $-\text{COOH}$ і $-\text{OH}$; Б. Груп $-\text{OH}$ і $-\text{NH}_2$;
В. Груп $-\text{SH}$ і $-\text{COOH}$; Г. Груп $-\text{COOH}$ і $-\text{NH}_2$.

9. Вкажіть на властивості, характерні для білків:

А. Висока молекулярна маса, термолабільність;
Б. Здатність розчинятися в органічних розчинниках, термостабільність;
В. Низька молекулярна маса, погано розчиняються у воді;
Г. Проходять через напівпроникні мембрани, не осаджуються солями важких металів.

10. Від чого залежить ступінь іонізації функціональних груп білкової молекули:

А. Від кількості функціональних груп;
Б. Від значення рН середовища;
В. Від наявності карбоксильних груп;
Г. Від наявності аміногруп.

11. Ізоелектрична точка білків – це значення рН, при якому:

А. Молекула білка набуває позитивного заряду;
Б. Білок є електронейтральним;
В. Молекула білка набуває негативного заряду;
Г. Розчинність білка найбільша.

12. Висолювання – це зворотне осадження білків з розчину під дією:

А. Солей важких металів;
Б. Концентрованих мінеральних кислот;
В. Насичених та напівнасичених розчинів солей лужних і лужноземельних металів;
Г. Органічних кислот.

13. Засолювання білків це:

А. Осадження під дією солей;
Б. Зниження розчинності під дією високих концентрацій солей важких металів;
В. Підвищення розчинності під дією низьких концентрацій нейтральних солей;
Г. Осадження під дією органічних кислот.

14. Вкажіть назву процесу, який зумовлює зміну структури та втрату властивостей білкової молекули:

А. Конденсація; Б. Ренатурація;
В. Денатурація; Г. Седиментація.

15. Що таке прості білки:

- А. Білки, які побудовані із залишків амінокислот і вуглеводів;
- Б. Білки, які побудовані лише із залишків амінокислот;
- В. Білки, які побудовані із залишків амінокислот і фосфорної кислоти;
- Г. Білки, що містять у своєму складі йони металів.

Вправи

1. Записати формули протейногенних амінокислот.
2. Записати в вигляді цвіттер іонів такі амінокислоти: А, V, Т, С.
3. Записати *D*- і *L*-форми амінокислот: А, V, S, М, F, Y. Записати формули незамінних амінокислот, зірочкою вказати асиметричний атом карбону.
4. Використовуючи табличні дані про значення констант іонізації функціональних груп, вказати сумарний заряд (–, 0, +) для гліцину, аспарагінової кислоти та гістидину при рН...1,0; 2,1; 4,0; 10 (див. додаток 1).
5. Суміш гліцину, аланіну, глутамінової кислоти, лізину і аргініну розділяли методом електрофорезу при рН...6,0. Які амінокислоти рухались до аноду чи до катоду, а які залишилися на старті?
6. Для більшості білків значення *pI* лежить у межах 4,5–6,5, який висновок можна зробити відносно їх амінокислотного складу.
7. Визначити *pI* амінокислот: гліцину, аланіну, серину, треоніну, користуючись значеннями $pK\alpha_1$ і $pK\alpha_2$.
8. Які амінокислоти (кислі, основні чи нейтральні) переважають у складі пептиду, якщо його ізоелектрична точка лежить у слабкокислому середовищі?
9. Записати структурні формули:
 - протейногенних амінокислот, які в розчині мають:
 - а) кислу реакцію; б) лужну реакцію.
 - протейногенних амінокислот, радикали яких містять:
 - а) сульфур; б) гетероцикл; в) гідроксигрупу;
 - оптичних ізомерів аланіну, валіну, ізолейцину, триптофану.
10. Записати хімізм реакцій, характерних для радикалів незамінних амінокислот.

ДОСЛІДЖЕННЯ ВЛАСТИВОСТЕЙ БІЛКІВ ТА АМІНОКИСЛОТ

1. ВЛАСТИВОСТІ АМІНОКИСЛОТ

РОБОТА № 1 РОЗЧИННІСТЬ АМІНОКИСЛОТ

Матеріал для дослідження: набір амінокислот.

Реактиви: етиловий спирт, ацетон, дистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, спиртівка.

Хід роботи

У три пробірки внести по кілька кристалів однієї з протеїногенних амінокислот. У першу додати 2 мл води, у другу – 2 мл етилового спирту, у третю – 2 мл ацетону. Порівняти розчинність амінокислоти у різних розчинниках. Пробірки з розчинами амінокислот нагріти на спиртівці. Зробити висновок про зміну розчинності амінокислот при різній температурі.

Результати оформити в вигляді таблиці.

Аміно-кислота	Хім. формула	Розчинність			Колір	Запах	Агрегат-ний стан
		вода	спирт	ацетон			

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Яка залежність існує між будовою і властивостями радикалів амінокислот та їх розчинністю?
2. Як залежить розчинність амінокислот від полярності розчинника?
3. Яка особливість розчинності циклічних амінокислот?

РОБОТА № 2 РЕАКЦІЇ АМІНОКИСЛОТ У ВОДНИХ РОЗЧИНАХ

Матеріал для дослідження: 1% розчин аланіну, 1% розчин глутамінової кислоти, 1% розчин лізину.

Реактиви: 1% розчин фенолфталеїну.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки.

Хід роботи

В три пробірки внести по 5 крапель 1% розчину амінокислот (А, Е, К). В кожен пробірку додати по кілька крапель фенолфталеїну. Спостерігати за розвитком забарвлення. Записати

рівняння реакцій, які дають уяву про іонізацію функціональних груп амінокислот у водних розчинах при різних значеннях рН.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Який заряд має глутамінова кислота в лужному, нейтральному і кислому середовищі? Відповідь пояснити.
2. Пояснити властивості лізину в лужному, нейтральному і кислому середовищі?
3. Визначити ізоелектричну точку та шкалу зарядів досліджуваних амінокислот.

РОБОТА № 3

ВИВЧЕННЯ АМФОТЕРНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ L-АЛАНІНУ

Матеріал для дослідження: 1% розчин аланіну.

Реактиви: 0,1% розчин хлоридної кислоти, підфарбований індикатором Конго в синій колір (кисле середовище), 0,1% розчин натрій гідроксиду, підфарбований фенолфталеїном у рожевий колір (лужне середовище).

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, піпетки.

Хід роботи

У дві пробірки внести по 0,5 мл 1% розчину аланіну. В одну з них при перемішуванні додати по краплях 0,1% розчин хлоридної кислоти в присутності індикатора Конго, до зміни забарвлення. В іншу – внести по краплях 0,1% розчин натрій гідроксиду в присутності фенолфталеїну, до зникнення забарвлення.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

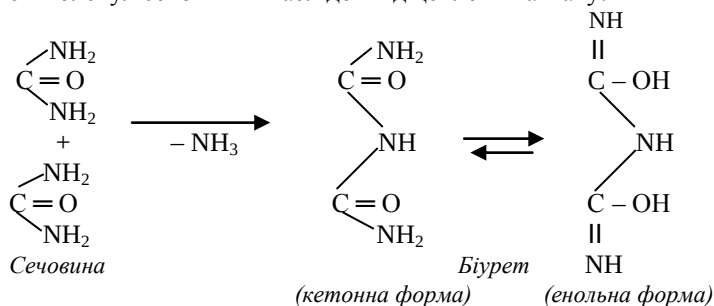
1. Чим зумовлені амфотерні властивості аланіну?
2. Які властивості виявляє аланін в кислому середовищі? Записати хімізм реакції.
3. Які властивості виявляє аланін у лужному середовищі? Записати хімізм реакції.
4. Визначити pI аланіну при різних значеннях рН.

2. КОЛЬОРОВІ РЕАКЦІЇ НА БІЛКИ ТА АМІНОКИСЛОТИ

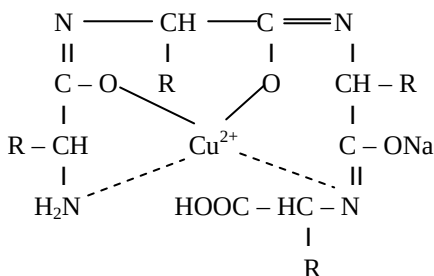
РОБОТА № 1 БІУРЕТОВА РЕАКЦІЯ (реакція Піотровського)

Принцип реакції. Біуретова реакція зумовлена наявністю в молекулах білків пептидних зв'язків.

Уперше цю реакцію було досліджено О.Я. Данилевським з похідним сечовини – біуретом. Біурет утворюється при взаємодії двох молекул сечовини внаслідок відщеплення аміаку:



Біуретова реакція на наявність пептидних зв'язків в молекулах білків ґрунтується на утворенні хелатного комплексу купрум-(2+)-іонів з функціональними групами пептидних зв'язків:



Матеріал для дослідження: 1% білковий розчин, 1% розчин желатини, 0,01% розчин гліцину.

Реактиви: біуретовий реактив.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр.

Хід роботи

В три пробірки внести: в першу 1 мл білкового розчину, у другу – 1 мл 1% розчину желатини, у третю – 1 мл 0,01% розчину гліцину. В кожну пробірку додати по 1 мл біуретового реактиву і перемішати. Порівняти забарвлення розчинів у пробірках.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

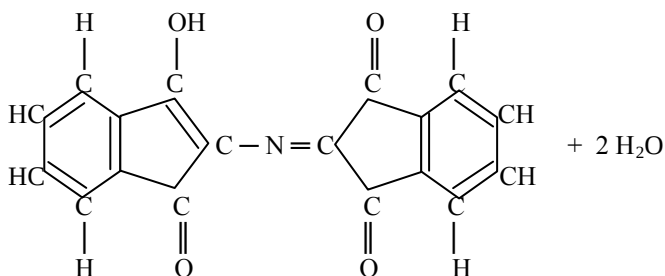
Дати відповіді на запитання

1. До якої групи якісних реакції слід віднести біуретову реакцію?
2. Чим зумовлена біуретова реакція в білках і пептидах?
3. Пояснити принцип біуретової реакції.
4. Записати хімізм утворення біуретового комплексу з біуретом і білком.

РОБОТА № 2 НІНГІДРИНОВА РЕАКЦІЯ

Принцип реакції. Білки, поліпептиди і вільні α -амінокислоти дають з нінгідрином синє або фіолетове забарвлення. Нінгідринова реакція виявляє в складі білків та амінокислот аміногрупу в α -положенні. Вона ґрунтується на окисно-відновних властивостях нінгідрину. Внаслідок окиснювального дезамінування і декарбоксилування від амінокислоти відщеплюється аміногрупа з утворенням аміаку, виділенням карбон (IV) оксиду та утворенням альдегіду, нінгідрин за цих умов відновлюється.

Відновлений нінгідрин, конденсується з аміаком і окисненою формою нінгідрину та утворює комплексну сполуку синьо-фіолетового кольору:



Ця реакція не є специфічною лише для амінокислот, оскільки її дають деякі аміни і амід.

Обережно: нінгідрин токсичний, тому слід уникати потрапляння його на шкіру і слизові оболонки.

Матеріал для дослідження: 1% білковий розчин, 1% розчин желатини, 0,01% розчин гліцину.

Реактиви: 0,5% ацетоновий розчин нінгідрину.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, піпетки, спиртівка.

Хід роботи

В пробірки внести: в першу 1 мл 1% білкового розчину, у другу – 1 мл 1% розчину желатини, у третю – 1 мл 0,01% розчину гліцину. В кожну пробірку додати по 5-10 крапель 0,5% ацетонового розчину нінгідрину і нагріти до кипіння. Порівняти швидкість утворення забарвлення у кожній з пробірок.

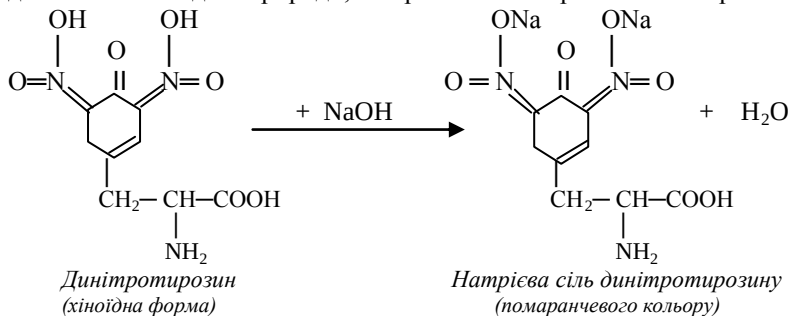
Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. До якої групи якісних реакцій слід віднести нінгідринову реакцію?
2. Що відкриває нінгідринова реакція у складі амінокислот і білків?
3. Який механізм нінгідринової реакції?
4. Пояснити причину різниці забарвлення в різних пробірках при проведенні кольорової реакції з нінгідрином.

РОБОТА № 3 КСАНТОПРОТЕЇНОВА РЕАКЦІЯ (реакція Мюльдера)

Принцип реакції. При нітруванні бензольного циклу ароматичних амінокислот концентрованою нітратною кислотою відбувається утворення нітросполук жовтого кольору, які за присутності лугу дають солі хіноїдної природи, забарвлені в помаранчевий колір.



Матеріал для дослідження: 1% білковий розчин, 1% розчин желатини, 0,01% розчин гліцину, 0,1% розчин фенолу.

Реактиви: 10% розчин натрій гідроксиду, концентрована нітратна кислота.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, спиртівка.

Хід роботи

В чотири пробірки внести: в першу 1 мл 1% білкового розчину, у другу – 1 мл 1% розчину желатини, у третю – 1 мл 0,01% розчину гліцину, в четверту – 1 мл 0,1% розчину фенолу. В кожную пробірку додати по 1 мл концентрованої нітратної кислоти і обережно нагріти на спиртівці. Спостерігати за розвитком забарвлення. Після охолодження в кожную пробірку додати по 1 мл 10% розчину натрій гідроксиду. Порівняти забарвлення розчинів у пробірках.

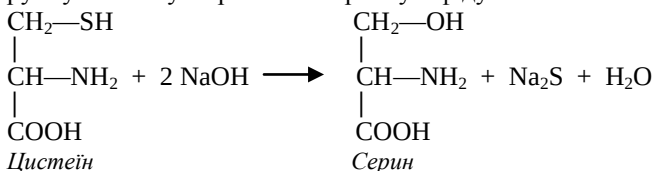
Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

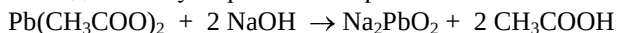
1. До якої групи кольорових реакцій слід віднести ксантопротеїнову реакцію?
2. На чому ґрунтується ксантопротеїнова реакція?
3. Пояснити причину різниці забарвлення в різних пробірках при проведенні ксантопротеїнової реакції.

РОБОТА № 4 РЕАКЦІЯ ФОЛЯ

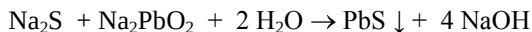
Принцип реакції. При нагріванні розчину білка з плюмбум ацетатом в присутності лугу, спостерігається буре або чорне забарвлення. Реакція зумовлена наявністю в білках амінокислот, що містять сульфур: цистину і цистеїну, які під впливом лугу руйнуються з утворенням натрій сульфїду:



Натрій сульфїд легко виявити за реакцією плюмбум ацетату з лугом, внаслідок чого утворюється натрій плюмбіт:



При взаємодії натрій сульфїду з натрій плюмбітом утворюється плюмбум сульфїд (осад чорного кольору):



Матеріал для дослідження: 1% білковий розчин, 1% розчин желатини, 0,01% розчин цистеїну.

Реактиви: 30% розчин натрій гідроксиду, 5% розчин плюмбум ацетату.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, спиртівка.

Хід роботи

В три пробірки внести: в першу 1 мл 1% білкового розчину, у другу – 1 мл 1% розчину желатини, у третю – 1 мл 0,01% розчину цистеїну. В кожну пробірку додати по 1 мл 30% розчину натрій гідроксиду, 1 мл 5% розчину плюмбум ацетату і нагріти на спиртівці. Порівняти забарвлення розчинів у пробірках.

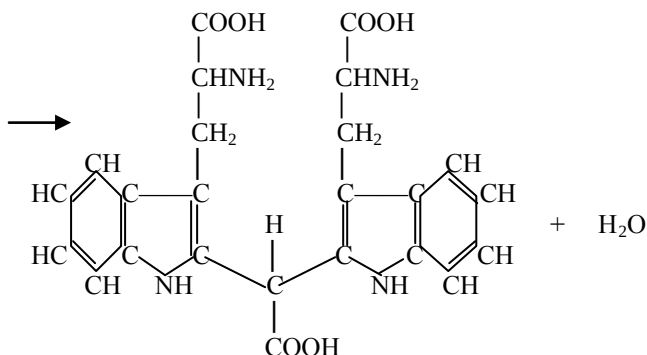
Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. До якої групи кольорових реакцій слід віднести реакцію Фоля?
2. Пояснити принцип реакції, записати хімізм.
3. Записати формули сульфурвмісних амінокислот.
4. Які амінокислоти у складі білків можна виявити за допомогою реакції Фоля?
5. Чому розчин желатини не дає позитивної реакції Фоля?

РОБОТА № 5 РЕАКЦІЯ АДАМКЕВИЧА

Принцип реакції. Триптофан у кислому середовищі взаємодіє з гліоксалевою кислотою, яка в невеликій кількості міститься в концентрованій ацетатній кислоті. Продукт конденсації, що утворюється за цих умов, забарвлений в червоно-фіолетовий колір.



Матеріал для дослідження: 1% білковий розчин, 1% розчин желатини, 0,01% розчин триптофану.

Реактиви: концентрована ацетатна кислота, концентрована сульфатна кислота.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, піпетки, спиртівка.

Хід роботи

В три пробірки внести: в першу 1 мл 1% білкового розчину, у другу – 1 мл 1% розчину желатини, у третю – 1 мл 0,01% розчин триптофану. В кожну пробірку додати по 0,5 мл концентрованої ацетатної кислоти і нагріти до розчинення осаду. Пробірки охолодити та обережно по стінці пробірок, додати по 1 мл концентрованої сульфатної кислоти. Спостерігати за появою забарвленого кільця на межі поділу фаз. Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. До якої групи кольорових реакцій слід віднести реакцію Адамкевича?
2. Пояснити принцип реакції та записати хімізм реакції Адамкевича.
3. Які принципи номенклатури і класифікації амінокислоти триптофану?

3. ВЛАСТИВОСТІ БІЛКІВ

а. Колоїдні властивості.

Білки, як гідрофільні високомолекулярні сполуки, при розчиненні в воді утворюють розчини, які мають колоїдні властивості, оскільки розміри їх молекул наближаються до розмірів міцел. Колоїдні властивості розчинів білків можна вивчати на прикладі ефекту Тіндаля та здатності білків до утворення гелів.

РОБОТА № 1 ЕФЕКТ ТІНДАЛЯ

Матеріал для дослідження: 1% розчин яєчного білка, 1% розчин желатини.

Реактиви: 1% розчин натрій хлориду, дистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, прилад для демонстрації ефекту Тіндаля.

Хід роботи

В чотири пробірки внести: в першу 5 мл води, у другу – 5 мл 1% розчину натрій хлориду, у третю – 5 мл 1% розчину желатини, в четверту – 5 мл 1% розчину яєчного білка. Всі розчини проглянути на приладі для демонстрації ефекту Тіндаля на відстані 20 см від джерела світла.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Чим зумовлені колоїдні властивості білків?
2. Пояснити причину ефекту Тіндаля. Про що він свідчить?
3. Чим колоїдні розчини відрізняються від істинних?

РОБОТА № 2 УТВОРЕННЯ ГЕЛЮ

Матеріал для дослідження: желатина.

Реактиви: дистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, скляні палички, водяна і крижана бані, терези з набором різноважок.

Хід роботи

У пробірку внести 0,5 г желатини, додати 4 мл підігрітої води і залишити на 20 хв. періодично помішуючи за допомогою скляної палички. Вміст пробірки нагріти до повного розчинення желатини, після чого пробірку поставити на крижану баню.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Чому білки здатні утворювати гелі?
2. Що таке синерезис?
3. Чим зумовлені властивості гелю?

6. Розчинність білків.

Розчинність білків є важливою їх характеристикою, яка у значній мірі залежить від амінокислотного складу, молекулярної маси, властивостей радикалів, температури, розчинників та інших факторів.

Переважає більшість білків, подібно до гідрофільних колоїдів, за певних умов легко розчиняються в воді, водно-солевих розчинах та в розчинах деяких полярних розчинників (спирт та ін.).

При розчиненні білка в воді навколо іонізованих і полярних груп молекул білка ($-\text{OH}$, $-\text{NH}_3^+$, $-\text{COO}^-$ та ін.) утворюються гідратні оболонки, які складаються з орієнтованих у просторі диполів води. Гідратація молекул білків є важливим фактором стабілізації їх розчинів.

Підвищення розчинності білків за присутності низьких концентрацій нейтральних солей має назву *засолювання*, або *сольового розчинення*.

При додаванні до білків розчинів нейтральних солей високої концентрації білки випадають в осад, тобто за цих умов відбувається зменшення їх розчинності (*висолювання*).

РОБОТА № 1

ДОСЛІДЖЕННЯ РОЗЧИННОСТІ ЯЄЧНОГО БІЛКА ТА КЕРАТИНУ

Матеріал для дослідження: яєчний білок, кератин.

Реактиви: 5% розчин натрій хлориду, 30% розчин амоній сульфату, дистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, піпетки, терези з набором різноважок.

Хід роботи

У пробірку внести 0,5 мл нерозбавленого яєчного білка, 2 мл води і перемішати. Спостерігати ефект осадження.

У дві пробірки внести по 0,5 мл яєчного білка. В одну додати 2 мл 5% розчину натрій хлориду, у другу – 2 мл 30% розчину амоній сульфату. Спостерігати за змінами у пробірках.

У дві інші пробірки внести по 0,5 г кератину. В одну з них додати 2 мл води, а у другу – 2 мл 5% розчину натрій хлориду.

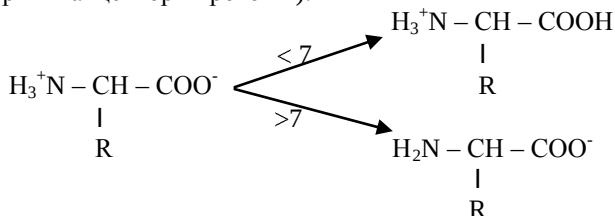
Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Чим зумовлена гетерогенність яєчного білка?
2. Який компонент яєчного білка розчиняється у воді, а який випадає в осад?
3. Чому при додаванні 5% розчину натрій хлориду осад у пробірці розчиняється?
4. Яку назву має процес підвищення розчинності білків при додаванні низьких концентрацій нейтральних солей?
5. Пояснити різницю між засолюванням і висолюванням.

в. Кислотно-основні властивості білків.

Білки, як і амінокислоти, є амфолітами. Радикали амінокислот, які входять до складу молекул білків, залежно від значення рН, можуть набувати позитивного чи негативного заряду і, відповідно, по-різному поводити себе у кислому і лужному середовищі (як донори чи акцептори протонів):



Значення рН середовища, при якому загальний заряд молекули білка дорівнює нулю (містить однакову кількість позитивно і негативно заряджених груп), має назву **ізоелектричної точки** (див. додаток 2). Розчин білків у ізоелектричній точці не має заряду, тому він нестійкий і легко випадає в осад.

РОБОТА №1 ВИЗНАЧЕННЯ ІЗОЕЛЕКТРИЧНОЇ ТОЧКИ КАЗЕЇНУ

Матеріал для дослідження: 0,4% розчин казеїну в 0,2 М розчині натрій ацетату.

Реактиви: 0,2 М розчин ацетатної кислоти, дистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки на 1 і 2 мл.

Хід роботи

У шість пронумерованих пробірок внести 0,2 М розчин ацетатної кислоти та дистильовану воду в кількостях, вказаних у таблиці, і по 0,2 мл 0,4% розчину казеїну в 0,2 М розчині натрій ацетату.

Номер пробірки	Об'єм 0,2М р-ну CH ₃ COOH	Об'єм H ₂ O, мл	Об'єм 0,4% р-ну казеїну, мл	рН суміші	Ефект осадження
1.	1,6	0,4	0,2	3,8	
2.	0,8	1,2	0,2	4,1	
3.	0,4	1,6	0,2	4,4	
4.	0,2	1,8	0,2	4,7	
5.	0,1	1,9	0,2	5,0	
6.	0,06	1,94	0,2	5,3	

Вміст пробірок ретельно перемішати і спостерігати за ефектом осадження. Після відстоювання протягом 5-10 хв. відмити пробірку, в якій ефект осадження виражений найбільше.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Яка залежність існує між розчинністю білка та його ізоелектричною точкою ?
2. Чому ізоелектрична точка є індивідуальною характеристикою кожного білка?
3. Чому в ізоелектричній точці розчини білків нестійкі?
4. Визначити ізоелектричну точку кислого, лужного і нейтрального білка.

г. Реакції осадження білків.

Осадження білків може бути зворотним та незворотнім. До реакцій зворотного осадження можна віднести висолювання білків, а також осадження водовіднімаючими агентами – органічними розчинниками (спиртом, ацетоном) при низькій температурі.

Незворотне осадження білків відбувається під впливом високої температури, солей важких металів, концентрованих кислот, лугів, реактивів на алкалоїди та інших факторів і має назву *денатурації*.

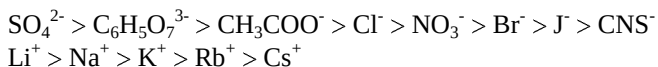
Зворотна денатурація – це втрата білками вищих рівнів структурної організації.

При незворотній денатурації руйнуються як вищі рівні структурної організації, так і первинна структура.

РОБОТА № 1 ОСАДЖЕННЯ БІЛКІВ НЕЙТРАЛЬНИМИ СОЛЯМИ (ВИСОЛЮВАННЯ)

Висолювання – це зниження розчинності білків при додаванні концентрованих розчинів нейтральних солей лужних і лужноземельних металів, наслідок конкуренції за розчинник йонів солі та функціональних груп білкових молекул. За цих умов йони солі зв'язують велику кількість води, а тієї, що залишилась, не вистачає для розчинення білка. Осадження білків при висолюванні має зворотний характер.

Найчастіше для висолювання використовують Na_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl , MgSO_4 . Висолююча здатність йонів солей (катіонів та аніонів) різна і визначається локалізацією їх в рядах Гофмейстера:



Матеріал для дослідження: яєчний білок або сироватка крові.

Реактиви: насичений розчин амоній сульфату, амоній сульфат кристалічний, натрій хлорид кристалічний, магній сульфат кристалічний, 1% розчин ацетатної кислоти, етиловий спирт, біуретовий реактив.

Обладнання: штатив з пробірками, лійки, фільтри, піпетки, мірний циліндр.

ВИСОЛЮВАННЯ БІЛКІВ АМОНІЙ СУЛЬФАТОМ

Хід роботи

В три пробірки внести: в першу 1 мл білка і 1 мл біуретового реактиву. Спостерігати за розвитком забарвлення. У другу пробірку внести 3 мл яєчного білка та додати рівний об'єм насиченого розчину амоній сульфату, перемішати. Через 5 хв. вміст пробірки профільтрувати. З частиною фільтрату провести біуретову реакцію. До решти фільтрату додати кристалічний амоній сульфат до повного насичення і відфільтрувати. До фільтрату додати 1 мл біуретового реактиву, порівняти забарвлення з розчином у першій пробірці.

У третю пробірку внести 2 мл яєчного білка та додати рівний об'єм насиченого розчину амоній сульфату і перемішати. До розчину з осадом білка додати рівний об'єм дистильованої води, добре перемішати.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Що таке висолювання? Чим зумовлений цей ефект?
2. Які фракції яєчного білка можна розділити методом висолювання?
3. Який білок випадає в осад при 50% насиченні розчину білків амоній сульфатом?
4. Які білки осаджуються при повному насиченні розчину білків амоній сульфатом?
5. До якого виду реакцій осадження (зворотних чи незворотних) можна віднести висолювання?

РОБОТА № 2

ОСАДЖЕННЯ БІЛКІВ ОРГАНІЧНИМИ РОЗЧИННИКАМИ

Принцип реакції. Дія органічних розчинників ґрунтується на зв'язуванні молекул води і дегідратації білкових молекул, а також зниженні діелектричної сталої водних розчинів та ступеня іонізації молекул білків, внаслідок чого знижується їх стійкість у розчинах. При додаванні води осаджений білок може бути знову переведений у розчин, тобто властивості його не змінюються.

Матеріал для дослідження: 1% розчин яєчного білка.

Реактиви: етиловий спирт, ацетон, дистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки на 1 мл.

Хід роботи

У дві пробірки внести по 1 мл білкового розчину. В першу додати 0,5 мл етилового спирту, у другу – 0,5 мл ацетону і перемішати. До утвореного осаду додати воду.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Яке явище спостерігається при додаванні до розчину білка ацетону чи спирту?
2. Пояснити механізм осадження білків органічними розчинниками?
3. Який ефект спостерігається при додаванні води?
4. На чому ґрунтується осаджуюча дія органічних розчинників?

РОБОТА № 3

ОСАДЖЕННЯ БІЛКІВ ОРГАНІЧНИМИ КИСЛОТАМИ

Принцип реакції. Механізм осадження білків органічними кислотами ґрунтується на зміні ступеня іонізації молекул білка внаслідок дегідратації білкової молекули та знятті електричного заряду.

Матеріал для дослідження: 1% розчин яєчного білка.

Реактиви: 10% розчин ТХА, 5% розчин сульфосаліцилової кислоти.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, піпетки.

Хід роботи

У дві пробірки внести по 1 мл білкового розчину. В першу додати 5 крапель 10% розчину ТХА, у другу – 5 крапель 5% розчину сульфосаліцилової кислоти і перемішати. До утвореного осаду додати воду.

Пояснити результати дослідів та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Яка різниця в осадженні білків органічними кислотами та органічними розчинниками?
2. Пояснити механізм осадження білків органічними кислотами.
3. Яке практичне значення має осадження білків ТХА?
4. Чи втрачають білки нативні властивості при осадженні органічними кислотами?
5. Як залежить інтенсивність осадження білків від концентрації органічних кислот?

РОБОТА № 4

ОСАДЖЕННЯ БІЛКІВ МІНЕРАЛЬНИМИ КИСЛОТАМИ

Принцип реакції. Білки в присутності концентрованих мінеральних кислот (крім фосфатної) денатурують і випадують в осад не лише в результаті дегідратації та нейтралізації заряду молекул, але і внаслідок утворення хелатних комплексів, тому при додаванні води не відбувається повного поновлення гідратних оболонок та розчинення осаджених білкових молекул.

Матеріал для дослідження: 1% розчин яєчного білка.

Реактиви: концентрована хлоридна кислота, концентрована нітратна кислота, концентрована сульфатна кислота, 10% розчин хлорної кислоти, дистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки на 1 мл.

Хід роботи

У чотири пробірки внести по 1 мл білкового розчину. В першу пробірку додати 0,5 мл концентрованої хлоридної кислоти, у другу – 0,5 мл концентрованої нітратної кислоти, у третю – 0,5 мл концентрованої сульфатної кислоти і в четверту – 0,5 мл 10% розчину хлорної кислоти. Спостерігати за утворенням осадів. Потім у всі пробірки додати воду і спостерігати за змінами, які відбуваються за цих умов.

Пояснити результати дослідів та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Пояснити механізм осадження білків мінеральними кислотами.
2. Яке практичне значення має осадження білків нітратною кислотою?
3. Яка різниця осадження білків мінеральними і органічними кислотами?
4. Чи можна віднести осадження білків мінеральними кислотами до зворотних реакцій осадження?

РОБОТА № 5
ОСАДЖЕННЯ БІЛКІВ СОЛЯМИ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

Принцип реакції. Солі важких металів (купрум, ферум, плумбум, гідраргірум, аргентум, цинку) зумовлюють незворотнє осадження білків, внаслідок утворення міцних комплексних сполук.

Солі більшості важких металів призводять до денатурації білка.

Матеріал для дослідження: 1% розчин яєчного білка.

Реактиви: 5% розчин плумбум ацетату, 5% розчин купрум (II) сульфату, 3% розчин аргентум нітрату.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, піпетки.

Хід роботи

У три пробірки внести по 1 мл 1% білкового розчину. В першу додати 5 крапель 5% розчину плумбум ацетату, у другу – 5 крапель 5% розчину купрум (II) сульфату, у третю – 5 крапель 3% розчину аргентум нітрату, перемішати і спостерігати за утворенням осадів.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Який механізм осадження білків солями важких металів?
2. Яка особливість осадження білків купрум (II) сульфатом?
3. Що таке денатурація білка?
4. Які властивості характерні для денатурованих білків?
5. За яких умов можлива ренатурація (ренативація) молекули білка?

РОБОТА № 6
ОСАДЖЕННЯ БІЛКІВ ПРИ НАГРІВАННІ

Більшість білків тваринного походження при нагріванні вище 45°C денатурують. Такий ефект пояснюється тим, що під впливом високої температури зв'язки, які стабілізують структуру нативної молекули білка руйнуються, внаслідок чого повністю порушується структурна організація білкових молекул (втрата не лише вищих рівнів структурної організації, але і первинної структури). За цих умов проходить незворотна денатурація білка (деструкція).

Білки, що мають кислотні властивості, при підвищенні температури краще осаджуються у слабкокислому середовищі, а білки, які мають основні властивості – у слабколужному, що зумовлено значеннями їх ізoeлектричної точки. В сильнокислому чи сильнолужному середовищі розчини білків при нагріванні осаджуються лише при додаванні достатньої кількості будь-якої нейтральної солі. Стійкість розчинів білків за цих умов зумовлена перезарядженням білкових молекул: у кислому середовищі білок набуває позитивного заряду, а в лужному – відповідно негативного. Оскільки заряд білкової молекули є одним із факторів стабілізації їх у розчині це, відповідно, підвищує їх стійкість внаслідок дії сил електростатичного відштовхування.

Найбільш повне і швидке осадження білка при нагріванні відбувається при значеннях рН, що відповідають їх ізoeлектричній точці.

Принцип реакції. При підвищенні температури вище 40 °С проходить денатурація білків і випадання їх в осад.

Матеріал для дослідження: 1% розчин яєчного білка.

Реактиви: 1% розчин ацетатної кислоти, 10% розчин ацетатної кислоти, 10% розчин натрій гідроксиду, насичений розчин натрій хлориду.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, піпетки, спиртівка.

Хід роботи

У п'ять пробірок внести по 2 мл 1% розчину яєчного білка. Вміст першої пробірки залишити без змін. У другу пробірку додати 1 краплю 1% розчину ацетатної кислоти, у третю – 1 мл 10% розчину ацетатної кислоти, в четверту – 1 мл 10% розчину ацетатної кислоти і 3-4 краплини насиченого розчину натрій хлориду, в п'яту – 1 мл 10% розчину натрій гідроксиду. Всі

пробірки нагріти до кипіння і спостерігати за ефективністю осадження білків.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Які особливості температурного осадження білків?
2. У чому різниця між зворотним і незворотним осадженням білків під впливом температури?
3. Порівняти осадження білків при різних значеннях рН та пояснити причини явища.
4. Чому білки не осаджуються при низьких і високих значеннях рН?
5. При якому значенні рН відбувається найінтенсивніше осадження білків?
6. Чому при нагріванні скіпається молоко, яке зберігалось при кімнатній температурі?

ЛАБОРАТОРНО-ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №2

ТЕМА: ДОСЛІДЖЕННЯ СКЛАДУ І ВЛАСТИВОСТЕЙ СКЛАДНИХ БІЛКІВ

Опрацювати теоретичний матеріал, використовуючи літературу

Основна: [1, с. 118-133]; [2, с. 105-111]; [3, с. 80-94]; [5, с. 45-63].

Додаткова: [4]; [5]; [6]; [9].

Методичні вказівки

1. При опрацюванні теоретичного матеріалу звернути увагу на принципи класифікації білків, особливості будови і функцій простих та складних білків.
2. У процесі виконання практичних робіт записати хімізм і особливості кольорових реакцій, які дають змогу виявити наявність простетичних груп складних білків.
3. При виконанні практичних робіт дотримуватись правил техніки безпеки.
4. Оформити роботи, пояснити результати, записати висновки і виконати завдання для самоконтролю знань.

Теоретичні питання

1. Критерії класифікації білків. Класифікація білків за хімічним складом, формою білкових молекул, фізико-хімічними і біологічними властивостями.
2. Прості і складні білки, особливості їх будови.
3. Характеристика груп простих білків. Принципи класифікації.
4. Особливості амінокислотного складу та фізико-хімічних властивостей простих білків. Їх функції.
5. Альбуміни і глобуліни, особливості амінокислотного складу та функції.
6. Альбумін/глобуліновий коефіцієнт, значення в діагностиці захворювань.
7. Глутеліни і проламіни: склад, будова, властивості, біологічна роль.
8. Характеристика гістонів, їх значення в організмі.
9. Протеїноїди: будова, властивості, біологічна роль.
10. На основі яких критеріїв виділяють окремі групи складних білків?
11. Характеристика протеїдів.
12. Хромопротеїни: типи простетичних груп, властивості, біологічна роль.
13. Фосфопротеїни. Характеристика основних представників.
14. Ліпопротеїни і нуклеопротеїни. Типи зв'язку між білком і простетичною групою.
15. Глікопротеїни. Характеристика вуглеводного компоненту. Біологічна роль, властивості, функції.
16. Металопротеїни, їх функції в організмі (транспортна – церулоплазмін і трансферин; запасуюча – феритин та гемосидерин).

Тестові завдання

1. **Що таке складні білки?**
А. Білки, які побудовані із простого білка і небілкової частини (простетичної групи): вуглеводів, ліпідів, нуклеїнових кислот, йонів металів та ін.;
Б. Білки, що побудовані з простого білка і окремих спиртів;
В. Білки, що побудовані з простого білка і дикарбонових кислот;
Г. Білки, що побудовані з простого білка і діамінів.
2. **Класифікація простих білків базується на:**
А. Компонентному складі; Б. Особливостях структури;

- В. Функціях і властивостях; Г. Амінокислотному складі.
- 3. Глютеліни – це:**
 А. Рослинні білки; Б. Рослинні і тваринні білки;
 В. Тваринні білки; Г. Білки цитоплазми.
- 4. Гістони входять до складу:**
 А. Мембран; Б. Мітохондрій;
 В. Цитоплазми; Г. Ядерної ДНК.
- 5. Альбуміни й глобуліни відрізняються:**
 А. Будовою; Б. Властивостями;
 В. Властивостями і функціями; Г. Структурою.
- 6. Протаміни містять високий вміст:**
 А. Моноаміномонокарбонових кислот; Б. Цистеїну;
 В. Гліцину; Г. Аргініну та лізину.
- 7. Проламіни не містять у своєму складі:**
 А. Метіоніну; Б. Цистеїну; В. Тирозину; Г. Лізину.
- 8. Протеїноїди містять значну кількість:**
 А. Серину; Б. Гліцину; В. Тирозину; Г. Цистеїну.
- 9. Глікопротеїни складаються з білка та:**
 А. Цереброзидів; Б. Вуглеводних компонентів;
 В. Неорганічного фосфору; Г. Нуклеотидів.
- 10. Які прості білки входять до складу нуклеопroteїнів:**
 А. Альбуміни, глобуліни; Б. Фібриноген, колаген;
 В. Протаміни, гістони; Г. Проламіни, глютеліни.
- 11. У фосфопroteїнах залишки фосфату приєднуються до радикалів:**
 А. Цистеїну; Б. Аргініну;
 В. Серину; Г. Серину і треоніну.
- 12. Гемоглобін належить до:**
 А. Глікопротеїнів; Б. Металопroteїнів;
 В. Склеропroteїнів; Г. Хромопroteїнів.

Вправи

1. Записати фрагмент молекули казеїну, до складу якої входять незамінні амінокислоти.
2. Записати будову гемму, вказати тип зв'язку між білковою частиною і простетичною групою.
3. Записати будову цитохромів “а”, “в” та “с”.
4. Записати амінокислоти, радикали яких здатні до утворення водневого, дисульфідного, іонного й гідрофобного зв'язків.
5. Визначити молекулярну масу гемоглобіну, якщо до складу молекули входять 574 амінокислотні залишки.

6. Записати будову вуглеводних компонентів глікопротеїнів (глюкозаміну, галактозаміну, сіалових кислот, фукози).
7. Записати утворення О- та N-глікозидних зв'язків між білковою частиною і олігосахаридним ланцюгом.
8. Записати будову зв'язку між білковою частиною та простетичною групою фосфопротеїнів.
9. Записати схему утворення зв'язків у складі нуклеопротеїнів.
10. Записати будову амінокислот, які входять до складу фосфо- та нуклеопротеїнів.
11. Записати будову мінорних амінокислот, що входять до складу білків сполучної тканини.

а. Глікопротеїни.

РОБОТА № 1 ДОБУВАННЯ МУЦИНУ ІЗ СЛИНИ ТА ВИЯВЛЕННЯ В ЙОГО СКЛАДІ ВУГЛЕВОДНОГО КОМПОНЕНТУ

Матеріал для дослідження: слина.

Реактиви: концентрована ацетатна кислота, 1% спиртовий розчин α -нафтолу, концентрована сульфатна кислота.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, піпетки.

Хід роботи

У пробірку зібрати 2 мл слини і додати 10 крапель концентрованої ацетатної кислоти. Муцин випадає у вигляді осаду. Надосадову рідину обережно злити, а до осаду додати 1 мл 1% спиртового розчину α -нафтолу та перемішати. Після цього обережно, по стінці пробірки, додати 1 мл концентрованої сульфатної кислоти. На межі поділу рідин утворюється продукт конденсації фурфуролу з α -нафтолом у вигляді червоно-фіолетового кільця.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Яка будова глікопротеїнів?
2. Охарактеризувати тип зв'язку між білковою частиною і простетичною групою глікопротеїнів.
3. Яку роль виконують муцини та мукоїди?
4. Чому муцин випадає в осад при підкисленні середовища? Який висновок можна зробити про його амінокислотний склад?

РОБОТА № 2
**ВИЯВЛЕННЯ ВУГЛЕВОДНОГО КОМПОНЕНТУ В ОВОМУКОЇДІ
ЯЄЧНОГО БІЛКА**

Матеріал для дослідження: розчин яєчного білка.

Реактиви: 1% спиртовий розчин α -нафтолу, концентрована сульфатна кислота.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, спиртівка.

Хід роботи

У пробірку внести 1 мл білкового розчину, нагріти на спиртівці до ледь помітного осадження білка. Вміст пробірки охолодити, додати 1 мл 1% розчину α -нафтолу і перемішати. Після цього обережно, по стінці пробірки, додати 1 мл концентрованої сульфатної кислоти. На межі розподілу фаз утворюється червоно-фіолетове кільце.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Яку хімічну природу має овомукоїд яєчного білка?
2. Для чого проводять нагрівання білкового розчину?
3. Яке біологічне значення овомукоїду?

6. Фосфопротеїни.

РОБОТА № 1
**ВИДІЛЕННЯ КАЗЕЇНУ З МОЛОКА ТА
ДОСЛІДЖЕННЯ ЙОГО СКЛАДОВИХ КОМПОНЕНТІВ**

Принцип методу. Ізоелектрична точка казеїну відповідає рН...4,7, тому при підкисленні середовища він випадає в осад. Надлишок кислоти заважає осадженню, тому що при значеннях рН нижчих ізоелектричної точки, молекула білка перезаряджається і знову переходить у розчин.

Матеріал для дослідження: незбиране молоко.

Реактиви: концентрована ацетатна кислота, суміш Блур, 0,1% розчин натрій карбонату, 10% розчин натрій гідроксиду, біуретовий реактив, молібденовий реактив, 0,1% розчин фенолфталеїну, 10% розчин нітратної кислоти, дистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, центрифужні пробірки, піпетки, скляні палички, круглодонна колба із зворотним холодильником, водяна баня, спиртівка, центрифуга.

Хід роботи

У пробірку внести 4 мл молока, додати 4 мл води і 2 краплі концентрованої ацетатної кислоти. За цих умов казеїн випадає в осад. Вміст пробірки перенести в чисту центрифужну пробірку і відцентрифугувати при 3000 об./хв. протягом 5 хв. Центрифугат злити, а до осаду додати 2 мл суміші Блурі і добре перемішати скляною паличкою та повторно відцентрифугувати при 3000 об./хв. протягом 5 хв. Центрифугат злити і з невеликою його кількістю провести біуретову реакцію. До осаду додати 2 мл 0,1% розчину натрій карбонату, 4 мл 10% розчину натрій гідроксиду і перемішати. Вміст пробірки кількісно перенести у круглодонну колбу із зворотним холодильником і поставити на киплячу водяну баню для гідролітичного розкладу.

Через 30 хв. від початку кипіння нагрівання припинити. Колбу охолодити до кімнатної температури, після чого гідролізат перенести в мірний циліндр і додати рівний об'єм 0,1% розчину натрій карбонату. Гідролізат використати для виявлення складових компонентів казеїну.

Якісна реакція на білок.

Хід роботи

До 1 мл гідролізату додати 1 мл біуретового реактиву. Спостерігати за розвитком забарвлення.

Пояснити результати дослідження та записати висновок.

Якісна реакція на фосфатну кислоту

Хід роботи

До 1 мл гідролізату додати одну краплю фенолфталеїну і по краплях 10% розчин нітратної кислоти до нейтральної реакції. Після цього у пробірку додати 2 мл молібденового реактиву та нагріти на спиртівці. Спостерігати за розвитком забарвлення.

Пояснити результати дослідження та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Що являє собою казеїн? Яка його будова і властивості?
2. Чому осадження казеїну проводять при підкисленні молока?
3. Що являє собою простетична група фосфопротейнів?
4. Який тип зв'язку між білковою частиною і простетичною групою фосфопротейнів?

5. Пояснити біологічну роль фосфопротеїнів.

в. Хромопротеїни.

РОБОТА № 1 ЯКІСНА РЕАКЦІЯ НА ГЕМІНОВЕ УГРУПУВАННЯ ГЕМОГЛОБІНУ Бензидинова проба

Принцип реакції. Під впливом гемоглобіну бензидин окиснюється гідроген пероксидом в *n*-хінондиїмід, що дає синє забарвлення. З часом синє забарвлення змінюється на червоне:

Матеріал для дослідження: 1% розчин крові.

Реактиви: 1% свіжоприготовлений спиртовий розчин гваякової смоли, 0,2% спиртовий розчин бензидину, 3% розчин гідроген пероксиду.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки.

Хід роботи

У дві пробірки внести по 0,5 мл 1% розчину крові. В першу додати 1-2 краплі 1% спиртового розчину гваякової смоли, а у другу – 1-2 краплі 0,2% спиртового розчину бензидину. В кожную пробірку додати по 1-2 краплі 3% розчину гідроген пероксиду і спостерігати за зміною забарвлення.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Які біологічні функції гемоглобіну і міоглобіну?
2. Чим зумовлені кольорові реакції гемоглобіну з гваяковою смолою та бензидином?
3. Яке значення якісних реакцій на гем гемоглобіну?

РОБОТА № 2 ВИЯВЛЕННЯ ФЕРУМУ У СКЛАДІ ГЕМОГЛОБІНУ

Принцип реакції. Ферум, що входить до складу гемоглобіну, утворює з калій тіоціанатом за присутності хлоридної кислоти, ферум (III) тіоціанат рожевого або червоного кольору.

Матеріал для дослідження: кров.

Реактиви: концентрована нітратна кислота, 10% розчин хлоридної кислоти, 10% розчин калій тіоціанату.

Обладнання: фарфорова чашка, піпетки, електрична плитка.

Хід роботи

У фарфорову чашку внести 2 краплі крові, обережно додати 4 краплі концентрованої нітратної кислоти й випарувати на киплячій водянній бані до утворення сухого залишку, який розчинити в 1-2 краплях 10% розчину хлоридної кислоти. Далі додати 1-2 краплі 10% розчину калій тіоціанату. Спостерігати за зміною забарвлення.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Що являє собою простетична група хромопротеїнів?
2. На чому ґрунтується визначення феруму у складі гемоглобіну?
3. Який тип зв'язку між білковою частиною та гемом гемоглобіну?

ТЕОРЕТИЧНИЙ ПРАКТИКУМ №3 **ТЕМА: СТРУКТУРНА ОРГАНІЗАЦІЯ БІЛКІВ**

Опрацювати теоретичний матеріал, використовуючи літературу

Основна: [1, с. 118-133]; [2, с. 105-111]; [3, с. 80-94]; [5, с. 45-63].

Додаткова: [6]; [8]; [9]; [10].

Теоретичні питання

1. Поняття про структурну організацію білків. Сучасні уявлення про структуру білкових молекул.
2. Первинна структура білків, методи її вивчення.
3. Утворення пептидів. Особливості пептидного зв'язку. Назва пептидів. Роботи О. Данилевського та Е. Фішера.
4. Зв'язки, що стабілізують первинну структуру білкових молекул.
5. Особливості первинної структури білків. Реалізація принципів структурної подібності та взаємозамінності амінокислот у поліпептидному ланцюгу.
6. Первинна структура і видова специфічність. Особливості первинної структури інсуліну.
7. Поліморфізм первинної структури. Варіабельні та інваріантні залишки амінокислот, їх значення.
8. Вторинна структура білків. Визначення та особливості. Критерії Л. Полінга і Р. Корі

9. Зв'язки, що стабілізують вторинну структуру. Параметри α -спіралі.
10. Пошарово-складчаста структура, її особливості.
11. Зверхвторинна структура, види та особливості формування.
12. Доменний принцип організації, його зв'язок з біологічною активністю білків.
13. Третинна структура білків, методи її вивчення. Роботи **Дж. Кендрю, Д. Філіпса і П. Петрутца**.
14. Типи зв'язків, що стабілізують третинну структуру.
15. Нативна конформація, особливості. Принцип взаємоперетворення конформацій.
16. Четвертинна структура білків. Типи зв'язків, що її стабілізують. Ізологічна та гетерологічна взаємодія. Характеристика білків, які мають четвертинну структуру (аспартатамінотрансфераза, гемоглобін, ВТМ).
17. Поняття про сили слабкої взаємодії, їх значення у стабілізації різних рівнів структури білкових молекул.

Тестові завдання

1. **Що являє собою первинна структура білка:**
 - А. Певна послідовність залишків амінокислот у поліпептидному ланцюгу (ланцюгах);
 - Б. Просторова конфігурація поліпептидного ланцюга (ланцюгів);
 - В. Укладання поліпептидного ланцюга (ланцюгів) у клубки певної форми;
 - Г. Спіралізація поліпептидного ланцюга (ланцюгів).
2. **Що таке вторинна структура білка:**
 - А. Певна просторова конфігурація поліпептидного ланцюга;
 - Б. Взаємодія поліпептидних ланцюгів між собою;
 - В. Послідовність амінокислотних залишків у поліпептидному ланцюгу;
 - Г. Орієнтація амінокислот у просторі.
3. **Який із указаних методів дає можливість визначити послідовність розміщення всіх амінокислот у білковій молекулі:**
 - А. Метод Сенгера;
 - Б. Метод Едмана;
 - В. Метод Акабборі;
 - Г. Ферментативний метод.
4. **Які зв'язки стабілізують вторинну структуру білка:**
 - А. Пептидні;
 - Б. Дисульфідні;
 - В. Водневі;
 - Г. Гідрофобні.

5. **Що являє собою третинна структура білка:**
 - А. Взаємодія кількох білкових глобул між собою;
 - Б. Спіралізація поліпептидних ланцюгів;
 - В. Загальна просторова орієнтація (конформація) поліпептидних ланцюгів;
 - Г. Асоціація білкових і небілкових субодиниць.
6. **Які з указаних зв'язків стабілізують третинну структуру білка:**
 - А. Гідрофобні;
 - Б. Пептидні;
 - В. Водневі;
 - Г. Дисульфідні.
7. **Для яких білків характерна четвертинна структура:**
 - А. Які у своєму складі мають лише один протомер;
 - Б. Що складаються із двох і більшої кількості протомерів;
 - В. Які у своєму складі мають небілкову частину;
 - Г. Що побудовані з одного поліпептидного ланцюга.

Вправи

1. Яка кількість субодиниць у молекулах гемоглобіну, вірусу тютюнової мозаїки, лактатдегідрогенази?
2. Розрахувати довжину (в нм) поліпептидного ланцюга білка, який складається з 159 амінокислотних залишків і має відсоток спіралізації 40%.
3. Білковий компонент вірусу тютюнової мозаїки складається з 2130 субодиниць, молекулярна маса кожної з яких становить 17500 Да. Розрахувати загальну довжину всіх поліпептидних ланцюгів, якщо відсоток спіральної конфігурації складає 30%.
4. Вказати всі можливі види взаємодії між фрагментами поліпептидного ланцюга при стабілізації третинної структури: - Глі – Вал – Лей – Цис – Тир – Арг – Фен – Ала – Цис – Цис -. Записати однолітерні позначення амінокислот.
5. Які види взаємодії можливі між радикалами амінокислот: Глу, Тре, Гіс, Сер, Асп, Тир, Арг, Ілей, Лей, Фен, Ала.
6. Вказати можливі види взаємодії на контактних ділянках субодиниць білка, які містять залишки амінокислот Вал, Тре, Асп, Три, Лей, Арг, при формуванні четвертинної структури.
7. Визначити значення pI гліцину та аланіну, якщо значення $pK\alpha_1$ складає відповідно 2,40 і 2,34, а $pK\alpha_2$ – 9,70 і 9,68. Відповідь пояснити.
8. Визначити значення pI аспарагінової кислоти і лізину, якщо значення $pK\alpha_1$ складає відповідно 1,90 і 2,20, $pK\alpha_2$ – 9,60 і 8,96, $pK\alpha_3$ – 3,86 і 10,50.

12. Записати формули амінокислот, радикали яких при формуванні третинної структури білків забезпечують утворення водневих, іонних та гідрофобних зв'язків.
13. Записати всі можливі варіанти водневих зв'язків, які утворюються в білковій молекулі у зв'язку з наявністю в її складі залишків амінокислот, що містять ковалентно зв'язаний атом гідрогену з частковим позитивним зарядом і атом кисню, який має частковий негативний заряд.
14. Записати будову глутатіону, офтальмової кислоти, карнозину.
15. Записати *L*- і *D*-форми амінокислот: Вал, Фен, Мет, Тир, Глу, Асп.
16. Визначити сумарний заряд та значення pI в кислому, лужному та нейтральному середовищі наступних пептидів:
 - а) $H_2N - Глі - Ала - Асп - Про - OH$;
 - б) $H_2N - Глу - Три - Про - Вал - OH$;

ЛАБОРАТОРНО-ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №4 **ТЕМА: ВИВЧЕННЯ СКЛАДУ ТА ВЛАСТИВОСТЕЙ** **НУКЛЕЙНОВИХ КИСЛОТ**

Опрацювати теоретичний матеріал, використовуючи літературу

Основна: [1, с. 133-168]; [2, с. 56-82]; [3, с. 189-222]; [4, с. 41-56]; [5, с. 49-55, 91-100, 104-114].
 Додаткова: [4]; [5]; [6]; [10].

Методичні вказівки

1. При опрацюванні теоретичного матеріалу звернути увагу на компонентний склад нуклеїнових кислот (РНК і ДНК), будову азотистих основ пуринового та піримідинового ряду, нумерацію атомів у пуринових і піримідинових циклах.
2. Чітко засвоїти особливості таутомерних форм азотистих основ.
3. Звернути увагу на будову нуклеозидів, моно- та полінуклеотидів.
4. Уважно розглянути схему гідролітичного розкладу нуклеопротейнів. Звернути увагу на особливості компонентного складу рибо- та дезоксирибонуклеопротейнів.
5. При виконанні практичних робіт дотримуватись правил техніки безпеки.
6. Оформити роботи, пояснити результати, записати висновки і виконати завдання для самоконтролю знань.

Теоретичні питання

1. Відкриття нуклеїнових кислот. Роботи Ф.Мішера, Р.Альтмана.
2. Генетична роль нуклеїнових кислот. Роботи О.Евері, М.Маккартні, А.Херші, М.Чейза, Г.Рисса, А.Мирського.
3. Хімічний склад нуклеїнових кислот, виділення з біоматеріалу.
4. Складові компоненти нуклеїнових кислот.
5. Характеристика пуринових основ. Таутомерні форми. Лактим-лактамі форми. Нумерація атомів карбону в пуринових циклах.
6. Характеристика піримідинових основ. Таутомерні форми. Лактим-лактаміне перетворення. Нумерація вуглецевих атомів в піримідинових циклах.
7. Мінорні пуринові й піримідинові основи, будова і функції.
8. Вуглеводний компонент нуклеїнових кислот, нумерація вуглецевих атомів у фуранозному циклі.
9. Нуклеозиди. Зв'язок між їх складовими компонентами, будова, номенклатура.
10. Нуклеотиди. Рибонуклеотиди та дезоксирибонуклеотиди, будова, номенклатура.
11. Нуклеотидний склад ДНК і РНК.
12. ДНК і РНК, загальна характеристика. Різниця в молекулярній масі, складі, структурі, функціях та локалізації у клітині.
13. Види ДНК і РНК, їх характеристика.
14. Властивості та функції нуклеїнових кислот.
15. Видова специфічність ДНК і РНК. Роботи А.М. Білозерського.
16. Рівні структурної організації нуклеїнових кислот.
17. Первинна структура ДНК. Характеристика зв'язків.
18. Особливості чергування нуклеотидів в первинній структурі.
19. Принцип комплементарності, його реалізація у структурі ДНК. Правила Е. Чаргаффа. Коефіцієнт специфічності.
20. Вторинна структура ДНК. Модель Д. Уотсона і Ф. Кріка.
21. Основні параметри подвійної спіралі ДНК. А, В, С, SBS-форми ДНК.
22. Зв'язки, що стабілізують вторинну структуру ДНК.
23. Третинна структура ДНК. Нуклеосоми. Структурна організація ДНК у хромосомах.
24. Рибонуклеїнові кислоти: будова, функції, молекулярна маса.
25. Види РНК. Характеристика іРНК, тРНК та рРНК.
26. Рівні структурної організації РНК.
27. Вторинна структура тРНК.

28. Мінорні основи в структурі тРНК, їх значення.
29. Третинна структура тРНК.
30. Особливості структурної організації рРНК та іРНК.

Тестові завдання

1. **Нуклеїнові кислоти – лінійні полімери, в яких нуклеотидні залишки з'єднані між собою з допомогою:**
А. Водневих зв'язків; Б. Іонних зв'язків;
В. 3',5'-фосфодіефірних зв'язків; Г. Координаційних зв'язків;
2. **У молекулі ДНК число залишків аденіну завжди дорівнює числу залишків:**
А. Тиміну; Б. Гуаніну; В. Цитозину; Г. Ксантину.
3. **Один виток подвійної спіралі А-форми ДНК містить таку кількість пар основ:**
А. 5; Б. 10; В. 20; Г. 100; Д. 200.
4. **Який із нижчевказаних вуглеводів входить до складу РНК:**
А. β -D-рибофураноза; Б. Рамноза;
В. β -D-фруктофураноза; Г. β -D-дезоксирибофураноза.
5. **Які азотисті основи є мінорними:**
А. Аденін; Б. Гуанін; В. Тимін; Г. Пурин;
Д. 6-метиладенін.
6. **Нуклеозидами з перерахованих нижче сполук є:**
А. Аденозин; Б. 2'-дезокситимідин;
В. Аденінрибонуклеозидмонофосфат;
Г. Аденілова кислота;
7. **З якою азотистою основою цитозин з'єднується водневими зв'язками?**
А. Аденін; Б. Ксантин;
В. Гуанін; Г. Гіпоксантин; Д. Урацил.
8. **Який вуглеводний компонент входить до складу ДНК:**
А. α -D-дезоксирибофураноза; Б. Рамноза;
В. β -D-фруктофураноза; Г. β -D-рибофураноза;
Д. β -D-галактопіраноза.
9. **Скільки водневих зв'язків утворюється між аденіном і тиміном:**
А. 2; Б. 5; В. 10; Г. 15; Д. 3.
10. **Скільки водневих зв'язків утворюється між цитозином та гуаніном:**
А. 2; Б. 3; В. 10; Г. 15; Д. 5.
11. **Закономірності чергування мононуклеотидів на структурі ДНК це:**

- | | |
|----------------------|------------------------|
| А. Зворотні повтори; | Б. Мінорні чергування; |
| В. Паліндроми; | Д. Правила Чаргаффа. |

12. Вторинна структура ДНК це:

- | | |
|-----------------------|------------------------|
| А. α -спіраль; | Б. β -структура; |
| В. Подвійна спіраль; | Г. L-спіраль. |

13. Вторинна структура тРНК має форму:

- | | |
|----------------------|---------------------|
| А. Спіралі; | Б. Клубка; |
| В. Ліктьового згину; | Г. Листка конюшини. |

Вправи

- Записати будову нуклеозидів аденіну, гуаніну, цитозину, тиміну, урацилу. Дати повні та скорочені назви.
- Записати формули і дати повні та скорочені назви нуклеотидам, що містять аденін, гуанін, цитозин, тимін.
- Динуклеотиди й полінуклеотиди, характеристика міжнуклеотидних зв'язків.
- Показати міжнуклеотидні зв'язки на прикладі окремих пар основ: А – Т; Ц – У; Г – Ц; А – Г; Г – У; У – У.
- Яка будова мінорних основ: 1-метилцитозину, 5-метилцитозину, 1-метиладеніну, 1-гідроксиметилцитозину, 7-метилгуаніну, 6-метиладеніну, 6-диметиладеніну.
- Записати фрагмент первинної структури ДНК, показати напрям антипаралельних ланцюгів.
- Записати фрагмент первинної структури РНК.
- Один з ланцюгів ДНК має таку послідовність мононуклеотидів: 3'-АГГ ЦЦТ ТАА АГТ ТТТ ААГ ГТТ ЦБА ААТ-5'. Записати послідовність мононуклеотидів комплементарного ланцюга, пунктиром вказати зв'язки між азотистими основами.
- Записати формули рибонуклеозид- і дезоксирибонуклеозид-5'-моно-, ди- та трифосфатів аденіну, гуаніну, цитозину, тиміну, урацилу. Дати повні й скорочені назви.
- Записати формули β -D-рибофуранози і β -D-2-дезоксирибофуранози.
- Яка будова аденілових кислот: 3,5-цАМФ, 2,3-цАМФ, АМФ, АДФ, АТФ. Вказати можливі варіанти приєднання залишків фосфорної кислоти.
- Здійснити перетворення за поданими схемами:
 β -D-рибофураноза + гуанін $\rightarrow$
 β -D-рибофураноза + урацил $\rightarrow$
 β -D-2-дезоксирибофураноза + аденін $\rightarrow$

РОБОТА № 1 КИСЛОТНИЙ ГІДРОЛІЗ НУКЛЕОПРОТЕЇНІВ

Принцип реакції. Для вивчення хімічного складу нуклеопротеїнів слід провести кислотний гідроліз дріжджів (кип'ятінням з розчином сульфатної кислоти). При нетривалому або частковому гідролізі нуклеопротеїни розщеплюються на білок і нуклеїнові кислоти; при повному гідролізі нуклеїнові кислоти розкладаються на окремі мононуклеотиди та їх складові компоненти: пуринові і піримідинові основи, рибозу чи дезоксирибозу та фосфатну кислоту. Білок також зазнає часткового гідролізу до низькомолекулярних пептидів і амінокислот, що можна виявити за допомогою специфічних кольорових реакцій.

Матеріал для дослідження: дріжджі.

Реактиви: 5% розчин сульфатної кислоти, біуретовий реактив, концентрований розчин аміаку, аміачний розчин аргентум нітрату, 1% спиртовий розчин α -нафтолу, концентрована сульфатна кислота, молібденовий реактив, 10% розчин натрій гідроксиду, реактив Фелінга.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, піпетки, лійка, марля для фільтрування, фарфорова ступка, плоскодонна колба із зворотним холодильником, спиртівка, водяна баня, терези з набором різноважок.

Хід роботи

У фарфорову ступку внести 1 г дріжджів, гомогенізувати у фарфоровій ступці при поступовому додаванні 25 мл 5% розчину сульфатної кислоти. 1 мл гомогенату перенести у пробірку і додати 1,0 мл 10% розчину натрій гідроксиду та 1,5 мл біуретового реактиву. Спостерігати за зміною забарвлення. Решту гомогенату перенести у плоскодонну колбу із зворотним холодильником і гідролізувати на киплячій водяній бані протягом 1 год. Після цього, гідролізат охолодити, довести дистильованою водою до початкового об'єму і профільтрувати через марлю, складену вдвоє.

Фільтрат використати для проведення якісних реакцій на наявність білка та складових компонентів нуклеїнових кислот.

а. Виявлення поліпептидів.

Хід роботи

До 1 мл фільтрату додати 1 мл 10% розчину натрій гідроксиду і 1,5 мл біуретового реактиву. Спостерігати за появою забарвлення.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

б. Виявлення пуринових основ.

Принцип реакції. Пуринові основи при взаємодії з аміачним розчином аргентум нітрату утворюють осад срібних солей пуринових основ, забарвлений у світло-бурий колір:

Хід роботи

До 2 мл фільтрату по краплях додати концентрований розчин NH_4OH (до лужної реакції на лакмус) та 1 мл аміачного розчину аргентум нітрату. Спостерігати за утворенням осаду.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

в. Виявлення пентоз за реакцією Подобедова-Молиша.

Принцип реакції. При взаємодії концентрованої сульфатної кислоти з пентозами проходить їх дегідратація з утворенням фурфуролу, який з тимолом або α -нафтолом за присутності концентрованої сульфатної кислоти дає продукти конденсації червоного або червоно-фіолетового кольору.

Хід роботи

У пробірку внести 1 мл фільтрату, додати 1 мл 1% спиртового розчину α -нафтолу і перемішати. Після цього обережно, не струшуючи, по стінці пробірки додати 1 мл концентрованої сульфатної кислоти. Спостерігати за появою забарвлення.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

г. Виявлення фосфатної кислоти.

Принцип реакції. Фосфатна кислота при нагріванні з молібденовим реактивом утворює триамонійфосфомолібдат, який при охолодженні випадає в вигляді жовтого осаду.

Хід роботи

До 1 мл фільтрату додати рівний об'єм молібденового реактиву. Суміш нагріти на спиртівці до кипіння. Спостерігати за розвитком забарвлення.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Що являють собою нуклеопротейни?
2. Які компоненти утворюються при кислотному гідролізі рибо- і дезоксирибонуклеопротейнів?
3. З якою метою проводять гомогенізацію та кислотний гідроліз нуклеопротейнів?
4. На яких специфічних кольорових реакціях ґрунтується визначення складових компонентів нуклеопротейнів?

ВИДІЛЕННЯ ТА ЯКІСНЕ ВИЯВЛЕННЯ НУКЛЕІНОВИХ КИСЛОТ

РОБОТА № 1 ВИДІЛЕННЯ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОПРОТЕЇНІВ І ВИЯВЛЕННЯ ДНК

Принцип методу. Дезоксирибонуклеопротейни добре розчинні в лужних та сольових розчинах і випадають в осад при нейтралізації або розведенні розчинів водою. Характерною особливістю ядерних нуклеопротейнів є їх здатність утворювати в'язкі розчини при додаванні нейтральних солей (наприклад, в 1М розчині натрій хлориду). При осадженні із сольових розчинів нуклеопротейни випадають в осад у вигляді тоненьких фібрил.

Для якісного визначення дезоксирибонуклеопротейнів проводять реакцію з дифеніламіновим реактивом. При нагріванні розчину, що містить дезоксирибонуклеопротейни, з дифеніламіновим реактивом рідина поступово набуває синього забарвлення. Реакція зумовлена присутністю дезоксирибози, яка вивільнюється при гідролітичному розкладі дезоксирибонуклеопротейнів.

Матеріал для дослідження: селезінка, печінка, лімфатичні вузли.

Реактиви: 1н розчин натрій хлориду, 5% розчин ацетатної кислоти, 0,4% розчин натрій гідроксиду, дифеніламіновий реактив.

Обладнання: фарфорова ступка, хімічні стакани на 50 мл, мірний циліндр, центрифужні пробірки, піпетки, водяна баня, центрифуга, терези з набором різноважок.

Хід роботи

2 г подрібненої тканини гомогенізувати у ступці з кварцевим піском, при поступовому екстрагуванні 25 мл 1н розчину натрій хлориду, протягом 15 хв.

Одержаний в'язкий гомогенат перенести в центрифужні пробірки і відцентрифугувати при 3000 об./хв. протягом 10 хв. Центрифугат злити в чистий стакан та переосадити нуклеопротейни додаванням по краплях 5% розчину ацетатної кислоти. Суміш повторно відцентрифугувати при 3000 об./хв. протягом 10 хв. Надосадову рідину злити, а з осадом провести якісну реакцію на ДНК.

Для цього осад розчинити в 1 мл 0,4% розчину натрій гідроксиду, додати рівний об'єм дифеніламінового реактиву (до розчинення осаду, що утворився) і прокип'ятити на водяній бані протягом 15-20 хв. Спостерігати за появою забарвлення.

Пояснити результати досліду та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. На чому ґрунтується виділення дезоксирибонуклеопротейнів з біоматеріалу?
2. Які особливості осадження дезоксирибонуклеопротейнів з розчинів?
3. Яка якісна реакція використовується для визначення дезоксирибонуклеопротейнів?
4. Яка особливість проведення якісної реакції з дифеніламіновим реактивом?

РОБОТА № 2

ВИДІЛЕННЯ РИБОНУКЛЕОПРОТЕЇНІВ І ВИЯВЛЕННЯ РНК

Принцип методу. Виділення рибонуклеопротейнів ґрунтується на екстрагуванні їх розчином луґу з наступним переосадженням розчином ацетатної кислоти.

Для якісного визначення рибонуклеопротейнів проводять реакцію з дифеніламіновим реактивом. При нагріванні розчину, що містить рибонуклеопротейни, з дифеніламіновим реактивом рідина поступово набуває зеленого забарвлення. Реакція зумовлена

присутністю рибози, яка вивільнюється при гідролітичному розкладі рибонуклеопротейнів.

Матеріал для дослідження: дріжджі.

Реактиви: 0,4% розчин натрій гідроксиду, 5% розчин ацетатної кислоти, дифеніламіновий реактив.

Обладнання: фарфорова ступка, мірний циліндр, центрифужні пробірки, хімічні стакани на 50 мл, пробірки, піпетки, водяна баня, центрифуга, терези з набором різноважок.

Хід роботи

5 г дріжджів гомогенізувати у фарфоровій ступці з кварцевим піском, при поступовому екстрагуванні 40-50 мл 0,4% розчином натрій гідроксиду, протягом 15 хв.

Отриманий гомогенат перенести в центрифужні пробірки і відцентрифугувати при 3000 об./хв. протягом 10 хв. Центрифугат злити у чистий стакан та переосадити нуклеопротейни додаванням по краплях 10-15 мл 5% розчину ацетатної кислоти і постійному перемішуванні (до повного осадження). Суміш знову відцентрифугувати при 3000 об./хв. протягом 10 хв. Надосадову рідину злити, а з осадом провести якісну реакцію на РНК з дифеніламіновим реактивом.

Пояснити результати досліду та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. На чому ґрунтується виділення рибонуклеопротейнів з біоматеріалу?
2. Які особливості осадження рибонуклеопротейнів з розчинів?
3. Яка якісна реакція використовується для визначення рибонуклеопротейнів?
4. Яка особливість якісної реакції з дифеніламіновим реактивом при виявленні рибонуклеопротейнів?
5. Чому для виділення рибо- і дезоксирибонуклеопротейнів використовують різний біоматеріал?

РОБОТА № 3 ВИДІЛЕННЯ ТА ЯКІСНЕ ВИЯВЛЕННЯ ДНК І РНК

Принцип методу. Метод ґрунтується на якісному визначенні азотистих основ мононуклеотидів РНК і ДНК, яке проводять після виділення, розділення та гідролізу полінуклеотидів.

I спосіб

Матеріал для дослідження: печінка.

Реактиви: 10% розчин натрій гідроксиду, 10% розчин ТХА, 96° етиловий спирт, дифеніламіновий реактив.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, центрифужні пробірки, піпетки, скляні палички, водяна та крижана баня, центрифуга, терези з набором різноважок.

Хід роботи

500 мг печінки внести у пробірку, додати 1 мл 10% розчину натрій гідроксиду і поставити на киплячу водяну баню на 15 хв., вміст пробірки періодично помішувати скляною паличкою. Тканина розчиняється, утворюючи опалесцюючий розчин.

Пробірку охолодити до кімнатної температури, поставивши на крижану баню, після чого перенести в центрифужну пробірку, додати 0,5 мл 10% розчину ТХА (для осадження білків) та відцентрифугувати при 5000 об./хв. протягом 10 хв. Центрифугат перенести в чисту центрифужну пробірку і додати 6 мл 96° етилового спирту (операцію проводити на льоду) для осадження ДНК (РНК залишається в розчині). Осад перемішати і залишити на льоду на 20 хв., потім повторно відцентрифугувати при 5000 об./хв. протягом 10 хв.

1 мл надосадової рідини, що містить РНК, перенести в чисту пробірку, додати 2 мл дифеніламінового реактиву та поставити на киплячу водяну баню на 15 хв. Рідина поступово набуває зеленого забарвлення.

До невеликої кількості осаду, що містить ДНК, додати 2 мл дифеніламінового реактиву і поставити на киплячу водяну баню на 15 хв. Рідина поступово набуває синього забарвлення.

II спосіб

Матеріал для дослідження: печінка.

Реактиви: 0,25н розчин сахарози, 10% розчин ТХА, 96° етиловий спирт насичений натрій ацетатом, суміш Блур, 0,3н розчин натрій гідроксиду, біуретовий реактив, 42% розчин хлорної кислоти, 0,5н розчин хлорної кислоти, дифеніламіновий реактив.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, центрифужні пробірки, піпетки, ножиці, фарфорові ступки, центрифуга, водяна баня, терези з набором різноважок.

Хід роботи

4 г печінки добре подрібнити і гомогенізувати у фарфоровій ступці при поступовому додаванні 18 мл 0,25н розчину сахарози.

До 1 мл гомогенату додати 5 мл 10% розчину ТХА, перемішати і відцентрифугувати при 3000 об./хв. протягом 10 хв. Надосадову рідину злити, до осаду додати 5 мл 96° етилового спирту насиченого натрій ацетатом, перемішати і залишити на 5 хв. для екстрагування ліпідів. Після цього суміш відцентрифугувати при 3000 об./хв. протягом 5 хв. Надосадову рідину злити, до осаду додати 5 мл суміші Блура, перемішати та відцентрифугувати при 3000 об./хв. протягом 5 хв. Осад розчинити в 4 мл 0,3н розчину натрій гідроксиду і гідролізувати на киплячій водяній бані протягом 1 год.

При м'якому лужному гідролізі РНК розщеплюється до нуклеотидів, тоді як ДНК не руйнується і випадає в осад при додаванні 42% розчину хлорної кислоти або 50% розчину ТХА.

У гідролізаті визначити наявність білка, нуклеотидів РНК і ДНК.

1. ВИЯВЛЕННЯ БІЛКА

До 1 мл гідролізату додати 2 мл біуретового реактиву. Спостерігати за появою забарвлення.

2. ВИЯВЛЕННЯ НУКЛЕОТИДІВ РНК

До 3 мл гідролізату додати 1,5 мл 42% розчину хлорної кислоти і відцентрифугувати при 3000 об./хв. протягом 10 хв. У чисту пробірку перенести 2 мл надосадової рідини, додати 4 мл дифеніламінового реактиву і поставити на киплячу водяну баню. Спостерігати за появою забарвлення.

3. ВИЯВЛЕННЯ ДНК

До осаду, який одержали в попередній роботі (після відокремлення РНК), додати 5 мл 0,5н розчину хлорної кислоти і нагріти до кипіння. Після охолодження відцентрифугувати. В чисту пробірку перенести 1 мл надосадової рідини та додати 2 мл дифеніламінового реактиву, пробірку поставити на киплячу водяну баню. Спостерігати за появою забарвлення.

Пояснити результати дослідів та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. На чому ґрунтується виділення РНК і ДНК з біоматеріалу?
2. Який компонент нуклеопротейнів визначають за допомогою біуретового реактиву?
3. Яка особливість якісної реакції з дифеніламіновим реактивом при виявленні рибо- і дезоксирибонуклеопротейнів?

РОБОТА № 4

ЯКІСНЕ ВИЯВЛЕННЯ ДНК ЗА МЕТОДОМ ДІШЕ

Принцип методу. Метод ґрунтується на здатності вуглеводного компоненту нуклеїнових кислот (рибози та дезоксирибози) вступати у взаємодію з цистеїн хлоридом, внаслідок чого утворюються сполуки, забарвлені у рожевий колір.

Матеріал для дослідження: 0,1% розчин натрієвої солі ДНК.

Реактиви: 5% розчин цистеїн хлориду, розчин сульфатної кислоти (15 мл сульфатної кислоти і 6 мл води).

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, термостат.

Хід роботи

У пробірку внести 1 мл 0,1% розчину натрієвої солі ДНК і додати 0,04 мл 5% розчину цистеїн хлориду та 5 мл розчину сульфатної кислоти. Вміст пробірки перемішати і поставити в термостат на 5 хв. при 40°C. Спостерігати за зміною забарвлення у пробірці.

Пояснити результати досліду та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Який механізм реакції Діше?
2. Записати будову сполуки, яку виявляють у складі ДНК за допомогою цієї реакції.

РОБОТА № 5

ВИЗНАЧЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНОЇ МАСИ ДНК МЕТОДОМ ВІСКОЗОМЕТРІЇ

Принцип методу. Молекулярну масу нуклеїнових кислот зазвичай визначають за допомогою методів електронної мікроскопії, рівноважного центрифугування, віскозометрії тощо.

Розчини нуклеїнових кислот мають дуже високу в'язкість, що дає змогу визначати молекулярну масу ДНК віскозометричним

методом, оскільки збільшення в'язкості залежить від концентрації розчиненої ДНК, розмірів і форми молекули.

Матеріал для дослідження: 0,002% і 0,004% розчин ДНК.

Реактиви: розчинник: 0,14М розчин натрій хлориду в 0,015М розчині натрій цитрату.

Обладнання: віскозиметр Оствальда, секундомір, скляні фільтри, піпетки.

Хід роботи

Через скляний фільтр у праву, розширену частину віскозиметра внести 10 мл розчинника. За допомогою гумової трубки, надітої на вужчий кінець віскозиметра, заповнити розчинником ліву, розширену частину віскозиметру. Секундоміром визначити час витікання об'єму рідини під дією власної маси. Показник в'язкості розчинника (η_0) визначити тричі і розрахувати середнє значення.

Далі вказані операції проробити з 10 мл 0,002% і 0,004% розчинами ДНК.

Розрахунок провести за формулами:

$$\eta_v = \frac{\eta_{\text{днк}}}{\eta_0}; \quad \eta_{\text{п}} = \frac{\eta_v - 1}{C}, \text{ де}$$

η_v – відносна в'язкість;

$\eta_{\text{днк}}$ – в'язкість розчину ДНК;

η_0 – в'язкість розчинника;

$\eta_{\text{п}}$ – приведена в'язкість;

C – концентрація ДНК.

Розрахунок молекулярної маси провести за формулою:

$$M_r = \frac{2\eta_{\text{п2}} - \eta_{\text{п1}}}{9} \times 10^6$$

Пояснити результати досліду та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. У чому суть віскозиметрії?
2. Чому розчини ДНК мають високу в'язкість?
3. Від чого залежить в'язкість розчинів ДНК?

РОБОТА № 6
**ВИЗНАЧЕННЯ КОНФОРМАЦІЙНОГО СТАНУ ДНК
МЕТОДОМ ВІСКОЗОМЕТРІЇ**

Принцип методу. За допомогою методу віскозиметрії можна визначити процеси денатурації та ренатурації ДНК.

Матеріал для дослідження: 0,08% розчин ДНК.

Реактиви: розчинник: 0,14М розчин натрій хлориду в 0,015М розчині натрій цитрату.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, водяна і крижана бані, термометр, термостат, віскозиметр Оствальда, секундомір, скляні фільтри, піпетки.

Хід роботи

У три пробірки внести по 1 мл 0,08% розчину ДНК. В першу пробірку (ДНК нативна) додати 9 мл розчинника. Другу пробірку (ДНК денатуrowана) помістити в киплячу водяну баню на 10 хв., після чого швидко охолодити на льоду та додати 9 мл розчинника. Третю пробірку (ДНК ренатуrowана) прогріти на киплячій водяній бані протягом 10 хв. і охолодити не виймаючи пробірки з водяної бані до 67°C (час охолодження має складати не менше 30 хв.). Після цього розчин ДНК інкубувати в термостаті протягом 30-40 хв. при 67°C.

Одержані розчини ДНК використати для визначення в'язкості. Необхідно, щоб усі зразки ДНК перед визначенням мали однакову температуру.

Розрахунок відносної в'язкості провести за формулою:

$$\eta_v = \frac{\eta_{\text{ДНК}}}{\eta_0}$$

Пояснити результати досліду та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Що таке денатурація ДНК? Які процеси проходять за цих умов?
2. Пояснити поняття "точка плавлення ДНК."
3. За яких умов можлива ренатурація ДНК?
4. У чому суть віскозиметричного методу визначення конформаційного стану ДНК?

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ДНК

РОБОТА № 1

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ДНК У ТКАНИНАХ МЕТОДОМ ШМІДТА–ТАННГАУЗЕРА

Принцип методу. При додаванні до екстрагованої лугом тканини насиченого розчину натрій хлориду в ацетатній кислоті проходить осадження білків, в розчині залишаються ДНК та інші фосфатвмісні сполуки. ДНК відокремлюють переосадженням спиртом з наступним відмиванням осаду ТХА. Вміст ДНК визначають за фосфором.

Матеріал для дослідження: печінка тварини.

Реактиви: 1н розчин натрій гідроксиду, насичений розчин натрій хлориду в 20% ацетатній кислоті, етиловий спирт, 5% ТХА, концентрована сульфатна кислота, 30% гідроген пероксид, 30% розчин натрій гідроксиду, дифеніламіновий реактив, 5% розчин амоній молібдату, 1% розчин гідрохінону, карбонат-сульфатна суміш, основний стандартний розчин калій дигідрофосфату, дистильована вода, універсальний індикатор.

Обладнання: штатив з пробірками, скляні палички, мірний циліндр, піпетки, центрифужні пробірки, центрифуга, хімічний стакан, мірна колба на 50 мл, фарфорова чашка, водяна і крижана бані, терези з набором різноважок, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 10 мм.

Хід роботи

У центрифужну пробірку внести 1 мл 1н розчину натрій гідроксиду та 100 мг подрібненої тканини печінки. Пробірку поставити на киплячу водяну баню на 15 хв., помішуючи суміш скляною паличкою. Після чого охолодити (спочатку до кімнатної температури і далі до 0°C).

До охолодженої проби додати 0,5 мл насиченого розчину натрій хлориду в 20% розчині ацетатної кислоти для осадження білків. Через 5 хв. пробу відцентрифугувати при 5000 об./хв. протягом 10 хв.

Приготувати чисті пробірки, в які внести по 6 мл етилового спирту і охолодити на льоду. Після центрифугування у пробірки перенести надосадову рідину (ДНК випадає в осад, а в розчині залишається РНК). Осадження проводити протягом 30 хв. Після цього вміст пробірок відцентрифугувати при 5000 об./хв. протягом

10 хв. З надосадовою рідиною провести реакцію з дифеніламіновим реактивом.

Осад, що містить ДНК, відмити додаванням 5 мл 5% ТХА і відцентрифугувати. Надосадову рідину обережно злити, а осад перенести в фарфорову чашку, обережно додати 1,5 мл концентрованої сульфатної кислоти та декілька крапель 30% гідроген пероксиду, мінералізувати до утворення освітленої рідини, яку перенести в хімічний стакан і за допомогою 30% розчину натрій гідроксиду нейтралізувати до нейтральної реакції за універсальним індикатором.

Рідину кількісно перенести в колбу на 50 мл і загальний об'єм довести водою до позначки.

З колби відібрати 5 мл рідини, перенести у пробірку, додати 0,5 мл 5% розчину амоній молібдату і 0,5 мл 1% розчину гідроксиду. Через 5 хв. у пробірку внести 2 мл карбонат-сульфатної суміші і загальний об'єм довести водою до 10 мл.

Через 10 хв. визначити екстинкцію проби на ФЕК в кюветі довжиною оптичного шляху 10 мм відносно суміші реактивів.

Кількість ДНК визначити за калібрувальною кривою, для побудови якої приготувати робочий стандартний розчин з основного стандартного розчину калій дигідрофосфату (0,4393 г в 100 мл) розведенням його у 100 разів.

У п'ять пробірок внести відповідно 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 мл робочого розчину і довести водою до 1 мл (робочі стандартні розчини калій дигідрофосфату містять відповідно 1, 2, 3, 4, 5 мкг фосфору в 1 мл). Отримані розчини обробити як дослідні.

На основі отриманих результатів побудувати калібрувальну криву: на осі абсцис відкласти значення концентрації фосфату, а на осі ординат – відповідні їм значення екстинкції.

У нормі вміст фосфору в ДНК складає 25-35 мг%.

Провести розрахунки та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Чому визначення ДНК проводять після осадження білків?
2. Яка будова нуклеопротейнів та їх біологічна роль?
3. Яким чином можна розділити ДНК і РНК?

РОБОТА № 2 КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ДНК ЗА ДІШЕ (з дифеніламіном)

Принцип методу. β,D-дезоксирибозураноза, що входить до складу ДНК, при взаємодії з дифеніламіновим реактивом утворює

комплексну сполуку синього кольору, інтенсивність забарвлення якої пропорційна вмісту ДНК.

ДНК у великій кількості міститься в селезінці, печінці, зубній залозі та інших тканинах, багатих на ядерну речовину.

Матеріал для дослідження: печінка, селезінка, зубна залоза.

Реактиви: 5% розчин натрій хлориду, який містить 0,4% розчин натрій цитрату, 5% розчин сульфатної кислоти, стандартний розчин ДНК (1 г/л), 1М розчин хлорної кислоти, дифеніламіновий реактив, дистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, фарфорова ступка, центрифужні пробірки, центрифуга, піпетки на 1 мл, колба із зворотнім холодильником, скляні палички, водяна баня, терези з набором різноважок, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм.

Хід роботи

Виділення ДНК з тваринних тканин. 1,5 г печінки (або іншої тканини) гомогенізувати в фарфоровій ступці з 100 мг кварцевого піску при поступовому додаванні 35 мл 5% розчину натрій хлориду, який містить 0,4% розчин натрій цитрату, протягом 15 хв. Одержаний гомогенат перенести в центрифужну пробірку та відцентрифугувати при 3 000 об./хв. протягом 15 хв.

Центрифугат при помішуванні скляною паличкою повільно додати до шестикратного об'єму дистильованої води. Нерозчинні в воді дезоксирибонуклеопротейни випадають в осад у вигляді ниток, які необхідно накрутити на паличку, перенести в колбу із зворотнім холодильником для гідролізу, додати 30-40 мл 5% розчину сульфатної кислоти та обережно прокип'ятити на водяній бані протягом 30-40 хв. Отриманий гідролізат охолодити.

Кількісне визначення ДНК. У пробірку внести 0,5 мл свіжоприготовленого стандартного розчину ДНК (1 г/л) і 0,5 мл 1М розчину хлорної кислоти, вміст пробірки перемішати, поставити на киплячу водяну баню на 10 хв. та охолодити.

Взяти дві пробірки: в першу (дослідну) внести 1 мл гідролізату ДНК, у другу (контрольну) – 0,5 мл дистильованої води і 0,5 мл 1М розчину хлорної кислоти.

У кожену пробірку додати по 2 мл дифеніламінового реактиву, перемішати скляною паличкою і поставити на киплячу водяну баню на 10 хв. для розвитку забарвлення.

Після охолодження визначити екстинкцію стандартної і дослідної проби на ФЕК (червоний світлофільтр, 600-650 нм, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм) відносно контролю.

Розрахунок вмісту ДНК у тваринних тканинах провести:

1. За формулою:

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

$C_{\text{д.}}$ – вміст ДНК в дослідній пробі (г/л);

$C_{\text{ст.}}$ – вміст ДНК у стандартній пробі (г/л);

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

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

2. За калібрувальною кривою, для побудови якої у три пробірки внести по 1 мл водних розчинів ДНК різної концентрації (20, 50, 100, 150, 200 мкг/мл) і 2 мл дифеніламінового реактиву. Пробірки поставити на киплячу водяну баню на 10 хв., після чого визначити їх екстинкцію.

На основі отриманих результатів побудувати калібрувальну криву: на осі абсцис відкласти значення концентрацій стандартних водних розчинів ДНК (мкг/мл), а на осі ординат – відповідні їм значення екстинкції.

Провести розрахунки та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. На чому ґрунтується метод виділення ДНК з біоматеріалу?
2. Записати будову продуктів гідролітичного розкладу ДНК.
3. Які особливості дифеніламінової реакції з ДНК і РНК?

РОБОТА № 3 ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ РНК ЗА РЕАКЦІЄЮ З ОРЦИНОМ

Принцип методу. β,D-рибофураноза, яка входить до складу нуклеотидів РНК, при взаємодії з орциновим реактивом утворює комплексні сполуки зеленого кольору, інтенсивність забарвлення яких пропорційна вмісту РНК.

Матеріал для дослідження: дріжджі.

Реактиви: 0,4% розчин натрій гідроксиду, 5 % розчин ацетатної кислоти, 5% розчин сульфатної кислоти, стандартний розчин РНК (1 г/л), орциновий реактив, дистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, фарфорова ступка, центрифужні пробірки, скляні палички, центрифуга, колба із зворотним холодильником, водяна баня, терези з набором різноважок, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм.

Хід роботи

Виділення РНК з дріжджів. 10 г сухих дріжджів ретельно подрібнити в фарфоровій ступці (можна додати 100 мг кварцевого піску) протягом 15 хв. і екстрагувати з 50 мл 0,4% розчину натрій гідроксиду. Екстракт перенести в центрифужні пробірки та відцентрифугувати при 3000 об./хв. протягом 10 хв. До центрифугату, при помішуванні, додати 15-20 мл 5% розчину ацетатної кислоти і відцентрифугувати при 3000 об./хв. протягом 5 хв. Осад з центрифужної пробірки перенести в колбу із зворотним холодильником, у яку додати 30-40 мл 5% розчину сульфатної кислоти та поставити на водяну баню на 30-40 хв. для гідролізу, після чого охолодити.

Кількісне визначення РНК. Взяти три пробірки: в одну (дослідну) внести 2 мл гідролізату РНК, у другу (стандартну) – 2 мл стандартного розчину РНК, у третю (контрольну) – 2 мл води. В кожну пробірку додати по 2 мл орцинового реактиву та поставити на киплячу водяну баню на 20 хв., після чого охолодити.

Визначити екстинкцію стандартної і дослідної проби на ФЕК (червоний світлофільтр, 600-650 нм, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм) відносно контролю.

Розрахунок вмісту РНК провести:

1. За формулою:

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

$C_{\text{д.}}$ – вміст РНК в дослідній пробі (г/л);

$C_{\text{ст.}}$ – вміст РНК у стандартній пробі (1 г/л);

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

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

2. За калібрувальною кривою (див. попередню роботу).

Провести розрахунки та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Чому для виділення РНК використовують дріжджі?
2. Які етапи виділення РНК з біоматеріалу?
3. Записати будову продуктів гідролітичного розкладу РНК.

РОБОТА № 4 КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ДНК ЗА МЕТОДОМ БРОДІ

Принцип методу. Інтенсивність забарвлення дезоксирибози з цистеїн хлоридом залежить від кількості ДНК у розчині. Цим методом можна визначити ДНК у розчинах, які містять від 1 до 10 мкг ДНК.

Матеріал для дослідження: розчин ДНК (1-10 мкг речовини).

Реактиви: 1% розчин цистеїн хлориду, концентрована сульфатна кислота.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки на 1 і 5 мл, термостат, спектрофотометр.

Хід роботи

У пробірку внести 0,5 мл розчину ДНК і додати 0,05 мл 1% розчину цистеїн хлориду та 5 мл охолодженої концентрованої сульфатної кислоти і поставити в термостат при 25°C на 20 хв.

Кількісний вміст ДНК визначити спектрофотометричним методом при довжині хвилі 474 нм.

Провести розрахунки та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. У чому суть кількісного визначення ДНК за методом Броді?
2. Записати будову складових компонентів ДНК.
3. Пояснити функції ДНК у клітині.

РОБОТА № 5 КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ ЗА МЕТОДОМ О.С. СПІРІНА

Принцип методу. Нуклеїнові кислоти визначають за фосфатними залишками нуклеотидів, ураховуючи різницю екстинкцій хлорних екстрактів тканин при довжині хвилі 270 і 290 нм.

Матеріал для дослідження: печінка, селезінка.

Реактиви: 0,5М розчин хлорної кислоти.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, центрифужні пробірки, центрифуга, водяна баня, терези з набором різноважок, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 10 мм.

Хід роботи

У центрифужну пробірку внести 5-10 мл 0,5М розчину хлорної кислоти, 5-500 мг тканини і поставити на киплячу водяну баню на 20 хв. Після охолодження надосадову рідину відокремити центрифугуванням та визначити її екстинкцію на ФЕК (270 і 290 нм, кювета довжиною оптичного шляху 10 мм) відносно контролю (0,5М розчин хлорної кислоти).

Розрахунок вмісту фосфату нуклеотидів провести за формулою:

$$C_{\text{д.}} = \frac{E_{270} - E_{290}}{E_{\text{пит.}}}, \text{ де}$$

$C_{\text{д.}}$ – вміст фосфату нуклеотидів (мкг/мл);

E_{270} і E_{290} – екстинкція дослідної проби;

$E_{\text{пит.}}$ – питома екстинкція, яка складає 0,19.

Питома екстинкція, яка при довжині хвилі 270 нм є практично однаковою для РНК і ДНК, відповідає концентрації (1 мкг) нуклеїнових кислот в 1 мл розчину.

Для перерахунку кількості фосфату на вміст нуклеїнових кислот використовують коефіцієнт перерахунку 10,3 (для РНК – 10,5, для ДНК – 10,1).

Провести розрахунки та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Які особливості визначення нуклеїнових кислот у біоматеріалі?
2. У чому особливість визначення нуклеїнових кислот за методом О. Спіріна?
3. З якою метою проводять гідроліз біоматеріалу протягом 20 хвилин?

ЛАБОРАТОРНО-ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 5

ТЕМА: ВИВЧЕННЯ ВЛАСТИВОСТЕЙ ФЕРМЕНТІВ

Опрацювати теоретичний матеріал, використовуючи літературу

Основна: [1, с. 178-188]; [2, с. 140-167]; [3, с. 102-113]; [4, с. 98-121]; [5, с. 74-93].

Додаткова: [2]; [4]; [5]; [6]; [8]; [9]; [10].

Методичні вказівки

1. При опрацюванні теоретичного матеріалу звернути увагу на хімічну природу ферментів, особливості їх як біокаталізаторів.
2. З'ясувати чим зумовлені загальні властивості ферментів.
3. Які особливості будови ферментів протеїнів і протеїдів?
4. Засвоїти поняття “субстрат”, види специфічності ферментів, вплив на активність ферментів температури та рН середовища.
5. При виконанні практичних робіт слідкувати за дотриманням умов проведення ферментативних реакцій (температура, концентрація ферменту, рН середовища та ін.) і правил техніки безпеки.
6. Оформити роботи, пояснити результати, записати висновки та виконати завдання для самоконтролю знань.

Теоретичні питання

1. Історія вивчення ферментів. Роботи К. Кірхгофа, О. Данилевського, І. Павлова. Особливості ферментів як біокаталізаторів.
2. Спільні та відмінні риси між ферментами і неорганічними каталізаторами.
3. Хімічна природа ферментів. Докази їх білкової природи.
4. Прості та складні ферменти, особливості їх будови.
5. Поняття про активний і аллостеричний центр ферментів.
6. Одно- та багатоцентрові ферменти. Мультиферментні комплекси.
7. Ізоферменти. Особливості будови й функції.
8. Будова і функції кофакторів, їх особливості та роль у процесах біокаталізу.
9. Активатори ферментів та їх особливості.
10. Механізм дії ферментів.
11. Аллостеричні ефектори, їх роль у метаболізмі.
12. Кінетика ферментативних реакцій.
13. Вплив температури на активність ферментів.
14. Вплив рН середовища на активність ферментів.

15. Процеси активації та гальмування ферментів. Утворення активних форм ферментів із проферментів, значення процесу.
16. Інгібітори й активатори ферментів.
17. Конкурентне і неконкурентне гальмування ферментативної активності.
18. Специфічність ферментів, види специфічності.

Тестові завдання

1. **Доказом білкової природи ферментів є:**
 - А. Здатність до осадження;
 - Б. Взаємодія з кислотами;
 - В. Висока молекулярна маса;
 - Г. Здатність до окиснення.
2. **Спільними властивостями ферментів і неорганічних каталізаторів є:**
 - А. Термолабільність;
 - Б. Залежність від ефекторів;
 - В. Специфічність дії;
 - Г. Каталіз лише термодинамічно можливих реакцій;
 - Д. Залежність від кількості субстрату.
3. **Прості ферменти складаються із:**
 - А. Протетичної групи;
 - Б. Кофактора;
 - В. Поліпептидного ланцюга;
 - Г. Коферменту.
4. **Який фермент володіє абсолютною специфічністю до субстрату:**
 - А. Хімотрипсин;
 - Б. Папаїн;
 - В. Уреаза;
 - Г. Аргіназа;
 - Д. Лізоцим.
5. **Який із протеолітичних ферментів володіє естеразною активністю:**
 - А. Трипсин;
 - Б. Карбоксипептидаза;
 - В. Амінопептидаза;
 - Г. Хімотрипсин;
 - Д. Пепсин.
6. **При якому значенні рН більшість ферментів виявляє максимальну активність:**
 - А. Кислому, рН...1,5-2;
 - Б. Лужному, рН...8-9;
 - В. Близькому до нейтрального;
 - Г. При рН...7.
7. **Яка температура є оптимальною для дії більшості ферментів:**
 - А. 50-60°C;
 - Б. 15-20°C;
 - В. 80-100°C;
 - Г. 35-40°C.
8. **Який фермент володіє стереоспецифічністю:**
 - А. Альдолаза;
 - Б. Піруватдегідрогеназа;
 - В. α -глюкозидаза;
 - Г. Фумарат-гідратаза;
 - Д. Ліпаза.

9. В організмі безпосередньо знешкоджує токсичний гідроген пероксид:

- А. Каталаза; Б. Глутатіонпероксидаза;
В. Супероксид-дисмутаза; Г. Глутатіонредуктаза;
Д. Ксантиноксидаза.

10. Яким ферментам властива абсолютна специфічність:

- А. Сахаразі, уреазі; Б. Амілазі;
В. Пепсину, трипсину; Г. Алкогольдегідрогеназі;
Д. Фосфатазі.

11. Для якого класу ферментів коферментом є тіамінпірофосфат:

- А. Трансфераз; Б. Оксидоредуктаз;
В. Гідролаз; Г. Ліаз; Д. Лігаз.

12. Для якого класу ферментів коферментом є КоASH:

- А. Гідролаз; Б. Трансфераз;
В. Оксидоредуктаз; Г. Лігаз; Д. Ліаз.

Вправи

1. У пробірку з невідомим субстратом додали витяжку з дріжджів. Після 10 хв. інкубації суміш у пробірці дає позитивну реакцію Фелінга. Який субстрат був у пробірці?
2. Синтез яких коферментів загальмовується, якщо в організмі дефіцит вітаміну В₅ (РР)?
3. Записати будову кофакторів оксидоредуктаз.
4. Записати будову пантотенової кислоти та кофактора, до складу якого вона входить.
5. Записати будову флавінових кофакторів.
6. Записати будову кофакторів ферментів аміотрансфераз.
7. Визначити шифр ферментів гексокінази, ацетил-трансфери, аланін-аміотрансфери, піруватдегідрогенази.
8. Заповнити таблицю.

Назва кофактору	Будова кофактору	Біологічна роль	До складу яких ферментів входить	Приклади ферментативних реакцій

9. Записати схеми реакцій, які каталізують оксидоредуктази, трансфери, ліази, лігази, ізомерази.
10. Визначити шифр ферменту, що каталізує реакції за схемами та записати хімізм:
а) глюкоза → глюкозо-6-фосфат;
б) етиловий спирт → ацетальдегід.

1. ВИВЧЕННЯ ДІЇ ФЕРМЕНТІВ

РОБОТА № 1 ВИВЧЕННЯ ДІЇ АМІЛАЗИ

Принцип методу. α -Амілаза, що міститься у слині та секреті панкреатичної залози, це фермент, який каталізує реакцію гідролітичного розкладу крохмалю і глікогену до мальтози. Крохмаль з йодом дає синє забарвлення, а продукти його гідролізу (декстрини) залежно від ступеня гідролітичного розщеплення крохмалю за присутності йоду утворюють гаму забарвлення – від червоно-бурого до жовто-бурого. Мальтоза, як кінцевий продукт гідролітичного розкладу крохмалю і глікогену при дії α -амілази, з йодом не дає будь-якої кольорової реакції.

Матеріал для дослідження: розчин слини (1:5).

Реактиви: 0,5% розчин крохмалю, розчин Люголя, дистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки, мірний циліндр.

Хід роботи

У дві пробірки внести по 0,5 мл 0,5% розчину крохмалю. В першу (дослідну) додати 1 мл розчину слини, а у другу (контрольну) – 1 мл води. Через 15 хв. у кожену пробірку додати по 3 краплі розчину Люголя.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. До якого класу ферментів належить α -амілаза?
2. Які зв'язки в молекулі крохмалю розщеплює α -амілаза?
3. За допомогою якої якісної реакції виявляють наявність крохмалю?
4. Що таке декстрини? Яку кольорову реакцію вони дають з йодом?

РОБОТА № 2 ВИВЧЕННЯ ДІЇ ЛІПАЗИ

Принцип методу. Ліпаза прискорює розщеплення жиру на гліцерин і жирні кислоти, присутність яких можна виявити за зміною рН середовища.

Матеріал для дослідження: 5% розчин панкреатину в 1% розчині натрій гідрокарбонату, молоко.

Реактиви: 1% розчин натрій гідроксиду, 0,5% розчин фенолфталеїну, дистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, піпетки, термостат.

Хід роботи

У дві пробірки внести по 1 мл молока. В першу (дослідну) додати 0,5 мл 5% розчину панкреатину, у другу (контрольну) – 0,5 мл води. В кожну пробірку додати по 1-2 краплі 0,5% розчину фенолфталеїну і по краплях 1% розчин натрій гідроксиду до слабко-рожевого забарвлення (рН...8,0). Пробірки поставити в термостат при 38°C на 30 хв.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. До якого класу ферментів належить ліпаза?
2. На чому ґрунтується визначення дії ліпази?
3. Записати хімізм реакції розщеплення тристеарину під впливом ліпази.

РОБОТА № 3 ВИВЧЕННЯ ДІЇ ПЕРОКСИДАЗИ КРОВІ

Принцип методу. Пероксидаза прискорює реакцію окиснення органічних сполук за участю гідроген пероксиду. Зокрема, бензидин, під впливом пероксидази, окиснюється з утворенням сполуки помаранчевого кольору.

Матеріал для дослідження: кров.

Реактиви: 3% розчин гідроген пероксиду, 0,5% розчин бензидину в концентрованій ацетатній кислоті.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, піпетки.

Хід роботи

У дві пробірки внести по 1 мл 0,5% розчину бензидину і 2 мл 3% розчину гідроген пероксиду. В першу пробірку додати 1-2 краплі крові, у другу – 1-2 краплі води, перемішати. Спостерігати за зміною забарвлення.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. До якого класу ферментів належить пероксидаза?
2. Який механізм дії та біологічна роль пероксидази крові?
3. Яким чином можна виявити присутність ферменту?

2. ВИВЧЕННЯ ВЛАСТИВОСТЕЙ ФЕРМЕНТІВ

РОБОТА № 1 ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРИ НА АКТИВНІСТЬ АМІЛАЗИ

Матеріал для дослідження: розчин слини (1:5).

Реактиви: 0,5% розчин крохмалю, розчин Люголя, дистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, піпетки, крижана баня, спиртівка, термостат.

Хід роботи

У чотири пронумеровані пробірки внести по 1 мл розчину слини. Першу пробірку залишити у штативі при кімнатній температурі, другу поставити в термостат при 38°C, третю – на крижану баню, вміст четвертої прокип'ятити на спиртівці. Через 30 хв. в кожную пробірку додати по 2 мл 0,5% розчину крохмалю, перемішати і залишити в тих же умовах. Спостереження за ходом гідролітичного розкладу крохмалю провести за реакцією з розчином Люголя: проби з кожної пробірки брати на початку дослідження та через 2, 5, 10 і 15 хв. після додавання субстрату (на предметному скельці).

Результати спостереження записати в таблицю.

Номер пробірки	Температурний режим	Реакція з розчином Люголя через певні проміжки часу (у хв.)				
		0	2	5	10	15
1	15-20 °C					
2	38 °C					
3	0 °C					
4	100 °C					

Залежність активності амілази від температури показати на графіку.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. До якого класу ферментів належить амілаза?
2. Яким чином зміна температури впливає на активність амілази?
3. Як можна виявити зміну активності амілази?
4. Які значення температурного оптимуму для амілази?

РОБОТА № 2

ВПЛИВ pH СЕРЕДОВИЩА НА АКТИВНІСТЬ АМІЛАЗИ

Принцип методу. Вплив pH середовища на активність амілази визначають за зміною інтенсивності забарвлення розчину крохмалю з розчином Люголя внаслідок утворення декстринів.

Матеріал для дослідження: амілаза слини.

Реактиви: 0,5% розчин крохмалю, 1н розчин хлоридної кислоти, розчин Люголя.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, піпетки, термостат.

Хід роботи

У дві пробірки внести по 1 мл слини. В першу додати 1 мл 1н розчину хлоридної кислоти, у другу – 1 мл води. Через 5 хв. у кожную пробірку додати по 0,5 мл 0,5% розчину крохмалю і перемішати. Пробірки поставити в термостат при 37°C на 20 хв. Після чого додати по 3 краплі розчину Люголя. Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Чим пояснюється чутливість ферментів до pH середовища?
2. Яким чином зміна pH середовища впливає на активність амілази?
3. В яких межах значень pH лежить активність більшості ферментів? Чому?
4. При якому значенні pH активність ферментів мінімальна?

РОБОТА № 3

СПЕЦИФІЧНІСТЬ АМІЛАЗИ І САХАРАЗИ

Принцип методу. Амілаза каталізує гідролітичне розщеплення полісахариду крохмалю з утворенням мальтози, яка містить вільний глікозидний гідроксил, що зумовлює відновні властивості. На дисахариди амілаза не діє.

Фермент сахараза каталізує гідролітичне розщеплення сахарози з утворенням β ,D-фруктози та α ,D-глюкози і не діє на полісахариди та інші дисахариди.

Матеріал для дослідження: розчин слини (1:5), препарат сахарози.

Реактиви: 0,5% розчин крохмалю, 0,5% розчин сахарози, розчин Люголя, реактив Фелінга, дистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки, мірний циліндр, спиртівка, термостат.

Хід роботи

У дві пробірки внести по 3 мл 0,5% розчину крохмалю і додати: в першу – 1 мл розчину слини, що містить амілазу, у другу – 1 мл препарату сахарози, перемішати і залишити у термостаті при 37°C на 10-15 хв.

У дві інші пробірки внести по 3 мл 0,5% розчину сахарози, в першу додати 1 мл препарату сахарози, у другу – 1 мл розчину слини і залишити в тих же умовах.

Через 10-15 хв. у пробірки з крохмалем додати по 5-10 краплин розчину Люголя і спостерігати за зміною забарвлення.

У дві інші пробірки додати по 2 мл реактиву Фелінга і нагріти до кипіння. В цьому випадку дія ферменту виявляється за позитивною реакцією Фелінга: утворенням спочатку осаду жовтого кольору, який поступово змінює забарвлення на цегляно-червоне (реакція характерна для відновлюючих дицукрів).

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. До якого класу належать ферменти амілаза і сахароза?
2. Який вид специфічності характерний для амілази і сахарози? Чому?
3. На чому ґрунтується виявлення дії амілази?
4. Яким чином виявляють дію сахарози?

РОБОТА № 4 СПЕЦИФІЧНІСТЬ ДІЇ УРЕАЗИ

Принцип методу. Фермент уреаза каталізує розщеплення сечовини на карбон (IV) оксид і аміак, що зумовлює зміну рН середовища, яке визначають за присутності фенолфталеїну.

На тіосечовину фермент уреаза не діє, тобто для нього характерною є абсолютна специфічність.

Матеріал для дослідження: препарат уреаз (соєва мука, подрібнене гарбузове насіння).

Реактиви: 5% розчин сечовини, 5% розчин тіосечовини, 0,1% розчин фенолфталеїну, дистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, шпатель, мірний циліндр, піпетки, термостат.

Хід роботи

У дві пробірки на кінчику шпателя внести препарат уреазу і по 5 крапель 0,1% розчину фенолфталеїну. В першу додати 1 мл 5% розчину сечовини, а у другу – 1 мл 5% розчину тіосечовини. Пробірки поставити в термостат при 20°C на 15 хв.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. До якого класу ферментів належить уреазу? Яка її біологічна роль?
2. Який вид специфічності характерний для уреазу? Чому?
3. Пояснити механізм дії уреазу.
4. Яким чином виявляють дію уреазу?

3. ДІЯ АКТИВАТОРІВ ТА ІНГІБІТОРІВ НА АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ

РОБОТА № 1

ВПЛИВ АКТИВАТОРІВ ТА ІНГІБІТОРІВ НА АКТИВНІСТЬ АМІЛАЗИ

Активність амілази може змінюватися залежно від виду йонів присутніх у середовищі. Одні з них можуть активувати фермент, а інші пригнічувати його дію. Зокрема, протилежний вплив на активність амілази виявляють аніони хлоридної та сульфатної кислот.

Матеріал для дослідження: розчин слини (1:3).

Реактиви: 1% розчин натрій хлориду, 1% розчин купрум (II) сульфату, 1% розчин крохмалю, розчин Люголя, дистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, піпетки.

Хід роботи

У три пробірки внести по 3 мл розчину слини. В першу додати 2 краплі 1% розчину натрій хлориду, у другу – 2 краплі 1% розчину купрум (II) сульфату, у третю – одну краплю води. В кожную пробірку додати по 5 крапель 1% розчину крохмалю і залишити на 10-15 хв. при кімнатній температурі. Після цього у пробірки додати по 1-2 краплі розчину Люголя.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Які аніони є активаторами чи інгібіторами амілази?

2. Яким чином впливають активатори на активність ферментів?
3. Чому під впливом інгібіторів активність ферментів знижується?
4. Які є види гальмування ферментів?

РОБОТА № 2 ГАЛЬМУЮЧА ДІЯ ХЛОРИД-ІОНІВ НА ОКИСНЮВАЛЬНІ ФЕРМЕНТИ

До складу фруктів і овочів входять ферменти поліфенолоксидази, що каталізують реакції окиснення поліфенолів до хінонів, які зумовлюють потемніння зрізів рослинних тканин.

Матеріал для дослідження: свіже яблуко або картопля.

Реактиви: кристалічний натрій хлорид, кристалічний натрій йодид.

Обладнання: фільтрувальний папір, скальпель.

Хід роботи

Три шматочки яблука (картоплі) помістити на пронумеровані фільтрувальні папірці. На зріз першого нанести натрій хлорид, другого – натрій йодид, третій (контрольний) залишити без змін. Через 10-15 хв. спостерігати за зміною забарвлення.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. З якою метою на шматочки яблука (картоплі) наносили натрій хлорид і натрій йодид?
2. Які йони виявляють гальмуючу дію на окиснювальні ферменти?
3. Записати хімізм перетворення фенолів у хінони.

ЛАБОРАТОРНО-ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №6
ТЕМА: ВІТАМІНИ: БУДОВА, ВЛАСТИВОСТІ,
БІОЛОГІЧНА РОЛЬ

Опрацювати теоретичний матеріал, використовуючи літературу

Основна: [1, с. 240-283]; [2, с. 173-199]; [3, с. 148-173]; [4, с. 399-417]; [5, с. 107-150].

Додаткова: [1]; [3]; [4]; [5]; [6]; [7]; [8]; [9]; [10].

Методичні вказівки

1. При опрацюванні теоретичного матеріалу звернути увагу на:
 - а) принципи класифікації вітамінів;
 - б) особливості будови і властивостей та біологічну роль водорозчинних і жиророзчинних вітамінів.
2. При виконанні практичних робіт дотримуватись правил техніки безпеки.
3. Оформити роботи, пояснити результати, записати висновки і виконати завдання для самоконтролю знань.

Теоретичні питання

1. Дати визначення поняття “вітаміни”, їх роль у процесах життєдіяльності.
2. Історія розвитку вчення про вітаміни. Роботи вітчизняних і зарубіжних вчених у галузі вітамінології.
3. Класифікація та номенклатура вітамінів. Особливості фізіологічної дії водорозчинних і жиророзчинних вітамінів.
4. Поняття про гіпо- та авітамінози, гіперавітамінози. Причини їх розвитку.
5. Поширення, хімічна природа і фізіологічна роль в організмі водорозчинних вітамінів та добова потреба людини в них.
6. Характеристика, будова і властивості водорозчинних вітамінів.
7. Будова, властивості та симптомокомплекси нестачі вітаміну В₁.
8. Арибофлавіноз, характерні ознаки.
9. Пелагра, причини розвитку, шляхи профілактики.
10. Ознаки відсутності вітаміну В₆. Будова і функції.
11. Антискорбутний вітамін. Історія вивчення, будова, функції.
12. Біотин. Будова і властивості.
13. Специфічні ознаки авітамінозів, викликані відсутністю або недостатньою кількістю у їжі водорозчинних вітамінів.

14. Поширення, хімічна природа та фізіологічна роль в організмі жиророзчинних вітамінів і добова потреба людини в них.
15. Характеристика, будова та властивості жиророзчинних вітамінів.
16. Специфічні ознаки авітамінозів, викликаних відсутністю або недостатньою кількістю в їжі жиророзчинних вітамінів.
17. Роль вітаміну А в акті зору.
18. Біологічно активні форми вітаміну А в організмі, їх роль в забезпеченні різноманітних функцій організму.
19. Утворення вітаміну А з попередників.
20. Форми вітаміну D, їх біологічна роль.
21. Утворення вітаміну D з попередників.
22. Вітамін К. Будова і властивості.
23. Токоферол: будова, властивості, біологічна роль.
24. Убіхінон. Будова, біологічна роль.
25. Вітамін F: особливості будови, функції.
26. Вітаміноподібні сполуки: будова, властивості, функції.
27. Механізм впливу вітамінів на процеси обміну речовин в організмі.
28. Роль вітамінів у лікуванні захворювань.

Тестові завдання

З наведених висловів вибрати правильні:

1. А. Вітамін В₁₂ широко поширений у тканинах вищих рослин;
Б. Вітамін В₂ – похідне каротинів;
В. Вітамін Е – безбарвна масляниста рідина, добре розчинна в рослинних маслах, спирті, сірчаному та петролейному ефірах;
Г. Всі вітаміни групи К (без винятку) не розчинні у воді;
Д. Вікасол – безбарвний розчинний у воді дрібнокристалічний порошок.
2. А. Джерелом вітаміну Е для людини є рослинні масла, салат, зернові продукти, різні тваринні тканини, особливо жирова;
Б. Добова потреба у вітаміні В₆ для людини складає 2-4 мг;
В. Вітамін В₆ є похідним стеролів;
Г. Джерелом вітаміну С є переважно їжа рослинного походження.
3. А. Пангамова кислота – широко розповсюджена в природі сполука;
Б. Джерелом нікотинової кислоти є хліб, різні крупи, м'ясні продукти (особливо печінка), дріжджі;
В. Пангамова кислота являє собою маслянисту рідину;

- Г. Головним джерелом вітаміну D є ягоди, овочі та фрукти;
 Д. Природнім антагоністом вітаміну K є гепарин-гетерополісахарид, що продукується у тканинах печінки й легень, і затримує процес згортання крові.
4. А. Хімічну природу вікасолу встановлено А. Паладіним і його співробітниками (1942 р.);
 Б. Антивітаміном пантотенової кислоти є пентоїлтаурин – антимікробна речовина;
 В. Джерелом вітаміну E є переважно фрукти;
 Г. Вітаміни групи K, за винятком вікасолу, нерозчинні у воді, але добре розчиняються в петролейному ефірі, ацетоні, бензолі і спирті;
 Д. Добова потреба у вітаміні A для дітей нижче, ніж для дорослих.
5. А. Вітамін K₃ – жовтуватий кристалічний порошок із температурою плавлення 150 °C;
 Б. Тіамін не вдалося одержати синтетично;
 В. Добова потреба у вітаміні A для дорослих нижча, ніж для дітей;
 Г. Антивітаміном тіаміну є дегідроксипіридоксин;
 Д. Карнітин – похідне піридину.
6. А. Вітамерія полягає у тому, що фізіологічною дією, характерною для одного вітаміну, володіють декілька схожих за хімічною будовою сполук – вітамерів;
 Б. Карнітин (вітамін B₇) – γ-триметиламінобутират;
 В. Біотин – похідне ізоалоксазину;
 Г. Вітамін B₁₂ – попередник ліпідів;
 Д. Вітамін F одержують із льняної та соняшникової олії.
7. А. Усі вітаміни містять аміногрупу;
 Б. Недостатнє надходження в організм вітамінів викликає авітаміноз;
 В. При відсутності вітамінів у їжі розвивається авітаміноз;
 Г. Біотин у тканинах міститься переважно у зв'язаному з білком стані;
 Д. Інозит (біос I) – шестиатомний циклічний спирт – похідне циклогексану (циклогексанол).
8. А. Ендогенні гіповітамінози виникають при недостатньому надходженні в організм того чи іншого вітаміну;
 Б. На пантотенову кислоту багаті дріжджі, горох, рисові висівки, молоко, яйця, печінка, серце, нирки;
 В. Вітамін A₂ входить до складу зорового пурпуру родопсину;

- Г. Вітамін А₁ входить до складу зорового пурпуру родопсину;
Д. Піритіамін – антивітамін тіаміну.
9. А. Вітамін D широко використовується для підвищення продуктивності птахів та великої рогатої худоби;
Б. Каротини широко розповсюджені й синтезуються в організмі тварин;
В. Джерелом вітаміну D для людини є продукти рослинного походження, в основному фрукти і ягоди;
Г. Інозит необхідний для росту мікроорганізмів, нормального розвитку і життєдіяльності тварин;
Д. Вперше на важливу роль вітамінів як додаткових факторів харчування вказав в 1881 році М.І. Лунін.
10. А. Джерелом вітаміну D для людини є риб'ячий жир, вершкове масло, жовток яйця, печінка тварин, молоко;
Б. Параамінобензойна кислота добре розчинна у воді, спирті, ефірі;
В. Біотин міститься в продуктах рослинного і тваринного походження;
Г. Вітамін U – похідне ізоалоксазину;
Д. Вітамін К – похідне піримідину.
11. А. Головним джерелом вітаміну С є ягоди, фрукти та овочі;
Б. Антивітамін біотину – авідин;
В. Антивітамін вітаміну В₆ – піридин-3-сульфо кислота;
Г. Вітамін А входить до складу зорового пурпуру прісноводних риб – порфіропсину;
Д. При недостатньому надходженні в організм вітамінів розвивається гіпоавітаміноз.
12. А. Вітамін D₂ можна отримати із плодів шипшини;
Б. Вітамін U міститься у листях капусти;
В. Основним депо вітаміну В₁₂ в організмі є печінка;
Г. Основне джерело вітаміну А – тваринні продукти;
Д. Фолієва кислота вперше була виділена із зерен пшениці.

Вправи

1. Записати формулу нікотинової кислоти та її аміду. До складу якої біологічно активної сполуки входить нікотинамід? Будова та біологічна роль цієї речовини.
2. Будова і біологічна роль піридоксалу та піридоксаміну. З яким класом ферментів пов'язана їх біологічна роль, навести приклади.

3. Здійснити перетворення за схемою: аскорбінова кислота $\rightarrow$ дегідроаскорбінова кислота $\rightarrow$ щавлева кислота + треонова кислота.
4. Будова *n*-амінобензойної кислоти. До складу якої біологічно активної сполуки вона входить?
5. Записати рівняння реакції за поданою схемою:
 β -каротин $\rightarrow$ 2 молекули ретинолу.
6. Записати будову ретинолу, ретиналю, ретиноевої кислоти, ретинолацетату.
7. Здійснити перетворення: вітамін А – кислота $\rightarrow$ вітамін А – спирт; вітамін А – альдегід $\rightarrow$ вітамін А – ефір.
8. Будова філохінонів (вітамін K₁, K₂ і K₃).
9. Яка будова α -, β - та γ -токоферолів.
10. Записати схеми реакцій, які пояснюють механізм участі убіхінону в окисно-відновних реакціях.
11. Будова 5,6,7,8-тетрагідрофолієвої кислоти. Пояснити роль фолатів в організмі.
12. Описати основні симптомокомплекси нестачі водорозчинних вітамінів (B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B_C, B₁₂, C і P).
13. Описати основні симптомокомплекси нестачі жиророзчинних вітамінів (A, D, E, K і F).
14. Добова потреба дорослої людини в нікотиновій кислоті (7,5 мг) зменшується, якщо в їжі міститься велика кількість триптофану. Який з цього можна зробити висновок?

1. ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА ЖИРОРОЗЧИННІ ВІТАМІНИ

Вітамін А (ретинол)

РОБОТА № 1 РЕАКЦІЯ ДРУММОНДА

Принцип реакції. Сульфатна кислота, що володіє водовіднімаючими властивостями, сприяє перетворенню вітаміну А в комплексну сполуку червоно-фіолетового кольору. Реакція Друммонда не володіє специфічністю.

Матеріал для дослідження: масляний розчин вітаміну А.

Реактиви: концентрована сульфатна кислота.

Обладнання: предметне скло, скляні палички.

Хід роботи

На сухе предметне скельце нанести 3 краплі масляного розчину вітаміну А і обережно додати 2 краплі концентрованої сульфатної кислоти. Спостерігати за зміною забарвлення.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Чим зумовлена реакція Друмонда?
2. Які властивості характерні для вітаміну А?
3. Що являє собою масляний розчин вітаміну А? Записати його будову.
4. Пояснити біологічну роль вітаміну А.
5. Записати біологічно активні форми вітаміну А.

РОБОТА № 2

РЕАКЦІЯ З ФЕРУМ (III) СУЛЬФАТОМ

Принцип реакції. Вітамін А з ферум (III) сульфатом у кислому середовищі дає сполуку, забарвлену в рожево-червоний колір (каротини дають зеленувате забарвлення).

Матеріал для дослідження: масляний розчин вітаміну А або риб'ячий жир.

Реактиви: концентрована ацетатна кислота насичена ферум (II) сульфатом, концентрована сульфатна кислота.

Обладнання: предметне скельце, скляні палички.

Хід роботи

На сухе предметне скельце нанести 2 краплі масляного розчину вітаміну А, обережно додати 3 краплі концентрованої ацетатної кислоти насиченої ферум (II) сульфатом і 1-2 краплі концентрованої сульфатної кислоти. Спостерігати за зміною забарвлення.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. За допомогою якої якісної реакції можна відрізнити каротин і вітамін А?
2. Які захворювання розвиваються при нестачі вітаміну А.
3. Чому добову потребу у вітаміні А виражають в інтернаціональних одиницях? Яке їх абсолютне значення?
4. Які межі рекомендованих норм добової потреби у вітаміні А.

РОБОТА № 3
Виявлення наявності каротиноїдів у біоматеріалі

Матеріал для дослідження: свіжа морква, пасерована в жирі морква, жовток курячого яйця.

Реактиви: ефір медичний, концентрована сульфатна кислота, дистильована вода.

Обладнання: фарфорова ступка, пробірки з пробками, піпетки, Шуттель-апарат, терези з набором різноважок.

Хід роботи

0,5 г подрібненої моркви внести у фарфорову ступку, додати 1 мл води і розтерти до гомогенного стану. Гомогенну масу перенести у пробірку, обережно (під тягою) додати 1 мл ефіру, закрити пробкою та поставити в Шуттель-апарат для струшування протягом 10 хв. Після розшарування суміші 0,5 мл верхнього ефірного шару перенести в чисту пробірку і провести реакцію Друмонда (обережно додати 3-4 краплі концентрованої сульфатної кислоти).

Реакцію Друмонда провести з морквою, пасерованою в жирі.

Виявити наявність вітаміну А в жовтку курячого яйця.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Що таке каротиноїди? Яка їх будова?
2. Яка будова α - і β -каротину? В чому різниця між ними?
3. Яким чином β -каротин перетворюється на вітамін А?
4. З якою метою проводили пасерування моркви в жирі?

Вітамін D₃ (холекальциферол)

РОБОТА № 1
РЕАКЦІЯ З АНІЛІНОМ

Принцип реакції. При нагріванні розчину вітаміну D₃ або риб'ячого жиру з сумішшю аніліну і концентрованої хлоридної кислоти розчин забарвлюється в червоний колір.

Матеріал для дослідження: масляний розчин вітаміну D₃ або риб'ячий жир.

Реактиви: хлороформ, анілінова суміш.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки, спиртівка.

Хід роботи

У суху пробірку внести 2 краплі масляного розчину вітаміну D або риб'ячого жиру, додати 10 крапель хлороформу, 2 краплі анілінової суміші, перемішати і нагріти. Спостерігати за зміною забарвлення.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Які властивості характерні для вітаміну D?
2. На чому ґрунтується якісне визначення вітаміну D в біоматеріалі?
3. Біологічна роль вітаміну D. Ознаки нестачі.

РОБОТА № 2

ВИЯВЛЕННЯ ЕРГОСТЕРОЛУ У ДРІЖДЖАХ

Принцип реакції. Ергостерол за будовою подібний до холестеролу, тому він дає характерну для нього реакцію з ацетангідридом і сульфатною кислотою, внаслідок чого утворюються сполуки синього або зеленого кольору.

Матеріал для дослідження: дріжджі.

Реактиви: хлороформ, концентрована сульфатна кислота, ацетангідрид.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки.

Хід роботи

У пробірку внести невелику кількість сухих дріжджів, додати 15-20 крапель хлороформу і ретельно перемішати. Отриманий екстракт профільтрувати. До фільтрату додати по 5 крапель ацетангідриду і концентрованої сульфатної кислоти. Спостерігати за зміною забарвлення.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Записати будову ергостеролу.
2. Назвіть відомі Вам рослинні стерини. Яка їх біологічна роль?
3. Записати хімізм реакцій утворення кальційтріолу. Пояснити його біологічну роль.

Вітамін Е (токоферолі)

РОБОТА № 1

РЕАКЦІЯ З КОНЦЕНТРОВАНОЮ НІТРАТНОЮ КИСЛОТОЮ

Принцип реакції. α -токоферол з концентрованою нітратною кислотою утворює сполуку, забарвлену в червоний колір, так як продукт окиснення α -токоферолу має хіноїдну структуру. Цю реакцію використовують і для кількісного визначення α -токоферолу.

Матеріал для дослідження: 0,1% спиртовий розчин α -токоферолу.

Реактиви: концентрована нітратна кислота, кристалічна сахароза.

Обладнання: предметне скельце, штатив з пробірками, піпетки.

Хід роботи

Дослід 1. На сухе предметне скельце нанести 2 краплі розчину вітаміну Е, декілька кристалів сахарози і 2 краплі концентрованої нітратної кислоти. Спостерігати за появою забарвлення.

Дослід 2. В суху пробірку внести 5 крапель 0,1% спиртового розчину α -токоферолу і 1 мл концентрованої нітратної кислоти. При струшуванні утворюється емульсія, яка поступово змінює забарвлення.

Пояснити результати дослідів та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. На яких властивостях α -токоферолу ґрунтується його взаємодія з концентрованою нітратною кислотою?
2. Що являють собою вітамери вітаміну Е? Записати їх будову.
3. Які властивості характерні для вітаміну Е?

РОБОТА № 2

РЕАКЦІЯ З ФЕРУМ (III) ХЛОРИДОМ

Принцип реакції. α -токоферол окиснюється ферум (III) хлоридом до α -токоферилхінону, який має червоне забарвлення.

Матеріал для дослідження: 0,1% спиртовий розчин α -токоферолу.

Реактиви: 10% розчин ферум (III) хлориду.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки на 1 мл.

Хід роботи

У суху пробірку внести 0,5 мл 1% спиртового розчину α -токоферолу, додати 0,5 мл 10% розчину ферум (III) хлориду і старанно перемішати. Спостерігати за зміною забарвлення.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Пояснити принцип реакції взаємодії α -токоферолу з ферум (III) хлоридом?
2. Які якісні реакції характерні для токоферолу?
3. Чому вітамін Е називають антистерильним?
4. Які продукти харчування можуть забезпечити добову потребу в вітаміні Е?

Вітамін К (філохінони)

РОБОТА № 1

РЕАКЦІЯ ВІТАМІНУ К₃ З АНІЛІНОМ

Принцип реакції. Спиртовий розчин вітаміну К₃ (2-метил-1,4-нафтохінону) за присутності аніліну забарвлюється в червоний колір, що зумовлено утворенням 2-метил-3-феніламіно-1,4-нафтохінону та 2-метил-1,4-діоксинафталіну:

Матеріал для дослідження: 0,05% спиртовий розчин вікасолу.

Реактиви: розчин аніліну.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки.

Хід роботи

До 1 мл 0,05% розчину вікасолу додати 2 краплі розчину аніліну і перемішати. Рідина забарвлюється в червоний колір.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Чим зумовлена реакція взаємодії вітаміну К з аніліном?
2. Яка біологічна роль вітаміну К?
3. Які ознаки нестачі вітаміну К?

РОБОТА № 2 РЕАКЦІЯ З ЦИСТЕЇНОМ

Принцип реакції. Вікасол за присутності цистеїну в лужному середовищі утворює комплекс, забарвлений у лимонно-жовтий колір.

Матеріал для дослідження: 0,1% водний розчин вікасолу.

Реактиви: 0,05% розчин цистеїну, 10% розчин натрій гідроксиду.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки на 1 мл.

Хід роботи

До 1 мл 0,1% водного розчину вікасолу додати 1 мл 0,05% розчину цистеїну і 0,5 мл 10% розчину натрій гідроксиду. Спостерігати за зміною забарвлення.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Які якісні реакції дають змогу виявити вітамін К в розчині?
2. Назвіть джерела вітаміну К. Яка добова потреба у цьому вітаміні?
3. Чим відрізняються вітамери вітаміну К? Запишіть їх будову.

2. ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА ВОДОРозчинні Вітаміни

Вітамін В₁ (тіамін)

РОБОТА № 1 РЕАКЦІЯ ОКИСНЕННЯ ТІАМІНУ ДО ТІОХРОМУ

Принцип реакції. Тіамін у лужному середовищі під впливом калій гексаціаноферату (III) перетворюється в тіохром, який за присутності ізобутилового спирту дає інтенсивно-синю флюоресценцію. Ця реакція дуже чутлива і специфічна. Вона використовується і для кількісного визначення тіаміну.

Матеріал для дослідження: 0,5% розчин тіаміну.

Реактиви: 1% розчин калій гексаціаноферату (III), 30% розчин натрій гідроксиду, ізобутиловий спирт.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр.

Хід роботи

До 1 мл розчину тіаміну додати 2 мл суміші 1% розчину калій гексаціаноферату (III) і 30% розчину натрій гідроксиду (1:1), добре перемішати та залишити на 3 хв. Тіохром екстрагувати 5 мл ізобутилового спирту енергійним і рівномірним струшуванням протягом 2 хв. Ізобутиловий екстракт тіохрому в ультрафіолетовій частині спектру дає інтенсивно-синю флюоресценцію.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Пояснити механізм реакції окиснення тіаміну до тіохрому?
2. Які ознаки нестачі вітаміну В₁?
3. В яких продуктах харчування міститься вітамін В₁ та які рекомендовані норми добової потреби в цьому вітаміні?

Вітамін В₂ (рибофлавін)

РОБОТА № 1

ВІДНОВЛЕННЯ РИБОФЛАВІНУ

Принцип реакції. Реакція зумовлена відновленням рибофлавіну спочатку в родофлавін (проміжну сполуку) червоного кольору, а потім у безбарвний лейкофлавін.

Матеріал для дослідження: 0,025% розчин рибофлавіну.

Реактиви: концентрована хлоридна кислота, цинк металічний.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки.

Хід роботи

У пробірку внести 1 мл розчину рибофлавіну, додати 0,5 мл концентрованої хлоридної кислоти і шматочок металічного цинку. У пробірці утворюються бульбашки водню, який відновлює рибофлавін, рідина поступово стає рожевою, а потім знебарвлюється.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Пояснити механізм участі рибофлавіну в реакціях оксидоредукції.
2. Записати хімізм утворення коферментної форми вітаміну В₂.

3. Вміст вітаміну В₂ в картоплі складає 0,15 мг%, у процесі приготування втрачається близько 1/3 вітаміну. Розрахувати кількість продуктів, яка може задовольнити добову потребу.

Вітамін В₅ (нікотинова кислота, нікотинамід)

РОБОТА № 1 РЕАКЦІЯ З КУПРУМ (II) АЦЕТАТОМ

Принцип реакції. При нагріванні нікотинової кислоти з розчином купрум (II) ацетату утворюється синій осад мідної солі нікотинової кислоти

Матеріал для дослідження: нікотинова кислота кристалічна.

Реактиви: 10% розчин ацетатної кислоти, 5% розчин купрум (II) ацетату.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, спиртівка, терези з набором різноважок.

Хід роботи

У пробірку внести 5-10 мг нікотинової кислоти, довести до кипіння та розчинити при нагріванні у 2 мл 10% розчину ацетатної кислоти. Після чого додати рівний об'єм 5% розчину купрум (II) ацетату. Рідина стає каламутною і забарвлюється у блакитний колір, а при відстоюванні випадає осад синього кольору.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Пояснити механізм реакції взаємодії вітаміну РР з купрум (II) ацетатом.
2. Яка будова нікотинової кислоти та її біологічна роль?
3. В яких продуктах харчування міститься вітамін РР?

РОБОТА № 2 РЕАКЦІЯ З НАТРІЙ КАРБОНАТОМ

Принцип реакції. При нагріванні нікотинової кислоти з натрій карбонатом утворюється піридин, який має специфічний різкий запах.

Матеріал для дослідження: нікотинова кислота кристалічна.

Реактиви: безводний натрій карбонат.

Обладнання: фарфоровий тигель, електрична плитка.

Хід роботи

Роботу виконувати під тягою!

У фарфоровому тиглі змішати нікотинову кислоту з безводним натрій карбонатом і нагріти.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Чим зумовлена поява запаху піридину?
2. Яка систематична назва вітаміну PP?
3. Яким чином можна запобігти розвитку PP-авітамінозу?

РОБОТА № 3

ВІДМІННІСТЬ МІЖ НІКОТИНОВОЮ КИСЛОТОЮ І НІКОТИНАМІДОМ

Принцип реакції. При нагріванні нікотинамід у лугу виділяється аміак, який змінює колір лакмусового папірця.

Матеріал для дослідження: нікотинова кислота кристалічна, нікотинамід кристалічний.

Реактиви: 10% розчин натрій гідроксиду, дистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки, спиртівка, лакмусовий папірець.

Хід роботи

Взяти дві пробірки: в одну внести невелику кількість нікотинової кислоти, у другу – нікотинамід. В кожен пробірку додати по 2 мл води та 1 мл 10% розчину натрій гідроксиду, перемішати і нагріти до кипіння. До отвору пробірок прилаштувати змочений водою лакмусовий папірець. Спостерігати за зміною його кольору.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Пояснити різницю в будові і властивостях нікотинової кислоти та нікотинамід.
2. Записати будову нікотинової кислоти і нікотинамід.
3. Записати хімізм реакції амідування нікотинової кислоти.

Вітамін В₆ (піридоксин)

РОБОТА № 1 РЕАКЦІЯ З ФЕРУМ (III) ХЛОРИДОМ

Принцип реакції. При взаємодії піридоксину з розчином ферум (III) хлориду утворюється комплексна сполука червоного кольору.

Матеріал для дослідження: 5% водний розчин піридоксину.

Реактиви: 5% розчин ферум (III) хлориду.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки на 1 мл.

Хід роботи

До 1 мл 5% розчину піридоксину додати 0,5 мл 5% розчину ферум (III) хлориду і перемішати. Спостерігати за зміною забарвлення.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Яка будова та властивості вітаміну В₆?
2. На чому ґрунтується участь вітаміну В₆ в метаболічних реакціях організму?
3. Які ознаки нестачі вітаміну В₆ та добова потреба у цьому вітаміні?

Вітамін В₁₂ (ціанкобаламін)

РОБОТА № 1 ВИЯВЛЕННЯ КОБАЛЬТУ У СКЛАДІ ВІТАМІНУ В₁₂

Принцип методу. При нагріванні вітаміну В₁₂ з калій гідросульфідом або при дії сильного окисника відбувається його руйнування. Кобальт, який вивільняється за цих умов, можна виявити за допомогою α -нітрозо- β -нафтолу, з яким він утворює комплексну сполуку оранжево-червоного кольору. При високій концентрації цієї солі вона може утворювати осад яскраво-червоного кольору.

Матеріал для дослідження: аптечний препарат вітаміну В₁₂.

Реактиви: I. Концентрована нітратна кислота, концентрована хлоридна кислота, 1% ацетоновий розчин α -нітрозо- β -нафтолу, 10% розчин натрій гідрофосфату, дистильована вода.

II. Концентрована сульфатна кислота, гідроген пероксид, 10% розчин тіосечовини, дистильована вода.

Обладнання: мірний циліндр, піпетки, фарфоровий тигель, піщана баня, спиртівка, лакмусовий папір, смужки фільтрувального паперу.

Хід роботи

Дослід 1. Половину вмісту ампули з розчином вітаміну V_{12} внести у фарфоровий тигель, випарити до утворення сухого залишку і прожарити. Після охолодження додати 1 мл концентрованої нітратної кислоти, 3 мл концентрованої хлоридної кислоти та прокип'ятити до повного випаровування рідини. Після охолодження залишок розчинити у 2 краплях води, додати 1 краплю 1% ацетонового розчину α -нітросо- β -нафтолу і по краплях 10% розчин калій гідрофосфату до слабколувної реакції (за лакмусом). За наявності кобальт-(3+)-іонів з'являється червоно-буре забарвлення, якщо вони відсутні – забарвлення жовто-зелене.

Дослід 2. Вміст ампули з розчином вітаміну V_{12} внести у фарфоровий тигель, додати 10 крапель концентрованої сульфатної кислоти та поставити на піщану баню на 10 хв. Потім додати 2 краплі гідроген пероксиду – рідина знебарвлюється. Після знебарвлення рідини в тигель додати 1 мл води. Після цього на смужку фільтрувального паперу нанести краплю 10% розчину тіосечовини, підсушити і на те ж саме місце нанести 2 краплі одержаного мінералізату. Спостерігати появу забарвлення.

Пояснити результати дослідів та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Яка будова вітаміну V_{12} ? Чим він відрізняється від інших вітамінів?
2. Яка біологічна роль вітаміну V_{12} в організмі?
3. Які ознаки нестачі вітаміну V_{12} , причини?

Вітамін С (аскорбінова кислота)

РОБОТА № 1 РЕАКЦІЯ З МЕТИЛЕНОВИМ СИНІМ

Принцип реакції. Реакція ґрунтується на відновлюючих властивостях аскорбінової кислоти. Під дією аскорбінової кислоти розчин метиленового синього знебарвлюється.

Матеріал для дослідження: 0,1% розчин аскорбінової кислоти.

Реактиви: 0,01% розчин метиленового синього, 10% розчин натрій карбонату, дистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки, спиртівка.

Хід роботи

У дві пробірки внести по 1 краплі 0,01% розчину метиленової сині і 10% розчину натрій карбонату. В першу пробірку додати 5 крапель 0,1% розчину аскорбінової кислоти, у другу – 5 крапель води і одночасно нагріти обидві пробірки. Спостерігати за зміною забарвлення.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Похідним якої сполуки є вітамін С?
2. Записати схему зворотного і незворотного окиснення вітаміну С.
3. Які рекомендовані норми добової потреби у вітаміні С?

РОБОТА № 2

РЕАКЦІЯ З КАЛІЙ ГЕКСАЦІАНОФЕРАТОМ (III)

Принцип реакції. Аскорбінова кислота відновлює калій гексаціановий ферат (III) в калій гексаціановий ферат (II), який з ферум (3+)-іонами дає сіль $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ синього або синьо-зеленого кольору:

Матеріал для дослідження: 0,1% розчин аскорбінової кислоти.

Реактиви: 1% розчин калій гексаціанового ферату (III), 1% розчин ферум (III) хлориду.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки на 1 мл.

Хід роботи

До 1 мл розчину аскорбінової кислоти додати 1 мл 1% розчину калій гексаціанового ферату (III) і 0,5 мл 1% розчину ферум (III) хлориду. Спостерігати зміну забарвлення, внаслідок утворення калій гексаціанового ферату (II).

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. На яких властивостях аскорбінової кислоти ґрунтується реакція з калій гексаціановим фератом (III)?
2. Записати хімізм реакції взаємодії аскорбінової кислоти з калій гексаціановим фератом (III).

3. Яка кількість квашеної капусти може забезпечити добову потребу людини у вітаміні С, якщо вона містить 18,4 мг% цього вітаміну?

РОБОТА № 3 РЕАКЦІЯ З РОЗЧИНОМ ЛЮГОЛЯ

Принцип реакції. Аскорбінова кислота знебарвлює розчин Люголя в результаті відновлення йоду до гідроген йодиду.

Матеріал для дослідження: 1% розчин аскорбінової кислоти.

Реактиви: розчин Люголя, дистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки.

Хід роботи

У дві пробірки внести по 0,5 мл дистильованої води і 2-3 краплі розчину Люголя. В одну пробірку додати 0,5 мл дистильованої води, у другу – 0,5 мл 1% розчину аскорбінової кислоти. Спостерігати за зміною забарвлення.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Які властивості характерні для вітаміну С?
2. За яких умов проходить руйнування вітаміну С? Записати хімізм реакції.
3. Які продукти харчування можуть забезпечити добову потребу в вітаміні С і в якій кількості?

3. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВІТАМІНІВ

РОБОТА № 1 КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТИ В РОСЛИННОМУ БІОМАТЕРІАЛІ ЗА МЕТОДОМ ТІЛЬМАНСА

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

Матеріал для дослідження: картопля, яблука, свіжа і кисла капуста, цибуля, лимон, хвоя, шипшина.

Реактиви: 0,001н розчин 2,6-дихлорфеноліндофенолу (реактив Тільманса), 2% розчин хлоридної кислоти, дистильована вода.

Обладнання: ступки, кварцевий пісок, скляні палички, колбочки на 50-100 мл, лійки, вата для фільтрування, хімічні стакани на 20 мл, піпетки на 5 мл, мікробюретка, терези з набором різноважок.

Хід роботи

5 г біоматеріалу розтерти у ступці з невеликою кількістю кварцевого піску при поступовому додаванні 9 мл 2% розчину хлоридної кислоти. Отриману витяжку профільтрувати через вату. До 3 мл фільтрату додати 2-5 мл води і відтитрувати з мікробюретки 0,001 н розчином 2,6-дихлорфеноліндофенолу до появи рожевого забарвлення, яке не зникає протягом 30 сек.

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

$$X = \frac{0,088 \cdot a \cdot V \cdot 100}{v \cdot C} \text{ мг\%, де}$$

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

V – загальний об'єм фільтрату, мл;

V – кількість фільтрату, взятого для титрування, мл;

C – наважка біоматеріалу, г.

Провести розрахунки та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. У чому суть кількісного визначення аскорбінової кислоти за методом Тільманса?
2. Які етапи визначення кількості вітаміну С в рослинному біоматеріалі?
3. Що таке гомогенізація?

РОБОТА № 2 КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВІТАМІНУ С У МОЛОЦІ ЗА МЕТОДОМ ТІЛЬМАНСА

Матеріал для дослідження: незбиране молоко.

Реактиви: 0,001н розчин 2,6-дихлорфеноліндофенолу (реактив Тільманса), 2% розчин хлоридної кислоти, дистильована вода.

Обладнання: колбочки на 50-100 мл, піпетки на 1 і 5 мл, мікробюретка.

Хід роботи

5 мл молока розвести водою у 3 рази (1ч. молока і 2ч. дистильованої води).

Взяти три конічні колби (дві дослідні і одну контрольну). В дослідні колби внести по 1 мл 2% розчину хлоридної кислоти і 5 мл розведеного молока, в контрольну – 1 мл 2% розчину хлоридної кислоти та 5 мл дистильованої води. Вміст колб перемішати і відтитрувати 0,001н розчином 2,6-дихлорфеноліндофенолу до появи рожевого забарвлення.

Розрахунок вмісту аскорбінової кислоти в молоці провести за формулою:

$$X = \frac{N \cdot k \cdot 0,088 \cdot k_1 \cdot 100}{C} \text{ мг\%, де}$$

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

k – коефіцієнт нормальності розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу;

k₁ – коефіцієнт розведення молока;

C – кількість розведеного молока, взятого для титрування, мл.

Приклад розрахунку.

$$X = \frac{\left(\frac{1,42 + 1,46}{2} - 0,04 \right) \cdot 0,988 \cdot 0,088 \cdot 3 \cdot 100}{5} = 7,3 \text{ мг \%, де}$$

1,42 – кількість розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу, використаного на титрування 1-ої дослідної проби, мл;

1,46 – кількість розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу, використаного на титрування 2-ої дослідної проби, мл;

0,04 – кількість розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу, використаного на титрування контрольної проби, мл.

Провести розрахунки та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Для чого проводять розведення молока?
2. Розрахувати яка кількість молока необхідна для задоволення добової потреби у вітаміні С.

3. На чому ґрунтується принцип методу?

РОБОТА № 3 КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВІТАМІНУ С В СЕЧІ

Принцип методу. Метод ґрунтується на здатності вітаміну С відновлювати реактив Тільманса в кислому середовищі. Уринарна екскреція вітаміну С дає уяву про забезпечення організму вітаміном С протягом певного періоду. Погодинна уринарна екскреція вітаміну С визначається за методом А.Железнякової.

І спосіб

Матеріал для дослідження: сеча.

Реактиви: 0,001н розчин натрієвої солі 2,6-дихлорфеноліндофенолу (реактив Тільманса), 5% розчин ацетатної кислоти, дистильована вода.

Обладнання: конічні колби на 50-100 мл, піпетки на 2 мл, мікробюретка.

Хід роботи

У дві колби внести по 2 мл 5% розчину ацетатної кислоти. В першу (дослідну) додати 2 мл профільтрованої сечі, у другу (контрольну) – 2 мл дистильованої води. Вміст колб відтитрувати 0,001н розчином натрієвої солі 2,6-дихлорфеноліндофенолу.

Розрахунок вмісту аскорбінової кислоти в сечі, зібраної натще, провести за формулою:

$$X = \frac{(a - \bar{b}) \times K \times 0,088 \times v}{4 \times c} \quad (\text{мг}), \text{ де}$$

X – кількість аскорбінової кислоти, що виділилася з сечею за 1 год., мг;

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

$\bar{b}$ – кількість індикатора, використаного на титрування розчину в контрольному досліді, мл;

K – поправка до титру (див. додаток 10.);

v – об'єм зібраної сечі, мл;

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

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

c – проміжок часу між двома сечовиділеннями, год.

II спосіб

Досліджуваний матеріал: сеча.

Матеріали та реактиви: концентрована ацетатна кислота, 0,001н розчин натрієвої солі 2,6-дихлорфеноліндофенолу.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, піпетки, конічні колби, мікробюретки.

Хід роботи

Зафіксувати час першого ранішнього сечовиділення. Потім через 0,5-1 год. до прийому їжі зібрати сечу і визначити її об'єм.

У конічну колбу на 100 мл внести піпеткою 0,4 мл концентрованої ацетатної кислоти, 4 мл досліджуваної сечі, 10,6 мл дистильованої води та відтитрувати 0,001н розчином 2,6-дихлорфеноліндофенолу до появи рожевого забарвлення, яке не зникає протягом 30 сек.

Паралельно з дослідною пробою обробити контрольну: до 0,4 мл концентрованої ацетатної кислоти додати 14,6 мл дистильованої води і відтитрувати до появи рожевого забарвлення.

Розрахунок вмісту аскорбінової кислоти в сечі провести за формулою:

$$X = \frac{(a - b) \cdot K \cdot 0,088 \cdot V}{V_1 \cdot t} \text{ (мг)}, \text{ де}$$

X – погодинна уринарна екскреція аскорбінової кислоти, мг/год.

a – кількість індикатора, використаного на титрування сечі (середнє значення двох проб), мл;

b – кількість індикатора, використаного на титрування контрольної проби, мл;

K – поправка на титр розчину індикатора (див. додаток 5);

V – об'єм зібраної сечі, мл;

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

V_1 – об'єм сечі, взятої на титрування, мл;

t – проміжок часу між двома сечовиділеннями, год.

Провести розрахунки та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Яке діагностичне значення має визначення вмісту вітаміну С в сечі?

2. Яке значення має визначення рівня погодинної уринарної екскреції вітаміну С?
3. Який рівень погодинної уринарної екскреції вітаміну С:
 - а) при забезпеченні організму вітаміном С;
 - б) при С-гіпоавітамінозах та С-гіпервітамінозах.

РОБОТА № 4 КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВІТАМІНУ Р (РУТИНУ) ЗА МЕТОДОМ ЛЕВЕНТАЛЯ

Принцип методу. Визначення рутину ґрунтується на його здатності окиснюватись калій перманганатом. Як індикатор у цій реакції використовується індигокармін (білий індиго), який вступає в реакцію з калій перманганатом після того, як окисниться весь рутин. Доведено, що 1 мл 0,1н розчину калій перманганату окиснює 6,4 мкг рутину. При окисненні білий індиго змінює забарвлення, яке переходить в світло-жовте, червоно-фіолетове, фіалково-синє (синій індиго).

Матеріал для дослідження: екстракт чаю.

Реактиви: розчин індигокарміну, 0,05н розчин калій перманганату, гаряча дистильована вода.

Обладнання: конічні колби на 50-100 мл, піпетки на 10 мл, мікробюретка, терези з набором різноважок, електрична плитка.

Хід роботи

100 мг чаю екстрагувати в 50 мл гарячої води протягом 5 хв. У конічну колбу внести 10 мл екстракту, додати 10 мл води, 10 крапель розчину індигокарміну, перемішати і відтитрувати 0,05н розчином калій перманганату до появи стійкого жовтого забарвлення.

Розрахунок вмісту рутину провести за формулою:

$$X = \frac{3,2 \cdot A \cdot 50 \cdot 100}{10 \cdot 0,1 \cdot 1000} \text{ мг \%}, \text{ де}$$

3,2 – кількість рутину, що відповідає 1 мл 0,05н розчину калій перманганату, мкг.

A – об'єм 0,05н розчину калій перманганату, використаного на титрування, мл;

0,1 – наважка чаю, г;

10 – об'єм екстракту, взятий для аналізу, мл;
50 – загальний об'єм екстракту, мл;
100 – коефіцієнт переведення у відсотки;
1000 – коефіцієнт переведення мікрограмів у міліграми.

Провести розрахунки та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. До якої групи вітамінів належить рутин?
2. З яким іншим водорозчинним вітаміном пов'язана біологічна функція рутину?
3. Який препарат рутину використовується в медицині? Пояснити чому?

ЛАБОРАТОРНО-ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №7

ТЕМА: ГОРМОНИ. ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ ТА КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Опрацювати теоретичний матеріал, використовуючи літературу

Основна: [1, с. 284-321]; [2, с. 423-437]; [3, с. 441-467]; [4, с. 330-385]; [5, с. 154-210].

Додаткова: [3]; [4]; [5]; [6]; [8], [9]; [10].

Методичні рекомендації

1. При опрацюванні теоретичного матеріалу звернути увагу на особливості гормонів як специфічних регуляторів метаболічних функцій організму.
2. З'ясувати принципи класифікації і номенклатури гормонів.
2. Розглянути будову ендокринної системи організму.
3. Звернути увагу на особливості нейрогуморальної регуляції.
4. Дати характеристику гіпер- та гіпофункції ендокринних залоз.
5. З'ясувати механізми дії гормонів пептидної і стероїдної природи.
6. Виконати тестові завдання та вправи.

Теоретичні питання

1. Дати визначення поняття “гормони”, їх роль у процесах життєдіяльності.
2. Історія вивчення гормонів. Внесок А.М. Утєвського, С.М. Лейтеса, О.В. Палладіна та зарубіжних вчених у розвиток ендокринології.

3. Особливості гормонів як універсальних регуляторів метаболізму. Залози внутрішньої секреції. Поняття про ендो- та екзокринну функції.
4. Характеристика ендокринних залоз: гіпофізу, епіфізу, гіпоталамусу, щитоподібної залози, паращитоподібної залози, тимусу, надниркових залоз, підшлункової залози, статевих залоз.
5. Тропні фактори. Особливості впливу на ендокринну систему.
6. Залози ЦНС, їх функції.
7. Периферійні ендокринні залози.
8. Нейроендокринна регуляція процесів життєдіяльності.
9. Номенклатура гормонів.
10. Класифікація гормонів: а) анатомічна; б) хімічна; в) фізіологічна.
11. Гіпер- та гіпофункції ендокринних залоз.
12. Гормони білкової природи, приклади, назва, будова, механізм дії.
13. Гормони – похідні амінокислот, приклади, будова.
14. Гормони пептидної природи, приклади, будова.
15. Стероїдні гормони, приклади, біологічна роль, механізм дії.
16. Катехоламіни, біологічні ефекти та їх реалізація.
17. Парагормони, будова і біологічна роль.
18. Будова та біологічна роль простагландинів.
19. Гормони гіпофізу. Структура, біологічна роль, гіпо- і гіперфункції гіпофізу.
20. Гормони щитоподібної залози. Будова, властивості, гіпо- та гіперфункція щитоподібної залози.
21. Підшлункова залоза. Гормони підшлункової залози, будова, властивості, гіпо- і гіперфункції підшлункової залози.
22. Інсулін: будова, функції, механізм дії.
23. Тимус. Роль у регулюванні імунного стану організму.
24. Надниркові залози. Біологічна роль гормонів надниркових залоз. Механізм дії.
25. Статеві залози. Гормони статевих залоз.
26. Паращитоподібні залози.
27. Гормони гастроінтестинального тракту та ЦНС.

Тестові завдання

1. Вкажіть, що являють собою гормони:

А. Органічні біологічно активні речовини, що продукуються залозами внутрішньої секреції;

- 95

- 12. Які основні процеси в організмі регулює інсулін:**
А. Синтез білків; Б. Розщеплення ліпідів;
В. β-Окиснення жирних кислот; Г. Вміст цукру в крові.
- 13. Які гормони синтезуються в мозковій частині надниркових залоз:**
А. Глюкагон, гормон росту; Б. Інсулін, окситоцин;
В. Тироксин, соматотропін; Г. Адреналін, норадреналін.
- 14. Як впливає підвищене виділення адреналіну на вміст цукру в крові?**
А. Знижує вміст цукру в крові;
Б. Підвищує вміст цукру в крові;
В. Не впливає на вміст цукру в крові;
Г. Сприяє засвоєнню цукру клітинами тканин.
- 15. При патології якої ендокринної залози розвивається Аддісонова хвороба?**
А. Підшлункової; Б. Кори наднирників;
В. Щитоподібної; Г. Гіпоталамуса.
- 16. Вкажіть гормони, які синтезуються в яєчниках людини:**
А. Естрогени, андрогени; Б. Андрогени, фолітропін;
В. Тироксин, інсулін; Г. Соматотропін, адреналін.
- 17. Вкажіть гормони, які синтезуються переважно в сім'яниках людини:**
А. Кортикостероїди, глюкагон; Б. Андрогени, естрогени;
В. Естрогени, соматомедини; Г. Простагландини, пролактин.
- 18. Вкажіть гормони, які впливають на розвиток вторинних статевих ознак:**
А. Інсулін, адреналін; Б. Тироксин, соматотропін;
В. Окситоцин, вазопресин; Г. Естрогени, андрогени.

Вправи

1. Записати будову гормонів щитоподібної залози.
2. Здійснити перетворення за поданою схемою:
фенілаланін → тирозин → монойодтирозин → 
трийодтиронін
тетрайодтиронін
3. Записати схему синтезу адреналіну з фенілаланіну, вказати ферменти.
4. Записати схему реакцій окиснення адреналіну, вказати ферменти.
5. Записати будову гормонів кори надниркових залоз.
6. Записати будову ліберинів і статинів.

7. Здійснити перетворення за поданою схемою:
Адреналін $\rightarrow$ дегідроадреналін $\rightarrow$ адренохром.
8. Записати реакції перетворення за поданою схемою:
фенілаланін $\rightarrow$ адреналін.
9. Записати будову естрадіолу, естріолу і прогестерону, вказати їх біологічні функції.
10. Охарактеризувати біологічну дію ацетилхоліну, записати його будову.
11. Записати схему утворення серотоніну, вказати його біологічну роль.
12. Записати схему утворення тіреоїдних гормонів.

Завдання для самоконтролю знань

1. Записати будову фрагментів молекули інсуліну:
 - а) перших чотирьох ланок;
 - б) п'яти останніх ланок;
 - в) від п'ятнадцятої до двадцятої ланки.
2. Записати будову молекул вазопресину і окситоцину.
3. Яка будова три- та тетраїодтироніну.
4. Записати будову фрагменту АКТГ від п'ятої до п'ятнадцятої ланки.
5. Будова і біологічна роль кортикостероїдів.
6. Записати реакції перетворення за поданою схемою: фенілаланін $\rightarrow$ адреналін.
7. Будова та біологічна роль глюко- і мінералокортикоїдів.
8. Розрахувати масову частку (в%) Оксигену в молекулі естрадіолу і тестостерону. Яка сполука є більш окисненою?
9. У наднирниках за добу утворюється 0,35 мг альдостерону, що складає 1,5% від суми кортикостероїдів. Розрахувати масу кортикостерону і 17-оксикортикостерону, якщо відомо, що їх частка в сумарній масі кортикостероїдів складає 75%.
10. Вміст адреналіну в мозковому шарі наднирників людини складає 0,05% від їх маси. Розрахувати кількість адреналіну в наднирниках, якщо відомо, що в них міститься 0,005% норадреналіну, що складає 0,5 мг.
11. Розрахувати добову інкрецію адреналіну з сечею у хворого з різко вираженим больовим синдромом, якщо добовий діурез складає 900 мл. ($E_{\text{дос.}}=0,34$, $E_{\text{ст.}}=0,30$, для визначення брали 30 мл сечі).

12. Адреналін і норадреналін є оптично активними сполуками, втім *L*-ізомер адреналіну в 15 разів активніше *D*-ізомера. Записати проєкційні форми *D*- і *L*- адреналіну.
13. Записати реакції перетворень за поданими схемами: фенілаланін → тирозин → моноидтирозин → дийодтирозин → трийодтиронін.
14. Записати первинну структуру інсуліну від першого до дев'ятого амінокислотного залишку А-ланцюга.

1. ГОРМОНИ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ

У підшлунковій залозі утворюються гормони: інсулін, глюкагон, ліпокаїнова інстанція, ваготонін та ін. Серед них важливу роль відіграє інсулін, який утворюється в β -клітинах острівців Лангерганса (від лат. *insula* – острівець). Інсулін є простим білком з молекулярною масою 6000 Да, який складається з двох поліпептидних ланцюгів, сполучених дисульфідними зв'язками, що утворюються між сульфгідрильними групами залишків цистеїну. Ланцюг А містить 21 амінокислотний залишок, а ланцюг В – 30. У молекулі інсуліну відсутні амінокислоти триптофан, метіонін і оксипролін.

Інсулін має білкову природу та властивості, характерні для білків, і дає характерні для них кольорові реакції.

ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА ІНСУЛІН

Принцип реакцій. Якісні реакції на інсулін ґрунтуються на його білковій природі.

РОБОТА № 1 РЕАКЦІЯ ГЕЛЛЕРА

Матеріал для дослідження: препарат інсуліну в ампулах.

Реактиви: концентрована нітратна кислота.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, піпетки.

Хід роботи

У пробірку внести 1 мл концентрованої нітратної кислоти і обережно по стінках додати 10 крапель інсуліну. Пробірку тримати під кутом 45°, щоб рідини не змішувались. На межі двох рідин утворюється білий аморфний осад у вигляді невеликого кільця.

Пояснити результати досліду та зробити висновки.

Дати відповіді на запитання

1. Про що свідчить позитивна реакція Геллера?
2. Чому при додаванні нітратної кислоти до розчину інсуліну утворюється осад?
3. Яка біологічна роль інсуліну?

РОБОТА № 2 РЕАКЦІЯ З СУЛЬФОСАЛІЦИЛОВОЮ КИСЛОТОЮ

Матеріал для дослідження: препарат інсуліну в ампулах.

Реактиви: 20% розчин сульфосаліцилової кислоти.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, піпетки.

Хід роботи

У пробірку внести 1 мл розчину інсуліну, додати 5 крапель 20% розчину сульфосаліцилової кислоти. Спостерігати випадання білого осаду.

Пояснити результати досліду та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Пояснити принцип реакції взаємодії інсуліну з сульфосаліциловою кислотою.
2. Які ознаки гіпофункції підшлункової залози?
3. Пояснити механізм дії інсуліну, його біологічні функції.

РОБОТА № 3 БІУРЕТОВА РЕАКЦІЯ

Матеріал для дослідження: препарат інсуліну в ампулах.

Реактиви: біуретовий реактив.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, піпетки.

Хід роботи

У пробірку внести 10 крапель інсуліну, додати 1 мл біуретового реактиву і перемішати. Спостерігати зміну забарвлення.

Пояснити результати досліду та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Чому інсулін дає позитивну біуретову реакцію?
2. До якої групи якісних реакцій належить біуретова реакція?
3. Яка будова інсуліну, його особливості?

РОБОТА № 4 РЕАКЦІЯ ФОЛЯ

Матеріал для дослідження: препарат інсуліну в ампулах.

Реактиви: 10% розчин натрій гідроксиду, 5% розчин плюмбум ацетату.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, піпетки, спиртівка.

Хід роботи

У пробірку внести 10 крапель інсуліну, 2 мл 10% розчину натрій гідроксиду і 1 мл 5% розчину плюмбум ацетату. Вміст пробірки перемішати та нагріти на спиртівці до кипіння. У пробірці з'являється бурий осад плюмбум сульфід.

Пояснити результати досліду та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Що виявляють у складі інсуліну за допомогою реакції Фоля?
2. Яке значення дисульфідних зв'язків у молекулі інсуліну?
3. Який механізм утворення активної форми інсуліну?

2. ГОРМОНИ МОЗКОВОГО ШАРУ НАДНИРКОВИХ ЗАЛОЗ

У клітинах мозкового шару надниркових залоз утворюються гормони адреналін та норадреналін.

За хімічною природою вони є похідними пірокатехіну (катехоламіни) і утворюються в організмі з амінокислоти тирозину. У нейтральних розчинах адреналін та норадреналін легко окиснюються з утворенням продуктів, близьких до галохрому, які дістали назву адренохрому (мають червоний колір). Полімеризація адренохрому спричинює утворення темних пігментів типу меланінів.

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

ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА АДРЕНАЛІН

РОБОТА № 1 РЕАКЦІЯ З КАЛІЙ ЙОДАТОМ

Принцип реакції. При взаємодії адреналіну з калій йодатом у кислому середовищі утворюється сполука червоно-фіолетового кольору.

Матеріал для дослідження: 0,1% розчин адреналіну.

Реактиви: 1% розчин калій йодату, 10% розчин хлоридної кислоти.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки, водяна баня.

Хід роботи

У пробірку внести 3 краплі 0,1% розчину адреналіну, 2 краплі 1% розчину калій йодату і 5 крапель 10% розчину хлоридної кислоти. Провести нагрівання при 60°C.

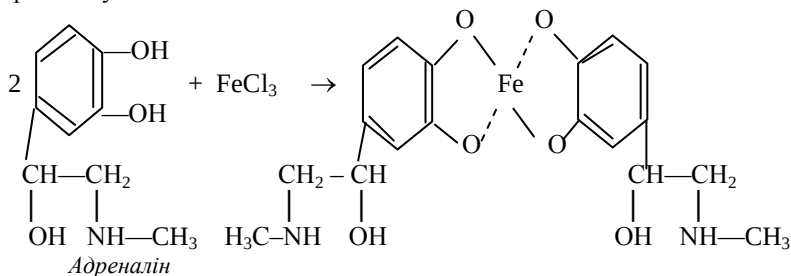
Пояснити результати досліду та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Пояснити біологічну роль катехоламінів.
2. Які особливості біологічних ефектів адреналіну і норадреналіну?
3. Записати рівняння реакцій за схемою: феніланін → адреналін.

РОБОТА № 2 РЕАКЦІЯ З ФЕРУМ (III) ХЛОРИДОМ

Принцип реакції. Реакція ґрунтується на здатності пірокатехінового угрупування адреналіну з ферум (III) хлоридом утворювати комплексну сполуку смарагдово-зеленого кольору типу феноляту:



Якщо до розчину адреналіну чи його сполук з ферумом додати луг, то утворюється адренохром, який має вишнево-червоне забарвлення.

Матеріал для дослідження: 0,1% розчин адреналіну.

Реактиви: 1% розчин ферум (III) хлориду, 25% розчин аміаку.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки.

Хід роботи

У пробірку внести 3 краплі розчину адреналіну та 1 краплю 1% розчину ферум (III) хлориду. Спостерігати за появою забарвлення. Додати 1 краплю 25% розчину аміаку і спостерігати за зміною забарвлення.

Пояснити результати досліду та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. На чому ґрунтується якісна реакція на адреналін з ферум (III) хлоридом?
2. За рахунок чого утворюється забарвлений комплекс?
3. Записати хімізм реакції утворення адренохром.

РОБОТА № 4

РЕАКЦІЯ З НІТРИТНО-МОЛІБДЕНОВИМ РЕАКТИВОМ

Принцип реакції. Адреналін у кислому середовищі при взаємодії з нітритно-молібденовим реактивом утворює сполуку жовто-оранжевого кольору. При додаванні лугу забарвлення змінюється на малиново-червоне, яке за присутності концентрованої хлоридної кислоти переходить у лимонно-жовте.

Матеріал для дослідження: 0,1% розчин адреналіну.

Реактиви: 5% розчин хлоридної кислоти, 10% розчин натрій гідроксиду, концентрована хлоридна кислота, нітритно-молібденовий реактив.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, піпетки.

Хід роботи

У пробірку внести 1 мл 0,1% розчину адреналіну, додати 1 мл 5% розчину хлоридної кислоти і 1 мл нітритно-молібденового реактиву. Суміш перемішати та спостерігати за появою забарвлення. Потім додати 3-5 крапель 10% розчину натрій

гідроксиду і відмітити зміни, що відбулися за цих умов та після додавання декількох краплин концентрованої хлоридної кислоти.

Пояснити результати досліду та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Яка хімічна природа адреналіну?
2. Як адреналін впливає на рівень цукру у крові?
3. Чому адреналін і норадреналін отримали назву катехоламінів?
4. Де синтезуються катехоламіни і які їх біологічні ефекти?

РОБОТА № 6

ОКИСНЕННЯ АДРЕНАЛІНУ КАЛІЙ ГЕКСАЦІАНОФЕРАТОМ (III)

Принцип реакції. Метод ґрунтується на здатності адреналіну окиснюватися при дії на нього калій гексаціаноферату (III) в адренохром, з якого в лужному середовищі утворюється адренолютин, що дає жовто-зелену флюоресценцію.

Матеріал для дослідження: 0,1% розчин адреналіну.

Реактиви: 0,2% розчин калій гексаціаноферату (III), аскорбінова кислота кристалічна, 10% розчин натрій гідроксиду.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, піпетки, флюорометр.

Хід роботи

У дві пробірки внести по 1 мл 0,1% розчину адреналіну. В першу пробірку додати 2 мл води, у другу – 2-3 краплі 0,2% розчину калій гексаціаноферату (III) і залишити на 5 хв.

Потім у кожную пробірку додати на кінчику шпателя аскорбінову кислоту і по 1 мл 10% розчину натрій гідроксиду (аскорбінова кислота запобігає подальшому окисненню адренохрому, а натрій гідроксид сприяє перетворенню його в адренолютин).

Пробірки помістити у штатив флюорометра і спостерігати інтенсивність характерної флуоресценції.

Пояснити результати досліду та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Яким чином відбувається окиснення адреналіну?
2. З якою метою додають аскорбінову кислоту? Який можливий механізм реакції?
3. Яка будова катехінових та хіноїдних форм катехоламінів?

3. ГОРМОНИ КОРИ НАДНИРКОВИХ ЗАЛОЗ

РОБОТА № 1 ЯКІСНА РЕАКЦІЯ НА 11-ДЕЗОКСИКОРТИКОСТЕРОН

Принцип реакції. Під час взаємодії 11-дезоксикортикостерону з сульфатною кислотою утворюється сполука, що має синє забарвлення і дає червону флюоресценцію.

Матеріал для дослідження: масляний розчин 11-дезоксикортикостерону.

Реактиви: 96° етиловий спирт, концентрована сульфатна кислота.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки, спиртівка.

Хід роботи

У пробірку внести 1 краплю масляного розчину 11-дезоксикортикостерону, додати 3-4 краплі 96° етилового спирту, 3-4 краплі концентрованої сульфатної кислоти і обережно нагріти до кипіння. Охолодити, знову додати 0,5 мл концентрованої сульфатної кислоти і повторно нагріти. Спостерігати за зміною забарвлення.

Пояснити результати досліду та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Які біологічні функції 11-дезоксикортикостерону?
2. Де відбувається інкреція гормону?
3. Записати будову гормону.

РОБОТА № 2 ВЗАЄМОДІЯ КОРТИЗОНУ ТА ДЕЗОКСИКОРТИКОСТЕРОНУ З РЕАКТИВОМ ФЕЛІНГА

Принцип реакції. При нагріванні на водяній бані суміші спиртових препаратів кортикостероїдів з реактивом Фелінга випадає цегляно-червоний осад. Реакція зумовлена відновними властивостями α -кетонного угруповання, яке легко окиснюється.

Матеріал для дослідження: кортизон ацетат, дезоксикортикостерон ацетат.

Реактиви: 96° етиловий спирт, реактив Фелінга.

Обладнання: штатив з пробірками, спиртівка.

Хід роботи

Взяти 2 пробірки: в одну внести 10 мг кортизон ацетату, у другу – 10 мг дезоксикортикостерон ацетату. В кожную пробірку додати по 1 мл 96° етилового спирту і вміст пробірок добре перемішати. Потім додати по 1 мл реактиву Фелінга та нагріти. Спостерігати за зміною забарвлення і утворенням осаду.

Пояснити результати досліду та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Де продукується кортизон?
2. Які біологічні ефекти глюко- і мінералокортикоїдів?
3. Яким тропним фактором контролюється синтез та інкреція кортикостероїдів?
4. Які біологічні ефекти кортизону?
5. До якої групи кортикостероїдів належить кортизон?

РОБОТА № 3

ВЗАЄМОДІЯ КОРТИЗОНУ ТА ГІДРОКОРТИЗОНУ З КОНЦЕНТРОВАНОЮ СУЛЬФАТНОЮ КИСЛОТОЮ

Принцип реакції. Концентрована сульфатна кислота є загальним специфічним реактивом на наявність стероїдного циклу у складі гормонів кори наднирників. Поява забарвлених продуктів реакції, наявність чи відсутність флюоресценції в ультрафіолетовому випромінюванні, зміна забарвлення після розведення водою, а в деяких випадках – хлороформом, дають змогу розрізнити лікарські гормональні препарати кортикостероїдів. У результаті взаємодії сульфатної кислоти з кортизоном розвивається жовте забарвлення, з гідрокортизоном – жовте з зеленою флюоресценцією, з дезоксикортикостероном – вишнево-червоне з зеленувато-коричневою флюоресценцією (після додавання води).

Матеріал для дослідження: кортизон ацетат, гідрокортизон ацетат.

Реактиви: концентрована сульфатна кислота, хлороформ, дистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, спиртівка, флюорометр.

Хід роботи

Взяти 2 пробірки: в одну внести 2 мг препарату кортизон ацетату, а у другу – 2 мг препарату гідрокортизон ацетату. В кожную пробірку додати по 2 мл концентрованої сульфатної кислоти,

обережно перемішати і спостерігати зміну забарвлення, а через 20 хв. появу флюоресценції в ультрафіолетових променях світла.

У другу пробірку обережно додати 3 мл води і спостерігати за зміною забарвлення та флюоресценцією.

Спостерігати забарвлення нижнього та верхнього шарів при додаванні в цю ж пробірку 3 мл хлороформу.

Пояснити результати досліду та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Яка біологічна дія характерна для кортикостероїдів?
2. Будова кортизону і гідрокортизону?
3. Яке значення має реакція кортикостероїдів з концентрованою сульфатною кислотою?
4. Пояснити механізм дії гормонів кори надниркових залоз.
5. На чому ґрунтується антизапальна та антиалергічна дія кортизону?

4. СТАТЕВІ ГОРМОНИ

ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА ФОЛІКУЛІН (ЕСТРОН)

РОБОТА № 1

РЕАКЦІЯ НА ФЕНІЛЬНУ ГРУПУ З РЕАКТИВОМ ФОЛІНА

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

Матеріал для дослідження: спиртовий розчин фолікуліну.

Реактиви: 30% розчин натрій гідроксиду, реактив Фоліна.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, піпетки.

Хід роботи

До 2 мл розчину фолікуліну додати 1 краплю 30% розчину натрій гідроксиду і 1 мл реактиву Фоліна. Розвивається характерне для фенільної групи синє забарвлення.

Пояснити результати досліду та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Під контролем якого тропного фактора знаходиться інкреція фолікуліну?

2. Чим зумовлена циклічність інкреції цього гормону?
3. Яка будова фолікуліну?

РОБОТА № 2

РЕАКЦІЯ НА ФЕНІЛЬНУ ГРУПУ З СУЛЬФАТНОЮ КИСЛОТОЮ

Принцип реакції. При взаємодії фолікуліну з сульфатною кислотою утворюється ефірна сполука солом'яно-жовтого кольору з зеленуватою флюоресценцією, який при нагріванні змінюється на помаранчевий.

Матеріал для дослідження: спиртовий розчин фолікуліну.

Реактиви: концентрована сульфатна кислота.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, водяна баня.

Хід роботи

У пробірку внести 1 мл спиртового розчину фолікуліну і поставити на киплячу водяну баню на 10 хв. для видалення спирту. До фолікуліну, що залишився у пробірці, додати 7 мл концентрованої сульфатної кислоти і знову поставити на 10 хв. у ті ж умови.

Пояснити результати досліду та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Чому для проведення реакції використовують спиртовий розчин гормону?
2. Яка хімічна природа фолікуліну?
3. Пояснити назву гормону.

5. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ГОРМОНІВ

РОБОТА № 1

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АДРЕНАЛІНУ ЗА МЕТОДОМ ФОЛІНА

Принцип методу. Метод ґрунтується на колориметричному визначенні інтенсивності синього забарвлення, що розвивається при взаємодії адреналіну з реактивом Фоліна. До складу реактиву Фоліна входять солі фосфорновольфрамової і фосформолібденової кислот. Ці солі при взаємодії з фенолами та поліфенолами відновлюються з утворенням оксидів металів, з нижчим ступенем окиснення, комплекси яких забарвлені в синій колір.

Матеріал для дослідження: сеча.

Реактиви: стандартний розчин адреналіну (1 мл містить 0,4 мг адреналіну), 10% свіжоприготовлений розчин натрій карбонату, реактив Фоліна, дистильована вода.

Обладнання: мірний циліндр на 10 мл, піпетки на 1 і 5 мл, ФЕК, кювети з довжиною оптичного шляху 10 мм.

Хід роботи

Взяти три сухі чисті мірні пробірки: в першу (дослідну) внести 1 мл сечі, у другу (стандартну) – 1 мл стандартного розчину адреналіну, у третю (контрольну) – 1 мл води. В кожну пробірку додати по 4 мл 10% свіжоприготовленого розчину натрій карбонату і по 0,5 мл реактиву Фоліна. Вміст пробірок перемішати. Рідина поступово забарвлюється в синій колір, який досягає найбільшої інтенсивності через 3-5 хв.

Через 5 хв. об'єм рідини у пробірках довести до 10 мл 10% розчином натрій карбонату.

Визначити екстинкцію дослідної і стандартної проб на ФЕК при жовтому світлофільтрі в кюветах з довжиною оптичного шляху 10 мм проти контролю.

Розрахунок вмісту адреналіну в досліджуваному матеріалі провести за формулою:

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

$C_{\text{дос.}}$ – концентрація адреналіну в дослідному розчині, мг/мл;

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

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

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

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

Провести розрахунки та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Яка хімічна природа адреналіну? Де відбувається його інкреція?
2. Який фактор контролює інкрецію адреналіну?
3. Яке діагностичне значення має визначення гормону в рідинах організму?

Клінічне значення. Збільшення вмісту адреналіну в сечі спостерігається при захворюваннях, пов'язаних із больовим синдромом, емоційним і фізичним навантаженням, інсомії (порушенні сну). Незначне збільшення катехоламінів можливе при гіпертонічних кризах, після введення інсуліну, кортизону, АКТГ. Значне збільшення рівня гормонів відбувається при феохромацитоммах, що супроводжуються підвищенням тиску крові в вигляді нападів стійкої гіпертензії.

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

ТЕМИ, ВИНЕСЕНІ НА САМОСТІЙНЕ ОПРАЦЮВАННЯ

ТЕМА 1. СКЛАД, БУДОВА ТА ВЛАСТИВОСТІ ЦУКРИДІВ

Опрацювати теоретичний матеріал, використовуючи літературу

Основна: [1, с. 208-229]; [2, с. 17-42]; [3, с. 306-328]; [4, с. 57-71].
Додаткова: [4]; [5]; [6]; [8]; [9].

Методичні рекомендації

1. При опрацюванні теоретичних питань звернути увагу на особливості будови та функцій вуглеводів.
2. З'ясувати принципи класифікації вуглеводів на основі біологічних та фізико-хімічних властивостей і складу.
3. Розглянути будову моно-, ди- та поліцукрів.
4. Звернути увагу на особливості гомо- і гетерополіцукрів. Дати характеристику окремих представників гомо- та гетерополіцукрів.
5. Виконати тестові завдання і вправи.

Теоретичні питання

1. Загальна характеристика моноцукрів.
2. Які особливості характерні для моноцукрів?
3. Фізико-хімічні властивості та способи отримання моноцукрів.
4. Ізомерія моноцукрів.
5. Поняття про оптичну і структурну ізомерію.

6. Які сполуки називають епімерами?
7. Туатомерні форми цукрів, їх характеристика.
8. На яких властивостях цукрів ґрунтується їх класифікація?
9. Похідні моноцукрів.
10. Характеристика окремих представників моноцукрів. Їх біологічна роль.
11. Записати будову глюкози, галактози, фруктози. Вказати біологічну роль.
12. Охарактеризувати похідні моноцукрів.
13. Біологічна роль аміноцукрів.
14. Олігоцукри.
15. Які цукри називають дицукрами?
16. Яка властивість дицукрів покладена в основу їх класифікації?
17. Відновлюючі й невідновлюючі цукри, особливості будови, властивості.
18. Характеристика окремих представників олігоцукрів.
19. Записати будову сахарози, мальтози, лактози, трегалози, целобіози, рафінози та стахіози.
20. Поліцукри: будова, властивості, біологічна роль.
21. Що таке гомо- та гетерополіцукри?
22. Будова крохмалю й глікогену.
23. Біологічна роль глікогену.
24. Целюлоза: будова, властивості, функції.
25. Характеристика окремих представників гомо- та гетерополіцукрів.

Завдання для самоконтролю знань

1. Як виникла назва “вуглеводи”?
2. Яким чином розрахувати кількість оптичних ізомерів моноцукру?
3. Чи збігається напрям обертання променя поляризованого світла із стереоструктурою моноцукрів?
4. Що таке D- та L-форми моноцукрів?
5. Що являють собою проекційні формули Хеуорса? Який їх недолік?
6. Які формули моноцукрів компенсують недоліки проекційних формул Хеуорса?
7. Які типи конфігурації більш стійкі – крісла чи човна? Чому?
8. Як називаються типи циклічних структур моноцукрів?
9. Яку назву має гідроксил, що утворюється з альдегідної (альдоз) або кетогрупи (кетоз)?

10. Якими властивостями володіє глікозидний гідроксил?
11. Як називаються α - та β -форми моноцукрів?
12. Що таке амінопохідні моноцукрів? Їх значення.
13. Яким додатковим модифікаціям піддаються аміноцукри?
14. Чи відомі фосфорильовані похідні аміноцукрів?
15. Що характерно для дицукрів типу глікозидо-глюкозидів (трегалози)?
16. Пояснити поняття “інвертний цукор”.
17. Чи зброджується сахароза?
18. Пояснити що таке редукуючі і нередукуючі цукри. Якими властивостями вони володіють?
19. Пояснити найважливіші фізико-хімічні властивості фруктози і глюкози.
20. Охарактеризувати трегалозу, лактозу і целобіозу.
21. Яку будову має рафіноза? Біологічна роль.
22. Що являють собою аміноцукри?
23. Яким чином утворюються ацетилпохідні аміноцукрів?
24. Що являють собою сахарні кислоти?
25. Охарактеризувати глюконову кислоту.
26. Які ви знаєте найбільш поширені уранові кислоти?
27. Охарактеризувати альдарову кислоту.
28. Що являє собою галактуронова кислота? Її біологічна роль.
29. Охарактеризувати трицукор меліцитозу.
30. На яких властивостях цукрів ґрунтується їх взаємодія з купрум (II) гідроксидом?
31. В чому полягає суть реакції “срібного дзеркала”?
32. Що таке інулін; камеді?
33. Охарактеризувати геміцелюлозу. Як класифікують геміцелюлози?
34. Що таке пектинові речовини? Їх біологічна роль.
35. Охарактеризувати мукополісахариди.
36. Дати характеристику основним представникам мукополісахаридів.
37. Що таке агар-агар? Які його властивості?
38. Які функції виконує хондроїтинсульфатна кислота? Її будова.

Тестові завдання

1. **Вкажіть, на які три групи поділяють вуглеводи:**
 - А. Моносахариди, полісахариди, кетогексози;
 - Б. Дисахариди, альдогексози, моносахариди;
 - В. Моносахариди, олігосахариди, полісахариди;

Г. Полісахариди, дисахариди, пентози.

2. **Яка загальна формула відповідає моносахаридам:**
А. $C_nH_{3n}O_n$; Б. $C_nH_{2n}O_{3n}$; В. $C_{2n}H_nO_n$; Г. $C_nH_{2n}O_n$.
3. **Яка із названих сполук належить до моносахаридів:**
А. Глікоген; Б. Лактоза; В. Фруктоза; Г. Сахароза.
4. **Яка із названих сполук належить до пентоз:**
А. Галактоза; Б. Рибоза; В. Маноза; Г. Лактоза.
5. **Яка із названих сполук належить до гексоз:**
А. Ксилоза; Б. Арабіноза; В. Маноза; Г. Ксилулоза.
6. **Яка із названих сполук належить до альдогексоз:**
А. Маноза; Б. Фруктоза; В. Рибоза; Г. Ксилоза.
7. **Яка із названих сполук належить до кетогексоз:**
А. Глюкоза; Б. Маноза; В. Галактоза; Г. Фруктоза.
8. **Вкажіть назву сполуки, яка побудована лише із залишків глюкози:**
А. Сахароза; Б. Лактоза; В. Мальтоза; Г. Хітин.
9. **Вкажіть назву сполуки, до складу якої входить фруктоза:**
А. Лактоза; Б. Мальтоза; В. Сахароза; Г. Крохмаль.
10. **Вкажіть групу вуглеводів, яку відносять до дисахаридів:**
А. Маноза, крохмаль, фруктоза;
Б. Глікоген, клітковина, рибоза;
В. Лактоза, мальтоза, сахароза;
Г. Галактоза, рибоза, дезоксирибоза.
11. **Які моносахариди утворюються при гідролізі сахарози?**
А. Глюкоза і галактоза; Б. Фруктоза та маноза;
В. Дві молекули глюкози; Г. Глюкоза і фруктоза.
12. **Вкажіть групу вуглеводів, яка належить до полісахаридів:**
А. Крохмаль, сахароза, лактоза;
Б. Мальтоза, фруктоза, клітковина;
В. Целюбіоза, клітковина, сахароза;
Г. Клітковина, крохмаль, глікоген.
13. **Вкажіть групу полісахаридів, мономером яких є лише глюкоза:**
А. Крохмаль, гіалуринова кислота, гепарин;
Б. Хондроїтинсірчана кислота, клітковина, гіалуринова кислота;
В. Клітковина, крохмаль, глікоген;
Г. Гепарин, клітковина, гіалуринова кислота.
14. **Який із перерахованих полісахаридів має розгалужену будову:**
А. Целюлоза; Б. Амілопектин; В. Амілоза; Г. Глікоген.
15. **Який із указаних вуглеводів є гетерополісахаридом:**

А. Глікоген; Б. Гепарин; В. Клітковина; Г. Крохмаль.

Вправи

1. Записати структурні формули моноцукрів (глюкоза, галактоза, маноза, фруктоза).
2. Записати структурні формули дицукрів (лактоза, мальтоза, сахароза).
3. Записати будову поліцукридного ланцюга крохмалю і глікогену.
4. Записати будову оптичних ізомерів моноцукрів (енантіомери, діастереоізомери).
5. Записати схему утворення глікозидних зв'язків у молекулах ди- і поліцукрів.
6. Будова аномерів глюкози.
7. Особливості структурної ізомерії, приклади.

ТЕМА 2. СКЛАД, БУДОВА І ВЛАСТИВОСТІ ЛІПІДІВ

Опрацювати теоретичний матеріал, використовуючи літературу

Основна: [1, с. 230-240]; [2, с. 43-55]; [3, с. 370-386]; [4, с. 72-85]; [5, с. 348-357].

Додаткова: [4]; [5]; [6]; [8]; [10].

Методичні рекомендації

1. При опрацюванні теоретичного матеріалу звернути увагу на особливості компонентного складу та особливості будови ліпідів.
2. З'ясувати принципи класифікації ліпідів на основі біологічних та фізико-хімічних властивостей і складу.
3. Розглянути будову простих ліпідів, жироподібних сполук та складних ліпідів.
4. Звернути увагу на особливості моноацидних і гетероацидних жирів та роль жирних кислот у визначенні фізико-хімічних властивостей жирів.
5. Дати характеристику основних представників простих і складних ліпідів.
6. Виконати тестові завдання і вправи.

Теоретичні питання

1. Загальна характеристика класу ліпідів, їх біологічна роль.
2. Класифікація ліпідів за біологічними та фізико-хімічними властивостями.
3. Характеристика жирних кислот, які входять до складу ліпідів. Особливості жирнокислотного складу рослинних і тваринних жирів.
4. Моноацидні та гетероацидні жири. Будова і функції.
5. Фізичні властивості жирів (розчинність, щільність, емульгування, температура плавлення).
6. Хімічні властивості жирів (омилення, гідроліз, гідрування, полімеризація).
7. Характеристика простих жирів, будова, властивості і біологічна роль.
8. Діольні ліпіди, будова, властивості.
9. Характеристика складних ліпідів. Класифікація, будова, властивості та біологічна роль складних ліпідів.
10. Стерини і стериди: будова, властивості та біологічна роль.
11. Воски.
12. Орнітоліпіди.
13. Характеристика природних жирів та олій. Висихаючі і невисихаючі масла.
14. У чому відмінність між твердим і рідким жиром?

Тестові завдання

1. **Що являють собою ліпіди (жири і жироподібні речовини):**
А. Високомолекулярні органічні сполуки добре розчинні у воді;
Б. Високомолекулярні органічні сполуки добре розчинні в органічних розчинниках;
В. Низькомолекулярні органічні сполуки добре розчинні в органічних розчинниках;
Г. Низькомолекулярні органічні сполуки добре розчинні у воді.
2. **На які три групи поділяють ліпіди:**
А. Прості, складні, похідні ліпідів;
Б. Складні, жироподібні, воски;
В. Тригліцериди, фосфоліпіди, стериди;
Г. Гліколіпіди, фосфоліпіди, жирні кислоти.
3. **Гліцериди (нейтральні жири) побудовані з:**
А. Двохатомного спирту етиленгліколю і вищих жирних кислот;
Б. Трьохатомного спирту гліцерину і вищих жирних кислот;

- В. Трьохатомного спирту гліцерину і фосфорної кислоти;
Г. Одноатомного спирту етанолу і вищої жирної кислоти.
4. **Які із вказаних жирних кислот є ненасиченими:**
А. Пальмітинова, масляна, капронова;
Б. Арахідонова, олеїнова, лінолева;
В. Арахісова, пальмітинова, стеаринова;
Г. Бегенова, капронова, пальмітинова.
5. **Що показує йодне число жиру?**
А. Вміст насичених жирних кислот;
Б. Вміст вільних жирних кислот;
В. Кислотність жиру;
Г. Кількість ненасичених жирних кислот.
6. **Що показує кислотне число жиру?**
А. Кількість зв'язаних жирних кислот;
Б. Кількість вільних жирних кислот;
В. Кількість ненасичених жирних кислот;
Г. Кількість насичених жирних кислот.
7. **Вкажіть сполуки, які належать до фосфоліпідів:**
А. Лецитини, кефаліни;
Б. Стерини, стериди;
В. Цереброзиди, гангліозиди;
Г. Гліколіпіди, гліцериди.
8. **До складу яких ліпідів входять азотисті основи холін і коламін (етаноламін)?**
А. Гліцеридів, стеринів;
Б. Лецитинів, кефалінів;
В. Гліколіпідів, цереброзидів;
Г. Гангліозидів, стеридів.
9. **Які тканини організму містять найбільшу кількість фосфоліпідів?**
А. Печінка, мозок;
Б. Кров, шкіра;
В. Сполучна тканина, лімфа;
Г. М'язи, ліквор.
10. **До складу яких груп ліпідів входять вуглеводи?**
А. Кардіоліпіни, сфінгомієліни;
Б. Фосфатидилхоліни, ацетальфосфатиди;
В. Фосфатидилколаміни, тригліцериди;
Г. Цереброзиди, гангліозиди.
11. **Вкажіть, які сполуки відносять до стеридів?**
А. Сполуки гліцерину і фосфорної кислоти;

РОЗДІЛ 2 ДИНАМІЧНА БІОХІМІЯ

ЛАБОРАТОРНО-ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №1 ТЕМА: ОБМІН РЕЧОВИН І ЕНЕРГІЇ. БІОЛОГІЧНЕ ОКИСНЕННЯ

Опрацювати теоретичний матеріал, використовуючи літературу

Основна: [1, с. 322-346]; [2, с. 358-389]; [3, с. 178-188, 411-430]; [4, с. 115-136]; [5, с. 244-282].

Додаткова: [4]; [5]; [6]; [8]; [9]; [10].

Методичні вказівки

1. При розгляді теоретичних питань звернути увагу на: особливості загального, проміжного та внутрішньоклітинного обміну речовин; шляхи вилучення, перетворення і використання енергії у клітині, біологічне окиснення та його етапи; будову макроергічних сполук, їх класифікацію і шляхи утворення; схему перенесення протонних еквівалентів від первинного донора до кінцевого акцептора; будову мітохондрій та роль ферментних систем внутрішньої мембрани в генерації енергії АТФ.
2. Розмежовувати поняття “анаболічні та катаболічні реакції”, “асиміляція і дисиміляція”, “специфічні та амфіболічні шляхи метаболізму”, їх особливості.
3. При виконанні практичних робіт дотримуватись правил техніки безпеки.
4. Оформити роботи, пояснити результати, записати висновки і виконати завдання для самоконтролю знань.

Теоретичні питання

1. Предмет і завдання динамічної біохімії.
2. Охарактеризувати живі організми як відкриті системи.
3. Характерні ознаки живого. Суть обміну речовин, особливості його в живих організмах і неживих системах.
4. Характеристика складових обміну. Асиміляція та дисиміляція.
5. Поняття про загальний, проміжний і внутрішньоклітинний обмін.
6. Специфічні функції обміну речовин.
7. Поняття про анаболічні та катаболічні реакції, їх особливості.

8. Ендергонічні і екзергонічні реакції, приклади, особливості.
9. Поняття про специфічні та амфіболічні шляхи метаболізму.
10. Обмін енергії в живих системах, значення, функції.
11. Характеристика механізмів вилучення енергії. Поділ живих організмів залежно від джерел енергії і джерел атомів карбону.
12. Фото- і хемотрофи, їх характеристика та особливості.
13. Аутотрофні та гетеротрофні організми.
14. Поняття про вільну і зв'язану енергію. Характеристика джерел енергії для організму. Пояснити особливості використання енергії в живих організмах та неживих системах.
15. Етапи звільнення енергії, їх характеристика. Енергетичні сходинки.
16. Взаємний зв'язок між процесами звільнення і використання енергії. Енергетичне sprzęження як спосіб використання енергії в живих організмах.
17. Макроергічні сполуки, їх види, будова та функції.
18. Роль АТФ в енергетичному обміні.
19. УТФ, ЦТФ та їх роль у біоенергетичних процесах.
20. Фосфорилуюче окиснення, його біологічна роль. Види фосфорилуючого окиснення залежно від рівня sprzęження.
21. Фосфорилуюче окиснення на рівні субстрату. Механізм, приклади реакцій, значення.
22. Біологічне окиснення, значення для організму.
23. Розвиток уявлень про процеси біологічного окиснення. Пероксидна теорія О.Н. Баха.
24. Внесок О. Варбурга в формування уявлень про біологічне окиснення.
25. Сучасна теорія біологічного окиснення Палладіна-Віланда.
26. Шляхи використання кисню у процесах окиснення в організмі.

Тестові завдання

1. **Синтез АТФ в аутотрофів відбувається внаслідок:**
 А. Окиснення глюкози; Б. Взаємодії між субстратами;
 В. Розкладу жирних кислот; Г. Енергії фотонів;
2. **Дихальний ланцюг забезпечує:**
 А. Синтез ферментів;
 Б. Перетворення енергії;
 В. Транспорт кисню;
 Г. Перенесення протонних еквівалентів.
3. **До складу дихального ланцюга входять всі нижче перелічені компоненти, за винятком:**

- Д. Прагненням окисно-відновних пар перенесення електронів до розсіювання вільної енергії.
- 13. Вилучення енергії із субстратів тканинного дихання у дихальному ланцюзі відбувається внаслідок:**
- А. Розкладу субстратів до CO_2 і H_2O ;
 - Б. Зростання окисно-відновного потенціалу компонентів дихального ланцюга;
 - В. Перенесення електронів по дихальному ланцюгу;
 - Г. Перетворення енергії відщеплених електронів у протонний потенціал внутрішньої мембрани мітохондрій.
- 14. Де відбувається синтез АТФ під час окисного фосфорилювання?**
- А. В мітохондріях;
 - Б. В цитозолі;
 - В. На цитохромах;
 - Г. На АТФ-синтетазі, що знаходиться у матриксі й пронизує внутрішню мембрану.
- 15. Яка кількість молекул АТФ синтезується у процесі тканинного дихання, якщо первинною дегідрогеназою виступає НАД:**
- А. 2;
 - Б. 3;
 - В. 7;
 - Г. 4.
- 16. Скільки молекул АТФ синтезується у процесі тканинного дихання, якщо первинною дегідрогеназою виступає ФМН:**
- А. 5;
 - Б. 3;
 - В. 2;
 - Г. 4.
- 17. В якому місці дихального ланцюга призупиняється транспорт електронів під впливом актиноміцину?**
- А. Між НАДН₂ і ФМН;
 - Б. Між KoQH_2 і цитохромом b;
 - В. Між цитохромом b і c;
 - Г. Між цитохромом aa_3 і O_2 .
- 18. Як впливають на функціонування дихального ланцюга йони K^+ , якщо вони потрапляють у мітохондрію?**
- А. Не впливають;
 - Б. Частина енергії дихання використовується на транспорт іонів;
 - В. Збільшується утворення АТФ, бо зростає позитивний потенціал;
 - Г. Вихід АТФ зменшується, бо йони K^+ як іонофори зменшують величину мембранного електрохімічного потенціалу.
- 19. Макроергічними зв'язками називаються:**
- А. Хімічні зв'язки, на утворення яких потрібно багато енергії;
 - Б. Зв'язки, рівень зміни стандартної вільної енергії яких більше 20 кДЖ/Моль;
 - В. Зв'язки, при гідролізі яких виділяється менше 15 кДж енергії;
 - Г. Хімічні зв'язки, що утворені вугільною кислотою.

РОБОТА № 1 ВИДІЛЕННЯ ПРЕПАРАТУ ЦИТОХРОМІВ ТА ЦИТОХРОМОКСИДАЗИ

Принцип методу. Метод ґрунтується на центрифугуванні гомогенізованої м'язової тканини та екстрагуванні цитохрому “с” з отриманого гомогенату.

Матеріал для дослідження: свіжа м'язова тканина.

Реактиви: дистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, ножиці, ступки, лійки, фільтри, скляний або кварцевий пісок, терези з набором різноважок.

Хід роботи

5 г свіжої м'язової тканини звільнити від жиру і добре подрібнити ножицями. Подрібнену тканину гомогенізувати в фарфоровій ступці при поступовому додаванні чотирикратного об'єму дистильованої води до утворення гомогенної маси (для кращої гомогенізації можна використати кварцевий пісок).

Одержаний гомогенат профільтрувати через марлю складену вдвоє. Осад, що залишився на фільтрі, який містить цитохромоксидазу, комплекс цитохромів та інші дегідрогенази, промити водою до отримання прозорої рідини, після чого розділити його на три частини. Першу частину використати для відновлення цитохрому “с”, а дві інші – для проведення якісної реакції на цитохромоксидазу (для виявлення цитохромоксидазної активності).

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Записати схему транспорту електронів по цитохромній системі.
2. Яку окисно-відновну реакцію забезпечує цитохром “с”?
3. Вказати пункти спряження процесів окиснення і фосфорилування, локалізовані на цитохромній системі.

РОБОТА № 2 ВІДНОВЛЕННЯ ЦИТОХРОМУ “С”

Цитохром “с” – важливий компонент дихального ланцюга, який забезпечує транспорт протонних еквівалентів (електронів) на ділянці дихального ланцюга між цитохромами “в” і “а”. За хімічною природою він є складним білком, до складу якого в вигляді простетичної групи входить похідне протопорфірину IX, що

містить йони феруму, здатні змінювати ступінь окиснення і переходити із окисненої у відновлену форму. Цим зумовлена участь цитохрому “с” у процесах біологічного окиснення.

Принцип методу. Аскорбінова кислота відновлює цитохром “с”, внаслідок чого окиснюється до дигідроаскорбінової. Після відновлення цитохрому “с” колір розчину змінюється, що можна виявити візуально.

Матеріал для дослідження: препарат цитохрому “с” або 100 мг% розчин цитохрому “с”.

Реактиви: 0,5М розчин аскорбінової кислоти.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр.

Хід роботи

У пробірку, з одержаним у попередній роботі препаратом цитохрому “с” або 100 мг% розчином цитохрому “с”, додати 2 мл 0,5М розчину аскорбінової кислоти, спостерігати за зміною забарвлення.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

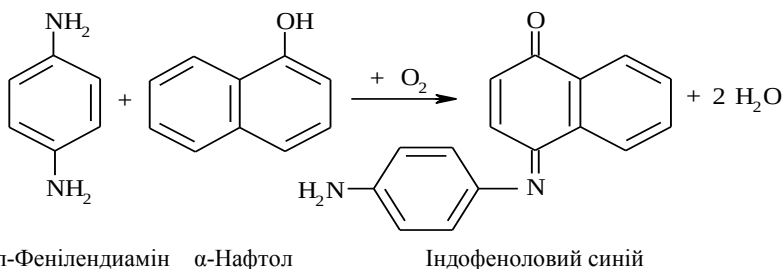
Дати відповіді на запитання

1. Яке значення має здатність цитохрому “с” переходити з окисненої у відновлену форму?
2. У чому подібність і відмінність у будові та функціях цитохромів і гемоглобіну?
3. Які компоненти цитохромної системи безпосередньо контактують з цитохромом “с”? Записати будову цитохромної системи.

РОБОТА № 3 ЯКІСНА РЕАКЦІЯ НА ЦИТОХРОМОКСИДАЗУ

Цитохромоксидаза (цитохром “аа₃”) – фермент, який завершує дихальний ланцюг, переносить два електрони, зняті з цитохрому “а”, безпосередньо на кисень. За хімічною природою цитохромоксидаза – це складний білок, до складу простетичної групи якого, крім йонів феруму, входять йони купруму.

Принцип методу. Цитохромоксидаза здатна окиснювати не лише цитохроми, але і деякі органічні сполуки, зокрема, реактив НАДІ, що містить *n*-фенілендіамін та α -нафтол, при взаємодії яких за присутності кисню утворюється барвник індофеноловий синій:



Матеріал для дослідження: препарат цитохромоксидази (з роб. № 1).

Реактиви: дистильована вода, реактив НАДІ.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, скляні палички, спиртівка.

Хід роботи

У дві пробірки з препаратом цитохромоксидази додати по 1 мл води та добре перемішати. Вміст першої (контрольної) пробірки прокип'ятити на спиртівці протягом 2-3 хв. Після охолодження в кожну з них внести по 2 мл реактиву НАДІ та перемішати. Спостерігати за зміною забарвлення.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Розрахувати зміни рівня стандартної вільної енергії у процесі перенесення протонів і електронів по системі дихального ланцюга.
2. Вказати пункти спряження в системі дихального ланцюга.
3. Записати хімізм реакцій, що відбуваються на завершальному етапі тканинного дихання, пояснити їх значення.

РОБОТА № 4

ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОЦЕСУ ФОСФОРИЛЮЮЧОГО ОКИСНЕННЯ

Матеріал для дослідження: суспензія мітохондрій.

Реактиви: інкубаційна суміш, АДФ, розчин субстрату (0,3М розчини ізоцитрату, малату, сукцинату, глютамінової кислоти (рН...7,4)), 10% розчин ТХА, 2,5% розчин амоній молібдату, 0,3М розчин аскорбінової кислоти в 0,1н розчині хлоридної кислоти, дистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки на 1 мл, мірний циліндр, лійки, фільтри, термостат.

Хід роботи

У дві пробірки внести по 1 мл інкубаційної суміші і 0,02 мл АДФ. У першу (дослідну) пробірку додати 0,5 мл субстрату та 0,5 мл суспензії мітохондрій, а у другу (контрольну) – 0,5 мл води і 0,5 мл суспензії мітохондрій. Вміст пробірок перемішати та поставити в термостат при 37°C на 15 хв. У кожну пробірку додати по 0,1 мл 10% розчину ТХА (для припинення реакції) і профільтрувати через складчастий фільтр.

У фільтратах визначити фосфатну кислоту: до фільтрату додати по 2 мл 2,5% розчину амоній молібдату і 0,5 мл розчину аскорбінової кислоти в 0,1н розчині хлоридної кислоти. Спостерігати за зміною забарвлення.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Яке значення процесу фосфорилуючого окиснення?
2. Дати визначення понять: “фосфорилуюче окиснення на рівні субстрату”, “фосфорилуюче окиснення на рівні електронно-транспортного ланцюга”.
3. Вказати основні шляхи утворення АТФ у гетеротрофних організмів.

ЛАБОРАТОРНО-ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №2

ТЕМА: ОБМІН БІЛКІВ

Опрацювати теоретичний матеріал, використовуючи літературу

Основна: [1, с. 347-388]; [2, с. 304-351]; [3, с. 261-305]; [4, с. 234-269, 300-309]; [5, с. 397-432, 474-487].

Додаткова: [4]; [5]; [6]; [8]; [10].

Методичні вказівки

1. При розгляді теоретичних питань звернути увагу на особливості перетворення білків під впливом ферментів у шлунково-кишковому тракті; кінцеві продукти обміну білків; особливості γ-глутаміл-трансферазного циклу, пояснити його значення.
2. Пояснити механізми знешкодження продуктів гниття білків у шлунково-кишковому тракті.

3. Охарактеризувати реакції перетворення амінокислот після всмоктування (дезамінування, переамінування, декарбоксилювання та ін.).
4. З'ясувати особливості утворення кінцевих продуктів білкового обміну.
5. Розмежовувати поняття уреотелітичні, урікотелітичні та амонійтелітичні організми.
6. Ознайомитися з особливостями методів визначення кінцевих продуктів білкового обміну.
7. При виконанні практичних робіт дотримуватись правил техніки безпеки.
8. Оформити роботи, пояснити результати, записати висновки і виконати завдання для самоконтролю знань.

Теоретичні питання

1. Обмін білків – центральна ланка метаболізму. Значення білків у харчуванні, повноцінні і неповноцінні білки.
2. Поняття про білковий мінімум та коефіцієнт зношування.
3. Баланс азоту в організмі. Добова потреба в білках.
4. Шляхи розкладу білків у травному каналі. Характеристика ферментів, що забезпечують цей процес.
5. Транспорт амінокислот через клітинні мембрани (γ-глутаміл-трансферазний цикл).
6. Гниття білків у кишках.
7. Механізми знешкодження продуктів гниття білків.
8. Внутрішньоклітинний обмін амінокислот.
9. Перетворення амінокислот по аміногрупі, характеристика ферментів.
10. Перетворення амінокислот по карбоксильній групі.
11. Перетворення амінокислот по радикалах, особливості, значення.
12. Характеристика кінцевих продуктів обміну амінокислот. Транспортні форми аміаку в організмі.
13. Шляхи зв'язування аміаку. Орнітиновий цикл.
14. Новоутворення амінокислот в організмі. Первинні і вторинні амінокислоти.

Тестові завдання

1. Під впливом яких ферментів проходить розщеплення білків у шлунку:
 А. Пепсиногену; Б. Трипсину;
 В. Пепсину; Г. Ентерокінази.

2. Які ферменти розщеплюють білки до пептидів у кишківнику:

- | | |
|-----------------------|--------------------|
| А. Трипсин; | Б. Амінопептидази; |
| В. Карбоксипептидази; | Г. Дипептидази. |

3. Ферменти, що забезпечують перетворення білків у шлунково-кишковому тракті, належать до класу:

- | | |
|--------------------|----------------|
| А. Оксидоредуктаз; | Б. Трансфераз; |
| В. Гідролаз; | Г. Ізомераз. |

4. Перенесення амінокислот через клітинні мембрани забезпечується за рахунок:

- | | |
|---------------------|--|
| А. Циклу Кребса; | Б. Карнітинового циклу; |
| В. Лимонного циклу; | Г. γ -глутамілтрансферазного циклу. |

5. Ендопептидазою є:

- | | |
|-----------------------|--------------------|
| А. Пепсин; | Б. Амінопептидаза; |
| В. Карбоксипептидаза; | Г. Дипептидаза. |

6. Екзопептидазою є:

- | | |
|-----------------|-----------------|
| А. Пепсин; | Б. Трипсин; |
| В. Хімотрипсин; | Г. Дипептидаза. |

7. Яка сполука є коферментом трансаміназ:

- | | |
|-----------------------|------------------------|
| А. Піридоксальфосфат; | Б. Піридоксамінфосфат; |
| В. Тіамін; | Г. Тіамініпрофосфат. |

8. У результаті внутрішньомолекулярного дезамінування амінокислот утворюються:

- | | |
|---------------------|------------------------------|
| А. Кетокислоти; | Б. Насичені жирні кислоти; |
| В. Гідроксикислоти; | Г. Ненасичені жирні кислоти. |

9. У результаті окисного дезамінування амінокислот утворюються:

- | | |
|---------------------|------------------------------|
| А. Кетокислоти; | Б. Насичені жирні кислоти; |
| В. Гідроксикислоти; | Г. Ненасичені жирні кислоти. |

10. Який амін утворюється при декарбоксилюванні гістидину:

- | | |
|---------------|---------------|
| А. Тирамін; | Б. Гістамін; |
| В. Путресцин; | Г. Кадаверин. |

11. Яка отруйна сполука утворюється при декарбоксилюванні лізину:

- | | |
|-------------|---------------|
| А. Тирозин; | Б. Путресцин; |
| В. Індол; | Г. Кадаверин. |

12. При декарбоксилюванні орнітину утворюється:

- | | |
|---------------|------------|
| А. Скатол; | Б. Фенол; |
| В. Путресцин; | Г. Крезол. |

13. При декарбоксилюванні якої амінокислоти утворюється β -аланін:

- А. Аспарагінової кислоти; Б. Глутаміну;
В. Глутамінової кислоти Г. Лейцину.
- 14. При декарбоксилюванні якої амінокислоти утворюється γ-аміномасляна кислота:**
А. Глутамінової кислоти; Б. Гліцину;
В. Аспарагінової кислоти; Г. Лізину.
- 15. Яка амінокислота є акцептором аміаку при утворенні його транспортних форм:**
А. Аланін; Б. Валін;
В. Гліцин; Г. Аспарагінова кислота.
- 16. Похідне якої амінокислоти забезпечує процеси метилювання субстратів:**
А. Ізолейцин; Б. Метіонін;
В. Треонін; Г. Серин.
- 17. Яка амінокислота є проміжним продуктом при біосинтезі сечовини і розщеплюється з утворенням орнітину та сечовини:**
А. Лейцин; Б. Цитрулін;
В. Аргінін; Г. Валін.
- 18. Під час розкладу якої амінокислоти утворюються індол і скатол:**
А. Триптофану; Б. Тирозину;
В. Фенілаланіну; Г. Гістидину.
- 19. Під час розкладу якої амінокислоти утворюються крезол:**
А. Триптофану; Б. Тирозину;
В. Аланіну; Г. Цистеїну.
- 20. Яка сполука є кінцевим продуктом азотистого обміну у птахів:**
А. Креатин; Б. Аміак;
В. Сечова кислота; Г. Сечовина.
- 21. Яка сполука є головним кінцевим продуктом азотистого обміну у ссавців:**
А. Сечова кислота; Б. Сечовина;
В. Аміак; Г. Алантоїн.

Вправи

- Записати хімізм гідролітичного розкладу білка за схемою: білок → поліпептиди → амінокислоти. Вказати ферменти.
- Записати схему гідролізу гексапептиду довільної будови під впливом аміно- і карбоксипептидаз.

3. Здійснити гідроліз поліпептиду довільної будови під впливом пепсину, трипсину та хімотрипсину.
4. Написати рівняння реакцій дезамінування серину, лейцину і треоніну за участю флавінвмісного білка (оксидази амінокислот).
5. Записати окиснювальне дезамінування глютамінової та аспарагінової кислоти під впливом НАД⁺-залежної оксидоредуктази.
6. Записати схему переамінування аланіну та α -кетоглутарової кислоти.
7. Записати схему декарбоксилювання аспарагінової кислоти під впливом β -аспартатдекарбоксилази.
8. Записати схему утворення гістаміну, тираміну, триптаміну.
9. Здійснити перетворення за схемою: глютамінова кислота $\rightarrow$ 4-аміно-бутират + CO₂.
10. Записати схему декарбоксилювання аргініну, лізину, орнітину.
11. Шляхи зв'язування та перенесення аміаку в організмі.
12. Записати орнітиновий цикл, хімізм, значення.
13. Здійснити перетворення за схемами: а) цистеїн $\rightarrow$ таурин; б) метіонін $\rightarrow$ цистеїн.
14. Вказати можливі шляхи біосинтезу аланіну, охарактеризувати ферменти, які каталізують ці реакції.
15. Записати рівняння реакцій за схемою: гомосерин $\rightarrow$ цистотіонін $\rightarrow$ гомоцистеїн $\rightarrow$ метіонін.
16. В обміні речовин важлива роль належить реакції трансметилування за участю S-аденозилметіоніну. Записати рівняння реакцій, що проходять за схемою: метіонін $\rightarrow$ S-аденозилметіонін $\rightarrow$ N-диметил-гліцин (саркозин) $\rightarrow$ гомоцистеїн.
17. Записати реакції орнітинового циклу, вказати ферменти, що каталізують окремі його етапи.
18. Записати реакції: а) дезамінування амінокислот Сер, Вал, Тре, Глі; б) декарбоксилювання амінокислот Орн, Арг, Асп, Глу, Тир, Фен.
19. Які діаміни утворюються в результаті декарбоксилювання амінокислот Ліз, Орн, Арг? Записати реакції, вказати ферменти.
20. Записати повні схеми реакцій переамінування між:
а) α -кетоглутаровою кислотою і аланіном,
б) ЩОК та гліцином,
в) ЩОК і глютаміновою кислотою.

МЕТОДИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ БІЛКІВ ТА КІНЦЕВИХ ПРОДУКТІВ ОБМІНУ

РОБОТА №1 ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ БІЛКА В СИРОВАТЦІ (ПЛАЗМІ) КРОВІ БІУРЕТОВИМ МЕТОДОМ

Принцип методу. Білки сироватки (плазми) крові в лужному середовищі при взаємодії з купрум (II) сульфатом утворюють комплексні сполуки фіолетового кольору. Інтенсивність забарвлення комплексу купрум-іонів з функціональними групами пептидного зв'язку пропорційна вмісту білка.

Для визначення білків не слід використовувати сироватку, яка містить сліди гемолізу, оскільки гемоглобін, що звільняється при гемолізі еритроцитів, також дає позитивну біуретову реакцію.

Матеріал для дослідження: сироватка крові.

Реактиви: стандартний розчин білка (10% розчин альбуміну концентрації 100 (або 98) г/л.), робочий розчин біуретового реактиву.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, піпетки, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 10 мм.

Хід роботи

Взяти дві пробірки: в першу (дослідну) внести 0,1 мл сироватки крові, а у другу (стандартну) – 0,1 мл стандартного розчину білка. В кожну пробірку додати по 5 мл робочого розчину біуретового реактиву (уникати піноутворення).

Через 30 хв. визначити екстинкцію стандартної і дослідної проби на ФЕК (зелений світлофільтр, 540-560 нм, кювета довжиною оптичного шляху 10 мм) відносно контролю (вода).

Розрахунок вмісту білка в сироватці крові провести:

1. За формулою:

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

$C_{\text{д.}}$ – вміст білка в дослідній пробі (г/л);

$C_{\text{ст.}}$ – вміст білка у стандартній пробі (г/л);

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

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

Приклад розрахунку. Якщо екстинкція стандартної проби складає 0,30, а дослідної – 0,18, то:

$$C = \frac{100 \cdot 0,18}{0,30} = 60 \text{ (г/л)}$$

2. За калібрувальною кривою, для побудови якої приготувати серію розведень стандартного розчину білка (100 г/л) концентрацією від 20 до 100 г/л як вказано в таблиці:

№ п/п	Стандартний розчин білка (100 г/л), мл	Н ₂ О дист. (або 0,9% розчин натрій хлориду), мл	Концентрація білка, г/л
1.	0,2	0,8	20
2.	0,4	0,6	40
3.	0,6	0,4	60
4.	0,8	0,2	80
5.	1,0	–	100

З кожного розведення відібрати по 0,1 мл робочого розчину і провести визначення вмісту білка (див. хід роботи).

За отриманими результатами побудувати криву: на осі абсцис відкласти значення концентрації білка, а на осі ординат – відповідні їм значення екстинкції та визначити вміст білка в дослідній пробі (див. рис.1.).

Провести розрахунки та зробити висновок.

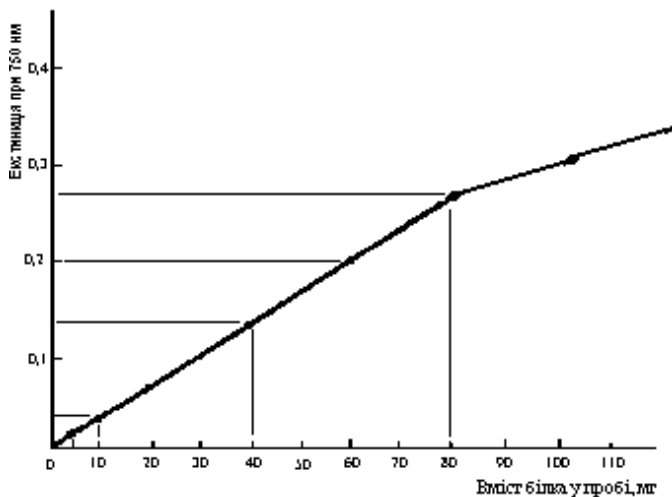


Рис. 1. Калібрувальна крива для визначення вмісту білка.

Дати відповіді на запитання

1. Які білки входять до складу рідин організму?
2. Чому сироватка крові, яку використовують для визначення вмісту білка, не повинна містити слідів гемолізу?
3. Пояснити принцип реакції, на якій ґрунтується кількісне визначення білка, записати хімізм.

РОБОТА № 2

ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ БІЛКА МЕТОДОМ ЛОУРІ

Принцип методу. При додаванні біуретового реактиву і реактиву Фоліна до біоматеріалу розвивається специфічне забарвлення, інтенсивність якого пропорційна вмісту білка.

Поєднання двох реакцій (біуретової та реакції Фоліна) значно підвищує чутливість методу. Це дає змогу визначати слідові кількості білка (20-50 мкг). Метод широко застосовують при визначенні вмісту білків у спінальній рідині, низки специфічних білків у крові, зокрема, фібриногену та ін.

Матеріал для дослідження: сироватка крові, розведена у 100 разів.

Реактиви: біуретовий реактив, реактив Фоліна, дистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки на 1 і 2 мл, скляні палички, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 10 мм.

Хід роботи

Взяти три пробірки: у першу (дослідну) внести 0,2 мл сироватки крові, у другу (стандартну) – 0,2 мл стандартного розчину білка, у третю (контрольну) – 0,2 мл води. В кожну пробірку додати по 2 мл біуретового реактиву, перемішати і через 10 хв. внести по 0,2 мл реактиву Фоліна.

Через 30 хв. визначити екстинкцію стандартної і дослідної проби на ФЕК (зелений світлофільтр, 540-560 нм, кювета довжиною оптичного шляху 10 мм) відносно контролю.

Розрахунок вмісту білків у сироватці крові провести за формулою чи калібрувальною кривою (див. попередню роботу).

Вміст білка в сироватці крові практично здорових людей складає: в дорослих – 65-85 г/л (у віці після 60 років вміст білка у плазмі знижується); у новонароджених: доношених – 46-70 г/л, недоношених – 36-60 г/л (у крові з пуповини – 40-80 г/л); у дітей віком 1 тиждень – 44- 76 г/л, 7 міс. – 1 рік – 51-73 г/л, 1-2 роки – 56-75 г/л, 3-6 років – 56-85 г/л.

Провести розрахунки та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Чому метод Лоурі чутливіший порівняно з іншими?
2. Яке значення має кількісне визначення вмісту білка?
3. Чи однаковий білковий склад сироватки, плазми та цільної крові?

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ КІНЦЕВИХ ПРОДУКТІВ БІЛКОВОГО ОБМІНУ

1. Загальний азот сечі

Враховуючи те, що білки є азотовмісними сполуками, важливою характеристикою стану білкового обміну є азотистий баланс – показник, який дає уяву про відношення між вмістом азоту, що надходить до організму, та кількістю азоту, який виділяється у складі кінцевих продуктів обміну.

Сума всіх азотовмісних сполук, що виділяються з сечею у процесі обміну, складає загальний азот сечі. Цей показник включає: азот сечовини (80-90% загального азоту), аміаку (біля 5% загального азоту), креатиніну (2-7% загального азоту), сечової кислоти (1,6% загального азоту), гіпурової кислоти (0,5% загального азоту), індикану, парних глюкуронових кислот (1-3% загального азоту). За добу з сечею виділяється 10-20 г загального азоту, основну частину якого складає азот сечовини.

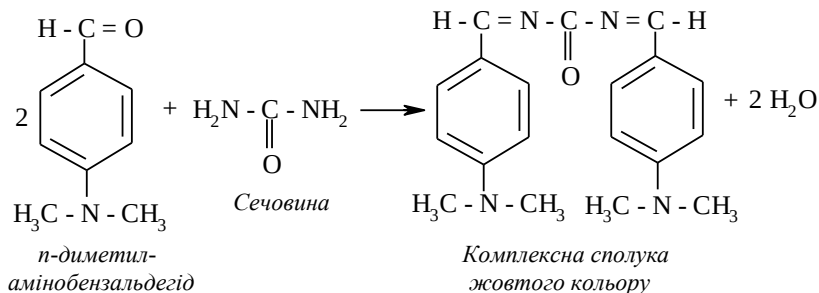
За вмістом загального азоту сечі можна визначити кількість білка, що надходить до організму, та розрахувати стан азотистого балансу. Для цього кількість визначеного азоту слід перемножити на коефіцієнт перерахунку 6,25, розрахованого виходячи з того, що в білках міститься в середньому 16% азоту.

Визначення вмісту загального азоту сечі та окремих його складових має важливе значення для оцінки стану білкового обміну в організмі, а також функціонування внутрішніх органів – печінки, нирок та ін.

а. Азот сечовини

РОБОТА № 3 ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ АЗОТУ СЕЧОВИНИ

Принцип методу. Аміногрупи сечовини в кислому середовищі з *n*-диметиламінобензальдегідом утворюють комплексну сполуку жовтого кольору, інтенсивність забарвлення якої пропорційна вмісту сечовини в сечі:



Матеріал для дослідження: сеча.

Реактиви: стандартний розчин сечовини (10 мг%), дистильована вода, 2% розчин *n*-диметиламінобензальдегіду.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки на 1 і 2 мл, скляні палички, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 3 мм.

Хід роботи

Піпетки і пробірки обов'язково повинні бути сухими!

Взяти три пробірки: в одну (дослідну) внести 0,2 мл сечі, у другу (стандартну) – 0,2 мл стандартного розчину сечовини, у третю (контрольну) – 0,2 мл дистильованої води. В кожну пробірку додати по 1,2 мл 2% розчину *n*-диметиламінобензальдегіду, добре перемішати.

Через 15 хв. визначити екстинкцію стандартної і дослідної проби на ФЕК (синій світлофільтр, кювета довжиною оптичного шляху 3 мм) відносно контролю.

Кількість сечовини розрахувати у грамах на добу (коефіцієнт перерахунку в одиниці СІ (мМоль/доб.) складає 16,65).

Приклад розрахунку. Якщо екстинкція стандартного розчину – 0,9, а дослідного – 0,6, то розрахунок проводимо за схемою:

1. Визначаємо вміст (в г%) сечовини сечі:

0,9 відповідає 1 г% сечовини

0,6 ————— X

$$X = 0,7 \text{ г\%}$$

2. Визначаємо вміст сечовини в добовій кількості сечі:

0,7 г сечовини міститься в 100 мл сечі

X г ————— в 1500 мл сечі

$$X = 10,5 \text{ г}$$

3. Розраховуємо загальну кількість азоту, що виділяється з сечовиною:

10,5 г азоту відповідає 95%

X г ————— 100%

$$X = 11,05 \text{ г}$$

4. Визначаємо кількість білка, що надходить до організму:

$$11,05 \text{ г} \cdot 6,25 = 69,07 \text{ г}$$

5. Розраховуємо кількість білка, яка повинна надходити до організму теоретично, враховуючи масу тіла:

$$65 \text{ кг} \cdot 1,2 = 78 \text{ г.}$$

Провести розрахунки і записати висновок про стан азотистого балансу та збалансованість раціону.

Дати відповіді на запитання

1. За яких умов при збалансованому харчуванні може спостерігатися негативний азотистий баланс? Відповідь обґрунтувати.
2. Пояснити поняття “азотистий баланс організму.”
3. Які рекомендовані норми добової потреби в білку та критерії її визначення?
4. Яким чином за вмістом азоту сечовини можна визначити стан азотистого балансу?

6. Азот аміаку

РОБОТА № 4

ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ АЗОТУ АМІАКУ В СЕЧІ

Принцип методу. При взаємодії амонійних солей з формальдегідом утворюється гексаметилентетраамін (уротропін) та звільняється еквівалентна кількість відповідних кислот, які відтитровують лугом.

Матеріал для дослідження: сеча.

Реактиви: 0,1% розчин фенолфталеїну, 0,1н розчин натрій гідроксиду, свіжонеїтралізований 20% розчин формальдегіду.

Обладнання: конічна колба на 50 мл, бюретка для титрування, мірний циліндр, піпетки.

Хід роботи

У конічну колбу на 50 мл внести 10 мл сечі, додати 1-2 краплі фенолфталеїну та нейтралізувати 0,1н розчином натрій гідроксиду до появи рожевого забарвлення. Після цього додати рівний об'єм свіжонеутралізованого розчину формальдегіду (реакція середовища змінюється і червоний колір індикатора зникає). Вміст колби відтитрувати 0,1н розчином натрій гідроксиду до появи стійкого рожевого забарвлення.

У добовій сечі здорової людини міститься 0,5-1 г аміаку або його екскреція з сечею складає 30-60 мМоль/доб.

Приклад розрахунку.

1. За кількістю натрій гідроксиду, використаного на титрування, можна визначити кількість аміаку в 10 мл сечі:

1 мл 0,1н NaOH еквівалентний вмісту 1,7 мг аміаку,
на титрування використано 2,2 мл 0,1н NaOH – x мг аміаку
 $x = 3,74 \text{ мг}$

2. Яка кількість аміаку виділяється з сечею за добу?

В 10 мл сечі — 3,74 мг аміаку

В 1500 мл сечі — x_1 мг аміаку

$$x_1 = 561 \text{ мг} = 5,61 \text{ г}$$

Провести розрахунки та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. На чому ґрунтується принцип методу визначення вмісту аміаку в сечі?
2. У вигляді яких сполук аміак виділяється з сечею?
3. Записати хімізм утворення транспортних форм аміаку в організмі.

в. Азот амінокислот

РОБОТА № 5

ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ВІЛЬНОГО АМІННОГО АЗОТУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ЗА МЕТОДОМ Г.А. УЗБЕКОВА

Принцип методу. Вміст амінного азоту визначають колориметрично за інтенсивністю забарвлення, яке утворюється внаслідок взаємодії амінокислот сироватки крові з нінгідриновим реактивом.

Матеріал для дослідження: сироватка крові.

Реактиви: 1% водний розчин нінгідрину, 0,04н розчин ацетатної кислоти, дистильована води.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки на 1 мл, водяна баня, скляні палички, мірні пробірки на 10 мл, фільтри, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм.

Хід роботи

У пробірку внести 0,5 мл сироватки крові та 0,5 мл 0,04н розчину ацетатної кислоти, закрити пробкою, поставити на водяну баню і повільно довести до кипіння та прокип'ятити протягом 5 хв. (відлік часу вести з моменту закипання). Після охолодження до вмісту пробірки додати 1 мл дистильованої води, перемішати скляною паличкою і профільтрувати через паперовий фільтр. Пробірку та осад на фільтрі промити 2 рази водою (по 1 мл), після чого фільтрат і промивні води об'єднати.

До отриманого фільтрату додати 0,5 мл 1% водного розчину нінгідрину, перемішати та помістити на киплячу водяну баню на 20 хв. Після охолодження загальний об'єм суміші довести дистильованою водою до 10 мл і залишити на 5 хв. при кімнатній температурі.

Паралельно приготувати контрольну пробу: в мірну пробірку внести 3 мл води, 0,5 мл 0,04н розчину ацетатної кислоти, 0,5 мл 1% водного розчину нінгідрину. Після перемішування поставити на киплячу водяну баню на 20 хв., охолодити і довести водою до 10 мл.

Визначити екстинкцію дослідної проби на ФЕК (зелений світлофільтр, 500-560 нм, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм) відносно контролю (можна брати звичайну дистильовану воду).

Розрахунок вмісту амінного азоту в сироватці крові провести:

1. За калібрувальною кривою, на якій слід знайти кількість мкг азоту, що відповідає отриманій екстинкції. Для переведення результатів у мг% використати формулу:

$$C = \frac{a \times 100}{b \times 1000}, \text{ де}$$

C – вміст азоту в дослідній пробі (мг%);

a – кількість азоту, знайдена за калібрувальною кривою (мкг);

b – об'єм сироватки крові, взятої для досліджу (0,5 мл);

1000 – коефіцієнт перерахунку мкг в мг.

2. Вміст амінного азоту можна визначити за градуювальною таблицею залежно від значень екстинкції (див. додаток 6).

У нормі вміст амінного азоту в сироватці крові складає 2,0-4,3 мг%.

Провести розрахунки та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Чому для визначення вмісту амінного азоту використовують нінгідринову реакцію?
2. Пояснити поняття “амінний азот”.
3. Яке діагностичне значення визначення вмісту амінного азоту в сироватці крові?

г. Залишковий азот

РОБОТА № 6

ВИЗНАЧЕННЯ ЗАЛИШКОВОГО АЗОТУ КРОВІ КОЛОРИМЕТРИЧНИМ МЕТОДОМ З РЕАКТИВОМ НЕССЛЕРА

Принцип методу. Залишковий азот визначають у безбілковому фільтраті з використанням реактиву Несслера.

Матеріал для дослідження: кров.

Реактиви: основний стандартний розчин амоній сульфату (0,1 мг азоту в 1 мл), 10% розчин ТХА, концентрована сульфатна кислота, 0,5н розчин сульфатної кислоти, 30% розчин гідроген пероксиду, 50% розчин натрій гідроксиду, реактив Несслера.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки на 1 мл, мірний циліндр, водяна баня, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм.

Хід роботи

У пробірку внести 1,8 мл дистильованої води і 0,2 мл крові, додати 0,3 мл 10% розчину ТХА та 0,2 мл 0,5н розчину сульфатної кислоти. Суміш ретельно перемішати і через 15 хв. профільтрувати в суху пробірку.

1 мл безбілкового фільтрату перенести в термостійку пробірку і додати 3 краплі концентрованої сульфатної кислоти та 3 краплі 30% розчину гідроген пероксиду і обережно прогріти до отримання безбарвного мінералізату.

Після охолодження до мінералізату додати 10 мл води, 6 крапель 50% розчину натрій гідроксиду (для нейтралізації кислоти) та 0,5 мл реактиву Несслера.

Паралельно приготувати контроль і стандартну пробу. Для приготування контролю до 10 мл води додати 6 крапель 50% розчину натрій гідроксиду та 0,5 мл реактиву Несслера. Стандартну пробу готувати додаванням до 10 мл основного стандартного розчину амоній сульфату 6 крапель 50% розчину натрій гідроксиду і 0,5 мл реактиву Несслера.

Визначити екстинкцію стандартної і дослідної проби на ФЕК (синій світлофільтр, 590 нм, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм) відносно контролю.

Розрахунок вмісту залишкового азоту у крові провести:

1. За формулами:

а) у безбілковому фільтраті:

$$C_{\text{д.}} = \frac{C_{\text{ст.}} \times E_{\text{д.}}}{E_{\text{ст.}}}, \text{ де}$$

$C_{\text{д.}}$ – вміст залишкового азоту в дослідній пробі;

$C_{\text{ст.}}$ – вміст азоту у стандартній пробі (0,1 мг/мл);

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

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

б) у крові:

$$C = \frac{C_{\text{д.}} \times v \times 100}{1 \times 0,2}, \text{ де}$$

C – вміст залишкового азоту крові (мг%);

$C_{\text{д.}}$ – вміст залишкового азоту в дослідній пробі (або знайдений за калібрувальною кривою);

v – загальний об'єм суміші, отриманий після осадження білків (2,5 мл);

0,2 – кількість крові, взятої для аналізу (мл).

2. За калібрувальною кривою, для побудови якої приготувати серію розведень основного стандартного розчину амоній сульфату як вказано в таблиці:

№ п/п	Основний стандартний розчин амоній сульфату (0,1 мг азоту в 1 мл), мл	H ₂ O дист., мл	Концентрація азоту в розчині, мг/10мл	Реактиви на визначення азоту
1.	1	9	0,01	6 крапель 50% розчину натрій гідроксиду, 1 крапля концентрованої сульфатної кислоти і 0,5 мл реактиву Несслера
2.	2	8	0,02	
3.	3	7	0,03	
4.	4	6	0,04	
5.	5	5	0,05	
6.	6	4	0,06	
7.	7	3	0,07	
8.	8	2	0,08	
9.	9	1	0,09	

Визначити екстинкцію проб як вказано вище. На основі отриманих результатів побудувати калібрувальну криву: на осі абсцис відкласти значення концентрації азоту, а на осі ординат – відповідні їм значення екстинкції.

Провести розрахунки та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Що означає поняття “залишковий азот крові”?
2. Чому визначення залишкового азоту проводять у безбілковому фільтраті?
3. Чому підвищення вмісту залишкового азоту у крові є небезпечним для організму?
4. Перерахувати компоненти, які складають залишковий азот. Вказати їх значення.

РОБОТА № 7

ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ КРЕАТИНІНУ В СЕЧІ ЗА КОЛЬОРОВОЮ РЕАКЦІЄЮ ЯФФЕ (метод Поппера та співроб.)

Принцип методу. Креатинін при взаємодії з пікриновою кислотою в лужному середовищі утворює креатинін пікрат оранжевого кольору.

У вигляді стандартного розчину замість 0,1% розчину креатиніну можна використовувати 0,5н розчин калій біхромату.

Матеріал для дослідження: сеча.

Реактиви: 0,5н розчин калій біхромату (забарвлення якого відповідає 0,01 мг креатиніну в 1 мл розчину) або основний стандартний розчин креатиніну (100 мг% або 8,8 мМоль/л), 10% розчин натрій гідроксиду (придатний протягом тижня), 2% (насичений) розчин пікринової кислоти, дистильована вода.

Обладнання: конічні колби на 50 і 100 мл, мірний циліндр, піпетки на 1 мл, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 10 мм.

Хід роботи

Дослід 1. Взяти три конічні колби на 100 мл: в першу (дослідну) внести 0,5 мл сечі, у другу (стандартну) – 0,5 мл основного стандартного розчину креатиніну. В кожну колбу додати по 3 мл насиченого розчину пікринової кислоти, ретельно перемішати, додати по 0,2 мл 10% розчину натрій гідроксиду і знову перемішати. У третю (контрольну) колбу внести 3 мл насиченого розчину пікринової кислоти та 0,2 мл 10% розчину натрій гідроксиду. Через 10 хв. загальний об'єм у колбах довести дистильованою водою до позначки.

Визначити екстинкцію стандартної і дослідної проби на ФЕК (зелений світлофільтр, 500-560 нм, кювета довжиною оптичного шляху 10 мм) відносно контролю.

Розрахунок вмісту креатиніну в сечі провести за формулою:

$$C_{\text{д.}} = \frac{C_{\text{ст.}} \times E_{\text{д.}} \times D}{E_{\text{ст.}} \times a \times 1000}, \text{ де}$$

$C_{\text{д.}}$ – вміст креатиніну в добовому об'ємі сечі;

$C_{\text{ст.}}$ – вміст креатиніну у стандартній пробі (100 мг% або 8,8 мМоль/л);

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

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

D – добовий об'єм сечі, мл;

a – об'єм сечі, взятої для аналізу (0,5 мл);

1000 – коефіцієнт перерахунку міліграм у грами.

Дослід 2. У колбу на 50 мл внести 0,4 мл сечі, додати 1 мл насиченого розчину пікринової кислоти та 0,4 мл 10% розчину натрій гідроксиду і ретельно перемішати. Через 10 хв. вміст колби довести водою до позначки та перемішати.

Визначити екстинкцію дослідної і стандартної (0,5 н розчин калій біхромату) проби на ФЕК (зелений світлофільтр, 530 нм, кювета довжиною оптичного шляху 10 мм) відносно контролю.

Розрахунок вмісту креатиніну в сечі провести за формулою:

$$C_{\text{д.}} = \frac{C_{\text{ст.}} \times E_{\text{д.}} \times D}{E_{\text{ст.}} \times 100}, \text{ де}$$

$C_{\text{д.}}$ – вміст креатиніну в добовому об'ємі сечі;

$C_{\text{ст.}}$ – вміст креатиніну у стандарті;

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

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

D – добовий об'єм сечі (мл).

За вмістом креатиніну можна отримати інформацію про стан фізичного навантаження людини.

Провести розрахунки та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Яка біологічна роль креатиніну?
2. Записати схему утворення креатину і креатиніну.
3. Як проходить обмінна реакція між креатином та АТФ?

ЛАБОРАТОРНО-ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №3 **ТЕМА: ОБМІН НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ**

Опрацювати теоретичний матеріал, використовуючи літературу

Основна: [1, с. 389-415]; [2, с. 262-303]; [3, с. 189-260]; [4, с. 270-300, 310-329]; [5, с. 446-473, 498-505].

Додаткова: [4]; [5]; [6]; [8]; [10].

Методичні вказівки

1. При розгляді теоретичних питань звернути увагу на особливості ферментного гідролізу нуклеїнових кислот.
2. Дати характеристику специфічних ендо- та екзонуклеаз, нуклеотидаз і нуклеозидаз.
3. Вивчити хімізм реакцій утворення кінцевих продуктів розкладу пуринів і піримідинів.
4. Охарактеризувати ферменти, які забезпечують синтез пуринових та піримідинових нуклеотидів.
5. При виконанні практичних робіт дотримуватись правил техніки безпеки.

6. Оформити роботи, пояснити результати, записати висновки і виконати завдання для самоконтролю знань.

Теоретичні питання

1. Охарактеризувати шляхи розкладу нуклеїнових кислот за участю специфічних ферментів.
2. Розклад полінуклеотидів. Характеристика основних груп нуклеаз, специфіка їх дії.
3. Катаболізм нуклеотидів, характеристика нуклеотидаз.
4. Розклад нуклеозидів, характеристика нуклеозидаз.
5. Шляхи розкладу основ пуринового ряду до кінцевих продуктів, характеристика ферментів.
6. Особливості катаболізму пуринів у людини та інших видів тварин.
7. Шляхи розкладу до кінцевих продуктів основ піримідинового ряду, характеристика ферментів.
8. Роль 5-фосфорибозил-1-пірофосфату в синтезі пуринових і піримідинових нуклеотидів.
9. Характеристика зв'язуючої ланки в синтезі нуклеозидмонофосфатів пуринового ряду.
10. Утворення нуклеозидмонофосфатів, нуклеозиддифосфатів та нуклеозидтрифосфатів пуринового ряду.
11. Синтез піримідинових нуклеотидів, характеристика ферментів.
12. Характеристика зв'язуючої ланки в синтезі нуклеозидмонофосфатів піримідинового ряду.
13. Утворення нуклеозидмонофосфатів, нуклеозиддифосфатів і нуклеозидтрифосфатів піримідинового ряду.

Тестові завдання

1. **Нуклеази – це ферменти, які розщеплюють:**
 - А. Полінуклеотиди до мононуклеотидів;
 - Б. Міжнуклеозидні зв'язки;
 - В. Мононуклеотиди до нуклеозидів;
 - Г. Нуклеозиди.
2. **Нуклеотидази – це ферменти, які розщеплюють:**
 - А. Міжнуклеозидні зв'язки;
 - Б. Полінуклеотиди до мононуклеотидів;
 - В. Мононуклеотиди до нуклеозидів;
 - Г. Нуклеозиди до пуринових і піримідинових основ та β -D-рибофуранози.
3. **Нуклеозидази – це ферменти, які розщеплюють:**

- А. Нуклеозиди до пуринових і піримідинових основ та β -D-рибофуранози;
 Б. Полінуклеотиди до моонуклеотидів;
 В. Міжнуклеозидні зв'язки;
 Г. Моонуклеотиди до нуклеозидів.
- 4. Яка сполука є кінцевим продуктом обміну пуринових основ у людини:**
 А. Сечовина і гліоксалева кислота; Б. Сечова кислота;
 В. Ксантин; Г. Алантоїн.
- 5. Яка сполука є кінцевим продуктом обміну пуринових основ у риб і амфібій:**
 А. Сечовина й гліоксалева кислота; Б. Сечова кислота;
 В. Алантоїнова кислота; Г. Алантоїн.
- 6. Які сполуки утворюються при розкладі урацилу:**
 А. Карбамінова та β -аміноізомасляна кислоти;
 Б. Карбамінова кислота і β -аланін;
 В. Алантоїн;
 Г. β -аланін та β -аміноізомасляна кислота.
- 7. Які сполуки утворюються при розкладі тиміну:**
 А. α -аланін і карбамінова кислота;
 Б. Карбамінова і β -аміноізомасляна кислоти;
 В. Сечова кислота;
 Г. β -аланін і β -аміноізомасляна кислота.
- 8. Який фермент бере участь в утворенні сечової кислоти з пуринових основ:**
 А. Урикооксидаза; Б. Ксантиноксидаза;
 В. Аденінаміносинтетаза; Г. Алантоїназа.
- 9. Який фермент забезпечує перетворення аденіну на гіпоксантин:**
 А. Аденозинізомераза; Б. Аденаза;
 В. Аденозингідролаза; Г. Алантоїназа
- 10. Який фермент забезпечує перетворення гуаніну на ксантин:**
 А. Гіанозинізомераза; Б. Гуаназа;
 В. Гуанозингідролаза; Г. Алантоїназа
- 11. Яка амінокислота бере участь у біосинтезі пуринових основ:**
 А. Аланін; Б. Гліцин; В. Аспарагін; Г. Лізін.
- 12. Попередником якої сполуки є оротова кислота:**
 А. Уридилової кислоти; Б. Цитидилової;
 В. Аденілової; Г. Гуанілової.
- 13. Попередником якої сполуки є інозинова кислота:**
 А. Цитидилової; Б. Аденілової;

- В. Гуанілової; Г. Уридилової.
- 14. Присутність яких сполук необхідна для функціонування ДНК-полімерази:**
 А. Йонів Mg^{2+} ; Б. ДНК-матриці;
 В. Затравної РНК з 3'-ОН-кінцем;
 Г. Чотирьох дезоксирибонуклеотид-5'-трифосфатів.
- 15. Які сполуки необхідні для нормальної діяльності РНК-полімерази (транскриптази):**
 А. Чотири рибонуклеозид-5'-фосфатів;
 Б. ДНК-затравка; В. Йони Mg^{2+} ; Г. РНК-затравка.
- 16. Яка з перерахованих нуклеїнових кислот є матрицею для біосинтезу рРНК:**
 А. рДНК; Б. рРНК; В. мРНК; Г. тРНК.
- 17. Яка з перерахованих нуклеїнових кислот забезпечує кодування амінокислот при біосинтезі білка:**
 А. рДНК; Б. рРНК; В. мРНК; Г. тРНК.
- 18. Який процес відбувається при перетворенні: УМФ → ЦМФ:**
 А. Фосфорилування; Б. Метилування;
 В. Амінування; Г. Дезамінування.
- 19. Який процес відбувається при перетворенні: дУМФ → дТМФ:**
 А. Фосфорилування; Б. Метилування;
 В. Амінування; Г. Дезамінування.

Вправи

- Записати сполуки, які утворюються при дії на олігонуклеотид такої первинної структури: АЦЦ ЦЦА ГГГ УУУ ЛГУ УЦФ:
 а) ендонуклеази зміної отрути;
 б) РНКазі I; в) РНКазі II;
 г) фосфодіестерази селезінки.
- Здійснити перетворення: аденін → сечова кислота; урацил → Х; сечова кислота → Х; аденозин-3'-фосфат → аденозин → інозит → гіпоксантин.
- Записати схему дезамінування цитозину, аденіну, гуаніну. Назвати ферменти, які каталізують ці реакції.
- Здійснити перетворення: гуанозин-3-фосфат → гуанозин → гуанін → ксантин → ?

5. Записати схему перетворення нуклеотиду довільної будови, який складається з шести нуклеотидних залишків під впливом екзо- і ендонуклеаз.
6. Специфіка дії рибонуклеаз (гідролаз та фосфодіестераз). Записати розщеплення тетрарибонуклеотидного фрагменту за участю цих ферментів.
7. Записати схему розщеплення:
 - а) динуклеотиду при дії 3'- і 5'-нуклеаз;
 - б) нуклеотиду за участю гідролаз та рибозилтрансфераз.
8. Записати формулу сечової кислоти в таутомерних формах.
9. Здійснити перетворення за схемами: а) гуанозин $\rightarrow$ ксантин; б) аденозин $\rightarrow$ інозит; в) гіпоксантин $\rightarrow$ сечова к-та.
10. Розклад мононуклеотидів до кінцевих продуктів: АМФ $\rightarrow$ сечова к-та; ГМФ $\rightarrow$ сечова к-та; ТМФ $\rightarrow$ кінцеві продукти розкладу.
11. Записати схеми перетворення до нуклеозидів таких фрагментів ДНК під впливом нуклеаз, нуклеотидаз і нуклеозидаз: 5'-АЦТГ-3'; 5'-ГТАТЦ-3'.
12. Записати повну схему розкладу до кінцевих продуктів фрагменту РНК такої будови: 3'-АГЦ ЦУУ-5'.
13. Які ферменти приймають участь у перетворенні аденіну в гіпоксантин та ксантин, а гуаніну в ксантин? Записати хімізм реакцій.
14. Записати будову та схему утворення кінцевих продуктів розкладу пуринів і піримідинів у нижчих організмів.
15. Записати будову та схему утворення кінцевих продуктів розкладу основ пуринового і піримідинового ряду в організмі людини та вищих ссавців.
16. Здійснити перетворення: $\text{NH}_3 + \text{CO}_2 + \text{АТФ} \rightarrow$ уридинмонофосфат.
17. Записати хімізм реакцій синтезу оротової кислоти.
18. Записати початкові реакції синтезу пуринових основ, вказати ферменти.
19. Які особливості синтезу нуклеозидмонофосфатів пуринового і піримідинового ряду?
20. Записати перетворення за схемою: УМФ $\rightarrow$ ЦМФ $\rightarrow$ ЦДФ $\rightarrow$ ЦТФ.
21. Які продукти утворюються при частковому гідролізі олігорибонуклеотиду 5'-ГЦА ГУА УУГ-3' за участю панкреатичної рибонуклеази?

ВИЗНАЧЕННЯ КІНЦЕВИХ ПРОДУКТІВ ОБМІНУ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ

РОБОТА № 1 ВИДІЛЕННЯ СЕЧОВОЇ КИСЛОТИ З СЕЧІ

У людини сечова кислота є кінцевим продуктом пуринового обміну. Джерелом сечової кислоти є нуклеопротейни їжі та тканин організму. При гідролізі нуклеопротейнів у тканинах організму утворюються амінопурини – аденін та гуанін, які зазнають гідролітичного дезамінування з утворенням гіпоксантину і ксантину. Під впливом ферменту оксидази гіпоксантин та ксантин окиснюються до сечової кислоти.

Принцип методу. Сечову кислоту виділяють при підкисленні сечі з наступним фільтруванням або випаровуванням.

I спосіб

Матеріал для дослідження: сеча.

Реактиви: концентрована хлоридна кислота.

Обладнання: мірний циліндр, лійка, конічні колби на 50 мл, фільтри.

Хід роботи

До 20 мл сечі додати 2 мл концентрованої хлоридної кислоти і залишити в холодильнику протягом доби. На дні та стінках посудини утворюються кристали сечової кислоти, забарвлені пігментами сечі в темно-бурий колір. З отриманим осадом провести якісні реакції на сечову кислоту.

II спосіб

Матеріал для дослідження: сеча.

Реактиви: 2% розчин хлоридної кислоти.

Обладнання: фарфорова чашка, мірний циліндр, водяна баня.

Хід роботи

У фарфорову чашку внести 5 мл сечі і випарити на водяній бані (при температурі не вище 70°C) до утворення сухого залишку, додати ще 5 мл сечі та повторно випарити. До сухого залишку додати 10 мл 2% розчину хлоридної кислоти і залишити на деякий час для кристалізації. Кристали сечової кислоти, що утворилися, використати для проведення якісних реакцій.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Які сполуки є попередниками утворення сечової кислоти?
2. Чому для виділення сечової кислоти необхідне кисле середовище?
3. Який вид патології пов'язаний з порушенням метаболізму пуринів?

РОБОТА № 2 ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА СЕЧОВУ КИСЛОТУ

а. Дослідження відновних властивостей сечової кислоти

Принцип методу. Сечова кислота при нагріванні в лужному середовищі відновлює купрум (II) гідроксид до купрум (I) оксиду, який має цегляно-червоне забарвлення.

Матеріал для дослідження: сечова кислота.

Реактиви: 10% розчин натрій гідроксиду, 1% розчин купрум (II) сульфату.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, піпетки, спиртівка.

Хід роботи

Кристали сечової кислоти з попередньої роботи внести в чисту пробірку, додати 2 мл 10% розчину натрій гідроксиду і по краплях 1% розчин купрум (II) сульфату до утворення блакитного осаду купрум (II) гідроксиду, який при перемішуванні не зникає. Пробірку прогріти на спиртівці та спостерігати за зміною забарвлення.

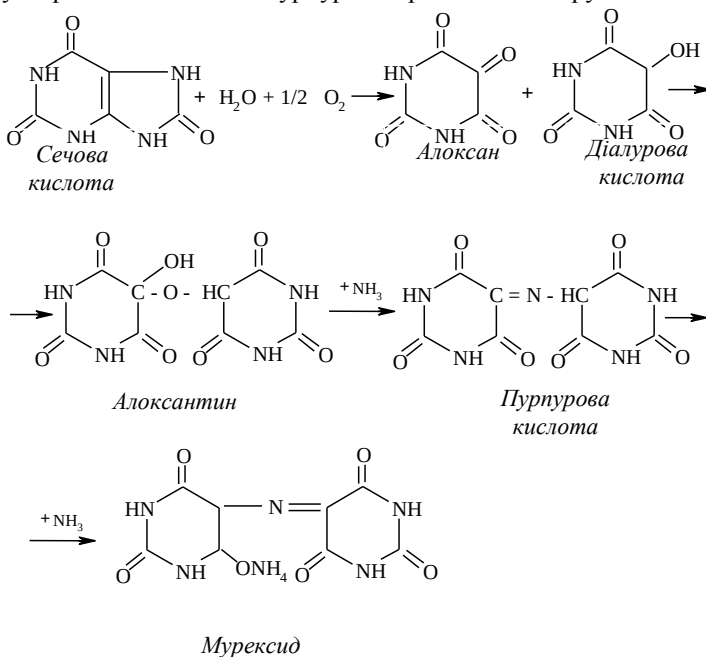
Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Чим зумовлені відновні властивості сечової кислоти?
2. Який фермент забезпечує перетворення ксантину в сечову кислоту?
3. Записати хімізм реакції за схемою: сечова кислота $\rightarrow \text{NH}_3 + \text{CO}_2$.

6. Мурексидна проба

Принцип методу. Сечова кислота за присутності нітратної кислоти розкладається з утворенням алоксану і діалурової кислоти, які далі утворюють комплекси пурпурно-червоного кольору:



Мурексидну пробу використовують для визначення сечової кислоти в сечових каменях.

Матеріал для дослідження: сечова кислота.

Реактиви: концентрована нітратна кислота, 25% розчин аміаку, 10% розчин натрій гідроксиду.

Обладнання: фарфорова чашка, водяна баня, піпетки.

Хід роботи

У фарфорову чашку внести кілька кристалів сечової кислоти, додати 2-3 краплі концентрованої нітратної кислоти і обережно випарити на водяній бані (при температурі не вище 70°C). Після охолодження до сухого коричнево-червоного залишку, який містить продукти окиснення і гідратації сечової кислоти, на один його бік

додати 1 краплину 25% розчину аміаку, на інший – 1 краплину 10% розчину натрій гідроксиду. За цих умов з аміаком утворюється пурпурно-червоне забарвлення мурексиду, а з розчином лугу – фіолетове забарвлення.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Які властивості сечової кислоти зумовлюють позитивну мурексидну пробу?
2. Яке клінічне значення мурексидної проби?
3. Пояснити принцип мурексидної проби.

РОБОТА № 3 КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ СЕЧОВОЇ КИСЛОТИ В СЕЧІ

І способ

Принцип методу. Сечова кислота відновлює фосфорно-вольфрамовий реактив, внаслідок чого утворюються оксиди вольфраму з нижчим ступенем окиснення, комплекси яких забарвлені в синій колір. Інтенсивність забарвлення пропорційна вмісту сечової кислоти.

Матеріал для дослідження: сеча.

Реактиви: насичений розчин натрій карбонату, реактив Фоліна, дистильована вода.

Обладнання: мірні пробірки на 10 мл, піпетки, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм.

Хід роботи

Взяти дві мірні пробірки на 10 мл: в першу (контрольну) внести 1,5 мл води, а у другу (дослідну) – 1,5 мл розведеної в 50 разів сечі. В кожну пробірку додати по 0,7 мл насиченого розчину натрій карбонату і 0,05 мл реактиву Фоліна, перемішати. Загальний об'єм рідини довести дистильованою водою до 10 мл.

Визначити екстинкцію дослідної проби на ФЕК (червоний світлофільтр, 600-650 нм, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм) відносно контролю.

Розрахунок вмісту сечової кислоти, яка виділяється з сечею за добу, провести за формулою:

$$C = \frac{a \cdot b \cdot v}{1,5 \cdot 1000} \text{ мг, де}$$

а – вміст сечової кислоти у пробі, яку знаходять за калібрувальною кривою (мкг);
б – розведення сечі;
в – об'єм сечі, що виділяється за добу (мл);
1,5 – об'єм сечі, взятої для аналізу (мл);
1000 – коефіцієнт перерахунку мікрограмів у міліграми.

Для побудови калібрувальної кривої необхідно приготувати серію робочих розчинів сечової кислоти різної концентрації.

Для приготування робочого стандартного розчину, який в 1 мл містить 0,02 мг сечової кислоти, необхідно 5 мл основного стандартного розчину сечової кислоти (20 мг%) внести в мірну колбу на 50 мл і довести дистильованою водою до позначки.

У 7 пронумерованих пробірок на 10 мл внести: 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 і 2 мл робочого стандартного розчину сечової кислоти, що відповідає 2, 4, 8, 12, 16, 20 і 40 мкг сечової кислоти. В кожну пробірку додати по 0,7 мл насиченого розчину натрій карбонату і 0,05 мл реактиву Фоліна. Об'єм у пробірках довести дистильованою водою до 10 мл.

Визначити екстинкцію стандартних проб на ФЕК за тих же умов, що і дослідної проби.

На основі отриманих результатів побудувати калібрувальну криву: на осі абсцис відкласти значення концентрації сечової кислоти, а на осі ординат – відповідні їм значення екстинкції.

Провести розрахунки та записати висновок.

II спосіб

Принцип методу. Сечова кислота в лужному середовищі відновлює фосфорновольфрамовий реактив до фосфорновольфрамової сині, інтенсивність забарвлення якої пропорційна вмісту сечової кислоти. Кількість відновленого фосфорновольфрамового реактиву визначають титриметрично.

Матеріал для дослідження: сеча.

Реактиви: 20% розчин натрій гідроксиду, реактив Фоліна, 0,01н розчин калій гексаціаноферату (III).

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки на 2 мл, бюретка для титрування.

Хід роботи

До 1,5 мл сечі додати 1 мл 20% розчину натрій гідроксиду і 1 мл фосфорновольфрамового реактиву Фоліна, перемішати та відтитрувати 0,01н розчином калій гексаціаноферату (III) до зміни забарвлення (синього на жовто-зелене).

Розрахунок. Для визначення сечової кислоти в сечі необхідно знати, яка кількість її відповідає 1 мл калій гексаціаноферату (III).

Якщо на титрування стандартної проби, що містить 0,25 мг сечової кислоти в 0,5 мл, використано 0,34 мл калій гексаціаноферату (III), то 1 мл реактиву відповідає $0,25 : 0,34 = 0,73$ мг сечової кислоти.

Розрахунок вмісту сечової кислоти (в мг) в добовій кількості сечі провести за формулою:

$$C = \frac{0,73 \cdot a \cdot b}{1,5} \text{ мг, де}$$

a – об'єм калій гексаціаноферату (III), використаного на титрування (мл);

b – добовий об'єм сечі (1500-2000 мл);

1,5 – об'єм сечі, використаної для аналізу (мл).

У сечі здорової людини протягом доби при звичайному харчовому раціоні виділяється близько 270-600 мг сечової кислоти.

Провести розрахунки та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Які особливості титриметричного методу визначення вмісту сечової кислоти?
2. Чи залежить рівень екскреції сечової кислоти від характеру дієти?
3. Яке діагностичне значення має визначення вмісту сечової кислоти в біоматеріалі?

РОБОТА № 4

ЯКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ КАРБАМІНОВОЇ КИСЛОТИ В СЕЧІ

Принцип методу. Карбамінова кислота є продуктом катаболізму пуринових основ. При нагріванні карбамінової кислоти з натрій дифеніл-п-сульфонатом, діацетилмонооксимом і калій персульфатом у кислому середовищі утворюються сполуки рожевого кольору, інтенсивність забарвлення яких пропорційна вмісту карбамінової кислоти.

Матеріал для дослідження: сеча.

Реактиви: 50% розчин сульфатної кислоти, 1% розчин натрій дифеніл-*n*-сульфонату, 3% розчин діацетилмонооксиму, 1% розчин калій персульфату.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки на 1 мл, мірний циліндр, пробка із зворотним холодильником, водяна баня.

Хід роботи

У колбу із зворотним холодильником внести 3 мл сечі, 6 мл 50% розчину сульфатної кислоти, 0,1 мл 1% розчину натрій дифеніл-*n*-сульфонату та 0,25 мл 3% розчину діацетилмонооксиму і поставити на киплячу водяну баню на 10 хв.

Після охолодження до суміші додати 0,25 мл 1% розчину калій персульфату та поставити на киплячу водяну баню на 1 хв. Охолодити і спостерігати за зміною забарвлення.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. При розкладі яких компонентів нуклеїнових кислот утворюється карбамінова кислота? Записати хімізм.
2. Пояснити принцип методу визначення карбамінової кислоти.
3. Записати хімізм утворення карбамінової кислоти.

РОБОТА № 5

ВИЗНАЧЕННЯ СЕЧОВОЇ КИСЛОТИ В СИРОВАТЦІ КРОВІ КОЛОРИМЕТРИЧНИМ МЕТОДОМ (за Мюлер-Зейфером)

Принцип методу. Вміст сечової кислоти визначають колориметрично в безбілковому фільтраті за реакцією з реактивом Фоліна.

Матеріал для дослідження: сироватка крові.

Реактиви: стандартний розчин сечової кислоти, 20% розчин ТХА, насичений розчин натрій карбонату, реактив Фоліна, дистильована вода.

Обладнання: мірні пробірки на 10 мл, піпетки на 1 мл, центрифужні пробірки, центрифуга, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм.

Хід роботи

У центрифужну пробірку внести 1 мл сироватки крові, додати 1 мл 10% розчину ТХА та 1 мл дистильованої води. Вміст пробірки

ретельно перемішати і через 30 хв. відцентрифугувати при 3000 об./хв. протягом 15 хв.

Взяти три мірні пробірки на 10 мл: в одну (дослідну) внести 1 мл центрифугату, у другу (стандартну) – 0,5 мл стандартного робочого розчину сечової кислоти, 0,5 мл 20% розчину ТХА і 0,5 мл дистильованої води, а у третю (контрольну) – 1 мл води. В кожен пробірник додати по 0,7 мл насиченого розчину натрій карбонату та 1 краплі (0,05 мл) реактиву Фоліна.

Через 10 хв. визначити екстинкцію стандартної і дослідної проби на ФЕК (червоний світлофільтр, 600-650 нм, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм) відносно контролю.

Розрахунок вмісту сечової кислоти в сироватці крові провести:

1. За формулою:

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

$C_{\text{д.}}$ – вміст сечової кислоти в дослідній пробі;

$C_{\text{ст.}}$ – вміст сечової кислоти у стандартній пробі;

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

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

2. За калібрувальною кривою, для побудови якої основний стандартний розчин сечової кислоти (200 мг/л) розвести дистильованою водою у 2 рази та приготувати серію його розведень як вказано в таблиці:

№ пробірки	Робочий стандартний розчин, 100 мг/л, (мл)	Дистильована вода, (мл)	Концентрація сечової кислоти	
			мг/л	мМоль/л
1.	0,5	9,5	5	0,029
2.	1,0	9,0	10	0,059
3.	2,0	8,0	20	0,118
4.	3,0	7,0	30	0,177
5.	4,0	6,0	40	0,236
6.	5,0	5,0	50	0,295
7.	6,0	4,0	60	0,354

Отримані розчини обробити як дослідні проби.

На основі отриманих результатів побудувати калібрувальну криву: на осі абсцис відкласти значення концентрації сечової

кислоти (в мг/л), а на осі ординат – відповідні їм значення екстинкції.

Зауваження до методу

1. При дослідженні вмісту сечової кислоти сироватку крові не слід зберігати більше 6 год. та використовувати біоматеріал з слідами гемолізу.
2. Перед визначенням вмісту сечової кислоти бажано не вживати медпрепарати – похідних пурину (кофеїну, теоброміну, теофіліну), фенолу (креазоту, саліцилатів та ін.), вітаміну С, похідних тіазолу.

Вміст сечової кислоти в сироватці крові практично здорових людей віком від 20 до 49 років знаходиться в межах 45-82 мг/л (0,27-0,48 мМоль/л) у чоловіків і 30-65 мг/л (0,18-0,38 мМоль/л) у жінок, а в віці після 60 років – 42-80 мг/л (0,25-0,47 мМоль/л) у чоловіків і 32-73 мг/л (0,19-0,43 мМоль/л) у жінок.

Провести розрахунки та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. З якою метою до біоматеріалу додають ТХА?
2. Який вплив на організм виявляє значне підвищення чи зниження рівня сечової кислоти у крові?
3. Пояснити вираз “гіперурікемія”. Причини її розвитку.

ЛАБОРАТОРНО-ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №4
ТЕМА: ОБМІН ВУГЛЕВОДІВ

Опрацювати теоретичний матеріал, використовуючи літературу

Основна: [1] С. 416-458; [2] С. 200-224; [3] С. 328-369; [4] С. 143-189; [5] С. 287-345.

Додаткова: [4], [5], [6]; [8]; [10].

Методичні вказівки

1. При розгляді теоретичних питань звернути увагу на: шляхи розкладу вуглеводів та ферменти, які приймають участь у цих процесах; особливості внутрішньоклітинного обміну вуглеводів; шляхи утворення глюкозо-6-фосфату.
2. З'ясувати особливості дихотомічного та апотомічного розкладу вуглеводів.

3. Розмежовувати поняття “цукор крові” і “істинна глюкоза”. З’ясувати механізм нейрогуморальної регуляції цих показників та особливості їх кількісного визначення.
4. При виконанні практичних робіт дотримуватись правил техніки безпеки.
5. Оформити роботи, пояснити результати, записати висновки і виконати завдання для самоконтролю знань.

Теоретичні питання

1. Вміст вуглеводів у продуктах харчування. Рекомендовані норми добової потреби організму в вуглеводах залежно від віку, виду діяльності людини, фізичного навантаження і кліматичних умов.
2. Основні етапи обміну вуглеводів. Особливості перетворення вуглеводів у травному каналі. Біологічна роль травлення.
3. Значення вуглеводного обміну. Добова потреба в вуглеводах.
4. Що включає поняття “проміжний обмін вуглеводів”?
5. Які ферменти забезпечують проміжний обмін вуглеводів?
6. Які вуглеводи надходять з продуктами харчування? Особливості їх розщеплення у процесі проміжного обміну.
7. Дати визначення поняття “цукор крові” та “істинна глюкоза крові”.
8. Пояснити механізм нейрогуморальної регуляції цукру у крові.
9. Шляхи розкладу полісахаридів та олігосахаридів. Ферменти, що каталізують розщеплення полісахаридів: α -, β - та γ -амілази, α -глюко-зидаза, аміло-1,6-глюкозидаза, β -галактозидаза, β -фруктофуранозидаза.
10. Фосфороліз поліцукрів. Фосфорилази, їх будова і механізм дії.
11. Всмоктування та транспорт вуглеводів. Їх резерви і використання у тканинах.
12. Цукор крові. Шляхи поповнення крові глюкозою.
13. Механізми нейрогуморальної регуляції обміну вуглеводів.
14. Метаболізм моносахаридів. Роль реакції фосфорилування в активації моносахаридів.
15. Взаємоперетворення фосфорних ефірів моносахаридів. Ізомеразі фосфорних ефірів моносахаридів. Роль нуклеозидифосфатцукрів у цьому процесі.
16. Обмін глюкозо-6-фосфату: шляхи утворення та використання.
17. Дихотомічний та апотомічний шляхи розкладу, їх співвідношення в організмі.

18. Біосинтез глікогену (глікогенез). Резервування глікогену, фізіологічне значення цього процесу.
19. Основні шляхи перетворення вуглеводів до кінцевих продуктів. Анаеробний шлях обміну вуглеводів.
20. Гліколіз і глікогеноліз, характеристика ферментів. Енергетичний ефект та баланс цих процесів.
21. Хімізм спиртового бродіння, характеристика ферментів, енергетичний ефект.
22. Аеробний шлях обміну вуглеводів, характеристика ферментів. Співвідношення між анаеробним та аеробним процесами перетворення вуглеводів в організмі (ефект Кребтрі і Пастера).
23. Хімізм окиснення пірвіноградної кислоти до кінцевих продуктів (окиснювальне декарбоксилювання ПВК).
24. Цикл трикарбонових кислот, характеристика ферментів, енергетичний ефект.
25. Апотомічний (пентозний) цикл перетворення вуглеводів, характеристика ферментів. Енергетичний ефект.
26. Загальний енергетичний баланс та ефект обміну вуглеводів. Значення вуглеводного обміну.
27. Біосинтез вуглеводів. Механізм первинного біосинтезу вуглеводів у процесі фотосинтезу і хемосинтезу.
28. Трансглікозилювання та його роль у біосинтезі оліго- і поліцукрів.
29. Роль нуклеозиддифосфатцукрів у глікозилтрансферазних реакціях, забезпечення специфічного біосинтезу оліго- та полісахаридів.
30. Поняття про глюконеогенез і його регуляцію.

Тестові завдання

1. Який фермент шлунково-кишкового тракту бере участь у перетворенні клітковини:

- | | |
|-----------------------|---------------------------|
| А. β -амілаза; | Б. α -амілаза; |
| В. γ -амілаза; | Г. β -фруктозидаза. |

2. Який моносахарид є продуктом повного гідролізу глікогену:

- | | |
|----------------------|-------------|
| А. Фруктоза; | Б. Маноза; |
| В. Глюкозо-6-фосфат; | Г. Глюкоза. |

3. Який моносахарид утворюється при повному гідролізі крохмалю:

- | | |
|---------------------------|-----------------------------------|
| А. α -D-галактоза; | Б. α -D-глюкоза; |
| В. α -D-фруктоза; | Г. α -D-фруктозо-6-фосфат. |

4. Які моносахариди утворюються при кислотному гідролізі лактози:

- А. Два залишки D-глюкози; Б. α -D-глюкоза і β -D-галактоза;
В. D-глюкоза і D-фруктоза; Г. D-глюкоза та D-маноза.
- 5. Який моносахарид утворюється при повному гідролізі целюлози:**
А. β -D-глюкоза; Б. α -D-глюкоза;
В. D-фруктоза; Г. D-галактоза.
- 6. Які моносахариди утворюються при гідролізі мальтози:**
А. Дві молекули α -D-галактози;
Б. Дві молекули α -D-глюкопіранози;
В. α -D-галактоза і β -D-глюкоза;
Г. Дві молекули β -D-глюкопіранози.
- 7. Які моносахариди утворюються при гідролізі целобіози:**
А. Дві молекули α -D-манози;
Б. Дві молекули α -D-глюкопіранози;
В. α -D-фруктоза і β -D-глюкоза;
Г. Дві молекули β -D-глюкопіранози.
- 8. Які моносахариди утворюються при гідролізі сахарози:**
А. Дві молекули α -D-галактози;
Б. Дві молекули α -D-глюкози;
В. α -D-глюкоза і β -D-фруктоза;
Г. Дві молекули β -D-фруктози.
- 9. Скільки молекул АТФ утворюється при окисненні однієї молекули глюкози до молочної кислоти:**
А. 3; Б. 2; В. 6; Г. 4.
- 10. Яка кількість молекул АТФ синтезується при повному окисненні молекули глюкози:**
А. 24; Б. 36; В. 12; Г. 38.
- 11. Яка кількість молекул АТФ утворюється при повному окисненні однієї молекули гліцерол-3-фосфату:**
А. 5; Б. 20; В. 12; Г. 25.
- 12. Скільки молекул АТФ синтезується у процесі перетворення однієї молекули ПВК до кінцевих продуктів:**
А. 38; Б. 15; В. 16; Г. 30.
- 13. Яка кількість молекул АТФ синтезується у циклі Кребса:**
А. 10; Б. 12; В. 16; Г. 11.
- 14. Що таке ефект Пастера:**
А. Гальмування анаеробного перетворення вуглеводів під впливом кисню;
Б. Гальмування окиснення D-гліцеральдегід-3-фосфату синільною кислотою;

- В. Гальмування процесу фосфорилуючого окиснення на рівні субстрату при гліколізі;
Г. Гальмування окиснювального декарбоксилювання ПВК.
- 15. Який фермент каталізує перетворення оцтового альдегіду на етиловий спирт:**
А. Алкогольдегідрогеназа; Б. Піруватдекарбоксилаза;
В. Ацетатдегідрогеназа; Г. Етанолдекарбоксилаза.
- 16. Реакція: АТФ + глюкоза → АДФ + глюкозо-6-фосфат здійснюється за участю:**
А. Альдолази; Б. Фосфоглюкомутази;
В. Фруктокінази; Г. Глюкокінази.
- 17. Для перетворення фруктозо-6-фосфату в фруктозо-1,6-дифосфат, крім відповідного ферменту, необхідна:**
А. АДФ; Б. НАДФ; В. Кoenзим А; Г. АТФ.
- 18. На якому етапі в циклі Кребса синтезується ГТФ при перетворенні:**
А. Цитрату в цис-аконітат; Б. α-кетоглутарату в сукцинат;
В. Сукцинату в янтарну к-ту; Г. Малату в оксалоацетат.
- 19. Який кінцевий продукт утворюється при окиснювальному декарбоксилюванні пірвіноградної кислоти:**
А. Цитрат; Б. α-кетоглутарат;
В. Ацетилфосфат; Г. Ацетил-КоА.
- 20. У результаті якої реакції утворюється седогептулозо-7-фосфат та D-гліцеральдегід-3-фосфат із рибозо-5-фосфату і ксилулозо-5-фосфату:**
А. Трансамінування; Б. Трансглікозилювання;
В. Трансальдолазна реакція; Г. Транскетолазна реакція.
- 21. Що є кінцевим продуктом гліколізу:**
А. Піруват; Б. Лактат;
В. Піруват та лактат; Г. Етанол і CO₂.
- 22. Який фермент каталізує розщеплення фруктозо-1,6-дифосфату на дві тріози:**
А. Тріозофосфатізомераза; Б. Фруктозодифосфатальдолаза;
В. Гексокіназа; Г. Фосфофруктокіназа.
- 23. Який фермент каталізує перетворення ПВК у молочну кислоту:**
А. Лактатдегідрогеназа; Б. Сукцинатдегідрогеназа;
В. Піруватдегідрогеназа; Г. Малатдегідрогеназа.
- 24. Який фермент каталізує перетворення глюкозо-6-фосфату в фруктозо-6-фосфат:**
А. Альдолаза; Б. Фосфоглюкомутаза;

В. Глюкозофосфатізомераза; Г. Енолаза.

25. Який фермент каталізує перетворення лимонної кислоти в ізолимонну:

- А. Аконітатгідратаза; Б. Альдолаза;
В. Аденілатциклаза; Г. Ізоцитратдегідрогеназа.

26. Перетворення ізолимонної кислоти на щавлевою янтарну каталізує фермент:

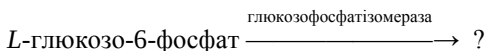
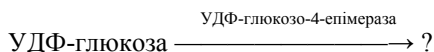
- А. ГТФ-аденілаткіназа; Б. Ізоцитратдегідрогеназа;
В. Ізоцитратдекарбоксилаза; Г. Аконітатлігаза.

27. Окиснення янтарної кислоти до фумарової каталізує фермент:

- А. Ізоцитратдегідрогеназа; Б. Сукцинатдекарбоксилаза;
В. Сукцинатдегідрогеназа; Г. Фумураттрансфераза.

Вправи

1. Записати хімізм реакцій гідролізу та фосфоролізу крохмалю за участю відповідних ферментів.
2. Записати реакції гідролізу дицукрів: мальтози, сахарози, лактози. Вказати ферменти, які забезпечують ці процеси.
3. Здійснити перетворення за схемами, вказати ферменти, які приймають участь у цих реакціях:
 $АТФ + D\text{-глюкоза} \rightarrow$ $АТФ + D\text{-фруктоза} \rightarrow$
 $АТФ + D\text{-маноза} \rightarrow$ $АТФ + D\text{-рибоза} \rightarrow$
4. Записати схему перетворення фруктозо-1,6-дифосфату до 2-фосфоенолпіровиноградної кислоти.
5. Здійснити перетворення за схемами: $D\text{-фруктоза} \rightarrow$ ПВК;
 $D\text{-глюкоза} \rightarrow$ 2-фосфоенолпіровиноградна кислота.
6. Здійснити перетворення за схемами, вказати в яких процесах проходять вказані реакції: $УТФ \rightarrow$ УДФ-глюкоза;

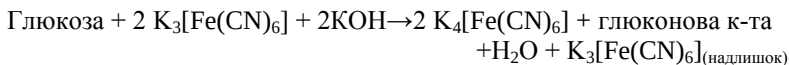


7. Які шляхи утворення глюкозо-6-фосфату в організмі?
8. Записати реакції перетворення глюкозо-6-фосфату до молочної кислоти.
9. Записати схему перетворення піровиноградної кислоти.
10. Записати реакції розкладу глікогену, вказати ферменти.
11. Біосинтез глікогену, вказати ферменти.
12. Розрахувати енергетичний баланс гліколізу і глікогенолізу.

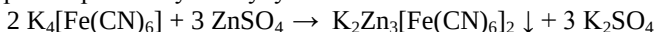
13. Записати реакції утворення фосфорних ефірів моноцукрів та шляхи утворення глюкозо-6-фосфату.
14. Записати реакції глікогенолізу до утворення фруктозо-1,6-дифосфату.
15. Реакції гліколізу, енергетичний ефект.
16. Записати рівняння і розрахувати енергетичний ефект реакцій за такими схемами:
 - а) глюкоза $\rightarrow$ 3-фосфогліцериновий альдегід;
 - б) діоксиацетонмонофосфат $\rightarrow$ піруват;
 - в) лактат $\rightarrow$ ацетил-КоА;
 - г) ацетил-КоА $\rightarrow$ $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$;
 - д) піруват $\rightarrow$ оксалоацетат.
17. Яка кількість молекул АТФ утворюється при повному окисненні таких субстратів:
 - а) пірувату;
 - б) НАД Н₂;
 - в) фруктозо-1,6-дифосфату;
 - г) фосфоенолпірувату;
 - д) дигідрокси-ацетонмонофосфату.
18. Записати хімізм ЦТК.
19. Апотомічний розклад глюкози, хімізм реакцій, енергетичний ефект.

РОБОТА № 1 ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ЦУКРУ У КРОВІ ЗА МЕТОДОМ ХАГЕДОРНА-ІЄНСЕНА

Принцип методу. При кип'ятінні в лужному середовищі глюкоза відновлює калій гексаціаноферат (III) до калій гексаціаноферату (II):

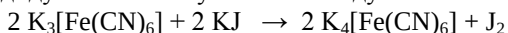


Оскільки ця реакція зворотна, то для зміщення рівноваги вправо додають цинк сульфат, який з калій гексаціанофератом (II) утворює нерозчинну сполуку.



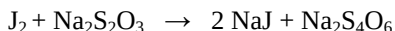
Невикористаний залишок калій гексаціаноферату (III) визначається йодометрично.

У кислому середовищі калій гексаціаноферат (III) витісняє з калій йодиду еквівалентну кількість йоду:



Для зміщення рівноваги реакції вправо додають цинк сульфат у складі потрійного розчину.

Кількість вільного йоду визначають титруванням натрій гіпосульфітом.



Між вмістом цукру у крові та кількістю натрій гіпосульфіту, використаного на титрування, існує обернена залежність.

Матеріал для дослідження: кров.

Реактиви: 0,45% розчин цинк сульфату, 0,1н розчин натрій гідроксиду, хлор-цинк-йодний потрійний розчин, 3% розчин ацетатної кислоти, 1% розчин крохмалю в насиченому розчині натрій хлориду, 0,005н розчин натрій гіпосульфіту, 0,005н розчин калій гексаціаноферату (III), дистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки на 1, 2 і 5 мл, бюретка для титрування на 2 мл, штатив з “цукровими” пробірками, лійки, вата для фільтрування, вимочена в гарячій дистильованій воді і висушена, водяна баня.

Хід роботи

У дві пробірки (контрольну та дослідну) внести по 5 мл 0,45% розчину цинк сульфату і 1 мл 0,1н розчину натрій гідроксиду. В дослідну пробірку додати 0,1 мл крові.

Пробірки поставити на киплячу водяну баню на 3 хв. Приготувати дві “цукрові” пробірки з ватними фільтрами, попередньо промитими гарячою дистильованою водою.

Вміст пробірок, що знаходилися на водяній бані, профільтрувати в підготовлені “цукрові” пробірки. Пробірки, в яких проводили осадження білків, двічі промити гарячою водою (по 3 мл), яку виливати на фільтри.

По закінченні фільтрування фільтри зняти, а у пробірки з великою точністю внести по 2 мл 0,005н розчину калій гексаціаноферату (III) і знову поставити на киплячу водяну баню на 15 хв., після чого охолодити. В кожну пробірку додати по 2 мл хлор-цинк-йодного потрійного розчину, 2 мл 3% розчину ацетатної кислоти і 2-3 краплі крохмалю.

Виділений йод відтитрувати з бюретки 0,005н розчином натрій гіпосульфіту до зникнення синього забарвлення.

Вміст цукру в 0,1 мл крові визначити по таблиці (див. додаток 7).

Приклад розрахунку. Якщо на титрування дослідної проби використано 1,45 мл 0,005н натрій гіпосульфїту, то в першому вертикальному стовпчику таблиці знайти число 1,4, у верхньому горизонтальному – 0,05. На місці перетину отримуємо число 0,097 мг. Таким же чином визначаємо вміст “цукру” в контрольному досліді. Якщо на титрування контрольної проби використано 1,96 мл 0,005н розчину натрій гіпосульфїту, то це відповідає 0,007 мг.

1. Проводимо розрахунок цукру в дослідній пробі:

$$0,097 - 0,007 = 0,09 \text{ мг цукру в } 0,1 \text{ мл крові.}$$

2. Перераховуємо на 100 мл крові:

$$0,09 \text{ мг цукру в } 0,1 \text{ мл крові}$$

$$X \text{ ————— в } 100 \text{ мл}$$

$$X = 90 \text{ мг або } 90 \text{ мг\%}.$$

Для перерахунку мг% в мМоль/л необхідно кількість мг перемножити на 10 і поділити на 180.

Провести розрахунки та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Які шляхи поповнення крові глюкозою?
2. Пояснити поняття “гіперглікемія”, “глюкозурія”, “кетонемія” і “кетонурія”.
3. Який вміст глюкози у крові відповідає фізіологічній нормі?

РОБОТА № 2 **ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ЦУКРУ У КРОВІ ЗА МЕТОДОМ** **ПОКРОВСЬКОГО-КРАЙКО**

Принцип методу. Глюкоза при взаємодії з пікриновою кислотою в лужному середовищі утворює комплексні сполуки помаранчевого кольору, інтенсивність забарвлення яких пропорційна вмісту глюкози.

Матеріал для дослідження: кров

Реактиви: насичений розчин пікринової кислоти, стандартний розчин глюкози (3,5 мМоль/л), 10% розчин натрій гідроксиду, дистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, центрифужні пробірки, мікропіпетки, центрифуга, водяна баня, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм.

Хід роботи

У центрифужну пробірку внести 1 мл води і 0,05 мл крові (піпетку промити цією ж водою) та залишити на 5 хв. для гемолізу. У другу пробірку внести 1 мл води і 0,05 мл стандартного розчину глюкози. В кожну пробірку додати по 5 крапель насиченого розчину пікринової кислоти, ретельно перемішати. Вміст першої пробірки відцентрифугувати при 4000 об./хв. протягом 10 хв. Центрифугат перенести в іншу пробірку. У пробірки з центрифугатом і стандартним розчином глюкози додати по 5 крапель 10% розчину натрій гідроксиду та поставити на киплячу водяну баню на 3 хв.

Після охолодження визначити екстинкцію дослідної і стандартної проби на ФЕК (зелений світлофільтр, 500-560 нм, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм) відносно води.

Розрахунок вмісту цукру у крові провести за формулою:

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

$C_{\text{д.}}$ – вміст глюкози в дослідній пробі (мМоль/л);

$C_{\text{ст.}}$ – вміст глюкози у стандартній пробі (мМоль/л);

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

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

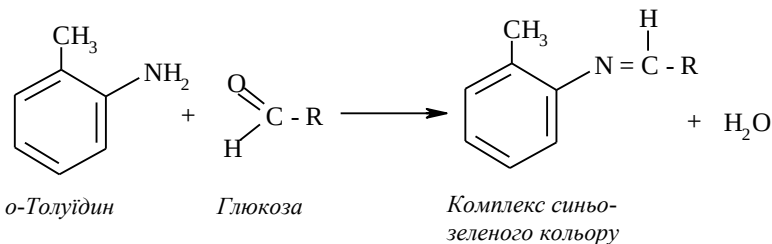
Провести розрахунки та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Що таке гемоліз? Які особливості цього процесу?
2. Які механізми нейрогуморальної регуляції цукру у крові?
3. Пояснити поняття “цукровий діабет”. Причини його розвитку.

РОБОТА № 3 **ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ГЛЮКОЗИ У КРОВІ ЗА КОЛЬОРОВОЮ** **РЕАКЦІЄЮ З О-ТОЛУЇДИНОМ (метод Хіварінен-Ніккіла)**

Принцип методу. При нагріванні глюкози з о-толуїдином за присутності ацетатної кислоти утворюються сполуки синьо-зеленого кольору, інтенсивність забарвлення яких пропорційна вмісту глюкози:



Метод високоспецифічний і дає можливість у суміші цукрів визначити лише глюкозу.

Матеріал для дослідження: кров

Реактиви: о-толуїдиновий реактив, 3% розчин ТХА, робочий стандартний розчин глюкози (5,55 мМоль/л), дистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, центрифужні пробірки, піпетки на 1 і 5 мл, центрифуга, водяна баня, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм.

Хід роботи

У три пробірки (одна з яких центрифужна) внести по 0,9 мл 3% розчину ТХА. В першу (центрифужну) додати 0,1 мл крові, у другу – 0,1 мл стандартного розчину глюкози, у третю – 0,1 мл води. Вміст пробірок перемішати і дослідну пробірку (з кров'ю) відцентрифугувати при 3000 об./хв. протягом 10 хв. Центрифугат злити в чисту суху пробірку.

З кожної пробірки відібрати по 0,5 мл розчину і перенести в чисті пронумеровані пробірки та додати по 4,5 мл о-толуїдинового реактиву. Пробірки закрити шматочком фольги і поставити на киплячу водяну баню на 8 хв. (!).

Після охолодження визначити екстинкцію стандартної і дослідної проби на ФЕК (червоний світлофільтр, 600-650 нм, або жовто-оранжевий, 595 нм, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм) відносно контролю.

Розрахунок вмісту глюкози у крові провести:

1. За формулою:

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

$C_{\text{д.}}$ – вміст глюкози в дослідній пробі (мМоль/л);

$C_{\text{ст.}}$ – вміст глюкози у стандартній пробі (мМоль/л);

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

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

2. За калібрувальною кривою, для побудови якої із основного стандартного розчину глюкози (10 г/л) приготувати серію робочих розчинів як вказано в таблиці:

№ пробірок	Стандартний розчин глюкози (10 г/л або 55,5 мМоль/л), мл	0,2% розчин бензойної кислоти, мл	Концентрація глюкози, мМоль/л
1.	8	92	4,44
2.	10	90	5,55
3.	20	80	11,10
4.	30	70	16,65
5.	40	60	22,20

З кожної пробірки по 0,5 мл отриманих робочих розчинів перенести в інші пробірки, додати по 4,5 мл о-толуїдинового реактиву і обробити як дослідні.

На основі отриманих результатів побудувати калібрувальну криву: на осі абсцис відкласти значення концентрації глюкози, а на осі ординат – відповідні їм значення екстинкції.

Лінійна залежність між величинами екстинкції і концентрації глюкози в розчині зберігається в інтервалі 1,78-22,20 мМоль/л.

Зауваження до методу

1. Цільну кров необхідно досліджувати відразу після відбирання. При зберіганні крові концентрація глюкози в ній швидко зменшується внаслідок гліколізу (швидкість зниження 7% за годину). Запобігти цьому можна внесенням у пробу натрій фториду.
2. Не слід залишати кров невідцентрифугованою більше ніж на 30 хв.
3. Сироватку, яку зберігали тривалий час, не бажано використовувати для аналізу.
4. У сироватці крові чи плазмі концентрація глюкози стабільна при температурі 2-8 °С протягом 3 діб (72 год.).
5. Концентрація глюкози не знижується при стабілізації ТХА.
6. За 3 доби до проведення аналізу необхідно виключити вживання аскорбінової кислоти та антибіотиків тетрациклінового ряду.
7. Якщо після кип'ятіння вміст пробірок став непрозорим, проби слід відцентрифугувати протягом 10 хв. і визначити екстинкцію центрифугату.

Провести розрахунки та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Що означає термін “істинна глюкоза крові”? При яких захворюваннях рекомендується визначення цього показника?
2. Які причини розвитку гіперглікемії? Її види.
3. Пояснити принцип методу визначення глюкози у крові з о-толуїдином.

РОБОТА № 4

**ВИЗНАЧЕННЯ ГЛЮКОЗИ У СЕЧІ ЗА КОЛЬОРОВОЮ РЕАКЦІЄЮ
З О-ТОЛУЇДИНОМ (метод Хіварінен-Ніккіла)**

Матеріал для дослідження: сеча.

Реактиви: о-толуїдиновий реактив, 3% розчин ТХА, робочий стандартний розчин глюкози (5,55 мМоль/л), дистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, центрифужні пробірки, піпетки на 1 і 5 мл, центрифуга, водяна баня, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 10 мм.

Хід роботи

Перед проведенням дослідження необхідно провести якісну реакцію на вміст глюкози в сечі і залежно від цього сечу розводять у 2- 10 разів.

У три пробірки (одна з яких центрифужна) внести по 0,9 мл 3% розчину ТХА. В першу (дослідну) додати 0,1 мл розведеної сечі, у другу (стандартну) – 0,1 мл робочого стандартного розчину глюкози, у третю (контрольну) – 0,1 мл води. Вміст пробірок перемішати і дослідну пробірку відцентрифугувати при 1500 об./хв. протягом 15 хв.

З кожної пробірки відібрати по 0,5 мл розчину і перенести в чисті пронумеровані пробірки, в кожен додати по 4,5 мл о-толуїдинового реактиву. Пробірки закрити шматочком фольги і поставити на киплячу водяну баню на 8 хв. (!).

Після охолодження визначити екстинкцію стандартної і дослідної проби на ФЕК (червоний світлофільтр, 600-650 нм, або жовто-оранжевий, 595 нм, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм) відносно контролю.

Розрахунок вмісту глюкози в сечі провести:

1. За формулою:

$$C_{\text{д}} = \frac{C_{\text{ст.}} \cdot E_{\text{д.}} \cdot a}{E_{\text{ст.}}}, \text{ де}$$

$C_{\text{д}}$ – вміст глюкози в сечі (мМоль/л);

$C_{\text{ст.}}$ – вміст глюкози у стандартній пробі (мМоль/л);

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

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

a – розведення сечі.

2. За калібрувальною кривою (див. попередню роботу).

Провести розрахунки та записати висновок.

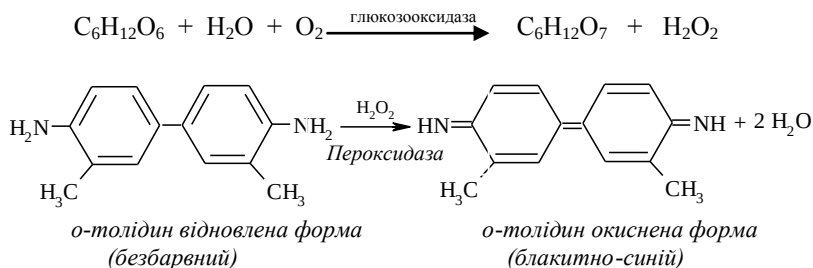
Дати відповіді на запитання

1. За яких умов в сечі можлива поява цукру?
2. Охарактеризувати ознаки, які є проявом цукрового діабету.
3. Що означає поняття “нірковий поріг для глюкози”.

РОБОТА № 5

ГЛЮКОЗООКСИДАЗНИЙ МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ГЛЮКОЗИ У КРОВІ, СИРОВАТЦІ КРОВІ, СПІНАЛЬНІЙ РІДИНІ

Принцип методу. Фермент глюкозооксидаза окиснює глюкозу з утворенням глюконової кислоти і гідроген пероксиду, який окиснює *o*-толідін, внаслідок чого утворюється сполука блакитно-синього кольору:



Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна концентрації глюкози в розчині та визначається колориметрично.

Метод високоспецифічний і чутливий. Дає змогу визначати вміст глюкози від 0,2 до 4,0 г/л.

Матеріал для дослідження: кров, сироватка крові, спінальна рідина.

Реактиви: стандартний розчин глюкози (1 г/л), ізотонічний розчин натрій хлориду, 5% розчин цинк сульфату, 0,3М розчин натрій гідроксиду, ензимо-хромогенний реактив, дистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, центрифужні пробірки, піпетки на 1 і 5 мл, центрифуга, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 10 мм.

Хід роботи

У центрифужну пробірку внести 0,1 мл крові (сироватки крові, спінальної рідини) і 1,1 мл ізотонічного розчину натрій хлориду, перемішати. Додати 0,4 мл 5% розчину цинк сульфату та 0,4 мл 0,3М розчину натрій гідроксиду. Суміш ретельно перемішати і через 10 хв. відцентрифугувати при 2500 об./хв. протягом 10 хв.

Взяти три пробірки: в першу (дослідну) внести 1 мл центрифугату, у другу (стандартну) – 1 мл стандартного розчину глюкози, у третю (контрольну) – 1 мл води. В кожну пробірку додати по 3 мл ензимо-хромогенного реактиву, перемішати.

Через 20 хв. (!) визначити екстинкцію стандартної і дослідної проби на ФЕК (червоний світлофільтр, 600-650 нм, кювета довжиною оптичного шляху 10 мм) відносно контролю.

Розрахунок вмісту глюкози в біоматеріалі провести за формулою:

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

$C_{\text{д.}}$ – вміст глюкози в дослідній пробі (мМоль/л);

$C_{\text{ст.}}$ – вміст глюкози у стандартній пробі (мМоль/л);

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

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

У цільній крові практично здорових людей вміст глюкози складає 3,32-5,55 мМоль/л, а у плазмі – 3,32-6,10 мМоль/л. Сеча практично здорових людей містить сліди глюкози. В добовому об'ємі сечі може міститися до 125-130 мг глюкози.

Провести розрахунки та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Які переваги ензиматичного методу визначення глюкози?
2. Записати хімізм реакції окиснення глюкози за участю ферменту глюкозооксидази.
3. Пояснити принцип глюкозооксидазного методу визначення вмісту глюкози. Записати хімізм реакції.

РОБОТА № 6
**ЕКСПРЕС-МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ ЦУКРУ
В БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ**

Для визначення рівня глюкози в цільній крові пацієнтів з діагностованим діабетом часто використовують глюкометри різної модифікації, в яких застосовують тест-смужки просочені ферментним препаратом.

Принцип методу. Кров наносять на тест-смужку, компоненти якої реагують з глюкозою крові з утворенням забарвленого комплексу, інтенсивність якого пропорційна вмісту глюкози у крові. Оптична система приладу фіксує забарвлення та висвітлює результат на моніторі.

Матеріал для дослідження: кров.

Обладнання: глюкометр.

Хід роботи

Порядок роботи на глюкометрі системи «ONE TOUCH II»

Перевірка приладу:

1. Включити прилад. На моніторі з'являється напис “КОД 7” (приклад) (номер коду на моніторі не слід змінювати при тестуванні) і після цього – ВВЕДЕННЯ СМУЖКИ. Ввести індикаторну смужку розрізаним кінцем вперед, забарвленою стороною догори. Через деякий час з'являється напис: ЗАЧЕКАТИ і далі: “УСТАН. ПРОБИ”, після цього слід вийняти смужку та після появи напису “ВВЕДЕННЯ STOP.2” ввести її у паз розрізаним кінцем вперед іншою стороною догори. Прилад відраховує від 4 до 0, потім з'являється напис 70 – ДОБРЕ (приклад), якщо число потрапляє в межі нормального рівня для смужки. Якщо результати тесту з смужкою не потрапляють у такі межі, на екрані з'являється напис: 38 – НЕДОБРЕ, ПОВТОР. За цих умов необхідно повторити тест. Перевіряти прилад слід, як мінімум, один раз на день, а також у випадку, коли результати приладу на відповідають самопочуттю хворого.

Перед проведенням визначення встановити код (проводити щоразу коли використовують новий набір тест-смужок). Номер коду на упаковці тест-смужок може бути від 1 до 16 і повинен відповідати коду, встановленому на приладі.

1. Натиснути кнопку включення. На моніторі з'являється напис “КОД 7” (приклад), а через декілька секунд – ВВЕДЕННЯ

СМУЖКИ. Якщо номер коду співпадає з номером тест-смужки, можна переходити до тестування.

2. Якщо номер коду на екрані не співпадає з номером тест-смужки, слід натиснути і відпустити кнопку коду «С» на боковій панелі приладу - номер коду збільшується на одиницю. Таким чином виставити потрібний код.

Визначення вмісту глюкози у крові:

1. Натиснути кнопку включення. На екрані з'являється напис "КОД 7" (приклад), який змінюється написом "ВВЕДЕННЯ СМУЖКИ". Обережно виїняти тест-смужку із упаковки, не торкаючись місця нанесення крові, ввести у тримач розрізаним кінцем вперед, точкою тесту догори. Через деякий час з'являється напис: ЧЕКАТИ і далі: УСТАНОВКА ПРОБИ.
2. Нанести краплю крові на відповідне місце тест-смужки. При нанесенні крові необхідно слідкувати за тим, щоб:
 - торкнутися лише кінчиком краплі до точки тесту;
 - нанести достатньо крові, щоб сформувалася кругла блискуча крапля, яка повністю закриває точку тестової смужки;
 - не зрушувати тест-смужку.
3. Прилад відраховує від 45 до 0 і видає результат, який з'являється на моніторі: 5,5 мМоль/л (приклад).

Дати відповіді на запитання

1. З якою метою використовують глюкометри?
2. Пояснити принцип методу визначення вмісту глюкози у крові за допомогою глюкометрів.
3. Яка перевага експрес-методів визначення вмісту глюкози?

РОБОТА № 7 ВИЗНАЧЕННЯ ГЛЮКОЗИ В СЕЧІ ЗА ДОПОМОГОЮ ІНДИКАТОРНИХ СМУЖОК "ГЛЮКОТЕСТ"

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

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

Матеріал для дослідження: сеча.

Реактиви: набір глюкотестів – тест-смужки і кольорова шкала.

Хід роботи

Смужку “Глюкотесту” змочити у свіжозібраній сечі і залишити на 2 хв. для розвитку забарвлення. Після цього провести візуальну оцінку порівнянням забарвлення тест-смужки з кольоровою шкалою. За відсутності глюкози в сечі колір тест-смужки не змінюється.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

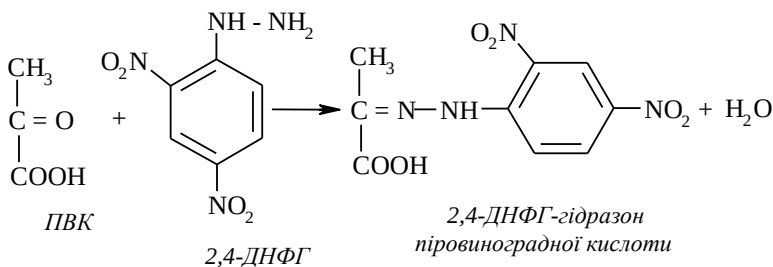
1. Який вміст глюкози в сечі у практично здорових людей?
2. За яких умов можлива поява глюкози в сечі?
3. Пояснити принцип методу визначення вмісту глюкози в сечі за допомогою індикаторних смужок “Глюкотесту”.

2. ВИЗНАЧЕННЯ МЕТАБОЛІТІВ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОГО ОБМІНУ ВУГЛЕВОДІВ

РОБОТА № 1

ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ПІРОВИНОГРАДНОЇ КИСЛОТИ У КРОВІ ТА СЕЧІ (модифікований метод Умбрайта)

Принцип методу. Пірвіноградна кислота в кислому середовищі при дії 2,4-динітрофенілгідразину осаджується в вигляді 2,4-динітрофенілгідразону пірвіноградної кислоти, який з лугом утворює сполуку червоно-коричневого кольору. Інтенсивність забарвлення пропорційна концентрації пірвіноградної кислоти і визначається колориметрично.



Матеріал для дослідження: сеча, кров.

Реактиви: стандартний розчин натрій пірувату (5 мг%), 0,1% розчин ДНФГ, 12% розчин натрій гідроксиду, 10% ТХА (термін зберігання не більше 1 міс.), дистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки на 1 мл, центрифужні пробірки, центрифуги, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм.

Хід роботи

Визначення ПВК у крові. В центрифужну пробірку внести 0,3 мл крові та 0,7 мл води і після перемішування додати 1 мл 10% розчину ТХА та відцентрифугувати при 1500 об./хв. Протягом 15 хв.

Взяти три пробірки: в першу (дослідну) внести 0,3 мл надосадової рідини, у другу (стандартну) – 0,3 мл стандартного розчину натрій пірувату, у третю (контрольну) – 0,3 мл води. В кожну пробірку додати по 0,4 мл 0,1% розчину ДНФГ, перемішати та поставити в темне місце на 20 хв., після чого додати по 1 мл 12% розчину натрій гідроксиду.

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

Визначення ПВК у сечі. Взяти три пробірки: в першу (дослідну) внести 0,3 мл розведеної у 3 рази сечі, у другу (стандартну) – 0,3 мл стандартного розчину натрій пірувату, у третю (контрольну) – 0,3 мл води. В кожну пробірку додати по 0,5 мл 0,1% розчину ДНФГ, перемішати і поставити в темне місце на 20 хв. Після цього додати по 1 мл 12% розчину натрій гідроксиду.

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

Розрахунок вмісту піровиноградної кислоти провести:

1. За формулою:

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

$C_{\text{д.}}$ – вміст ПВК у дослідній пробі (мг%);

$C_{\text{ст.}}$ – вміст ПВК у стандартній пробі (мг%);

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

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

У випадку визначення вмісту ПВК сечі необхідно врахувати її розведення.

2. За калібрувальною кривою, для побудови якої з основного стандартного розчину (200 мг/л) піровиноградної кислоти приготувати серію розведень.

Взяти шість пробірок, в які внести відповідно 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 та 0,6 мл основного стандартного розчину ПВК і загальний об'єм розчину довести дистильованою водою до 10 мл.

Після цього з кожної пробірки відібрати по 0,3 мл розчину і перенести в інші пронумеровані пробірки із врахуванням концентрації в них ПВК. Проби обробити як дослідні.

На основі отриманих результатів побудувати калібрувальну криву: на осі абсцис відкласти значення концентрації ПВК, а на осі ординат – відповідні їм значення екстинкції.

У крові практично здорових людей вміст ПВК складає 0,114 мМоль/л (10 мг/л). Концентрація ПВК у крові немовлят у тричі вища. За добу з сечею практично здорових людей виділяється 200 мг піровиноградної кислоти.

Провести розрахунки та записати висновок.

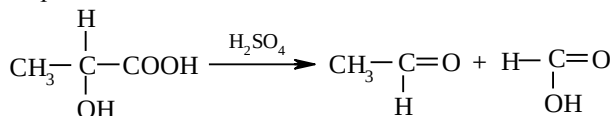
Дати відповіді на запитання

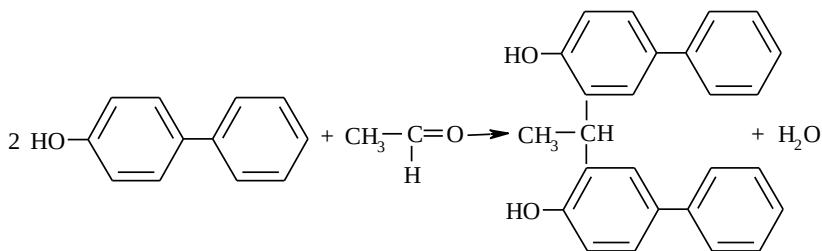
1. Записати схему утворення ПВК з глюкози.
2. Які шляхи перетворення ПВК в організмі?
3. Пояснити принцип методу визначення ПВК в біоматеріалі.

РОБОТА № 2

ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ МОЛОЧНОЇ КИСЛОТИ У КРОВІ (ЗА БАРКЕРОМ І САММЕРСОНОМ)

Принцип методу. Молочна кислота при кип'ятінні з концентрованою сульфатною кислотою розкладається з утворенням мурашиної кислоти і ацетальдегіду, який з *n*-гідроксидифенілом утворює продукт конденсації фіолетового кольору, інтенсивність якого пропорційна вмісту молочної кислоти і визначається колориметрично:





n-гідроксидифеніл

Ацетальдегід

1,1-ди(гідроксидифеніл)-етан

Матеріал для дослідження: кров.

Реактиви: 10% розчин ТХА, 20% розчин купрум (II) сульфату, кальцій гідроксид, стандартний розчин літій лактату (100 мг%), концентрована сульфатна кислота, лужний розчин *n*-гідроксидифенілу, дистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки на 1 і 5 мл, центрифужні пробірки, водяна і крижана бані, термостат, центрифуга, терези з набором різноважок, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 10 мм.

Хід роботи

У центрифужну пробірку внести 0,5 мл дистильованої води, 0,1 мл крові і 1 мл 10% розчину ТХА та відцентрифугувати при 3000 об./хв. протягом 5 хв.

Центрифугат перенести в чисту центрифужну пробірку, додати 0,5 мл насиченого розчину купрум (II) сульфату і 0,5 г кальцій гідроксиду, перемішати до появи блакитного забарвлення (якщо забарвлення зеленувате, то пробу далі не обробляти), залишити на 30 хв. для осадження вуглеводів, осад відцентрифугувати.

Приготувати три чисті пробірки: в першу (дослідну) внести 1 мл центрифугату, у другу (стандартну) – 1 мл стандартного розчину літій лактату, у третю – 1 мл води. В кожну пробірку при охолодженні обережно, по стінках, додати по 3 мл концентрованої сульфатної кислоти, перемішати і поставити на киплячу водяну баню на 5 хв. Після цього пробірки охолодити, додати по 1 краплі лужного розчину *n*-гідроксидифенілу та поставити в термостат при 30°C на 30 хв., помішуючи суміш до розчинення осаду, що утворився.

Після появи блакитного забарвлення пробірки поставити на киплячу водяну баню на 90 с. (!).

Після охолодження визначити екстинкцію стандартної і дослідної проби на ФЕК (зелений світлофільтр, 500-560 нм, кювета довжиною оптичного шляху 10 мм) відносно сульфатної кислоти.

Розрахунок вмісту молочної кислоти у крові провести за формулою:

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

$C_{\text{д.}}$ – вміст молочної кислоти в дослідній пробі (мг%);

$C_{\text{ст.}}$ – вміст молочної кислоти у стандартній пробі (мг%);

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

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

Провести розрахунки та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Яку назву має процес перетворення глюкози до молочної кислоти? Які його особливості та енергетичний баланс і ефект?
2. Записати схему циклу Корі. Пояснити його значення.
3. Пояснити принцип методу визначення вмісту молочної кислоти.

3. ФУНКЦІОНАЛЬНІ ПРОБИ НА ПАТОЛОГІЮ ВУГЛЕВОДНОГО ОБМІНУ

РОБОТА № 1 ВЗАЄМОДІЯ АЦЕТОНУ З ЙОДОМ (Проба Лібена)

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

CH_3

|

$\text{C}=\text{O} + \text{I}_2 + 2\text{NaOH} \rightarrow \text{CH}_3\text{I} + \text{CH}_3\text{COONa} + \text{NaI} + \text{H}_2\text{O}$

|

CH_3

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

Матеріал для дослідження: сеча.

Реактиви: 10% розчин натрій гідроксиду, 10% розчин йоду в калій йодиді.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки, мірний циліндр.

Хід роботи

У пробірку внести 5 мл сечі, додати 1 мл 10% розчину натрій гідроксиду і по краплях 10% розчин йоду в калій йодиді до появи жовтуватого забарвлення. Спостерігати за змінами у пробірці.

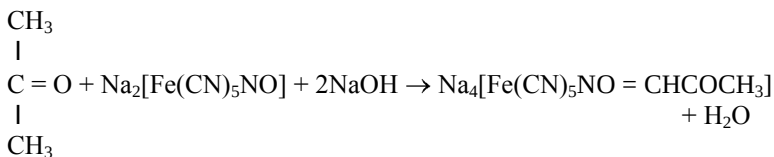
Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Пояснити поняття “ацетон сечі”. Яке діагностичне значення проби на ацетон?
2. Записати хімізм реакції взаємодії ацетону з йодом.
3. Що означають назви “кетонемія” і “кетонурія”?

РОБОТА № 2
РЕАКЦІЯ НА АЦЕТОН І АЦЕТОАЦЕТАТНУ КИСЛОТУ
(Проба Ротера)

Принцип реакції. При взаємодії ацетону чи ацетоацетатної кислоти з натрій нітропрусидом у лужному середовищі утворюються комплексні сполуки оранжево-червоного кольору:



Матеріал для дослідження: сеча.

Реактиви: амоній сульфат кристалічний, концентрований аміак, 5% розчин натрій нітропрусиду.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки, мірний циліндр.

Хід роботи

У пробірку внести 5 мл сечі, додати амоній сульфат до повного насичення, 1-2 краплі концентрованого аміаку і 2-3 краплі 5% розчину натрій нітропрусиду, перемішати. Спостерігати за появою забарвлення.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Що являє собою ацетон і за яких умов він утворюється в організмі?
2. За яких умов вміст ацетону і ацетоацетатної кислоти в рідинах організму зростає?
3. Яке діагностичне значення має визначення ацетону та ацетоацетатної кислоти?
4. Записати схему утворення кетонів тіл.

РОБОТА № 3
РЕАКЦІЯ НА АЦЕТОН І АЦЕТОАЦЕТАТНУ КИСЛОТУ
(Проба Ланге)

Принцип реакції. При взаємодії ацетону чи ацетоацетатної кислоти з натрій нітропрусидом за присутності концентрованого аміаку утворюються комплексні сполуки пурпурово-фіолетового кольору.

Матеріал для дослідження: сеча.

Реактиви: 10% розчин натрій нітропрусиду, концентрована ацетатна кислота, концентрований аміак.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки на 1 мл.

Хід роботи

У пробірку внести 1 мл сечі підкисленої ацетатною кислотою і додати по кілька крапель 10% розчину натрій нітропрусиду та концентрованого аміаку, перемішати. Спостерігати за появою забарвлення.

Пояснити результати дослідів та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Що включає в себе поняття “кетонів тіла”?
2. Записати будову ацетоацетатної кислоти.
3. Чим зумовлена поява кетонів тіл у сечі?
4. Який вміст кетонів тіл у сечі при діабеті?

РОБОТА № 5
РЕАКЦІЯ НА β -ОКСИМАСЛЯНУ КИСЛОТУ
(Проба Гардта)

Принцип реакції. Продукти окиснення β -оксимасляної кислоти гідроген пероксидом взаємодіють з натрій нітропрусидом з утворенням комплексної сполуки червоного кольору. Ацетон і ацетоацетатну кислоту видаляють при нагріванні сечі.

Матеріал для дослідження: сеча.

Реактиви: концентрована ацетатна кислота, 3% розчин гідроген пероксиду, 10% розчин натрій нітропрусиду, 25% розчин аміаку, дистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки, мірний циліндр, водяна баня.

Хід роботи

До 10 мл сечі додати 10 мл води і 2-3 краплі концентрованої ацетатної кислоти, перемішати та випарити до половини об'єму.

У пробірку внести 5 мл отриманої сечі, додати 1 мл гідроген пероксиду, прокип'ятити протягом 1 хв. і охолодити. За цих умов β -оксимасляна кислота окиснюється.

До отриманої суміші додати 10-15 крапель 10% розчину натрій нітропрусиду, перемішати та додати 2 мл 25% розчину аміаку. Спостерігати за зміною забарвлення.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Записати будову β -оксимасляної кислоти.
2. Продуктом обміну яких сполук є кетонів тіла?
3. Який наслідок для організму може мати значне підвищення вмісту кетонів тіл у крові?

ЛАБОРАТОРНО-ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №5

ТЕМА: ОБМІН ЛІПІДІВ

Опрацювати теоретичний матеріал, використовуючи літературу

Основна: [1, с. 458-487]; [2, с. 225-261]; [3, с. 387-410]; [4, с. 190-233]; [5, с. 357-393].

Додаткова: [4]; [5]; [6]; [8]; [9]; [10].

Методичні вказівки

1. При розгляді теоретичних питань звернути увагу на: особливості ферментативного розкладу окремих груп ліпідів, вплив різних факторів на цей процес.
2. З'ясувати значення холевих кислот та холейнових комплексів в емульгуванні жиру.
3. Звернути увагу на ферментативний розклад тригліцеридів, стеридів та фосфоліпідів.
4. З'ясувати питання, що стосуються транспортних форм ліпідів та процесів ре синтезу тригліцеридів і фосфоліпідів.
5. Розглянути основні етапи синтезу простих та складних ліпідів.

Теоретичні питання

1. Біологічна роль ліпідів. Класифікація ліпідів за хімічними та біологічними особливостями.
2. Ліпіди, їх значення у харчуванні. Рекомендовані норми добової потреби.
3. Поняття про харчову цінність ліпідів, роль окремих компонентів.
4. Співвідношення між рослинними та тваринними жирами в раціоні.
5. Характеристика факторів, що забезпечують перетворення ліпідів.
6. Будова жовчних кислот: холевої, 7-дезоксихолевої, таурохолевої, літохолевої і хенодезоксизолевої.
7. Гідроліз тригліцеридів, характеристика продуктів гідролізу.
8. Характеристика основних факторів перетравлювання жирів. Ферменти, які забезпечують катаболізм ліпідів.
9. Всмоктування продуктів гідролізу ліпідів. Роль холейнових комплексів. Парні жовчні кислоти, їх характеристика, роль у процесах емульгування та міцелоутворення.

10. Травлення і всмоктування ліпоїдів. Продукти гідролізу фосфогліцеридів (лецитинів, кефалінів, серинфосфоліпідів). Характеристика A_1 -, A_2 -, C- та D-фосфоліпаз.
11. Дія фосфоліпаз на прикладі гідролізу лецитину.
12. Обмін стеринів і стеридів.
13. Ферментативний гідроліз стеридів. Характеристика холестеринестераз.
14. Реакції окиснення та відновлення стеролів в організмі. Утворення стероїдів.
15. Нагромадження у стінці кишок продуктів гідролізу ліпідів і ліпоїдів: гліцерину, жирних кислот, холестерину, фосфатної кислоти та нітрогенвмісних сполук. Ресинтез жирів.
16. Транспортні форми ліпідів: хіломікрони, α - і β -ліпопротеїни, неестерифіковані жирні кислоти. Рухомий резерв енергетичного і пластичного матеріалу.
17. Перетворення нейтральних жирів у тканинах. Розщеплення тригліцеридів.
18. Розклад гліцерину, характеристика ферментів.
19. Перетворення вищих жирних кислот. Суть сучасної теорії β -окиснення жирних кислот. Локалізація процесу в клітині. Роль карнітину в перенесенні жирних кислот через мембрани мітохондрій.
20. Обмін ацетил-КоА. Гліоксалевий цикл.
21. Механізм біосинтезу вищих жирних кислот. Малоніл-КоА як акцептор ацильних залишків.
22. Характеристика ферментів, які забезпечують перебіг реакцій на окремих етапах подовження радикалів жирних кислот.
23. Будова і механізм дії синтетази вищих жирних кислот.
24. Механізм синтезу тригліцеридів. Характеристика фосфатидного та моногліцеридного шляху біосинтезу тригліцеридів.
25. Біосинтез фосфоліпідів, характеристика ферментів.

Тестові завдання

1. Під впливом яких сполук відбувається емульгування жиру в кишечнику:

А. Ненасичених жирних кислот;	Б. Насичених жирних кислот;
В. Фосфатів;	Г. Жовчевих кислот.
2. Яка сполука використовується для синтезу кетонових тіл у печінці:

А. Бутирил-КоА;	Б. Ацил-КоА;
В. Сукциніл-КоА;	Г. Ацетил-КоА.

3. Дія якого ферменту призводить до утворення лізофосфоліпідів:

А. Фосфоліпази А ₁ ;	Б. Фосфоліпази А ₂ ;
В. Фосфоліпази С;	Г. Фосфоліпази В.
4. Жовчеві кислоти у складі жовчі знаходяться у кон'югованому стані з:

А. Холестерином;	Б. Білірубіном;
В. Гліцином й аланіном;	Г. Гліцином і таурином.
5. Яка кислота належить до жовчевих:

А. Арахідонова;	Б. Лінолева;
В. Холева;	Г. Олеїнова.
6. Жовчеві кислоти є продуктом обміну:

А. Фосфоліпідів;	Б. Гліколіпідів;
В. Холестерину;	Г. Тригліцеридів.
7. За допомогою чого вищі жирні кислоти транспортуються з гіялоплазми в мітохондрії:

А. Альбумінів;	Б. ЩОК;
В. Карнітину;	Г. Холестерину.
8. В яких клітинних компонентах відбувається окиснення жирних кислот:

А. Ядрі;	Б. Мітохондріях;
В. Рибосомах;	Г. Цитоплазмі.
9. Фермент холестеринестераза забезпечує:

А. Розщеплення стеридів;	
Б. Біосинтез холестерину;	
В. Перенесення холестерину крізь мембрану;	
Г. Гідроліз холестерину.	
10. Яка сполука приймає участь у перенесенні залишку жирної кислоти через мембрану мітохондрій:

А. Карнозин;	Б. Карнітин;
В. Креатинін;	Г. Анзерин.
11. Які кінцеві продукти утворюються у результаті β-окиснення жирних кислот із непарним числом атомів Карбону:

А. Сукциніл-КоА і СО ₂ ;	Б. Пропіоніл-КоА і оцтова к-та;
В. Ацетил-КоА та Н ₂ О;	Г. β-гідроксибутират.
12. Які шляхи окиснення жирних кислот, крім β-окиснення, відбуваються у живих клітинах:

А. Окиснювальне фосфорилування;	Б. α-окиснення;
В. γ-окиснення;	Г. ω-окиснення.

16. Записати схему окиснення гліцерину до піровиноградної кислоти.
17. Записати хімізм реакцій ферментативного гідролізу до кінцевих продуктів: тристеарату, лецитину, трипальмітату та фосфатидилхоліну. Розрахувати енергетичний ефект.
18. Розрахувати енергетичний баланс розкладу до кінцевих продуктів: гліцерину, фосфогліцерину, діоксиацетонфосфату.
19. Розрахувати енергетичний ефект розкладу до кінцевих продуктів (CO_2 і H_2O): а) триолеату; б) стеародипальмітату; в) стеародиолеату; г) пальмітодистеарату.
20. Записати хімізм реакцій β -окиснення стеаринової, олеїнової й пальмітинової кислот. Розрахувати енергетичний баланс.
21. Здійснити перетворення за схемою: гліцерин $\rightarrow$ піровиноградна к-та. Розрахувати енергетичний ефект.
22. Синтез кефаліну з дипальмітату і УДФ-коламіну. Вказати ферменти, які приймають участь у цьому процесі.
23. Здійснити перетворення за схемами:
 - а) лецитин $\rightarrow$ гліцерофосфохолін;
 - б) β -моностеарат $\rightarrow$ тристеарат;
 - в) ацетил-КоА $\rightarrow$ малоніл-КоА.
 - г) β -монопальмітат $\rightarrow$ трипальмітат;
 - д) 3-фосфогліцерат $\rightarrow$ тристеарат;
 - е) гліцерин $\rightarrow$ триолеат.
 - ж) стеарил-КоА $\rightarrow$ тристеарат;
 - з) малоніл-КоА $\rightarrow$ бутирил-КоА;
 - і) фосфогліцерат $\rightarrow$ лецитин.
24. Записати схеми синтезу: а) пальмітинової кислоти; б) лецитину; в) стеаринової кислоти; г) УДФ-холіну.
25. Записати хімізм реакцій, які каталізує синтетаза жирних кислот. Дати характеристику ферменту.
26. Записати реакції активації пальмітинової, стеаринової й олеїнової кислот.
27. Записати реакції, які каталізують: ацетилхолінестераза, фосфоліпаза А, фосфоліпаза С, фосфоліпаза D, фосфогліцератфосфомутаза, ацетил-КоА-карбоксилаза.
28. Здійснити перетворення за схемами: тригліцерол $\rightarrow$ гліцерин + жирні кислоти; тригліцерид $\rightarrow$ β -моногліцерид; лецитин $\rightarrow$ лізолецитин; кефалін $\rightarrow$ кінцеві продукти розкладу; лецитин $\rightarrow$ фосфатидна кислота.
29. Яка частина молекули триацетилгліцеролів містить більшу кількість біологічно доступної енергії (з розрахунку на 1 атом

карбону), залишки жирних кислот чи залишок гліцеролу? Відповідь обґрунтувати.

30. Визначити кількість води, яка утворюється у організмі верблюда з 1 кг жиру, якщо він утворений трипальмітатом.
31. Пояснити роль карбоксилазної реакції у біосинтезі жирних кислот. Записати хімізм і вказати ферменти.
32. Виходячи з сумарного рівняння біосинтезу трипальмітату з гліцеролу та пальмітинової кислоти, розрахувати кількість АТФ, яка необхідна для синтезу 200 г трипальмітату.
33. Розрахувати кількість молекул АТФ, необхідних для синтезу фосфатидхоліну, до складу якого входять залишки олеїнової і пальмітинової кислоти.
34. Розрахувати кількість молекул АТФ, яка необхідна для синтезу 100 г тристеарату.
35. Здійснити перетворення за схемою і вказати ферменти: серин $\rightarrow$ коламін $\rightarrow$ холін.
36. Розрахувати енергетичний ефект окиснення: а) стеаринової кислоти, б) пальмітинової кислоти.
37. Яка кількість молекул ацетил-КоА утворюється за один цикл β -окиснення жирних кислот?

ВИЗНАЧЕННЯ ПРОСТИХ І СКЛАДНИХ ЛІПІДІВ ТА ПРОДУКТІВ ЇХ ОБМІНУ

ФЕРМЕНТАТИВНИЙ ГІДРОЛІЗ ЛІПІДІВ

РОБОТА № 1

РОЗЩЕПЛЕННЯ ЛЕЦИТИНУ ФОСФОЛІПАЗАМИ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ

Лецитини – це група складних ліпідів (фосфогліцеридів), до складу молекули яких входять гліцерин, два залишки вищих жирних кислот та фосфохолін. Розщеплення лецитину в організмі відбувається під впливом фосфоліпаз. Існує кілька видів фосфоліпаз (A_1 , A_2 , C , D), які каталізують розщеплення певного складноєфірного зв'язку в молекулі лецитину.

Принцип методу. Неорганічний фосфат, який утворюється при гідролізі лецитину за участю фосфоліпаз, визначають за кольоровою реакцією з амоній молібдатом.

Матеріал для дослідження: препарат панкреатину.

Реактиви: 1% водна суспензія лецитину, 5% розчин панкреатину, молібденовий реактив, дистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки на 1 і 2 мл, термостат, спиртівка.

Хід роботи

У дві пробірки внести по 2 мл 1% водної суспензії лецитину. В першу (контрольну) додати 1 мл дистильованої води, у другу (дослідну) – 1 мл 5% розчину панкреатину. Пробірки поставити в термостат на 30 хв. при 38°C. Після цього в кожну пробірку додати по 2 мл молібденового реактиву і нагріти на спиртівці до кипіння. В дослідній пробірці з'являється жовтий осад.

Пояснити результати досліду та зробити висновок.

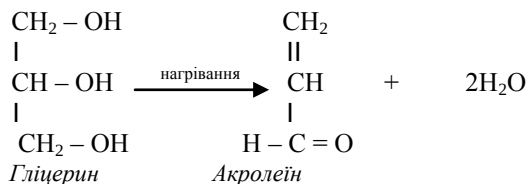
Дати відповіді на запитання

1. Чому отрути змій і скорпіонів виявляють гемолітичну дію?
2. Записати схему гідролітичного розщеплення холінфосфатидів.
3. Яка сполука утворюється під впливом фосфоліпази A₂? Записати її будову.

РОБОТА № 2

АКРОЛЕЇНОВА ПРОБА НА ГЛІЦЕРИН

Принцип реакції. Гліцерин при нагріванні розкладається з утворенням акрилового альдегіду (акролеїну), який виділяється в вигляді газу білого кольору:



Акролеїн має різкий запах горілого сала.

При взаємодії акролеїну з аміачним розчином аргентум нітрату утворюється сполука темного кольору (якісна реакція на альдегіди).

Матеріал для дослідження: рослинна олія.

Реактиви: калій гідрогенсульфат кристалічний, аміачний розчин аргентум нітрату.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки, смужки фільтрувального паперу, спиртівка.

Хід роботи

У пробірку внести 2-3 краплі олії, додати 100-200 мг калій гідросульфату і нагріти. Спостерігати за виділенням газу. До отвору пробірки піднести фільтрувальний папір, з нанесеним на нього аміачним розчином аргентум нітрату. Спостерігати за зміною забарвлення папірця.

Пояснити результати досліду та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. На яких властивостях гліцерину ґрунтується акролеїнова проба?
2. Складовою яких ліпідів є гліцерин? Записати їх будову.
3. Здійснити перетворення за схемою: гліцерин → гліцерофосфат → фосфатидна кислота → триацилгліцерол.

ВИЗНАЧЕННЯ ТРИАЦИЛГЛІЦЕРОЛІВ

Тригліцероли (нейтральні жири) – це складні етери трьохатомного спирту гліцерину і вищих жирних кислот.

Тригліцероли залежно від жирних кислот, які входять до їх складу, поділяють на моноацидні (містять три однакових залишки жирних кислот) і гетероацидні (до їх складу входять залишки двох чи трьох різних жирних кислот).

Тригліцероли мають важливе біологічне значення оскільки є запасною формою жиру, що депонується в організмі.

РОБОТА № 3 ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ТРИАЦИЛГЛІЦЕРОЛІВ У СИРОВАТЦІ КРОВІ (за Карлсоном і Ігнатовською)

Принцип методу. Гліцерин, що звільняється при гідролізі тригліцеролів, взаємодіє з натрій перйодатом з утворенням формальдегіду, який визначають за кольоровою реакцією з хромотроповою кислотою.

Матеріал для дослідження: сироватка крові.

Реактиви: стандартний розчин трибутирину (200 мг%), хлороформ, активована кремнієва кислота, 0,4% спиртовий розчин калій

гідроксиду (готувати перед використанням), 0,5% розчин натрій періодату, 5% розчин натрій бісульфіту, розчин хромотропової кислоти, 0,7М розчин сульфатної кислоти.

Обладнання: штатив з пробірками, пробірки з притертими пробками, піпетки на 1 мл, мірний циліндр, паперовий фільтр, водяна баня, терези з набором різноважок, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 3 мм.

Хід роботи

У пробірку з притертою пробкою внести 0,5 г активованої кремнієвої кислоти, 0,5 мл сироватки крові і 10 мл хлороформу, ретельно перемішати та залишити на 4 год. (можна на добу). Після цього вміст пробірки ще раз ретельно перемішати і профільтрувати через паперовий фільтр, промитий хлороформом. Екстракт випарити до утворення сухого залишку та розчинити в 0,5 мл хлороформу.

Взяти три сухі пробірки: в першу (дослідну) внести 0,5 мл хлороформного екстракту, у другу (стандартну) – 0,5 мл стандартного розчину трибутирину, у третю (контрольну) – 0,5 мл хлороформу. В кожную пробірку додати по 0,5 мл 0,4% розчину калій гідроксиду, перемішати і поставити на водяну баню (60-70 °С) на 20 хв., після чого додати по 0,5 мл 0,7М розчину сульфатної кислоти та поставити на водяну баню, де витримати доки не зникне запах спирту (близько 20 хв.). Після охолодження в кожную пробірку додати по 1 краплі натрій періодату, перемішати і через 10 хв. внести по 1 краплі 5% розчину натрій бісульфіту, ретельно перемішати. Через 10 хв. додати по 5 мл хромотропової кислоти, ретельно перемішати та поставити на киплячу водяну баню на 30 хв.

Охолодити й визначити екстинкцію стандартної та дослідної проби на ФЕК (зелений світлофільтр, 500-560 нм, кювета довжиною оптичного шляху 3 мм) відносно контролю.

Розрахунок вмісту тригліцеролів у сироватці крові провести за формулою:

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

$C_{\text{д.}}$ – вміст тригліцеролів у дослідній пробі (мг%);

$C_{\text{ст.}}$ – вміст тригліцеролів у стандартній пробі (мг%);

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

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

Вміст тригліцеролів у нормі може коливатися від 0 до 200 мг%.

Провести розрахунки та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Записати будову моно- і гетероацидних жирів.
2. Яке біологічне значення тригліцеролів в організмі?
3. Пояснити принцип методу.

РОБОТА №4 КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВІЛЬНИХ ЖИРНИХ КИСЛОТ У СИРОВАТЦІ КРОВІ

Принцип методу. Жирні кислоти з натрій диетилдитіокарбаматом за присутності мідного реактиву утворюють комплекси, інтенсивність забарвлення яких пропорційна концентрації вільних жирних кислот.

Матеріал для дослідження: сироватка крові.

Реактиви: стандартний розчин пальмітинової кислоти у хлороформі (в 1 мл міститься 0,256 мг), хлороформ, мідний реактив, 0,1% розчин натрій диетилдитіокарбамату в бутанолі.

Обладнання: штатив з пробірками, центрифужні пробірки, піпетки на 1 і 5 мл, центрифуга, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм.

Хід роботи

Узяти дві центрифужні пробірки: в першу (дослідну) внести 0,5 мл сироватки крові, у другу (стандартну) – 1 мл стандартного розчину пальмітинової кислоти у хлороформі. В кожную пробірку додати по 5 мл хлороформу і 2,5 мл мідного реактиву, перемішати та відцентрифугувати при 3000 об./хв. протягом 15 хв.

У контрольну пробірку внести 5 мл хлороформу та 0,5 мл 0,1% розчину натрій диетилдитіокарбамату в бутанолі.

У центрифужних пробірках проходить розшарування суміші. Нижній шар перенести в чисті пробірки й додати по 0,5 мл 0,1% розчину натрій диетилдитіокарбамату в бутанолі.

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

Розрахунок вмісту вільних жирних кислот провести за формулою:

$$C_{\text{д.}} = \frac{E_{\text{д.}} \times C_{\text{ст.}} \times 1000}{E_{\text{ст.}} \times 0,5}, \text{ де}$$

$C_{\text{д.}}$ – вміст вільних жирних кислот у дослідній пробі (мкМоль/л);

$C_{\text{ст.}}$ – вміст вільних жирних кислот у стандартній пробі;

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

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

1000 – коефіцієнт перерахунку в мкМоль/л;

0,5 – об'єм сироватки крові, взятої для аналізу.

У нормі вміст вільних жирних кислот у сироватці крові складає 640-880 мкМоль/л.

Провести розрахунки та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Які жирні кислоти входять до складу ліпідів?
2. Пояснити поняття “вільні жирні кислоти”. Їх функції.
3. Де у клітині проходить β -окиснення жирних кислот? Записати хімізм реакцій.

Клінічне значення. Вміст вільних жирних кислот у сироватці крові підвищується при цукровому діабеті, гіперпродукції адреналіну або його додатковому введенні. Крім того, підвищення вмісту жирних кислот спостерігається при голодуванні, коли проходить мобілізація жиру з жирових депо.

Зниження вмісту вільних жирних кислот у сироватці крові може спостерігатися після введення інсуліну чи глюкози.

ВИЗНАЧЕННЯ ХОЛЕСТЕРИНУ

Холестерин – це ненасичений одноатомний поліциклічний спирт, похідне циклопентанпергідрофенантрону. Холестерин в організмі людини та тварин існує як у вільному стані (в мозку та еритроцитах), так і в вигляді етерів з вищими жирними кислотами (у плазмі крові).

Холестерин та його етери містяться у крові та різних тканинах людини і тварин. Так, близько 22-25% від загального вмісту холестерину включає нервова тканина, зокрема мієлін, 20-22% -

сполучна тканина, 21% - м'язи, 11% - шкіра, 8% - кров, 4% - печінка.

За походженням розрізняють екзогенний і ендогенний холестерин. Екзогенний холестерин в організм людини надходить з продуктами харчування тваринного походження (яйця, м'ясо, вершкове масло, молоко, печінка тощо), а ендогенний синтезується у клітинах печінки (80%), стінках тонких кишок (10%), шкірі (5%).

Біологічна роль холестерину в тому, що він є обов'язковим компонентом мембранних структур усіх клітин організму та попередником біосинтезу стероїдних гормонів, вітаміну D₃, жовчєвих кислот та інших біологічно активних сполук.

РОБОТА № 5 ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ЗАГАЛЬНОГО ХОЛЕСТЕРИНУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ПРЯМИМ МЕТОДОМ ЗА РЕАКЦІЄЮ КАЛІАНІ-ЗЛАТКІС-ЗАКА

Принцип методу. Холестерин за присутності концентрованої ацетатної кислоти, ферум (III) хлориду та сульфатної кислоти утворює продукт конденсації червоно-фіолетового кольору, інтенсивність якого пропорційна вмісту холестерину і визначається колориметрично.

Матеріал для дослідження: сироватка крові.

Реактиви: концентрована ацетатна кислота, робочий розчин ферум (III) хлориду, стандартний розчин холестерину в концентрованій ацетатній кислоті (180 мг%), дистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки на 2 і 5 мл, мікропіпетки, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 10 мм.

Хід роботи

Взяти три пробірки: в першу (дослідну) внести 0,1 мл сироватки крові, у другу (стандартну) – 0,1 мл стандартного розчину холестерину в етиловому спирті, у третю (контрольну) – 0,1 мл води. В кожну пробірку додати по 3 мл концентрованої ацетатної кислоти і 2 мл робочого розчину ферум (III) хлориду. Вміст пробірок перемішати та залишити при кімнатній температурі на 15 хв.

Визначити екстинкцію стандартної і дослідної проби на ФЕК (зелений світлофільтр, 500-560 нм, кювета довжиною оптичного шляху 10 мм) відносно контролю.

Розрахунок вмісту холестерину в сироватці крові провести за формулою:

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

$C_{\text{д.}}$ – вміст холестерину в дослідній пробі (мг%);

$C_{\text{ст.}}$ – вміст холестерину у стандартній пробі (мг%);

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

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

Вміст холестерину в сироватці крові практично здорової людини складає 130-250 мг%.

Провести розрахунки та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Записати будову холестерину.
2. До якої групи ліпідів належить холестерин?
3. Яка біологічна роль холестерину в організмі?

РОБОТА № 6

ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ВІЛЬНОГО І ЕТЕРИФІКОВАНОГО ХОЛЕСТЕРИНУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ НЕПРЯМИМ МЕТОДОМ ЗА РЕАКЦІЄЮ ЗЛАТКІС-ЗАКА

Принцип методу. Загальний холестерин екстрагують ізопропіловим спиртом. Вільний холестерин, який перейшов в екстракт, осаджують дигітоніном і визначають в осаді за реакцією Златкіс-Зака. Вміст етерифікованого холестерину в дослідній пробі знаходять за різницею вмісту загального та вільного холестерину.

Матеріал для дослідження: сироватка крові.

Реактиви: ізопропіловий спирт, концентрована ацетатна кислота, робочий розчин ферум (III) хлориду, 1% розчин дигітоніну, ацетон, стандартний розчин холестерину в етиловому спирті (180 мг%).

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки на 2 і 5 мл, мікропіпетки, центрифужні пробірки, центрифуга, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм.

Хід роботи

До 0,2 мл сироватки крові при постійному перемішуванні додати 4,8 мл ізопропілового спирту і залишити при кімнатній температурі на 10 хв., після чого відцентрифугувати при 1500-3000 об./хв. протягом 5 хв. Надосадову рідину обережно перенести в

іншу пробірку та використати для визначення вмісту загального і вільного холестерину.

Визначення загального холестерину. Взяти три пробірки: в одну (дослідну) внести 1 мл надосадової рідини, у другу (стандартну) – 1 мл робочого стандартного розчину холестерину, у третю (контрольну) – 1 мл ізопропілового спирту. В кожну пробірку додати по 2 мл концентрованої ацетатної кислоти і 2 мл робочого розчину ферум (III) хлориду, суміш ретельно перемішати та залишити на 10-15 хв.

Визначення вільного холестерину. До 2 мл надосадової рідини додати 1 мл 0,1% розчину дигітоніну, перемішати і залишити на 30 хв., після чого пробу відцентрифугувати при 3000 об./хв. протягом 5 хв. Надосадову рідину обережно відібрати, а до осаду додати 3 мл ацетону та повторно відцентрифугувати при 3000 об./хв. протягом 5 хв. Надосадову рідину обережно видалити, пробірки залишити на 5-10 хв. відкритими для випаровування ацетону. До осаду вільного холестерину додати 1 мл ізопропілового спирту, 2 мл концентрованої ацетатної кислоти і після перемішування 2 мл робочого розчину ферум (III) хлориду. Суміш ретельно перемішати до повного розчинення осаду та залишити на 10- 15 хв.

Визначити екстинкцію стандартної і дослідної проби на ФЕК (зелений світлофільтр, 560 нм, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм) відносно контролю.

Розрахунок вмісту загального і вільного холестерину провести за формулою:

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

C_d – вміст загального і вільного холестерину в дослідній пробі, (мМоль/л);

$C_{ст.}$ – вміст загального і вільного холестерину у стандартній пробі (5,18/2,59 мМоль/л);

E_d – екстинкція дослідної проби;

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

Провести розрахунки та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Пояснити поняття “стерини” і “стериди”. Їх біологічна роль.
2. Здійснити перетворення за схемою: холестерин + пальмітинова кислота $\rightarrow$?
3. Пояснити принцип методу.

РОБОТА № 7
**ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ЗАГАЛЬНОГО ХОЛЕСТЕРИНУ В
СИРОВАТЦІ КРОВІ МЕТОДОМ ІЛЬКЕ
(метод ґрунтується на реакції Лібермана-Бурхардта)**

Принцип методу. Холестерин за присутності ацетангідриду і суміші ацетатної та сульфатної кислот утворює продукти конденсації зеленого кольору, інтенсивність забарвлення яких пропорційна вмісту холестерину.

Матеріал для дослідження: сироватка крові.

Реактиви: реактив Лібермана-Бурхардта, стандартний розчин холестерину в етиловому спирті (180 мг% або 4,7 мМоль/л).

Обладнання: сухі пробірки, мікропіпетки, піпетки на 1 і 5 мл, скляні циліндри, термостат, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм.

Хід роботи

У три сухі пробірки (присутність води заважає розвитку забарвлення) внести по 2,1 мл реактиву Лібермана-Бурхардта. В першу (дослідну) обережно по стінках додати 0,1 мл негемолізованої сироватки крові, у другу (стандартну) – 0,1 мл стандартного розчину холестерину, третя пробірка – контрольна. Вміст пробірок енергійно перемішати і поставити в термостат при 37°С на 20 хв.

Визначити екстинкцію стандартної і дослідної проби на ФЕК (червоний світлофільтр, 600-650 нм, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм) відносно контролю.

Розрахунок вмісту холестерину в сироватці крові провести:

1. За формулою:

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

$C_{д.}$ – вміст холестерину в дослідній пробі (мМоль/л);

$C_{ст.}$ – вміст холестерину у стандартній пробі (4,7 мМоль/л);

$E_{дос.}$ – екстинкція дослідної проби;

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

2. За калібрувальною кривою, для побудови якої з основного стандартного розчину холестерину приготувати серію робочих розчинів як вказано в таблиці:

Номер пробірок	Основний стандартний розчин холестерину, мл	Реактив Лібермана-Бурхардта, мл	Кількість холестерину у пробі, мг	Концентрація холестерину	
				мМоль/л	мг%
1.	0,05	2,15	0,09	2,3	90
2.	0,10	2,10	0,18	4,7	180
3.	0,15	2,05	0,27	7,0	270
4.	0,20	2,00	0,36	9,3	360
5.	0,25	1,95	0,45	11,6	450

Стандартні проби обробити як дослідні і на основі отриманих результатів побудувати калібрувальну криву: на осі абсцис відкласти значення концентрації холестерину, а на осі ординат – відповідні їм значення екстинкції.

Зауваження до методу

1. Всі пробірки і піпетки повинні бути сухими, оскільки наявність води заважає розвитку забарвлення.
2. Поява каламуті може бути зумовлена наявністю води в реактивах чи посуді.
3. Сироватку необхідно додавати дуже повільно, по стінках пробірки, оскільки при швидкому внесенні сироватки з'являється жовтувато-зелене забарвлення, яке маскує специфічний для холестерину зелений колір і зумовлює високі показники екстинкції.
4. Суміш необхідно ставити в термостат, а не залишати при кімнатній температурі, оскільки за цих умов показники екстинкції можуть бути занижені.

Вміст загального холестерину в сироватці крові практично здорових людей, визначений за цим методом, складає 3,0-5,2 мМоль/л.

Провести розрахунки та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Що означають поняття “вільний” і “загальний” холестерин?
2. Які значення вмісту холестерину в сироватці крові в нормі?
3. Пояснити принцип побудови калібрувальної кривої.

РОБОТА № 8
**ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ВІЛЬНОГО І ЕТЕРИФІКОВАНОГО
ХОЛЕСТЕРИНУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ПРЯМИМ МЕТОДОМ
(метод ґрунтується на реакції Лібермана-Бурхардта)**

Принцип методу. Вільний холестерин осаджують дигітоніном і визначають в осаді за реакцією Лібермана-Бурхардта. Вміст етерифікованого холестерину визначають за різницею концентрацій загального і вільного холестерину.

Матеріал для дослідження: сироватка крові.

Реактиви: реактив для визначення вмісту холестерину (реактив Лібермана-Бурхардта), концентрована сульфатна кислота, 0,25% розчин дигітоніну, ізопропіловий спирт, стандартний розчин холестерин-дигітоніну, стандартний розчин для визначення загального холестерину (180 мг%).

Обладнання: штатив з сухими пробірками, піпетки на 1 і 5 мл, центрифужні пробірки, центрифуга, термостат, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм.

Хід роботи

Визначення загального холестерину. Взяти три пробірки: в першу (дослідну) внести 0,05 мл сироватки крові, у другу (стандартну) – 0,05 мл стандартного розчину для визначення загального холестерину, у третю (контрольну) – 0,05 мл води. В кожну пробірку додати по 2,5 мл реактиву для визначення холестерину, перемішати і поставити в термостат при 25 °С на 10 хв. Після цього додати по 0,5 мл концентрованої сульфатної кислоти та залишити в термостаті на 10 хв.

Визначити екстинкцію стандартної і дослідної проби на ФЕК (червоний світлофільтр, 600-650 нм, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм) відносно контролю.

Визначення вільного холестерину. Взяти дві центрифужні пробірки: в першу (дослідну) внести 0,05 мл сироватки крові і 1 мл 0,25% розчину дигітоніну, у другу (контрольну) – 0,05 мл сироватки крові та 1 мл ізопропілового спирту. Вміст пробірок перемішати і через 10 хв. відцентрифугувати при 3000 об./хв. протягом 10 хв. Надосадову рідину злити, а до осадів додати по 3 мл реактиву для визначення вмісту холестерину, перемішати та знову відцентрифугувати.

По 2,5 мл надосадової рідини перенести в інші пробірки, додати по 0,5 мл концентрованої сульфатної кислоти та залишити в термостаті при 25 °С на 10 хв.

Приготування стандарту: у пробірку внести 0,05 мл стандартного розчину холестерин-дигітоніну і додати 3 мл реактиву для визначення вмісту холестерину, перемішати. До 2,5 мл отриманої суміші додати 0,5 мл концентрованої сульфатної кислоти та залишити в термостаті при 25 °С на 10 хв.

Визначити екстинкцію стандартної та дослідної проби на ФЕК (червоний світлофільтр, 600-650 нм, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм) відносно контролю.

Розрахунок вмісту вільного холестерину провести за формулою:

$$C_{\text{д.}} = \frac{C_{\text{ст.}} \cdot (E_{\text{д.}} - E_{\text{к.}})}{E_{\text{ст.}}}, \text{ де}$$

$C_{\text{д.}}$ – вміст вільного холестерину в дослідній пробі (мг%);

$C_{\text{ст.}}$ – концентрація холестерину у стандартній пробі (мг%);

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

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

$E_{\text{к.}}$ – екстинкція контрольної проби на сироватку;

Вміст вільного холестерину в сироватці крові практично здорових людей складає у середньому 30%, а етерифікованого – 70% від загального.

Провести розрахунки та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Записати будову вільного і етерифікованого холестерину.
2. Пояснити поняття “ендо- та екзогенний холестерин”.
3. Яке клінічне значення має визначення вмісту холестерину в сироватці крові?

Клінічне значення. Дослідження рівня холестерину в сироватці крові не дає вичерпної інформації про певне захворювання, а лише свідчить про патологію обміну ліпідів в організмі.

Високий рівень холестерину спостерігається при генетичних порушеннях обміну ліпідів: родинний гомо- і гетерозиготний гіперхолестеролемії, родинній комбінованій гіперліпідемії, полігенній гіперхолестеролемії.

Підвищення вмісту холестерину характерне також для атеросклерозу, міксидеми, менінгіту, цукрового діабету, деяких

захворювань печінки, які супроводжуються внутрішньо- і зовнішньопечінковим холестазом (обтураційна жовтяниця), ушкодженнях нирок (гломерулонефрит, нефротичний синдром із набряками, хронічна ниркова недостатність), злоякісних пухлин підшлункової залози і простати, подагри, ішемічної хвороби серця, гострого інфаркту міокарда, гіпертонії, гіпотиреозу, хронічного алкоголізму, ожиріння тощо. При цих захворюваннях гіперхолестеролемія має вторинний характер.

Вміст холестерину знижується при хронічних серцевих захворюваннях, гострих інфекційних захворюваннях, гіпертиреозі, тривалому голодуванні, гострих панкреатитах, порушеннях ЦНС, гострих гнійно-запальних процесах, лихоманках, деяких видах злоякісних пухлин, ревматизмі, гемолітичній жовтяниці, бронхіті, сухотах, неспецифічній пневмонії, анемії та ін.

ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНИХ (СУМАРНИХ) ЛІПІДІВ

Загальні ліпіди крові включають нейтральні жири, вільні жирні кислоти, фосфоліпіди, холестерин, ліпопротеїни різної густини, вміст яких у рідинах організму є важливим показником стану ліпідного обміну.

РОБОТА № 9

ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ЗАГАЛЬНИХ ЛІПІДІВ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ЗА РЕАКЦІЄЮ З ФОСФОРНОВАНІЛІНОВИМ РЕАКТИВОМ

Принцип методу. Продукти розкладу ліпідів, після кислотного гідролізу сульфатною кислотою, з фосфорнованіліновим реактивом утворюють сполуки, інтенсивність забарвлення яких пропорційна вмісту загальних ліпідів.

Матеріал для дослідження: сироватка крові.

Реактиви: стандартний розчин триолеату (600 мг%, або 6 г/л), концентрована сульфатна кислота, фосфорнованіліновий реактив, дистильована вода.

Обладнання: сухі пробірки, піпетки на 1 і 5 мл, водяна баня, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм.

Хід роботи

Узяти три сухі пробірки: в першу (дослідну) внести 0,1 мл сироватки крові, у другу (стандартну) – 0,1 мл стандартного розчину триолеату, у третю (контрольну) – 0,1 мл дистильованої води. В кожную пробірку додати по 5 мл концентрованої сульфатної кислоти, перемішати і поставити на киплячу водяну баню на 10 хв.

Після охолодження з кожної пробірки відібрати по 0,2 мл гідролізату та перенести в чисті сухі пробірки (дослідну, стандартну, контрольну). В кожную пробірку додати по 3 мл фосфорнованілінового реактиву, ретельно перемішати і залишити на 45 хв. у темному місці.

Визначити екстинкцію дослідної та стандартної проби на ФЕК (зелений світлофільтр, 500-560 нм, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм) відносно контролю.

Розрахунок вмісту загальних ліпідів у сироватці крові провести:

1. За формулою:

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

$C_{\text{д.}}$ – вміст загальних ліпідів у дослідній пробі (мг%);

$C_{\text{ст.}}$ – вміст загальних ліпідів у стандартній пробі (мг%);

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

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

2. За калібрувальною кривою, для побудови якої з основного стандартного розчину триолеату (1200 мг% або 12 г/л) приготувати серію робочих стандартних розчинів як вказано в таблиці:

№ пробірок	Основний стандартний розчин триолеату (12 г/л), мл	Хлороформ, мл	Концентрація загальних ліпідів, мг%
1.	0,17	0,83	200
2.	0,33	0,67	400
3.	0,50	0,50	600
4.	0,67	0,33	800
5.	0,83	0,17	1000
6.	1,00	-	1200

З кожного розведення взяти по 0,1 мл робочого стандартного розчину і обробити як дослідні.

На основі отриманих результатів побудувати калібрувальну криву: на осі абсцис відкласти значення концентрації триолеату, а на осі ординат – відповідні їм значення екстинкції.

Пряма залежність між вмістом загальних ліпідів і екстинкцією зберігається до 12 г/л.

Провести розрахунки та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Що включає у себе поняття “загальні ліпіди” ?
2. Записати схему гідролізу триолеату. Вказати ферменти.
3. Які функції і добова потреба в ліпідах?

РОБОТА № 10
**ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ЗАГАЛЬНИХ ЛІПІДІВ У
СИРОВАТЦІ КРОВІ НЕФЕЛОМЕТРИЧНИМ МЕТОДОМ
(Мікрометод Хуерго)**

Принцип методу. Після екстрагування ліпідів сироватки крові сумішню Блура та взаємодії екстракту з сульфатною кислотою утворюється емульсія, інтенсивність якої визначають на колориметрі-нефелометрі.

Матеріал для дослідження: сироватка крові.

Реактиви: стандартний розчин ліпідів, суміш Блура, 1% розчин сульфатної кислоти.

Обладнання: сухі пробірки, мірний циліндр, піпетки на 1 і 5 мл, водяна баня, колориметр-нефелометр, кювета довжиною оптичного шляху 10 мм.

Хід роботи

У пробірку внести 0,2 мл сироватки крові, додати 3,2 мл суміші Блура, ретельно перемішати, поставити на холодну водяну баню і поступово прогріти до 80 °С. Після охолодження профільтрувати через паперовий фільтр. Загальний об'єм довести сумішню Блура до 4 мл, додати 10 мл 1% розчину сульфатної кислоти і поставити на киплячу водяну баню на 1 хв., охолодити.

Через 1 год. визначити екстинкцію дослідної проби на колориметрі-нефелометрі (червоний світлофільтр, 630 нм, кювета довжиною оптичного шляху 10 мм) відносно контролю (2 мл суміші Блура і 10 мл 1% розчину сульфатної кислоти).

- Розрахунок вмісту загальних ліпідів у сироватці крові провести:
1. За формулою:

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

$C_{\text{д.}}$ – вміст загальних ліпідів у дослідній пробі (г/л);

$C_{\text{ст.}}$ – вміст загальних ліпідів у стандартній пробі (г/л);

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

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

2. За калібрувальною кривою, для побудови якої з основного стандартного розчину триолеату приготувати робочі стандартні розчини як вказано в таблиці:

№ пробірок	Основний стандартний розчин ліпідів, мл	Суміш Блура, мл	Концентрація загальних ліпідів у пробі, г/л
1.	0,2	1,8	2
2.	0,5	1,5	5
3.	1,0	1,0	10
4.	1,5	0,5	15
5.	2,0	-	20

У кожен пробірник додати по 10 мл 1% розчину сульфатної кислоти і обробити як дослідні.

На основі отриманих результатів побудувати калібрувальну криву: на осі абсцис відкласти значення концентрації загальних ліпідів, а на осі ординат – відповідні їм значення екстинкції.

У нормі вміст загальних ліпідів у сироватці крові складає 4,0-8,0 г/л або 400-800 мг%.

Провести розрахунки та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. З якою метою до сироватки крові додають суміш Блура?
2. Записати будову компонентів, що входять до складу простих і складних ліпідів.
3. Яке діагностичне значення має визначення вмісту загальних ліпідів у сироватці крові?

Клінічне значення. Підвищення вмісту загальних ліпідів у сироватці крові спостерігається при цукровому діабеті, ліпоїдному нефрозі, гострому і хронічному нефриті з набряками, ожирінні, атеросклерозі, ішемічній хворобі серця, а також при гіпотиреозі, панкреатиті, зловживанні алкоголем. Гіперліпемія є характерною ознакою цирозу печінки та гострих форм гепатитів (особливо при появі жовтяниці).

РОБОТА № 11 ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНИХ ЛІПІДІВ У ТКАНИННИХ ЕКСТРАКТАХ

Принцип методу. Ліпіди екстрагують сумішшю Блурі і після гідролізу визначають за реакцією з фосфорнованіліновим реактивом.

Матеріал для дослідження: печінка, мозок, м'язи.

Реактиви: концентрована сульфатна кислота, фосфорнованіліновий реактив.

Обладнання: фарфорові чашки, сухі пробірки, піпетки на 1, 2 і 5 мл, мірний циліндр, водяна баня, терези з набором різноважок, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм.

Хід роботи

Екстрагування ліпідів. Взяти 500-1000 мг сирової або 100-200 мг висушеної тканини (для мозку – 75-100 мг), подрібнити її і додати 10-20 мл суміші Блурі. Пробірки закрити пробками, перемішати і залишити для екстрагування ліпідів на 12-24 год. Після екстрагування вміст пробірок перемішати та поставити в термостат при 50-60°C на 30 хв., після чого профільтрувати. Фільтрат використати для визначення загальних ліпідів.

2 мл екстракту внести в фарфорову чашку на 10 мл (дослідна проба) і випарити до утворення сухого залишку.

Взяти дві пробірки: в одну (дослідну) внести 2 мл екстракту ліпідів, у другу (контрольну) – 2 мл дистильованої води. В кожну пробірку додати по 5 мл концентрованої сульфатної кислоти, ретельно перемішати та поставити на киплячу водяну баню на 10 хв.

Після охолодження в сухі пробірки внести по 0,2 мл гідролізату і додати по 3 мл фосфорнованілінового реактиву, ретельно перемішати.

Через 45 хв. визначити екстинкцію дослідної проби на ФЕК (зелений світлофільтр, 500-560 нм, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм) відносно контролю.

Розрахунок загальних ліпідів у тканинному екстракті провести за калібрувальною кривою.

Провести розрахунки та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Яким чином проводять екстрагування ліпідів?
2. Пояснити поняття “транспортні форми ліпідів”.
3. Записати схему розкладу тригліцеридів у процесі проміжного обміну.

ВИЗНАЧЕННЯ СКЛАДНИХ ЛІПІДІВ

ВИЗНАЧЕННЯ β -ЛІПОПРОТЕЇНІВ (ЛІПОПРОТЕЇНІВ НИЗЬКОЇ ГУСТИНИ)

β -Ліпопротеїни – білково-ліпідні комплекси, які мають низьку відносну густину, що пов’язано з незначним вмістом у складі їх молекул білків і високим вмістом ліпідів. Вони є однією із транспортних форм ліпідів.

Ліпопротеїни низької густини забезпечують транспорт холестерину до тканин (надниркових залоз, статевих залоз, мозку й ін.). Їх вважають атерогенними, оскільки збільшення їх вмісту призводить до посиленого відкладання холестерину в судинній системі та розвитку атеросклерозу.

РОБОТА № 12

ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ β - І ПРЕ- β -ЛІПОПРОТЕЇНІВ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ТУРБІДИМЕТРИЧНИМ МЕТОДОМ (за Бурштейном і Самай)

Принцип методу. Кальцій хлорид та гепарин порушують колоїдну стійкість білків сироватки крові, зумовлюють преципітацію β - та пре- β -ліпопротеїнів і утворення каламуті. За ступенем помутніння визначають вміст цих фракцій у сироватці крові.

Матеріал для дослідження: сироватка крові, яка не містить гепарину.

Реактиви: 0,025М розчин кальцій хлориду, гепарин активністю 1000 ОД в 1 мл.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки на 1 і 2 мл, колориметр-нефелометр, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм.

Хід роботи

У кювету довжиною оптичного шляху 5 мм внести 2 мл 0,025М розчину кальцій хлориду, встановити колориметр-нефелометр на нульову позначку при червоному світлофільтрі (довжина хвилі 720 нм). Після цього в кювету додати 0,2 мл сироватки крові і, після перемішування, виміряти інтенсивність помутніння. Далі у цю ж кювету додати 0,04 мл гепарину, перемішати і рівно через 4 хв. (!) знову виміряти екстинкцію.

Розрахунок вмісту β - та пре- β -ліпопротеїнів у сироватці крові провести за формулою:

$$C = (E_{\text{д.}} - E_{\text{к.}}) \cdot 11,65, \text{ де}$$

C – вміст β - і пре- β -ліпопротеїнів у сироватці крові (г/л);

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

$E_{\text{к.}}$ – екстинкція контрольної проби;

11,65 – емпіричний коефіцієнт.

Вміст β - та пре- β -ліпопротеїнів у сироватці крові залежить від віку й статі людини і в нормі складає 3-4,5 г/л.

Провести розрахунки та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Яка будова й біологічна роль ліпопротеїнів? Їх види.
2. Що являє собою простетична група ліпопротеїнів?
3. Пояснити поняття “колоїдна стійкість білків”. Чим вона зумовлена?

Клінічне значення. Пробу Бурштейна-Самай використовують для лабораторної оцінки функціонального стану печінки.

Підвищення вмісту β -ліпопротеїнів у сироватці крові спостерігається при атеросклерозі, механічній жовтяниці, гострих гепатитах, хронічних захворюваннях печінки, цукровому діабеті, глікогеновій хворобі, гіпотиреозі, мононуклеозі, β_1 -плазмоцитомі, ксантоматозі і ожирінні.

Зниження вмісту β -ліпопротеїнів у сироватці крові спостерігається при β_2 -плазмоцитомі.

ВИЗНАЧЕННЯ ФОСФОЛІПІДІВ

Фосфоліпіди – це складні етери багатоатомних спиртів з вищими жирними кислотами і фосфатною кислотою. До складу фосфоліпідів входять також нітрогенвісні сполуки: холін, етаноламін, спирт інозит (інозитол). За природою спирту фосфоліпіди поділяють на фосфатидилгліцериди, фосфатидилсфінгозини і фосфатидилінозити.

Синтез фосфоліпідів відбувається переважно в печінці, а також у невеликих кількостях в інших тканинах.

РОБОТА № 13

ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ФОСФОЛІПІДІВ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ЗА ВМІСТОМ ЛІПІДНОГО ФОСФОРУ (за Свенбергом і Свеннерхолмом)

Принцип методу. Фосфоліпіди осаджують ТХА, проводять гідроліз за присутності хлорної кислоти та виявляють вміст ліпідного фосфору.

Матеріал для дослідження: сироватка крові.

Реактиви: 10% розчин ТХА, концентрований розчин хлорної кислоти (57% або іншої близької концентрації), 4% розчин амоній молібдату, 1% розчин аскорбінової кислоти (можна замінити 1% розчином гідрохінону, 9% розчином тіосечовини), робочий стандартний розчин неорганічного фосфату (0,05 мг%), дистильована вода.

Обладнання: центрифужні пробірки, піпетки на 1, 2 і 5 мл, водяна баня, центрифуга, мірні пробірки на 10 мл, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм.

Хід роботи

У центрифужну пробірку внести 1,5 мл дистильованої води, 0,1 мл сироватки крові і після перемішування 3 мл 10% розчину ТХА (перші 1,5 мл вносити повільно при постійному перемішуванні, інші 1,5 мл швидше). Через 1-2 хв. вміст пробірки відцентрифугувати при 3000 об./хв. протягом 5 хв. до утворення щільного осаду, якщо необхідно, то тривалість центрифугування збільшити.

Надосадову рідину злити, а до осаду додати 0,5 мл концентрованої хлорної кислоти і поставити на киплячу водяну на

20-30 хв. Відразу ж після знебарвлення у пробірку внести 2,5 мл дистильованої води.

Взяти дві мірні пробірки: в одну (контрольну) внести 0,4 мл концентрованої хлорної кислоти, у другу (стандартну) – 0,4 мл концентрованої хлорної кислоти і 1 мл робочого стандартного розчину неорганічного фосфату. Загальний об'єм довести дистильованою водою до 3 мл.

У кожную пробірку додати по 0,5 мл 4% розчину амоній молібдату, перемішати та додати по 0,5 мл 1% розчину аскорбінової кислоти. Загальний об'єм довести дистильованою водою до 5 мл і ретельно перемішати.

Через 20 хв. визначити екстинкцію стандартної і дослідної проби на ФЕК (червоний світлофільтр, 600-650 нм, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм) відносно контролю.

Розрахунок вмісту ліпідного фосфору провести за формулою:

$$C_{\text{д.}} = \frac{C_{\text{ст.}} \times E_{\text{д.}}}{E_{\text{ст.}} \times 0,1} \times 25, \text{ де}$$

$C_{\text{д.}}$ – вміст фосфоліпідів у дослідній пробі (мг%);

$C_{\text{ст.}}$ – вміст фосфору у стандартній пробі (0,05 мг%);

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

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

0,2 – об'єм взятої для дослідів сироватки крові;

25 – коефіцієнт перерахунку на загальні фосфоліпіди.

У нормі вміст загальних фосфоліпідів у сироватці крові складає 1,5-3,6 г/л, а лецитину 0,75-1,2 г/л

Провести розрахунки та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Яке значення фосфоліпідів в організмі?
2. Записати хімізм реакцій гідролітичного розкладу фосфоліпідів.
3. Дати характеристику ферментів катаболізму фосфоліпідів.

Клінічне значення. Вміст загальних фосфоліпідів у сироватці крові зростає у хворих первинними і вторинними гіперліпопротеїнеміями.

Підвищення вмісту загальних фосфоліпідів у сироватці крові спостерігається при глікогенозі I типу, холестазі, обтураційній жовтяниці, цирозі печінки, вірусному гепатиті, печінковій комі,

постгеморагічній анемії, хронічному панкреатиті, важкій формі цукрового діабету, нефротичному синдромі.

Вміст загальних фосфоліпідів у сироватці крові знижується при перніціозній анемії, спадковому сфероцитозі, серповидноклітинній анемії, аліментарній дистрофії, важких формах вірусного гепатиту, портального цирозі, жировій дегенерації печінки, гіпертиреозі, розсіяному склерозі, прогресуванні атеросклерозу.

ЛАБОРАТОРНО-ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №6

ТЕМА: ВОДНО-МІНЕРАЛЬНИЙ ОБМІН

Опрацювати теоретичний матеріал, використовуючи літературу

Основна: [1, с. 488-508]; [3, с. 431-440]; [5, с. 470-478].

Додаткова: [5]; [7].

Методичні вказівки

1. При вивченні теоретичного матеріалу звернути увагу на значення водно-сольового обміну, роль окремих мікро- і макроелементів у життєдіяльності організмів, функції та форми води в організмі, регуляцію водно-мінерального обміну.
2. Звернути увагу на особливості класифікації біогенних елементів, їх фізіологічні функції.
3. Дати характеристику органогенних елементів.
4. Пояснити причини розвитку метаболічних розладів в організмі при дефіциті чи надлишку мікро- і макроелементів.
5. Охарактеризувати специфічні ознаки, зумовлені порушенням обміну води та мікро- і макроелементів.

Теоретичні питання

1. Хімічний склад живих організмів.
2. Неорганічні та органічні складові тканин та органів.
3. Поняття про водно-сольовий обмін.
4. Значення води та інших мінеральних сполук в організмі.
5. Охарактеризувати будову молекули води.
6. Аномальні властивості води.
7. Значення води для перебігу метаболічних процесів.
8. Форми води в організмі. Поняття про вільну, мобільну та зв'язану воду.
9. Функції води в живих організмах.
10. Добова потреба у воді. Ендогенна вода, значення.

11. Механізми регуляції водного обміну.
12. Поняття про біогенні елементи.
13. Класифікація біогенних елементів.
14. Органогенні елементи та їх значення.
15. Поняття про макро-, мікро- та ультрамікроелементи.
16. Охарактеризувати біологічну дію окремих хімічних елементів.
17. Поняття про гіпо- та гіпермікроелементози.
18. Органогенні елементи, їх відсотковий вміст у складі живої речовини.
19. “Макро-, мікро- і ультрамікроелементи”, їх кількісний вміст в організмі.
20. Охарактеризувати механізми регуляції водно-мінерального обміну.
21. Які сполуки складають мінеральну основу кісткової тканини?
22. В якому співвідношенні в організмі містяться кальцій та фосфор?
Вказати відсотковий вміст води в органах і тканинах живих організмів.

Тестові завдання

1. **До біофілів належать такі елементи:**
 А. Цинк, купрум, магній, аргентум;
 Б. Манган, кобальт, хром, магній;
 В. Гідраргірум, арсен, плюмбум, аурум;
 Г. Кобальт, нікол, цинк, арсен.
2. **До органогенів належать такі елементи:**
 А. Кальцій, магній, цинк, хром;
 Б. Арсен, натрій, аргентум, нікол;
 В. Кальцій, натрій, фосфор, нітроген;
 Г. Сіліцій, купрум, кадмій, хром.
3. **Відсотковий вміст мікроелементів в організмі складає:**
 А. Більше 10%;
 Б. Менше 90%;
 В. Менше 0,001%;
 Г. Більше 0,001%.
4. **Яка кількість мілілітрів ендогенної води утворюється в організмі людини за добу:**
 А. 50;
 Б. 100;
 В. 200;
 Г. 350.
5. **Добова потреба людини в воді складає:**
 А. 120 мл/кг;
 Б. 30-40 мл/кг;
 В. 60-80 мл/кг;
 Г. 80-100 мл/кг.
6. **Співвідношення між кількістю спожитої та виділеної води називається:**
 А. Ізоіонією;
 Б. Гідролітичним балансом;

- В. Кислотно-лужною рівновагою; Г. Водним балансом.
7. **Який гормон стимулює зворотне всмоктування води в ниркових каналцях та зменшення діурезу:**
А. Інсулін; Б. Вазопресин; В. Глюкагон; Г. Окситоцин.
 8. **Впорядкована структура молекул води називається:**
А. Диполь; Б. Кластер; В. Йон; Г. Цвitterіон.
 9. **Вода, що утворюється в організмі при окисненні органічних сполук, називається:**
А. Інтрацелюлярною; Б. Екзогенною;
В. Ендогенною; Г. Екстрацелюлярною.
 10. **Вода, що забезпечує гідратацію молекул біополімерів, називається:**
А. Гідратаційною; Б. Гідролізованою;
В. Іонізованою; Г. Гідрованою.
 11. **Основна маса води, що входить до складу організму та міститься у клітинах, називається:**
А. Інтрацелюлярною; Б. Лабільною;
В. Іммобільною; Г. Екстрацелюлярною.
 12. **Вода, що надходить до організму ззовні, називається:**
А. Ендогенною; Б. Екзогенною;
В. Іммобільною; Г. Екстрацелюлярною.
 13. **Вода, що знаходиться у міжклітинному просторі й рідинах організму, називається:**
А. Інтрацелюлярною; Б. Ендогенною;
В. Іммобільною; Г. Екстрацелюлярною.
 14. **Одним із чинників розвитку подагри є надлишкове надходження в організм:**
А. Купруму; Б. Молібдену; В. Магнію; Г. Мангану.
 15. **Хвороба Вільсона-Коновалова (гепатоцеребральна дегенерація) є наслідком спадкової недостатності:**
А. Трансферину; Б. Гаптоглобіну;
В. Цитохромоксидази; Г. Церулоплазміну.

Вправи

1. Об'єм вологої рибосоми дріжджів складає $15 \cdot 10^{-3} \text{ нм}^3$, а сухої – $5 \cdot 10^{-3} \text{ нм}^3$. Розрахувати вміст іміобілізованої води в рибосомі.
2. Визначити число атомів магнію, які містяться в одній 80S рибосомі проростків гороху, якщо на 1 г сухої речовини рибосом припадає 10 мг магнію. Відносна молекулярна маса 80S рибосоми складає $4,5 \cdot 10^{-6} \text{ Да}$ ($1 \text{ Да} = 1,67 \cdot 10^{-24} \text{ г}$).

3. Визначити число атомів магнію, які знаходяться в одній рибосомі бактерії *E. Coli*, якщо на 1 г сухої речовини рибосом припадає 20 мг магнію. Відносна молекулярна маса 70S рибосоми складає $2,65 \cdot 10^{-6}$ Да.

РОБОТА № 1 ВИЗНАЧЕННЯ ВОДИ І СУХОГО ЗАЛИШКУ У ТКАНИНАХ

Матеріал для дослідження: м'язова тканина.

Обладнання: тигель, терези з набором різноважок, сушильна шафа.

Хід роботи

Наважку тканини помістити в тигель, зважити та поставити в сушильну шафу і висушити до постійної маси.

Розрахунок сухого залишку провести за формулою: $X = A / B$, де A – маса сирієї тканини (г); B – маса сухої тканини (г).

Вміст води знайти за різницею: $100 - X$.

Провести розрахунки та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Яка біологічна роль води в організмі?
2. Який вміст води у клітинах організму, її форми та функції?
3. Пояснити аномальні властивості води і їх значення.

РОБОТА № 2 ДОСЛІДЖЕННЯ МІНЕРАЛЬНОГО СКЛАДУ ТКАНИН ТА РІДИН ОРГАНІЗМУ

У складі живих організмів виявлено більше 70 хімічних елементів. Це, так звані, біогенні елементи, оскільки вони входять до складу живих організмів.

Біогенні елементи поділяють на органогенні, макро-, мікро- і ультрамікроелементи.

Органогенні елементи (O, C, N, H, P, S) є основою структури організму, входять до складу всіх тканин і рідин організму як обов'язкові складові компоненти: Оксиген (62,4%), Карбон (21,15%), Гідроген (9,8%), Нітроген (3,1%), Фосфор (0,95%).

Макроелементи (Ca, Mg, Na, P, S, Cl, Fe) – містяться у складі тканин і рідин організму у кількості більший $10^{-3}\%$. Для них характерна структурна функція.

Мікроелементи (Mn, Zn, Cu, B, Co, F, Br, Sn, Pb, Se, Te та ін.) – приймають участь у забезпеченні різноманітних біохімічних процесів. Вміст їх в організмі менший $10^{-3}\%$.

Ультрамікроелементи – знаходяться в кількості менше $10^{-6}\%$.

Роль мінеральних речовин в організмі різноманітна, за їх участю підтримуються три важливі константи гомеостазу – ізотонія, ізотермія та ізоіонія. Мінеральні речовини виконують також опірну і пластичну функції. Збудження та подразливість живої клітини залежить від співвідношення іонів K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} . При нестачі або надлишку мінеральних речовин в організмі спостерігається розлад метаболізму.

Серед неорганічних речовин клітини важлива роль належить воді. Їй притаманні унікальна будова та властивості, які зумовлюють її специфічні функції у забезпеченні процесів життєдіяльності.

Вода складає 60-70% організму людини, зокрема, в людини вагою 70 кг міститься близько 42 л води, з них 28 л складає внутрішньоклітинна і 14 л – позаклітинна (плазма крові, лімфа). Вода, що циркулює в вигляді плазми (3,5 л), дістала назву внутрішньосудинної. Вода, яка локалізована поза клітинами (10,5 л), має назву міжклітинної рідини. Залежно від стану, в якому знаходиться вода у клітині, розрізняють вільну і зв'язану воду. Зв'язана, у свою чергу, включає міцнозв'язану (іммобільну) і слабкозв'язану (лабільну).

Матеріал для дослідження: м'язова тканина, кров, молоко.

Реактиви: концентрована нітратна кислота, 30% розчин гідроген пероксиду, 0,5% розчин хлоридної кислоти, 20% розчин винної кислоти, 10% розчин калій гідропіроантимонату, концентрована хлоридна кислота, розчин барій хлориду, 20% розчин аргентум нітрату, 5% і 10% розчин нітратної кислоти, 10% розчин калій роданіду, 5% розчин калій гексаціаноферату (II), 4% і 25% розчин аміаку, 5% розчин ацетатної кислоти, 4% розчин амоній оксалату, 20% розчин магній сульфату, 2,5% розчин амоній молібдату, дистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, піпетки, фарфоровий тигель, лійка, фільтри, спиртівка, центрифуга, терези з набором різноважок.

1. ОДЕРЖАННЯ МІНЕРАЛІЗАТУ ТКАНИН

Хід роботи

3 г досліджуваної тканини висушити до видалення вологи та прогріти до утворення озоленого залишку білого кольору і припинення виділення диму.

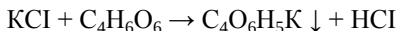
Після охолодження утворену масу залити 15 мл гарячої дистильованої води, екстрагувати при помішуванні протягом 15 хв., профільтрувати і фільтрат використати для визначення калій-, натрій- та хлор-іонів.

Осад, що залишився на фільтрі, висушити та спалити в муфельній печі до повного озолення, при додаванні в тигель кількох крапель концентрованої нітратної кислоти і 30% гідроген пероксиду. Білий залишок, який утворився, розчинити в 5 мл 0,5% розчину хлоридної кислоти та профільтрувати. Фільтрат використати для визначення ферум-(3+)-, кальцій-, магній- і фосфат-іонів.

2. ВИЯВЛЕННЯ КАЛІЙ-ІОНІВ

Хід роботи

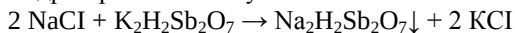
До 1 мл витяжки додати кілька крапель 20% розчину винної кислоти. Спостерігати за появою білого кристалічного осаду калій гідротартрату.



3. ВИЯВЛЕННЯ НАТРІЙ-ІОНІВ

Хід роботи

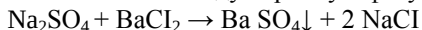
До 1 мл витяжки додати кілька крапель 10% розчину калій гідропіроантимонату. Спостерігати за появою білого кристалічного осаду натрій гідропіроантимонату.



4. ВИЯВЛЕННЯ СУЛЬФАТ-ІОНІВ

Хід роботи

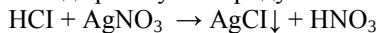
До 0,5 мл фільтрату додати 3-4 краплі концентрованої хлоридної кислоти і кілька крапель розчину барій хлориду. Спостерігати за появою білого осаду барій сульфату.



5. ВИЯВЛЕННЯ ХЛОРИД-ІОНІВ

Хід роботи

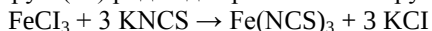
1 мл витяжки підкислити 3 краплями 10% розчину нітратної кислоти і додати кілька крапель 20% розчину аргентум нітрату. Утворюється білий осад аргентум хлориду.



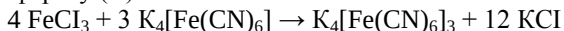
6. ВИЯВЛЕННЯ ФЕРУМ-(3+)-ІОНІВ

Хід роботи

До 1 мл витяжки додати по краплях 10% розчин калій роданіду. Утворюється ферум (III) роданід червоного кольору.



До 1 мл фільтрату додати кілька крапель 5% розчину калій гексаціаноферату (II). Утворюється синє забарвлення ферум гексаціаноферату (II).

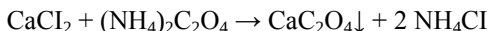


7. ВИЯВЛЕННЯ КАЛЬЦІЙ-, МАГНІЙ- ТА ФОСФАТ-ІОНІВ

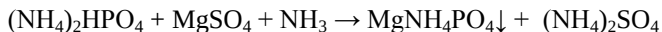
Хід роботи

Фільтрат, отриманий в попередній роботі, нейтралізувати 4% розчином аміаку до помутніння, додати 5% розчин ацетатної кислоти до просвітлення.

До 0,5 мл отриманого розчину додати 4% розчин амоній оксалату.



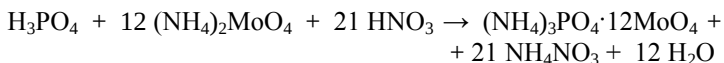
Утворений осад кальцій оксалату відокремити центрифугуванням. До центрифугату додати 25% розчин аміаку до утворення осаду солі магній-амоній фосфату.



Утворений осад відокремити центрифугуванням. До центрифугату додати 20% розчин магній сульфату до повного осадження фосфатної кислоти в вигляді магній-амоній фосфату.

Для виявлення фосфату використати обидва осади магній-амоній фосфату, для чого розчинити їх у 2 мл 5% розчину нітратної кислоти і додати 5 мл 2,5% розчину амоній молібдату та нагріти.

Спостерігати утворення жовтого осаду амонійної солі фосфорномолібденової кислоти.



Пояснити результати дослідів та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. З якою метою проводять озолення біоматеріалу?
2. Які особливості виявлення катіонів та аніонів?
3. Пояснити хімізм якісних реакцій на виявлення калій-, натрій- і хлор-іонів.

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ЙОНІВ У СКЛАДІ РІДИН ОРГАНІЗМУ

1. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ХЛОРИДІВ

Хлориди – основні позаклітинні аніони, які складають 66% всіх аніонів плазми. Вони містяться в усіх біологічних рідинах організму. У складі крові знаходяться в вигляді натрій хлориду. Його вміст в еритроцитах майже у 2 рази нижчий, ніж у плазмі крові.

Хлориди регулюють осмотичний тиск, водний баланс та кислотно-лужну рівновагу, активують амілазу, забезпечують утворення хлоридної кислоти шлункового соку, газообмінну функцію еритроцитів, знешкодження продуктів патологічного розкладу тканин.

Виведення хлоридів з організму відбувається переважно з сечею, а також з потом та каловими масами.

Обмін хлоридів пов'язаний з обміном натрію і регулюється ЦНС та ендокринною системою.

РОБОТА № 1 ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ХЛОРИДІВ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ЗА МЕТОДОМ ЛІВЕНСОНА

Принцип методу. При титруванні безбілкового фільтрату крові 0,01н розчином аргентум нітрату за присутності калій хромату, після зв'язування всіх хлоридів у вигляді аргентум хлориду,

відбувається утворення аргентум хромату цегляно-червоного кольору.

Матеріал для дослідження: сироватка крові (кров).

Реактиви: 0,45% розчин цинк сульфату, 0,1н розчин натрій гідроксиду, 5% розчин калій хромату, 0,1н розчин аргентум нітрату, стандартний 0,1н розчин натрій хлориду, дистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки на 1 мл, піпетки, водяна баня, бюретка для титрування.

Хід роботи

У дві пробірки внести по 5 мл 0,45% розчину цинк сульфату і 1 мл 0,1н розчину натрій гідроксиду. В першу пробірку додати 0,1 мл сироватки крові (крові). Пробірки поставити на киплячу водяну баню на 3 хв., після цього вміст пробірок профільтрувати, а осад двічі промити 3 мл дистильованої води. До фільтратів додати по 2 краплі 5% розчину калій хромату і відтитрувати 0,01н розчином аргентум нітрату до появи цегляно-червоного забарвлення.

Розрахунок вмісту хлоридів у сироватці крові провести за формулою:

$$C_{\text{д}} = \frac{(V - V_1) \times 100 \times 0,355}{0,1}, \text{ де}$$

$C_{\text{д}}$ – вміст хлоридів у сироватці крові (мг%);

V – об'єм 0,01н розчину аргентум нітрату, використаного на титрування дослідної проби (мл);

V_1 – об'єм 0,01н розчину аргентум нітрату, використаного на титрування стандартної проби (мл);

0,355 – кількість мг хлору, яка відповідає 1 мл 0,01н розчину аргентум нітрату;

0,1 – об'єм взятої для дослідження сироватки крові (мл);

100 – коефіцієнт перерахунку на 100 мл крові.

Коефіцієнт перерахунку в одиниці СІ (мМоль/л) складає 0,288.

Вміст хлоридів у сироватці крові практично здорових дорослих людей складає 340-390 мг%

Провести розрахунки та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Яка роль хлоридів у підтриманні показників гомеостазу?

2. Яким чином обмін хлоридів пов'язаний з обміном інших катіонів і аніонів?
3. Пояснити біологічну роль хлоридів в організмі.

РОБОТА № 2

ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ХЛОРИДІВ У СЕЧІ МЕТОДОМ МОРА

Принцип методу. Хлориди осаджують титрованим розчином аргентум нітрату за присутності калій хромату, який після їх осадження взаємодіє з аргентум нітратом з утворенням оранжево-червоного осаду.

Матеріал для дослідження: сеча.

Реактиви: 5% розчин калій хромату, 0,1н розчин аргентум нітрату, дистильована вода.

Обладнання: конічні колби на 50 мл, піпетки, бюретка для титрування.

Хід роботи

Взяти дві конічні колби на 50 мл: в першу (дослідну) внести 1 мл сечі і 5 мл води, у другу (контрольну) – 6 мл води. В кожную колбу додати по 3 краплі 5% розчину калій хромату і відтитрувати 0,1н розчином аргентум нітрату. Випадає білий осад аргентум хлориду. Титрування продовжувати до утворення оранжево-червоного осаду.

1 мл 0,1н розчину аргентум нітрату відповідає 3,55 мг хлору або 5,85 мг натрій хлориду ($M(Cl)=35,5$; $Mg(NaCl)=58,5$).

Розрахунок вмісту хлоридів у 1 мл сечі провести за формулою:

$$C = \frac{(A - B) \cdot 3,55 \cdot 100}{0,1}, \text{ де}$$

C_d – вміст хлоридів в 1 мл сечі;

A – об'єм 0,1н розчину аргентум нітрату, використаного на титрування дослідної проби, мл;

B – об'єм 0,1н розчину аргентум нітрату, використаного на титрування контрольної проби, мл.

Коефіцієнт перерахунку мг% в мМоль/л складає 0,288.

Вміст хлоридів у сечі практично здорових дорослих людей складає 170-210 мМоль/л. В нормі добова екскреція хлорид-іонів із сечею у новонароджених складає 0,3-1,4 мМоль, у дітей віком 1-

2 місяці – 1,0-3,0 мМоль, 2-6 місяців – 3,0-14,0 мМоль, 6-12 місяців – 3-30 мМоль, 1-2 роки – 14-40 мМоль.

Провести розрахунки та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Яка кількість хлоридів виділяється з сечею за добу?
2. Пояснити поняття “гіпер- і гіпохлоремія” та “гіпер- і гіпохлорурія”.
3. Які шляхи виділення хлоридів з організму?
4. В якій формі хлор міститься у тканинах і рідинах організму?

Клінічне значення. *Гіперхлоремія* може спостерігатися при надмірному вживанні натрій хлориду, затримці рідини в організмі (набряках, появі трансудатів), порушенні виведення хлоридів з сечею при захворюваннях нирок (нефритах, нефрозах, нефросклерозах, гострому гломерулонефриті), а також при гіперхлоремічних ацидозах, респіраторному алкалозі, підвищеній секреції альдостерону.

Гіпохлоремія розвивається при недостатньому надходженні хлоридів з продуктами харчування, втратах внаслідок зневоднення організму (блюванні, проносах, посиленому потовиділенні, поліурії), захворюваннях нирок (особливо при нирковому діабеті), деяких інфекційних захворюваннях (токсична дифтерія, коліти), пневмонії.

Гіпохлоруремія спостерігається при набряках, посиленому потовиділенні, захворюваннях нирок, запаленні легень, кишковій непрохідності та інших патологічних станах, що супроводжуються затримкою води у тканинах.

Гіперхлоруремія зазвичай зустрічається при розсмоктуванні набряків.

2. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ КАЛІЮ В РІДИНАХ ОРГАНІЗМУ

Калій – головний інтрацелюлярний катіон, який міститься у клітинах всіх тканин організму та травних соках. Розподіл калію в організмі такий: в середині клітини – до 90%, 2,5% калію входить до складу міжклітинної рідини і до 8% його міститься у тканинах опорно-рухового апарату. Основним депо калію є м’язова тканина.

Біологічна роль калію полягає в підтриманні осмотичного тиску, кислотно-лужної рівноваги, передачі нервових імпульсів. Калій стимулює діяльність серцевого м’язу, приймає участь у процесах біосинтезу білків, глікогену, АТФ, креатинфосфату,

ацетилхоліну. Крім того, разом з натрієм він створює різницю потенціалів на клітинних мембранах, що забезпечує функціонування K^+/Na^+ -наосу, транспорт різних речовин та йонів.

Виведення калію з організму відбувається в основному з сечею (через нирки). Незначна кількість його може виділятися у складі поту, слини та калових мас.

У регуляції вмісту калію важливу роль відіграє ЦНС. Рецептори, чутливі до калію, локалізовані у кровоносних судинах печінки, нирок, тонких кишок. Крім ЦНС в регуляції обміну калію задіяна ендокринна система, зокрема, гормони підшлункової залози (інсулін) та кори надниркових залоз (альдостерон). Альдостерон посилює екскрецію калію в ниркових каналцях та сприяє зниженню його вмісту в організмі. Інсулін виявляє протилежний ефект – зменшує втрати калію з сечею і полегшує його транспорт у клітини.

При надлишку калію спостерігається посилене виділення натрію з організму.

РОБОТА № 1 ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ КАЛІЮ В СИРОВАТЦІ КРОВІ (за Крамером-Тісдаллем)

Принцип методу. Калій сироватки крові осаджують натрій кобальтнітридом з наступним відокремленням осаду, в якому визначають вміст калію титруванням калій перманганатом за присутності сульфатної кислоти.

Матеріал для дослідження: сироватка крові.

Реактиви: натрій-кобальт нітрит, 0,01н розчин калій перманганату, 20% розчин сульфатної кислоти, 0,01н розчин щавлевої кислоти, стандартний розчин калій хлориду (1 мл розчину містить 0,2 мг калію), бідистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, центрифужні пробірки, піпетки на 1 і 5 мл, центрифуга, водяна баня, бюретка для титрування.

Хід роботи

У центрифужну пробірку внести 0,5 мл сироватки крові і по краплях, при постійному перемішуванні, додати 1 мл натрій-кобальт нітриту. Через 45 хв. додати 3 мл бідистильованої води, перемішати та відцентрифугувати при 5000 об./хв. протягом 10-15 хв. Надосадову рідину відокремити, а до осаду додати 5 мл бідистильованої води, перемішати і повторно відцентрифугувати

(промивання проводити доки надосадова рідина не стане безбарвною).

До осаду додати 2,5 мл 0,01н розчину калій перманганату, 1 мл 20% розчину сульфатної кислоти, перемішати та поставити на киплячу водяну баню на 90 с., періодично перемішуючи вміст пробірки. Після цього додати 1 мл 0,01н розчину щавелевої кислоти. Якщо рідина не знебарвиться, то додати ще 1 мл 0,01н розчину щавелевої кислоти. Знебарвлений розчин відтитрувати 0,01н розчином калій перманганату до появи слабо-рожевого забарвлення.

Розрахунок вмісту калію в сироватці крові провести за формулою:

$$C_{\text{д}} = [(V - V_1) - 0,06] \times a \times 200, \text{ де}$$

$C_{\text{д}}$ – вміст калію в сироватці крові (мг%);

V – загальний об'єм 0,01н розчину калій перманганату (2,5 мл + об'єм у мл, використаний на титрування);

V_1 – об'єм 0,01н розчину щавелевої кислоти;

0,06 – об'єм 0,01н розчину калій перманганату, використаного для отримання слабо-рожевого забарвлення розчину (в мл);

a – маса калію, якому відповідає 1 мл 0,01н розчину калій перманганату (в мг).

Величину “а” знаходять таким чином: 0,5 мл стандартного розчину калій хлориду (який містить 0,1 мг калію) обробити та відтитрувати як і дослідну пробу.

Приклад розрахунку величини “а”: якщо на титрування використано 1,5 мл 0,01н розчину калій перманганату, то 1 мл цього розчину відповідає (0,1:1,5) 0,067 мг калію.

Провести розрахунки та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Яким чином відбувається регуляція вмісту калію в рідинах організму?
2. Тканини яких органів нагромаджують значну кількість калію?
3. Пояснити функції калію в організмі.

РОБОТА № 2 ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ КАЛІЮ В СИРОВАТЦІ КРОВІ КОЛОРИМЕТРИЧНИМ МЕТОДОМ

Принцип методу. Калій-іони за наявності плюмбум-, купрум- і нітрит-іонів утворюють осад, який розчиняють у суміші риванолу та концентрованої ацетатної кислоти і визначають екстинкцію

розчину, яка пропорційна вмісту нітрит-іонів. Для розрахунку вмісту калій-іонів використовують коефіцієнт 9,23, встановлений за співвідношенням калій- і нітрит-іонів в утвореній сполучі.

Матеріал для дослідження: сироватка крові.

Реактиви: 5% розчин натрій ацетату, 0,5% розчин риванолу, суміш купрум ацетату, плумбум ацетату і натрій нітриту, концентрована ацетатна кислота, дистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, центрифужні пробірки, піпетки на 1 і 2 мл, мірний циліндр, скляні палички, центрифуга, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 10 мм.

Хід роботи

У центрифужну пробірку внести 0,5 мл 5% розчину натрій ацетату, 0,1 мл сироватки крові та 0,5 мл суміші купрум ацетату, плумбум ацетату і натрій нітриту, ретельно перемішати скляною паличкою. Через 30 хв. відцентрифугувати при 3000 об./хв. протягом 10 хв. Надосадову рідину відокремити (вона повинна бути абсолютно прозорою).

До осаду додати 1 мл 5% розчину натрій ацетату, перемішати, повторно відцентрифугувати та до осаду додати 1 мл 0,5% розчину риванолу і 2 мл ацетатної кислоти.

1 мл суміші перенести в іншу пробірку і додати 7 мл води, перемішати.

Визначити екстинкцію дослідної проби на ФЕК (зелений світлофільтр, 540 нм, кювета довжиною оптичного шляху 10 мм) відносно контролю (дистильована вода).

Розрахунок вмісту калію в сироватці крові провести за формулою:

$$C_d = E \times 9,23, \text{ де}$$

C_d – вміст калію в сироватці крові (мМоль/л);

E – екстинкція дослідної проби;

9,23 – коефіцієнт перерахунку.

У нормі вміст калію в сироватці крові складає 17,5-22,5 мг%.

Провести розрахунки та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Які гормони регулюють вміст калію в рідинах і тканинах організму?
2. Пояснити поняття “інтра- та екстрацелюлярні йони”.
3. Який принцип дії і значення калій-натрієвого насосу?

Клінічне значення. *Гіперкаліємія* спостерігається при надмірному вживанні калію з продуктами харчування, лікарськими препаратами, а також при ацидозах, нирковій недостатності, підвищеному розкладі клітин і тканин (гемолітична анемія, пухлини, некрози), анафілактичному шоку, нирковій патології (олігоурії, анурії, нерфозах), зневодненні, гіпофункції кори надниркових залоз (хворобі Аддісона), задусі та ін.

Гіпокаліємія має місце при недостатньому надходженні калію з продуктами харчування, блюванні, надмірному застосуванні діуретиків, метаболічному і дихальному алкалозі, ацидозі, ураженні ниркових каналців, цукровому діабеті, внаслідок передозування АКТГ та препаратів кори надниркових залоз. Гіпокаліємія супроводжується гальмуванням проведення нервових імпульсів у м'язовій тканині, особливо в міокарді, що викликає серцеву недостатність і може призвести до зупинки серця. Крім того, внаслідок втрати калію можуть спостерігатися порушення функціонування шлунково-кишкового тракту: втрата апетиту, блювання, послаблення перистальтики кишок тощо.

Гіперкаліурія може розвиватися при гіперфункції кори надниркових залоз та передньої долі гіпофізу (синдром Іценко-Кушінга, альдостеронізм), ураженні ниркових каналців, вживанні діуретиків, при алкалозах і ацидозах, посиленому розкладанні клітин, лікуванні кортикостероїдами та АКТГ.

Гіпокаліурія має місце при гіпофункції кори надниркових залоз і гіпофізу, захворюваннях нирок (нефрити, нефросклерози, пієлонефрити).

3. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ НАТРІЮ В РІДИНАХ ОРГАНІЗМУ

Натрій – основний екстрацелюлярний катіон. У складі позаклітинної рідини його вміст складає 50% загальної кількості натрію організму. Він може депонуватися в кістках. У складі кісткової тканини вміст натрію складає близько 44% його загальної кількості в організмі. Лише 6% натрію знаходиться в середині клітини.

Біологічна роль натрію полягає в підтриманні осмотичного тиску (головний компонент, який забезпечує створення нормальної осмолярності), кислотно-лужної рівноваги (входить до складу буферних систем крові), передачі нервових імпульсів, формуванні короткочасної пам'яті, впливає на збудливість м'язових волокон і серцево-судинної системи, а також забезпечує транспорт амінокислот, цукрів та інших сполук.

Виведення натрію з організму відбувається переважно з сечею. Незначна кількість його може виділятися у складі поту і калових мас.

Обмін натрію в організмі регулюється ЦНС та ендокринною системою. Наприклад, гормон кори надниркових залоз альдостерон сприяє затримці натрію в організмі.

РОБОТА № 1

ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ НАТРІЮ В СИРОВАТЦІ КРОВІ І СЕЧІ

Принцип методу. Натрій осаджують у вигляді потрібної солі натрій-цинк-ураніл ацетату з наступним розчиненням її у воді та колориметричним визначенням екстинкції утвореного розчину жовтого кольору.

Матеріал для дослідження: сироватка крові, сеча.

Реактиви: етиловий спирт, розчин цинк-ураніл ацетату, 20% розчин ТХА, стандартний розчин натрію, бідистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, центрифужні пробірки, піпетки на 1, 2 і 5 мл, центрифуга, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 10 мм.

Хід роботи

У центрифужну пробірку внести 0,5 мл сироватки крові, додати 1,5 мл 20% розчину ТХА, перемішати і відцентрифугувати при 3000 об./хв. протягом 10 хв.

Взяти дві центрифужні пробірки: в першу (дослідну) внести 0,4 мл безбілкового центрифугату сироватки крові (відповідає 0,1 мл крові) або 0,2 мл сечі, у другу (стандартну) – 0,2 мл стандартного розчину натрію. В кожен пробірку додати по 1 мл розчину цинк-ураніл ацетату, перемішати і залишити при 4°C на 1 год. та відцентрифугувати при 3000 об./хв. протягом 10 хв. Надосадову рідину відокремити, а до осадів додати по 2 мл розчину цинк-ураніл ацетату і знову відцентрифугувати. Надосадову рідину видалити, а осад розчинити в 5 мл бідистильованої води (при утворенні осаду через надлишок фосфатів необхідно знову відцентрифугувати).

Визначити екстинкцію стандартної і дослідної проби на ФЕК (синій або фіолетовий світлофільтр, 420-440 нм, кювета довжиною оптичного шляху 10 мм) відносно контролю (дистильована вода).

Розрахунок вмісту натрію в сироватці крові провести за формулою:

$$C_{\text{д}} = \frac{E_{\text{д}} \times C_{\text{ст.}} \times 10 \times 100}{E_{\text{ст.}}}, \text{ де}$$

$C_{\text{д}}$ – вміст натрію в дослідній пробі (мг%);

$C_{\text{ст.}}$ – вміст натрію у стандартній пробі (мг%);

$E_{\text{д}}$ – екстинкція дослідної проби;

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

Розрахунок вмісту натрію в сечі провести за формулою:

$$C_{\text{д}} = \frac{E_{\text{д}} \times C_{\text{ст.}} \times 5 \times a}{E_{\text{ст.}} \times 1000}, \text{ де}$$

$C_{\text{д}}$ – вміст натрію в дослідній пробі (мг%);

$C_{\text{ст.}}$ – вміст натрію у стандартній пробі (мг%);

$E_{\text{д}}$ – екстинкція дослідної проби;

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

a – добовий об'єм сечі (мл).

У нормі вміст натрію у сироватці крові складає 290-310 мг%, в сечі – 130,5-261 мг%/добу.

Провести розрахунки та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Яка біологічна роль натрію в організмі?
2. Пояснити роль натрію у підтриманні показників гомеостазу.
3. Які механізми регуляції вмісту натрію в організмі?

Клінічне значення. *Гіпернатріємія* спостерігається при нецукровому діабеті, зневодненні організму, гіперфункції кори надниркових залоз (синдром Іценко-Кушінга).

Гіпонатріємія буває абсолютна та відносна. Відносна гіпонатріємія розвивається при недостатньому надходженні натрію з продуктами харчування, введенні в організм великої кількості рідини, що не містить електролітів, порушенні функціонування нирок. Абсолютна гіпонатріємія спостерігається при захворюваннях нирок, гострій недостатності надниркових залоз, зневодненні організму (блюванні, проносах, посиленому потовиділенні, поліурії), крововиливах, діабетичних ацидозах.

Гіпернатрійурія спостерігається при розсмоктуванні набряків, ексудатів та трансудатів, у період одужання після інфекційних захворювань, зниженні зворотного всмоктування натрію в ниркових каналах, що пов'язано з гіпофункцією

наднирників, важкими пошкодженнями нирок і використанням діуретиків.

Гіпонатріємія може виникати в результаті посиленого потовиділення, блювання та проносів, затримки натрію у тканинах (пневмонії, набряках), а також при нефритах, посиленні зворотного всмоктування натрію в ниркових канальцях внаслідок гіперфункції надниркових залоз (альдостеронізм), при лікуванні гормонами надниркових залоз, гіперфункції передньої долі гіпофізу або гіпофункції його задньої долі (нецукровий діабет).

4. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ КАЛЬЦІЮ У РІДИНАХ ОРГАНІЗМУ

Кальцій – макроелемент, що входить до складу кісткової тканини, де вміст його складає майже 97% загальної маси. У складі кісток кальцій знаходиться в вигляді нерозчинних солей фосфатної кислоти. Решта його міститься в рідинах організму в іонному стані, а також у комплексі з білками альбумінової фракції. Невелика кількість кальцію є у крові в вигляді кальцій хлориду.

Кальцій знижує проникність кровоносних судин та клітинних мембран, а також збудливість клітин центральної і периферичної нервової системи, забезпечує регуляцію процесів скорочення м'язів, зсідання крові, формуванні опірних і покривних тканин, є активатором ферментів, зокрема, трипсиногену, лужної фосфатази, аденозинтрифосфатази, сукцинатдегідрогенази, ліпази, фосфоліпази, α -ліпази та ін.

З організму кальцій виводиться переважно з сечею.

Регуляцію вмісту кальцію в організмі забезпечують гормони парашитоподібних залоз – паратгормон і кальцитонін. Паратгормон сприяє підвищенню вмісту кальцію у крові внаслідок посилення реабсорбції в ниркових канальцях та за рахунок надходження його у кров з кісткової тканини. Кальцитонін виявляє протилежний ефект – знижує рівень кальцію внаслідок послаблення його реабсорбції в ниркових канальцях та посилення надходження в кісткову тканину. В регуляції вмісту кальцію важлива роль належить метаболіту вітаміну D₃ – 1,25-дигідроксикальциферолу, який сприяє синтезу кальційзв'язуючого білка та посилює всмоктування кальцію в тонких кишках. Порушення всмоктування кальцію може спостерігатися за наявності у продуктах харчування надлишку жирів, фосфатів, фітинової і щавелевої кислот.

РОБОТА № 1
**ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ КАЛЬЦІЮ У СИРОВАТЦІ КРОВІ
МАНГАНОМЕТРИЧНИМ МЕТОДОМ (метод де Ваарда)**

Принцип методу. Після осадження кальцію в вигляді кальцій оксалату та нагрівання утвореного осаду з сульфатною кислотою звільняється щавелева кислота, яку відтитровують калій перманганатом.

Матеріал для дослідження: сироватка крові.

Реактиви: 4% розчин амоній оксалату, 2% розчин аміаку, 1н розчин сульфатної кислоти, 0,01н розчин калій перманганату, дистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, центрифужні пробірки, піпетки на 1 і 5 мл, скляні палички, водяна баня, бюретка для титрування.

Хід роботи

Взяти дві центрифужні пробірки: в першу внести 1 мл сироватки крові, у другу – 1 мл дистильованої води. В кожную пробірку додати по 1 мл 4% розчину амоній оксалату, ретельно перемішати і через 30 хв. відцентрифугувати при 3000 об./хв. протягом 10 хв. Надосадову рідину обережно злити. Кальцій оксалат залишається на дні в вигляді осаду, який необхідно відмити від надлишку амоній оксалату та інших сполук 2% розчином аміаку. Для цього в кожную пробірку додати по 4 мл 2% розчину аміаку, осад суспендувати і знову відцентрифугувати (промивання провести 2-3 рази).

До промитих осадів додати по 2 мл 1н розчину сульфатної кислоти, суспендувати і поставити на киплячу водяну баню на 1 хв. (!). Після цього гарячі проби відтитрувати 0,01н розчином калій перманганату до появи блідо-рожевого забарвлення.

Розрахунок вмісту кальцію в сироватці крові провести за формулою:

$$C_d = 0,2 \times (V - V_1) \times 100, \text{ де}$$

C_d – вміст кальцію в сироватці крові (мг%)

V – об'єм 0,01н розчину калій перманганату, використаного на титрування дослідної проби (мл);

V_1 – об'єм 0,01н розчину калій перманганату, використаного на титрування контрольної проби (мл);

0,2 – коефіцієнт поправки на титр 0,01н розчину калій перманганату за кальцієм (1 мл 0,01н розчину калій перманганату еквівалентний 0,2 мг кальцію);

100 – коефіцієнт перерахунку на 100 мл сироватки крові.

Коефіцієнт перерахунку в одиниці СІ (мМоль/л) складає 0,25.

Провести розрахунки та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Від яких факторів залежить вміст кальцію у крові?
2. Яка біологічна роль кальцію в організмі?
3. Пояснити механізм регуляції вмісту кальцію в організмі.
4. Які ознаки порушення кальцій-фосфорного обміну?

РОБОТА № 2

ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ КАЛЬЦІЮ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ТИТРОМЕТРИЧНИМ МЕТОДОМ З ВИКОРИСТАННЯМ МУРЕКСИДУ

Принцип методу. Кальцій при взаємодії з мурексидом у лужному середовищі утворює комплексні сполуки червоно-фіолетового кольору, які руйнуються при додаванні сильнішого комплексоутворювача, що зумовлює звільнення мурексиду і зміну забарвлення на фіолетове або блідо-бузкове.

Матеріал для дослідження: сироватка крові.

Реактиви: розчин комплексоутворювача, 9н розчин натрій гідроксиду, мурексид змішаний з натрій хлоридом у співвідношенні 1:50 (ретельно розтертий у порошок), дистильована вода.

Обладнання: конічна колба, мірний циліндр, шпатель, бюретка для титрування.

Хід роботи

У конічну колбу внести 50 мл дистильованої води, 0,4 мл 9н розчину натрій гідроксиду і на кінчику шпателя невелику кількість мурексиду, ретельно перемішати та спостерігати за появою блідо-бузкового забарвлення. Отриманий розчин розділити навпіл, одна частина якого слугує еталоном забарвлення індикатора, друга є дослідною пробою для визначення вмісту кальцію. До цієї проби додати 1 мл сироватки крові і після появи червоно-фіолетового забарвлення відтитрувати розчином комплексоутворювача до появи забарвлення, характерного для еталону.

Розрахунок вмісту кальцію в сироватці крові провести за формулою:

$$C_d = 7,2 \times V, \text{ де}$$

C_d – вміст кальцію в дослідній пробі (мг%);

7,2 – коефіцієнт перерахунку;

V – об'єм розчину комплексоутворювача, використаного на титрування.

У нормі вміст кальцію в сироватці крові складає 9-12 мг%

Провести розрахунки та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Охарактеризувати функції кальцію в організмі та регуляцію його вмісту.
2. В якій формі кальцій міститься у крові?
3. Які механізми нейрогуморальної регуляції обміну кальцію в організмі?

РОБОТА №3

ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ Кальцію В СЕЧІ ТИТРОМЕТРИЧНИМ МЕТОДОМ З ВИКОРИСТАННЯМ МУРЕКСИДУ (за Грінблаттом і Хартманном)

Матеріал для дослідження: сеча.

Реактиви: 0,02М розчин трилону Б, 10% розчин натрій гідроксиду, мурексид змішаний з натрій хлоридом у співвідношенні 1:100 (ретельно розтертий у порошок), дистильована вода.

Обладнання: конічна колба, мірний циліндр, бюретка для титрування.

Хід роботи

У конічну колбу внести 3 мл сечі, 47 мл дистильованої води, 5 мл 10% розчину натрій гідроксиду і на кінчику шпателя невелику кількість мурексиду, перемішати та відтитрувати 0,02М розчином трилону Б до появи синьо-фіолетового забарвлення.

При розрахунку слід врахувати, що 1 мл 0,02М розчину трилону Б еквівалентний 1 мл 0,02М розчину кальцію, тобто 40,08/50000 г кальцію.

Розрахунок вмісту кальцію в сироватці крові провести за формулою:

$$C_{\text{д}} = \frac{40,08 \times 1000 \times a \times V}{50000 \times 3} = 0,267 \times V \times a, \text{ де}$$

$C_{\text{д}}$ – вміст кальцію в дослідній пробі (мг/добу);

V – об'єм 0,02М розчину трилону Б, використаного на титрування (мл);

a – добовий об'єм сечі (мл).

У нормі екскреція кальцію з сечею складає 100-300 мг/добу.

Провести розрахунки та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. В якій формі кальцій виділяється з сечею?
2. За яких умов уринарна екскреція кальцію може підвищуватися чи знижуватися?
3. При діагностиці яких захворювань використовують показники уринарної екскреції кальцію?

Клінічне значення. Порушення обміну кальцію в організмі може реалізуватися в організмі в вигляді гіпо- і гіперкальціємії та гіпо- і гіперкальціурії. *Гіперкальціємія* є фізіологічна та патологічна.

Фізіологічна *гіперкальціємія* може спостерігатися у новонароджених, а також після вживання їжі, яка містить значну кількість сполук кальцію.

Патологічна *гіперкальціємія* розвивається при гіпервітамінізмі Д, гіперпаратиреозі (до 29 мг%), хворобі Аддісона, синдромі Іценко-Кушинга, акромегалії, гострій кістковій атрофії, злоякісних захворюваннях з метастазами в кісткову тканину, лейкозах, гангренах, перитонітах, запальних процесах, серцевій недостатності, жовтяниці тощо.

Гіпокальціємія зустрічається частіше, ніж гіперкальціємія. Зниження вмісту кальцію у крові спостерігається при гіповітамінізмі Д, гіпопаратиреозі, остеомалії, гломерулонефритах, хронічній нирковій недостатності, панкреатиті, бронхопневмонії, хронічному сепсисі, гострому панкреатиті, уремії, у дитячому віці при спазмофільії (тетанії), рахіті, лікуванні кортизоном.

Гіперкальціурія спостерігається при злоякісних новоутвореннях з метастазами в кісткову тканину, розкладі кісткової тканини, ниркових порушеннях, підвищеному всмоктуванні в кишках (передозування вітаміну D, ідіоматичній дитячій гіперкальціємії).

Гіпокальціурія може розвиватися при гіпокальцієміях, за виключенням тих, що супроводжуються підвищеним виведенням кальцію через нирки, порушенні клубочкової фільтрації (нефрити), гіпопаратиреозі, рахіті, гіпотиреозі.

РОБОТА № 5
**ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ КАЛЬЦІУ В МОЛОЦІ
ЗА МЕТОДОМ де ВААРДА**

Сполуки кальцію складають близько 1/5 загальної кількості мінеральних речовин молока. В молоці ВРХ вміст кальцію в середньому складає 40 г%, а в молоці корови – 80-85 г%.

Принцип методу. Кальцій осаджують у вигляді оксалату. Осад, що утворився розчиняють у сульфатній кислоті. Еквівалентну кількість щавелевої кислоти, що утворюється, відтитровують розчином калій перманганату.

1 мл 0,01н розчину калій перманганату відповідає 0,2 мг кальцію.

Матеріал для дослідження: незбиране молоко.

Реактиви: 4% розчин амоній оксалату, 2% розчин аміаку, 1н розчин сульфатної кислоти, 0,01н розчин калій перманганату, дистильована вода.

Обладнання: центрифужні пробірки, піпетки на 1 і 5 мл, скляні палички, бюретка для титрування, водяна баня, центрифуга.

Хід роботи

Молоко розвести в 10 разів (1 мл молока довести водою до 10 мл).

Взяти дві центрифужні пробірки: в одну внести 1 мл молока, а у другу – 1 мл дистильованої води. В кожную пробірку додати по 0,5 мл 4% розчину амоній оксалату, добре перемішати і залишити на 30 хв. Осад, що утворився, відцентрифугувати при 3000 об./хв. протягом 10 хв. Прозору рідину обережно декантувати, а до осаду додати по 4 мл 2% розчину аміаку, щоб відмити від залишку амоній оксалату, та повторно відцентрифугувати при 3000 об./хв. протягом 10 хв.

Надосадову рідину відокремити від осаду, який двічі промити водою і перенести в інші пробірки, в кожную з яких додати по 1 мл 1н розчину сульфатної кислоти, ретельно перемішати скляною паличкою до повного розчинення осаду та поставити на киплячу водяну баню на 4 хв.

Гарячі розчини відтитрувати 0,01н розчином калій перманганату до появи слабо-рожевого забарвлення.

Розрахунок вмісту кальцію в молоці провести за формулою:

$$C = \frac{0,2 \cdot (A - B) \cdot 100}{0,1} \text{ мг, де}$$

A – кількість 0,01н розчину калій перманганату, використаного на титрування дослідної проби (мл);

B – кількість 0,01н розчину калій перманганату, використаного на титрування контрольної проби (мл);

0,2 – кількість кальцію, яка відповідає 1 мл 0,01н розчину калій перманганату (мг);

0,1 – вміст молока в 1 мл розведеного (мл).

Провести розрахунки та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. В якому вигляді міститься кальцій в молоці?
2. В яких молочних продуктах міститься максимальна кількість кальцію? Чому?
3. Людина постійно вживає продукти харчування багаті на кальцій. Чи буде це запорукою достатнього забезпечення ним організму?

5. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ НЕОРГАНІЧНОГО ФОСФАТУ В РІДИНАХ І ТКАНИНАХ ОРГАНІЗМУ

Фосфор в організмі міститься переважно в кістковій тканині (90%). Решта його знаходиться в іонному стані в середині клітини. Незначна кількість фосфору міститься в рідинах організму.

У крові фосфор знаходиться в вигляді неорганічного фосфату, органічних фосфорних ефірів, у складі фосфоліпідів, вільних нуклеотидів тощо. У клініці найчастіше використовують визначення неорганічних фосфатів і фосфоліпідів.

В організмі фосфор виконує низку функцій: підтримує кислотно-лужну рівновагу, використовується для побудови кісткової тканини (разом з кальцієм і магнієм), забезпечує синтез креатинфосфату в м'язовій тканині, активує ряд ферментів, забезпечує депонування і перенесення енергії у складі макроергічних сполук, активує всмоктування кальцій-іонів. Крім того, в вигляді фосфатної кислоти входить до складу нуклеїнових кислот, коферментів, макроергічних сполук, фосфатидів, фосфопротеїнів та ін.

Виділення фосфору відбувається в основному з сечею та у складі калових мас.

Обмін фосфору тісно пов'язаний з обміном кальцію. Тому для організму важливе значення має підтримання співвідношення між ними (1:1,5), при порушенні якого можлива поява розладів метаболічних процесів в організмі.

У регуляції обміну фосфору в організмі важливе значення мають паратгормон, кальцитонін і вітамін D. Паратгормон зумовлює зниження вмісту фосфатів у крові внаслідок посилення клубочкової фільтрації і пригнічення реабсорбції їх у нирках. Подібною дією володіє кальцитонін. Вітамін D сприяє збільшенню

рівня фосфатів у крові внаслідок посилення всмоктування їх у кишках та фіксації фосфатів у кістковій тканині.

РОБОТА № 1 ВИЗНАЧЕННЯ НЕОРГАНІЧНОГО ФОСФАТУ М'ЯЗОВОЇ ТКАНИНИ

Принцип методу. Неорганічний фосфат з амоній молібдатом у кислому середовищі утворює амонійну сіль фосфорномолібденової кислоти, яка при відновленні за участю аскорбінової кислоти, утворює фосфорномолібденову синь, інтенсивність забарвлення якої пропорційна вмісту фосфору.

Матеріал для дослідження: м'язова тканина.

Реактиви: 10% розчин ТХА, стандартний розчин калій дигідрофосфату (1 мл містить 0,02 мг фосфору), 5% розчин амоній молібдату, 0,1% розчин аскорбінової кислоти, дистильована вода.

Обладнання: терези з набором різноважок, ножиці, фарфорова ступка, конічна колба на 50 мл, лійка, марля, штатив з пробірками, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 10 мм.

Хід роботи

2,5 г подрібнених м'язів розтерти в фарфоровій ступці з 10 мл 10% розчину ТХА. Гомогенат перенести в колбу на 50 мл, ступку промити 20 мл 10% розчину ТХА і 10 мл дистильованої води. Об'єм довести водою до 50 мл, перемішати і профільтрувати.

Взяти три пробірки: в першу (дослідну) внести 2 мл фільтрату, у другу (стандартну) – 2 мл стандартного розчину калій дигідрофосфату, у третю (контрольну) – 2 мл води. В кожну пробірку додати по 0,5 мл 5% розчину амоній молібдату і 1 мл 0,1% розчину аскорбінової кислоти. Вміст пробірок перемішати.

Через 10 хв. визначити екстинкцію стандартної і дослідної проби на ФЕК (червоний світлофільтр, 600-650 нм, кювета довжиною оптичного шляху 10 мм) відносно контролю.

Розрахунок вмісту неорганічного фосфату провести за формулою:

$$C_{\text{д.}} = \frac{C_{\text{ст.}} \times E_{\text{д.}} \times 50 \times 100}{E_{\text{ст.}} \times A \times 2 \times 1000}, \text{ де}$$

$C_{\text{д.}}$ – концентрація фосфору в дослідній пробі (мг%);

$C_{\text{ст.}}$ – концентрація фосфору у стандартній пробі (2 мг%);

Е_д – екстинкція дослідної проби;
Е_{ст} – екстинкція стандартної проби.
50 – об'єм суспензії м'язової тканини (мл);
2 – об'єм фільтрату, взятого для визначення (мл);
А – наважка м'язів (г).

Провести розрахунки та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Які форми фосфору присутні в рідинах і тканинах організму?
2. Яке значення фосфору для функціонування кісткової тканини?
3. Пояснити причини патології кісткової тканини, які дістали назву “остеомалія”.

РОБОТА № 2 ВИЗНАЧЕННЯ НЕОРГАНІЧНОГО ФОСФАТУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ТА СЕЧІ

Принцип методу. Після осадження білків розчином ТХА, в центрифугаті залишається неорганічний фосфат. При взаємодії з молібденовою кислотою він утворює фосфатно-молібденову кислоту, яка відновлюється аскорбіновою кислотою з утворенням комплексної сполуки синього кольору. Інтенсивність забарвлення пропорційна вмісту неорганічного фосфату.

Матеріал для дослідження: сироватка крові, сеча.

Реактиви: 10% розчин ТХА, робочий стандартний розчин калій дигідрофосфату (1 мл містить 0,02 мг фосфору), 5% розчин амоній молібдату, 0,1% розчин аскорбінової кислоти (готувати перед використанням на 0,1н розчині хлоридної кислоти), дистильована вода.

Обладнання: центрифужні пробірки, штатив з пробірками, піпетки на 1 і 5 мл, центрифуга, ФЕК, кювета з довжиною оптичного шляху 10 мм.

Хід роботи

У центрифужну пробірку внести 1 мл сироватки крові, додати 3 мл дистильованої води і 1 мл 10% розчину ТХА, перемішати та залишити на 25 хв. Вміст пробірки відцентрифугувати при 3 000 об./хв. протягом 10 хв.

Взяти три пробірки: в першу (дослідну) внести 2,5 мл центрифугату, який містить 0,5 мл сироватки крові або 2,5 мл сечі, розведеної в 10 разів, у другу (стандартну) – 2,5 мл стандартного

розчину калій дигідрофосфату, у третю (контрольну) – 2,5 мл води. В кожен пробірник додати по 0,5 мл 5% розчину амоній молібдату і 0,5 мл 0,1% розчину аскорбінової кислоти. Вміст пробірок перемішати та залишити на 5 хв. Після цього в кожен пробірник додати по 2,5 мл дистильованої води, перемішати.

Визначити екстинкцію стандартної й дослідної проби на ФЕК (червоний світлофільтр, 600-650 нм, кювета довжиною оптичного шляху 10 мм) відносно контролю.

Розрахунок вмісту неорганічного фосфату в сироватці крові провести:

За формулою:

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

$C_{\text{д.}}$ – вміст неорганічного фосфату в дослідній пробі (мг%);

$C_{\text{ст.}}$ – вміст неорганічного фосфату в стандартній пробі (2 мг%);

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

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

2. За калібрувальною кривою, для побудови якої приготувати серію розведень робочого стандартного розчину фосфору як вказано в таблиці:

Номер пробірок	Робочий стандартний розчин фосфору, мл	Дистильована вода, мл	Вміст фосфору у пробі, мМоль/л
1.	0,25	1,9	0,65
2.	0,50	1,65	1,29
3.	0,75	1,4	1,94
4.	1,00	1,15	2,58
5.	1,25	0,9	3,23

У кожен пробірник внести по 1,25 мл 10% розчину ТХА, 0,5 мл 5% розчину амоній молібдату і 0,1 мл 0,1% розчину аскорбінової кислоти. Вміст пробірок ретельно перемішати та залишити на 20 хв.

Визначити екстинкцію стандартних проб на ФЕК (червоний світлофільтр, 600-650 нм, кювета довжиною оптичного шляху 10 мм) відносно контролю.

На основі отриманих результатів побудувати калібрувальну криву: на осі абсцис відкласти значення концентрації неорганічного фосфату, а на осі ординат – відповідні їм значення екстинкції.

Вміст неорганічного фосфату в сироватці крові практично здорових людей складає 0,81-1,45 мМоль/л, в сечі – 25,8-48,4 мМоль/добу. У новонароджених його концентрація у сироватці крові знаходиться у межах 1,13-2,78 мМоль/л, у дітей дошкільного віку – 1,45-2,10 мМоль/л, у дітей шкільного віку – 1,45-1,78 мМоль/л. У літній період вміст неорганічного фосфору в крові дещо вищий, ніж у зимовий.

Провести розрахунки та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Яка біологічна роль фосфору в організмі?
2. Пояснити механізм регуляції вмісту фосфору в рідинах і тканинах організму.
3. Що означають терміни “фосфатемія” та “фосфатурія”?

Клінічне значення. Вміст неорганічного фосфату в сироватці крові залежить від функціонування паращитоподібних і щитоподібної залози, надходження вітаміну D до організму та функції нирок.

Гіперфосфатемія має місце при нирковій недостатності, гіпарпаратиреоїдизмі, акромегалії, цукровому діабеті, кетозі, надмірному вживанні вітаміну D, ультрафіолетовому опроміненні, при хворобі Аддісона та Іценко-Кушинга, спазмофілії, а також при токсикозах у вагітних. Крім того, збільшення вмісту фосфатів у крові характерне і для періоду загоєння переломів кісток. Фізична праця також супроводжується збільшенням вмісту неорганічного фосфору внаслідок розщеплення макроергічних сполук.

Гіпофосфатемія у дитячому віці спостерігається при рахіті (на ранній стадії вміст фосфату може знижуватися до 0,19-0,97 мМоль/л), у немовлят при гіпарпаратиреоїдизмі, гіперінсулізмі, міксидемі. Крім того, гіпофосфатемія розвивається при остеомалачії, пелагрії, тривалому лікуванні інсуліном чи кальцій хлоридом, вживанні бідної на фосфати їжі та порушенні всмоктування їх у кишечнику.

Гіперфосфатурія є однією з ознак рахіту (у 2-10 разів порівняно з нормою). Може спостерігатися також при лейкозах, гіпертиреозі, цукровому діабеті, менінгіті тощо.

Гіпофосфатурія має місце при сухотах, лихоманках, гострій жовтій атрофії печінки, нирковій недостатності, акромегалії.

6. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ МАГНІЮ У РІДИНАХ ОРГАНІЗМУ

Магній – біоелемент, який міститься у крові, органах і тканинах, а також у вигляді солей входить до складу кісткової тканини, де знаходиться значна його кількість. Обмін магнію тісно пов'язаний з обміном кальцію.

Значна кількість магнію (55-60%) міститься у крові в іонізованому вигляді, 14-50% його зв'язана з білками, а 10-15% входить до складу комплексних сполук з ліпідами і нуклеотидами. Вміст магнію у крові вищий, оскільки еритроцити містять його майже у 2 рази більше, ніж сироватка чи плазма. Магній належить до інтрацелюлярних елементів – вміст його у клітинах у 3-15 разів вищий, ніж у міжклітинній рідині.

Біологічна роль магнію зумовлена здатністю його до комплексоутворення з органічними лігандами. Магній необхідний для біосинтезу білків і нуклеїнових кислот, він є активатором ряду ферментів, зокрема, фосфорилази, фосфатази, ацетилтрансферази, аміноацил-тРНК-синтетази та ін., а також є кофактором і активатором багатьох ферментів, які забезпечують процеси гліколізу, бродіння, циклу трикарбонових кислот, синтезу сечовини тощо. Крім того, магній гальмує процеси збудження в центральній нервовій системі.

РОБОТА № 1 ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ МАГНІЮ У СІРОВАТЦІ КРОВІ ТА ЕРИТРОЦИТАХ

Принцип методу. Магній при взаємодії з титановим жовтим у лужному середовищі утворює забарвлений комплекс, інтенсивність забарвлення якого пропорційна вмісту магнію в біоматеріалі.

Матеріал для дослідження: сироватка крові.

Реактиви: 10% розчин натрій вольфрамату, 0,67н розчин сульфатної кислоти, 6% та 0,2н розчини натрій гідроксиду, 2% розчин гідроксиламін хлориду, 0,1% розчин метилового червоного в етиловому спирті, 0,075% розчин титанового жовтого, стандартний розчин магній сульфату, дистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, мірні пробірки на 10 мл, центрифужні пробірки, скляні палички, центрифуга, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 10 мм.

Хід роботи

Підготовка сироватки крові. В центрифужну пробірку внести 2 мл дистильованої води, 1 мл сироватки крові, 1 мл 10% розчину натрій вольфрамату, перемішати і додати 1 мл 0,67н розчину сульфатної кислоти. Вміст пробірки ретельно перемішати скляною паличкою. Через 15 хв. пробу відцентрифугувати при 3 000 об./хв. протягом 10 хв.

Підготовка еритроцитів. Гепаринізовану кров відцентрифугувати при 3 000 об./хв. протягом 30 хв. До 0,5 мл еритроцитної маси додати 2,5 мл дистильованої води і ретельно перемішати, після чого додати 1 мл 0,67н розчину сульфатної кислоти, 1 мл 10% розчину натрій вольфрамату, перемішати і через 15 хв. профільтрувати.

2,5 мл прозорого центрифугату (фільтрату) перенести в мірну пробірку на 10 мл, в іншу (контрольну) пробірку внести 2,5 мл води. В кожну пробірку додати по одній краплі метилового червоного, перемішати та нейтралізувати 0,2н розчином натрій гідроксиду до появи жовтого забарвлення. Після цього додати по 1 мл 2% розчину гідроксиламін хлориду, 1 мл 0,075% розчину титанового жовтого і 2 мл 6% розчину натрій гідроксиду, перемішати і загальний об'єм сумішей у пробірках довести дистильованою водою до 10 мл.

Визначити екстинкцію дослідної проби на ФЕК (зелений світлофільтр, 500-560 нм, кювета довжиною оптичного шляху 10 мм) відносно контролю.

Розрахунок вмісту магній-іонів у сироватці крові та еритроцитах провести за калібрувальною кривою, для побудови якої з основного стандартного розчину магній сульфату приготувати серію робочих розведень як вказано в таблиці:

Номер пробірок	Основний стандартний розчин магній сульфату, мл	Дистильована вода, мл	Концентрація магнію у пробі, мМоль/л
1.	0,25	5,75	0,41
2.	0,50	5,50	0,82
3.	0,75	5,25	1,23
4.	1,00	5,00	1,65
5.	1,25	4,75	2,06
6.	1,50	4,50	2,47

У кожен пробірку додати по 1 мл 2% розчину гідроксиламіні хлориду, 1 мл 0,075% розчину титанового жовтого і 2 мл 6% розчину натрій гідроксиду. Визначити екстинкцію проб на ФЕК (зелений світлофільтр, 500-560 нм, кювета з довжиною оптичного шляху 10 мм) відносно контролю.

На основі отриманих результатів побудувати калібрувальну криву: на осі абсцис відкласти значення концентрації магній сульфату, а на осі ординат – відповідні їм значення екстинкції.

Провести розрахунки та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Яка біологічна роль магнію в організмі?
2. Як магній розподілений у тканинах і рідинах організму?
3. За яких умов відбувається підвищення або зниження вмісту магнію в сироватці крові?

РОБОТА № 2
**КОМПЛЕКСОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ
МАГНІЮ В СИРОВАТЦІ КРОВІ**
(за Н.В. Сюдмак, М.І. Гунтер, Л.К. Кондратчук)

Принцип методу. Вміст магнію визначають за різницею між сумою вмісту кальцію і магнію та вмістом кальцію з використанням специфічних індикаторів.

Матеріал для дослідження: сироватка крові.

Реактиви: 10% розчин ТХА, 0,002н розчин трилону Б, аміачний буферний розчин (рН...10,0), розчин хромогену чорного, флюорексон, робочий розчин натрій сульфід, 6% розчин калій гідроксиду.

Обладнання: штатив з пробірками, центрифужні пробірки, мірний циліндр, піпетки, шпатель, скляні палички, конічні колби, центрифуга, бюретка для титрування.

Хід роботи

У центрифужну пробірку внести 2 мл сироватки крові, 2 мл 10% розчину ТХА, перемішати і відцентрифугувати при 2000 об./хв. протягом 5 хв.

Визначення сумарного вмісту кальцію і магнію. В колбу внести 100 мл аміачного буферного розчину, 2 мл робочого розчину натрій сульфід, 10 крапель розчину хромогену та ретельно перемішати. Рідина повинна набути блакитного або синьо-

блакитного забарвлення, якщо воно бузкове чи фіалкове, то це свідчить про наявність домішок кальцію і магнію в реактивах. Їх можна видалити при додаванні розчину трилону Б до отримання необхідного забарвлення (реактиви слід готувати на бідистильованій воді).

Отриману суміш реактивів розділити порівну на дві колби. В одну з них додати 1 мл безбілкового фільтрату сироватки крові (відповідає 0,5 мл сироватки), перемішати (з'являється вишнево-червоне забарвлення) і повільно відтитрувати 0,002н розчином трилону Б до появи синьо-блакитного кольору, характерного для еталону (ним є розчин в іншій колбі).

Визначення вмісту кальцію. У колбу внести 100 мл 6% розчину калій гідроксиду і на кінчику шпателя флюорексон (близько 20 мг), ретельно перемішати. Рідина набуває зеленої флюоресценції, зумовленої присутністю домішок кальцію в розчині калій гідроксиду. Їх необхідно видалити додаванням 0,002н розчину трилону Б до зникнення флюоресценції та появи рожевого забарвлення. Після цього суміш розділити порівну на дві колби. В одну з них додати 1 мл безбілкового фільтрату сироватки крові (з'являється зелена флюоресценція). Вміст колби повільно відтитрувати 0,002н розчином трилону Б до зникнення флюоресценції і появи рожевого кольору, еталоном для порівняння забарвлення є розчин в іншій колбі.

Розрахунок вмісту кальцію в сироватці крові провести за формулою:

$$C_{\text{д}} = \frac{V \times 0,002 \times T \times 1000 \times 20,04}{0,5 \times 10} = V \times T \times 8,01, \text{ де}$$

$C_{\text{д}}$ – вміст кальцію в дослідній пробі (мг%);

V – об'єм 0,002н розчину трилону Б, використаного на титрування кальцію (мл);

T – коефіцієнт поправки на титр 0,002н розчину трилону Б.

Розрахунок вмісту магнію в сироватці крові провести за формулою:

$$C_{\text{д}} = \frac{(V_1 - V) \times 0,002 \times T \times 1000 \times 12,16}{0,5 \times 10} = (V_1 - V) \times T \times 4,86, \text{ де}$$

$C_{\text{д}}$ – вміст магнію в дослідній пробі (мг%);

V – об'єм 0,002н розчину трилону Б, використаного на титрування кальцію (мл);

V_1 – об'єм 0,002н розчину трилону Б, використаного на титрування кальцію і магнію (мл);

T – коефіцієнт поправки на титр розчину.

Вміст магнію в сироватці крові у практично здорових людей складає 1,6-2,9 мг% або 0,75-1,25 мМоль/л.

Провести розрахунки та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Чому при нестачі магнію порушуються функції серцево-судинної системи?
2. Яка роль магнію в забезпеченні активності ферментів?
3. Пояснити принцип методу.

РОБОТА № 3

ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ МАГНІЮ В СЕЧІ (за Н.В. Сюдмак)

Матеріал для дослідження: сироватка крові.

Реактиви: 0,005н розчин трилону Б, аміачний буферний розчин (рН...10,0), 6% розчин калій гідроксиду, розчин хромогену чорного, флюорексон.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, піпетки, скляні палички, конічні колби, бюретка для титрування.

Хід роботи

Визначення сумарного вмісту кальцію і магнію. В колбу внести 100 мл аміачного буферного розчину, 10 крапель розчину хромогену і ретельно перемішати. Рідина повинна набути блакитного або синьо-блакитного забарвлення.

Отриману суміш реактивів розділити порівну на дві колби, в одну з них додати 1 мл сечі, перемішати (з'являється червоне забарвлення) і повільно відтитрувати 0,002н розчином трилону Б до появи вихідного синьо-блакитного забарвлення, еталоном для порівняння забарвлення є розчин в іншій колбі.

Визначення вмісту кальцію. У колбу внести 100 мл 6% розчину калій гідроксиду, на кінчику шпателя флюорексон (близько 20 мг) і по краплях додати 0,005н розчин трилону Б до появи рожевого забарвлення. Після цього суміш розділити порівну на дві колби і в одну з них додати 1 мл сечі (з'являється зелена флюоресценція). Вміст колби повільно відтитрувати 0,002н розчином трилону Б до зникнення флюоресценції і появи рожевого кольору, еталоном для порівняння забарвлення є розчин в іншій колбі.

Розрахунок вмісту кальцію в сечі провести за формулою:

$$C_{\text{д}} = V \times T \times a \times 5 \times 20,04 = V \times T \times a \times 100,2, \text{ де}$$

$C_{\text{д}}$ – вміст кальцію в дослідній пробі (мг/добу);

V – об'єм 0,002н розчину трилону Б, використаного на титрування кальцію (мл);

a – добовий діурез (л);

T – коефіцієнт поправки на титр 0,002н розчину трилону Б.

Розрахунок вмісту магнію в сечі провести за формулою:

$$C_{\text{д}} = (V_1 - V) \times T \times a \times 5 \times 12,16 = (V_1 - V) \times T \times a \times 60,8, \text{ де}$$

$C_{\text{д}}$ – вміст магнію в дослідній пробі (мг/добу);

V – об'єм 0,002н розчину трилону Б, використаного на титрування кальцію (мл);

V_1 – об'єм 0,002н розчину трилону Б, використаного на титрування кальцію і магнію (мл);

a – добовий діурез (л);

T – коефіцієнт поправки на титр розчину.

Вміст магнію в сечі у практично здорових людей складає 100-300 мг/добу.

Провести розрахунки та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Який вміст магнію в рідинах організму?
2. Пояснити поняття “інтрацелюлярний елемент”.
3. Які метаболічні розлади спостерігаються в організмі при нестачі чи надлишку магнію?

Клінічне значення. *Гіпомагніємія* спостерігається при вживанні їжі з низьким вмістом білка, шлунково-кишкових розладах (діареї, порушенні всмоктування магнію в кишечнику, пухлинах кишечника тощо), серцево-судинних захворюваннях (хронічна ішемічна хвороба серця, атеросклероз тощо), ниркових захворюваннях (гострий каналцевий некроз), ендокринних розладах (цукровий діабет, гіпотиреоз, тиреотоксикоз, гіперальдостеронізм).

Недостатнє надходження магнію в організм викликає м'язові судоми, надмірну нейром'язову збудливість, конвульсії, тахікардію,

психічні розлади. Дефіцит магнію призводить до зменшення вмісту внутрішньоклітинного калію, внаслідок чого відбувається звуження коронарних та магістральних артеріальних судин і, відповідно, підвищення артеріального тиску (гіпертензії).

Зменшення вмісту магнію у плазмі крові призводить до порушення згортання крові, підвищення артеріального тиску, погіршення мікроциркуляції в капілярах. Крім того, гіпомagneмія спостерігається при гострому і хронічному панкреатиті, хронічній серцево-судинній недостатності, хронічному гломерулонефриті, онкозахворюваннях, хронічному алкоголізмі, діабетичному ацидозі, ендокринних розладах, токсикозі в вагітних, вагітності.

Зниження концентрації магнію спочатку у клітинах, а потім у міжклітинному просторі призводить до ішемії міокарду, серцевих аритмій, гострої серцевої недостатності і може стати причиною раптової смерті.

Гіпермагнемія спостерігається при гострій і хронічній нирковій недостатності, анурії, уремії, гіпотиреозі, хворобі Іценко-Кушинга, задусі, діабетичному ацидозі, есенціальній гіпертензії, прогресуючому атеросклерозі, гіпертрофічному артриті, зневодненні організму. Підвищення вмісту магнію у крові більше, ніж 1,2 мМоль/л, може спричинити пригнічення дихального центру, розвиток коматозного стану, порушення провідності міокарду, блокаду і зупинку серця. Крім того, збільшення вмісту магнію у крові викликає появу сонливості, так званій, магнезіальний наркоз, який знімається введенням йонів кальцію.

7. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ КУПРУМУ У РІДИНАХ ОРГАНІЗМУ

Купрум – життєвонеобхідний мікроелемент, який в основному зосереджений у печінці у складі білка гемокупреїну. У крові він міститься в еритроцитах та плазмі крові. Близько 90% купруму плазми входить до складу церулоплазміну і лише незначна його кількість знаходиться у вільному стані, або у комплексі з альбумінами та глобулінами.

Купрум відіграє важливу біологічну роль, оскільки є кофактором багатьох ферментів, які забезпечують обмін речовин в організмі та підтримання ряду показників гомеостазу, забезпечує імунні реакції. Купрум посилює активність інсуліну, гормонів гіпофіза, статевих залоз, позитивно впливає на процеси росту і розвитку організму, виявляє гіпоглікемічну дію, сприяє синтезу колагену та еластину. Крім того, у складі церулоплазміну, купрум забезпечує перехід феруму з двовалентного у тривалентний стан, що зумовлює краще засвоєння його організмом.

РОБОТА № 1
**ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ КУПРУМУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ
ЗА МЕТОДОМ ШМІДТА
(модифікація А.Г. Рахманкулова та І.А. Коптєвої)**

Принцип методу. Вміст купрум-іонів у сироватці крові визначають за інтенсивністю жовтого забарвлення комплексної сполуки, яка утворюється внаслідок його взаємодії з натрій диетилдитіокарбаматом.

Матеріал для дослідження: сироватка крові.

Реактиви: 20% розчин ТХА, 4% розчин натрій пірофосфату, 25% розчин аміаку, 1% розчин натрій диетилдитіокарбамату, робочий стандартний розчин купруму (100 мкг%), бідистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, мірний циліндр, центрифужні пробірки, мікропіпетки, центрифуга, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 10 мм.

Хід роботи

Взяти три пробірки, одна з яких центрифужна: в одну (центрифужну, дослідну) пробірку внести 1 мл сироватки крові, у другу (стандартну) – 1 мл робочого стандартного розчину купруму, у третю (контрольну) – 1 мл води. В кожну пробірку додати по 2,5 мл бідистильованої води, 1,5 мл 20% розчину ТХА, вміст пробірок ретельно перемішати. Через 10 хв. дослідну пробу відцентрифугувати при 3000 об./хв. протягом 30 хв. до отримання прозорого центрифугату.

У три інші пробірки перенести по 2,5 мл відповідних розчинів і прозорого центрифугату. В кожну пробірку додати по 0,5 мл 4% розчину натрій пірофосфату, 0,25 мл 25% розчину аміаку і 0,5 мл 1% розчину натрій диетилдитіокарбамату. Вміст пробірок перемішувати протягом 15-20 с.

Визначити екстинкцію стандартної і дослідної проби на ФЕК (синій світлофільтр, кювета довжиною оптичного шляху 10 мм) відносно контролю.

Розрахунок вмісту купруму в сироватці крові провести за формулою:

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

$C_{\text{д}}$ – вміст купруму в дослідній пробі (мкг%);

$C_{\text{ст.}}$ – вміст купруму у стандартній пробі (мкг%);

$E_{\text{д}}$ – екстинкція дослідної проби;

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

Коефіцієнт перерахунку в одиниці СІ (мкМоль/л) складає 0,157.

У нормі вміст купруму в сироватці крові складає: в жінок – 13,4-24,4 мкМоль/л, у чоловіків – 11,0-22,0 мкМоль/л, у новонароджених 3,1-9,4 мкМоль/л (наприкінці першого місяця показники наближаються до значень, характерних для дорослих).

Провести розрахунки та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Охарактеризувати біологічну роль купруму в організмі.
2. В яких формах купрум входить до складу рідин і тканин організму?
3. Які захворювання зумовлені нестачею чи надлишком купруму в організмі?

Клінічне значення. Підвищення вмісту купруму, а відповідно і церулоплазміну, спостерігається при захворюваннях, що супроводжуються посиленням розкладом тканин: перніційозній, мегалобластичній та апластичній анеміях, ускладненнях гемодіалізу, таласемії, лейкозах, лімфогранулематозі, злоякісних новоутвореннях (у шлунково-кишковому тракті, легенях, кістковій тканині, молочній залозі, шийці матки), при травмах, захворюваннях печінки (гепатитах, цирозах, механічній (але не паренхіматозній) жовтяниці), черевному тифі, неспецифічній пневмонії, сухотах, гострій дизентерії, інфекційному неспецифічному поліартриті, гострих формах інфекційних захворювань, колагенозах, інфаркті міокарду, пелагрії, гіпо- та гіпертиреозі, при вагітності.

Зниження вмісту купруму і активності церулоплазміну спостерігається при хворобі Вільсона-Коновалова, нефротичному синдромі, опіках, хронічній ішемічній хворобі серця, залізодефіцитній анемії, диспротеїнемії, а також при незбалансованому білковому харчуванні та у немовлят.

8. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ФЕРУМУ В РІДИНАХ ОРГАНІЗМУ

Ферум – макроелемент, який входить до складу гемоглобіну (57-75%) та міоглобіну (7%), який є резервом кисню в м'язах; значна кількість феруму міститься в печінці, кістковому мозку, селезінці (20%); він є складовою низки ферментів – цитохромів, каталази, пероксидази та ін. (16%).

В організмі ферум міститься в геміновій (гемоглобін, міоглобін, цитохроми, цитохромоксидаза тощо) і негеміновій формі, представленою ферумбілковими комплексами – ферритином та гемосидерином, які є запасною формою феруму і містяться в печінці, селезінці та кістковому мозку. Транспортною формою феруму в організмі є ферумвмісний білок трансферин, який забезпечує перенесення його до кровотворних органів.

Біологічна роль феруму полягає, в першу чергу, в тому, що він входить до складу гемоглобіну, який забезпечує дихальну функцію крові, та міоглобіну, що створює резерв кисню в м'язах. Крім того, ферум виконує роль кофактору багатьох ферментів.

З організму ферум виводиться у складі калових мас, сечі і поту, в жінок під час менструального циклу.

РОБОТА № 1 ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ФЕРУМУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ЗА КОЛЬОРОВОЮ РЕАКЦІЄЮ З β -ФЕНАНТРОЛІНОМ

Принцип методу. Вміст феруму визначають колориметрично за кольоровою реакцією з батофенантроліном після відновлення його тіогліколевою кислотою в безбілковому фільтраті.

Матеріал для дослідження: сироватка крові.

Реактиви: тіогліколева кислота, 40% розчин ТХА, насичений розчин натрій ацетату, 1н розчин хлоридної кислоти, спиртовий розчин батофенантроліну, стандартний розчин феруму (1,67 мкг/мл або 30 мкМоль/л), бідистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, центрифужні пробірки, піпетки на 1 мл, центрифуга, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 10 мм.

Хід роботи

Взяти три пробірки: в першу (дослідну) внести 0,7 мл сироватки крові, у другу (стандартну) – 0,7 мл стандартного розчину феруму, у третю (контрольну) – 0,7 мл бідистильованої води. В кожну пробірку додати по 0,1 мл тіогліколевої кислоти та 0,35 мл 1н розчину хлоридної кислоти, ретельно перемішати, додати по 0,2 мл 40% розчину ТХА і після повторного перемішування відцентрифугувати при 2500 об./хв. протягом 10 хв.

Центрифугати в кількості 0,7 мл перенести в інші пробірки і додати по 0,6 мл насиченого розчину натрій ацетату та 0,7 мл

розчину батофенантроліну, ретельно перемішати. Забарвлення розвивається протягом 20-30 сек.

Визначити екстинкцію стандартної і дослідної проби на ФЕК (зелений світлофільтр, 540 нм, кювета довжиною оптичного шляху 10 мм) відносно контролю.

Розрахунок вмісту феруму в сироватці крові провести за формулою:

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

$C_{\text{д.}}$ – вміст феруму в дослідній пробі (мкМоль/л);

$C_{\text{ст.}}$ – вміст феруму у стандартній пробі (30 мкМоль/л);

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

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

У нормі вміст феруму в сироватці крові складає в чоловіків – 12-32 мкМоль/л, у жінок – 10-28 мкМоль/л.

Провести розрахунки та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Яка біологічна роль феруму в організмі?
2. В яких формах ферум міститься в організмі?
3. Пояснити участь феруму в забезпеченні дихальної функції крові.

Клінічне значення. Патологія обміну феруму зазвичай пов'язана з його дефіцитом.

Зниження вмісту феруму в організмі може бути наслідком:

1. Недостатнього надходження феруму з продуктами харчування.
2. Порушення всмоктування у шлунково-кишковому тракті (при гастритах, резекції шлунка і кишечника, профузних проносах у дітей, глисних інвазіях).
3. Посиленого використання органами та тканинами: при вагітності, підвищених фізичних навантаженнях.
4. Втрати феруму внаслідок кровотеч.
5. Тимчасового перерозподілу феруму в організмі: при системних захворюваннях сполучної тканини (колагенозах, ревматизмі, ревматоїдному поліартриті), злоякісних новоутвореннях, хронічному гепатиті, цирозі печінки, гострих і хронічних захворюваннях легень, септичних станах, уремії, інфаркті міокарду.

Підвищення вмісту феруму в сироватці крові спостерігається при недостатньому його використанні, надмірному надходженні з продуктами харчування, а також при первинному гемохроматозі, коли через спадкове порушення механізму, який обмежує всмоктування феруму у шлунково-кишковому тракті, у кров надходить надмірна його кількість, а також при таласеміях та всіх формах жовтяниць.

Недостатнє використання феруму для утворення феритину може розвиватися при деяких захворюваннях печінки, а також є наслідком ферментативних порушень синтезу гему (спадкова сидероахрестична анемія, рефрактерна набута сидероахрестична анемія, пов'язана з отруєнням плумбумом).

9. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ СУЛЬФАТІВ У РІДИНАХ ОРГАНІЗМУ

Сульфур в організмі знаходиться переважно у складі органічних і неорганічних сполук. Значна кількість його входить до складу білків покривних тканин, біологічно активних сполук – ферментів, гормонів, пептидів. У складі глутатіону і таурину сульфур забезпечує обмін білків та ліпідів, перебіг окисно-відновних процесів.

Окрім того, він входить до складу S-аденозилметіоніну – кофактору ферментів, що забезпечують реакції переметилування, і КоА-SH, який відіграє важливу роль в обмінних процесах організму. В вигляді активних сульфатів сульфур забезпечує знешкодження різних токсичних продуктів обміну.

Виводиться з організму сульфур з сечею у складі неорганічних сульфатів, солей ефіросульфатних кислот і, так званого, “нейтрального” сульфур (цистин, сульфіді тощо). Сульфати утворюються переважно внаслідок окиснення сульфурвмісних амінокислот, які надходять до організму з продуктами харчування.

Окрім того, в сечі людини містяться і парні сполуки етерів сульфатної кислоти в вигляді солей: фенолсульфатна, крезолсульфатна, індоксилсульфатна, які утворюються в печінці внаслідок знешкодження продуктів гниття білків.

РОБОТА № 1
ЯКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ СУЛЬФАТІВ У СЕЧІ

Принцип методу. При кислотному гідролізі етерів сульфурвмісних сполук утворюється сульфатна кислота, яка осаджується в вигляді барієвих солей.

Матеріал для дослідження: сеча.

Реактиви: 10% розчин хлоридної кислоти, 5% розчин барій хлориду.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки, водяна баня.

Хід роботи

20 крапель сечі внести у пробірку, додати 5 крапель 10% розчину хлоридної кислоти, нагріти та профільтрувати. До фільтрату додати по краплях 5% розчин барій хлориду до повного осадження, помістити на киплячу водяну баню на 5-6 хв. і спостерігати за появою осаду.

Пояснити результати досліду та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Які сульфурвмісні сполуки присутні в рідинах організму?
2. Пояснити біологічну роль сульфурвмісних сполук в організмі.
3. Що є джерелом сульфурвмісних сполук у сечі?

РОБОТА № 2
ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ СУЛЬФАТІВ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ТА СЕЧІ
(за Берландом і Сорго в модифікації
І.Л. Віноградової та О.О. Сафарової)

Принцип методу. При взаємодії сульфатів з солями барію утворюється стійка суспензія барій сульфату.

Матеріал для дослідження: сироватка крові, сеча.

Реактиви: барій-желатиновий реактив, 4% і 8% розчин ТХА, стандартний розчин сульфатів (0,01М розчин амоній сульфату), дистильована вода.

Обладнання: штатив з пробірками, піпетки, водяна баня, ФЕК, кювета довжиною оптичного шляху 3 мм.

Хід роботи

Визначення вмісту сульфатів у сироватці крові. У центрифужну пробірку внести 2 мл сироватки крові, додати 2 мл 8% розчину ТХА, перемішати і через 20 хв. відцентрифугувати при 3000 об./хв. протягом 10 хв. Центрифугат профільтрувати та

визначити екстинкцію фільтрату на ФЕК (жовтий світлофільтр, 450 нм, кювета довжиною оптичного шляху 3 мм) відносно води. Після цього до 2 мл фільтрату додати 0,5 мл барій-желатинового реактиву, ретельно перемішати і визначити екстинкцію цього розчину за тих же умов, але відносно контролю (4 мл 4% розчину ТХА та 1 мл барій-желатинового реактиву).

Розрахунок вмісту сульфатів у сироватці крові провести за калібрувальною кривою (за показник екстинкції дослідної проби брати різницю величин екстинкції проб після та до додавання барій-желатинового реактиву) і формулою:

$$C_{\text{д.}} = C_{\text{к.}} \times 50, \text{ де}$$

$C_{\text{д.}}$ – вміст сульфатів у дослідній пробі (мг%);

$C_{\text{к.}}$ – вміст сульфатів, знайдений за калібрувальною кривою;

50 – коефіцієнт перерахунку.

Визначення вмісту сульфатів у сечі. У пробірку внести 0,1 мл сечі, 1,9 мл 8% розчину ТХА, 2 мл дистильованої води, перемішати і провести визначення як вказано вище (з сироваткою крові).

Розрахунок вмісту сульфатів у сечі провести за калібрувальною кривою і формулою:

$$C_{\text{д.}} = C_{\text{к.}} \times 10 \times a, \text{ де}$$

$C_{\text{д.}}$ – вміст сульфатів у дослідній пробі (мг/добу);

$C_{\text{к.}}$ – вміст сульфатів, знайдений за калібрувальною кривою;

10 – коефіцієнт перерахунку;

a – добовий діурез.

Для побудови калібрувальної кривої необхідно приготувати серію розведень основного стандартного розчину сульфатів як вказано в таблиці та додати вказану кількість реактивів:

№ пробірки	Стандартний розчин сульфатів, мл	Дист. вода, мл	8% розчин ТХА, мл	Барій-желатиновий реактив, мл	Вміст сульфатів у пробі, мг
1.	0,2	1,8	2	1	0,192
2.	0,175	1,825	2	1	0,168
3.	0,15	1,85	2	1	0,144

4.	0,125	1,875	2	1	0,120
5.	0,1	1,9	2	1	0,096
6.	0,075	1,925	2	1	0,072
7.	0,05	1,95	2	1	0,048
8.	0,025	1,975	2	1	0,024

Визначити екстинкцію отриманих проб на ФЕК (жовтий світлофільтр, 450 нм, кювета довжиною оптичного шляху 3 мм) відносно контролю (4 мл 4% розчину ТХА і 1 мл барій-желатинового реактиву).

На основі отриманих результатів побудувати калібрувальну криву: на осі абсцис відкласти значення концентрації сульфатів, а на осі ординат – відповідні їм значення екстинкції.

У нормі вміст сульфатів у сироватці крові складає 3,4-7,75 мг%, у сечі – 1,2-4,5 г/добу.

Провести розрахунки та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Записати будову ФАФС і УДФГК, пояснити їх біологічну роль.
2. Які сполуки осаджуються з біоматеріалу за допомогою ТХА?
3. Яке діагностичне значення має визначення сульфатів?

Клінічне значення. Збільшення вмісту сульфатів у сироватці крові та зменшення їх виділення з сечею спостерігається при гострій і хронічній нирковій недостатності та супроводжується посиленням розкладом білків. Наслідком цього є звільнення сульфатів та затримка виділення їх нирковими канальцями. Рівень сульфатів у крові також є показником інтенсивності процесів катаболізму білків та екскреторної функції нирок.

10. ДОСЛІДЖЕННЯ КОМПОНЕНТНОГО СКЛАДУ М'ЯЗЕВОЇ ТКАНИНИ

М'язове волокно – це багатоядерна клітина товщиною 10-100 нм і довжиною до 12 см, в якій розрізняють оболонку – *сарколему*, плазму – *саркоплазму* і *ядро*. Саркоплазма за складом неоднорідна. В ній містяться щільніші ділянки, розміщені паралельно до осі волокна, так звані, *міофібрили* – скоротливі елементи м'язового волокна. Крім того, в саркоплазмі присутні *мітохондрії*, *мікосоми* та інші структурні елементи. В ядрі містяться *дезоксирибонуклеопроteiни*.

Вміст різних сполук у м'язовій тканині ссавців такий: вода – 70-75%, органічні речовини – 23-28%, білки – 18-20%, азотисті екстрактивні речовини – 1,0-1,7%, безазотисті екстрактивні речовини – 0,7-1,35%, ліпіди – 1,0-3,0%, неорганічні солі – 1,0-1,5%. У м'язовій тканині присутні також біологічно активні сполуки: ферменти, вітаміни, гормони, макро- і мікроелементи.

Білковий склад м'язової тканини включає саркоплазматичні (близько 42%) та міофібрилярні (55%) білки.

Білки сарколеми представлені *колагеном, еластином, ретикуліном*. Крім того, важливими компонентами сарколеми є різні групи складних білків: *глікопротеїни (муцин і мукоїди), нейрокератини і ліпопротеїни*.

До групи білків саркоплазми належать *міоген, міоальбумін, глобулін X, міоглобін і рибонуклеопроїєни*.

До міофібрилярних білків відносять *міозин, актин, актоміозин, тропоміозин і контрактин*.

Білки м'язової тканини поділяють на нерозчинні в воді і сольових розчинах та розчинні. Фракцію розчинних білків складають глобуліни. Вони входять переважно до складу саркоплазми та її дрібних органел. Міофібрилярні білки розчиняються в сольових розчинах з іонною силою більше 0,35. Білки сарколеми нерозчинні в воді і сольових розчинах.

До азотистих екстрактивних сполук, які входять до складу м'язової тканини, належать *карнозин, ансерин, карнітин, холін, креатин, креатинфосфат, АТФ, інозинова кислота, пуринові і піримідинові основи, вільні амінокислоти, сечовина*.

Безазотисті екстрактивні речовини представлені *глікогеном, мальтозою, глюкозою, піровиноградною кислотою, молочною кислотою, вітамінами і жирними кислотами*.

Крім того, в м'язовій тканині міститься велика кількість ферментів: *проїєнази (катепсини), ліпази, весь комплекс гліколітичних і окисно-відновних ферментів* та ін.

Ферментативні властивості притаманні й деяким білкам, зокрема, *актину, міозину, міогену, глобуліну X*.

Хімічний склад м'язової тканини при “дозріванні”, солінні, варінні та інших видах технологічної обробки змінюється. У ній нагромаджується велика кількість молочної кислоти і ортофосфатів, що зумовлює зниження рН до 6,0-5,0, частина водорозчинних білків переходить у нерозчинний стан. Крім того, знижується вміст глікогену, нагромаджується глюкоза, мальтоза та молочна кислота, частина нерозчинних білків переходить у розчинний стан, повільно

зростає кількість амінного азоту від 5-6 до 8-9 мг%. Внаслідок дії мікроорганізмів підвищується вміст аміаку.

РОБОТА № 1 ВИДІЛЕННЯ ГЛІКОГЕНУ З М'ЯЗІВ

Матеріал для дослідження: свіжа м'язова тканина або печінка.

Реактиви: 10% розчин ацетатної кислоти, 96° етиловий спирт, 1% розчин йоду, дистильована вода.

Обладнання: фарфорова чашка, фарфорова ступка, спиртівка (електрична плитка), штатив з пробірками, піпетки, лійка, фільтри, терези з набором різноважок.

Хід роботи

1 г подрібненої м'язової тканини (або 0,5 г печінки) внести в фарфорову чашку і додати 4 мл гарячої дистильованої води та прокип'ятити протягом 3 хв.

Вміст чашки перенести в фарфорову ступку і розтерти до отримання гомогенної маси, яку знову перенести в фарфорову чашку, прокип'ятити ще 30 хв. (по мірі викіпання рідини додавати воду). Глікоген переходить у розчин.

Для повного осадження білків рідину підкислити 5-10 краплями 10% розчину ацетатної кислоти.

Осад відокремити фільтруванням. У фільтраті визначити глікоген.

ЯКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ГЛІКОГЕНУ

Хід роботи

До 5 крапель фільтрату додати 5-10 крапель спирту, глікоген випадає в осад.

В одну пробірку внести невелику кількість осадженого глікогену, а в іншу – 5 крапель дистильованої води. В кожну пробірку додати по 1-2 краплі 1% розчину йоду. В першій пробірці йод адсорбується на колоїдних часточках глікогену і, залежно від його кількості, рідина набуває рожевого, червоного або темно-бурого забарвлення. Колір іншої пробірки зумовлений присутністю йоду (жовто-коричневий).

Пояснити результати досліду та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Чим зумовлена відмінність у забарвленні розчинів у пробірках?

2. Що є джерелом глікогену м'язів?
3. Пояснити принцип осадження глікогену спиртом.

11. ДОСЛІДЖЕННЯ КОМПОНЕНТНОГО СКЛАДУ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ

У кістковій тканині зосереджено в середньому 20-25% води і 75-80% сухого залишку, в якому понад 30% білків та 45% неорганічних сполук. Кістки складаються із **кісткової тканини**, **кісткового мозку** та **надкістя**.

До складу кісткової тканини, крім води, білків і мінеральних речовин, входить 1,5-3,0% жирів.

У процесі обробки кісткової тканини слабкими кислотами (ацетатною, розведеною хлоридною, фосфатною та ін.) мінеральні речовини розчиняються і залишаються органічні сполуки, які мають назву **остейну**. До його складу входять: вода (70%), білки (25-28%), мінеральні речовини (3%) й жири (0,2%).

Основним білком кісткової тканини є **колаген**, який складає 93% усіх білків і використовується для отримання желатини.

При прожарюванні кісткової тканини залишаються лише мінеральні сполуки, які включають, так звані, зольні елементи, переважно кальцієві солі карбонатної та фосфатної кислот, і в меншій кількості – магнієві солі фосфатної кислоти та кальцій фторид. У середньому 99% кальцію, 87% фосфору і 58% магнію, що є в організмі, містяться у кістковій тканині.

Зольні елементи В складі кісткової тканини містяться у таких кількостях: CaO – 52%, MgO – 1,2%, P₂O₅ – 50,3%, Na₂O – 1,1%, K₂O – 0,2%, Cl – 0,1%, Fe – 0,1%, CO₂ – 5%.

РОБОТА № 1 ВИЗНАЧЕННЯ МІНЕРАЛЬНОГО СКЛАДУ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ

Матеріал для дослідження: добре очищені від м'яких тканин, виварені й подрібнені кістки.

Реактиви: 5% розчин хлоридної кислоти.

Обладнання: фарфоровий тигель, муфельна піч.

Хід роботи

Подрібнені кістки витримати кілька днів у 5% розчині хлоридної кислоти. Витяжку використати для визначення іонів Fe³⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ і фосфатної кислоти (див. роботу № 1).

Залишок розділити на дві частини.

Одну частину подрібнених кісток обережно прогріти в тиглі до обвуглення та прожарити в муфельній печі до утворення золи. Органічна частина кісткової тканини згорає, а мінеральна залишається у вигляді зольних елементів.

Пояснити результати досліду та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Який хімічний склад кісткової тканини?
2. Що являє собою колаген?
3. Назвати зольні елементи, що входять до складу кісткової тканини.

РОБОТА № 2 ДОСЛІДЖЕННЯ ОРГАНІЧНОЇ ЧАСТИНИ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ

Матеріал для дослідження: залишок після сольової екстракції кісткової тканини.

Реактиви: біуретовий реактив, концентрована нітратна кислота, 10% розчин натрій гідроксиду, дистильована вода.

Обладнання: термостійка колба, водяна баня, штатив з пробірками, мірний посуд.

Хід роботи

Частину залишку подрібненої кістки, після сольової екстракції, добре промити водою, щоб видалити хлоридну кислоту, та витримати на водяній бані протягом 1 год.

Желатину, яка утворилася виявити за специфічними реакціями (біуретовою і ксантопротеїною).

Пояснити результати досліду та зробити висновок.

Дати відповіді на запитання

1. Який білок переходить у розчин після сольової екстракції?
2. Що являє собою желатина?
3. Чому желатина з біуретовим реактивом утворює червоно-фіолетове забарвлення?

ДОДАТКИ

Додаток 1.

Значення pK_a іонізованих груп деяких амінокислот

№ п/п	Амінокислоти	pK_1 – COO^-	pK_2 – NH_3^+	pK_R
1.	Гліцин	2,34	9,60	
2.	Аланін	2,34	9,69	
3.	Лейцин	2,36	9,60	
4.	Ізолейцин	2,36	9,68	
5.	Серин	2,21	9,15	
6.	Треонін	2,63	10,43	
7.	Глутамін	2,17	9,13	
8.	Аспарагінова к-та	2,19	9,82	3,86
9.	Глутамінова к-та	2,19	9,67	4,25
10.	Аспарагін	2,02	8,80	
11.	Глутамін	2,17	9,13	
12.	Гістидин	1,82	9,67	6,00
13.	Цистеїн	1,71	9,17	6,00
14.	Тирозин	2,20	9,11	10,07
15.	Лізін	2,18	8,95	10,53
16.	Треонін	2,71	9,62	
17.	Тирозин	2,20	9,11	10,07 (-OH)
18.	Триптофан	2,38	9,39	
19.	Аргінін	2,17	9,04	12,48

pK_1 – константа іонізації $COOH$ -груп;

pK_2 – константа іонізації NH_2 -груп;

$pI = 1/2 (pK_1 + pK_2)$.

Додаток 2.

Значення pH , що відповідає ізоелектричній точці деяких білків

Фібриноген	8,0	Альбумін яєчного білка	4,9
Гемоглобін	6,7	Альбумін сироватки крові	4,88
Міоген	6-6,57	Казеїн	4,7
Міоглобін	5,2	Міозин	4,6-5,2
Желатина	4,9	Муцин	2,7
Пепсин	1,1		

Додаток 3.

ДЕЯКІ ФІЗИЧНІ КОНСТАНТИ АМІНОКИСЛОТ

№ п/п	Амінокислота	Температура розкладу	Розчинність у воді		pI
			25°C	100°C	
1.	Гліцин	292	24,99	67,17	5,97
2.	Аланін	297	16,65	37,30	6,01
3.	Валін	315	8,85	18,80	5,96
4.	Лейцин	337	2,43	5,64	5,98
5.	Ізолейцин	284	4,12	8,26	6,02
6.	Серин	228	5,00	32,20	5,68
7.	Цистеїн	178			
8.	Метіонін	283	3,50	13,6	5,74
9.	Пролін	222	16,23	23,9	6,30
10.	Лізін	224			9,82
11.	Аргінін	238			10,76
12.	Аспарагінова к-та	270	0,50	6,9	2,77
13.	Глутамінова к-та	249	0,86	14,00	3,24
14.	Аспарагін	236	2,98	55,10	5,41
15.	Глутамін	185	3,6		5,65
16.	Фенілаланін	284	2,96	9,90	5,48
17.	Треонін	253	20,5		6,16
18.	Тирозин	344	0,045	0,56	5,66
19.	Триптофан	282	1,14	4,99	5,89

Додаток 4.

Оптимальні значення pH, характерні для дії деяких ферментів

Фермент	Значення pH	Фермент	Значення pH
Пепсин	1,5-2,2	Амілаза солоду	4,4-4,5
Трипсин	7,0-7,8	Ліпаза (насіння рицини)	4,7-5,0
Уреаза	7,0	Сахараза (дріжджова)	4,6-5,0
Аргіназа	9,5-9,9	Мальтаза (дріжджова)	6,7-7,2
Амілаза слини	6,8	Каталаза	7,0

ВСТАНОВЛЕННЯ КОЕФІЦІЄНТУ ПОПРАВКИ ДО ТИТРУ (коефіцієнту нормальності розчину 2,6- дихлорфеноліндофенолу).

Коефіцієнт поправки встановлюють за титруванням 0,01н розчином солі Мора. Для цього в колбу на 100 мл внести 10 мл розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу, додати 5 мл насиченого розчину амоній оксалату і титрувати із мікробюретки 0,01н розчином солі Мора до різкої зміни синього забарвлення на солом'яно-жовте. Якщо зміна забарвлення проходить поступово або утворюється бурувато-коричневе забарвлення – це свідчить про непридатність розчину індофенолу.

Розрахунок коефіцієнту нормальності розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу проводити за формулою:

$$K = \frac{a \cdot v}{c}, \text{ де}$$

K – коефіцієнт нормальності розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу;
 a – кількість мілілітрів 0,01н розчину солі Мора, використаних на титрування 10 мл розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу;
 v – кількість мілілітрів 0,01н розчину калій перманганату, використаних на титрування 10 мл 0,01н розчину солі Мора;
 c – кількість мілілітрів 0,01н розчину калій перманганату, використаних на титрування 10 мл 0,01н розчину амоній оксалату.

Розрахунок: Нехай на титрування 10 мл 2,6-дихлорфеноліндофенолу використано 0,98 мл розчину солі Мора, на титрування 10 мл солі Мора – 11,2 мл розчину калій перманганату, а на титрування 10 мл 0,01н розчину амоній оксалату – 11 мл розчину калій перманганату, то титр розчину індофенолу потрібно розраховувати з коефіцієнтом, рівним:

$$\frac{0,98 \cdot 11,2}{11} \approx 0,99782$$

Розчин 2,6-дихлорфеноліндофенолу нестійкий, тому його слід готувати в невеликих кількостях і зберігати в темній склянці з притертою пробкою. Термін зберігання приготовленого розчину 7 днів.

При зберіганні титр розчину змінюється, тому його слід перевіряти щодня перед проведенням визначення.

Додаток 6.

**Градувальна таблиця для визначення аміноного азоту
(ФЕК, кювета з довжиною оптичного шляху 5 мм, зелений
світлофільтр)**

Екстинкція	мкг	мг%	Екстинкція	мкг	мг%
0,005	6,30	1,26	0,255	18,48	3,70
0,010	6,58	1,32	0,260	18,76	3,75
0,015	6,79	1,36	0,265	18,97	3,79
0,020	7,00	1,40	0,270	19,18	3,84
0,025	7,28	1,46	0,275	19,39	3,88
0,030	7,49	1,50	0,280	19,67	3,93
0,035	7,77	1,55	0,285	19,88	3,98
0,040	7,98	1,60	0,290	20,16	4,03
0,045	8,26	1,65	0,295	20,37	4,07
0,050	8,54	1,71	0,300	20,65	4,13
0,055	8,75	1,75	0,305	20,86	4,17
0,060	8,96	1,79	0,310	21,14	4,23
0,065	9,24	1,85	0,315	21,35	4,27
0,070	9,52	1,90	0,320	21,56	4,31
0,075	9,73	1,95	0,325	21,84	4,37
0,080	9,94	1,99	0,330	22,12	4,42
0,085	10,22	2,04	0,335	22,33	4,47
0,090	10,43	2,09	0,340	22,61	4,52
0,095	10,71	2,14	0,345	22,82	4,56
0,100	10,92	2,18	0,350	23,10	4,62
0,105	11,20	2,24	0,355	23,31	4,66
0,110	11,41	2,28	0,360	23,52	4,70
0,115	11,69	2,34	0,365	23,80	4,76
0,120	11,90	2,38	0,370	24,08	4,82
0,125	12,18	2,44	0,375	24,29	4,86
0,130	12,39	2,48	0,380	24,50	4,90
0,135	12,60	2,52	0,385	24,78	4,96
0,140	12,88	2,58	0,390	25,06	5,01
0,145	13,09	2,62	0,395	25,27	5,05
0,150	13,37	2,67	0,400	25,48	5,10
0,155	13,65	2,73	0,405	25,76	5,15
0,160	13,86	2,77	0,410	26,04	5,21
0,165	14,07	2,81	0,415	26,25	5,25

0,170	14,28	2,86	0,420	26,;6	5,29
0,175	14,56	2,91	0,425	26,70	5,34
0,180	14,84	2,97	0,430	27,02	5,40
0,185	15,05	3,01	0,435	27,23	5,45
0,190	15,26	3,05	0,440	27,44	5,49
0,195	15,54	3,11	0,445	27,65	5,53
0,200	15,82	3,16	0,450	27,93	5,59
0,205	16,03	3,21	0,455	28,14	5,63
0,210	16,24	3,25	0,460	28,42	5,68
0,215	16,52	3,30	0,465	28,70	5,74
0,220	16,73	3,35	0,470	28,91	5,78
0,225	17,01	3,40	0,475	29,12	5,82
0,230	17,22	3,44	0,480	29,40	5,88
0,235	17,50	3,50	0,485	29,68	5,94
0,240	17,78	3,56	0,490	29,89	5,98
0,245	17,99	3,60	0,495	30,10	6,02
0,250	18,20	3,64	0,500	30,38	6,08

Додаток 7.

**Таблиця для визначення вмісту цукру у крові
за методом Хагедорна-Ієнсена**

Кількість гіпосуль- фіту, мл	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
0,0	0,385	0,382	0,379	0,376	0,374	0,370	0,367	0,364	0,316	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	0,007	0,005	0,003	0,002

Додаток 8.

Біохімічні показники крові, сироватки та плазми

Показник	Досліджуваний матеріал	Значення у традиційних одиницях	Коефіцієнт перерахунку	Значення в одиницях СІ
Адреналін	плазма	0,35-0,62 мкг/л		1,91-2,46 мМоль/л
Азот загальний				0,87 мМоль/л
Азот - аміний - аміаку - залишковий	сироватка кров плазма кров	2-4,3 мг% 20-25 мг% 10-30 мг% 20-40 мг%	0,714	14,3-25,0 мМоль/л 17,85-35,7 мМоль/л 7,14-21,42 мкМоль/л 14,28-28,56 мМоль/л
Альбумін	сироватка крові	3,0-5,0 г%	10	30-50 г/л
Аміак	кров	0,05 мг%		7,14-21,42 мкМоль/л
Амінокислоти	кров	50 мг%		21,4 мМоль/л
Ацетон	кров	0-3 мг%		0-516,5 мкМоль/л
Білірубін - прямий - непрямий - загальний	сироватка	0,05-0,25 мг% 0,1-1,0 мг% 0,1-1,2 мг%	17,104	0,86-4,3 мкМоль/л 1,7-17,1 мкМоль/л 1,7-20,5 мкМоль/л
Білок загальний	сироватка крові	6,5-8,5 г%	10	65-85 г/л
Галактоза	сироватка	2-17 мг%	55,5	111-943,5 мкМоль/л
Гаптоглобін	сироватка	0,28-1,9 г/л		
Гемоглобін	кров плазма	♂ 12,5-17,5 г% ♀ 11,5-15,5 г% 0,2-2,5 мг%	10	♂ 125-175 г/л ♀ 115-155 г/л 2-25 мг/л
Глікоген	кров	1,62-3,87 мг%	10	16,2-38,7 мг/л
Глобуліни	сироватка	2,3-3,5 г%	10	23-35 г/л
Глюкоза	сироватка	60-100 мг%	0,055	3,32-5,55 мМоль/л
Глюкозамін	сироватка	61-78 мг%	0,056	3,4-4,36 мМоль/л
Глюкуронова кислота	сироватка	1,2-1,3 мг%	51,5	61,8-66,96 мкМоль/л
Жирні кислоти	сироватка	190-420 мг%		9-16 мМоль/л
Жовчні кислоти	сироватка	0-3 мг%		0-76,4 мкМоль/л
Індикан	сироватка	0,22-0,8 мг%		0,88-3,20 мкМоль/л
Кетонові тіла	кров	1-3 мг%	10	10-30 мг/л

17-кетостероїди	плазма	25-125 мкг%	0,0344	0,86-4,31 мкМоль/л
Креатин	сироватка, плазма	♂ 0,2-0,6 мг% ♀ 0,6-1,0 мг%	76,25	♂ 15,25-45,75 мкМоль/л ♀ 45,25-76,25 мкМоль/л
Креатинін	сироватка, плазма	♂ 0,7-1,1 мг% ♀ 0,6-0,9 мг%	88,3	♂ 62-97 мкМоль/л ♀ 53-80 мкМоль/л
Лецитин	сироватка	0,75-1,2 г/л		
Ліпіди загальні	сироватка	300-800 мг%	0,01	3-8 г/л
α-ліпопротеїни	плазма	♂ 125-425 мг% ♀ 250-650 мг%	0,01	♂ 1,25-4,25 г/л ♀ 2,5-6,5 г/л
β-ліпопротеїни	плазма	300-450 мг%	0,01	3,0-4,5 г/л
Молочна кислота	кров - артеріальна - венозна	3-7 мг% 5-20 мг%		11,0-22 мкМоль/л 13,4-24,4 мкМоль/л
Норадреналін	плазма	0,65-0,81 мкг%	59	38,42-47,79 нМоль/л
β-оксимасляна кислота	кров	0,14-1,9 мг%	96	13,4-182,4 мкМоль/л
Піровиноградна кислота	кров	0,3-0,9 мг%	113,56	34,07-102,2 мкМоль/л
Серомукоїди	сироватка	0,22-0,28 г/л		
Серотонін	кров	5,0-30,0 мкг%		0,3-1,7 мкМоль/л
Сечова кислота	сироватка	♂ 45-82 мг/л ♀ 30-65 мг/л	0,0059	♂ 0,27-0,48 мМоль/л ♀ 0,18-0,38 мМоль/л
Сечовина	сироватка	0,15-0,50 мг%	16,65	2,50-8,33 мМоль/л
Сіалові кислоти	сироватка	55-79 мг%		2,0-2,36 мМоль/л
Соматотропін	сироватка	10 мг%		0,47 нМоль/л
Трансферин	сироватка	170-400 мг%	0,113	19,3-45,4 мкМоль/л
Тригліцериди	сироватка, плазма	50-150 мг%	0,0118	0,59-1,77 мМоль/л
Фосфоліпіди	сироватка	1,5-3,6 г/л	0,3229	0,48-1,16 мМоль/л
Фруктоза	кров	0,1-0,5 мг%	55,5	5,55-27,75 мкМоль/л
Фукоза	сироватка	6,7-9,8 мг%		
Холестерин	сироватка	130-250 мг%	0,026	3,38-6,5 мМоль/л
Церулоплазмін	сироватка	23-50 мг%	0,066	1,52-3,31 мкМоль/л
<i>Вітаміни</i>				
A	сироватка	15-60 мкг%		0,52-2,1 мкМоль/л
B ₁	плазма	1,0-1,5 мкг%		0,03-0,045 мкМоль/л
B ₂	кров	12 мкг%		0,033 мкМоль/л
B ₆	сироватка	1,0-18 мкг%		0,059-1,06 мкМоль/л
B ₁₂	кров	0,06-0,14 мкг%		0,44-1,03 нМоль/л

С	сироватка	0,6-1,6 мкг%		34,1-90,8 мМоль/л
<i>Ферменти</i>				
Аланінаміно-трансфераза	сироватка або плазма	5-30 у.о.		0,1-0,68 мМоль/год.л
Амілаза	кров	16-64 у.о.		12-32 г/год.л
Аспартатамі-нотрансфераза	сироватка або плазма	8-40 у.о.		0,1-0,45 мМоль/год.л
Каталаза	кров	10-15 у.о.		
Лактатдегід-рогеназа	сироватка	13,3-66,7 О/л		0,2-1,1 мккат/л або 0,8-4 мМоль/год.л
Ліпаза	сироватка	14-26 у.о.		
Фосфатаза кисла	сироватка	0-0,7 МЕ/л		0,05-0,13 мМоль/год.л
Фосфатаза лужна	сироватка	2-4 у.о. або 54-137 О/л		0,5-1,3 мМоль/год.л
Холінестераза	сироватка			160-340 мМоль/год.л
<i>Йони</i>				
Калій	сироватка плазма	17,5-22,5 мг% 13,6-20,8 мг%	0,25	4,38-5,63 мМоль/л 3,4-5,3 мМоль/л
Кальцій	сироватка	9-12 мг%	0,25	2,3-3,0 мМоль/л
Купрум	сироватка	♂ 70-140 мкг% ♀ 85-155 мкг%	0,157	♂ 11,0-22,0 мкМоль/л ♀ 13,4-24,4 мкМоль/л
Літій	сироватка			0,5-1,5 мМоль/л
Магній	сироватка	1,6-2,9 мг%	0,47	0,75-1,36 мМоль/л
Натрій	сироватка	290-310 мг%	0,45	130-150 мМоль/л
Сульфати	сироватка	3,4-7,75 мг%		
Ферум	сироватка	♂ 65-175 мкг% ♀ 54-160 мкг%	0,185	♂ 12-32 мкМоль/л ♀ 10-28 мкМоль/л
Фосфат неорганічний	сироватка	2-4 мг%		1,2-2,2 мМоль/л
Хлор	сироватка	340-390 мг%	0,288	98-112 мМоль/л
Цинк	сироватка	0,2-0,5 мг%	1,65	0,33-0,8 мМоль/л

♀ - жінки

♂ - чоловіки

Додаток 9.

Біохімічні показники сечі

Показник	Значення у традиційних одиницях	Значення в одиницях СІ
Адреналін	3-15 мкг/добу	16,4-81,9 мМоль/добу
Азот - загальний	6-17 г/добу	428,3-1213,6 мМоль/добу
- амінний	0,1-0,42 г/добу	7,139-29,99 мМоль/добу
- аміаку	0,5-1 г/добу	35,7-71,4 мМоль/добу
Аміак		10-107 мМоль/добу
Амілаза	16-64 од.	20-160 г/год.л
Амінокислоти	1 г/добу	1 г/добу
Ацетон	негативна	негативна
Білок загальний	25-75 мг/добу	
Вітамін В ₂	300-1000 мкг/добу	
Вітамін С	20-30 мг/добу	113,6-170,3 мкМоль/добу
Індикан	10-12 мг/добу	46,99-56,39 мкМоль/добу
Калій	1,5-3,2 г/добу	38,4-81,8 мкМоль/добу
Кальцій	0,1-0,25 г/добу	2,5-6,25 мМоль/добу
Кетонові тіла	50 мг/добу	861 мкМоль/добу
17-кетостероїди		♂ 42-47 мкМоль/добу ♀ 34-39 мкМоль/добу
Креатинін	0,5-2,0 г/добу	4,4-17,7 мМоль/добу
Купрум	6-100 мкг/добу	94,4-1573,3 нМоль/добу
Магній	6-8,5 мг%/добу	3-4,25 мМоль/добу
Натрій	130,5-261 мг%/добу	130,5-261 мМоль/добу
Норадреналін	10-40 мкг/добу	59-256,4 нМоль/добу
ПВК	10-25 мг%	113,7-283,9 мкМоль/добу
Серотонін		0,5-1,2 мкМоль/добу
Сечова кислота	270-600 мг/добу	1,6-3,54 мМоль/добу
Сечовина	20-35 г/добу	333,0-582,8 мМоль/добу
Сіалові кислоти	♂ 84-89 мг%/добу ♀ 79-85 мг%/добу	
Сульфати	1,2-4,5 г/добу	
Уробіліноген	0-6 мг/добу	
Уроглікопротеїни	♂ 154-163 мг/добу ♀ 137,5-145,1 мг/добу	
Уропесин	150-300 у.о.	
Фосфат неорганічний	0,9-1,3 г/добу	10-30 мМоль/добу
Хлор		170-210 мМоль/л

ПРИГОТУВАННЯ РЕАКТИВІВ

Аміачний буфер, рН...10,0: 1 г амоній хлориду розчинити в 5-10 мл бідистильованої води, додати 5 мл 25% розчину аміаку і загальний об'єм суміші довести бідистильованою водою до 1 л.

3М аміачний буфер, рН...8: змішати 100 мл розчину А та 2 мл розчину Б. Зберігати в посуді з притертою пробкою в холодильнику.

Розчин А: 16,04 г амоній хлориду розчинити в невеликій кількості води і загальний об'єм розчину довести дистильованою водою до 100 мл.

Розчин Б: 90,8 мл 25,7% розчину аміаку ($\rho = 0,905$) довести до 200 мл дистильованою водою.

Аміачний розчин аргентуму: до 5% розчину аргентум нітрату по краплях додавати розчин аміаку доти, доки не розчиниться сірий осад.

Анілінова суміш: змішати 15 частин аніліну і 1 частину концентрованої хлоридної кислоти.

Дифеніламіновий реактив: 1 г дифеніламіну розчинити в 100 мл суміші із 95 частин концентрованої ацетатної кислоти і 5 частин концентрованої сульфатної кислоти.

Інкубаційна суміш (фосфорилююче окиснення): змішати 0,1 мл 1,5М розчину калій хлориду, 0,2 мл фосфатного буферного розчину (рН...7,4), 0,1 мл 0,5М розчину магній хлориду і 0,6 мл 0,25М розчину сахарози. Потім до цієї суміші додати 0,02 мл розчину АДФ (45 мг АДФ розчинити в 1 мл дистильованої води чи фосфатного буферного розчину (рН...7,4). Зберігати в замороженому стані). Суміш готувати перед використанням.

Молібденовий реактив для визначення фосфорної кислоти: 7,5 г молібдату амонію розчинити в 100 мл води і додати 100 мл концентрованої нітратної кислоти.

Окиснювальний розчин: 2,5 г натрій перйодату розчинити в 200-300 мл дистильованої води і загальний об'єм розчину довести водою до 500 мл. Стабільний при зберіганні в холодильнику.

Основний стандартний розчин рибофлавіну: 100 мкг рибофлавіну в 1 мл – 10 мг рибофлавіну при нагріванні розчинити в 100 мл дистильованої води

Препарат сахарози: 0,5 г висушених дріжджів добре розтерти в фарфоровій ступці, а потім гомогенізувати з 5 мл дистильованої води.

Препарат уреаз: 1 г соєвого борошна або подрібненого гарбузового насіння внести в колбу, додати 4 мл 0,1н розчину хлоридної кислоти, 42 мл води і 10 крапель толуолу. Перемішати та залишити на ніч, після чого профільтрувати.

Реактив ацетатно-сульфатнокислий: змішати 95 частин концентрованої ацетатної кислоти і 5 частин концентрованої сульфатної кислоти.

Реактив біуретовий: у колбу на 1 л внести 1,5 г купрум сульфату і 6,0 г калій натрій тартрату та розчинити в невеликій кількості води. Далі додати 300 мл 10% розчину натрій гідроксиду і 0,1 г калій йодиду. Після перемішування загальний об'єм суміші довести дистильованою водою до 1 л.

Реактив біуретовий: 4,5 г сегнетової солі ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$) розчинити в 40 мл 0,2н розчину натрій гідроксиду. Після розчинення додати 1,5 г купрум сульфату ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) і 0,5 г калій йодиду (KI) та довести до 100 мл 0,2н розчином натрій гідроксиду. Зберігати в темному місці (або в посуді із темного скла). Реактив придатний близько місяця.

Реактив біуретовий робочий розчин: 20 мл біуретового реактиву змішати з 80 мл розчину калій йодиду (0,5 г калій йодиду розчинити у 100 мл 0,2н розчину натрій гідроксиду. Зберігати в посуді з темного скла не більше двох тижнів).

Реактив дифеніламіновий: 1 г дифеніламіну розчинити в суміші 2,75 мл концентрованої сульфатної кислоти і 100 мл концентрованої ацетатної кислоти.

Реактив ензимо-хромогенний: в мірну колбу на 100 мл внести 80-90 мл ацетатного буферного розчину (pH...4,8), додати 2 мг глюкозооксидази, 1 мг пероксидази та перемішати до розчинення. Після цього додати 1 мл 1% розчину о-толідину в абсолютному спирті і загальний об'єм розчину довести ацетатним буфером до позначки. Зберігати в посуді з темного скла при температурі 8-10 °C. Реактив придатний протягом 3-4 тижнів.

Реактив кольоровий: до 30 мл робочого розчину ферум (III) хлориду додати 20 мл дистильованої води, 1 мл водного розчину діацетил-монооксиму (25 г/л., розчин стійкий) та 0,25 мл водного розчину тіосемикарбазиду (2,5 г/л або 3,2 г/л тіосемикарбазид хлорид). Обидва розчини стійкі тривалий час якщо зберігати в темному посуді при кімнатній температурі. Реактив готувати безпосередньо перед використанням.

Реактив Мілона: 40 г ртуті розчинити у 60 мл концентрованої нітратної кислоти при кімнатній температурі. Далі розчин

помістити на теплу водяну баню до припинення виділення бурих парів і перемішати. Після додати 120 мл води та перемішати. Потім одержаний розчин розвести водою у співвідношенні 1:1.

Реактив НАДІ: змішати в рівних об'ємах 1% спиртовий розчин α -нафтолу, 1% водний розчин диметилпарафенілендіаміну і 1,5% розчин натрій карбонату. Реактив готувати безпосередньо перед використанням, забарвлення повинно бути темно-коричневе і без рожевого відтінку.

Реактив Несслера: 10 г калій йодиду (KJ) розчинити в 15 мл води, додати 15 г йоду (J_2), ретельно перемішати і додати 80 мл 50% розчину натрій гідроксиду. Перемішати та загальний об'єм розчину довести дистильованою водою до 500 мл. Залишити на добу, після чого профільтрувати через скляну вату.

Реактив нітритно-молібденовий: 5 г натрій нітриту і 5 г натрій молібдату розчинити в 50 мл дистильованої води.

Реактив о-толуїдиновий: 0,15 г тіосечовини розчинити в 94 мл концентрованої ацетатної кислоти і змішати з 6 мл безкольорового або ледь жовтого (!) ортотолуїдину (очищеного шляхом перегонки). Реактив стійкий. Зберігати в холодильнику.

Реактив сульфатнокислий: суміш з 6 об'ємів сульфатної кислоти та 1 об'єму води.

Реактив Фелінга: змішати рівні об'єми реактиву Фелінга I і II. I. 40 г купрум сульфату розчинити в 1 л дистильованої води. II. 200 г калій натрій тартрату розчинити при нагріванні в невеликій кількості води. Додати 150 г натрій гідроксиду і загальний об'єм суміші довести дистильованою водою до 1 л.

Реактив Фоліна (для визначення адреналіну): 100 г х.ч. натрій вольфрамату і 25 г натрій молібдату розчинити в 700 мл дистильованої води в колбі на 1,5 л і при постійному помішуванні додати в нього 50 мл ортофосфорної кислоти (850 г/л) та 100 мл концентрованої хлоридної кислоти. Після цього колбу закрити оберненим холодильником і вміст колби кип'ятити протягом 10 год. Під кінець нагрівання додати 150 г літій сульфату, 50 мл води і кілька крапель бром (1-2 краплі). Якщо бром буде в надлишку, то для його видалення розчин необхідно прокип'ятити протягом 10-15 хв. з колби Ерленмейєра суміш перелити в мірну колбу на 1 л і загальний об'єм суміші довести дистильованою водою до 1 л.

Реактив Фоліна (визначення білка): у круглодонну колбу об'ємом 300-500 мл внести 20 г натрій вольфрамату ($Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$), 5 г натрій молібдату ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) і розчинити у 140 мл води. До розчину додати 10 мл 85% ортофосфатної кислоти і 20 мл

концентрованої хлоридної кислоти. Суміш прокип'ятити в колбі із зворотним холодильником протягом 10 год. Після цього в колбу додати 30 г літій сульфату, 10 мл води, кілька крапель бромів і прокип'ятити 15 хв. під витяжною шафою для виділення надлишку бромів. Розчин охолодити, загальний об'єм довести дистильованою водою до 200 мл і профільтрувати. Утворений жовтий розчин зберігати в посуді з темного скла. Перед використанням розвести у два рази.

Реактив Фоліна (визначення сечової кислоти): 100 г х.ч. натрій вольфрамату розчинити в 750 мл дистильованої води в колбі Ерленмейєра і при постійному помішуванні розчину в нього додати 80 мл ортофосфатної кислоти (850 г/л). Після цього вміст колби прокип'ятити протягом 4-6 год. до знебарвлення розчину. Якщо суміш не знебарвлюється, в колбу необхідно додати кілька краплин бромів (1-2 краплі). Якщо бром буде в надлишку, то для його видалення розчин необхідно прокип'ятити протягом 10-15 хв. Отриманий розчин необхідно перенести в мірну колбу на 1 л і загальний об'єм суміші довести дистильованою водою до позначки. Реактив стійкий при зберіганні.

Розчин амоній сульфату стандартний основний (для визначення залишкового азоту крові): 0,4716 г амоній сульфату (х.ч.), висушеного до сталої маси, розчинити в 1 л дистильованої води (1 мл розчину містить 0,1 мг азоту).

Розчин ацетилацетону: 1 мл ацетилацетону розчинити в 50 мл 0,5н розчину натрій карбонату. Використовувати свіжоприготовленим.

Розчин білків сироватки крові стандартний (100 г/л): 1 г альбуміну розчинити в 6-7 мл ізотонічного розчину натрій хлориду і довести ним до об'єму 10 мл. Для повного розчинення білка вміст пробірки необхідно витримати при кімнатній температурі протягом 30 хв. Оскільки піноутворення прискорює руйнування білка, то з метою запобігання цьому можна внести 1-2 краплі окислового спирту чи медичного (диетилового) ефіру, які знижують поверхневий натяг. 1 мл стандартного розчину містить 0,1 г білка.

Розчин глюкози стандартний робочий (5,55 мМоль/л): 100 мг глюкози розчинити у 100 мл 0,2% розчину бензойної кислоти. Зберігати в холодильнику.

Розчин 2,4-динітрофенілгідразину: 19,8 мг 2,4-ДНФГ розчинити в невеликій кількості 1н розчину хлоридної кислоти при нагріванні на водяній бані. Після охолодження загальний об'єм довести 1н розчином хлоридної кислоти до 100 мл. На наступний день реактив

профільтрувати. Розчин зберігати в посуді з темного скла. Реактив придатний протягом року.

0,001н розчин 2,6-дихлорфеноліндофенолу (реактив Тільманса): 250 мг 2,6-дихлорфеноліндофенолу розчинити в 700 мл води і додати 300 мл фосфатної буферної суміші (рН 6,9-7,0)

Розчин для відмивання: 8 г калій метабісульфіту і 10 мл концентрованої хлоридної кислоти розчинити в 1 л дистильованої води. Розчин готувати безпосередньо перед використанням.

Розчин креатиніну стандартний основний (100 мг% або 8,8 мМоль/л): 100 мг креатиніну розчинити в 100 мл 0,1н розчину хлоридної кислоти. Зберігати в холодильнику в посуді з притертою пробкою.

Розчин креатиніну стандартний робочий (1 мг% або 88 мкМоль/л): основний стандартний розчин розвести дистильованою водою у 100 разів. Розчин нестійкий.

Розчин Люголя: 60 г калій йодиду розчинити в невеликій кількості води, додати 20 г металічного йоду і загальний об'єм розчину довести дистильованою водою до 1 л.

Розчин натрій пірувату стандартний основний (50 мг%): 50 мг ПВК або 62,5 мг кристалічного натрій пірувату розчинити в невеликій кількості дистильованої води і загальний об'єм довести дистильованою водою до 100 мл (1 мл розчину містить 0,5 мг ПВК). Робочий стандартний розчин (5 мг%) готувати розведенням основного в 10 разів. В 1 мл робочого розчину міститься 50 мкг ПВК.

Розчин натрій пірувату стандартний робочий (5 мг%): точну наважку 5 мг натрій пірувату кількісно перенести в мірну колбу та загальний об'єм довести дистильованою водою до 100 мл.

Розчин ПВК стандартний основний (200 мг/л): 200 мг ПВК розчинити в 1 л води, що відповідає 250 мг/л натрій пірувату (88 мг ПВК відповідає 110 мг натрій пірувату).

Розчин потрійний хлор-цинк-йодний: 50 г цинк сульфату і 250 г натрій хлориду внести в мірну колбу на 1 л, розчинити в невеликому об'ємі води. Загальний об'єм довести дистильованою водою до позначки. Перед використанням в невеликому об'ємі розчину розчинити 2,5 г калій йодиду і загальний об'єм довести цим же розчином до 100 мл.

0,01н розчин солі Мора: в колбу на 1 л внести 3,92 г солі Мора і розчинити у 100 мл дистильованої води, потім довести водою до позначки. Для більшої стійкості на 1 л розчину додати 0,5 мл концентрованої сульфатної кислоти. У кислому середовищі розчин

солі Мора зберігає свій титр протягом 1-2 місяців. Титр солі Мора встановлювати за титруванням 0,01н розчином калій перманганату. Для цього в конічну колбу на 100 мл внести 10 мл розчину солі Мора, додати 1,5 мл розчину сульфатної кислоти (1:2 за об'ємом) і титрувати до появи слабо-рожевого забарвлення.

Розчин сечової кислоти стандартний (200 мг/л): 100 мг сечової кислоти внести в мірну колбу на 500 мл, додати 25 мл розчину літій карбонату (5 г/л), 25 мл дистильованої води та після розчинення сечової кислоти загальний об'єм довести дистильованою водою до 500 мл, попередньо додавши 12,5 мл формаліну (консервант). Зберігати в холодильнику протягом місяця.

Розчин сечової кислоти стандартний робочий (20 мг/л): основний стандартний розчин розвести дистильованою водою в 10 разів. Цей розчин нестійкий і може зберігатися лише протягом 2-3 діб. В 1 мл розчину міститься 0,02 мг сечової кислоти.

Розчин солі Мора основний: 0,7032 г солі Мора розчинити в 1 л бідистильованої води, підкисленої 1 мл фіксанальної сульфатної кислоти. В 1 мл розчину міститься 100 мкг феруму.

Розчин солі Мора робочий: в колбу на 100 мл внести 5 мл основного розчину солі Мора і загальний об'єм довести 0,005н розчином хлоридної кислоти до позначки. В 1 мл розчину міститься 5 мкг феруму.

0,5н розчин калій біхромату (визначення креатиніну): 24,54 г калій біхромату розчинити в невеликому об'ємі води і в мірній колбі довести водою до 1л.

0,25M розчин кальцій хлориду: в колбу внести 9,7 мл 100 г/л розчину безводного кальцій хлориду і загальний об'єм довести дистильованою водою до 350 мл.

0,45M розчин натрій лактату: в колбу на 100 мл внести 5 мл 80% розчину молочної кислоти та нейтралізувати її 2н розчином натрій гідроксиду до слабо рожевого забарвлення (за присутності фенолфталеїну). Загальний об'єм довести дистильованою водою до позначки.

0,03M розчин натрій пірофосфату, рН...8,8: в колбу на 500 мл внести 6,69 г $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 50 мл дистильованої води. Суміш ретельно перемішати та встановити рН розчину 8,8 за допомогою 1н розчину хлоридної кислоти. Загальний об'єм суміші довести водою до позначки. Реактив стійкий протягом місяця при зберіганні в холодильнику.

0,7М розчин сульфатної кислоти: до невеликої кількості дистильованої води додати 3,7 мл концентрованої сульфатної кислоти, перемішати та після охолодження загальний об'єм довести дистильованою водою до 100 мл.

1,8М розчин хлорної кислоти: вказана концентрація хлорної кислоти відповідає вмісту 18,084 г її в 100 мл розчину. На основі цього і ґрунтується розрахунок. Якщо використовується розчин хлорної кислоти концентрації 578,1 г/кг, це означає, що у 100 г його міститься 57,81 г чистої кислоти. За пропорцією знаходимо кількість (у г) хлорної кислоти:

$57,81 - 100$, а $18,084 - x$, тоді $x = 18,084 \times 100 / 57,81 = 31,28$

Отже, 18,084 г чистої кислоти міститься в 31,28 г її розчину. Щоб перевести одиниці масового співвідношення (г/кг) в одиниці концентрації (г/л), необхідно знайти густину кислоти цієї концентрації, яка складає 1,51 г/мл. Враховуючи це, встановити об'єм кислоти: $31,28 / 1,51 = 20,7$ мл. Тобто, для приготування 1,8 Моль/л розчину хлорної кислоти з вихідного розчину (578,1 г/кг) необхідно взяти 20,7 мл розчину хлорної кислоти і загальний об'єм довести дистильованою водою до 100 мл. Зберігати в холодильнику, краще в морозилці.

0,04н розчин ацетатної кислоти: 0,23 мл концентрованої ацетатної кислоти розвести у 100 мл води.

0,1н розчин ацетатної кислоти: 2,84 мл концентрованої ацетатної кислоти розчинити в 500 мл дистильованої води.

0,005н розчин калій гексаціаноферату (III) (лужний): 1,65 г калій гексаціаноферату (III) розчинити в невеликій кількості води, додати 10,6 г безводного натрій карбонату і загальний об'єм довести дистильованою водою до 1 л. Розчин зберігати в посуді з темного скла.

9н розчин натрій гідроксиду: 36 г натрій гідроксиду розчинити в невеликій кількості води і загальний об'єм довести дистильованою водою до 100 мл.

0,005н розчин натрій гіпосульфїту ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). 5 мл 0,1н розчину натрій гіпосульфїту довести дистильованою водою до 100 мл. Вихідний 0,1н розчин краще готувати з фіксаналу. При його відсутності 2,4819 г кристалічного натрій гіпосульфїту розчинити в невеликій кількості води і довести водою до 100 мл.

0,005н розчин хлоридної кислоти: до 5 мл 0,1н розчину хлоридної кислоти додати 95 мл бідистильованої води.

2,5% розчин амоній молібдату в 5н розчині сульфатної кислоти: 25 г амоній молібдату розчинити в 450 мл дистильованої води і

після розчинення загальний об'єм розчину довести до 500 мл. В мірну колбу з 350 мл води обережно додати 139 мл сульфатної кислоти. Після охолодження в цю ж колбу додати приготовлений розчин амоній молібдату, перемішати і загальний об'єм довести дистильованою водою до позначки. Якщо на дні утворюється осад, розчин непридатний до використання.

0,2% розчин бензойної кислоти (2 г/л): 0,2 г кристалічної бензойної кислоти розчинити при нагріванні в невеликій кількості води. Після охолодження загальний об'єм довести дистильованою водою до 100 мл.

2% розчин *n*-диметиламінобензальдегіду: 4 г *n*-диметиламінобензальдегіду розчинити у 200 мл розчину, який містить 50 мл дистильованої води і 150 мл концентрованої ацетатної кислоти.

0,1% розчин 2,4-динітрофенілгідразину: до 100 мг 2,4-ДНФГ поступово додати 100 мл 2н розчину хлоридної кислоти (10 мл концентрованої хлоридної кислоти довести дистильованою водою до загального об'єму 100 мл) до його повного розчинення. Розчин профільтрувати і зберігати в холодильнику. Якщо 2,4-ДНФГ погано розчиняється, його слід залишити на добу, після чого ретельно перемішати та нагріти під струменем гарячої води.

5% розчин натрій бісульфіту: 5 г натрій бісульфіту розчинити у 100 мл дистильованої води. Розчин стабільний при зберіганні протягом 1 місяця при кімнатній температурі.

1% розчин крохмалю (визначення цукру за методом Хагедорна-Йенсена): до 1 г розчинного крохмалю додати 100 мл насиченого розчину натрій хлориду і при постійному помішуванні довести до кипіння. При помутнінні непридатний.

1,2% розчин пікринової кислоти: 1,4-1,5 г пікринової кислоти розчинити в 100 мл гарячої (70-80 °С) дистильованої води (суміш нагрівати на водяній бані). Залишити на добу при кімнатній температурі (для осадження надлишку пікринової кислоти), після чого профільтрувати. Розчин повинен бути прозорим. Зберігати в посуді з темного скла.

2% розчин пікринової кислоти: 2 г пікринової кислоти розчинити у 100 мл гарячої (70-80 °С) дистильованої води (суміш нагрівати на водяній бані). Розчин залишити на добу при кімнатній температурі (для осадження надлишку пікринової кислоти), після чого профільтрувати. Пікринова кислота – сильна отрута, тому поводитися з нею необхідно дуже обережно.

18% розчин хлоридної кислоти: концентровану хлоридну кислоту з густиною 1,19 розвести дистильованою водою у співвідношенні 1:1.

0,5% розчин *n*-фенілендіамін хлориду: 5 г *n*-фенілендіамін хлориду розчинити в 1 л води. Зберігати в холодильнику в посуді з темного скла.

0,5% розчин *n*-фенілендіаміну в ацетатному буфері (pH...5,2): 5 г *n*-фенілендіаміну розчинити в 1 л ацетатного буферу (20 мл кислоти та 163 г натрій ацетату розчинити в 1 л дистильованої води).

20% розчин формальдегіду свіжонеутралізований: до 50 мл формаліну додати 1 мл 0,05% водно-спиртового розчину (1:1) фенолфталеїну і 0,2н розчин натрій гідроксиду до блідо-рожевого забарвлення. Готувати перед використанням.

Стандартний розчин адреналіну: в колбу на 25 мл внести 1 мл 0,1% аптечного розчину адреналіну і довести водою до позначки. 1 мл стандартного розчину містить 0,04 мг адреналіну.

Суміш Блура: змішати 3 частини етилового спирту і 1 частину диетилового ефіру.

Суміш розчинів купрум і плюмбум ацетату та натрій нітриту: 7,5 г купрум ацетату і 2 г плюмбум ацетату розчинити у 150 мл дистильованої води при нагріванні до 100 °С, після чого профільтрувати. У 20 мл отриманого розчину розчинити 0,25 мг натрій нітриту.

Формольна суміш: до 50 мл 40% розчину формальдегіду додати 10 краплин 0,1% розчину фенолфталеїну і по краплях 0,1н розчин калій або натрій гідроксиду до утворення слабкого рожевого забарвлення.

Фосфатний буфер з pH 7,4: змішати 81 мл 0,2 Моль/л розчину динатрій гідрогенфосфату і 19 мл 0,2 Моль/л розчину натрій дигідрогенфосфату. Загальний об'єм розчину довести дистильованою водою до 200 мл.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Біологічна хімія : Лабораторний практикум / [Під заг. ред. Я.І. Гонського]. – Тернопіль : Укрмедкнига, 2001. – 288 с.
2. Биологическая химия : Практикум / [Под общ. ред. Ю.В. Хмелевского]. – К. : Вища школа, 1985. – 208 с.
3. Біологічна хімія: тести та ситуаційні задачі : навч. посібник / Т.І. Бондарчук, Н.М., Гринчишин, Л.І. Кобилінська та ін.; за ред. О.Я. Склярова. – К. : Медицина, 2010. – 360 с.
4. Биохимические методы исследования в клинике : Справочник / [Под ред. А.А. Покровського]. – М. : Медицина, 1969. – 652 с.
5. Біохімія : Практикум / М.Є. Кучеренко, В.М. Войцицький, Ю.Д. Бабенюк, В.І. Гаврилей. – К. : Либідь, 1995. – 152 с.
6. Біохімія : тестовий контроль / М.Є. Кучеренко, О.Ю. Пашенко, І.М. Турянця та ін. – К. : Либідь, 1995. – 339 с.
7. Биохимия : Краткий курс с упражнениями и задачами / [Под ред. чл.-корр. РАН, проф. Е.С. Северина, проф. А.Я. Николаева]. – М. : ГЭОТАР-МЕД, 2001. – 448 с.
8. Вороніна Л.М. Біологічна хімія / Л.М. Вороніна, В.Ф. Десенко, Н.М. Мадієвська та ін. – Харків : Основа, 2000. – 607 с.
9. Виноградова Р.П. Біологічна хімія : Практикум / Р.П. Виноградова, Н.Є. Кучеренко, А.Р. Литвиненко та ін. – К. : Вища школа, 1977. – 384 с.
10. Воронина Л.Н. Руководство к лабораторным и семинарским занятиям по биологической химии / Л.Н. Воронина, В.Ф. Десенко, В.Н. Кравченко и др. – Харьков: Основа, 1996. – 430 с.
11. Гарбарець Б.О. Практикум з медичної біохімії : навч. посібник / Б.О. Гарбарець, І.Ю. Висоцький, А.А. Качанова. – К. : [б.в.], 1998. – 415 с.
12. Гонський Я.І. Біохімія людини / Я.І. Гонський, Т.І. Максимчук. – Тернопіль : Укрмедкнига, 2001. – 725 с.
13. Горячковский А.М. Справочное пособие по клинической биохимии / А.М. Горячковский. – Одесса : ОКФА, 1994. - 415 с.
14. Горячковский А.М. Клиническая биохимия : Справочное пособие / А.М. Горячковский. – Одесса : Астропринт, 1998. – 608 с.
15. Губський Ю.І. Біологічна хімія / Ю.І. Губський. – Київ-Вінниця : Нова книга, 2007. – 650 с.

16. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике / В.С. Камышников. – М. : МЕДпресс-информ, 2004. – 920 с.
17. Клінічна біохімія / [За ред. О.Я. Склярова]. – К. : Здоров'я, 2002. – 298 с.
18. Тарасенко Л.М. Функціональна біохімія / Л.М. Тарасенко. – Вінниця : Нова книга, 2007. – 384 с.
19. Кушманова О.Д. Руководство к лабораторным занятиям по биологической химии / О.Д. Кушманова, Г.М. Ивченко. – [3-е изд., перераб. и доп.]. – М. : Медицина, 1983. – 272 с.
20. Маршал В. Дж. Клиническая биохимия / В. Дж. Маршал. – М. : БИНОМ, 1999. – 368 с.
21. Назаренко Г.И. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований / Г.И. Назаренко, А.А. Кишкун. – М. : Медицина, 2000. – 540 с.
22. Остапеч М.Г. Практикум з біохімії / М.Г. Остапеч, Н.М. Романська – К. : Вища школа, 1974. – 256 с.
23. Пустовалова Л.М. Практикум по биохимии / Л.М. Пустовалова. – Ростов-на-Дону : Феникс, 1999. – 540 с.
24. Филипович Ю.Б. Практикум по общей биохимии. / Ю.Б. Филипович, Т.А. Егорова, Г.А. Севастьянова; под ред. Ю.Б. Филлиповича. – М. : Просвещение, 1982. – 311 с.
25. Чиркин А.А. Практикум по биохимии / А.А. Чиркин. – Мн. : Новое знание, 2002. – 512 с.

ЗМІСТ

Передмова	3
Правила роботи в біохімічній лабораторії.....	4
Абревіатурні скорочення.....	6
Список рекомендованої літератури.....	7
Розділ I. Статична біохімія	
Лабораторно-практичне заняття № 1. Фізико-хімічні властивості білків та амінокислот.....	8
Лабораторно-практичне заняття № 2. Дослідження складу і властивостей складних білків.....	29
Теоретичний практикум № 3. Структурна організація білків.....	36
Лабораторно-практичне заняття № 4. Вивчення складу та властивостей нуклеїнових кислот.....	39
Лабораторно-практичне заняття № 5. Вивчення властивостей ферментів	60
Лабораторно-практичне заняття № 6. Вітаміни: будова, властивості, біологічна роль.	70
Лабораторно-практичне заняття № 7. Гормони: якісні реакції та кількісне визначення.....	93
Теми, винесені на самостійне опрацювання	
Тема: 1. Склад, будова та властивості цукридів	109
Тема 2. Склад, будова і властивості ліпідів.....	113
Розділ II. Динамічна біохімія	
Лабораторно-практичне заняття № 1. Обмін речовин і енергії. Біологічне окиснення.....	117
Лабораторно-практичне заняття № 2. Обмін білків.	125
Лабораторно-практичне заняття № 3. Обмін нуклеїнових кислот.	142
Лабораторно-практичне заняття № 4. Обмін вуглеводів.....	155
Лабораторно-практичне заняття № 5. Обмін ліпідів.....	180
Лабораторно-практичне заняття № 6. Водно-мінеральний обмін.....	208
Додатки.....	255
Список	274

Навчально-методичне видання

Федір Федорович Боєчко
Любов Олександрівна Боєчко
Ірина Василівна Шмиголь

Лабораторний практикум з біохімії

Навчально-методичний посібник
для студентів ВНЗ
III – IV рівня акредитації

Комп'ютерна верстка:
І.В. Шмиголь

Редагування:
Л.О. Боєчко

Підписано до друку 10.02.2015 Формат 60х84/16. Гарнітура Таймс
Папір офсет. Ум. друк. арк. 11,5 Тираж 300 пр. Зам. № 5244

Видавець і виготівник видавничий відділ
Черкаського національного університету
імені Богдана Хмельницького

Адреса: бульвар Шевченка, 81, м. Черкаси, Україна, 18031
Тел. (0472) 37-13-16, факс (0472) 37-22-33,
e-mail: vydav@cdu.edu.ua, <http://www.cdu.edu.ua>

Свідцтво про внесення до державного реєстру
суб'єктів видавничої справи ДК № 3427 від 17.03.2009 р.