

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
Рівненський державний гуманітарний університет

## БІОХІМІЯ

Лабораторний практикум  
Для здобувачів вищої освіти першого  
(бакалаврського) рівня зі спеціальностей 091  
«Біологія» та 014 «Середня освіта (Біологія)» за  
освітньо-професійними програмами «Біологія» та  
Середня освіта (Біологія)»

Рівне, 2021

УДК 577.1(076.5)  
ББК Е 072 р

**Біохімія:** Лабораторний практикум. Навч. - метод.  
посібник / уклад.: В.В. Демчук Рівне: РДГУ, 2021. 92с.

Рецензенти:

В.О. Володимирець, к.б.н, доцент кафедри агрохімії, ґрунтознавства та землеробства НУВГП

Л.В. Ойцюсь, к.б.н., доцент кафедри біології, здоров'я людини та фізичної терапії РДГУ.

Затверджено кафедрою природничих наук за методиками навчання.  
Протокол № 1 від 31 серпня 2020 р.

Наведено методики виконання лабораторних робіт з курсу «Біохімія» та коротке теоретичне обґрунтування кожного дослідження. Містить контрольні питання з теорії та практичної частини.

Для студентів спеціальностей 091 «Біологія» та 014 «Середня освіта (Біологія)».

Рекомендовано до руко навчально-методичною комісією психолого - природничого факультету Рівненського державного гуманітарного університету Протокол № 1 від 16 лютого 2021 р.

## ВСТУП

Основною метою лабораторного практикуму з біохімії є ознайомлення студентів із сучасними методами біохімічних досліджень, закріплення теоретичних знань студентів та формування практичних умінь і навичок на основі застосування досягнень біохімічної науки.

Практикум містить методiku та порядок виконання лабораторних робіт. Під час виконання запропонованих дослідів студенти опановують біохімічні методи експериментальних досліджень, набувають уміння аналізувати отримані результати. Окремий розділ присвячений правилам техніки безпеки під час роботи у біохімічній лабораторії. Наведено список використаної під час підготовки практикуму літератури.

До практикуму ввійшли лабораторні роботи з основних розділів біохімії: вуглеводи, ліпіди, нуклеїнові кислоти, білки, ферменти, вітаміни. Структура практикуму відповідає затвердженій робочій навчальній програмі дисципліни «Біохімія». Перший модуль «Біохімічні компоненти клітини» містить п'ять лабораторних робіт з виявлення амінокислот білків, вуглеводів, ліпідів, вітамінів та їх хімічних властивостей. До другого модуля «Ферменти та метаболічні шляхи. Енергетичний метаболізм» включено чотири роботи, що демонструють участь ензимів у хімічних реакціях, характерних для живих організмів, доводять наявність основних метаболічних шляхів енергетичного метаболізму, зокрема циклу трикарбонних кислот та дихального ланцюга. Четвертий модуль «Метаболізм основних класів біомолекул» складається з трьох лабораторних робіт, які підтверджують метаболічні перетворення амінокислот, вуглеводів, властивості ліпідів. У п'ятому модулі виконується одна лабораторна робота з виявлення гормонів у досліджуваних об'єктах. У лабораторних роботах викладено принцип методу, наведено необхідні структурні формули та реакції, основні матеріали, реактиви та обладнання, подано порядок виконання роботи, запропоновано контрольні запитання, що потребують не лише запам'ятовування, але й аналітичного мислення від виконавців, допомагають пояснити отримані результати, що має важливе значення для підготовки студентів до самостійного виконання наукових робіт.

## **ЗАХОДИ БЕЗПЕКИ ПІД ЧАС ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ**

1. У біохімічній лабораторії повинні бути в наявності протипожежні засоби (вогнегасник, пісок, вода), аптечка для надання першої медичної допомоги та засоби особистого захисту (гумові рукавички, захисні окуляри та ін).

2. У лабораторії заборонено вживати їжу, палити.

3. Працювати слід у спецодязі (халатах). Під час роботи з великими об'ємами концентрованих кислот та їх наливання доцільно додатково використовувати захисні окуляри.

4. Після роботи з реактивами слід вимити руки, а після роботи з токсичними сполуками – вимити руки, почистити зуби, промити ротову порожнину, змінити одяг.

5. Усі реактиви повинні бути у зразковому стані відповідно до вимог зберігання.

6. Отруйні та вибухонебезпечні речовини слід зберігати у сейфі.

7. Під час роботи з реактивами не можна торкатися обличчя, очей та відкритих ділянок шкіри.

8. Роботи, пов'язані з виділенням газів, потрібно проводити лише під витяжною шафою.

9. Заборонено пробувати реактиви на смак, вдихати леткі речовини – вони можуть бути отруйними.

10. Відбирати розчини потрібно лише піпетками, використовуючи спеціальні пристосування з гумовими грушами або дозатори.

11. Для приготування розчинів речовини треба відбирати шпателем, кількісно переносити їх у мірні стакани чи колби. Готові реактиви належить зберігати в закритому посуді з етикетками, на яких позначено назву, формулу сполуки, концентрацію та дату приготування.

12. Перед проведенням досліджень необхідно ретельно вивчити методику та підготувати робоче місце.

13. Перед використанням приладів слід детально ознайомитися з інструкцією.

14. Необхідно дотримуватись правил техніки безпеки під час роботи з електроприладами та обладнанням.

15. У випадку потрапляння на шкіру кислот чи лугів уражені ділянки слід негайно промити великою кількістю (струменем) води.

## Лабораторна робота 1

### ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА АМІНОКИСЛОТИ

**Мета роботи:** опанувати методи виявлення окремих амінокислот у білках та білкових гідролізатах, дослідити амінокислотний склад запропонованих білкових розчинів.

#### Основні теоретичні відомості

Амінокислоти – це гетерофункціональні сполуки, що містять у своєму складі як аміно-, так і карбоксильну групи. Амінокислоти розрізняють за кількістю цих груп (моноаміномонокарбонові, моноамінодикарбонові, діаміномонокарбонові, діамінодикарбонові) та наявністю додаткових функціональних груп (наприклад, гідроксильної, сульфгідрильної) або гетероатомів (наприклад сірки), за взаємним розміщенням аміно- і карбоксильної групи (наприклад  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -амінокислоти). Амінокислоти різняться також характером радикалів (ациклічні та циклічні, ароматичні та циклічні неароматичні, карбоциклічні та гетероциклічні) та їх полярністю – полярні (гідрофільні) та неполярні (гідрофобні). Усі амінокислоти, за винятком гліцину, який не має радикала і хірального центру, є оптично активними сполуками, тобто обертають площину поляризованого світла. Вони поділяються на амінокислоти L- та D-стереохімічних рядів, які відрізняються просторовим розміщенням замісників, напрямленням обертання площини поляризованого світла і біологічною активністю. Особливо виділяють протеїногенні амінокислоти, тобто такі, з яких побудовані білки живих організмів. Протеїногенними є L- $\alpha$ -амінокислоти. Для організмів амінокислоти можуть бути замінними та незамінними, а також частково або умовно замінними. Для кожного виду живих організмів існує свій певний набір незамінних амінокислот. Наприклад, для людини незамінними є вісім амінокислот, дві амінокислоти умовно замінні – вони обов'язкові для дітей і необов'язкові для дорослих.

Амінокислотний склад – важлива характеристика білка. Від того, які саме амінокислоти та в якій послідовності входять до складу білкової молекули (від якісного і кількісного складу), залежить просторова структура білка та його функції.

Повноцінні харчові білки за амінокислотним складом відповідають амінокислотному складу білків організму.

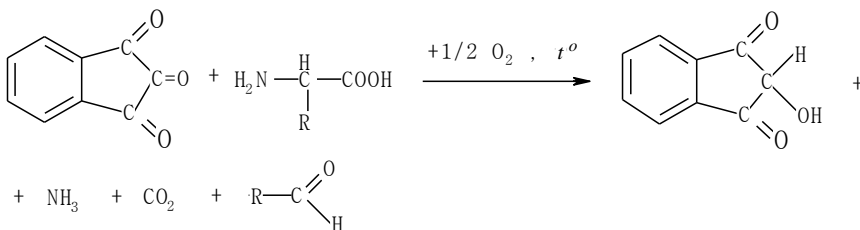
**Обладнання:** штатив із пробірками, градуйовані пробірки, піпетки, крапельниці, скляні палички, ванночка з льодом, водяна баня, пальник, годинник.

### 1.1. Нінгідринова реакція на $\alpha$ -амінокислоти

**Матеріали та реактиви:** гідролізат білка або 1 %-й розчин  $\alpha$ -амінокислоти; 0,1 М розчин нінгідрину; розчини білків 1, 2, 3, запропоновані викладачем.

#### Порядок виконання роботи

Нінгідринова реакція характерна для аміногруп, які розміщені в  $\alpha$ -положенні відносно карбоксильної групи. Під час нагрівання з нінгідрином  $\alpha$ -амінокислоти окиснюються і розпадаються на альдегід, вуглекислий газ та аміак, нінгідрин відновлюється до дикетооксигідриндену:



Виділений аміак реагує з іншою молекулою нінгідрину та з дикетооксигідринденом з утворенням сполуки, яка забарвлює розчин в інтенсивний фіолетово-синій колір.

У пробірку вносять 2–3 краплі розчину  $\alpha$ -амінокислоти (або гідролізату білка), додають 1–2 краплі 0,1 М розчину нінгідрину, злегка підігрівають і спостерігають за зміною забарвлення розчину.

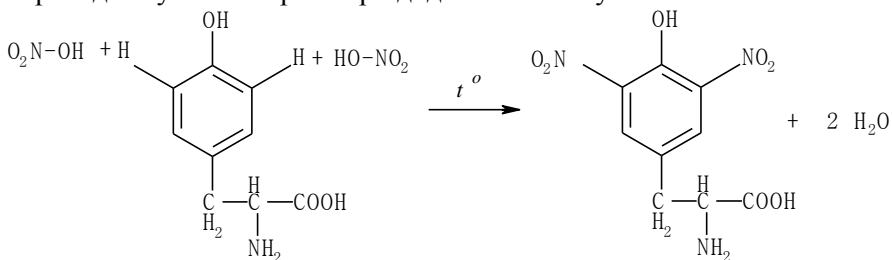
## 1.2. Ксантопротейнова реакція

**Матеріали та реактиви:** розчин тирозину (1 %-й) або білка; концентрована азотна кислота; аміак; розчини білків 1, 2, 3, запропоновані викладачем.

### Порядок виконання роботи

У пробірку вносять 1–2 краплі розчину тирозину (або білка), 2–3 краплі концентрованої азотної кислоти, нагрівають і спостерігають за зміною забарвлення розчину. Потім по одній краплі додають під час перемішування розчин аміаку до зміни забарвлення.

Ксантопротейнова реакція є характерною для ароматичних амінокислот фенілаланіну, тирозину, триптофану, бензольне кільце яких нітрується за дії концентрованої азотної кислоти з утворенням нітросполук, що забарвлюють розчин у жовтий колір; забарвлення переходить у жовтогаряче при додаванні аміаку.



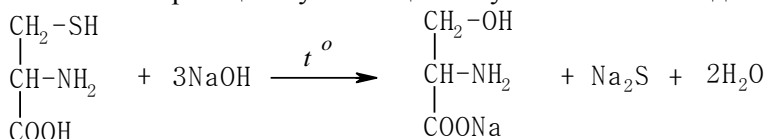
Ксантопротейнова реакція дуже чутлива, тому за її допомогою легко виявляють не лише ароматичні амінокислоти, але й білки, до складу яких вони входять.

## 1.3. Реакція Фоля на сірковмісні амінокислоти (вільні або у складі пептидів та білків)

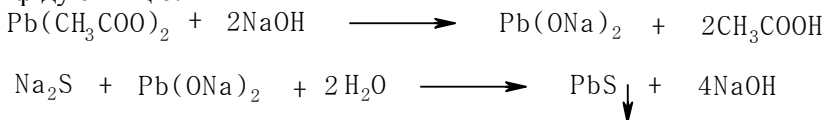
**Матеріали та реактиви:** водний 0,01 %-й розчин цистеїну; реактив Фоля (до 10 %-го розчину ацетату свинцю додають 10 %-й розчин гідроксиду натрію до розчинення утвореного осаду); концентрований розчин гідроксиду натрію; розчини білків 1, 2, 3, запропоновані викладачем.

## Порядок виконання роботи

У пробірку вносять 1 мл розчину цистеїну, 2 мл концентрованого розчину гідроксиду натрію та 1 мл реактиву Фоля. Суміш ретельно перемішують і кип'ятять на водяній бані 2 хв. Під час кип'ятіння в лужному середовищі пептидів або білків, що містять сірковмісні амінокислоти, від них легко відщеплюється сірка у вигляді сірководню, який у лужному середовищі утворює сульфід натрію. Рівняння реакції за участю цистеїну має такий вигляд:



Сульфід натрію можна виявити за допомогою іонів важких металів, наприклад свинцю, які утворюють з іонами сірки нерозчинний сульфід свинцю чорного кольору. Розчинний ацетат свинцю під час взаємодії з гідроксидом натрію утворює плумбіт натрію, який у ході реакції із сульфідом натрію утворює чорний осад сульфиду свинцю:



Через 3–5 хв випадає чорний осад сульфиду свинцю.

### 1.4. Реакція Міллона на тирозин

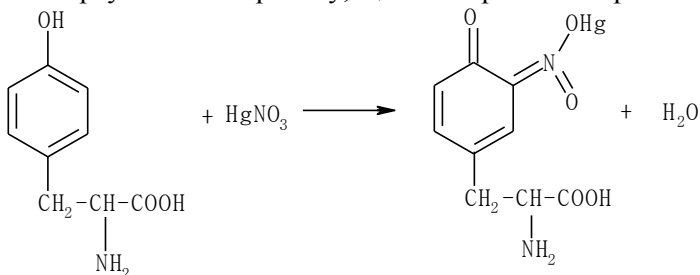
**Матеріали та реактиви:** водний 0,01 %-й розчин тирозину; реактив Міллона (40 г ртуті розчиняють у 57 мл концентрованої азотної кислоти та розводять двома об'ємами води, дають відстоятися і використовують надосадову рідину); розчини білків 1, 2, 3, запропоновані викладачем.

## Порядок виконання роботи

Фенольний гідроксил ароматичної амінокислоти тирозину бере участь у реакції з реактивом Міллона (суміш нітратів і нітритів ртуті



(I) і (II), розчинених в концентрованій азотній кислоті). При цьому утворюється ртутна сіль тирозину, що має червоне забарвлення:



До 3 мл розчину тирозину додають 1 мл розчину Міллона, ретельно перемішують. Через 10 хв розчин забарвлюється в червоний колір. Для прискорення реакції розчин можна підігріти.

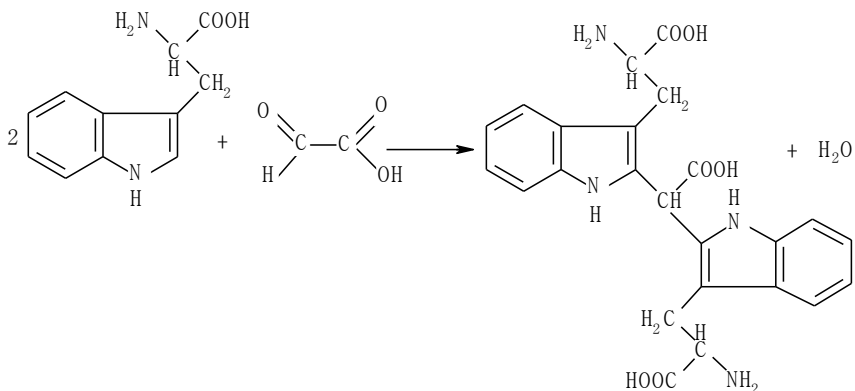
### 1.5. Реакція Адамкевича на триптофан

**Матеріали та реактиви:** водний 0,01 %-й розчин триптофану, льодяна оцтова кислота, яка завжди містить невелику кількість гліоксислової кислоти, концентрована сірчана кислота, розчини білків 1, 2, 3, запропоновані викладачем.

#### Порядок виконання роботи

До 0,5 мл розчину триптофану додають 0,5 мл льодяної оцтової кислоти, що містить гліоксислову кислоту. Одержану суміш спочатку нагрівають, потім охолоджують і по стінці пробірки обережно по краплинах додають 1 мл концентрованої сірчаної кислоти, слідкуючи, щоб рідини не змішувалися. Через 10 хв на межі поділу двох шарів утворюється червоно-фіолетове кільце.

Триптофан у кислому середовищі вступає в реакцію з гліоксисловою кислотою (альдегідами), утворюючи забарвлені в червоно-фіолетовий колір продукти конденсації:



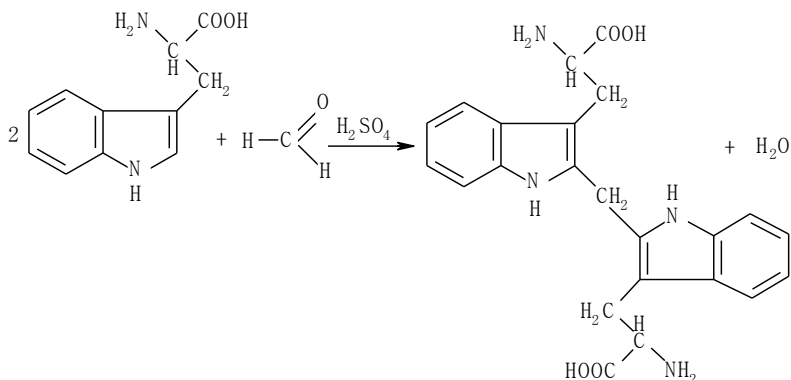
Реакцію можна прискорити нагріванням на водяній бані.

### 1.6. Реакція Вуазене на триптофан

**Матеріали та реактиви:** водний 0,01 %-й розчин триптофану, водний 2,5 %-й розчин формальдегіду, концентрована сірчана кислота, 0,5 %-й розчин нітрату натрію, розчини білків 1, 2, 3, запропоновані викладачем.

#### Порядок виконання роботи

До 2 мл розчину триптофану додають одну краплю розчину формальдегіду, суміш перемішують і вливають порціями по кілька крапель 6 мл концентрованої сірчаної кислоти, охолоджуючи пробірку у ванночці з льодом. Суміш знову перемішують і дають відстоятися 10 хв. Триптофан, конденсуючись із формальдегідом, утворює забарвлений продукт конденсації біс-2-триптофанілметан:

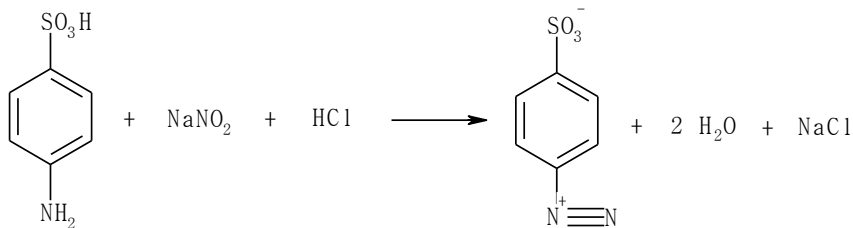


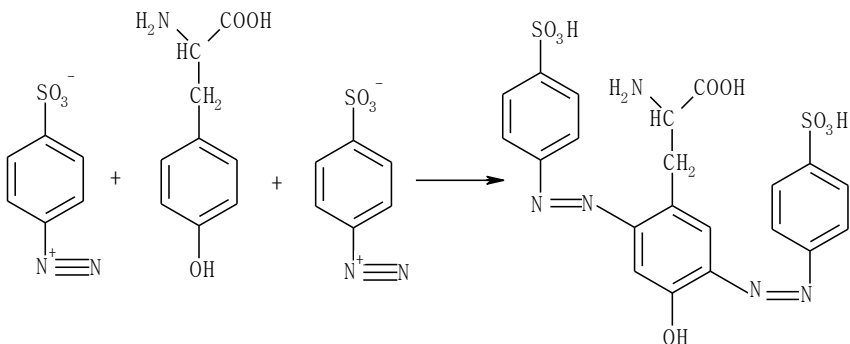
### 1.7. Реакція Паулі на гістидин і тирозин

**Матеріали та реактиви:** водний 0,01 %-й розчин гістидину, 1 %-й розчин сульфанілової кислоти в 5 %-у розчині соляної кислоти, 0,5 %-й розчин нітриту натрію, 10 %-й розчин карбонату натрію, розчини білків 1, 2, 3, запропоновані викладачем.

#### Порядок виконання роботи

До 1 мл розчину сульфанілової кислоти додають 2 мл розчину нітриту натрію, перемішують, негайно доливають 2 мл розчину гістидину, знову ретельно перемішують і додають 6 мл розчину карбонату натрію. Під час взаємодії сульфанілової кислоти з нітритом натрію (калію) в кислому середовищі відбувається реакція діазотування. Її продуктом є діазобензолсульфонова кислота, яка в реакції з гістидином (чи тирозином) утворює сполуку вишнево-червоного кольору:





Після перемішування розчин забарвлюється в червоно-вишневий колір.

### Оброблення експериментальних даних

Перевірте розчини білків 1, 2, 3 на наявність амінокислот (див. досліди 1.1 – 1.7). Побудуйте таблицю, в якій позначте, які амінокислоти містяться в кожному з досліджуваних розчинів білка.

### Контрольні запитання та завдання

1. Наведіть протеїногенні амінокислоти, напишіть їх структурні формули, позначте радикали.

2. Позначте незамінні, умовно замінні, замінні для людини амінокислоти.

3. Класифікуйте амінокислоти всіма відомими вам способами.

4. Які амінокислоти дають позитивну нінгідринову реакцію? Напишіть загальну формулу таких амінокислот.

5. Ксантопротеїнова реакція – принцип методу. Які амінокислоти можна виявити цією реакцією? Напишіть формули цих амінокислот.

6. Які амінокислоти можна виявити реакцією Фолья? Поясніть принцип цієї реакції.

7. Наведіть визначення енольного та фенольного гідроксилів, а також приклади сполук, що містять їх. Якою реакцією виявляється фенольний гідроксил тирозину?

8. Поясніть принцип якісних реакцій на триптофан.

9. Напишіть реакцію Паулі для гістидину.

10. Чи є амінокислоти хіральними сполуками? Напишіть формули амінокислот проекційними формулами Фішера.

11. Яка протеїногенна амінокислота не має радикала, а яка – аміногрупи?

**Література:** [1; 2; 4 –7].

## Лабораторна робота 2

### ЯКІСНА РЕАКЦІЯ НА ПЕПТИДИ ТА БІЛКИ. РОЗДІЛЕННЯ БІЛКІВ МЕТОДОМ ВИСОЛЮВАННЯ. ВИЗНАЧЕННЯ ОСНОВНИХ СКЛАДОВИХ КОМПОНЕНТІВ НУКЛЕОПРОТЕЇНІВ

**Мета роботи:** опанувати методи виявлення білків та пептидів у розчинах, розділення білків різної молекулярної маси, виявлення компонентів складних білків у гідролізатах.

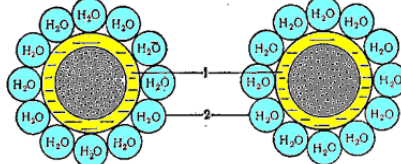
#### Основні теоретичні відомості

Білки – це біополімери, мономерами яких є амінокислоти. Білки утворюються з амінокислот в ході реакції поліконденсації, побічним продуктом є вода. Білок складається щонайменше з п'ятдесяти амінокислотних залишків, з'єднаних між собою пептидними зв'язками, що формуються за рахунок карбоксильної та аміногрупи. Пептидні зв'язки можуть бути в кето- або в енольній формах, між цими формами існує таутомерія (динамічна ізомерія).

Білки є поліпептидами. Поліпептид містить щонайменше десять амінокислотних залишків. Пептиди, які містять від двох до десяти амінокислотних залишків, називаються олігопептидами. Найменші олігопептиди – дипептиди, вони утворюються конденсацією двох амінокислот, містять один пептидний зв'язок.

Усі пептиди, крім дипептидів, у тому числі білки, дають позитивну біуретову реакцію, яка є якісною реакцією на пептидний зв'язок; у лужному середовищі за наявності сульфату міді(II) утворюють комплексні сполуки міді, забарвлені в синьо-фіолетовий колір, інтенсивність якого залежить від кількості пептидних зв'язків у молекулі білка. Уперше реакція утворення таких комплексних сполук міді була проведена з біуретом, тому її й називають біуретовою.

Білки розрізняються за молекулярною масою, яка залежить від кількості амінокислотних залишків у молекулі. Білки є гідрофільними сполуками, вони розчиняються у воді, утворюючи колоїдні розчини. Навколо білкової молекули за рахунок диполів води, певним чином орієнтованих біля полярних та заряджених груп, утворюється гідратна оболонка, що утримує макромолекулу білка в розчиненому стані. Заряд та гідратна оболонка – це фактори стабільності білкової молекули в розчині (рисунок):



**Білки в водному розчині.** 1 – колоїдні частинки білка;  
2 – гідратна оболонка

Висолювання – зворотнє осадження білків під дією водовіднімних засобів, що позбавляють білок гідратної оболонки (солей лужних, лужноземельних металів, сульфату амонію, спирту, ацетону). Білки осаджуються розчинами солей різних концентрацій. Деякі з них уже випадають в осад за концентрації сульфату амонію близько 1/10 від концентрації насичення, глобуліни – за напівнасичення, альбуміни – за повного насичення.

Білки можуть складатися лише з поліпептидного ланцюга, такі білки називають простими. Якщо до складу білка входить небілкова частина – простетична група, такий білок називають складним. При повному гідролізі складного білка в розчині можна виявити амінокислоти і складові компоненти простетичної групи. Складні білки можна класифікувати за характером простетичної групи, наприклад: ліпопротеїни, глікопротеїни, нуклеопртеїни, хромопротеїни, металопротеїни. Більшість відомих білків – складні. Різноманітні їх функції та локалізація в клітині: нуклеопртеїни – складові апарату зберігання та реалізації генетичної інформації, глікопротеїни беруть участь у передачі сигналів між клітинами, хромопротеїни переносять кисень та оксид вуглецю між тканинами, зберігають кисень у тканинах і т. ін.

Нуклеопртеїни – складні білки, простетичною групою яких є нуклеїнові кислоти. Під час гідролізу нуклеопртеїни поступово розпадаються на складові компоненти, в гідролізаті після повного

гідролізу містяться амінокислоти, азотисті основи пуринового і піримідинового ряду, пентози, фосфорна кислота.

**Обладнання:** штатив із пробірками, градуйовані піпетки, крапельниці, скляні палички, лійки, фільтрувальний папір, водяна баня.

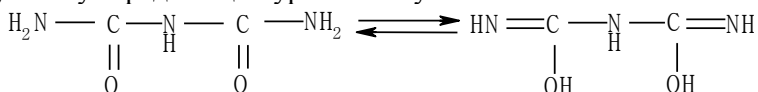
## 2.1. Біуретова реакція для виявлення пептидних зв'язків у пептидах та білках

**Матеріали та реактиви:** 1 %-й розчин яєчного білка, 10 %-й розчин гідроксиду натрію (чи калію), 1 %-й розчин сульфату міді.

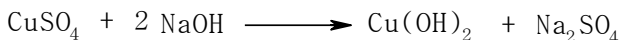
### Порядок виконання роботи

До 3 мл яєчного білка додають 1 мл розчину гідроксиду натрію, одну-дві краплі розчину сульфату міді і перемішують.

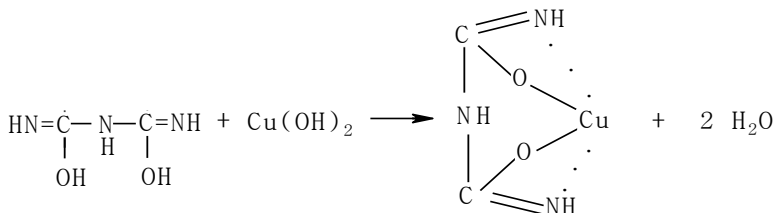
Біурет можна одержати під час нагрівання сечовини до температури 180 °С, він не є пептидом, але має два пептидні зв'язки. У лужному середовищі біурет енолізується:



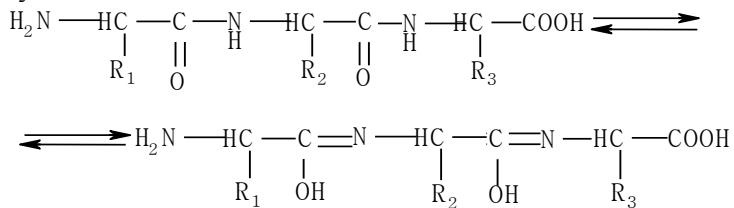
Гідроксид міді(II) для проведення біуретової реакції одержують реакцією взаємодії сульфату міді(II) із гідроксидом натрію (чи калію):



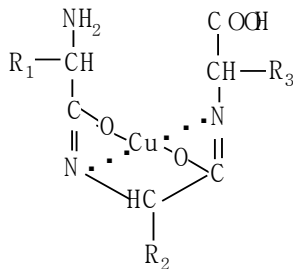
Дві молекули біурету в енольній формі взаємодіють із гідроксидом міді (II) й формують комплекс, у якому координаційні зв'язки утворені за рахунок електронних пар атомів азоту іміногруп. Комплекс біурету з міддю утворюється за такою схемою:



Подібний комплекс із міддю можуть утворювати пептиди та білки. Спочатку пептидні зв'язки в лужному середовищі енолізуються:



Найпростіший пептид, який дає позитивну біуретову реакцію, – трипептид:



Білки, що мають пептидні зв'язки в енольній формі, взаємодіють із гідроксидом міді (II) і утворюють подібні комплекси.

Уміст пробірки забарвлюється в червоно-фіолетовий колір.

## 2.2. Фракційне осадження білків методом висолювання

**Матеріали та реактиви:** розчин сироватки крові, сульфат амонію (кристалічний та насичений розчин).

### Порядок виконання роботи

У пробірку вливають 2–3 мл сироватки крові, додають такий самий об'єм насиченого розчину сульфату амонію, перемішують. В осад випадають глобуліни (50 % насичення розчину), які мають відносно велику молекулярну масу і невеликий заряд. Осад відфільтровують. До осаду на фільтрі додають невелику кількість води. В одержаному розчині містяться глобуліни, наявність яких виявляють шляхом кип'ятіння, спостерігаючи утворення осаду.



Фільтрат з розчином альбумінів розливають у дві пробірки. У першу пробірку додають кристалічний сульфат амонію до повного насичення (100 %-го насичення розчину). В осад випадають альбуміни. Уміст другої пробірки кип'ятять, спостерігають утворення осаду білків (альбумінів).

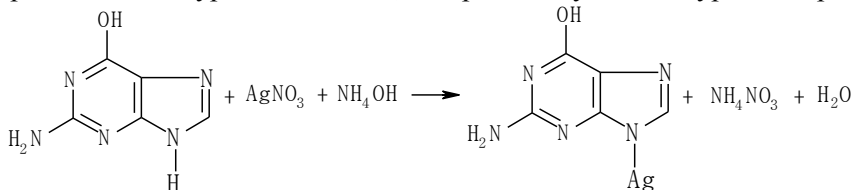
### 2.3. Виявлення основних компонентів у гідролізаті нуклеопротеїну

**Матеріали та реактиви:** гідролізат нуклеопротеїну, концентрований розчин аміаку, аміачний розчин нітрату срібла (до 5 %-го  $\text{AgNO}_3$  додають по краплях розчин аміаку до розчинення сірого осаду); концентрована сульфатна кислота, 1 %-й спиртовий розчин  $\alpha$ -нафтолу; реактив Фелінга (складається з двох розчинів: перший – 40 г сегнетової солі та 30 г гідроксиду натрію розчиняють, об'єм доводять до 200 мл; другий – 8 г перекристалізованого сульфиду міді ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) розчиняють у дистильованій воді, об'єм доводять до 200 мл; перед роботою змішують однакові об'єми першого та другого розчинів), 10 %-й  $\text{NaOH}$ , лакмус; молібденовий реактив (7,5 г молібдату амонію розчиняють у 100 мл води і додають 100 мл концентрованої нітратної кислоти).

#### Порядок виконання роботи

##### *Виявлення пуринових основ*

До 2 мл гідролізату нуклеопротеїну по краплях додають концентрований розчин аміаку (до лужної реакції на лакмус) та 0,5 мл аміачного розчину нітрату срібла. Пуринові основи унаслідок взаємодії з аміачним розчином нітрату срібла утворюють осад срібних солей пуринових основ, забарвлений у світло-бурий колір:

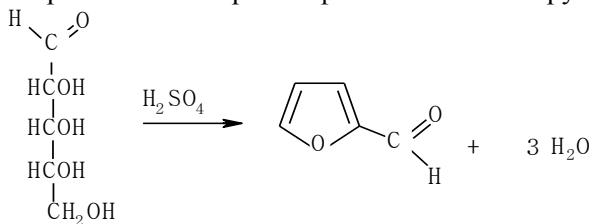


Гуанін

Спостерігають утворення осаду.

### **Виявлення пентоз за реакцією Подобедова–Моліша**

У пробірку вносять 1 мл гідролізату нуклеопротейну, додають 1 мл 1 %-го спиртового розчину  $\alpha$ -нафтолу і перемішують. Після цього обережно, не струшуючи, по стінці пробірки додають 1 мл концентрованої сульфатної кислоти. Під час взаємодії концентрованої сульфатної кислоти з пентозами вони дегідратуються з утворенням фурфуролу, який з тимолом або  $\alpha$ -нафтолом за наявності концентрованої сульфатної кислоти утворює продукти конденсації червоного або червоно-фіолетового кольору:



Пентоза (D-рибоза)

Фурфурол

Спостерігають появу забарвлення.

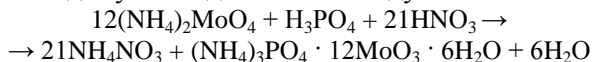
### **Виявлення пентоз за реакцією Фелінга**

У пробірку вносять 1 мл гідролізату нуклеопротейну і нейтралізують 10 %-м розчином натрій гідроксиду (за наявності лакмусу) та додають такий самий об'єм реактиву Фелінга. Уміст пробірок перемішують і нагрівають. Реакція ґрунтується на здатності пентоз під час нагрівання в лужному середовищі окиснюватися, відновлюючи блакитний купрум(II) гідроксид до жовтого купрум(I) гідроксиду з наступним утворенням осаду купрум(I) оксиду цегляно-червоного кольору.

Спостерігають появу забарвлення.

### **Виявлення фосфатної кислоти**

До 1 мл гідролізату нуклеопротейну додають такий самий об'єм молібденового реактиву. Суміш нагрівають кілька хвилин на водяній бані. Фосфатна кислота під час нагрівання з молібденовим реактивом утворює триамонійфосфомолібдат, який в результаті охолодження випадає у вигляді жовтого осаду:



Спостерігають появу забарвлення.

## ***Виявлення $\alpha$ -амінокислот нінгідриною реакцією***

(див. лабораторну роботу 1).

## **Оброблення експериментальних даних**

Наведіть схему послідовних стадій гідролізу нуклеопротейну, для кожної стадії вкажіть складові компоненти гідролізату та реакції, за допомогою яких вони виявляються. На яких стадіях можна осадити білок висолуванням? Запропонуйте метод експериментального підтвердження оборотності висолування. На якій стадії біуретова реакція стає негативною?

## **Контрольні запитання та завдання**

1. Які сполуки з пептидними зв'язками не дають позитивної біуретової реакції?
2. Напишіть таутомерні форми пептидного зв'язку.
3. Напишіть реакцію утворення трипептиду, наведіть його скорочену та повну назви.
4. Які речовини викликають оборотне осадження білків (висолування)? Поясніть механізм висолування. Назвіть фактори стабільності білкової молекули в розчині.
5. Які чинники викликають необоротне осадження білків?
6. Назвіть ознаки денатурації. Що називається ренатурацією?
7. Які рівні структурної організації має білкова молекула? Які зв'язки їх утворюють?
8. Що таке простетична група білка?
9. Як класифікуються складні білки? Назвіть основні класи складних білків, наведіть приклади.
10. Як можна розрізнити білки та пептиди в розчині?
11. Чи буде позитивною біуретова реакція в гідролізаті нуклеопротейну після повного гідролізу; після неповного гідролізу? Напишіть біуретову реакцію з трипептидом.

**Література:** [1; 2; 4-7].

## Лабораторна робота 3

### ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА МОНОСАХАРИДИ, ВІДНОВЛЮВАЛЬНІ ДИСАХАРИДИ, КРОХМАЛЬ

**Мета роботи:** опанувати методи виявлення в розчинах моносахаридів (глюкози, фруктози) та відновлювальних дисахаридів окисно-відновними реакціями; уміти виявляти крохмаль у розчинах за допомогою йод-крохмальної реакції.

#### Основні теоретичні відомості

Прості вуглеводи (моносахариди, або монози, або прості цукри) – це полігідроксиальдегіди або полігідроксикетони. Вони класифікуються на альдози та кетози залежно від наявності альдегідної або кетогрупи. Інша класифікація залежить від кількості атомів карбону (тріози, тетрози, пентози, гексози, гептози і так далі). Ці дві класифікації зручно поєднувати. Найпоширенішими моносахаридами є альдогексози, альдопентози, кетогексози. Альдозы можуть окиснюватися до відповідних кислот, одночасно відновлюючи солі металів. Ця властивість використовується для проведення якісних та кількісних реакцій для їх виявлення.

Складні вуглеводи у процесі гідролізу розпадаються на прості (прості вуглеводи не гідролізуються). Дисахариди – це найпростіші складні цукри. Вони складаються з двох моносахаридів, з'єднаних глікозидним зв'язком. Дисахариди поділяються на відновлювальні та невідновлювальні (редуючі та нередуючі). Відновлювальні дисахариди (наприклад лактоза, целобіоза чи мальтоза) можуть окиснюватися до відповідних кислот, відновлюючи солі металів. Таким чином, ці дисахариди беруть участь у реакціях, характерних для моносахаридів-альдоз. Але нередуючі дисахариди (наприклад сахароза) в подібні реакції не вступають. Для їх виявлення найчастіше використовують методи, що ґрунтуються на гідролізі дисахаридів до моносахаридів із наступним виявленням продуктів гідролізу – моносахаридів.

Полісахариди розрізняються за довжиною ланцюга, хімічною природою мономерних одиниць, що повторюються (якщо мономерні однакові, це гомополісахариди, якщо різні – гетерополісахариди),

ступенем розгалуження (нерозгалужені, або лінійні, полісахариди мають однакові зв'язки між монозами; у розгалужених полісахаридах монози з'єднані різними зв'язками). Полісахариди не містять вільних редуруючих груп, тому вони не мають відновлювальної здатності. Продуктами повного гідролізу полісахаридів за наявності кислот чи специфічних ферментів є моносахариди, які мають редуруючі властивості.

Крохмаль – основний резервний вуглевод рослин. Він складається з двох гомополісахаридів – амілози та амілопектину, мономерними ланками яких є глюкоза. Амілоза має лінійну структуру, залишки глюкози з'єднані між собою  $\alpha$ -1,4-глікозидними зв'язками. Вторинна структура амілози має вигляд спіралі, внутрішній діаметр якої відповідає розміру молекули йоду (0,5 нм). Тому за наявності молекулярного йоду в розчині він вбудовується в спіраль амілози з утворенням нестійких комплексів, що зумовлює синє забарвлення. Амілопектин має значно більшу молекулярну масу, ніж амілоза, він не дає позитивної йод-крохмальної реакції, під час нагрівання утворює клейстер. Основний тип зв'язку між залишками глюкози –  $\alpha$ -1,4-глікозидний, так само, як і в молекулі амілози. Але через кожні 25–30 моноз зв'язок між ними –  $\alpha$ -1,6-глікозидний, це місця або точки розгалуження ланцюга.

Аналог рослинного крохмалю у тварин – глікоген. Він також є гомополісахаридом. Будова глікогену нагадує будову амілопектину – залишки глюкози з'єднані між собою такими самими зв'язками, але місця розгалуження частіші – через кожні 5–6 моноз. Кінцевим продуктом гідролізу як крохмалю, так і глікогену є глюкоза.

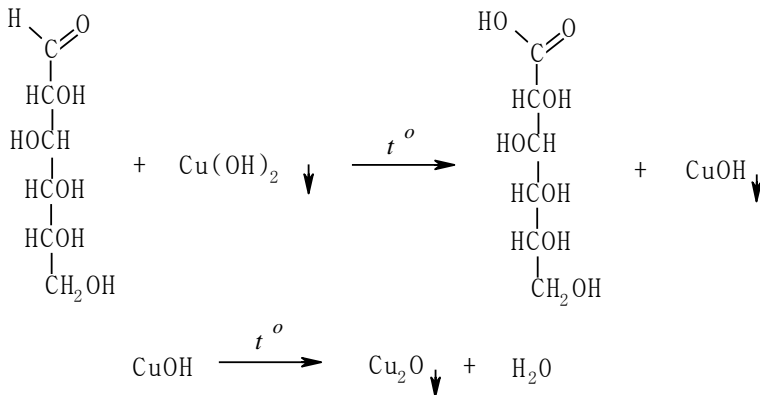
**Обладнання:** скляні палички, пробірки, піпетки градуйовані, крапельниці, штатив для пробірок, водяна баня, лабораторний термометр, лопаточка чи шпатель, годинник, пальник.

### 3.1. Реакція Троммера

**Матеріали та реактиви:** розчини глюкози, гідроксиду натрію, сульфату міді (всі 0,5 %-і).

## Порядок виконання роботи

Розчини альдоз (наприклад глюкози) у лужному середовищі відновлюють під час нагрівання оксиду міді(II) у геміоксид міді, а самі окиснюються до альдонових кислот. Реакція за участю глюкози:



У пробірку до 0,5 мл розчину гідроксиду натрію додають дві краплі розчину сульфату міді. Випадає осад гідроксиду міді(II) блакитного кольору. Додають 1 мл розчину глюкози, вміст пробірки перемішують. Осад розчиняється, а розчин набуває синього забарвлення. Під час його обережного нагрівання в полум'ї пальника до кипіння спостерігається випадіння жовтого осаду гідроксиду міді(I) або червоного осаду геміоксиду міді.

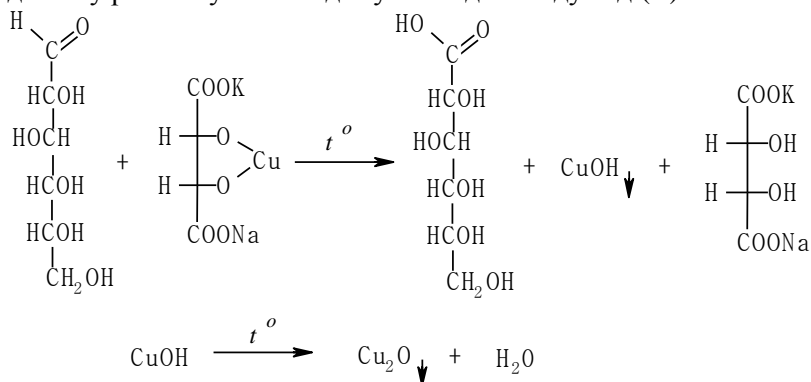
### 3.2. Реакція Фелінга

**Матеріали та реактиви:** розчин глюкози (5 %-й), реактив Фелінга (див. лабораторну роботу 2).

## Порядок виконання роботи

У пробірку додають 1 мл розчину глюкози та 1 мл реактиву Фелінга. В реактиві Фелінга іони міді(II) перебувають у вигляді комплексної сполуки з тартратами. Механізм реакції всіх редуруючих вуглеводів із реактивом Фелінга такий самий, як і в

реакції Троммера. Перевагою реактиву Фелінга є те, що мідь у разі надлишку реактиву не випадає у вигляді оксиду міді(II):



Уміст пробірки перемішують і нагрівають у полум'ї пальника до кипіння. Спостерігають утворення червоного осаду геміоксиду міді.

### 3.3. Реакція Селіванова на кетози

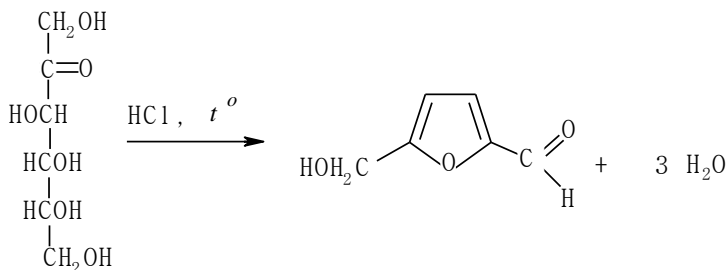
**Матеріали та реактиви:** кристалічний резорцин, 5 %-й розчин фруктози, 25 %-й розчин соляної кислоти.

#### Порядок виконання роботи

У пробірку наливають 1 мл розчину фруктози, 0,5 мл розчину соляної кислоти та додають кілька кристалів резорцину. Суміш нагрівають на водяній бані протягом 5–10 хв за температури 80 °С до появи вишнево-червоного кольору.

Під час нагрівання фруктози чи інших кетоз із соляною кислотою утворюється оксиметилфурфурол. Сполука, що утворюється під час конденсації оксиметилфурфуролу із резорцином, забарвлена у вишнево-червоний колір.

Рівняння реакції за участю фруктози має такий вигляд:



Спостерігають появу забарвлення.

### 3.4. Відновна здатність лактози та мальтози

**Матеріали та реактиви:** розчини лактози, мальтози, гідроксиду натрію, сульфату міді (всі 0,5 %-і).

#### Порядок виконання роботи

В одну пробірку наливають 2 мл розчину лактози, в іншу 2 мл розчину мальтози. В обидві пробірки потім додають по 1 мл розчину гідроксиду натрію і по п'ять крапель розчину сульфату міді. Пробірки обережно нагрівають у полум'ї пальника й спостерігають утворення червоного осаду геміоксиду міді.

Завдяки наявності вільної альдегідної групи в молекулі лактози, целобіози та мальтози ці дисахариди мають редуруючі властивості й можуть брати участь у реакціях відновлення, зокрема, дають позитивну реакцію Троммера.

### 3.5. Реакція крохмалю з йодом

**Матеріали та реактиви:** реактив Люголя (1 г йоду та 2 г йодистого калію розчиняють у 15 мл води й потім розводять водою до об'єму 300 мл); 0,1 %-й розчин крохмалю, 10 %-й розчин гідроксиду натрію чи калію.

#### Порядок виконання роботи

У пробірку наливають 2 мл розчину крохмалю, додають одну-дві краплі розчину Люголя. Уміст пробірки перемішують. Унаслідок



взаємодії крохмалю з йодом утворюється комплексна адсорбційна сполука синього кольору. Переносять 1 мл рідини в іншу пробірку, куди додають 1 мл розчину гідроксиду натрію чи калію. Спостерігають знебарвлення вмісту пробірки, що свідчить про взаємодію молекулярного йоду з лугом.

Суміш, що залишилася в пробірці, нагрівають на водяній бані. Спостерігають зникнення синього забарвлення (розчин стає жовтим через вміст йоду). Синій колір знову з'являється під час охолодження. Зникнення забарвлення внаслідок нагрівання зумовлене руйнуванням вторинної структури амілози і вивільненням йоду, з охолодженням вторинна структура відновлюється, нестійкі комплекси крохмалю з йодом також відновлюються, тому колір знову стає синім.

### **Оброблення експериментальних даних**

Побудуйте таблицю, у якій наведіть назви і формули моносахаридів та дисахаридів, класифікуйте їх. Напишіть реакції, якими вони виявляються. Схематично зобразіть вторинну структуру амілози, утворення йод-крохмального комплексу. Напишіть формули фрагментів амілози та амілопектину, назвіть зв'язки між залишками глюкози.

### **Контрольні запитання та завдання**

1. Чому осад гідроксиду міді(II) розчиняється під час перемішування з розчином глюкози? Запишіть рівняння відповідної реакції. Наявність яких функціональних груп вона підтверджує?

2. Наявність якої функціональної групи доводять позитивні реакції Толленса, Троммера, Фелінга? Напишіть ці реакції з глюкозою.

3. До яких моносахаридів належить фруктоза (за кількістю атомів карбону та наявністю функціональних груп)?

4. Що називається таутомерією, мутаротацією? Чи завжди вони є у розчинах моносахаридів та редукуючих дисахаридів?

5. Напишіть таутомерні форми моносахаридів (глюкози, галактози, маннози, фруктози, рибози, дезоксирибози) та

редуючих дисахаридів – мальтози, лактози, целобіози. Дайте їм повні назви.

6. Напишіть реакції Толленса з лактозою, Троммера з целобіозою, Фелінга з мальтозою. Назвіть продукти реакції.

7. Напишіть реакцію гідролізу сахарози, назвіть продукти реакції. Чи будуть позитивними реакції Толленса, Троммера, Фелінга з негідролізованою сахарозою, з сахарозою після гідролізу? Що називається інверсією сахарози, інвертним цукром?

8. Чи властива сахарозі таутомерія? Чи зазнає мутаротації свіжовиготовлений розчин сахарози? Чому?

9. Яку будову має крохмаль? З яких полісахаридів він складається? Який полісахарид зумовлює позитивну йод-крохмальну реакцію, а який – утворення клейстеру? Побудуйте схему утворення клатратного комплексу йоду з амілозою.

10. Яку будову має глікоген? Напишіть фрагмент молекули глікогену.

11. Яку будову має клітковина (целюлоза)? Який моносахарид є її мономерною ланкою?

12. Які сполуки називаються гетерополісахаридами? Які біологічні функції вони виконують? Наведіть приклади.

**Література:** [1; 2; 4 –7].

## **Лабораторна робота 4**

### **ВИЗНАЧЕННЯ ХІМІЧНИХ ПАРАМЕТРІВ ЖИРІВ**

**Мета роботи:** дослідити основні хімічні параметри жирів – здатність до омилення, визначити їх кислотність, ефірне число, йодне число, пероксидне число; розрахувати вміст гліцеролу в жирі; порівняти декілька жирів за хімічними параметрами.

### **Основні теоретичні відомості**

Жири або ліпіди – різноманітні за своєю будовою та функціями біоорганічні сполуки, яких об'єднує нерозчинність у полярних розчинниках (насамперед у воді) і розчинність в неполярних органічних розчинниках (ацетоні, хлороформі, діетиловому ефірі

тощо). Жири розрізняються за зовнішнім виглядом, кольором, запахом, консистенцією, а також хімічними параметрами, які є їх специфічними характеристиками.

Числом омилення (ЧО) називають кількість гідроксиду калію в 1 мг, яка потрібна для нейтралізації всіх жирних кислот (вільних і тих, що входять до складу триацилгліцеролів), що містяться в 1 г жиру.

Кислотністю жиру, або кислотним числом (КЧ), називають кількість КОН, мг, яка потрібна для нейтралізації вільних жирних кислот, що містяться в 1 г жиру.

Ефірним числом (ЕЧ) називають кількість КОН, мг, яка потрібна для нейтралізації всіх утворених під час омилення триацилгліцеролів жирних кислот, що містяться в 1 г жиру. ЕЧ визначають за різницею між ЧО жиру та його КЧ.

Йодним числом (ЙЧ) називають кількість йоду, г, яка може прореагувати зі 100 г жиру. Це число відповідає кількості подвійних зв'язків ненасичених жирних кислот у жирі.

Пероксидним числом називають кількість 0,005 М розчину  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (мл), витрачену на титрування вільного йоду, що виділився під час окиснення KI пероксидним угрупованням одного граму жиру. Також пероксидним числом називають:

- кількість грамів йоду, що виділяється з йодиду калію під впливом перекисів, які містяться в 100 г жиру;
- кількість грамів йоду, яка може прореагувати з активним воднем перекисів, які містяться в 100 г жиру;
- кількість йоду, еквівалентна кількості HI, що прореагувала за стандартних умов з перекисними або гідроперекисними угрупованнями жиру, виражена у відсотках.

**Обладнання:** колби об'ємом 50 мл, зворотний холодильник, водяна баня, ваги, піпетки, бюретки, крапельниці.

#### 4.1. Визначення числа омилення

**Матеріали та реактиви:** соняшникова або інша рослинна олія, будь-який твердий жир (наприклад, вершкове масло, маргарин, смалець), 0,1%-й спиртовий розчин фенолфталеїну, 0,5 М розчин  $\text{HC}_1$ , 0,5 М спиртовий розчин КОН (готують 10 мл 10 М водного

розчину КОН і потім розводять очищеним етанолом до необхідної концентрації, зберігають щільно закритим).

### **Порядок виконання роботи**

В одну колбу вміщують 0,5 г твердого жиру або 0,5 мл олії (досліджувана проба), у другу – 0,5 мл води (контрольна проба). В обидві колби доливають по 15 мл спиртового розчину КОН і кип'ятять зі зворотним холодильником на водяній бані протягом 50 хв до повного омилення гліцеридів і нейтралізації вільних жирних кислот, потім охолоджують до 30–40 °С. В обидві колби додають по декілька крапель розчину фенолфталеїну і титрують теплим розчином НСІ до зникнення рожевого забарвлення (до нейтральної реакції).

Кількість міліграмів КОН, витрачену на нейтралізацію всіх жирних кислот, що містяться в 1 г жиру – число омилення (ЧО) визначають за формулою

$$\text{ЧО} = (B - A) f Q / a,$$

де  $(B - A)$  – різниця результатів титрування контрольного та досліджуваного зразків 0,5 М розчином соляної кислоти, мл;  $f$  – коефіцієнт поправки на титр 0,5 М розчину НСІ (0,98);  $Q$  – кількість КОН (28,05 мг), яка еквівалентна 1 мл 0,5 М розчину КОН,  $a$  – наважка досліджуваного жиру, г.

### **4.2. Визначення кислотного числа жиру**

**Матеріали та реактиви:** соняшникова або інша рослинна олія, будь-який твердий жир (вершкове масло, маргарин, смалець), спирт, нейтралізований за фенолфталеїном, розчин КОН (0,1 М), 0,1 %-й розчин фенолфталеїну.

### **Порядок виконання роботи**

До 1 г жиру додають 5 мл спирту, нейтралізованого за фенолфталеїном, добре перемішують для максимального розчинення вільних жирних кислот і титрують розчином КОН до появи рожевого забарвлення (забарвлення не повинно зникати протягом 0,5–1 хв).

Кількість KOH, мг, витрачену на титрування вільних жирних кислот, що містяться в 1 г жиру, визначають за формулою

$$KЧ = A f Q / a,$$

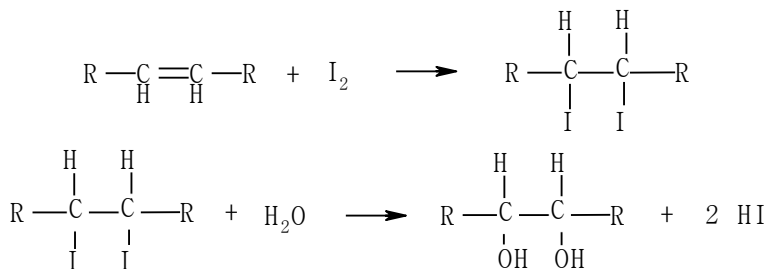
де  $A$  – об'єм 0,1 М розчину KOH, витрачений на титрування досліджуваної проби, мл;  $f$  – коефіцієнт поправки на титр 0,1 М розчину KOH (0,98);  $Q$  – кількість KOH (5,61 мг), еквівалентна 1 мл 0,1 М розчину KOH,  $a$  – наважка жиру, г.

### 4.3. Визначення йодного числа жиру

**Матеріали та реактиви:** соняшникова або інша рослинна олія, будь-який твердий жир (вершкове масло, маргарин, смалець), 0,1 М спиртовий розчин йоду, 1%-й розчин крохмалю, 0,05 М розчин  $Na_2S_2O_3$ .

#### Порядок виконання роботи

Визначення йодного числа (ЙЧ) ґрунтується на реакції приєднання йоду за місцем подвійного зв'язку, яка перебігає за рівнянням



В одну колбу (досліджувана проба) вносять наважку жиру 0,1–0,2 г, у другу (контрольна проба) – 0,1 – 0,2 мл води, додають по 10 мл спиртового розчину йоду, перемішують і залишають на 15 хв. Через 15 хв уміст колб титрують розчином  $Na_2S_2O_3$  до появи жовтуватого забарвлення. Потім, додавши 1 мл розчину крохмалю, суміш титрують до зникнення синього забарвлення.

Йодне число визначають за формулою

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

де  $(B - A)$  – різниця результатів титрування контрольного та досліджуваного зразків 0,05 М розчином гіпосульфиту натрію, мл;  $a$  – наважка досліджуваного жиру, г;  $f$  – коефіцієнт поправки на титр

0,05 М розчину  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (0,96);  $Q$  – кількість  $\text{I}_2$  (12,69 мг), еквівалентна 1 мл 0,05 М розчину  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ .

#### 4.4. Визначення пероксидного числа жиру

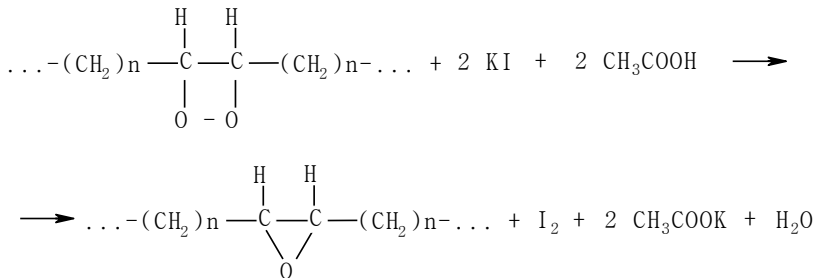
**Матеріали та реактиви:** соняшникова або інша рослинна олія, будь-який твердий жир (вершкове масло, маргарин, смалець), згірклий жир, насичений розчин  $\text{KI}$ , хлороформ, 0,005 М розчин  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , 1%-й розчин крохмалю, льодяна оцтова кислота.

#### Порядок виконання роботи

Метод ґрунтується на здатності пероксидного угруповання жиру реагувати з  $\text{KI}$  в кислому середовищі.

Реакція дуже чутлива, тому слід готувати контрольні проби, щоб уникнути помилки, спричиненої можливим утворенням йоду під час окислення  $\text{KI}$  киснем повітря.

В одну колбу (досліджувана проба) вносять наважку жиру (1 г), у другу (контрольна проба) – 1 мл води, додають по 5 мл льодяної оцтової кислоти, по 6 мл хлороформу та по 1 мл свіжоприготованого насиченого розчину  $\text{KI}$ , струшують протягом 5 хв, додають по десять крапель розчину крохмалю як індикатора і титрують розчином  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ .



Пероксидне число, тобто кількість 0,005 М розчину  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , мл, витрачена на титрування 1 г жиру, дорівнює

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

де  $(A - B)$  – різниця результатів титрування досліджуваного та контрольного зразків 0,005 М розчином  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ;  $f$  – коефіцієнт поправки на титр 0,005 М розчину  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (0,96).

## Оброблення експериментальних даних

Визначте ефірне число досліджуваних жирів.

Зважаючи на те, що для вивільнення однієї молекули гліцеролу необхідно витратити три молекули КОН, розрахуйте кількість гліцеролу в жирі (%) за формулою:

$$C = 96,02 \text{ ЕЧ } 100 / 56,11 \cdot 3 \cdot 1000,$$

де 96,02 – молекулярна маса гліцеролу; ЕЧ – ефірне число жиру, мг; 56,11 – молекулярна маса КОН, 3 – коефіцієнт перерахунку; 1000 – кількість міліграмів в 1 г.

Побудуйте таблицю, у якій вкажіть хімічні параметри досліджуваних жирів, порівняйте рослинні та тваринні жири.

## Контрольні запитання та завдання

1. Назвіть насичені, мононенасичені, поліненасичені вищі жирні кислоти. Напишіть їх структурні формули. Які вищі жирні кислоти складають вітамін F?

2. Від чого залежить консистенція жиру? Напишіть формулу рідкого жиру, реакцію утворення з нього твердого жиру.

3. Які сполуки нагромаджуються у згірклих жирах? У яких реакціях вони утворюються?

4. Для якого жиру – твердого чи рідкого – йодне число більше? Відповідь обґрунтуйте. Поясніть, чому при зберіганні жирів збільшується їх кислотне число.

5. Що таке прооксиданти та антиоксиданти? Які найважливіші природні антиоксиданти вам відомі?

6. Які ферментні системи в організмі знешкоджують перекисні сполуки?

7. Напишіть реакцію омилення триацилгліцеролу, назвіть реагенти та продукти реакції. Напишіть реакцію етерифікації між пальмітиновою, олеїною, стеариною кислотами та гліцином. За яких умов вона є оборотною? Назвіть продукт реакції.

8. Напишіть структурні формули фосфатидної кислоти, найпоширеніших фосфоацилгліцеролів – фосфатидилетаноламіну, фосфатидилхоліну. Яку біологічну роль вони виконують? Які ще фосфоацилгліцероли вам відомі?

9. Яка структура є основою холестерину? Напишіть його

формулу, загальну формулу ефірів холестеролу. Поясніть біологічну роль холестерину.

**Література:** [1; 2; 4 -7].

## **Лабораторна робота 5**

### **ВИЯВЛЕННЯ ВІТАМІНІВ У МОДЕЛЬНИХ РОЗЧИНАХ**

**Мета роботи:** опанувати методи виявлення водо- та жиророзчинних вітамінів.

#### **Основні теоретичні відомості**

Вітаміни – низькомолекулярні органічні речовини. Вони мають надходити в організм у невеликих кількостях, але відіграють значну роль у метаболізмі. Водорозчинні вітаміни не нагромаджуються в організмі, тоді як жиророзчинні можуть депонуватись, як правило, в печінці.

Водорозчинні вітаміни утворюють коферменти, що працюють разом з ферментами і є обов'язковими для перебігу певних біохімічних реакцій. Так, наприклад вітамін В<sub>1</sub> (тіамін) утворює кофермент тіаміндифосфат (тіамінпірофосфат), який бере участь у реакціях окисного декарбоксілювання  $\alpha$ -кетокислот. Вітаміни В<sub>2</sub> (рибофлавін) та В<sub>5</sub> або РР (нікотинамід) утворюють коферменти дегідрогеназ: ФАД (флавінаденіндинуклеотидфосфат) і ФМН (флавінмононуклеотид) побудовані на основі рибофлавіну (в основі його структури лежить ізоалоксазинове кільце), НАД(Ф) (нікотинамідаденіндинуклеотид(фосфат)) – на основі нікотинаміду (в основі його структури – піридинове кільце). Вітамін В<sub>6</sub> (піридоксаль і піридоксамін) є основою коферментів ПАЛФ (піридоксальфосфату) та ПАМФ (піридоксамінфосфату), які беруть участь у трансферазних реакціях. В основі його структури також лежить піридин. Вітамін С існує в окисненій та відновленій формах (аскорбінова кислота та дегідроаскорбінова кислота), бере участь в окисно-відновних реакціях, він може бути синтезованим з L-сорбози, що є кетогексозою. Усі водорозчинні вітаміни іноді об'єднують під назвою вітамінів групи В.



Жиророзчинні вітаміни не утворюють коферментів. Їх функції дуже різноманітні. Вони впливають на ріст і розмноження організмів, диференціювання тканин, побудову скелета, забезпечують цілісність біологічних мембран і можливість поділу клітин, захищають організм від крововиливів, беруть участь у сприйманні зорової інформації і т. ін. До жиророзчинних належать вітаміни А, D, E, K, F (комплекс поліненасичених вищих жирних кислот).

**Обладнання:** штатив із пробірками, крапельниці, піпетки, шпатель, термостат, водяна баня.

### **5.1. Якісні реакції на вітамін Р (рутин, вітамін проникності, цитрин)**

**Матеріали та реактиви:** рутин (порошок і насичений водний розчин), 1 %-й розчин хлориду заліза (III), концентрована сірчана кислота, 0,5 %-й розчин соляної кислоти, 10 %-й розчин гідроксиду натрію, реактив Фелінга (див. лабораторну роботу 2).

#### **Порядок виконання роботи**

##### ***Реакція рутину з хлоридом заліза(III)***

До 2 мл насиченого водного розчину рутину додають кілька крапель розчину  $\text{FeCl}_3$ . Хлорид заліза(III) утворює з рутином комплексні сполуки, забарвлені в смарагдово-зелений колір.

Спостерігають появу зеленого забарвлення.

##### ***Реакція рутину з концентрованою сірчаною кислотою***

До 2 мл насиченого водного розчину рутину обережно по стінці пробірки доливають 1 мл концентрованої сірчаної кислоти. Концентрована сірчана кислота утворює з флавонами та флавонолами, до яких належить вітамін Р, флавілієві солі, розчини яких мають яскраво-жовте забарвлення.

На межі поділу двох рідин виникає кільце жовтого кольору.

### ***Реакція рутину з реактивом Фелінга***

До 0,5 г рутину доливають 5 мл розчину соляної кислоти, кип'яять протягом 1 хв, потім фільтрують. Під час кислотного гідролізу рутину відщеплюється молекула рутинози. Потім рутиноза розкладається на глюкозу та рамнозу, які мають відновні властивості, тому можуть бути визначеними реакціями Толленса, Троммера, Фелінга. До 5 мл фільтрату додають 3 мл розчину гідроксиду натрію та 3 мл свіжовиготовленого реактиву Фелінга і знову нагрівають до кипіння.

Спостерігають утворення осаду геміоксиду міді червоного кольору.

## **5.2. Якісні реакції на вітамін С**

**Матеріали та реактиви:** розчин 2,6-дихлорфеноліндофенолу (0,1 %-й), 10 %-й розчин соляної кислоти, 0,1 %-й розчин йоду в калію йодиді, 0,01 %-й розчин метиленового синього, 10 %-й розчин  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 1 %-й розчин  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , 1 %-й розчин  $\text{FeCl}_3$ , 0,1 %-й розчин аскорбінової кислоти, витяжка із шипшини, дистильована вода.

### **Порядок виконання роботи**

#### ***Відновлення 2,6-дихлорфеноліндофенолу аскорбіновою кислотою***

У три пробірки вносять по 0,5 мл розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу, по одній-дві краплі розчину  $\text{HCl}$  і по краплях розчин аскорбінової кислоти або витяжку з шипшини (в контрольну пробірку додають 0,5 мл дистильованої води). Аскорбінова кислота здатна відновлювати 2,6-дихлорфенол-індофенол, який переходить при цьому в безбарвну лейкополуку.

Розчин 2,6-дихлорфеноліндофенолу знебарвлюється.

#### ***Відновлення метиленового синього аскорбіновою кислотою***

У три пробірки додають по одній краплі розчину метиленового синього і розчину карбонату натрію. В першу пробірку додають 5 крапель розчину аскорбінової кислоти, у другу – витяжки з шипшини, у третю – стільки ж дистильованої

води. Пробірки одночасно нагрівають за температури 37–40 °С. Аскорбінова кислота здатна відновлювати метиленовий синій, який переходить у безбарвну лейкосполуку.

У пробірках з аскорбіновою кислотою та витяжкою із шипшини рідина знебарвлюється.

#### ***Відновлення гексаціано(II) ферату калію аскорбіновою кислотою***

У три пробірки додають по одній краплі розчинів гексаціано(III) ферату калію і хлориду феруму. В одну з пробірок до утвореної зелено-бурої рідини додають 5–10 крапель розчину аскорбінової кислоти, у другу – 5–10 крапель витяжки з шипшини, у третю (контрольну) – 5–10 крапель дистильованої води. Аскорбінова кислота відновлює гексаціано(III)ферат калію до гексаціано(II) ферату калію, який, реагуючи з хлоридом феруму, утворює берлінську лазур – сполуку синього кольору.

Рідина в першій і другій пробірках забарвлюється в зелено-синій колір і випадає синій осад берлінської лазури. За обережного нашаровування дистильованої води осад на дні пробірки стає виразнішим. У контрольній пробірці зелено-бура рідина забарвлення не змінює.

#### ***Відновлення молекулярного йоду аскорбіновою кислотою***

У три пробірки додають по 10 крапель дистильованої води і по 1–2 краплі розчину йоду в йодиді калію. У першу пробірку додають 10 крапель аскорбінової кислоти, у другу – 10 крапель витяжки з шипшини, у третю (контрольну) – 10 крапель дистильованої води. Аскорбінова кислота здатна відновлювати молекулярний йод, який переходить при цьому у безбарвну йодидну кислоту.

Спостерігають знебарвлення розчину йоду в пробірках з аскорбіновою кислотою та з витяжкою з шипшини.

### **5.3. Реакція на тіамін (вітамін В<sub>1</sub>) з діазореактивом**

**Матеріали та реактиви:** розчин сульфанілової кислоти (1 %-й), 5 %-й розчин нітрату натрію, 10 %-й розчин бікарбонату натрію, тіамін (порошок або його 5 %-й розчин).

## **Порядок виконання роботи**

У пробірку вливають 1 мл розчину сульфанілової кислоти та 1 мл розчину нітрату натрію (утворюється діазореактив). Потім у пробірку вносять невелику кількість (на кінчику шпателя) порошку або 0,5 мл розчину тіаміну і по стінці пробірки обережно додають 1 мл розчину  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Вітамін  $\text{B}_1$  у лужному середовищі з діазореактивом утворює складну комплексну сполуку жовтогарячого або червоного кольору.

Спостерігають появу забарвленого кільця на межі двох рідин.

### **5.4. Реакції відновлення рибофлавіну (вітаміну $\text{B}_2$ )**

**Матеріали та реактиви:** концентрована соляна кислота, металевий цинк, 0,025 %-й розчин вітаміну  $\text{B}_2$  (суспензія рибофлавіну у воді).

## **Порядок виконання роботи**

У пробірку вливають 1 мл розчину вітаміну  $\text{B}_2$ , 0,5 мл концентрованої соляної кислоти і кидають грудочку металевого цинку. Під час змішування металевого цинку з концентрованою соляною кислотою утворюється водень, який відновлює жовтий рибофлавін спочатку на родофлавін (проміжна сполука) червоного кольору, а потім на безбарвний лейкофлавін.

Рідина в пробірці поступово забарвлюється в рожевий колір, а потім знебарвлюється. Під час збовтування знебарвлений розчин лейкофлавіну знову окиснюється киснем повітря на рибофлавін.

Спостерігають зміну забарвлення.

### **5.5. Реакція на вітамін PP (антипелагричний, $\text{B}_3$ ) з ацетатом міді**

**Матеріали та реактиви:** порошок вітаміну PP, 10 %-й розчин оцтової кислоти, 5 %-й розчин ацетату міді.

## **Порядок виконання роботи**

У пробірку вносять 5–10 мг вітаміну РР і розчиняють під час нагрівання в 1–2 мл розчину оцтової кислоти. До нагрітого до кипіння розчину додають такий же об'єм розчину ацетату міді. У процесі нагрівання вітаміну РР з розчином ацетату міді утворюється погано розчинний осад мідної солі вітаміну РР синього кольору.

Рідина стає каламутною і набуває блакитного кольору. Через деякий час відмічають появу синього осаду.

### **5.6. Реакція з хлоридом заліза на піридоксин (вітамін В<sub>6</sub>)**

**Матеріали та реактиви:** водний розчин (1 %-й) вітаміну В<sub>6</sub>, 1 %-й розчин FeCl<sub>3</sub>.

## **Порядок виконання роботи**

У пробірці перемішують 1 мл водного розчину піридоксину та дві краплі розчину хлориду заліза. Під час взаємодії піридоксину з розчином хлориду заліза рідина забарвлюється в червоний колір завдяки утворенню комплексної солі типу феноляту заліза.

Спостерігають забарвлення рідини.

### **5.7. Якісні реакції на жиророзчинні вітаміни**

#### **Якісні реакції на вітамін А**

**Матеріали та реактиви:** хлороформний розчин трихлороцтової сурми (33 %-й); хлороформ; 0,05 %-й масляний розчин вітаміну А в хлороформі або розчин риб'ячого жиру в хлороформі у співвідношенні 1:5; концентрована сірчана кислота, насичена сульфатом заліза(II); льодяна оцтова кислота.

## **Порядок виконання роботи**

### ***Реакція з трихлороцтовою сурмою***

У суху пробірку до однієї-двох крапель розчину вітаміну А в хлороформі або розчину риб'ячого жиру в хлороформі додають

чотири-п'ять крапель розчину трихлороцтової сурми в хлороформі й перемішують. Хлороформний розчин вітаміну А або риб'ячого жиру з трихлороцтовою сурмою забарвлюється в специфічний синій колір.

Спостерігають забарвлення рідини.

### ***Реакція Друммонда***

У пробірку до двох-трьох крапель розчину вітаміну А додають дві-три краплі концентрованої сірчаної кислоти. Вітамін А з концентрованою сірчаною кислотою у бензолному розчині утворює комплекс синього кольору.

Уміст пробірки забарвлюється в синій колір, який через деякий час змінюється на фіолетовий і бурий.

Спостерігають зміну забарвлення.

### ***Реакція із сульфатом заліза(II)***

У пробірку до двох-трьох крапель розчину риб'ячого жиру в хлороформі або масляного розчину вітаміну А в хлороформі доливають п'ять-десять крапель концентрованої сірчаної кислоти, насиченої сульфатом заліза(II), і одну-дві краплі льодяної оцтової кислоти. Вітамін А із сульфатом заліза(II) у кислому середовищі у хлороформному розчині утворює сполуку червоно-рожевого кольору.

Спостерігають появу блакитного забарвлення, яке поступово перетворюється на червоно-рожеве.

Каротини у цій реакції мають зелене забарвлення.

### **Якісні реакції на вітамін D**

**Матеріали та реактиви:** насичений розчин  $\text{SbCl}_5$ , хлороформний розчин вітаміну D, хлороформ, аніліновий реактив – анілін із концентрованою  $\text{HCl}$  (15:1), розчин бром у хлороформі (1:60).

## **Порядок виконання роботи**

### ***Реакція з хлоридом сурми(V)***

У суху пробірку до 2 мл розчину вітаміну D у хлороформі доливають 0,2 мл насиченого розчину  $\text{SbCl}_5$ . Вітамін D у хлороформному розчині з насиченим розчином хлориду сурми(V) утворює жовте забарвлення.

Спостерігають появу забарвлення.

### ***Реакція з аніліном***

У суху пробірку вносять одну-дві краплі рибачого жиру або розчину вітаміну D у хлороформі й додають одну краплю анілінового реактиву. Після перемішування утворюється емульсія жовтого кольору. Під час нагрівання емульсії із сумішшю аніліну та концентрованої соляної кислоти розчин забарвлюється в червоний колір.

Через 1–2 хв емульсія розділяється на два шари. Нижній шар забарвлений в інтенсивний червоний колір.

### ***Реакція з бромом***

У пробірку з двома-чотирма краплями розчину вітаміну D в хлороформі або рибачого жиру додають чотири-п'ять крапель розчину бром у хлороформі.

Спостерігають поступове забарвлення суміші в пробірці в зелено-блакитний колір.

## **Якісні реакції на вітамін К**

**Матеріали та реактиви:** розчин діетилмалонового ефіру (1 %-й), 1 %-й розчин КОН, спиртовий розчин вітаміну К, 5 %-й розчин діетилдитіокарбамату, 4 %-й спиртовий розчин NaOH, розчин аніліну, 0,05 %-й спиртовий розчин вікасолу.

## **Порядок виконання роботи**

### ***Реакція з діетилмалоновим ефіром***

У пробірку до 2 мл спиртового розчину вітаміну К додають 0,5 мл розчину діетилмалонового ефіру та 0,1 мл розчину КОН.

Спиртовий розчин вітаміну К у лужному середовищі з діетилмалоновим ефіром має червоно-фіолетове забарвлення.

Спостерігають появу червоно-фіолетового забарвлення.

### ***Реакція з діетилдитіокарбаматом***

У пробірку до 2 мл спиртового розчину вітаміну К додають 2 мл розчину діетилдитіокарбамату та 0,5 мл розчину NaOH в етанолі. Спиртовий розчин вітаміну К в лужному середовищі з діетилдитіокарбаматом утворює сполуку, забарвлену в блакитний колір.

Спостерігають появу забарвлення.

### ***Реакція з аніліном***

У пробірку з 1 мл спиртового розчину вікасолу додають дві краплі аніліну. За наявності аніліну спиртовий розчин вітаміну К забарвлюється в червоний колір, що зумовлено утворенням 1-метил-2-феніламінонафтохінону.

Перемішують і спостерігають появу забарвлення.

### **Якісні реакції на вітамін Е**

**Матеріали та реактиви:** спиртовий розчин (0,1 %-й)  $\alpha$ -токоферолу, концентрована азотна кислота, 1 %-й розчин хлорного заліза(III).

### **Порядок виконання роботи**

#### ***Реакція з азотною кислотою***

У суху пробірку вносять п'ять крапель спиртового розчину вітаміну Е, додають 1 мл концентрованої  $\text{HNO}_3$ , інтенсивно перемішують. Взаємодія  $\alpha$ -токоферолу з концентрованою азотною кислотою зумовлює забарвлення реакційної суміші в червоний колір. Це спричинено тим, що продукт окиснення  $\alpha$ -токоферолу має хіноїдну структуру.

Спостерігають поступову появу червоного забарвлення.



### ***Реакція з хлорним залізом***

У суху пробірку вносять 0,5 мл спиртового розчину  $\alpha$ -токоферолу, потім 0,5 мл розчину  $\text{FeCl}_3$  й інтенсивно перемішують. Під час взаємодії з хлорним залізом(III)  $\alpha$ -токоферол окиснюється до  $\alpha$ -токоферилхінону – сполуки червоного кольору:

Спостерігають появу забарвлення.

### **Оброблення експериментальних даних**

Побудуйте таблицю, у якій вкажіть: відомі вам водорозчинні вітаміни; коферменти, що їм відповідають; реакції, які перебігають за участю коферментів; реакції, якими можна виявити вітаміни; харчові джерела вітамінів та добову потребу в них.

Побудуйте таблицю, у якій вкажіть жиророзчинні вітаміни, їх біологічну роль, харчові джерела вітамінів та добову потребу в них.

### **Контрольні запитання та завдання**

1. Яка біологічна роль водорозчинних вітамінів? Напишіть формули вітамінів  $\text{B}_1$ ,  $\text{B}_2$ ,  $\text{B}_5$ ,  $\text{B}_6$ ,  $\text{C}$ .

2. Напишіть реакцію фенолу та вітаміну  $\text{B}_6$  з  $\text{FeCl}_3$ . Покажіть утворення трьох ковалентних і трьох координаційних зв'язків. Покажіть фенольні гідроксили в молекулі рутину.

3. Яка властивість аскорбінової кислоти лежить в основі її виявлення?

4. Напишіть ізоалоксазинове кільце, що становить основу рибофлавіну, в окисненій та відновленій формах. Напишіть коферменти вітамінів  $\text{B}_5$  та  $\text{B}_2$  в окисненій та відновленій формах.

5. Які жиророзчинні вітаміни ви знаєте? Яка роль вітамінів  $\text{A}$ ,  $\text{D}$ ,  $\text{E}$ ,  $\text{K}$ ,  $\text{F}$  у метаболізмі?

6. Яка речовина є попередником при синтезі вітаміну  $\text{D}$  в організмі людини? Який гормон синтезується з вітаміну  $\text{D}$ ?

7. Покажіть у структурі вітаміну  $\text{E}$  частину, що є хіноном.

8. Поясніть принципи реакцій виявлення жиророзчинних вітамінів. Чи можуть вони використовуватися для кількісного визначення?

**Література:** [1; 2; 4 -7].

## Лабораторна робота 6

### ВИЗНАЧЕННЯ НАЯВНОСТІ ФЕРМЕНТУ В БІОЛОГІЧНІЙ РІДИНІ. ВИЗНАЧЕННЯ СПЕЦИФІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ФЕРМЕНТІВ ЯК БІОЛОГІЧНИХ КАТАЛІЗАТОРІВ

**Мета роботи:** засвоїти основні принципи виявлення ферментів, уміти їх застосовувати для доведення наявності ферменту в біологічній рідині. Уміти доводити в експерименті специфічні властивості ферментів.

#### Основні теоретичні відомості

Ферменти – біологічні каталізатори білкової природи, які мають спільні риси з неорганічними каталізаторами, а також специфічні властивості. Наявність ферменту в біологічній рідині можна довести за його активністю. Ферменти прискорюють хімічні реакції, у яких субстрат тим чи іншим чином перетворюється на продукт реакції. Тому якщо фермент виявляє активність, субстрату стає менше, а продукту реакції – більше. За зменшенням кількості субстрату і збільшенням кількості продукту реакції можна оцінити активність будь-якого ферменту.

До специфічних властивостей ферментів належить залежність їх дії від температури, рН середовища, від наявності модуляторів (або ефекторів), які можуть або посилювати активність ферменту (активатори), або зменшувати її (інгібітори). Активність ферменту залежить також від концентрації субстрату. Крім того, ферменти є високоспецифічними відносно субстрату, перетворення якого каталізується.

Зі зниженням температури активність ферментів знижується, досягаючи мінімального значення за температури 0 °С. Під час підвищення температури на кожні 10 градусів активність ферменту зростає в 2–4 рази, доки не досягне максимальної. Температура, за якої спостерігається максимальна швидкість ферментативної реакції, називається оптимальною. Під час подальшого нагрівання, для більшості ферментів до 50–70 °С, фермент втрачає властивості біологічного каталізатора через теплову денатурацію білкової молекули.

Кожен фермент має своє значення рН середовища, за якого його активність максимальна – оптимальне рН. Для більшості ферментів людського організму це значення становить 6,8 – 7,4. Крива залежності активності ферменту від рН середовища на відміну від температурної залежності симетрична.

Активатори ферментів – це, як правило, іони металів, але іноді й аніони (для  $\alpha$ -амілази – аніони хлору). Переважний механізм дії – зв'язування з алостеричним центром ферменту, унаслідок чого змінюються конформація молекули ферменту і просторова відповідність молекул ферменту та субстрату. За таким самим механізмом можуть діяти і специфічні неконкурентні інгібітори ферментів. Конкурентні інгібітори конкурують з істинним субстратом за місця зв'язування в активному центрі ферменту. Підвищенням концентрації істинного субстрату можна позбавитись впливу конкурентного інгібітору, бо він витісняється з активного центру. Інгібування може бути неспецифічним, його зумовлює будь-який чинник, що руйнує структуру ферменту, денатурує його.

Із підвищенням концентрації субстрату швидкість ферментативної реакції зростає. Але з досягненням певної концентрації субстрату – концентрації насичення – всі місця зв'язування субстрату в активному центрі ферменту виявляються зайнятими, і подальше підвищення концентрації субстрату не пришвидшує перебіг реакції.

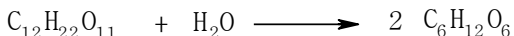
**Обладнання:** штатив із пробірками, піпетки, крапельниці, фарфорова ступка з товчачиком, лійки, термостат, водяна баня, газовий пальник.

### 6.1. Дія сахарози

**Матеріали та реактиви:** препарат сахарози (5 г пивних дріжджів розтирають у фарфоровій ступці з 2–3 мл дистильованої води та невеликою кількістю скляного піску, додають 8–10 мл води та фільтрують крізь вату), 2 %-й розчин сахарози, реактив Фелінга (див. лабораторну роботу 2).

## Порядок виконання роботи

У пробірку наливають 1 мл препарату ферменту, додають 3 мл розчину сахарози, добре перемішують і ставлять у термостат за температури 38 °С. Сахараза каталізує гідроліз сахарози до глюкози та фруктози:



Глюкозу, яка утворюється, визначають реакцією Фелінга. Для цього через 15 хв у пробірку вносять 2 мл реактиву Фелінга, перемішують і нагрівають до кипіння. Утворюється червоний осад геміоксиду міді. Сахараза не містить вільної альдегідної групи й тому не має відновних властивостей.

Результати дослідження заносять до табл.6.1.

Таблиця 6.1

### Визначення активності сахарози

Об'єкт дослідження	Досліджуваний фермент	Субстрат
Дріжджі	Сахараза	Сахараза
Термостат: $t^\circ = 38^\circ\text{C}$ на 15 хв		
Реакція	Фелінга	
Спостереження		

## 6.2. Дія амілази

**Матеріали та реактиви:** розчин крохмалю (0,2 %-й), 0,1 %-й розчин йоду в 0,2 %-у розчині йодиду калію, розчин слини, що містить фермент.

Приготування розчину слини – рот два-три рази ополіскують водою, далі відмірюють циліндром 50 мл дистильованої води й полощуть нею рот кілька разів протягом 3–5 хв. Зібрану рідину фільтрують крізь вату. Фільтрат використовують як джерело ферменту.

## Порядок виконання роботи

У дві пробірки наливають по 5 мл крохмального клейстеру, в одну з них додають 0,5 мл розчину слини, яка містить амілазу, добре перемішують і залишають стояти за кімнатної температури. Амілаза є ферментом, який каталізує гідроліз  $\alpha$ -1-4-глікозидного зв'язку крохмалю та глікогену до проміжних продуктів – декстринів. Крохмаль (за рахунок амілози) утворює з йодом сполуки синього кольору, декстрини – фіолетового, червоно-бурого, жовтого. Кінцевим продуктом гідролізу крохмалю є глюкоза.

Через 15 хв у обидві пробірки додають по п'ять крапель розчину йоду. У пробірці з амілазою слини розчин через 1 год знебарвлюється, а в пробірці без амілази колір розчину не змінюється, тобто залишається синьо-фіолетовим.

### 6.3. Вплив активаторів та інгібіторів на активність амілази

**Матеріали та реактиви:** розчин слини, 0,5 %-й розчин крохмалю, 0,1 %-й розчин йоду в 0,2 %-у розчині йодиду калію, 1 %-й розчин NaCl, 1 %-й розчин CuSO<sub>4</sub>.

## Порядок виконання роботи

Готують три пробірки. В першу наливають 2,5 мл води, у другу – 2 мл води та 0,5 мл розчину NaCl, у третю – 2 мл води та 0,5 мл розчину CuSO<sub>4</sub>. У всі пробірки додають по 2,5 мл розчину слини, перемішують, вносять по 2,5 мл розчину крохмалю, потім знову перемішують і ставлять у термостат за температури 38 °С. Активатором амілази є NaCl, а інгібітором – CuSO<sub>4</sub>. Вплив цих речовин на активність амілази визначають за ступенем гідролізу крохмалю під впливом ферменту за наявності NaCl і CuSO<sub>4</sub>.

Через 5 хв додають по п'ять крапель розчину йоду. Рідина в першій пробірці забарвлюється у фіолетовий або червоний колір, у другій – у червоний або жовтий, у третій – у синій.

#### 6.4. Дослідження впливу високих температур на активність $\alpha$ -амілази слини

**Матеріали та реактиви:** розчин крохмалю (0,2 %-й), 0,1 %-й розчин йоду в 0,2 %-у розчині йодиду калію, реактив Фелінга (див. лабораторну роботу 2), розчин слини, що містить фермент.

#### Порядок виконання роботи

Вплив температури на активність амілази слини проявляється у зміні інтенсивності розщеплення крохмалю цим ферментом за різних температурних умов зберігання ферменту. У дві пробірки додають по 1 мл розведеної у 2 рази слини, в інші дві – по 1 мл розведеної так само слини після попереднього кип'ятіння (протягом 2 хв). В усі чотири пробірки додають по 2 мл 0,2 %-го розчину крохмалю і ставлять у термостат за  $t^{\circ} = 37^{\circ}\text{C}$  на 15 хв.

Ступінь розщеплення крохмалю визначають за допомогою реакції з йодом (за зменшенням кількості субстрату) або реакції Фелінга (за збільшенням кількості продукту реакції). Для цього після інкубації проводять реакцію з йодом (0,1 %-м розчином йоду в 0,2 %-у розчині йодиду калію), додаючи по 1–2 краплі у дві пробірки (з некип'яченою слиною і зі слиною після кип'ятіння), та з реактивом Фелінга (додають по 2 мл реактиву Фелінга так само в дві пробірки, з некип'яченою слиною і зі слиною після кип'ятіння, перемішують і нагрівають до кипіння). Спостерігають забарвлення при реакції з йодом і утворення осаду в реакції Фелінга.

Результати дослідження заносять до табл.6.2:

Таблиця 6.2

#### Визначення активності $\alpha$ -амілази слини

Джерело ферменту	Досліджуваний фермент	Субстрат
Слина	$\alpha$ -Амілаза	Крохмаль
Термостат: $t^{\circ} = 37^{\circ}\text{C}$ на 10 хв		
Спостереження	Слина без кип'ятіння	Слина після кип'ятіння
Реакція з йодом		
Реакція Фелінга		

## 6.5. Вплив рН на активність амілази

**Матеріали та реактиви:** розчин слини, 1 %-й розчин крохмалю, 0,1 %-й розчин йоду в 0,2 %-у розчині йодиду калію, фосфатний буфер з різними значеннями рН, загальний об'єм буферного розчину – 100 мл (табл. 6.3).

Таблиця 6.3

### Склад фосфатного буферу, мл

рН	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,2 М), мл	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,2 М), мл
5,8	4,00	46,00
6,2	9,25	40,75
6,6	18,75	31,25
6,8	24,50	25,50
7,2	36,00	14,00
7,6	43,50	6,50
8,0	47,35	2,65

### Порядок виконання роботи

Вплив рН на активність амілази визначають за зміною інтенсивності забарвлення розчину крохмалю з йодом.

У сім пробірок наливають по 2 мл буферного розчину з різними значеннями рН. Потім доливають по 5 мл розчину крохмалю та по 1 мл розчину слини. Вміст пробірок перемішують і ставлять у термостат на 10 хв за температури 38 °С. Після інкубації в термостаті в усі пробірки додають по п'ять крапель розчину йоду, перемішують, спостерігають інтенсивність забарвлення. Для наочності в кожену пробірку можна долити декілька мілілітрів дистильованої води й розмішати.

Оптимум рН для амілази слини становить 6,8; у кислому та лужному середовищах активність амілази знижується.

### Оброблення експериментальних даних

Побудуйте схему взаємодії ферменту і субстрату в ході реакції. У який спосіб можна виявити наявність ферменту у біологічній рідині? Поясніть на прикладі сахарози, амілази.

Яким чином можна експериментально довести наявність у ферментів специфічних властивостей? Побудуйте таблицю, у якій наведіть експериментальні підтвердження специфічних властивостей амілази.

### **Контрольні запитання та завдання**

1. Назвіть основні способи виявлення ферментів у біологічних рідинах, проілюструйте відповідь способами визначення активності амілази слини.

2. Назвіть спільні властивості ферментів і неорганічних каталізаторів, специфічні властивості ферментів.

3. Назвіть функціонально активні ділянки молекули ферменту.

4. Які ферменти називають алостеричними?

5. Побудуйте графіки залежності активності амілази слини від температури, від рН середовища.

6. Як швидкість ферментативної реакції залежить від концентрації ферменту, від концентрації субстрату? Побудуйте відповідні графіки.

7. Яка константа характеризує спорідненість ферменту та субстрату? Чому вона чисельно дорівнює?

8. Чому активатори підвищують ферментативну активність?

9. Як класифікують інгібітори ферментів? Поясніть механізм їх дії.

10. Внаслідок чого відбувається неспецифічне інгібування ферменту?

11. Поясніть механізм інгібуючої дії сульфату міді на активність ферменту. До якого типу інгібіторів він належить?

12. Поясніть механізм впливу кип'ятіння на активність ферменту. Запропонуйте інші методи інактивації амілази.

13. Визначте основні одиниці вимірювання ферментативної активності.

14. Що таке питома активність ферменту? Для чого її визначають?

**Література:** [1; 4–7].



## Лабораторна робота 7

### ДОСЛІДЖЕННЯ СПЕЦИФІЧНОСТІ ДІЇ ГІДРОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ

**Мета роботи:** довести різні види специфічності гідролітичних ферментів.

#### Основні теоретичні відомості

Ферменти – високоспецифічні речовини. Вони розрізняються за видом (типом) специфічності. Якщо фермент каталізує перетворення лише одного субстрату, він має абсолютну специфічність.

Якщо фермент каталізує перетворення групи субстратів, його специфічність – відносна (або групова). Такий фермент високоспецифічний щодо типу зв'язку в молекулі субстрату. Гідролітичні ферменти (гідролази) каталізують розрив ковалентних зв'язків у молекулі субстрату за участю молекули води. Гідролази можуть мати абсолютну або відносну (групову) специфічність. Більшості гідролітичних ферментів шлунково-кишкового тракту людини притаманна групова специфічність. Наприклад, протеази (протеїнази, або пептидази) каталізують розщеплення пептидних зв'язків у молекулах білка, кінцевим продуктом гідролізу є амінокислоти. Глікозидази розривають глікозидні зв'язки, їх субстратом є вуглеводи, що розщеплюються за повного гідролізу до простих вуглеводів – моносахаридів. Естерази діють на ліпіди, складові компоненти яких з'єднані складноєфірними зв'язками, продуктами гідролізу нейтральних ліпідів є гліцерол та вищі жирні кислоти. Нуклеази (ДНК-ази, РНК-ази) прискорюють гідроліз нуклеїнових кислот до нуклеотидів.

Стереоспецифічними є ферменти, які каталізують перетворення лише певного стереоізомеру субстрату, а на інший стереоізомер не впливають.

**Обладнання:** штатив із пробірками, піпетки, водяна баня, крапельниці, термостат, газовий пальник.

## 7.1. Специфічність дії амілази та сахарози

**Матеріали та реактиви:** розчин слини, 0,5 %-й розчин крохмалю, 0,5 %-й розчин сахарози, 0,1 %-й розчин йоду в 0,2 %-у розчині йодиду калію, реактив Фелінга та препарат сахарози (див. лабораторні роботи 2 та 6).

### Порядок виконання роботи

У дві пробірки наливають по 3 мл розчину крохмалю. У першу пробірку додають 1 мл розчину слини (амілази), у другу – 1 мл препарату сахарози, перемішують і ставлять у термостат (38 °С).

У дві інші пробірки наливають по 3 мл розчину сахарози. У першу пробірку додають 1 мл препарату сахарози, у другу – 1 мл розчину слини і також ставлять у термостат (38 °С).

Через 15 хв у перші дві пробірки з крохмалем додають по п'ять крапель розчину йоду і спостерігають за забарвленням. У пробірці з амілазою синє забарвлення розчину не виникає або згодом зникає внаслідок розщеплення крохмалю амілазою. У другій пробірці розчин має синій колір тому, що сахароза не діє на крохмаль.

У двох інших пробірках дія ферменту виявляється за позитивною реакцією Фелінга на відновлювальні сахариди. Для цього в пробірки додають по 1 мл реактиву Фелінга та нагрівають до кипіння. Сахароза відновних властивостей не має, а глюкоза – один з продуктів гідролізу сахарози – має відновні властивості за рахунок наявності альдегідної групи. Тому в пробірці, у якій під впливом сахарози сахароза розщепилася на глюкозу та фруктозу, спостерігається цегляно-червоне забарвлення внаслідок утворення геміоксиду міді, а в пробірці, у якій сахароза лишилась неторканою, реакція Фелінга негативна.

Результати дослідження заносять до табл.7.1.

Таблиця 7.1

**Визначення специфічності  $\alpha$ -амілази та сахарози**

Фермент	Субстрат	Умови реакції	Реакція	
			З йодом	Фелінга
Амілаза	Крохмаль	37 °C 15 хв		
Амілаза	Сахароза			
Сахараза	Крохмаль	37 °C 15 хв		
Сахараза	Сахароза			

**7.2. Групова специфічність дії сахарози**

**Матеріали та реактиви:** препарат сахарози (див. лабораторну роботу 6), реактив Фелінга (див. лабораторну роботу 2), 1 %-й розчин рафінози, 1 %-й розчин сахарози.

**Порядок виконання роботи**

У дві пробірки наливають по 1 мл препарату сахарози. Сахараза специфічна щодо фруктозної частини дисахариду сахарози та трисахариду рафінози. В одну пробірку додають 2 мл розчину сахарози, у другу – 2 мл розчину рафінози. Вміст пробірок перемішують і поміщають на 5–10 хв у термостат (38 °C). Під дією ферменту розщеплюється  $\beta$ -глікозидний зв'язок ближче до фруктозної частини молекули. Потім у пробірки додають по 3 мл реактиву Фелінга, старанно перемішують і нагрівають до кипіння. Продукти ферментативного гідролізу сахарози та рафінози мають позитивну реакцію з реактивом Фелінга.

В обох пробірках утворюється червоний осад оксиду міді(I).

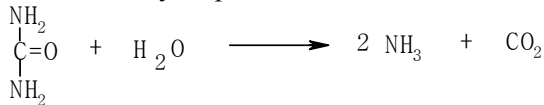
**7.3. Дія уреаз**

**Матеріали та реактиви:** розчин сечовини (5 %-й), 1 %-й спиртовий розчин фенолфталеїну, 0,01 %-й розчин кристалічної уреаз або препарат уреаз (до 8 г соєвої муки або подрібненого і розтертого гарбузового насіння додають 46 мл дистильованої води,

2 мл розчину 0,1 М НСl, перемішують, додають кілька крапель толуолу, залишають на півдобу і фільтрують).

### **Порядок виконання роботи**

У дві пробірки наливають по 1 мл розчину сечовини і додають по п'ять крапель розчину фенолфталеїну. В одну з них додають 5 мл препарату уреазу або розчин уреазу і перемішують. У другу пробірку додають 5 мл дистильованої води. Уреаза пришвидшує розщеплення сечовини з утворенням  $\text{CO}_2$  і  $\text{NH}_3$ :



У пробірці з уреазою утворюється аміак, який змінює рН середовища на лужне. За зміною рН у бік лужних значень роблять висновок про дію уреазу.

За наявності фенолфталеїну розчин забарвлюється в рожевий колір. Колір розчину в пробірці без уреазу не змінюється.

### **7.4. Абсолютна специфічність дії уреазу**

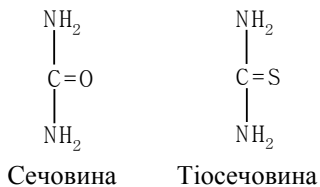
**Матеріали та реактиви:** препарат уреазу або 0,01 %-й розчин кристалічної уреазу, 1 %-й спиртовий розчин фенолфталеїну, 5 %-й розчин сечовини, 5 %-й розчин тіосечовини.

### **Порядок виконання роботи**

У дві пробірки наливають по 5 мл препарату або розчину уреазу та додають по п'ять крапель розчину фенолфталеїну. В одну пробірку додають 1 мл розчину сечовини, а в другу – 1 мл розчину тіосечовини. Обидві пробірки залишають на 20 хв за кімнатної температури. Незначні зміни в структурі субстрату приводять до того, що фермент з абсолютною специфічністю не впливає на цей субстрат. Так, субстратом для уреазу є сечовина, а тіосечовина, яка відрізняється від сечовини наявністю атома сірки, уреазою не розщеплюється.

Вміст пробірки із сечовиною забарвлюється в рожевий колір унаслідок утворення аміаку під час розщеплення сечовини.

Тіосечовина не розщеплюється під дією уреаз, тому забарвлення в другій пробірці не виникає.



### Оброблення експериментальних даних

Побудуйте таблицю, яка міститиме субстрати, які можуть розщеплюватися відомими вам гідролітичними ферментами. Виокреміть види специфічності цих ферментів.

### Контрольні запитання та завдання

1. Назвіть класи ферментів. До якого класу належать уреаз, амілаза, сахараза?
2. Назвіть види специфічності ферментів. Наведіть приклади.
3. Яку специфічність має більшість гідролітичних ферментів?
4. До чого специфічні ферменти, що мають групову (відносну) специфічність?
5. Напишіть реакцію гідролізу крохмалю. Яким ферментом вона каталізується?
6. Чому рН за дії уреаз змінюється?

Література: [1; 4–7].

## Лабораторна робота 8

### ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ПІДТВЕРДЖЕННЯ ФУНКЦІОНУВАННЯ ЦИКЛУ ТРИКАРБОНОВИХ КИСЛОТ

**Мета роботи:** засвоїти метод експериментального підтвердження функціонування циклу трикарбонних кислот за утворенням  $\text{CO}_2$ .

## Основні теоретичні відомості

Цикл трикарбонових кислот (ЦТК) – основний метаболічний шлях енергетичного обміну. Субстратом ЦТК є ацетил-КоА, який утворюється переважно в реакціях  $\beta$ -окислення вищих жирних кислот або в реакціях окисного декарбоксілювання пірувату.

Реакції ЦТК циклічні, інтермедіати можуть бути використані не тільки в реакціях катаболізму, але й в анаболічних (наприклад для синтезу амінокислот, глюкози). Тому ЦТК є амфіболічним процесом.

У ЦТК є чотири дегідрогеназні реакції, у яких відновлюються коферменти, що у свою чергу є субстратами дихального ланцюга, а також дві декарбоксилазні реакції, у яких виділяється по одній молекулі  $\text{CO}_2$ . Виділення газу є одним з доказів функціонування ЦТК.

**Обладнання:** пробірки, піпетки, фарфорова ступка з товчачиком, скляний пісок, вата, лійка, рН-метр, термостат, ваги, газовий пальник.

### 8.1. Підтвердження функціонування циклу трикарбонових кислот мітохондрій за утворенням $\text{CO}_2$

**Матеріали та реактиви:** ферментний препарат, що містить ферменти ЦТК та окисного декарбоксілювання пірувату (5 г пивних дріжджів розтирають у фарфоровій ступці з 2–3 мл дистильованої води та невеликою кількістю скляного піску, додають 8–10 мл води та фільтрують через вату), фосфатний буфер 1/15 М, рН = 7,4; піровиноградна кислота або піруват натрію 5 %-й, суспензія  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , 0,1 М розчин  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

#### Порядок виконання роботи

Перетворення ацетил-S-КоА за наявності мітохондрій, що містять ферменти ЦТК, супроводжується утворенням  $\text{CO}_2$ . Як джерело ацетил-S-КоА, що вступає в ЦТК, використовують піровиноградну кислоту, яка під дією мультиферментного

піруватдегідрогеназного комплексу мітохондрій піддається окисному декарбокسيلюванню з утворенням ацетил-S-КоА.

Дві пробірки – контрольну та дослідну – заповнюють реактивами за табл.8.1.

Для зв'язування CO<sub>2</sub>, що утворюється, в інкубаційне середовище додають Са(ОН)<sub>2</sub>. Після закінчення інкубації зв'язаний CO<sub>2</sub> визначають за виділенням бульбашок газу, що утворюються після додавання до інкубаційного середовища сірчаної кислоти.

Таблиця 8.1

**Вміст контрольної та дослідної пробірок**

Вміст пробірок, мл	Пробірки	
	контрольна	дослідна
Фосфатний буфер, рН = 7,4	2,0	2,0
Розчин пірувату натрію	0,5	0,5
Суспензія Са(ОН) <sub>2</sub>	0,5	0,5
Ферментний препарат	–	0,5
Ферментний препарат після кип'ятіння	0,5	–
Інкубація в термостаті 15 хв за температури 37 °С		
0,1 М розчин Н <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0	1,0
Результати: виділення CO <sub>2</sub>		

**Оброблення експериментальних даних**

Напишіть всі реакції ЦТК, позначте інтермедіати ЦТК, ферменти, субстрати та продукти реакцій. Побудуйте таблицю, у якій укажіть, до якого класу ферментів належить кожен з ферментів ЦТК. Виведіть сумарне рівняння ЦТК. Випишіть декарбоксилазні, дегідрогеназні реакції, назвіть піридинзалежні та флавінзалежні дегідрогенази. Напишіть структуру коферментів дегідрогеназних реакцій в окисненій та відновленій формах. Побудуйте таблицю, у якій укажіть джерело кожного з восьми атомів водню, що приєднались до коферментів при їх відновленні в реакціях ЦТК.

## Контрольні запитання та завдання

1. Яка внутрішньоклітинна локалізація ферментів ЦТК?
2. Поясніть будову та функції мітохондрій.
3. Чому в роботі необхідно зв'язувати  $\text{CO}_2$ , а потім вивільняти його під час взаємодії із сульфатною кислотою? Напишіть рівняння відповідних реакцій.
4. Які конкурентні інгібітори сукцинатдегідрогенази ви знаєте? Як позбавитись впливу конкурентного інгібітора?
5. Наведіть визначення лімітуючої реакції метаболічного процесу. Назвіть лімітуючу реакцію ЦТК.
6. Доведіть, що ЦТК є амфіболічним процесом.
7. Які реакції називаються анаплеротичними? Які реакції є анаплеротичними реакціями ЦТК?
8. Які вітаміни необхідні для функціонування ЦТК?
9. Поясніть функціонування  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназного комплексу. Які ферменти та коферменти він містить?

Література: [1; 4–7].

## Лабораторна робота 9

### ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ПІДТВЕРДЖЕННЯ ФУНКЦІОНУВАННЯ ДИХАЛЬНОГО ЛАНЦЮГА

**Мета роботи:** виділити мітохондрії та субмітохондріальну фракцію, що містить ферменти дихального ланцюга, виявити окремі компоненти дихального ланцюга та дослідити їх функціонування.

### Основні теоретичні відомості

Ферменти дихального ланцюга (ДЛ) локалізовані на внутрішній мембрані мітохондрій. Тому для дослідження функціонування ДЛ в лабораторних дослідах необхідно передусім одержати мітохондрії. Це досягається подрібненням тканин, їх руйнуванням, диференціальним центрифугуванням. Виділення окремих ферментних білків та комплексів проводиться екстрагуванням буферними розчинами. Дихальний ланцюг забезпечує передачу



відновних еквівалентів (атомів водню та електронів) на кисень, кінцевою реакцією є утворення води. Таким чином, ДЛ забезпечує тканинне дихання – поглинання кисню тканинами. За рахунок енергії, що вивільняється під час транспортування відновних еквівалентів уздовж ДЛ, відбувається окисне фосфорилювання – синтез АТФ з АДФ та неорганічного фосфату.

Процесу перенесення електронів уздовж ДЛ зручно вивчати з використанням субмітохондріальних фрагментів. Препарат Кейліна-Хартрі – фрагменти внутрішньої мембрани мітохондрій, майже без ферментів циклу Кребса, але з повним набором компонентів ДЛ. Для одержання препарату тканину руйнують розтиранням з абразивними матеріалами, проводять диференціальне центрифугування, екстрагування сольовими буферними розчинами.

Здатність мітохондрій поглинати кисень характеризує інтенсивність їх метаболізму. Манометричний метод, запропонований О. Варбургом, можна використовувати для дослідження процесів, що відбуваються з поглинанням кисню – окисного дезамінування, аеробного гліколізу, функціонування ДЛ, а також процесів, які відбуваються з виділенням газоподібних продуктів. Визначають зміну тиску в замкненій системі відомого об'єму за перебігом певних реакцій, розраховують об'єм газоподібного продукту, що утворився або витратився.

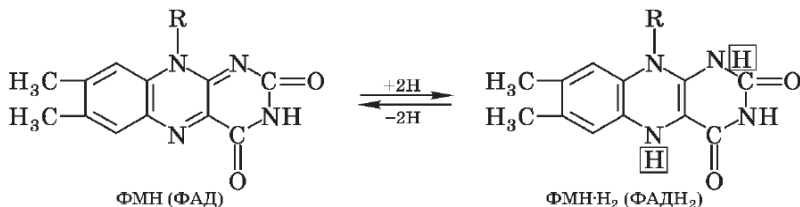
Полярографічний метод визначення концентрації кисню базується на електрохімічній реакції відновлення розчиненого кисню до перекису водню та води:



Електричний струм за певних умов лінійно залежить від концентрації кисню, тому можна визначити дихання біологічних об'єктів – тканин, суспензій клітинних органел, у тому числі мітохондрій. Найчастіше використовують електрод Кларка, який виготовлений з платини, що відділяється від реакційної суміші тонкою тефлоновою мембраною. Електрод заповнений насиченим розчином КСІ. У цей розчин дифундує кисень з реакційної суміші, перебігає електрохімічна реакція відновлення.

Акцептором атомів водню від НАДН+H<sup>+</sup> у ДЛ є флавінові ферменти, які містять простетичну групу – похідне вітаміну В<sub>2</sub>

(рибофлавіну) флавінмононуклеотид (ФМН). Простетичною групою ферменту сукцинатдегідрогенази є флавінаденіндинуклеотид (ФАД). ФМН та ФАД у складі ферментів беруть участь в оборотних окисно-відновних реакціях:



Окиснені форми ФМН і ФАД мають червоний, коричневий або зелений колір, тому ці компоненти ДЛ можна виявити за світлопоглинанням.

У перенесенні електронів ДЛ бере участь система цитохромів. Простетичною групою цитохромів є гем. Під час функціонування ДЛ валентність металу, що міститься у складі гему цитохромів, змінюється ( $\text{Fe}^{2+} \leftrightarrow \text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^+ \leftrightarrow \text{Cu}^{2+}$ ), цитохром приєднує або віддає один електрон. У клітині одночасно працює щонайменше два ланцюги цитохромів. Усі цитохроми, особливо у відновленій формі, мають характерні спектри світлопоглинання. Цитохроми b, c<sub>1</sub>, c виконують функцію проміжних переносників електронів, а цитохроми a та a<sub>3</sub> (цитохромоксидаза) є дихальним ферментом, що безпосередньо взаємодіє з киснем. Окиснена форма цитохромоксидази приймає електрони від відновленого цитохрому, переходячи у відновлену форму, яка потім знову окиснюється молекулярним киснем. Утворений активний кисень O<sup>2-</sup> приєднує два протони, унаслідок чого утворюється молекула води.

Цитохромоксидаза дуже чутлива до дії ціанідів, сульфідів, азидів, чадного газу та інших речовин, що взаємодіють з металом у складі гему. Інгібування цитохромоксидази спричинює кисневе голодування тканин, що пов'язане з неможливістю використовувати кисень як акцептор електронів і протонів у ДЛ мітохондрій.

**Обладнання:** пробірки, пробірка з пробкою та газовідвідною трубкою, марля, фільтрувальний папір, піпетки, ножиці, чашки Петрі, склянки, лід, пропелерна мішалка, скляний гомогенізатор,

центрифуга рефрижераторна високооборотна, м'ясорубка, ручний прес, фарфорова ступка з товкачиком, флуориметр.

### 9.1. Виділення мітохондрій з печінки тварин

**Матеріали та реактиви:** печінка тварин, 0,25 М розчин сахарози, розчин для виділення, що містить 0,25 М сахарози і 0,001 М ЕДТА (етилендіамінтетраацетату), рН 7,4, 1 М розчин HCl; 0,1 М розчин HCl; 1 М розчин KOH; 0,1 М розчин KOH.

#### Порядок виконання роботи

Тканину печінки промивають 2–3 рази невеликою кількістю охолодженого до 0 °С розчину для виділення. 15–20 г тканини подрібнюють ножицями в чашці Петрі, що стоїть на льоду. Кашицю переносять у склянку із свіжим розчином для виділення, знову промивають 2–3 рази, кожного разу відстоюють суміш, надосадову рідину обережно зливають. Тканину гомогенізують 30 – 40 с з 40 мл розчину для виділення, центрифугують 10 хв за 600 g і температури 0 – 2 °С для видалення ядер та не подрібнених шматочків тканини. Для розрахунку  $g$  (центрифужного поля) використовують формулу

$$g = 1118 \cdot 10^{-8} R N^2,$$

де  $R$  – радіус, що вимірюється від центра ротора до точки, у якій визначається центрифугувальне поле (до дна пробірки), см;  $N$  – швидкість обертання ротора, об/хв.

Супернатант зливають та зберігають на льоду, осад гомогенізують 20 с з 20 мл розчину для виділення, центрифугують 10 хв за 600 g. Супернатанти об'єднують.

Для осадження мітохондрій супернатант центрифугують при 14 000 g 10 хв. Осад суспендують в 0,5 мл розчину для виділення. Малими порціями, обережно струшуючи, додають 40 мл розчину для виділення та знову осаджують мітохондрії при 14 000 g 10 хв. Осад суспендують в 0,25 М сахарозі, знову центрифугують при 14 000 g 10 хв. Супернатант зливають, на осад мітохондрій обережно нашаровують 0,2–0,3 мл 0,25 М сахарози, легким струшуванням змивають верхній пухкий шар осаду, повторюють процедуру 2–3 рази. Щільний осад мітохондрій ретельно суспендують в 0,4–0,5 мл

0,25 М сахарози. Одержану густу суспензію мітохондрій зберігають у пробірці на льоду.

## **9.2. Одержання субмітохондріальних фрагментів (препарату Кейліна–Хартрі)**

**Матеріали та реактиви:** яловиче серце, фосфатно-боратний буфер, рН 7,4 (змішують однакові об'єми 0,15 М  $\text{H}_3\text{BO}_3$  та 0,15 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ); 0,1 М фосфатний буфер, рН 7,4; 0,02 М фосфатний буфер, рН 7,4; 1 М розчин  $\text{HCl}$ ; 0,1 М розчин  $\text{HCl}$ ; 1 М розчин  $\text{KOH}$ ; 0,1 М розчин  $\text{KOH}$ .

### **Порядок виконання роботи**

Для одержання препарату можна використовувати як свіже серце, так і заморожене. Активність НАДН–КоQ-редуктази в препараті із замороженого серця знижується, але активність сукцинатдегідрогенази майже не змінюється.

Серце очищають від жиру, судин, сполучної тканини, 100 г нарізають, розмелюють на м'ясорубці. Заливають 1 л водопровідної води і перемішують пропелерною мішалкою 20 хв. Воду зливають, осад фільтрують крізь 4 шари марлі, старанно віджимають. Повторюють декілька разів. Далі всі операції виконують у холодній кімнаті або на льоду з використанням охолоджених до 4 °С розчинів. Масу заливають 1 л 0,1 М фосфатного буфера, лишають на 2 год, безперервно перемішуючі. Екстракт зливають, масу, що залишилася, двічі промивають дистильованою водою по 0,5 л, старанно віджимають (краще за допомогою ручного преса) та помішають у фарфорову ступку, додають 10 мл 0,02 М фосфатного буфера та 10 г кварцового піску для розтирання. Суміш розтирають товкачиком протягом 1,5 год до одержання гомогенної сметаноподібної маси. До неї додають 25 мл 0,02 М фосфатного буфера, суміш ретельно перемішують.

Під час оброблення фосфатним буфером вимиваються ферменти циклу Кребса, а також цитохром с, тому висока активність препарату може бути досягнута лише при додаванні цитохрому с в інкубаційне середовище.

Одержаний препарат центрифугують за охолодження протягом 30 хв зі швидкістю 2 500 об/хв. Супернатант обережно зливають, центрифугують при 40 000 g протягом 1,5 год за температури 1 – 2 °С. Майже прозорий супернатант зливають. До осаду додають 1 мл фосфатно-боратного буфера, суспендують в скляному гомогенізаторі за найменшої швидкості обертання товчачика.

Одержаний препарат Кейліна–Хартрі зберігають у пробірці за температури 0 °С протягом декількох діб без помітного зниження сукцинатдегідрогеназної активності.

### **9.3. Виявлення флавінових коферментів**

**Матеріали та реактиви:** 1 %-і розчини флавінаденін-динуклеотиду та флавінмононуклеотиду.

#### **Порядок виконання роботи**

Окиснені форми ФАД і ФМН здатні зумовлювати в ультрафіолетовому спектрі флуоресценцію, інтенсивність якої залежить від їх концентрації. У відновлених формах флавінів флуоресценція не виникає.

В одну пробірку вносять 10 крапель 0,002 %-го розчину ФАД, а в другу – 10 крапель 0,002 %-го розчину ФМН, що готують розведенням 1 %-х розчинів. Доливають у кожную пробірку по 5 мл води і перемішують струшуванням. Опромінення вмісту пробірок ультрафіолетом зумовлює флуоресценцію. Порівнюють інтенсивність флуоресценції двох проб за допомогою флуориметра.

Додають у кожную пробірку на кінці скальпеля порошок сульфату натрію (відновник) і спостерігають за згасанням флуоресценції.

### **9.4. Визначення цитохрому с**

**Матеріали та реактиви:** 1 %-й розчини цитохрому с, концентрована соляна кислота, металевий цинк, 0,5 М розчин аскорбінової кислоти.

## Порядок виконання роботи

Розчин цитохрому с має червоний колір, після відновлення забарвлення втрачається. Як відновник поза організмом може бути використаний водень, що утворюється під час взаємодії концентрованої соляної кислоти і металевого цинку. Аскорбінова кислота може бути відновником цитохрому с як *in vitro*, так і *in vivo*.

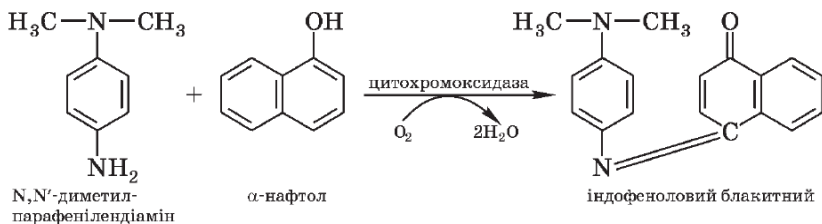
В одну пробірку вносять невелику частину розчину цитохрому с, у другу пробірку з газовідвідною трубкою – декілька мілілітрів концентрованої хлоридної кислоти і невеликий кусок металевого цинку. Закривають другу пробірку пробкою, зовнішній кінець трубки занурюють у першу пробірку, щоб крізь розчин цитохрому с проходили бульбашки водню. Через деякий час розчин помітно блідне (порівнюють забарвлення з контрольним розчином цитохрому с). Під час стояння розчин цитохрому с поступово знову набуває колишнього забарвлення унаслідок його окиснення киснем повітря. У третю пробірку вносять 1 – 2 мл розчину цитохрому с, додають 3 мл розчину 0,5 М аскорбінової кислоти. Спостерігають зникнення забарвлення.

## 9.5. Визначення цитохромоксидази

**Матеріали та реактиви:** свіжа м'язова тканина, відновний реактив: 1 %-й розчин диметил-п-фенілендіаміну, 1,5 %-й розчину карбонату натрію і 1%-й розчин  $\alpha$ -нафтолу в спирті змішують в рівних об'ємах, розчин повинен мати темно-коричневий колір без рожевого відтінку, його готують заздалегідь (за 1 год до заняття); 1 %-й розчин азиду натрію.

## Порядок виконання роботи

Цитохромоксидаза здатна окиснювати за участю кисню не тільки цитохроми, але й деякі інші сполуки, наприклад  $\alpha$ -нафтол і N,N'-диметил-п-фенілендіамін (відновний реактив). Унаслідок їх окиснення утворюється кольоровий продукт – індофеноловий блакитний:



Подрібнюють ножицями і ретельно розтирають у ступці 5 г свіжої м'язової тканини, додають порціями 20 мл води. М'язову кашку фільтрують через подвійний шар марлі і багаторазово промивають водою до знебарвлення промивних вод. Безбарвну масу, яка містить цитохромоксидазу, комплекс цитохромів і деякі дегідрогенази, віджимають між аркушами фільтрувального паперу. Одержаний залишок кашки розділяють на три частини: одну переносять у пробірку, а дві інші залишають на фільтрувальному папері. До кашки в пробірку доливають 2 мл води і кип'ячать уміст на водяній бані 1 хв. Пробірку охолоджують, обережно зливають рідину, а м'язову кашку за допомогою скляної палички переносять на інший аркуш фільтрувального паперу. На першу порцію м'язової кашки (кип'ячену) і другу (некип'ячену) наносять по 2–3 краплі відновного реактиву, третю (некип'ячену) спочатку змочують 1 %-м розчином азиду натрію, а через 3 хв на неї наносять 2–3 краплі реактиву НАДІ. Порівнюють забарвлення трьох проб.

### Оброблення експериментальних даних

Побудуйте схему послідовних етапів виділення мітохондріальної фракції та субмітохондріальних фрагментів з тваринних тканин. Напишіть окисно-відновні реакції за участю цитохромів ДЛ. Напишіть формулу гему у складі цитохрому в.

### Контрольні запитання та завдання

1. Назвіть внутрішньомітохондріальну локалізацію ферментів ЦТК та ДЛ.
2. Чому для виявлення активності дегідрогеназ у

субмітохондріальних фрагментах (препараті Кейліна–Хартрі) необхідно в реакційну суміш додавати розчин цитохрому с?

3. Напишіть перетворення ФАД, ФМН, НАД, НАДФ у ході окисно-відновної реакції. Укажіть ділянки молекул, що змінюються.

4. Поясніть принцип методу виявлення цитохрому с в досліджуваному розчині.

5. З яких білково-ліпідних комплексів складається ДЛ?

6. Назвіть місця спряження дихання та фосфорилування.

7. Чим зумовлено послідовність ферментів та переносників ДЛ?

8. Які речовини є інгібіторами ДЛ?

9. Які речовини роз'єднують процеси дихання та окисного фосфорилування?

10. Які речовини є інгібіторами окисного фосфорилування? На який фермент вони впливають?

11. Поясніть хеміосмотичну теорію Мітчела.

**Література:** [1; 4–7].



## Лабораторна робота 10

### ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ПІДТВЕРДЖЕННЯ МЕТАБОЛІЧНИХ ПЕРЕТВОРЕНЬ АМІНОКИСЛОТ

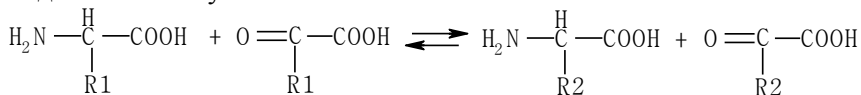
**Мета роботи:** підтвердити в модельних дослідах ензиматичні перетворення амінокислот.

#### Основні теоретичні відомості

Метаболізм або обмін речовин – сукупність біохімічних реакцій, що забезпечують життєдіяльність організму. Метаболізм поділяється на анаболізм та катаболізм. У процесі анаболізму з амінокислот синтезуються пептиди та білки. Загальними для амінокислот катаболічними реакціями є декарбоксилування, дезамінування, трансамінування або переамінування. Унаслідок декарбоксилування в організмі амінокислота втрачає карбоксильну групу, виділяється  $\text{CO}_2$  та утворюється біогенний амін.

Дезамінування поділяється на чотири види – внутрішньомолекулярне, відновне, гідролітичне та окисне, у результаті яких утворюються аміак та ненасичена карбонова кислота, насичена карбонова кислота,  $\alpha$ -оксикислота або  $\alpha$ -кетокислота відповідно. Найбільше притаманно живим організмам окисне дезамінування.

Трансамінування (непряме дезамінування або переамінування) – це реакція між  $\alpha$ -амінокислотою та  $\alpha$ -кетокислотою, унаслідок якої утворюються нові  $\alpha$ -амінокислота та  $\alpha$ -кетокислота без проміжного виділення аміаку.



Реакція каталізується ферментами амінотрансферазами (трансaminaзами), коферментами яких є піридоксальфосфат (ПАЛФ) та піридоксамінфосфат (ПАМФ). Амінотрансферази виявлені у більшості тваринних та рослинних тканин, а також у мікроорганізмів.

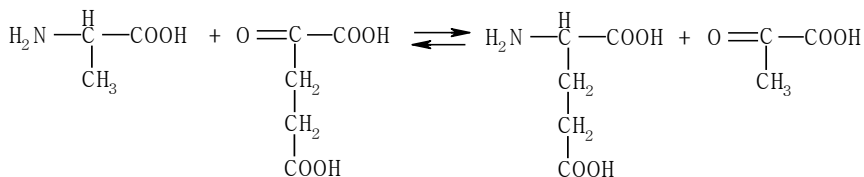
**Обладнання:** штатив із пробірками, скляні палички, капіляри, піпетки, скляні лійки, колби, водяна баня, крапельниця, термостат, газовий пальник, хроматографічний папір, паперові фільтри, пластинки для хроматографії Silufol, чашка Петрі для радіальної або стакан для висхідної хроматографії, пульверизатор, годинник, центрифуга лабораторна, фотоелектроколориметр (ФЕК).

### **10.1. Трансамінування між аланіном та $\alpha$ -кетоглутаровою кислотою**

**Матеріали та реактиви:** ферментний препарат (5 г пивних дріжджів розтирають у фарфоровій ступці з 2–3 мл дистильованої води та невеликою кількістю скляного піску, додають 8–10 мл води та фільтрують крізь вату), 1 %-й розчин аланіну, 1%-й розчин глутамінової кислоти, 1%-й розчин піровиноградної кислоти або пірувату натрію, 1%-й розчин  $\alpha$ -кетоглутарової кислоти, 0,1 %-й розчин карбонату калію, 0,025 %-й розчин монобромцтової кислоти, 10 %-й розчин трихлороцтової кислоти, свіжовиготовлений нінгідриновий реактив (9,5 мл 0,5 %-го розчину нінгідрину в 95 %-му ацетоні, 0,1 мл льодяної оцтової кислоти та 0,4 мл дистильованої води), суміш н-бутанолу, льодяної оцтової кислоти, води (4:1:5), концентрований розчин КОН (100 г КОН розчиняють у 60 мл дистильованої води), 2 %-й спиртовий розчин саліцилового альдегіду.

#### **Порядок виконання роботи**

Процес переамінування між аланіном та  $\alpha$ -кетоглутаровою кислотою каталізується ферментом аланінамінотрансферазою (АлАТ), в результаті утворюються піровиноградна (ПВК) та глутамінова кислоти. Реакція перебігає за участю ПАЛФ та ПАМФ, виділення аміаку не відбувається, як проміжні сполуки утворюються заміщені іміни або основи Шиффа. У ході реакції зменшуються вміст аланіну та  $\alpha$ -кетоглутарату, утворюються глутамінова кислота та піруват:



У дві пробірки наливають по 0,5 мл розчину аланіну, 0,5 мл розчину  $\alpha$ -кетоглутарової кислоти, 1 мл розчину  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (для одержання оптимального рН), 0,25 мл розчину монобромцтової кислоти, щоб запобігти перебігу реакцій гліколізу (для гальмування реакції відновлення пірувату в лактат). У дослідну пробірку вносять по 1 мл ферментного препарату, в контрольну – 1 мл ферментного препарату, прокип'яченого протягом 2–3 хв для інактивації ферментів, а далі охолодженого. Досліджувану та контрольну пробірки закривають пробками та інкубують у термостаті за температури  $37\text{ }^\circ\text{C}$  1 год. Для осадження білків у кожен пробірку додають по 0,25 мл 10 %-го розчину трихлороцтової кислоти й відфільтровують суміш.

Появу пірувату доводять реакцією із саліциловим альдегідом. Уміст аланіну та глютамінової кислоти в фільтраті визначають хроматографічним методом.

### ***Реакція на пірвіноградну кислоту***

До 2 мл фільтрату з кожної пробірки додають по 2 мл розчину  $\text{KOH}$  та по 1 мл розчину саліцилового альдегіду, пробірки струшують та інкубують 10–12 хв за температури  $37\text{ }^\circ\text{C}$ . У дослідній пробірці набуває інтенсивного жовтогарячого забарвлення, що свідчить про утворення ПВК. У контрольній пробірці забарвлення лишається світложовтим.

Для побудови калібрувальної кривої в 5 пробірок вносять 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 та 1,0 мл розчину ПВК, об'єм доводять водою до 2 мл. У кожен пробірку додають 2 мл розчину  $\text{KOH}$  та 1 мл розчину саліцилового альдегіду, пробірки струшують та інкубують 10–12 хв за температури  $37\text{ }^\circ\text{C}$ .

Вимірюють оптичну густину розчинів проти дистильованої води на ФЕК з використанням синього світлофільтра, довжина хвилі 450–480 нм.

### ***Радіальна хроматографія на папері***

Хроматографічний папір вирізають у вигляді кола, діаметр якого на 0,5 см більший від діаметра чашки Петрі. Вирізають смужку до центра кола і загинають її вниз. Олівцем ділять коло на 4 сегменти. На відстані 0,5 см від центра кола відмічають лінію старту, в сегментах на неї капіляром по краплинах наносять 2–3 рази один з розчинів: фільтрат дослідної проби, фільтрат контрольної проби, стандартний розчини аланіну або глютамінової кислоти, щоразу обережно підсушуючи папір над пальником. На дно чашки Петрі наливають суміш н-бутанолу, льодяної оцтової кислоти, води, папір занурюють відрізаною смужкою в рідину, закривають чашку. Хроматографію припиняють, коли фронт розчинника дійде майже до краю паперу (0,5 – 1 см від краю). Папір виймають і зразу ж олівцем відмічають фронт розчинника.

Хроматограму проявляють, а саме: обережно висушують над пальником, обробляють розчином нінгідрину, висушують в сушильній шафі за температури 70 °С протягом 10 – 15 хв. Відмічають олівцем забарвлені плями. Розраховують  $R_f$  для кожної плями як відношення відстані, що пройшла амінокислота, до відстані, що пройшов розчинник, порівнюють положення плям, одержаних з контрольного та дослідного фільтратів із плямами аланіну та глютамінової кислоти. Порівнюють розміри плям.

### ***Тонкошарова хроматографія***

Із пластинки Silufol вирізають прямокутник розміром 4×10 см. На відстані 0,5 см від нижнього краю пластини обережно олівцем проводять лінію старту, наносять на неї в окремих точках капіляром 2–3 рази, щоразу підсушуючи, стандартні розчини амінокислот та досліджувані розчини. Опускають пластину в стакан із сумішшю н-бутанолу, льодяної оцтової кислоти, води таким чином, щоб лінія старту не була занурена в рідину. Закривають стакан скляною кришкою й очікують, поки фронт розчинника підніметься вгору, не доходячи 0,5 см до верхнього краю пластини. Пластину виймають, олівцем відмічають лінію фронту розчинника.

Хроматограму проявляють та оцінюють так само, як у разі радіальної хроматографії на папері.

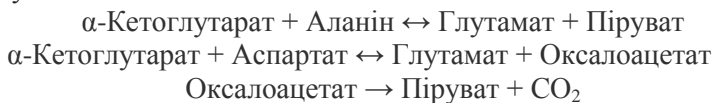
Для визначення абсолютного значення зменшення вмісту аланіну на пластинку або хроматографічний папір наносять відомі кількості аланіну та досліджуваних фільтратів. За допомогою одного із методів кількісного визначення амінокислот (візуальне порівняння, денситометрія чи елюція з хроматограм) визначають вміст аланіну в фільтраті проби та контролю. Аналізуючи одержані результати, установлюють зменшення вмісту аланіну в пробі порівняно з контролем.

## **10.2. Визначення активності аспартатамінотрансферази та аланінамінотрансферази у сироватці крові за Райтманом і Френкелем**

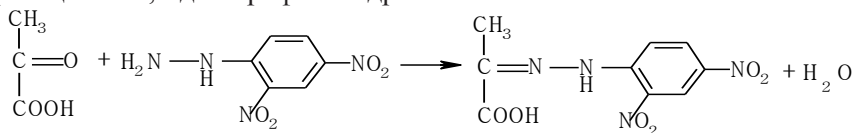
**Матеріали та реактиви:** кров, 0,1 %-й розчин 2,4-динітрофенілгідразину (ДНФГ), 0,4 М розчин NaOH, 1 мкМ розчин пірувату, субстратно-буферні суміші. (Для визначення активності АсАТ 29,2 г  $\alpha$ -кетоглутарової кислоти і 2,66 г D,L-аспарагінової кислоти (1,33 г L-аспарагінової кислоти) розчиняють у 1 М розчині натрію гідроксиду до повного розчинення осаду (рН 7,4), розчин переливають у мірну колбу на 100 мл і доводять об'єм до мітки 0,1 М фосфатним буфером (рН 7,4), додають 1 краплю хлороформу, зберігають у холодильнику в замороженому стані. Для визначення активності АлАТ субстратно-буферну суміш готують аналогічно, замість аспарагінової кислоти беруть 1,78 г D,L-аланіну (0,89 г L-аланіну)).

### **Порядок виконання роботи**

Метод ґрунтується на визначенні пірвіноградної кислоти (пірувату, ПВК), яка є одним із продуктів реакції, що каталізується АлАТ, або продуктом декарбоксілування оксалоацетату (щавлевооцтової кислоти, ЩОК), що утворюється в реакції, яка каталізується АсАТ:



Утворена пірвіноградна кислота визначається кольоровою реакцією з 2,4-динітрофенілгіdraзином:



Кров витримують 30 хв за температури 30 °С у водяній бані, далі центрифугують 15 хв за швидкості обертання 3 000 об/хв. Надосадову рідину використовують для визначення активності ферментів.

### ***Визначення активності АсАТ***

У пробірку вносять 0,5 мл субстратно-буферної суміші, що містить аспартат, витримують у термостаті 5 хв за температури 37 °С, додають 0,1 мл сироватки крові, інкубують 60 хв за температури 37 °С. Далі додають 0,5 мл розчину ДНФГ і лишають на 20 хв за кімнатної температури (18–25 °С). Додають 5 мл розчину гідроксиду натрію, ретельно перемішують і витримують 10 хв за кімнатної температури. Виміряють оптичну густину на ФЕК, використовуючи зелений світлофільтр (довжина хвилі 500–560 нм), у кюветі завтовшки 1 см.

Контрольну пробу готують так само, як і дослідну, але сироватку крові додають після інкубації 60 хв за температури 37 °С та додавання ДНФГ.

### ***Визначення активності АлаТ***

У пробірку вносять 0,5 мл субстратно-буферної суміші, що містить аланін, витримують в термостаті 5 хв за температури 37 °С, додають 0,1 мл сироватки крові, інкубують 30 хв за температури 37 °С. Далі визначення проводиться так само, як і АсАТ.

### ***Побудова калібрувальної кривої***

Для побудови калібрувальної кривої беруть 0,1, 0,2, 0,3, 0,5 мл розчину пірвату, до 0,6 мл доливають водою, далі додають 0,5 мл розчину ДНФГ і досліджують так само, як контрольну і дослідну проби. Будують графік залежності оптичної густини від вмісту ПВК в пробі (кмоль).

### ***Розрахунок активності ферментів***

Активність АсАТ та АлАТ виражають у мікромолях ПВК, що утворюються унаслідок інкубації за температури 37 °С протягом 60 хв 1 мл сироватки крові. Кількість ПВК знаходять за калібрувальною кривою, множать на 10 для перерахунку на 1 мл сироватки, для АлАТ додатково множать на 2 для перерахунку на 60 хв інкубації.

Фізіологічні значення активності амінотрансфераз у розрахунку на 1 мл сироватки крові після інкубації за температури 37 °С протягом 1 год.: АсАТ – 0,1– 0,5 мкмоль/год·мл; АлАТ – 0,1 – 0,7 мкмоль/год·мл.

### **Оброблення експериментальних даних**

Побудуйте калібрувальні графіки для визначення вмісту пірвіноградної кислоти в розчині та для визначення активності амінотрансфераз у сироватці крові. Розрахуйте вміст ПВК та активність АсАТ і АлАТ. Порівняйте результати радіальної хроматографії на папері та тонкошарової хроматографії.

### **Контрольні запитання та завдання**

1. Напишіть реакцію трансамінування між аспарагіноювою кислотою та пірватом або  $\alpha$ -кетоглутаратом. Назвіть фермент, коферменти, проміжні продукти реакції. Поясніть взаємозв'язок між трансамінуванням та дезамінуванням в організмі.

2. Напишіть реакції декарбоксилування гістидину, лізину,  $\alpha$ -декарбоксилування глютамінової кислоти. Назвіть ферменти, коферменти, продукти реакції, поясніть їх біологічну роль.

3. Напишіть реакції дезамінування аланіну (4 види). Назвіть ферменти, коферменти, продукти реакцій.

4. Назвіть шляхи утворення та детоксикації аміаку в організмі. Які кінцеві продукти білкового обміну?

5. У яких анаболічних реакціях беруть участь амінокислоти?

6. Напишіть реакцію утворення глутатіону, поясніть його біологічне значення.

**Література:** [1; 3–7].

## Лабораторна робота 11

### МОДЕЛЮВАННЯ РЕАКЦІЙ ГЛІКОЛІЗУ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

**Мета роботи:** підтвердити експериментально перетворення глюкози гліколітичним шляхом.

#### Основні теоретичні відомості

Гліколіз – це метаболічний шлях перетворення глюкози на піруват (в аеробних умовах) або на лактат (в анаеробних умовах). Анаеробний гліколіз – основний шлях енергетичного метаболізму за відсутності кисню. Сумарний енергетичний ефект гліколізу – утворення двох молекул АТФ у розрахунку на одну молекулу глюкози.

Ферменти гліколізу містяться в цитоплазмі. Гліколіз складається з двох стадій. У результаті першої стадії – фосфорилувань – з глюкози, що є гексозою, утворюються дві фосфотріози. Одна з них – гліцеральдегід-3-фосфат – є субстратом другої стадії гліколізу, яка називається стадією гліколітичної оксидоредукції. Гліцеральдегід-3-фосфат окиснюється, відновні еквіваленти від нього та від неорганічного фосфату акцептуються коферментом НАД<sup>+</sup>, який переносить два атоми водню на піруват, що перетворюється в лактат.

Перебіг процесу гліколізу можна експериментально підтвердити утворенням молочної кислоти і зменшенням вмісту неорганічного фосфату в інкубаційній суміші за наявності в ній гліколітичних ферментів та субстрату – глюкози.

**Обладнання:** пробірки, піпетки, фарфорова ступка з пестиком, скляний пісок, вата, лійка, рН-метр, фільтри, термостат, ваги, крапельниця.

#### 11.1. Вивчення процесу гліколізу в суспензії дріжджів



**Матеріали та реактиви:** пивні дріжджі (5 г) розтирають у фарфоровій ступці з 2–3 мл дистильованої води та невеликою кількістю скляного піску, додають 8–10 мл води та фільтрують крізь вату; фосфатний буфер 1/15 М, рН = 7,4 (9,46 г/л  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 10,40 г/л  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , доводять рН до 7,4, змішуючи розчини), 1 %-й розчин глюкози, вазелінове масло, 2 %-й розчин трихлороцтової кислоти (ТХО), 1 %-й розчин  $\text{FeCl}_3$ , 1 %-й розчин фенолу, розчин молібдату амонію (0,5 г чистого молібдату амонію розчиняють у 100 мл води, фільтрують, змішують із 100 мл 10 М розчину сірчаної кислоти), 0,1 %-й розчин аскорбінової кислоти.

### Порядок виконання роботи

Дві пробірки заповнюють реактивами за табл.11.1.

Таблиця 11.1

#### Вміст контрольної та дослідної пробірок

Вміст, мл	Пробірки	
	контрольна	дослідна
Суспензія дріжджів	1	1
Фосфатний буфер	2	2
Розчин глюкози	2	2
Розчин ТХО	2	–
Нашаровують на вміст пробірок по 10 крапель вазелінового масла та інкубують 60 хв за температури 37 °С		
Розчин ТХО	–	2
Вмісту пробірок фільтрують		
Визначення молочної кислоти і зменшення вмісту неорганічного фосфору		

В одну з пробірок (контрольна проба) відразу вносять 2 мл розчину трихлороцтової кислоти для інактивації ферментів і перемішують.

Вазелінове масло нашаровують в обидві пробірки для створення анаеробних умов. Інкубують у термостаті за температури 37 °С. Через 1 год. у пробірку з досліджуваною пробою додають 2 мл розчину трихлороцтової кислоти і перемішують. Уміст обох пробірок фільтрують, звільняючи від білка.

Після інкубації визначають утворену молочну кислоту, яка є кінцевим продуктом гліколізу, і зменшення вмісту неорганічного фосфору (використаного в реакціях фосфорилювання).

#### ***Визначення молочної кислоти в інкубаційному середовищі***

Із кожної пробірки беруть по 1,0 мл розчину, додають по 5 крапель 1 %-го  $\text{FeCl}_3$  і по 1,0 мл 1 %-го розчину фенолу. Унаслідок взаємодії феноляту заліза фіолетового кольору з молочною кислотою утворюється лактат заліза жовто-зеленого кольору.

Спостерігають появу жовто-зеленого забарвлення.

#### ***Визначення неорганічного фосфору в інкубаційному середовищі***

Із кожної пробірки беруть по 1,0 мл рідини, додають по 1,0 мл молібдату амонію і спостерігають зміну кольору. Взаємодія неорганічного фосфору з молібдатом амонію зумовлює утворення в кислому середовищі амонійної солі фосфорномолібденової кислоти –  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{MoO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  характерного жовтого кольору.

Додають по 1 мл розчину аскорбінової кислоти. Уміст пробірок добре перемішують. Молібдат амонію внаслідок відновлення аскорбіновою кислотою перетворюється на фосфорномолібденову синь, інтенсивність забарвлення якої пропорційна вмісту фосфору в досліджуваному матеріалі.

Через 10 хв проби фотометрують із червоним світлофільтром.

#### **Оброблення експериментальних даних**

Напишіть послідовно всі реакції анаеробного гліколізу, виділіть стадії, покажіть реакції фосфорилювання, субстратного фосфорилювання, окисно-відновні реакції. Покажіть реакцію, у якій використовується неорганічний фосфат; утворюється лактат.

Результати експерименту занесіть до табл.11.2.

Таблиця 11.2

**Визначення молочної кислоти (утворюється в ході гліколізу) та неорганічного фосфату (використовується в ході гліколізу)**

Уміст пробірок	Джерело ферментів гліколізу	Субстрат	Реакція на молочну кислоту	Інтенсивність реакції на $P_i$
Контроль	Дріжджі	Глюкоза		
Дослід	Дріжджі	Глюкоза		

### Контрольні запитання та завдання

1. Напишіть реакцію утворення феноляту заліза, лактату заліза.
2. Поясніть принцип визначення неорганічного фосфату.
3. Поясніть необхідність розтирання дріжджів із скляним піском.
4. Поясніть відмінність між аеробним та анаеробним гліколізом. Якою реакцією вони розрізняються?
5. Які кінцеві продукти та енергетика повного аеробного окиснення глюкози? Наведіть послідовність процесів, які його складають.

Література: [1; 4–7].

## Лабораторна робота 12

### ДОКАЗИ БУДОВИ ТА ВЛАСТИВОСТЕЙ ЛІПІДІВ

**Мета роботи:** дослідити розчинність ліпідів, опанувати методи виявлення ліпідів, доведення їх ненасиченості, виділення складових компонентів простих ліпідів.

### Основні теоретичні відомості

Ліпіди – біоорганічні молекули, які різняться за своєю будовою, функціями, всі є нерозчинними в полярних розчинниках, наприклад у воді, але розчиняються в неполярних органічних розчинниках (ацетон, хлороформ, діетиловий ефір тощо). Під час змішування жирів із водою утворюються емульсії, стійкість яких залежить від середовища, у якому вони створюються. Наявність у воді речовин-

емульгаторів (мила, жовчні кислоти, карбонати тощо) збільшує стійкість емульсій. Утворення емульсій зумовлене тим, що в поверхневий водяний шар, який оточує жирові краплинки, спрямовуються поверхнево-активні частинки жовчних кислот, мила, карбонату, котрі обволікають краплинки жиру і перешкоджають їх злиттю.

Ліпіди переважно є складними ефірами спиртів та вищих жирних кислот (ВЖК). Вищі жирні кислоти містять понад 10 атомів карбону, можуть бути насиченими або мати у своєму складі подвійні зв'язки. Природні ВЖК мають парну кількість атомів карбону, зигзагоподібну конформацію радикала, для ненасичених подвійні зв'язки є метиленрозділеними. Вітамін F є комплексом поліненасичених ВЖК. Арахідонова кислота – поліненасичена ВЖК, з якої в організмі синтезуються тканинні гормони.

Прості ліпіди побудовані лише зі спирту та ВЖК. Складні ліпіди містять ще додаткові компоненти – фосфат, вуглеводи, аміноспирти, амінокислоти тощо. Фосфоліпіди є основними молекулами, з яких побудовані біологічні мембрани. Ліпіди є важливим джерелом енергії, вони нагромаджуються в організмі. Резервними ліпідами є нейтральні ліпіди (тригліцериди (ТГ), триацилгліцероли). Вони побудовані з трьохатомного спирту гліцерину та ВЖК.

**Обладнання:** штатив із пробірками, піпетки, крапельниці, мірні колби, хімічні стакани, лійки, водяна баня, газовий пальник.

### 12.1. Розчинність ліпідів і утворення емульсії

**Матеріали та реактиви:** олія, спирт, бензол, хлороформ, 1 %-й розчин  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

#### Порядок виконання роботи

У чотири пробірки наливають по 0,2–0,3 мл олії, потім у першу додають 5 мл води, у другу – 5 мл спирту, у третю – 5 мл бензолу, у четверту – 5 мл хлороформу. Уміст усіх пробірок енергійно струшують. У першій пробірці олія та вода швидко діляться на два шари, у другій пробірці утворюється каламутний розчин унаслідок

недостатньої розчинності олії в спирті, у третій і четвертій – розчини прозорі.

У дві пробірки вносять по кілька крапель олії. В одну з них додають 2 мл води, у другу – 2 мл розчину  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , уміст пробірок інтенсивно струшують і спостерігають утворення емульсії. Відзначають різну стійкість емульсій у двох пробірках.

## **12.2. Виявлення ненасиченості ліпідів**

**Матеріали та реактиви:** розчин вершкового масла в хлороформі (0,2 – 0,25 г масла в 1 мл хлороформу), розчин олії в хлороформі (така сама кількість олії в 1 мл хлороформу), насичена бромна вода (5 г бром у 100 мл води в колбі з притертою пробкою струшують під витяжкою, іноді відкриваючи пробку для вивільнення парів бром у).

### **Порядок виконання роботи**

Жири рослинного походження містять більшу кількість залишків ненасичених жирних кислот, ніж жири тваринного походження. Різний ступінь ненасиченості ліпідів можна виявити на прикладі насичення бромом вершкового масла або олії.

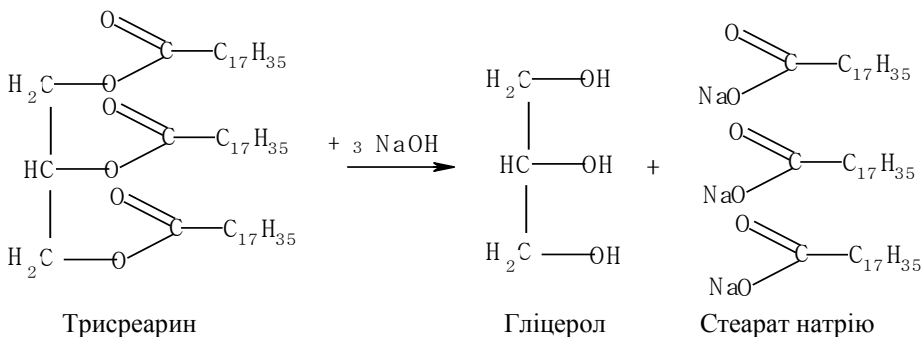
В одну пробірку вносять 1 мл розчину олії в хлороформі, у другу – 1 мл розчину вершкового масла в хлороформі. Потім у кожен пробірку краплинами додають бромну воду до припинення знебарвлення. Фіксують кількість бромної води, унесеної в кожен пробірку.

## **12.3. Омилення жиру, утворення нерозчинного мила та виділення вільних жирних кислот**

**Матеріали та реактиви:** олія, 50 %-й спиртовий розчин  $\text{KOH}$  або  $\text{NaOH}$ , 5 %-й розчин  $\text{CaCl}_2$ , концентрована  $\text{HCl}$ .

### **Порядок виконання роботи**

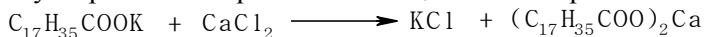
Жири під дією луку гідролізуються, утворюючи мила та гліцерол:



У колбу з 1 мл олії додають 20 мл спиртового розчину КОН (NaOH), перемішують і кип'ячать на водяній бані зі зворотним холодильником протягом 1 год. Після омилення розчин розводять водою до об'єму 20 мл. Одержаний розчин мила використовують для наступних реакцій.

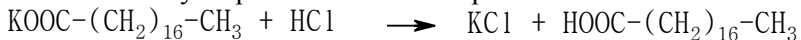
У пробірку з 2 мл розчину мила додають 1 мл розчину  $\text{CaCl}_2$ .

Під час внесення до розчину калієвого мила розчину солей кальцію утворюються нерозчинні кальцієві солі жирних кислот:



Утворюється нерозчинне кальцієве мило (стеарат кальцію).

У пробірку з 2 мл розчину розчинного мила додають 1 мл концентрованої  $\text{HCl}$ . Унаслідок додавання до мила концентрованої соляної кислоти утворюються вільні жирні кислоти:



Спостерігають утворення нерозчинних вільних кислот, які збираються у верхній частині пробірки.

#### 12.4. Якісні реакції на лецитин

**Матеріали та реактиви:** висушений яєчний жовток, спирт, ацетон, насичений розчин хлориду кадмію  $\text{CdCl}_2$  в етанолі, 5 %-й спиртовий розчин ваніліну, концентрована сульфатна кислота, фільтр.

## Порядок виконання роботи

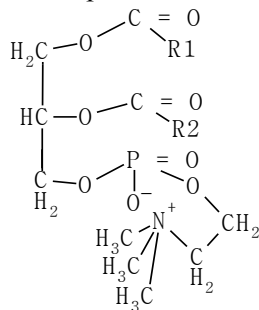
Лецитин (фосфатидилхолін) є одним із представників фосфоацилгліцеролів, які входять до складу біологічних мембран. Лецитин не розчиняється в ацетоні й утворює стійку емульсію з водою. Якісними реакціями на лецитин є реакції з хлоридом кадмію, з ваніліном та сульфатною кислотою.

У стакан, який містить 200–300 мг розтертого яєчного жовтка, додають 15 мл гарячого спирту і перемішують. Через 10–15 хв суміш охолоджують і фільтрують у суху пробірку. В іншу суху пробірку наливають 2–3 мл ацетону й по краплинах додають одержаний фільтрат. Спостерігають появу каламуті, а потім випадіння осаду лецитину, що свідчить про нерозчинність лецитину в ацетоні.

До 2–3 мл фільтрату додають по краплинах дистильовану воду, утвориться стійка емульсія.

До 2–3 мл фільтрату додають таку саму кількість насиченого спиртового розчину хлориду кадмію. Утворюється осад жовтуватобілого кольору.

До 2 мл фільтрату додають 2 краплі 5 %-го спиртового розчину ваніліну, по стінці нашаровують 1 мл концентрованої сульфатної кислоти. Утворюється кільце червоного кольору.



Лецитин

## Оброблення експериментальних даних

Напишіть скорочені та структурні формули пальмітинової, стеаринової, арахінової, олеїнової, пальмітоолеїнової, лінолевої, ліноленової, арахідонової кислот. Класифікуйте ці ВЖК.

Побудуйте таблицю, у якій наведіть формули різних класів ліпідів, вкажіть їх біологічну роль, реакції їх виявлення та хімічні властивості.

Наведіть формули різних видів мила. Напишіть реакції утворення рідкого мила з твердого жиру, твердого мила з рідкого жиру, твердого нерозчинного мила з рідкого жиру.

## Контрольні запитання та завдання

1. Як класифікуються ліпіди? Які ліпіди відкладаються в жирових депо? Напишіть загальну структурну формулу таких ліпідів. Які ліпіди є головним структурним компонентом біологічних мембран? Напишіть формулу будь-якого з них.

2. Які реакції є спільними в біосинтезі нейтральних ліпідів та фосфоацилгліцеролів? За яких умов синтез фосfolіпідів переважає?

3. Які ви знаєте транспортні форми ліпідів? Із яких структурних компонентів вони складаються? Яке значення має кожна з них?

4. Напишіть реакцію взаємодії ненасиченого ліпиду з бромною водою, реакцію Вагнера з олеїною кислотою.

5. Що називається милом? Які мила рідкі, а які тверді? Які мила добре розчиняються у воді, а які є нерозчинними? Із яких речовин можна одержати мило? Напишіть рівняння реакцій. Чому рідкі або розчинні тверді мила не використовуються для прання в морській воді?

6. Які метаболічні перетворення характерні для ліпідів?

7. Напишіть реакції анаеробного та аеробного окиснення гліцерину, розрахуйте його енергетику.

8. Розрахуйте енергетичний ефект повного аеробного окиснення молекули тристеарину.

9. Які вітаміни необхідні для метаболізму ліпідів?

**Література:** [1; 2; 4–7].



## Лабораторна робота 13

### ВИЯВЛЕННЯ ГОРМОНІВ У МОДЕЛЬНИХ РОЗЧИНАХ

**Мета роботи:** підтвердити наявність в модельних розчинах гормонів різної хімічної будови.

#### Основні теоретичні відомості

Гормони – біологічно активні речовини, що виробляються самими організмами, у надзвичайно низьких концентраціях регулюють метаболічні процеси та фізіологічні функції організму. Гормони поділяють на істинні, або справжні, які виділяються в кров і впливають на органи-мішені на відстані (дистантно), та тканинні, або гістогормони, що виділяються в тих же тканинах, на функціонування яких і впливають. Істинні гормони за хімічною будовою поділяють на білково-пептидні, похідні амінокислот, стероїдні. Більшість тканинних гормонів – похідні арахідонової (ейкозантаетраєнової) кислоти, а також похідні амінокислот.

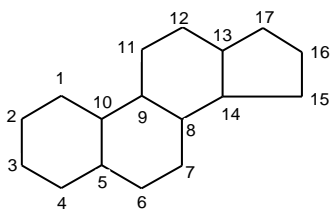
Тиреоїдні гормони – похідні амінокислот фенілаланіну та тирозину – трийодтиронін ( $T_3$ ) і тетраїодтиронін або тироксин ( $T_4$ ) – синтезуються щитоподібною залозою. До їх складу входять відповідно три або чотири атоми йоду. Ці гормони впливають на енергетичний обмін (є роз'єднувачами дихання та фосфорилювання), активують біосинтез білків, морфогенез (стимулюють формування й розвиток органів).

Гормони мозкового шару наднирників – адреналін (епінефрин) та норадреналін (норепінефрин) – також є похідними фенілаланіну та тирозину. Адреналін прискорює частоту та силу серцевих скорочень, підвищує артеріальний тиск, впливає на тонус м'язів шлунково-кишкового тракту, ока тощо. Норадреналін діє як нейромедіатор.

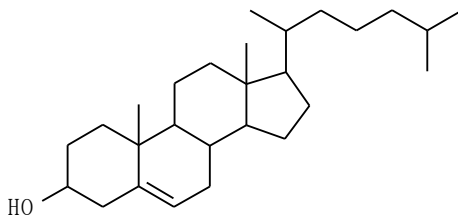
Інсулін – гормон білкової природи, що виробляється підшлунковою залозою, складається з 51 амінокислотного залишку, містить 2 поліпептидні ланцюги – ланцюг А з 21 та ланцюг В з 30 амінокислотних залишків. Ланцюги з'єднані між собою двома дисульфідними зв'язками, ще один дисульфідний зв'язок міститься у

межах ланцюга А. Основна біологічна роль інсуліну – зниження рівня глюкози в крові.

Стероїдні гормони є похідними стерану (циклопентанпергідрофенантрону); попередником для їх синтезу в організмі є холестерол (холестерин):



стеран



холестерол

До стероїдних гормонів належать кортикостероїди (гормони кори наднирників – мінералокортикоїди та глюкокортикоїди), статеві гормони (естрогени, андрогени) та кальцитріол (похідне вітаміну D<sub>3</sub>, сполука гормонального типу дії, бере участь у регуляції обміну кальцію). Стероїдні гормони розрізняються замісниками біля 10-го, 13-го, 17-го атомів карбону. Кортикостероїди містять метильні радикали біля 10-го та 13-го атомів, етильний радикал – біля 17-го атома (усього 21 атом карбону, їх називають C<sub>21</sub>-стероїди). Андрогени не мають етильного радикала біля 17-го атома (C<sub>19</sub>-стероїди). Естрогени мають лише один метильний радикал – біля 13-го атому (C<sub>18</sub>-стероїди). Стероїдні гормони мають у своєму складі гідроксильні та кетогрупи біля різних атомів карбону. Наприклад, андростерон, естрон (фолікулін) мають кетогрупу в 17-му положенні та гідроксильну – у 3-му. Стероїдні гормони виводяться з організму у вигляді 17-кетостероїдів з сечею, 1 – 25 мг на добу, кількість залежить від віку та статі, максимальна екскреція спостерігається у 25-річному віці. У разі стресів кількість 17-кетостероїдів у крові та сечі збільшується.

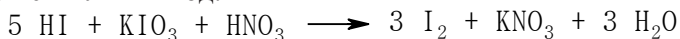
**Обладнання:** штатив із пробірками, піпетки, скляні палички, крапельниці, водяна баня, флуориметр.

### 13.1. Якісні реакції на тиреоїдні гормони

**Матеріали та реактиви:** тиреоїдин, концентрована  $\text{HNO}_3$ , 10 %-й розчин йодату калію  $\text{KIO}_3$ , хлороформ, 10 %-й розчин гідрокарбонату калію  $\text{KHCO}_3$ , 1 %-й розчин крохмалю, 10 %-й розчин сірчаної кислоти.

#### Порядок виконання роботи

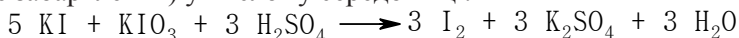
Під час кислотного гідролізу тиреоїдних гормонів утворюється йодидна кислота, унаслідок взаємодії якої з йодатом калію виділяється вільний йод:



Йод у хлороформі має фіолетове забарвлення. У пробірку поміщають кілька кристалів тиреоїдину, додають 10 крапель концентрованої нітратної кислоти і нагрівають 3–5 хв на водяній бані. Потім доливають 20 крапель 10 %-го розчину йодату калію. Уміст перемішують та охолоджують.

У пробірку додають 15 крапель хлороформу, струшують і спостерігають за розвитком забарвлення.

У процесі лужного гідролізу тиреоїдних гормонів (кип'ятіння з  $\text{KHCO}_3$ ) утворюється  $\text{KI}$ . Реакція між йодидом та йодатом є окисно-відновною: йодид калію  $\text{KI}$  є відновником, а калію йодат  $\text{KIO}_3$  – окисником. Виділений йод визначають за допомогою крохмалю (синє забарвлення) у кислому середовищі:



У ступку поміщають 10 таблеток тиреоїдину та ретельно їх розтирають. Розтерту масу пересипають у колбу для гідролізу, додають 20 мл 10 %-го розчину натрію гідрокарбонату. Колбу зі зворотним холодильником поміщають на азбестову сітку і вміст колби кип'ятять 15 хв (з моменту закипання) за помірного нагрівання.

У пробірку відміряють 25 крапель охолодженого гідролізату, додають 3 краплі 1 %-го розчину крохмалю, потім 4 краплі 10 %-го розчину калію йодату і приблизно 10–15 крапель 10 %-го розчину сірчаної кислоти до знебарвлення і далі до появи синього

забарвлення, що з'являється в результаті реакції вільного йоду, який виділився, з крохмалем.

### 13.2. Якісні реакції на інсулін

**Матеріали та реактиви:** розчин інсуліну (препарат інсуліну в ампулах), 0,1 М розчин нінгідрину, концентрована азотна кислота, аміак, реактив Фоля, реактив Міллона, концентрований розчин гідроксиду натрію, 10 %-й розчин гідроксиду натрію (чи калію), 1 %-й розчин сульфату міді, 20 %-й розчин сульфосаліцилової кислоти (ССК).

### Порядок виконання роботи

У п'ять пробірок вносять по 5 крапель інсуліну для ін'єкцій та проводять з ними реакції Фоля, Міллона, нінгідрину, ксатопротеїнову, біуретову (див. лабораторні роботи 1, 2).

Високочутливою є реакція осадження білків ССК. У пробірку з розчином інсуліну (10–20 крапель) додають по 1 краплі розчину ССК, спостерігають випадіння білого осаду.

### 13.3. Якісні реакції на адреналін

**Матеріали та реактиви:** розчин адреналіну 0,1 %-й (препарат адреналіну в ампулах), 1 %-й розчин хлориду заліза (III), 25 %-й розчин аміаку, 1 %-й розчин сульфанілової кислоти, 5 %-й розчин нітриту натрію, 10 %-й розчин карбонату натрію, 0,2 %-й розчин гексацианоферату (III) калію, кристалічна аскорбінова кислота, 10 %-й розчин гідроксиду натрію, 10 %-й розчин йодату калію  $KIO_3$ , 10 %-й розчин оцтової або ортофосфорної кислоти, 5 %-й розчин соляної кислоти, концентрована соляна кислота, нітритно-молібденовий реактив (5 г нітриту натрію та 5 г молібдату натрію розчиняють в 50 мл дистильованої води).

## **Порядок виконання роботи**

### ***Реакція на адреналін із хлоридом заліза (III)***

Адреналін досить легко вступає в окисно-відновні реакції. Гормон та продукти його окислення можна виявити кольоровими реакціями. Із розчином хлориду заліза (III) адреналін та норадреналін утворюють комплексну сполуку смарагдово-зеленого кольору. Із додаванням краплі розчину аміаку забарвлення стає вишнево-червоним, а потім жовтогарячо-червоним.

У пробірку вносять 10 крапель 0,1 %-го розчину адреналіну та 1 краплю 1 %-го розчину хлориду заліза (III). Потім додають 1 краплю аміаку. Спостерігають появу та зміну забарвлення.

### ***Реакція на адреналін з діазобензенсульфо кислотою***

Метод ґрунтується на здатності адреналіну утворювати з діазобензенсульфо кислотою сполуку червоного кольору.

Для одержання діазобензенсульфо кислоти в пробірку відміряють по 3 краплі 1 %-го розчину сульфанілової кислоти та 5 %-го розчину нітриту натрію, перемішують струшуванням. Потім у пробірку додають 5 крапель 0,1 %-го розчину адреналіну та 3 краплі 10 %-го розчину карбонату натрію. Уміст перемішують струшуванням і спостерігають за розвитком забарвлення.

### ***Реакція на адреналін з йодатом калію***

Адреналін у кислому середовищі з йодатом калію утворює сполуку червоно-фіолетового кольору.

У пробірку вносять 1 краплю 0,1 %-го розчину адреналіну, 5 мл води. Відбирають в іншу пробірку 0,5 мл розведеного розчину адреналіну, додають 1 мл розчину  $KIO_3$ , 10 крапель розчину оцтової або ортофосфорної кислоти і підігрівають суміш до температури 60 – 65 °С. Спостерігають появу забарвлення.

### ***Реакція на адреналін з нітритно-молібденовим реактивом***

Адреналін у кислому середовищі внаслідок взаємодії з нітритно-молібденовим реактивом утворює сполуку жовто-жовтогарячого кольору. Із додаванням лугу забарвлення змінюється на малиново-червоне, яке за наявності соляної кислоти переходить у лимонно-жовте.

У пробірку вносять 5 крапель 0,1 %-го розчину адреналіну, додають 5 крапель 5 %-го розчину соляної кислоти, 5 крапель нітритно-молібденового реактиву. Суміш перемішують і спостерігають появу забарвлення. Потім вносять 1 краплю 10 %-го розчину гідроксиду натрію, перемішують, додають 1–2 краплі концентрованої соляної кислоти, спостерігають зміни забарвлення на кожному етапі досліджу.

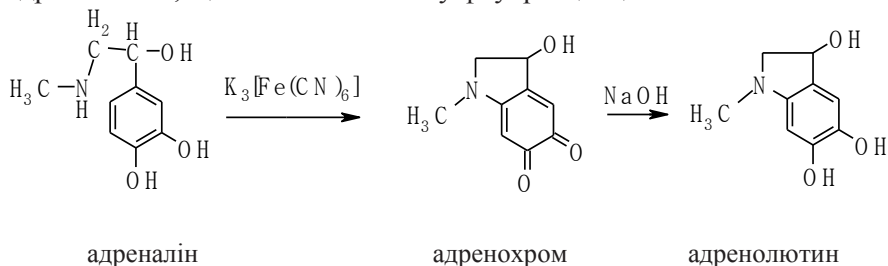
**Визначення адреналіну за флуоресценцією продуктів його окиснення**

Адреналін окиснюється під впливом лугів з утворенням сполук, для яких характерна зелена флуоресценція.

У пробірку вносять 0,5 мл дистильованої води, 5 крапель 10 %-го розчину гідроксиду натрію, 5 крапель 0,1 %-го розчину адреналіну, перемішують. Спостерігають появу флуоресценції за допомогою флуорометра.

**Визначення адреналіну за утворенням флуоресціювального продукту його окиснення – адренолютину**

Адреналін окиснюється під дією гексацианоферату (III) калію в адренохром, з якого в лужному середовищі утворюється адренолютин, що має жовто-зелену флуоресценцію:



У дві пробірки вносять по 1 краплі 0,1 %-го розчину адреналіну і додають в одну з них 5, а в іншу – 10 мл води, перемішують. Із цих пробірок у дві інші пробірки відмірюють по 2 мл розведених розчинів адреналіну, доливають по 0,3 мл 0,2 %-го розчину гексацианоферату (III) калію і залишають на 5 хв (при цьому адреналін окиснюється в адренохром). У кожену пробірку додають на кінчику скальпеля кристалічну аскорбінову кислоту та по 2 мл

розчину 10 %-го розчину гідроксиду натрію (аскорбінова кислота перешкоджає подальшому окисненню адренохрому, а натрію гідроксид сприяє перетворенню його в адренолютин). Пробірки розміщують у штативі флуориметра і порівнюють інтенсивність флуоресценції в пробах.

#### **13.4. Утворення феноляту фолікуліну**

**Матеріали та реактиви:** 1 %-й спиртовий розчин фолікуліну, 30 %-й розчин NaOH.

#### **Порядок виконання роботи**

Естрон (фолікулін) має у своєму складі фенольний гідроксил. У лужному середовищі утворюється розчинний у воді фенолят фолікуліну.

У дві сухі пробірки вливають по 0,5 мл спиртового розчину фолікуліну. В одну з них додають 1 мл води і спостерігають утворення емульсії фолікуліну (розчин каламутніє). У другу пробірку додають 1 мл 30 %-го розчину NaOH – каламуть не з'являється, оскільки в лужному середовищі утворюється розчинний фенолят фолікуліну.

#### **13.5. Якісна реакція на 11-дегідро-17-оксикортикостерон (кортизон)**

**Матеріали та реактиви:** 1 %-й спиртовий розчин кортизону (кортизон-ацетату), реактив Фелінга (див. лабораторну роботу 2).

#### **Порядок виконання роботи**

Кортизон може відновлювати  $\text{Cu}^{+2}$  до  $\text{Cu}^{+1}$ , тому його можна виявити реакцією з реактивом Фелінга.

До 1 мл 1 %-го спиртового розчину кортизону (кортизон-ацетату) додають 1 мл реактиву Фелінга і нагрівають на водяній бані (80 – 90 °C). Спостерігають утворення осаду оксиду міді (I) цегляного кольору.

### **13.6. Якісні реакції на 17-кетостероїди**

**Матеріали та реактиви:** 2 %-й спиртовий розчин м-динітробензолу, 30 %-й розчин гідроксиду натрію, 1 %-й спиртовий розчин естрону, 1 %-й спиртовий розчин андростану, сеча.

#### **Порядок виконання роботи**

У лужному середовищі 17-кетостероїди утворюють з м-динітробензолом продукти конденсації фіолетово-рожевого, вишнево-червоного кольору з максимумом світлопоглинання за довжини хвилі 530 нм. Інтенсивність забарвлення пропорційна кількості 17-кетостероїдів у сечі.

В одну пробірку вносять 5 крапель 1 %-го спиртового розчину фолікуліну, у другу – 5 крапель 1 %-го спиртового розчину андростану, у третю – 5 крапель сечі. У кожену пробірку додають 5 крапель 30 %-го розчину гідроксиду натрію і 5 крапель 2 %-го спиртового розчину м-динітробензолу. Пробірки струшують і спостерігають появу забарвлення через 2–3 хв.

#### **Оброблення експериментальних даних**

Побудуйте таблицю, у якій наведіть: відомі вам гормони; укажіть їх біологічну роль, хімічну природу, ендокринну залозу, що їх виробляє.

Зробіть висновок про вміст певних амінокислотних залишків у молекулі інсуліну. Порівняйте методи виявлення адреналіну.

#### **Контрольні запитання та завдання**

1. Як класифікують гормони за їх хімічною будовою? Наведіть приклади.
2. Які гормони називають справжніми (істинними)? Якими залозами внутрішньої секреції вони виробляються?
3. Який механізм дії гормонів ліпідної природи та тиреоїдних гормонів?



4. Який механізм дії гормонів білкової, пептидної природи та похідних амінокислот?

5. Напишіть схему каскадного механізму гормональної активації ферменту за участі циклічного АМФ (на прикладі глікогенфосфорилази).

6. Які гормони називаються тканинними (гістогормонами)? Яка їх хімічна природа?

7. Назвіть йодовмісні гормони щитоподібної залози. Напишіть формулу амінокислоти, з якої вони синтезуються.

8. Наведіть визначення енольного гідроксилу, фенольного гідроксилу. Напишіть реакцію фенолу з  $\text{FeCl}_3$ . Який гормон має фенольний гідроксил?

9. Поясніть принцип якісних реакцій на адреналін.

10. Що називається 17-кетостероїдами? Як можна їх виявити в біологічних рідинах?

11. Як можна виявити гормони білкової природи в розчинах?

12. Напишіть структурні формули стерану, холестерину.

13. Як розрізняються між собою за будовою кортикостероїди, статеві гормони?

14. Які особливості будови фолікуліну дозволяють виявляти його якісними реакціями?

**Література:** [1; 4–7].

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Біологічна хімія* : лаб. практикум [Під ред. Я.І.Гонського].– Тернопіль : Укрмедкнига, 2001. – 288 с.
2. *Біохімія* : практикум (статика) / Ф.Ф.Боєчко, Л.О.Боєчко, І.В.Шмиголь, Н.В.Чепчуренко – Черкаси : Вид-во ЧНУ, 2006. – 352 с.
3. *Кучеренко М.Є.* Сучасні методи біохімічних досліджень / М.Є. Кучеренко, Ю.Д. Бабенюк, В.М. Войціцький. – К. : Фітосоціоцентр, 2001. – 344 с.
4. *Лабораторні та семінарські заняття з біологічної хімії*: навч. посіб. для студ. вищ. навч. закл. / Л. М. Вороніна, В. Ф. Десенко, А. Л. Загайко та ін.— Х.: Вид\_во НФаУ; Оригінал, 2004.— 384 с.
5. *Лисиця А.В.* Біохімія : практикум [Навч. посіб.] / А.В. Лисиця. – Суми : Університетська книга, 2009. – 240 с.
6. *Практикум з біологічної хімії* / [Д.П. Бойків, О.Л. Іванків, Л.І. Кобилянська та ін.] / за ред. О.Я. Скіярова. – К. : Здоров'я, 2002. – 298 с.
7. *Шевряков М.В.* Практикум з біологічної хімії / Шевряков М.В., Яковенко Б.В., Явоненко О. Ф. – Суми: Університетська книга, 2003. – 204 с.

## ЗМІСТ

<b>Вступ</b> .....	3
<b>ЗАХОДИ БЕЗПЕКИ ПІД ЧАС ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ</b> .....	4
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 1. Якісні реакції на амінокислоти.....	5
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 2. Якісна реакція на пептиди та білки. Розділення білків методом висолювання. Визначення основних складових компонентів нуклеопротеїнів.....	13
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 3. Якісні реакції на моносахариди, відновлювальні дисахариди, крохмаль.....	20
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 4. Визначення хімічних параметрів жирів.....	26
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 5. Виявлення вітамінів у модельних розчинах.....	32
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 6. Визначення наявності ферменту в біологічній рідині. Визначення специфічних властивостей ферментів як біологічних каталізаторів.....	42
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 7. Дослідження специфічності дії гідролітичних ферментів.....	49
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 8. Експериментальне підтвердження функціонування циклу трикарбонних кислот.....	53
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 9. Експериментальне підтвердження функціонування дихального ланцюга.....	56
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 10. Експериментальне підтвердження метаболічних перетворень амінокислот.....	65
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 11. Моделювання реакцій гліколізу в експерименті.....	72
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 12. Докази будови та властивостей ліпідів.....	75
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 13. Виявлення гормонів у модельних розчинах.....	81
<b>Список літератури</b> .....	90

*Навчальне видання*

## **БІОХІМІЯ**

Лабораторний практикум  
для студентів спеціальностей 091 «Біологія» та 014 «Середня освіта  
(Біологія)».  
Рівне: РДГУ, 2021

Укладач: ДЕМЧУК Василь Володимирович