МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут ім. Ігоря Сікорського»

БІООРГАНІЧНА ХІМІЯ

Методичні вказівки
до виконання лабораторних робіт
для студентів спеціальності
161 Хімічні технології та інженерія

Київ
НТУУ «КПІ»
2017

Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з дисципліни “Біоорганічна хімія” для студентів спеціальності 161 «Хімічні технології та інженерія» / Уклад.: Л. А. Хрокало, О. Е. Чигиринець., В. І. Воробйова – К. : НТУУ «КПІ ім. Ігоря Сікорського», 2017. – 94 с.

Гриф надано Вченою радою
Хіміко-технологічного факультету
НТУУ «КПІ»
(Протокол № 2 від 27.02.2017)

Навчальне видання

Біоорганічна хімія

Методичні вказівки

до виконання лабораторних робіт

для студентів спеціальності 161 «Хімічні технології та інженерія»

Укладачі: *Хрокало Людмила Анатоліївна* канд. біол. наук, доц.
Чигиринець Олена Едуардівна доктор техн. наук, проф.
Воробйова Вікторія Іванівна канд. техн. наук

Відповідальний редактор: *Єфімова Вероніка Гаріївна* к.т.н., доцент

Рецензент: *Василькевич Олександр Іванович,* к.х.н., доцент

За редакцією укладачів

ЗМІСТ

ВСТУП....4

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 1. ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ МОНОСАХАРИДІВ ТА ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА ЇХ ВИЯВЛЕННЯ В РОЗЧИНАХ 5

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 2. ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ДИСАХАРИДІВ І ПОЛІСАХАРИДІВ ТА ЇХ ІДЕНТИФІКАЦІЯ....13

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 3. КІЛЬКІСНИЙ АНАЛІЗ ВМІСТУ ВУГЛЕВОДІВ У БІОЛОГІЧНОМУ МАТЕРІАЛІ....20

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 4. ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ЛІПІДІВ ТА ЇХ ІДЕНТИФІКАЦІЯ 26

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 5 ВИЗНАЧЕННЯ ХІМІЧНИХ КОНСТАНТ АЦИЛГЛІЦЕРОЛІВ 33

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 6. ЗАГАЛЬНІ ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ АМІНОКИСЛОТ ТА БІЛКІВ....39

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 7. ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА АМІНОКИСЛОТИ....47

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 8. ІДЕНТИФІКАЦІЯ АМІНОКИСЛОТ МЕТОДОМ ПАПЕРОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ....53

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 9. ДЕНАТУРАЦІЯ ТА ОСАДЖЕННЯ БІЛКІВ 59

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 10. ГРУПИ КРОВІ ЗА СИСТЕМОЮ АВ0 ТА Rh МЕТОДИ ЇХ ВИЗНАЧЕННЯ 64

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 11. ВПЛИВ УМОВ СЕРЕДОВИЩА НА ФЕРМЕНТАТИВНІ РЕАКЦІЇ. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ДІЇ ФЕРМЕНТІВ 73

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 12. ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА ВОДОРОЗЧИННІ І ЖИРОРОЗЧИННІ ВІТАМИНИ 82

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ....90

ВСТУП

В комплексній підготовці інженерів-технологів з виробництва харчових добавок та косметичних засобів важливою є дисципліна «Біоорганічна хімія», що вивчає хімічну будову, властивості і біологічні функції основних класів біомакромолекул: білків, ліпідів, вуглеводів, нуклеїнових кислот. Одержані знання допоможуть майбутнім фахівцям аналізувати склад харчових добавок і косметичних засобів з точки зору ефективності їх дії та безпеки для здоров'я людини і розробляти нові продукти з урахуванням зазначених аспектів.

Лабораторний практикум розроблений з метою закріплення теоретичного матеріалу шляхом формування у студентів навичок роботи з біологічним матеріалом, проведення якісних реакцій та кількісного аналізу для виявлення вмісту окремих сполук. До практикуму включені типові лабораторні роботи з наступних розділів біоорганічної хімії: вуглеводи, ліпіди, білки, ферментативні процеси, вітаміни. Роботи наведені у порядку логічної послідовності у відповідності до курсу лекцій і зростання складності їх виконання: на початку розглянуто загальні та специфічні фізико-хімічні та хімічні властивості біохімічно активних речовин, потім методи їх виділення з біоматеріалу і наостанок кількісний аналіз вмісту певних компонентів.

До кожної лабораторної роботи у скороченому вигляді наведені основні теоретичні відомості щодо класу досліджуваних сполук, необхідні матеріал та обладнання, детально хід виконання роботи і контрольні запитання для підготовки до захисту лабораторної роботи.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 1.

ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ МОНОСАХАРИДІВ ТА ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА ЇХ ВИЯВЛЕННЯ В РОЗЧИНАХ

Виявлення альдегідних властивостей гексозами: реакція Троммера, реакція Фелінга, реакція Барфеда. Якісні реакції на кетози: Селіванова, реакція фруктози з ваніліном.

Мета роботи: ознайомлення з хімічними властивостями моносахаридів (альдоз і кетоз) та їх ідентифікація у водних розчинах шляхом якісних реакцій

Реактиви: водні розчини: глюкози (ω(х) = 5%); фруктози (ω(х) = 5%); сахарози (ω(х) = 1%); гідроксиду натрію (ω(NaOH) = 5%); сульфату міді (ω($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) = 5%); хлоридної кислоти (ω(HCl) = 25%); а також реактив Фелінга*; реактив Барфеда**, розчин ваніліну в кислотах***; резорцин кристалічний,

***Реактив Фелінга.** *Безпосередньо перед застосуванням змішують два розчини: водний розчин № 1 (містить в 1 літрі 200 г калій-натрію виннокислого $C_4H_4O_6KNa \cdot 4H_2O$ (сегнетова сіль) та 150 г NaOH) і водний розчин № 2 (містить в 1 літрі 70 г $CuSO_4 \cdot 5H_2O$).*

****Реактив Барфеда.** *13,3 г ацетату міді розчиняють у 200 мл гарячої води, розчин фільтрують та додають до фільтрату 1,9 мл концентрованої оцтової кислоти)*;

*****Розчин ваніліну в кислотах** *(0,2 г ваніліну розчиняють у суміші 25 мл концентрованої HCl та 75 мл ортофосфатної кислоти ($\omega_{(x)}$ = 85%)). Розчин слід зберігати в темній склянці.*

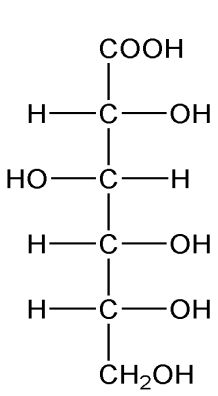
Обладнання: пробірки з штативом, гумові корки, скляні палички, градуйовані піпетки, газовий пальник або спиртівка, водяна баня з термометром, кристалізатор;

Теоретичні відомості

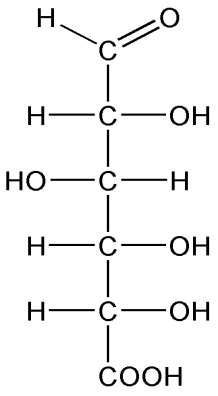
Емпірична формула моносахаридів $C_nH_{2n}O_n$, де n> 3. За хімічною будовою моносахариди є похідними багатоатомних спиртів і, залежно від кількості атомів карбону, їх поділяють на тріози, тетрози, пентози та гексози тощо. Положення карбонільної групи зумовлює поділ моносахаридів на *альдози* та *кетози*. Якщо карбонільна група розташована в кінці ланцюга, то моносахарид є альдегідом і має назву альдоза**.** За усіх інших положень

карбонільної групи моносахарид є кетоном, однак, кетогрупа у природних моносахаридів переважно знаходиться в С-2 положенні.

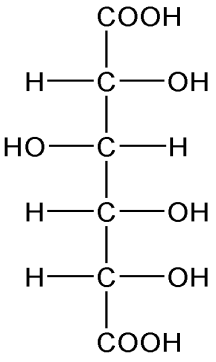
Моносахариди беруть участь в реакціях, характерних для спиртів, альдегідів та кетонів, що зумовлене наявністю відповідних функціональних груп в складі молекули. При окисненні кінцевих груп альдоз утворюються три варіанти сполук. При окисненні альдегідної групи моносахаридів утворюються *альдонові кислоти*, при окисненні термінальної гідроксильної групи − *уронові кислоти*. Наприклад, при окисненні альдегідної групи глюкози утворюється глюконова кислота, спиртової − глюкуронова, а при одночасному окисненні обох груп утворюється глюкарова (моноцукрова) кислота, яка має дві карбоксильні групи.



Глюконова кислота



Глюкуронова кислота



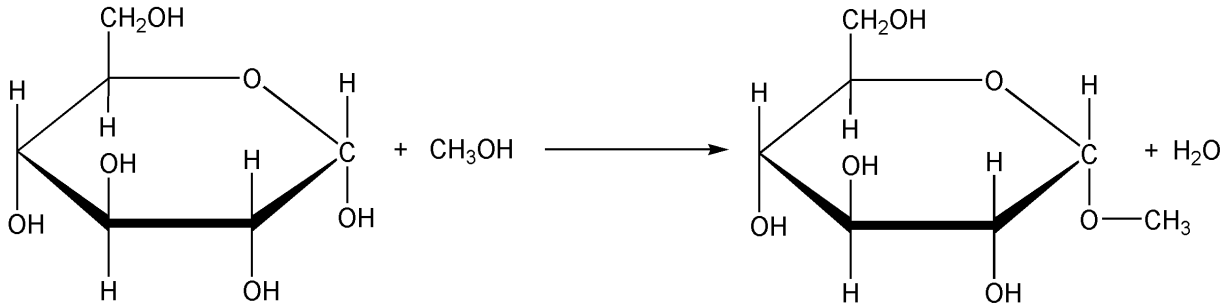
Глюкарова кислота

Фосфорильована форма D-глюконової кислоти (альдонової кислоти) є важливим проміжним продуктом у пентозофосфатному циклі. Уронові кислоти, зокрема глюкуронова, є складовими гетерополісахаридів.

Водні розчини моносахаридів характеризуються специфічною величиною кута питомого обертання плоскополяризованого світла $[a]_D^{20}$. Встановлено, що величина кута питомого обертання при розчиненні моносахариду поступово змінюється і лише після тривалого відстоювання розчину досягає певного значення (наприклад, для свіжо приготованого розчину глюкози $[a]_D^{20} = +112{,}2^o$, а після тривалого відстоювання розчину величина становить $[a]_D^{20} = +52{,}5^o$). Зміна величини кута питомого обертання

відбувається внаслідок взаємного перетворення аномерних форм моносахаридів у розчині і називається *мутаротацією* або *аномеризацією*. В розчині встановлюється рівновага між α- і β- циклічними формами сполуки, внаслідок трансформації структур в розчині (зміна положення Н− та ОН− біля першого атому карбону).

Моносахариди вступають в реакції відновлення з утворенням багатоатомних спиртів, наприклад, в результаті відновлення глюкози утворюється спирт *сорбітол*. При взаємодії з кислотами, спиртами або фенолами утворюється ефірний зв'язок між ОН-групою моносахаридів та ОН-групою кислоти або спирту, такі сполуки мають назву *глікозиди*. Нижче наведено реакцію між глюкозою та метанолом:



α-D-глюкоза **α-метил-D-глюкоза**

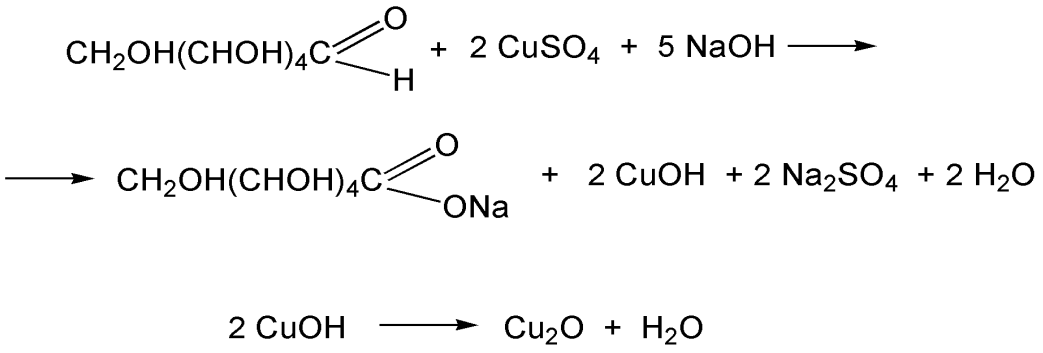
Розчини глікозидів на відміну від розчинів моносахаридів не підлягають таутомерним перетворенням (не мутаротують) внаслідок відсутності лінійних форм молекул.

ДОСЛІД 1.1. РЕАКЦІЯ ТРОММЕРА

Моносахариди альдози виявляють властивості альдегідів: здатні до окиснення у лужному середовищі з відновленням іонів металів. Так, солі оксиду міді (II) відновлюються до оксиду міді (I), солі срібла відновлюються до металевого срібла (реакція срібного дзеркала).

Розчини гексоз при нагріванні у лужному середовищі відновлюють гідроксид купруму (II) до оксиду купруму (I), а самі при цьому окиснюються

до відповідних альдонових кислот *(спочатку утворюється сіль а потім внаслідок гідролізу утворюється глюконова кислота).* Рівняння такої реакції (реакції Троммера) для глюкози буде мати наступний вигляд:



Слід мати на увазі, що за умови утворення гідроксиду купруму в надлишку, у розчині утворюється чорний осад CuO, який заважає визначенню та маскує позитивну реакцію.

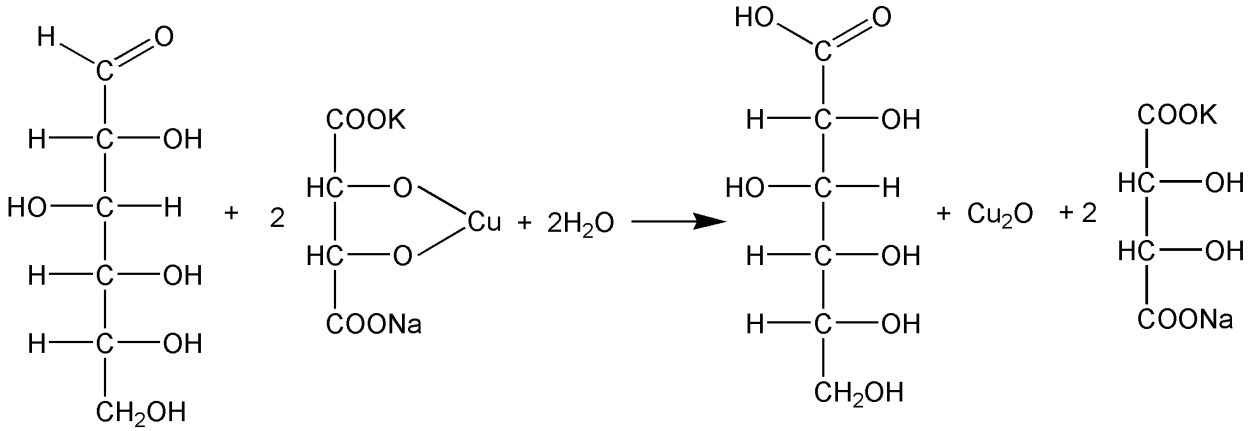
Хід роботи. У пробірку вносять 3 мл розчину глюкози та 1 мл розчину NaOH. До суміші обережно додають 4-5 крапель розчину $CuSO_4$. В процесі перебігу реакції спочатку утворюється осад гідроксиду купруму (II), який поступово розчиняється і розчин набуває блакитного кольору. Пробірку обережно підігрівають у полум'ї пальника до кипіння та спостерігають за зміною забарвлення.

Завдання. Записати результати спостереження, рівняння реакції та пояснити зміну забарвлення вмісту пробірки після нагрівання.

ДОСЛІД 1.2. РЕАКЦІЯ ФЕЛІНГА

Реакція Фелінга за своїм принципом також ілюструє здатність альдоз до відновлення металів, тобто є подібною до реакції Троммера. Однак, у реактиві Фелінга іони купруму знаходяться у складі комплексної сполуки (мідного алкоголяту сегнетової солі) і за її надлишку утворення чорного осаду CuO не спостерігається. Таким чином, реакцію Фелінга досить часто використовують для виявлення моносахаридів у біологічних рідинах.

Вуглеводи, які містять напівацетальний гідроксил або альдегідну групу, при кип'ятінні з реактивом Фелінга в лужному середовищі вступають в реакцію, в результаті якої утворюється Cu_2O −нерозчинна сполука червоного кольору.

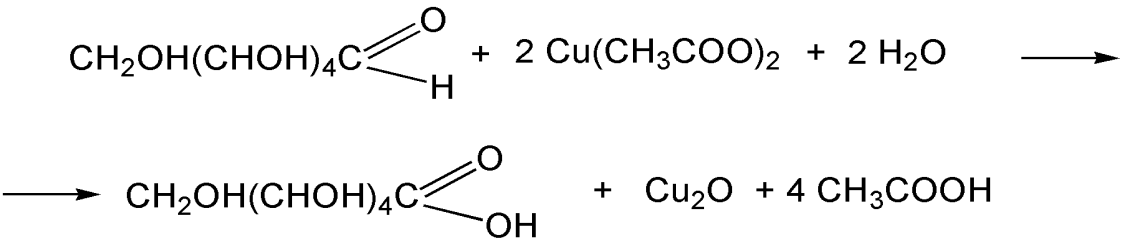


Хід роботи. В пробірку вносять 3 мл розчину реактиву Фелінга, а потім додають 5 мл розчину глюкози. Одержану суміш перемішують та обережно доводять до кипіння на пальнику.

Завдання. Записати результати спостереження, пояснити зміну забарвлення вмісту пробірки при нагріванні відповідно до рівняння реакції.

ДОСЛІД 1.3. РЕАКЦІЯ БАРФЕДА

Відновлення іонів міді моносахаридами може відбуватися як в лужному так і у слабко кислому (близькому до нейтрального) середовищі. В результаті реакції глюкози з ацетатом міді утворюється оцтова кислота та оксид купруму (I):



Реакція Барфеда відрізняється тим, що дисахариди, здатні до гідролізу, за таких умов практично не окиснюються. Тому реакція дає можливість ідентифікувати моносахариди в присутності дисахаридів.

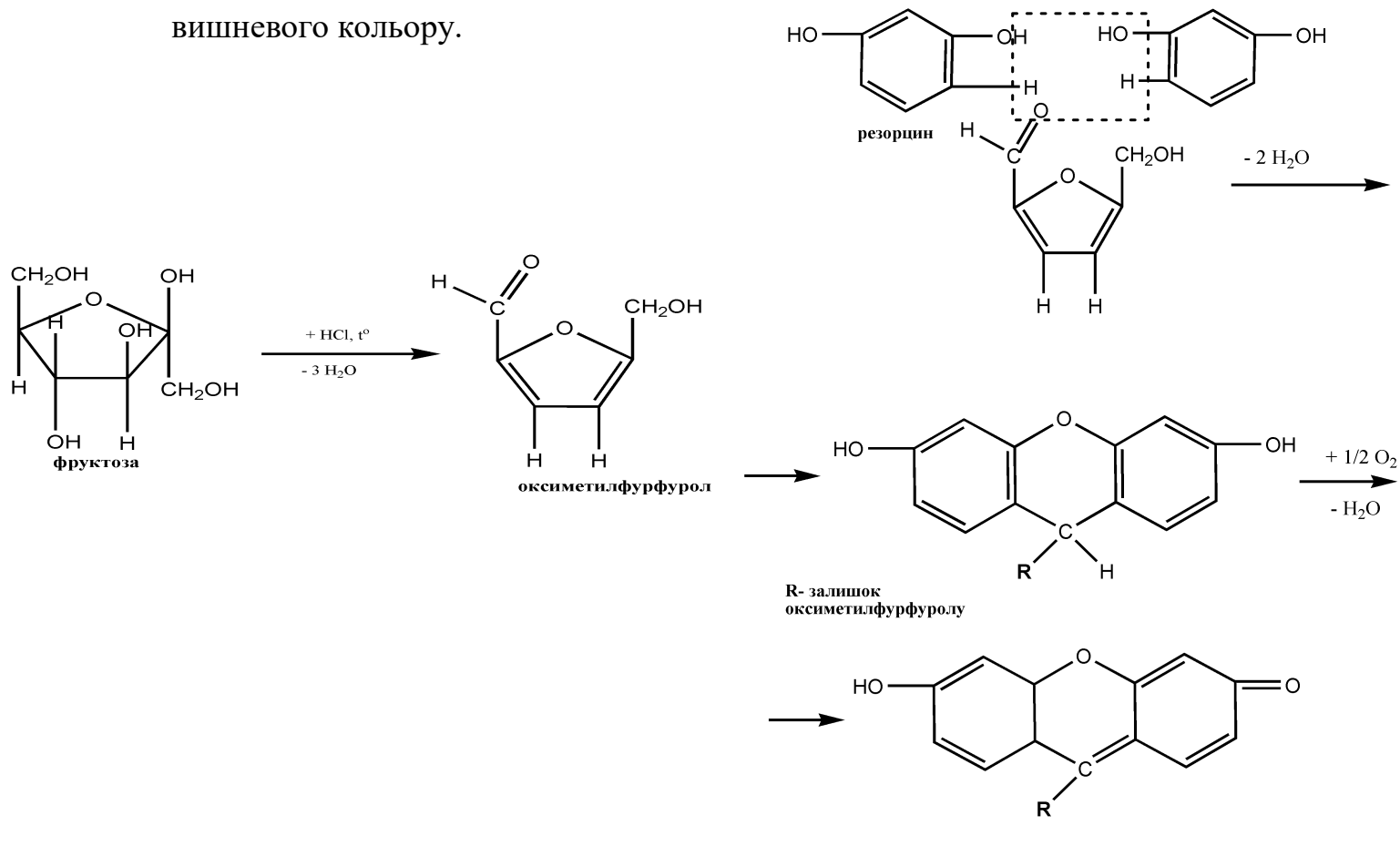
Хід роботи. В пробірку вносять 1 мл розчину глюкози, 1 мл дистильованої води та 1 мл реактиву Барфеда. В другу пробірку вносять 2 мл розчину сахарози та додають 1 мл реактиву Барфеда. В третю пробірку вносять 1 мл розчину глюкози, 1 мл розчину сахарози та 2 мл реактиву Барфеда. Вміст трьох пробірок ретельно перемішують і обережно нагрівають у полум'ї пальника до кипіння. Спостерігають за зміною забарвлення вмісту пробірок.

Завдання. Запишіть результати спостереження, рівняння реакції та поясніть зміну забарвлення вмісту пробірок при нагріванні.

ДОСЛІД 1.4. РЕАКЦІЯ СЕЛІВАНОВА

Кетози, на відміну від альдоз, при нагріванні з концентрованою соляною кислотою підлягають дегідратації, наприклад з фруктози утворюється оксиметилфурфурол.

Останній, взаємодіючи з резорцином, утворює поліциклічну сполуку вишневого кольору.

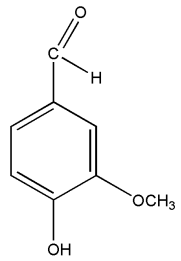


Хід роботи. У дві пробірки вносять: в першу 5 мл розчину фруктози та 1 мл розчину HCI; в другу 5 мл розчину глюкози та 1 мл розчину HCI. В кожну пробірку додають по декілька кристалів резорцину. Вміст пробірок ретельно перемішують. Суміші нагрівають на водяній бані (80°С) протягом 20 хв, слідкуючи за зміною забарвлення розчинів.

Завдання. Запишіть результати спостереження, рівняння реакції та поясніть зміну забарвлення вмісту пробірок.

ДОСЛІД 1.5. РЕАКЦІЯ ФРУКТОЗИ З ВАНІЛІНОМ

Якісне визначення вмісту фруктози (яка є кетозою) у водних розчинах може базуватися на її здатності утворювати забарвлені продукти конденсації з ваніліном (4-окси-3-метоксибензальдегідом). Ванілін не взаємодіє з альдозами (глюкозою, галактозою), однак реагує з олігосахаридами та полісахаридами, до складу яких входить фруктоза. Залежно від концентрації фруктози, продукти реакції мають стійке рожеве або червоне забарвлення.



Ванілін (4–окси- 3-метоксибензальдегід)

Хід роботи. У три пробірки вносять: в першу 1 мл розчину фруктози та 5 мл розчину ваніліну; в другу 1 мл розчину сахарози та 5 мл розчину ваніліну, в третю 1 мл розчину глюкози і 5 мл розчину ваніліну. Вміст пробірок ретельно перемішують та нагрівають на водяній бані (80 °С) протягом 10 хвилин. Потім пробірки швидко охолоджують у кристалізаторі з льодяною водою або льодом.

Завдання. Запишіть результати спостереження та поясніть зміну забарвлення вмісту обох пробірок після охолодження.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ

1. Чим відрізняються за хімічною будовою альдози і кетози?
2. Наведіть лінійну і циклічну форму молекули α-D-глюкози.
3. Положення напівацетальної (глікозидної групи) і формування. фуранозних і піранозних циклів у моносахаридів.
4. Наведіть приклади якісних реакцій на альдози.
5. Наведіть приклади якісних реакцій на кетози.
6. Охарактеризуйте подібність та відмінність якісних реакцій Троммера, Фелінга та Барфеда.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 2

ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ДИСАХАРИДІВ І ПОЛІСАХАРИДІВ ТА ЇХ ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Ідентифікація сахарози в розчині. Гідроліз сахарози та якісний аналіз утворених моносахаридів. Реакція крохмалю і глікогену з йодом. Гідроліз крохмалю, целюлози та ідентифікація утворених продуктів.

Мета роботи: ознайомитись з хімічними властивостями дисахаридів на прикладі сахарози, полісахаридів (крохмалю, глікогену та целюлози), провести якісні реакції на олігосахариди, полісахариди та продукти їх гідролізу.

Реактиви: водні розчини: глюкози (ω(х) = 5%); фруктози (ω(х) = 5%); сахарози (ω(х) = 5%); крохмалю (ω(х) = 1%); нітрату кобальту (ω($Co(NO_3)_2$) = 2%); сульфату міді (ω($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) = 5%); гідроксиду натрію (ω(NaOH) = 5% і ω(NaOH) = 25%); сульфатної кислоти (ω(H_2SO_4) = 3% і ω(H_2SO_4) = 80%); хлоридної кислоти (ω(HCl) = 3% і ω(HCl) = 25%); концентрована хлоридна кислота; розчин йоду*; медична вата; пісок; куряча (яловича або свиняча) печінка.

***Розчин йоду.** *1 г кристалічного I_2 та 2 г KI розчиняють в 20 мл дистильованої води, а потім доводять водою до об'єму 300 мл.*

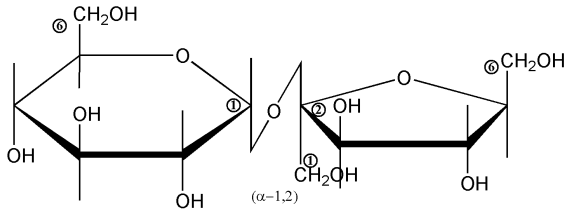
Обладнання: пробірки з штативом, гумові корки, скляні палички, стаканчик з термостійкого скла, градуйовані піпетки, водяна баня з термометром, порцелянова ступка, лійка, фільтрувальний папір.

Теоретичні відомості

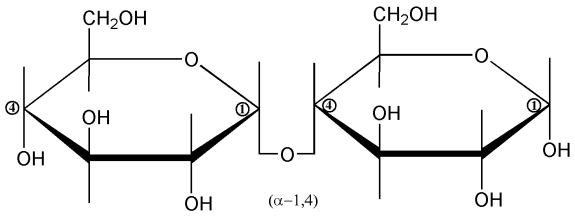
Полісахариди (*глікани*) − вуглеводи, до складу яких входять залишки тисяч молекул моносахаридів та (або) їх похідних, сполучених глікозидними зв'язками, що утворюють лінійні або розгалужені ланцюги. Найчастіше полісахариди утворюються за рахунок поліконденсації таких моносахаридів та їх похідних: D-глюкоза, D-маноза, D- та L-галактоза, D-ксилоза, L-арабіноза, D-глюкуронова кислота, D-глюкозоамін, D-галактозоамін,

сіалові та аміноуронові кислоти. Полісахариди мають велику молекулярну масу, олігосахариди значно меншу, оскільки олігосахариди містять до 10 олігомерів.

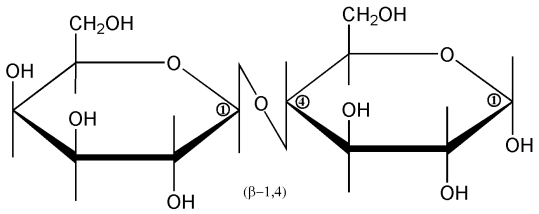
Дисахариди складаються з залишків двох моносахаридів. Залишки моносахаридів можуть бути сполучені між собою двома напівацетальними гідроксилами як у *трегалози* (грибний цукор, мікоза) і *сахарози*. Моносахариди можуть бути сполучені напівацетальним гідроксилом одного моносахариду та будь-яким гідроксилом іншого, наприклад *мальтоза* і *лактоза*.



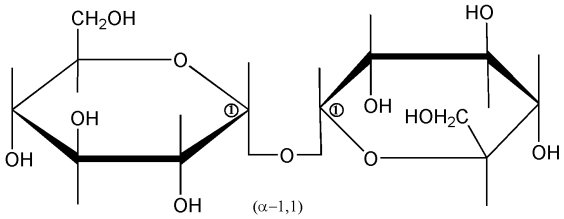
сахароза



мальтоза



лактоза



трегалоза

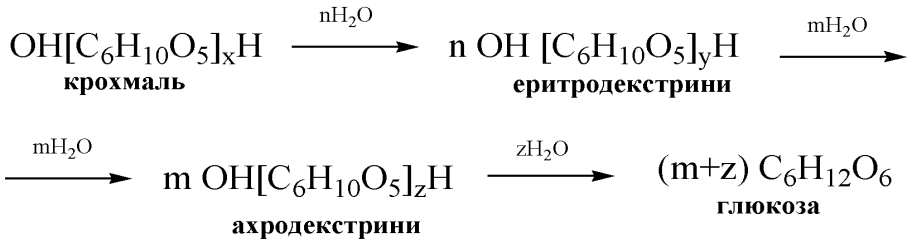
В залежності від вищенаведеного типу сполучення залишків моносахаридів у дисахариди, останні поділяють на такі, що мають відновлювальні властивості і здатні, наприклад, відновлювати метали (завдяки наявності в молекулі напівацетального гідроксилу, який не бере участі в утворенні глікозидного зв'язку) і такі, що не мають здатності відновлювати іони металів.

Дисахариди з двома зв’язаними напівацетальними гідроксилами типу трегалози не вступають у реакції, що визначаються наявністю альдегідної чи кетонної групи: не окиснюються і не відновлюються, а також не мутаротують. Дисахарид мальтоза і лактоза мають відновні властивості. Сахароза – дисахарид, що не має відновлювальних властивостей, оскільки

напівацетальний гідроксил глюкози бере участь в утворенні глікозидного зв'язку між фруктозою та глюкозою. Тому ідентифікувати не гідролізовану сахарозу в розчині за реакцією Троммера, Фелінга або Барфеда неможливо. Однак з солями кобальту (II) в лужному середовищі сахароза утворює комплексну сполуку фіолетового кольору. Ця реакція є специфічною лише для сахарози, тому і використовується для її ідентифікації.

Дія кислот або ферментів на дисахариди у водному розчині призводить до їх гідролізу до моносахаридів. Ферментативний гідроліз є специфічним до певних зв’язків, наприклад, мальтаза розщеплює виключно α-глікозидні зв'язки мальтози. Кислотний гідроліз дисахаридів, навпаки, не специфічний. Процес гідролізу цукру має назву інверсія, а гідролізовану сахарозу називають інвертованим цукром. Відмінність властивостей розчинів оцінюють за їх оптичною активністю, яку визначають за допомогою поляриметра. Водний розчин сахарози обертає площину плоскополяризованого променю світла праворуч (66,5°). Після гідролізу оптична активність такого розчину змінюється, оскільки гексози, які утворюються при її розщепленні, мають протилежні кути питомого обертання (α-D-глюкоза обертає промінь праворуч на 52,5°, а β-D-фруктоза ліворуч на 92°). Розчин інвертованої сахарози містить моносахариди, які можна виявити за допомогою якісної реакцій Троммера, Барфеда або Селіванова.

Полісахариди відрізняються як за складом мономерів, так і ступенем розгалуження та довжиною полімерного ланцюга. Розрізняють *гомополісахариди*, які мають залишки моносахаридів одного типу, та *гетерополісахариди*, що містять залишки різних моносахаридів. Полісахариди також піддаються кислотному та ферментативному гідролізу. Гідроліз відбувається поетапно, наприклад, при проміжними продуктами розкладу гомополісахариду крохмалю є декстрини. Гідроліз крохмалю відбувається за схемою:



x>y>z

Амілодекстрини, що утворюються на перших етапах гідролізу, мають найдовші полімерні ланцюги та осаджуються спиртами; їх комплексні сполуки з йодом мають синє забарвлення. Амілодекстрини гідролізують до *еритродекстринів*, комплексні сполуки останніх з йодом мають червоне забарвлення. *Ахродекстрини* утворюються на наступних етапах гідролізу, розчиняються в 70% етанолі, не утворюють забарвлених сполук з йодом. Потім утворюються *мальтодекстрини* і *мальтоза,* які мають відновлювальні властивості і також не забарвлюються під дією йоду. При повному гідролізі крохмалю утворюється α-D-глюкоза.

ДОСЛІД 2.1. ВИЯВЛЕННЯ САХАРОЗИ У ВОДНОМУ РОЗЧИНІ

Хід роботи. У три пробірки вносять по 2 мл розчинів вуглеводів: в першу − сахарози; в другу –глюкози; в третю – фруктози. Потім в кожну пробірку додають по 1 мл розчину гідроксиду натрію (ω(NaOH) = 5%) та по 5-7 крапель розчину $Co(NO_3)_2$. Вміст пробірок добре перемішують та спостерігають за зміною забарвлення розчинів.

Завдання. Запишіть результати спостереження та поясніть зміну забарвлення в процесі якісної реакції.

ДОСЛІД 2.2. ГІДРОЛІЗ САХАРОЗИ ТА ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА ПРОДУКТИ ГІДРОЛІЗУ

Хід роботи. У три пробірки вносять по 6 мл розчину сахарози. Потім у першу пробірку (контроль) додають 2 мл дистильованої води; у другу – 2 мл розчину хлоридної кислоти (ω(HCl) = 25%); в третю – 2 мл розчину гідроксиду натрію (ω(NaOH) = 25%). Вміст пробірок добре перемішують та нагрівають на водяній бані (80^o) протягом 20 хв. Після нагрівання пробірки переносять у штатив для охолодження. Після охолодження до першої і

третьої пробірок додають по 2 мл дистильованої води. В другій пробірці після охолодження проводять нейтралізацію середовища, а саме додають розчин гідроксиду натрію (ω(NaOH) = 25%): спочатку 1мл, а потім по краплинам ще 0,5 мл, контролюючи pH розчину за допомогою універсального індикаторного паперу. Вміст пробірок при додаванні речовин постійно добре перемішують. Наприкінці досліду з кожної з трьох пробірок відбирають у чисті пробірки по 3-4 мл суміші і поводять реакції Троммера і Селіванова.

Завдання. Запишіть і поясніть результати спостереження за забарвленням вмісту пробірок протягом інверсії сахарози і якісних реакцій на продукти гідролізу.

ДОСЛІД 2.3. ЯКІСНА РЕАКЦІЯ КРОХМАЛЮ ТА ГЛІКОГЕНУ З ЙОДОМ

Для ідентифікації крохмалю і продуктів його первинного гідролізу а також гомополісахариду *глікогену* використовують якісну реакцію з йодом. На відміну від згаданих сполук, *целюлоза* при взаємодії з йодом не дає забарвленого продукту. При дії йоду утворюються нестійкі адсорбційні сполуки синього (амілоза), червоно-фіолетового (амілопектин), червоно-коричневого іноді з фіолетовим відтінком (глікоген) кольорів. Внаслідок нестійкості сполуки (в утворенні комплексів бере участь саме молекулярний йод а не іони) продукти згаданої реакції чутливі до дії лугів та спиртів, а також високих температур.

Хід роботи. Спочатку готують водну витяжку глікогену. Подрібнюють 10 г свіжої печінки і розтирають з піском у порцеляновій ступці. Підготовлений матеріал переносять до стаканчика, додають 10-кратний об’єм підігрітого розчину гідроксиду натрію (ω(NaOH) = 25%) і витримують 15 хв в киплячій водяній бані. Гомогенат охолоджують, відфільтровують і нейтралізують розчином хлоридної кислоти (ω(HCl) = 25%).

Проводять якісну реакцію з йодом. У дві пробірки вносять: в першу – 5 мл розчину крохмалю; у другу – 5 мл витяжки глікогену. В кожну пробірку

додають по 2-3 краплі розчину йоду Вміст пробірок добре перемішують та спостерігають за зміною забарвлення розчинів.

Завдання. Запишіть та поясніть результати зміни забарвлення вмісту пробірок.

ДОСЛІД 2.4. ГІДРОЛІЗ КРОХМАЛЮ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ УТВОРЕНИХ ПРОДУКТІВ

При нагріванні розчину крохмалю з сильними кислотами відбувається гідроліз з утворенням α-D-глюкози, яку ідентифікують якісними реакціями Троммера, Фелінга, Барфеда.

Хід роботи. В дві пробірки вносять по 5 мл розчину крохмалю. В першу пробірку додають 2-3 краплі концентрованої HCl та витримують пробірку на киплячій водяній бані 15 хв. Друга пробірка є контрольним дослідом. Потім із вмістом кожної пробірки проводять якісну реакцію Троммера.

Завдання. Запишіть та поясніть зміну забарвлення вмісту пробірок.

ДОСЛІД 2.5. ГІДРОЛІЗ ЦЕЛЮЛОЗИ (ПОКАЗОВО)

Гідроліз целюлози мінеральними кислотами відбувається значно повільніше ніж крохмалю. Якщо целюлозу попередньо обробити розчином сульфатної кислоти ($\omega(H_2SO_4) = 80\%$), то процес значно прискорюється.

Хід роботи. В першу пробірку поміщають 150 мг медичної вати заливають 2 мл розчину сульфатної кислоти ($\omega(H_2SO_4) = 3\%$). В другу пробірку поміщають 150 мг вати, яку заливають 0,5 мл розчину сульфатної кислоти ($\omega(H_2SO_4) = 80\%$) до повного розчинення, після чого додають 1,5 мл дистильованої води. Обидві пробірки ставлять на киплячу водяну баню і утримують 5 хв. Пробірки охолоджують за кімнатної температури і нейтралізують їх вміст (в першу додають 3 мл розчину гідроксиду натрію ($\omega(NaOH) = 5\%$), в другу 3 мл (+0,5 мл по краплинах) розчину гідроксиду натрію ($\omega(NaOH) = 25\%$). Контроль за нейтралізацію – універсальний індикаторний папір.

З продуктами гідролізу проводять реакцію Троммера.

Завдання. Запишіть і поясніть результати спостереження.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ

1. Які типи зв’язків можуть бути між залишками моносахаридів в складі дисахаридів і як це впливає на відновлювальні властивості останніх?
2. Чому реакція срібного дзеркала проходить з глюкозою і не проходить із сахарозою?
3. Які речовини викликають гідроліз оліго- та полісахаридів?
4. Які речовини називають інвертованим цукром?
5. Які сполуки називають гомополісахаридами, а які – гетерополісахаридами?
6. Охарактеризуйте поетапний гідроліз крохмалю та якісні реакції на проміжні продукти.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 3

КІЛЬКІСНИЙ АНАЛІЗ ВМІСТУ ВУГЛЕВОДІВ У БІОЛОГІЧНОМУ МАТЕРІАЛІ

Визначення вмісту лактози в молоці. Визначення вмісту глюкози в крові людини

Мета роботи. набути навичок кількісного визначення вмісту лактози в молоці методом титрування та глюкози в крові електрохімічним методом.

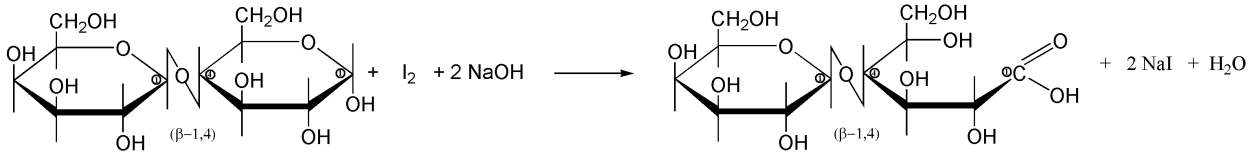
Реактиви: водні розчини: йоду ($C(\frac{1}{2}I_2)$ = 0,1 моль/л); тіосульфату натрію ($C(\frac{1}{2}Na_2S_2O_3)$ = 0,1 моль/л); сульфату міді ($\omega(CuSO_4 \cdot 5H_2O)$ = 7%); гідроксиду натрію ($\omega(NaOH)$ = 2%); фториду натрію ($\omega(NaF)$ = 5%); хлоридної кислоти ($\omega(HCl)$ = 5%); крохмалю ($\omega(x)$ = 1%), пастеризоване або свіже коров'яче молоко.

Обладнання: мірні колби на 50 мл; титрувальні колби; піпетки; бюретка; порцелянова ступка; конічна колба для титрування на 100 мл; пробірки; стерильні одноразові скаліфікатори, глюкометр, тест-смужки до глюкометра, етиловий спирт для дезинфекції ($\omega_{(C_2H_5OH)}$ = 96%), стерильна вата, стерильні одноразові гумові рукавички.

Теоретичні відомості

Молочний цукор *лактоза* є дисахаридом, що міститься в молоці ссавців в різній кількості залежно від біологічного виду і фізіологічних особливостей організму. В молоці жінок вміст лактози близько 7,5%, у коров'ячому молоці вміст молочного цукру в середньому становить 4,5%, а у деяких морських ссавців лактоза у молоці практично відсутня. Метод кількісного визначення лактози заснований на її здатності в лужному середовищі окиснюватися по напівацетальному гідроксилу до лактобіонової кислоти, в результаті реакції відбувається відновлення молекулярного йоду:

$$C_{12}H_{22}O_{11} + I_2 + 2NaOH = C_{12}H_{22}O_{12} + 2NaI + H_2O$$



При проведенні аналізу розчин йоду додають у надлишку. Надлишок вільного йоду, який не вступив у реакцію, визначають титруванням тіосульфатом натрію в присутності крохмалю. Реакція титрування:

$$I_2 + 2Na_2S_2O_3 = 2NaI + Na_2S_4O_6$$

Визначення концентрації глюкози в крові людини є одним з найпоширеніших біохімічних досліджень в клінічній практиці. Причина популярності тесту пов'язана з високим рівнем захворювання населення на цукровий діабет (I типу - інсулінзалежний, II тип - неінсулінзалежний). Клінічні методи визначення вмісту глюкози в крові поділяють на редуктометричні, колориметричні і ферментативні (глюкозидазний та гексокіназний). Найбільш поширеним на сьогодні є ферментативний глюкозооксидазний метод, який проводять за умов титриметричного аналізу в біохімічній лабораторії, або за використання портативних глюкометрів, що є доволі зручним, тому що його може зробити людина в домашніх умовах.

В основі *глюкозооксидазного методу* лежить дія ферменту глюкооксидази, що забезпечує проходження реакції

$$Глюкоза + H_2O + O_2 \xrightarrow{Глюкооксидаза} Глюконова_кислота + 2H_2O_2$$

Концентрація утвореного перекису водню відповідає первинній концентрації глюкози в крові.

Існує два типи глюкометрів. Перший тип глюкометрів працює за принципом фотометричного аналізу, другий тип − амперметричного (електрохімічного) аналізу. Суть *фотометричного методу* полягає у тому,

що молекули перекису водню під дією ферменту пероксидази розкладаються з утворенням активної форми кисню, який в свою чергу окиснює хромоген, що призводить до значної зміни кольору останнього і, відповідно, спектру поглинання.

Принцип роботи *електрохімічного* глюкометру заснований на вимірах сили струму, що виникає під час реакції глюкози крові з глюкооксидазою. Тест-смужка глюкометра має мікро комірку, що містить комплекс реагентів та вимірювальні електроди. Окиснення глюкози за участі глюкооксидази супроводжується відновленням ферроціаніду калію, який при контакті з електродом окиснюється, віддаючи електрон. Залежність сили струму від концентрації глюкози в діапазоні вимірювань приладу має лінійний характер. Фірми виробники електрохімічних глюкометрів постійно вносять технічні вдосконалення, які дозволяють зменшити об'єм проби крові і скоротити час аналізу. Сучасні тест-смужки мають мікрокапіляри, що значно спрощує процедуру нанесення краплини крові. Похибка виміру електрохімічного глюкометру не перевищує 0,02 ммоль/л.

Для клінічного аналізу вмісту глюкози в крові людини рекомендовано визначати вміст глюкози в крові людини зранку натщесерце. Для пацієнтів, які мають потенційні ризики захворювань на цукровий діабет (спадковий фактор, хронічні хвороби нирок тощо) рекомендовано проводити контроль глікемічного профілю. *Глікемічний профіль* полягає у вимірюванні вмісту глюкози крові людини протягом доби (6-8 вимірів), а саме аналіз натщесерце, через 30 хв після прийняття їжі, через 2 години після прийняття їжі.

У дорослої здорової людини норма рівня вмісту глюкози крові становить: натщесерце 3,5-5,9 ммоль/л; через 30 хв після прийняття їжі може

зростати до 10 ммоль/л (і вище, якщо їжа багата на вуглеводи); через 2 години після прийняття їжі 4,5-7,5 ммоль/л.

ДОСЛІД 3.1. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ЛАКТОЗИ В МОЛОЦІ

Хід роботи. У кожну з двох мірних колб (на 50 мл) вносять: 5 мл розчину $CuSO_4$; 5 мл розчину NaOH, 2,5 мл розчину NaF. Потім у колбу № 1 (дослід) додають 5 мл молока, колбу № 2 залишають для контролю. Вміст колб доводять дистильованою водою до мітки та добре перемішують. Суміші відстоюють 30 хвилин, відфільтровують у чисті колби , попередньо підписані № 1 і № 2.

Готують розчини для титрування. У дві конічні колби на 100 мл вносять по 20 мл фільтрату з колб № 1 (дослід) та № 2 (контроль), по 20 мл 0,1 н розчину йоду та по 10 мл розчину NaOH. Вміст колб добре перемішують, закривають і відстоюють протягом 20 хвилин. Після відстоювання в кожну колбу додають по 10 мл розчину HCI і перемішують. Вміст колб титрують розчином тіосульфату натрію спочатку до солом'яно-жовтого кольору, потім додають 3-4 краплі крохмалю та продовжують титрування до зникнення синього забарвлення. Кількість лактози (мг/мл) розраховують за формулою

$$C = \frac{(A - B) \cdot f \cdot V}{x \cdot y}$$, де

A − об'єм тіосульфату (мл), витраченого на титрування контрольної (холостої) проби № 2;

B − об'єм тіосульфату (мл), витраченого на титрування дослідної проби № 1;

f − титр тіосульфату (18,01 мг/мл, тобто *1 мл 0,1 н розчину* $Na_2S_2O_3$ *відповідає 18,01 мг лактози)*),

V − об'єм проби (50 мл),

x − аліквота молока (5 мл),

y − аліквота проби з лактозою, яку взяли на титрування (20 мл).

Завдання. Підготуйте пробу лактози в молоці і виконайте титрування. Розрахуйте за наведеною формулою вміст лактози в молоці в мг на мл. Зробіть перерахунки на відсотковий вміст лактози в молоці (для розрахунків використати густину молока 1,03 кг/л).

ДОСЛІД 3.2. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ГЛЮКОЗИ В КРОВІ (ПОКАЗОВО)

Хід роботи. *Роботу з відбором крові проводити з суворим дотриманням вимог стерильності: використовувати одноразові скаліфікатори, стерильні одноразові гумові рукавички!*

Відкрити пакетик і вийняти тест смужку. Утримуйте смужку таким чином, щоб контактні смужки (три чорні лінії) були повернуті догори і введіть її в глюкометр до упору. Таким чином, Ви включите глюкометр. (*Увага! Глюкометр автоматично виключається після 3 хв затримки. Тому якщо тест-смужку не було використано, її можна вийняти і повторно ввести в глюкометр).*

Простерилізувати місце проколу за допомогою шматочка вати, змоченої в етиловому спирті, витерти сухою стерильною ватою. Вийняти скаліфікатор з стерильної упаковки, зробити прокол і злегка надавити на палець пацієнта. Доторкніться одержаною краплиною крові до зони білого кольору на кінці тест-смужки і утримуйте її до звукового сигналу на глюкометрі і появи результату на дисплеї. Цифра на дисплеї вказує на вміст глюкози в крові в *ммоль/мл.* Притисніть шматочок вати до місця проколу для зупинення кровотечі.

Завдання. Визначити вміст глюкози крові натщесерце і оцінити глікемічний профіль пацієнта.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ

1. Наведіть хімічні формули лактози і лактобіонової кислоти. В яких біологічних рідинах міститься дисахарид лактоза?
2. Які моносахариди утворюються при гідролізі лактози.

3. На яких хімічних властивостях сполуки заснований метод кількісного визначення лактози в молоці?
4. Які методи кількісного визначення вмісту глюкози в крові використовують в клінічній практиці?
5. В чому полягає сутність глюкооксидазного методу визначення вмісту глюкози в крові?
6. Відмінність в принципах роботи фотометричного і електрохімічного (амперметричного) глюкометрів.
7. Межі норми вмісту глюкози в крові людини. Що таке глікемічний профіль і як його визначають?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 4

ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ЛІПІДІВ ТА ЇХ ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Розчинність ліпідів та утворення колоїдних розчинів. Виділення лецитину з біологічного матеріалу. Якісні реакції на холестерол. Визначення числа омилення жиру.

Мета роботи: ознайомитись з фізико-хімічними властивості деяких полярних і неполярних ліпідів, одержати лецитин з біологічного матеріалу, провести якісну реакцію на холестерин, визначити число омилення жирів.

Реактиви: олії на вибір: соняшникова, оливкова, кукурудзяна, ріпакова тощо; тваринний жир: качиний, яловичий, риб'ячий, сухий яєчний жовток, холестерин у порошку, етиловий спирт (ω(х) = 96%), хлороформ, бензол, ацетон; хлороформ; концентрована сульфатна кислота; водні розчини: хлориду кадмію ($\omega(CdCl_2)$ = 1%), хлоридної кислоти (C(HCl)=0,5 моль/л); спиртові розчини: КОН (C(KOH)= 0,5 моль/л)*, фенолфталеїну (ω(х) = 0,1%).

***Спиртовий розчин КОН:**

1. *Готують спирт-ректифікат: до 1 л етанолу* (ω(х) = 96%) *додають 10 г КОН і 5 г цинкового пилу і кип'ятять в колбі, закритій зворотним холодильником протягом 2 годин і переганяють*.

2. *Приготування розчину: 35 г КОН розчиняють в 20 мл дистильованої води, додають 1 л очищеного спирту-ректифікату, залишають на добу для відстоювання в закритій колбі і швидко декантують в склянку з темного скла).*

Обладнання: електронні ваги, пробірки із штативом, гумові корки, лійки, фільтрувальний папір; скляні стаканчики, порцелянова ступка з товкачиком, ліхтарик з ультрафіолетовим променем, круглодонна колба на 100 мл, зворотний холодильник, водяна баня з термометром,

Теоретичні відомості

Ліпіди є досить великою групою біоорганічних сполук, що істотно різняться за хімічною будовою і функціями. Переважна більшість ліпідів нерозчинні у воді, з біологічного матеріалу їх екстрагують органічними розчинниками. *Неполярні ліпіди* (переважно *ацилгліцероли*) екстрагують

неполярними: хлороформом, діетиловим ефіром, бензолом. Полярні ліпіди (фосфоліпіди, гліколіпіди тощо) екстрагують полярними розчинниками: спиртами, ацетоном. Стабілізаторами водних емульсій нейтральних ліпідів виступають карбонати, наприклад Na_2CO_3. *Лецитини* на відміну від інших ліпідів здатні утворювати стійкі емульсії у воді без додаткового додавання емульгаторів. Наявність у молекулах ліпідів полярних гідрофільних груп та неполярних гідрофобних радикалів зумовлює їх специфічні фізико-хімічні властивості та, відповідно, біологічні функції. Ліпіди входять до складу всіх клітин живих організмів, оскільки є основними структурними компонентами мембран, крім того, ацилгліцероли часто використовуються в клітині як запасаючі речовини (енергетичний резервний субстрат).

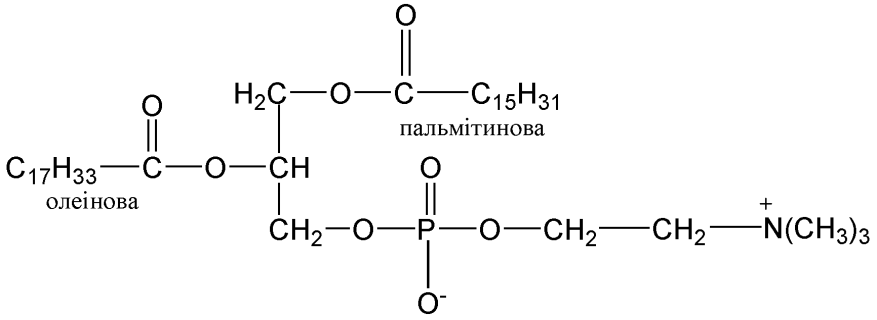
Відповідно до загальновизнаної класифікації розрізняють два основні класи ліпідів: *омилювані* і *неомилювані***,** в залежності від їх здатності до гідролізу в лужному середовищі з утворенням мил (солей вищих карбонових кислот). Неомилювані ліпіди є «однокомпонентними» в тому сенсі, що представляють собою сполуку, яка не піддається гідролізу. До неомилюваних ліпідів належать *стероли* (похідні циклопентанпергідрофенантрену) та *терпени* (похідні ізопрену). Найпоширенішим біогенним стеролом тваринного походження є *холестерол* (холестерин), що виступає попередником в біосинтезі жовчних кислот та стероїдних гормонів.

Омилювані ліпіди можуть бути «двокомпонентними» (*простими* - при гідролізі розпадаються на спирти і вищі карбонові кислоти) або складатись з більшої кількості компонентів (*складні*). До простих ліпідів відносять ацилгліцероли та воски, до складних: гліколіпіди, фосфоліпіди і сфінголіпіди (положення сфіноголіпідів в класифікації проміжне, оскільки частина сфінголіпідів належить до фосфоліпідів). Найбільш поширеними ліпідами є *прості жири* (*триацилгліцериди*) та *фосфоліпіди* (похідні фосфатидних кислот). Ацилгліцериди за своєю природою є складними ефірами гліцеролу та вищих жирних кислот. Фосфоліпіди − полярні ліпіди, являють собою складні ефіри багатоатомних спиртів гліцерину або сфінгозину з вищими

жирними кислотами та фосфатною кислотою. До складу фосфоліпідів входять також нітрогенвмісні сполуки: радикали холіну, етаноламіну і серину. Полярні ліпіди біомембран мають амфіфільні властивості завдяки наявності гідрофобного «хвоста», представленого вуглеводневими радикалами жирних кислот або вищого спирту сфінгозину, і гідрофільної «голівки», представленої іонізованими фосфатами, ковалентно зв'язаними із залишками холіну, етаноламіну, серину, гліцеролу, інозитолу або вуглеводу у гліколіпідів.

Вищі жирні кислоти (насиченими і ненасичені) є гідрофобними компонентами ацилгліцеролів та фосфоліпідів. Природа та співвідношення залишків жирних кислот, які входять до складу ліпідів визначають їх фізико-хімічні властивості. За підвищеного вмісту ненасичених жирних кислот температура плавлення жирів знижена і за нормальної температури вони є рідкими, за низького вмісту радикалів ненасичених жирних кислот, навпаки, жири є твердими.

Усі гліцериди здатні вступати в хімічні реакції, властиві для естерів. Найбільше аналітичне значення має реакція гідролізу (омилення), яка може відбуватися в лужному або кислому середовищі або під впливом ферментів.

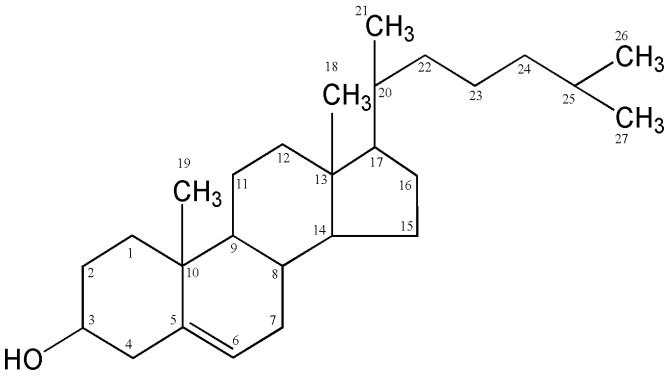


лецитин (фосфатидилхолін)

Лецитин належить до фосфоліпідів (гліцерофосфоліпідів), фосфодиефірний зв'язок утворений гідроксильною групою холіну. Лецитин входить до складу біомембран, сполуку використовують в медичній практиці при лікуванні гепатиту, атеросклерозу судин, ішемічного інсульту, хронічній пневмонії. Розчиняється в етиловому спирті і ацетоні, утворює стійку емульсію з водою.

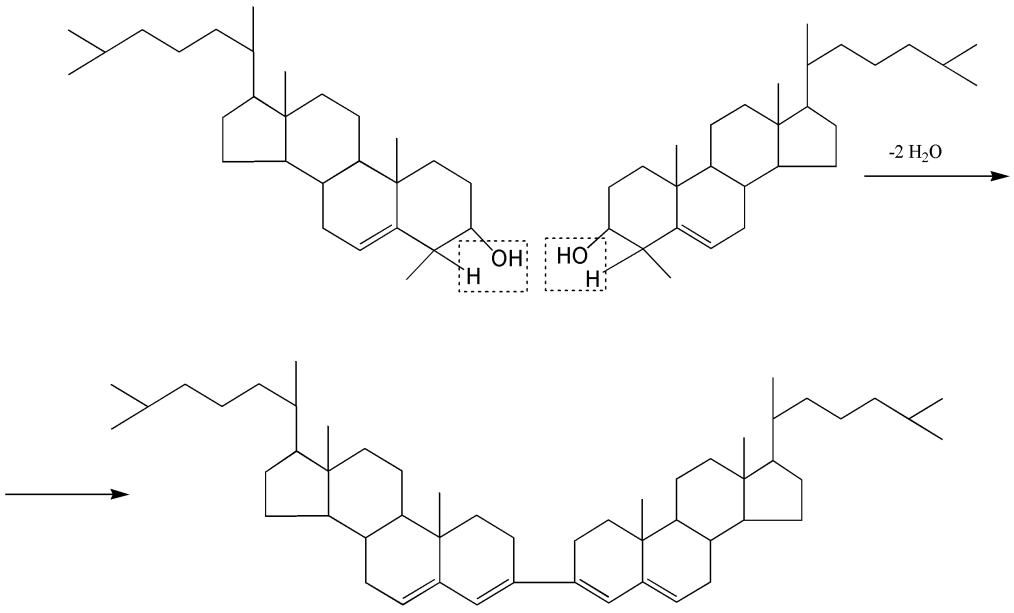
При гідролізі лецитину утворюється гліцерин, фосфорна кислота, холін та дві молекули жирних кислот, одна з яких є насиченою пальмітиновою $C_{15}H_{31}COOH$, а друга − ненасиченою олеїновою $C_{17}H_{33}COOH$. Осадження лецитину відбувається при додаванні насиченого розчину хлориду кадмію (білий осад).

Холестерин представляє собою 3-гідрокси-5,6-холестен, сполука не вступає в реакції омилення.



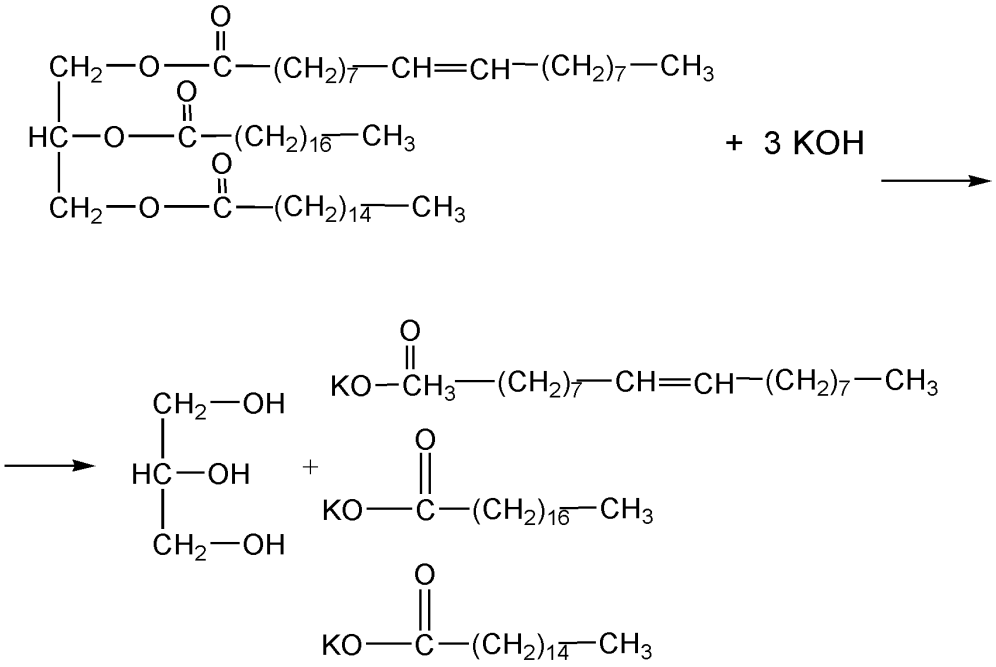
холестерин (холестерол)

Якісні реакції на холестерол ґрунтуються на його здатності перетворюватися з вторинного спирту на ненасичений вуглеводень *дихолестадієн* в результаті дегідратації і окиснення. Розчин холестеролу в хлороформі при взаємодії з оцтовим ангідридом і концентрованою сірчаною кислотою дає сполуку (ненасичений вуглеводень зі спряженими подвійними зв'язками) червоного кольору, що переходить в синій, а з часом – в зелений.



Більшість ліпідів під впливом лугу гідролізуються з утворенням мила та гліцеролу. *Число омилення (ЧО)* − показник, що одночасно вказує на

загальний вміст вільних та зв'язаних жирних кислот у складі жиру. Чисельно ЧО дорівнює кількості міліграмів КОН, який необхідно витратити для нейтралізації всіх жирних кислот, що містяться в 1 г певного жиру. Схема реакції омилення триацилгліцеролів має наступний вигляд:



ДОСЛІД 4.1. РОЗЧИННІСТЬ НЕЙТРАЛЬНИХ ЛІПІДІВ

Хід роботи. У чотири пробірки вносять по 0,2-0,3 мл різних олій. Потім у кожну з пробірок додають по 5 мл розчинників: у пробірку № 1 − воду, у пробірку № 2 − етиловий спирт, у пробірку № 3 − бензол, у пробірку № 4 хлороформ. Суміші в усіх пробірках енергійно струшують.

Завдання. Запишіть результати спостереження та поясніть причин утворення або не утворення розчинів і стійких емульсій.

ДОСЛІД 4.2. УТВОРЕННЯ СТІЙКИХ ЕМУЛЬСІЙ З ПОЛЯРНИМИ І НЕПОЛЯРНИМИ ЛІПІДАМИ

Хід роботи. У колбу вносять 0,5 г висушеного і розтертого яєчного жовтка, додають 20 мл нагрітого до 60^{o}С етилового спирту та перемішують. Через 10-15 хвилин суміш охолоджують і відфільтровують у чисту колбу; якщо одержують непрозорий фільтрат, то фільтрацію повторюють. У першу

пробірку вносять 2 мл фільтрату та додають по краплям дистильовану воду, постійно струшуючи. В другу пробірку вносять 2 мл ацетону і додають по краплям фільтрат, постійно струшуючи.. В третю пробірку вносять 0,1 мл олії і 5 мл насиченого розчину Na_2CO_3, вміст пробірки енергійно струшують.

Завдання. Запишіть результати спостереження та поясніть процеси, що відбуваються в кожній пробірці.

ДОСЛІД 4.3. ВИДІЛЕННЯ ЛЕЦИТИНУ, УТВОРЕННЯ ЕМУЛЬСІЙ, ОСАДЖЕННЯ ЛЕЦИТИНУ.

Хід роботи. Отриманий в досліді 4.2. фільтрат розділяють порівну на три пробірки. У першу додають 2 мл води; у другу − таку саму кількість ацетону; у третю − 5-6 крапель 1 % розчину хлориду кадмію.

Завдання. Запишіть і поясніть результати спостереження.

ДОСЛІД 4.4. ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА ХОЛЕСТЕРОЛ

Хід роботи. Розчиняють холестерол (2-3 кристали) в 2-3 мл хлороформу. Проводять якісні реакції Сальковського і Лібермана-Бурхарда.

Реакція Сальковського. В суху пробірку, що містить 0,5 мл розчину холестеролу в хлороформі, додають 0,5 мл концентрованої сульфатної кислоти і обережно струшують. Після розшарування спостерігають за зміною забарвлення: верхній шар, що містить холестерол в хлороформі, забарвлюється в пурпурно-червоний колір, а нижній (шар сірчаної кислоти) - у темно-червоний із зеленою флуоресценцією. Для спостереження флуоресценції в темряві світять на пробірку ліхтариком з ультрафіолетовим променем. Розчин холестерола переливають у фарфорову чашку і спостерігають за змінами забарвлення: перехід через фіолетовий, зелений до жовтого.

Реакція Лібермана-Бурхарда. В суху пробірку додають 1 мл розчину холестеролу в хлороформі, послідовно додають 10 крапель оцтового

ангідриду і 2 краплі концентрованої сірчаної кислоти. Вміст пробірки ретельно струшують і спостерігають утворення червоного забарвлення, яке переходить в червоно-фіолетове, фіолетове, синє і наприкінці зелене.

Завдання. Запишіть та поясніть результати якісних реакцій.

.

ДОСЛІД 4.5. ВИЗНАЧЕННЯ ЧИСЛА ОМИЛЕННЯ ЖИРУ

Хід роботи. В колбу № 1 (дослід) вносять 2 г олії або іншого жиру і фіксують точну масу наважки, вміст колби обережно збовтують так, щоб на стінках не залишилось олії або жиру. Колбу № 2 нічого не вносять − її використовують в якості контролю. В обидві колби додають по 25 мл спиртового розчину КОН. Вміст колб добре збовтують. До обох колб приєднують зворотний холодильник та витримують на киплячій водяній бані протягом 1 години. За цей час має пройти повне омилення ацилгліцеридів та нейтралізація вільних жирних кислот.

Після охолодження в обидві колби додають по 3-5 крапель розчину фенолфталеїну. Надлишок гідроксиду калію, що не прореагував з жирними кислотами, відтитровують в обох колбах 0,5 н розчином HCI до зникнення рожевого кольору.

Кількість КОН (мг), що пішла на нейтралізацію вільних та зв’язаних жирних кислот в 1 г жиру, розраховують за формулою:

$$ЧО = \frac{28{,}055(V_2 - V_1)}{x \cdot F},$$

де *ЧО* - число омилення, V_2 та V_1 - об'єми розчину хлоридної кислоти, витраченого на титрування відповідно контрольної (№ 2) та досліджуваної (№ 1) колб (мл),

x - наважка досліджуваного жиру (г);

28,055 - кількість мг КОН, що еквівалентно 1 мл 0,5 н розчину HCl (C(HCl)=0,5 моль/л),

F - поправочний коефіцієнт на титр КОН *(визначається безпосередньо перед дослідом титруванням фіксанальним HCl (C(HCl)=0,5 моль/л))*

Завдання. Виконати дослід, розрахувати число омилення досліджуваного жиру і порівняти його з теоретичними даними (див. лаб. роботу 5)

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ

1. В чому полягає складність формулювання визначення для ліпідів як групи біоорганічних сполук?
2. Наведіть приклади неомилюваних ліпідів.
3. Положення сфінголіпідів в загальній класифікації ліпідів.
4. Наведіть якісні реакції на виявлення холестерину.
5. Чим відрізняються фізико-хімічні властивості лецитину від переважної більшості ліпідів.
6. Якими є продукти реакцій омилення простих і складних ліпідів?
7. За яких умов одержують розчини або стійкі емульсії ліпідів?
8. Вміст яких жирних кислот (вільних чи зв’язаних ефірними зв’язками в складі ацилгліцеролів) визначають в досліді з числа омилення?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 5

ВИЗНАЧЕННЯ ХІМІЧНИХ КОНСТАНТ АЦИЛГЛІЦЕРОЛІВ

Визначення кислотного числа, йодного числа, пероксидного числа жиру

Мета роботи: визначити хімічні параметри триацилгліцеридів, зробити висновки щодо їх якості і товарної придатності.

Реактиви: олія (соняшникова, оливкова, кукурудзяна тощо); тваринний жир (гусячий, борсучий, риб'ячий); етиловий спирт (ω(х) = 96%); діетиловий ефір; льодова оцтова кислота; хлороформ; водні розчини: гідроксиду калію (С(КОН) = 0,1 моль/л); крохмалю (ω(х) = 0,5%); тіосульфату натрію (С($\frac{1}{2}Na_2S_2O_3$) = 0,01 моль/л і С($\frac{1}{2}Na_2S_2O_3$) = 0,05 моль/л); насичений розчин КІ; спиртові розчини: йоду (С($\frac{1}{2}I_2$) = 0,1 моль/л); фенолфталеїну (ω(х) = 0,1%).

Обладнання: колби на 50 мл; піпетки; бюретки.

Теоретичні відомості

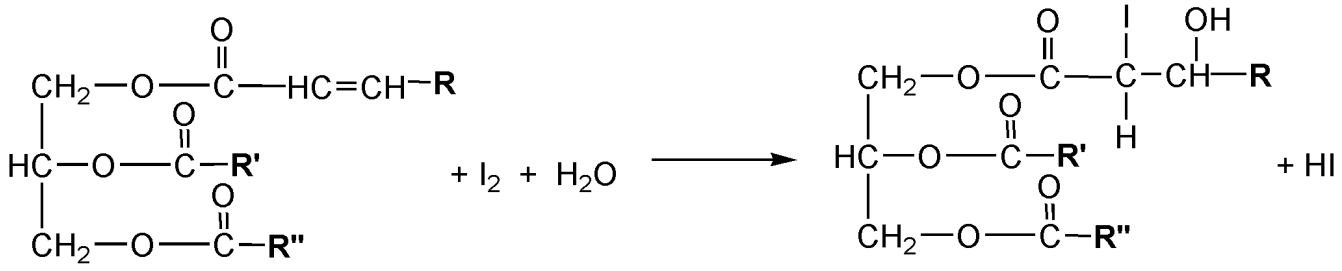
Хімічна природа алкільних радикалів жирних кислот визначає певні фізичні і хімічні властивості ліпідів. До складу рослинних ацилгліцеролів переважно входить олеїнова кислота (30 мас %), пальмітинова (15-50 мас %). Жирні кислоти відрізняються за довжиною вуглеводневого ланцюга, числом і положенням подвійних зв'язків. Для характеристики триацилгліцеридів і відповідно товарної якості жирів використовують чотири показника (число омилення, кислотне, йодне та пероксидне числа).

Число омилення (ЧО) − це кількість мг КОН, необхідного для нейтралізації всіх жирних кислот (як вільних так і в складі ацилгліцеролів) в 1 г жиру.

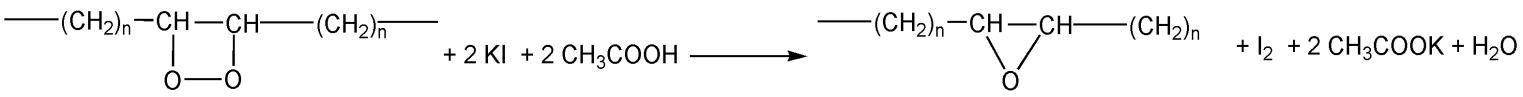
Кислотне число (КЧ) − кількість КОН (мг), необхідна для нейтралізації вільних жирних кислот, що містяться в 1 г жиру. Показник вказує на

стійкість жиру до окиснення, оскільки на перших етапах процесу йде вивільнення вільних жирних кислот з ацилгліцеролів.

Йодне число (ІЧ) – кількість йоду (г), що зв'язується з 100 г жиру. Приєднання J_2 відбувається за місцем подвійних зв'язків в ненасичених жирних кислотах. Показник характеризує вміст ненасичених жирних кислот в жирах і, відповідно, характеризує процес окиснення.



Пероксидне число (ПЧ) відповідає кількості мг розчину $Na_2S_2O_3$, який було витрачено на титрування вільного йоду, що виділився при окисненні йодид-іонів пероксидними сполуками, що містяться в одному грамі жиру.



При тривалому перебуванні жиру на повітрі, світлі, доступу вологи утворюються пероксидні сполуки в місцях подвійних зв'язків ненасичених жирних кислот, жир стає «прогірклим». ПЧ характеризує свіжість жиру.

Реакція титрування: $I_2 + 2Na_2S_2O_3 = 2NaI + Na_2S_4O_6$

Таблиця 5.1 − Нормативні показники фізико-хімічних констант триалцилгліцеролів, що входять до складу харчових жирів

Джерело жиру	**Число омилення мг КОН на 1 г жиру**	**Йодне число, г I_2 на 100 г жиру**	**Кислотне мг КОН на 1 г жиру**	**Пероксидне число Ммоль1/2 O_2 на кг жиру**
Соняшник	183-196	119-144	0,3-4,0	2,0-10,0
Ріпак	190-217	107-137	0,3-6,0	4,0-10,0
Соя	168-185	100-140	0,3-1,5	10,0
Жир свинячий	202,3	46-66	1,1-2,2	<2,5-свіжий 2,5-5,0 -не підлягає зберіганню 5,0-10,0 - сумнівної свіжості > 15 - зіпсований
Жир яловичий	198,2	32-47	1,1-3,5	
Жир баранячий	195,3	31-47	1,2-3,5	
Жир тріскový	187-191	160-183	< 2,8	7,2 -18

ДОСЛІД 5.1. ВИЗНАЧЕННЯ КИСЛОТНОГО ЧИСЛА ЖИРУ

Хід роботи. Дослід проводять в двох колбах для контролю відтворюваності. В сухі колби вміщують по 2-3 г олії та додають по 15 мл суміші етилового спирту і діетилового ефіру (1:1), попередньо нейтралізованого КОН по фенолфталеїну*.

**Примітка. Суміш спирту з ефіром нейтралізують 0,1 М спиртовим розчином КОН в присутності 3-4 крапель розчину фенолфталеїну) до слабко рожевого забарвлення і лише потім вливають в колбу з наважкою.*

Вміст колб ретельно перемішують для максимального переходу вільних жирних кислот у розчин і титрують водним розчином КОН в присутності індикатора фенолфталеїну до появи рожевого забарвлення, що не зникає

протягом 1 хв. При визначенні КЧ темних олій в якості індикатора використовують спиртовий розчин тимолфталеіну, ω(х) = 1% (кисле середовище − безбарвний, лужне − блакитний)

Кислотне число розраховують за формулою:

$$КЧ = \frac{5{,}61 \cdot V \cdot k}{m} \quad . \quad ,$$

де V - об'єм 0, 1 М розчину КОН, витраченого на титрування досліджуваної проби (мл);

m - наважка жиру (г);

5,61− кількість КОН (мг), еквівалентна 1 мл його 0, 1 М розчину.

k - поправочний коефіцієнт на титр КОН

Завдання. Визначити кислотне число олії або тваринного жиру на основі середніх значень між двома титруваннями. Зробити висновки щодо якості жиру або олії.

ДОСЛІД 5.2. ВИЗНАЧЕННЯ ЙОДНОГО ЧИСЛА ЖИРУ

Хід роботи. У дві пробірки за допомогою піпетки вносять по 5 мл спиртового розчину йоду. У пробірку № 1 (досліджувана проба) додають наважку жиру (0,3-0,5 г). Вміст пробірок ретельно перемішують і витримують протягом 25 хвилин. Потім вміст обох пробірок переносять у титрувальні колби, омиваючи порожні пробірки 5 мл води та зливаючи промивну воду до колб. Вміст кожної колби титрують розчином тіосульфату натрію ($C(\frac{1}{2} Na_2S_2O_3)$ = 0,05 моль/л) до появи блідо-жовтого забарвлення. Потім у колбу додають 3-5 крапель розчину крохмалю та продовжують титрування до зникнення синього забарвлення. Йодне число розраховують за формулою

$$ЙЧ = \frac{(V_2 - V_1) \cdot 0{,}006345 \cdot 100 \cdot k}{m}$$

де V_1 – об'єм 0,05 н розчину тіосульфату натрію , витрачений на титрування досліджуваної проби жиру (№ 1), мл;

V_2 – об'єм розчину тіосульфату натрію, витрачений на титрування контрольного розчину (№ 2), мл;

0,006345 – титр 0,05 н розчину тіосульфату (*г J_2 на мл $Na_2S_2O_3$*),

m – маса наважки жиру, г;

100 – коефіцієнт перерахунку результату виміру на 100 г жиру;

k – поправочний коефіцієнт *(за вказівкою викладача)*

Завдання. Провести дослід, розрахувати йодне число олії або тваринного жиру, зробити висновки щодо якості продукту.

ДОСЛІД 5.3. ВИЗНАЧЕННЯ ПЕРОКСИДНОГО ЧИСЛА ЖИРУ

Хід роботи. Визначення проводять в чотирьох колбах (дві колби використовують для досліду, дві – для контролю). КІ в невеликій кількості окиснюється в умовах доступу повітря, тому використання контрольних колб забезпечує необхідну точність визначення. Пробу жиру (1-2 г) зважують в колбах № 1 і № 2. Колби № 3 та №4 залишають в якості контролю. У кожну з колб вносять по 5 мл льодяної оцтової кислоти, 5 мл хлороформу та 1 мл свіжо приготованого насиченого розчину КІ. Колби щільно закривають гумовими корками, інтенсивно струшують протягом 2 хвилин та залишають інкубуватись в темному місці протягом 10 хвилин, періодично збовтуючи. Потім до кожної колби додають 50 мл дистильованої води, збовтують вміст і переливають у конічну колбу для титрування (змиваючи зі стінок колб залишки приблизно 10 мл води), і титрують розчином тіосульфату натрію (С($\frac{1}{2} Na_2S_2O_3$) = 0,01 моль/л). При досягненні солом'яно-жовтого забарвлення титрованої емульсії, до неї додають кілька крапель розчину крохмалю і

продовжують титрування до молочно-білого кольору. Пероксидне число розраховують за формулою:

$$ПЧ = \frac{(V_1 - V_2) \cdot c \cdot 1000}{m},$$

де V_1 – об'єм 0,01 н розчину тіосульфату натрію, витрачений на титрування дослідної проби жиру (№ 1), мл;

V_2 – об'єм 0,01 н розчину тіосульфату натрію, витрачений на титрування контрольного розчину (№ 2), мл,

с – молярна концентрація еквівалентів тіосульфату

m – маса наважки, г;

1000 – коефіцієнт перерахунку результату виміру в ммоль О на кг.

На титрування контрольного розчину має бути витрачено не більше 0,5-1 мл розчину тіосульфату 0,01 н (за більших об'ємів, слід перевірити реактиви на відповідність стандартним вимогам)

Для того, щоб перевести ПЧ у відсотки йоду (грами йоду на 100 г жиру), потрібно результат, виражений в *ммоль1/2 O_2 на кг* розділити на 78.

Завдання. Визначити пероксидне число зразків рослинних та тваринних жирів. Зробити висновки про товарну якість продукту.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ

1. Які сполуки входять до складу нейтральних ліпідів: олій та тваринних жирів?
2. Як впливає на фізичні властивості жирів відносний вміст насичених та ненасичених жирних кислот.
3. Які хімічні реакції перебігають при окисненні нейтральних ліпідів?
4. Дати визначення параметру число кислотне число жиру
5. Дати визначення параметру йодне число жиру.
6. Чому смакову якість і придатність до вживання остаточно можна визначити лише за використання пероксидного числа жиру?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 6.

ЗАГАЛЬНІ ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ АМІНОКИСЛОТ ТА БІЛКІВ

Кислотно-основні властивості амінокислот, біуретова реакція на пептидні зв'язки, утворення хелатних комплексів при взаємодії амінокислот з іонами металів.

Мета роботи: дослідити загальні хімічні властивості амінокислот. Провести якісну реакцію на пептидні зв'язки.

Реактиви: водний розчини: яєчного білку*; рослинних альбумінів**; желатини (ω(х) = 1%); амінокислот: гліцину (ω(Gly) = 1%); α-аланіну (ω(Ala) = 1%); глутамінової кислоти (ω(Glu) = 1%); лізину (ω(Lys) = 1%); гідроксиду натрію (ω(NaOH) = 10%); сульфату міді (ω($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) = 10%); індикаторні розчини метилоранжу та фенолфталеїну.

*** Розчин яєчного білку**

Білок одного курячого яйця відокремлюють від жовтка, розчиняють в 15-20 кратному об'ємі дистильованої води, добре перемішують. Утворену емульсію фільтрують через марлю, складену в 3 шари. Зберігають в холодильнику.

****Розчин рослинних альбумінів**

До 40 г пшеничної муки додають 160 мл дистильованої води, добре перемішують, відстоюють в холодильнику за температури від +1 до +5 ^oC одну добу. Суспензію фільтрують послідовно через вату і паперовий фільтр (червона стрічка).

Обладнання: колби, пробірки, піпетки, крапельниці, скляні палички.

Теоретичні відомості

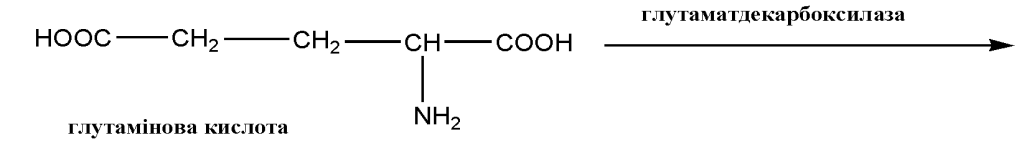
Білки входять до складу усіх клітинних компонентів та міжклітинних структур рослин, тварин і мікроорганізмів. Різноманітність білків живих клітин зростає пропорційно ступеню складності геному і, відповідно, рівню організації живого організму. Білки є високомолекулярними гетерополімерами, що побудовані із залишків амінокислот, об'єднаних кислото-амідними (пептидними) зв'язками (–NH–CO–). На сьогодні відомо понад 150 амінокислот, однак до складу білків входять лише 20 з них і ці амінокислоти називають протеїногенними.

Амінокислоти за хімічною природою є карбоновими кислотами, у яких один або більше атомів гідрогену заміщено на аміногрупу. Розрізняють α-, β-, γ- … ω- амінокислоти, залежно від положення аміногрупи по відношенню до карбоксильної групи. За винятком проліну, який є α-імінокислотою (нітроген задіяний в утворенні циклу), всі протеїногенні амінокислоти відносять до α-амінокислот. Це означає, що α-карбон (найближчий карбон до карбоксильної групи) сполучений як з карбоксильною так і аміно-групою. Крім того, кожна амінокислота має індивідуальний бічний радикал (R), що сполучається також з α- карбоном. Найчастіше саме радикали визначають основні фізико-хімічні властивості як амінокислот, так і поліпептидних ланцюгів, до складу яких вони входять.

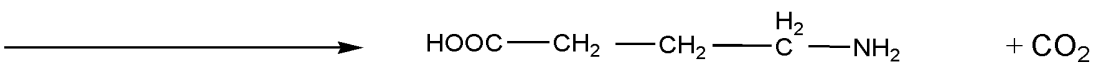
Якщо радикали амінокислот нейтральні (не містять додаткової аміно- або карбоксильної групи), то вони практично не впливають на дисоціацію карбоксильної або аміногрупи, і значення ізоелектричної точки амінокислоти лежить в межах pH середовища близького до нейтрального. Таким чином, в інтервалі pH від 4,0 до 9,0 нейтральні амінокислоти існують переважно у формі цвіттеріонів з протонованою аміногрупою і дисоційованою карбоксильною групою. Значення ізоелектричної точки амінокислот, що містять додаткові кислотні (аспарагінова кислота і глутамінова кислота) або основні групи (лізин, аргінін, гістидин), залежить від кислотності або основності радикалів цих амінокислот.

Амінокислоти вступають в наступні реакції:

- *Декарбоксилювання* з утворенням біологічно-активних амінів

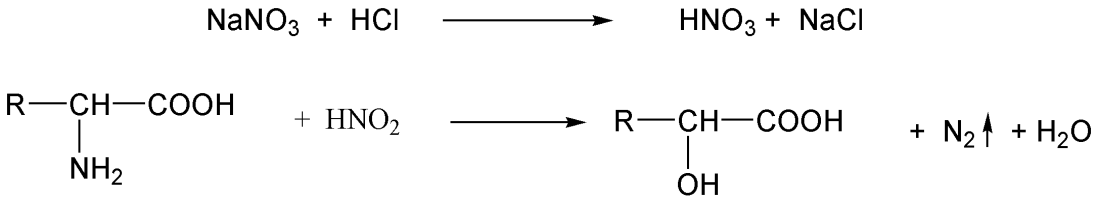


глутамінова кислота



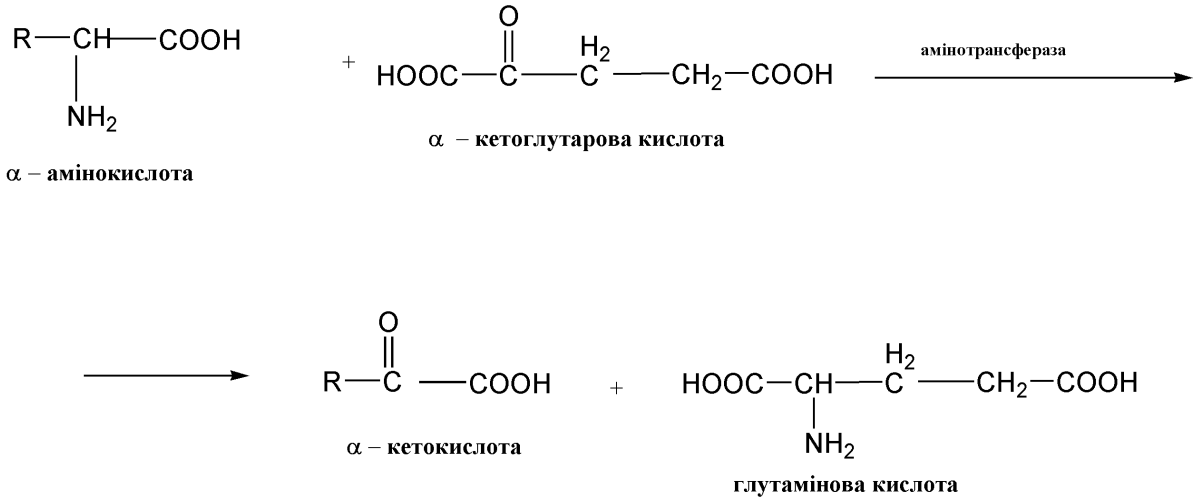
γ–аміномасляна кислота

- *Дезамінування* з утворенням карбонових кислот



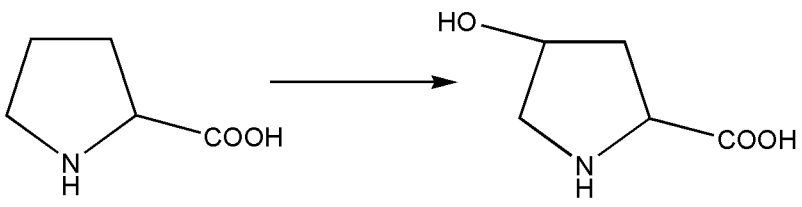
- *Утворення пептидів (амідів).* Сполучення окремих амінокислот супроводжується дегідратацією і утворенням амідного (пептидного) зв'язку (–NH–CO–)

- *Переамінування* (заміщення аміногрупи)



–Гідроксилювання.

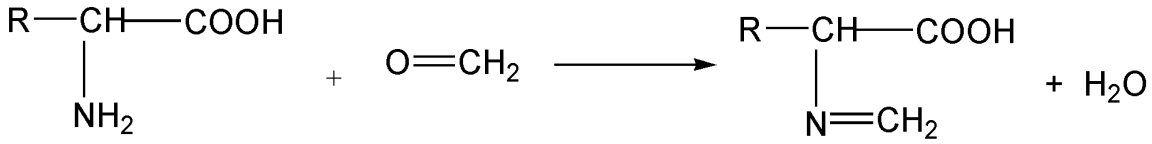
До складу колагену (одного з білків шкіри і сполучної тканини) входить гідроксильована амінокислота пролін (гідроксипролін). Додаткова гідроксильна група є біологічно важливою, оскільки стабілізує структуру колагенового волокна. Реакція гідроксилювання протікає в організмі за



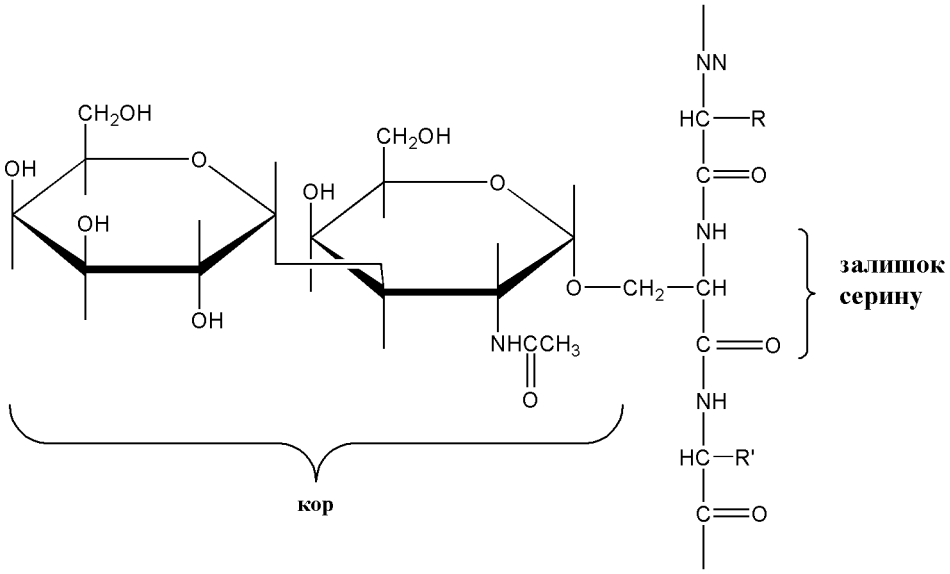
пролін **гідроксипролін**

участі редокс пари аскорбінової кислоти. За нестачі в організмі людини вітаміну С внаслідок недостатнього гідроксилювання колагену розвивається захворювання цинга, що супроводжується кровоточивістю ясен.

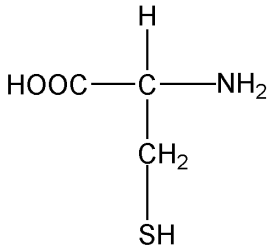
- *Реакції з альдегідами* з утворенням основ Шиффа:



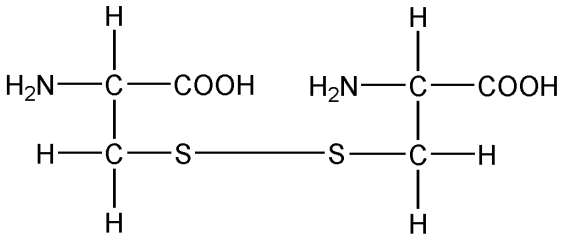
- *Взаємодіяти з вуглеводами* і утворення глікопептидів за рахунок формування N– та O– глікозидних зв'язків.



- *Окиснення SH-груп.* В результаті формуються дисульфідні зв'язки в структурі білку або окремі сполуки, наприклад, димер цистеїна – цистин.

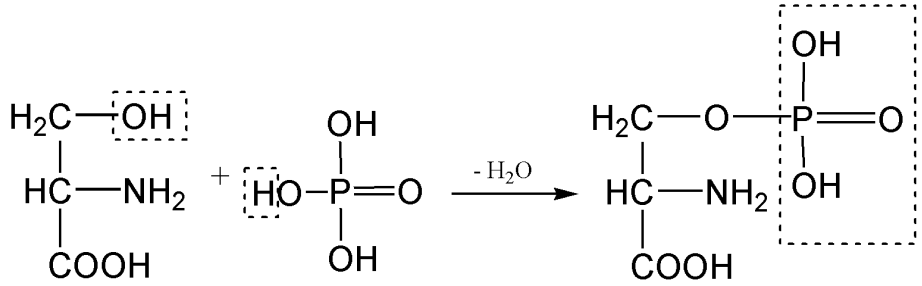


цистеін



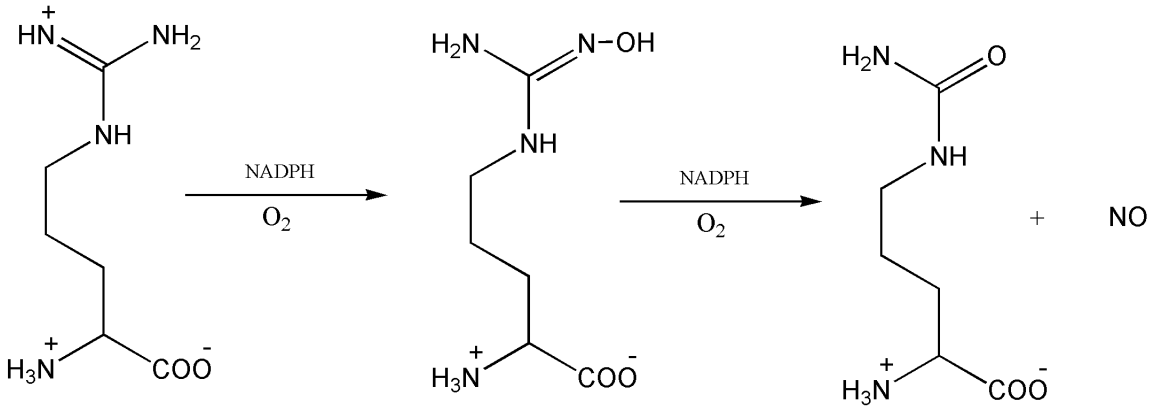
цистин

- *Фосфорилювання гідроксиамінокислот* з утворенням складних фосфорних ефірів.



серин **фосфосерин**

- *Окиснення гуанідінової групи амінокислоти аргініну*



Під час клінічних досліджень фармацевтичних препаратів для лікування серцево-судинних захворювань в одній з клінік США пацієнту помилково ввели препарат, що містив окис азоту (NO). Препарат викликав різке розслаблення кровоносних судин. Цим фактом зацікавились професор Ф. Ферчготт та лікарі Ф. Мурад і Л. Ігнарро. В результаті серії досліджень медицина одержала сенсаційне відкриття: окис азоту - речовина, що надзвичайно потрібна організму людини.

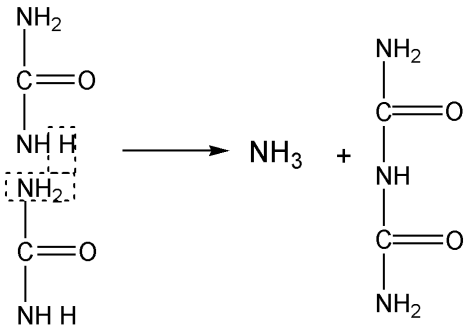
Пізніше було встановлено, що амінокислота аргінін регулює вміст в крові оксиду азоту (див. рівняння реакції)*, впливаючи на стан кровоносних судин, імунну та згортальну функцію крові, чоловічу статеву систему (еректильна функція). Аргінин*

входить до складу багатьох терапевтичних препаратів для лікування судинних і серцево-судинних захворювань (тивортін, вазотон). В 1992 році журнал «Science» назвав аргінін «Молекулою року», а в 1998 році Ферчготт, Мурад і Игнарро були удостоєні Нобелевської премії.

Властивості кожної молекули білку визначаються перш за все кількісним вмістом та послідовністю амінокислотних залишків. Широкий діапазон функцій, які виконують білки, знаходить відображення у різноманітті їх хімічних структур та просторових форм. Описуючи структуру певної молекули білку, використовують терміни: первинна, вторинна, третинна та четвертинна структура. Визначальною є первинна структура − послідовність амінокислотних залишків. Вторинна структура – це ряд просторових конформацій (α-спіраль, колагенова спіраль, β-структура), утворених за рахунок водневих зв'язків між окремими ділянками пептидного ланцюга або різними пептидними ланцюгами. Третинна структура білків (глобула або фібрила) являє собою результат «укладання» в тримірному просторі поліпептидного ланцюга з певною вторинною структурою. В утворенні та стабілізації третинної структури беруть участь водневі, іонні і гідрофобні взаємодії. Четвертинна структура білків утворюється при агрегації декількох поліпептидних ланцюгів або протомерів, кожен з яких має свою характерну впорядковану конформацію.

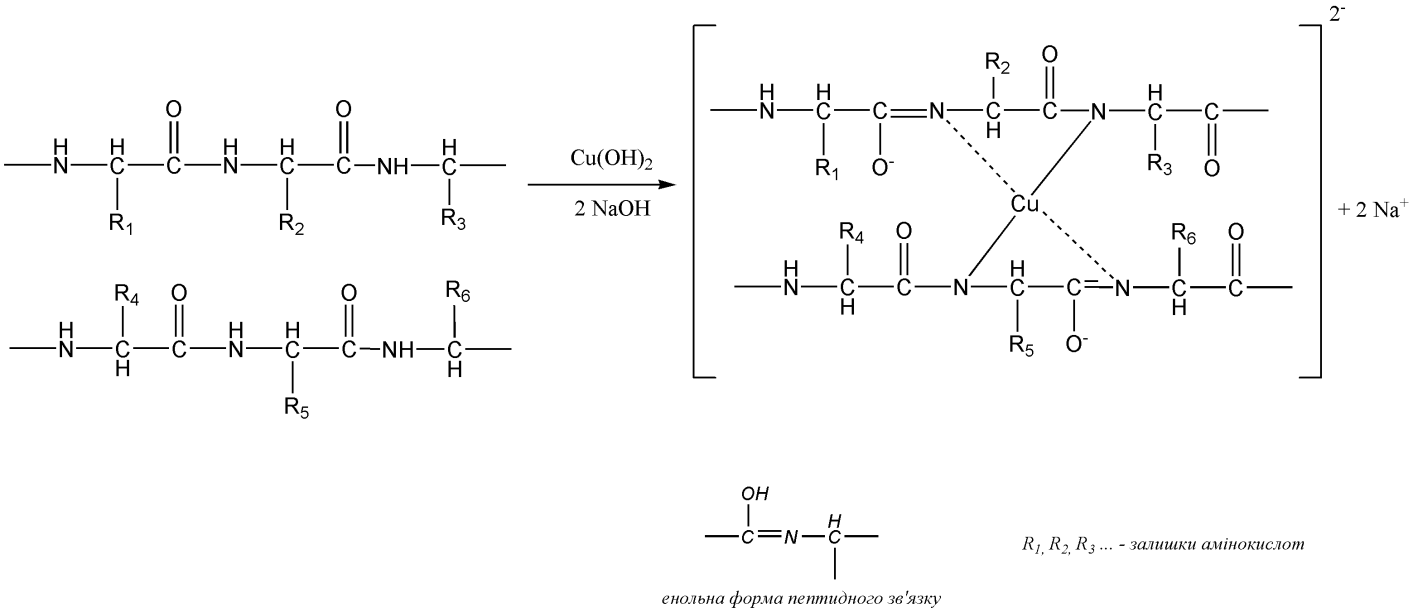
Пептидний зв'язок, що є основою первинної структури, за хімічною природою є ковалентним полярним зв'язком. Атоми нітрогену і карбону, поєднані між собою, мають неподілені пари електронів, завдяки чому поліпептидні ланцюги здатні утворювати комплексні забарвлені сполуки з іонами металів.

Прикладом такої кольорової реакції є біуретова реакція, де білки або пептиди взаємодіють з гідроксидом купруму (II). Позитивну біуретову реакцію дають сполуки, що містять не менше двох пептидних зв'язків. Назва реакції походить від назви сполуки «біурет», з якою вперше вона була проведена.

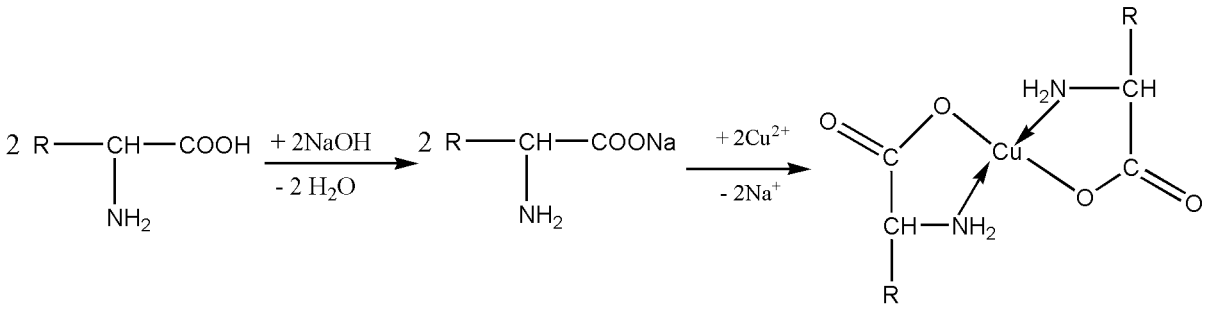


Біурет має два пептидні зв’язки і утворюється з сечовини при нагріванні її до 180 °С.

Колір та інтенсивність забарвлення продуктів біуретової реакції можуть змінюватись від синьо-фіолетового до червоно-фіолетового і залежать від кількості іонів купруму (II) в розчині та від структури пептиду, з яким вони взаємодіють. Можливе кількісне визначення білку за інтенсивністю забарвлення з використанням фотоелектроколориметра. Амінокислоти аспарагін і глутамін також дають позитивну біуретову реакцію, утворюючи стійку комплексну сполуку фіолетового кольору. Схему утворення комплексної сполуки купруму наведено нижче:



Інші α-амінокислоти при взаємодії з іонами двовалентних металів Cu^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+} в лужному середовищі утворюють хелатні комплекси:



В результаті взаємодії більшості амінокислот з іонами металів одержують кристалічні хелатні солі, які використовують для виявлення амінокислот.

ДОСЛІД 6.1. КИСЛОТНО-ОСНОВНІ ВЛАСТИВОСТІ АМІНОКИСЛОТ

В трьох флаконах (№ 1, № 2, № 3) міститься по 10 мл невизначеної безбарвної рідини. Відомо, що там знаходяться водні розчини або α-аланіну, або глутамінової кислоти, або лізину. Необхідно ідентифікувати вміст кожного флакону.

Хід роботи. Дослід проводять у двох варіантах, по три пробірки у кожному. У пробірки першого варіанту вносять по 1 мл розчинів амінокислот з флаконів № 1, № 2, № 3 і додають 1 краплю метилоранжу у кожну пробірку. У пробірки другого варіанту аналогічно вносять по 1 мл розчинів з флаконів № 1, № 2, № 3 і додають по 1 краплі фенолфталеїну. Спостерігають за зміною забарвлення розчину у пробірках кожної серії.

Завдання. Запишіть та поясніть зміну забарвлення розчинів. Визначте, розчини яких амінокислот у яких пробірках знаходяться. Напишіть формули досліджуваних амінокислот у вигляді іонів.

ДОСЛІД 6.2. БІУРЕТОВА РЕАКЦІЯ І УТВОРЕННЯ ХЕЛАТНИХ КОМПЛЕКСІВ МЕТАЛІВ

Хід роботи. У п’ять пробірок вносять:

-у пробірку №1 – 3 мл розчину яєчного білку,

-у пробірку № 2 – 3 мл розчину желатини,

-у пробірку № 3 – 2 мл розчину рослинних альбумінів,

-у пробірку № 4 – 2 мл розчину гліцину,

- у пробірку № 5 –2 мл розчину α-аланіну.

У кожну пробірку додають по 1 мл розчину NaOH та по 1-2 краплі розчину $CuSO_4$. Вміст пробірок добре перемішують та спостерігають за змінами, що відбуваються у розчинах протягом 15 хв відстоювання.

Завдання. Запишіть та поясніть зміну забарвлення розчинів, випадіння осаду. Напишіть реакції утворення хелатних комплексних солей при взаємодії гліцину та аланіну з іонами Cu^{2+} .

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ

1. В результаті яких реакцій з α-амінокислот утворюються карбонові кислоти і аміни?
2. Як утворюється первинна, вторинна, третинна і четвертинна структура білків?
3. Чому в організмі людини за достатньої кількості амінокислоти проліну але недостачі вітаміну С може розвиватись цинга?
4. Властивості пептидного зв’язку і реакція пептидів з іонами металів.
5. Які сполуки дають позитивну біуретову реакцію?
6. Яке забарвлення має аміноацетат купруму в лужному середовищі?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 7

ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА АМІНОКИСЛОТИ

Реакція з нінгідрином, реакція Фоля, ксантопротеїнова реакція, реакція Адамкевича.

Мета роботи: провести якісні реакції на амінокислоти у водних розчинах хімічно чистих сполук, у водних розчинах білків і нативному білку курячого яйця. Ідентифікувати α-амінокислоти (нінгідринова реакція), сірковмісні амінокислоти (реакція Фоля), амінокислоти з ароматичним радикалом (ксантопротеїнова реакція), триптофан (реакція Адамкевича)

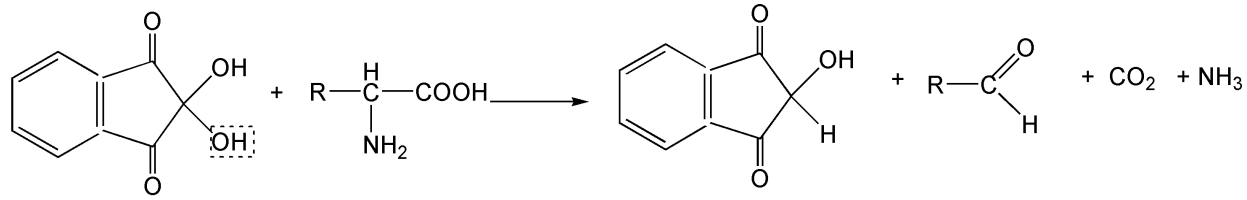
Реактиви: нативний яєчний білок; водні розчини: яєчного білку і рослинних альбумінів (приготування див. лаб. роб. № 6); желатини (ω(х) = 1%); амінокислот: гліцину (ω(Gly) = 1%); α-аланіну (ω(Ala) = 1%); аспарагіну (ω(Asn) = 1%); триптофану (ω(Trp) = 0,1%); гідроксиду натрію (ω(NaOH) = 20%); реактив Фоля (водний розчин ацетату плюмбуму (ω($Pb(CH_3COO)_2$) = 5%); розчин нінгідрину (ω(х) = 0,5%) у водному розчині ацетону (ω(C_3H_6O) = 95%); концентрована HNO_3, концентрована H_2SO_4, льодова оцтова кислота.

Обладнання: колби, пробірки, піпетки, крапельниці, скляні палички.

Теоретичні відомості

Якісна нінгідринова реакція

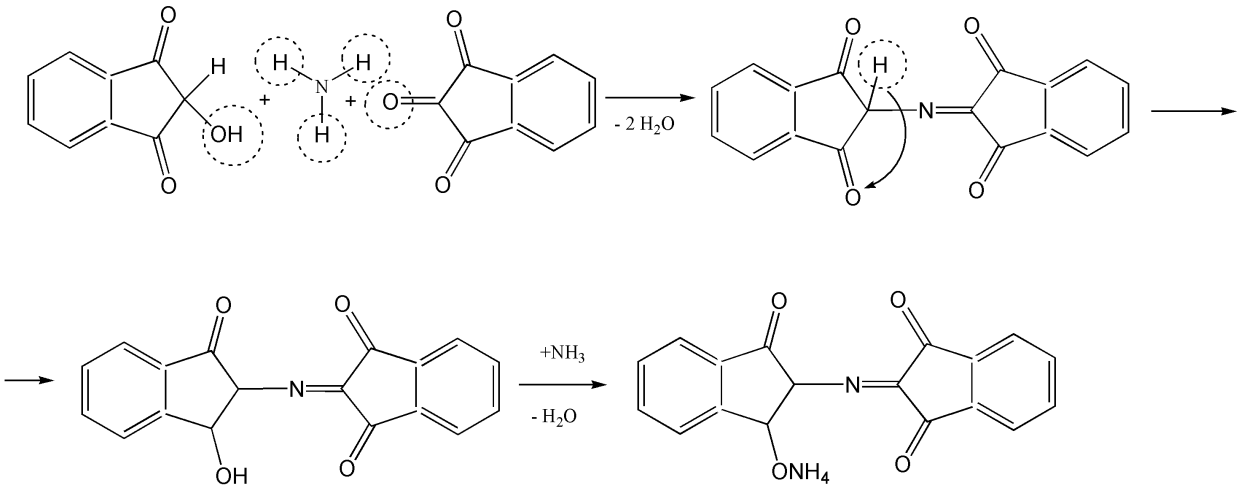
За нагрівання з нінгідрином (трикетогідринденгідратом) α-амінокислоти одночасно декарбоксилюються та дезамінуються з утворенням альдегіду, аміаку та вуглекислого газу. При цьому відбувається відновлення нінгідрину з утворенням гідриндантину.



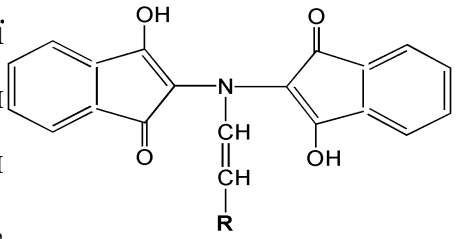
окиснена форма нінгідрину — відновлена форма нінгідрину

При нагріванні розчину білку з нінгідрином спочатку відбувається гідроліз білків до амінокислот, які потім відновлюються до альдегідів.

Молекули гідриндантину в розчині конденсуються з окисненою формою нінгідрину, при цьому утворюється сполука синьо-фіолетового кольору «барвник Руємана».



Наведена реакція є характерною для α-амінокислот, тобто всіх протеїногенних амінокислот. За присутності органічного розчинника (ацетону, на основі якого готують розчин нінгідрину) можливе утворення нової складної сполуки, що містить в своєму складі радикал амінокислоти і обумовлює інші варіанти забарвлення (жовте, помаранчове,блакитне). Так, пролін та оксипролін утворюють сполуку жовтого кольору, аспарагін – помаранчево-коричневу.



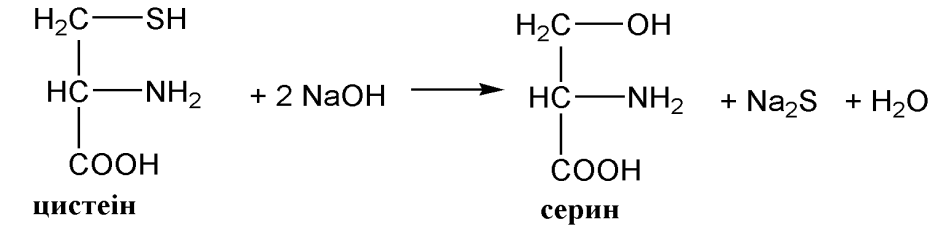
Нінгідринову реакцію використовують також для кількісного визначення протеїногенних амінокислот колориметричним методом за світлофільтру 560 нм, при чому для проліну світлофільтр 440 нм.

Якісна реакція Фоля

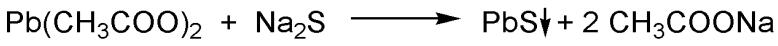
Амінокислоти цистеїн, цистин (димер цистину) і метіонін містять сульфур. За нагрівання лужних водних розчинів цистину і цистеїну

відбувається гідроліз сульфідгідрильної групи і утворення сульфідів натрію або калію. За присутності в розчині іонів Pb^{2+} утворюється нерозчинний сульфід плюмбуму (II) чорного кольору. Метіонін є стійкою сполукою і для гідролізу потребує вищих концентрацій NaOH (або KOH). Реакція Фоля дозволяє ідентифікувати вільні сірковмісні амінокислоти у розчині і сірковмісні амінокислоти у складі певного білка.

Реакції гідролізу цистеїну і утворення нерозчинного сульфіду плюмбуму:



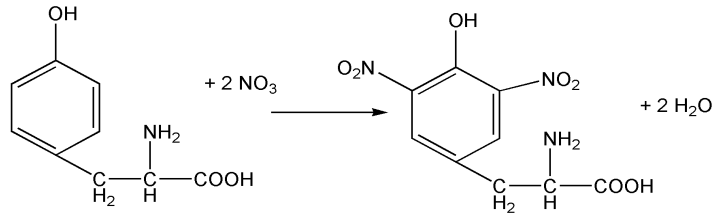
цистеін **серин**



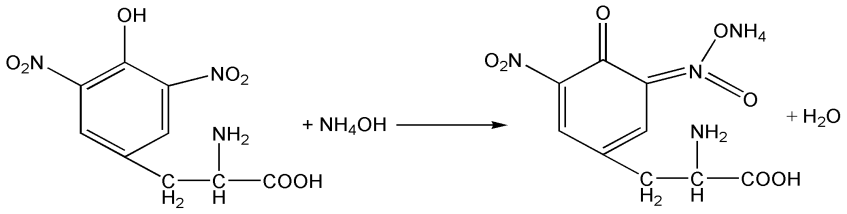
Якісна ксантопротеїнова реакція

Амінокислоти тирозин, фенілаланін, триптофан, які мають у складі радикалу ароматичне кільце, можуть бути ідентифіковані як у водному розчині у вільному стані так і у складі білку за допомогою ксантопротеїнової реакції. Назва реакції походить від грецьких коренів *csantos* - жовтий, *protein* - білок). Позитивну ксантопротеїнову реакцію також дають прості ароматичні сполуки: бензол, фенол тощо.

Взаємодія ароматичних амінокислот з концентрованою нітратною кислотою за високих температур приводить до нітрування бензольного кільця з утворенням забарвленої в жовтий колір сполуки. Реакція проходить в дві стадії (розглянемо на прикладі тирозину). На першій стадії тирозин взаємодіє з концентрованою HNO_3 з утворенням динітротирозіну (жовтий колір). Залежно від кількості HNO_3 може утворитись суміш динітро- і нітротирозину. На другій стадії нітротирозин реагує з гідроксидом натрію або з гідроксидом амонію з утворенням натрієвої або амонійної солі, що має помаранчеве забарвлення



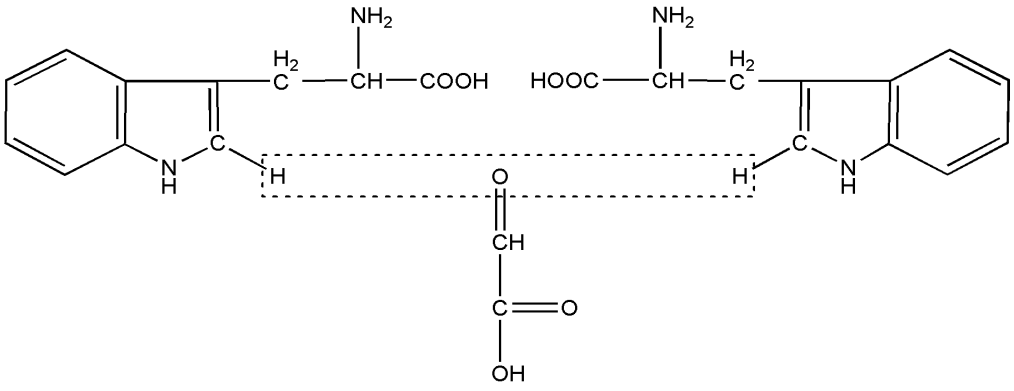
тирозин **динітротирозин**



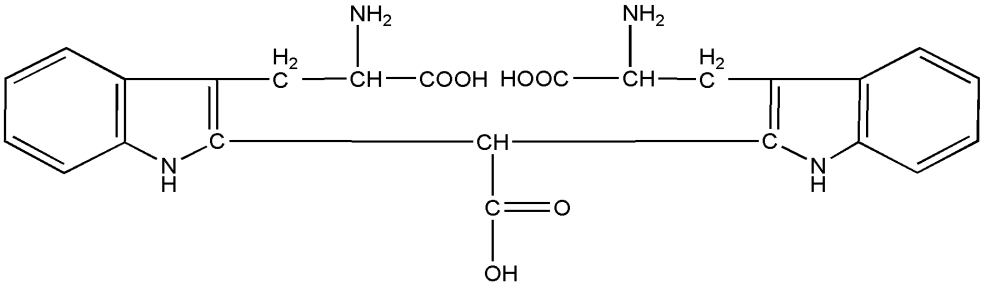
амонійна сіль динітротирозину

Якісна реакція на триптофан (реакція Адамкевича)

Триптофан у кислому середовищі вступає в реакцію з альдегідами, утворюючи при цьому забарвлені у червоно-фіолетовий колір продукти. Наприклад, з гліоксиловою кислотою (яка є домішкою концентрованої оцтової кислоти) реакція проходить за рівнянням



гліоксилова кислота



За аналогічною схемою відбувається реакція триптофану з оксиметилфурфуролом і формальдегідом.

ДОСЛІД 7.1. РЕАКЦІЯ АМІНОКИСЛОТ З НІНГІДРИНОМ

Хід роботи. У чотири пробірки вносять:

- в пробірку № 1 – 1 мл водного розчину яєчного білку;

-в пробірку № 2 – 1 мл водного розчину рослинних альбумінів;

-в пробірку № 3 – 1 мл розчину гліцину,

-в пробірку № 4 – 1 мл розчину аспарагіну. В пробірки додають по краплям розчин нінгідрину, добре перемішуючи: в пробірки з амінокислотами (№ 3, № 4) додають по 5-6 крапель, в пробірки з білками (№ 1, № 2) по 10-12 крапель. Суміші ставлять на водяну баню, яку спочатку поступово нагрівають а потім кип'ятять. Спостерігають за зміною забарвлення розчинів у пробірках. Після нагрівання при відстоюванні інтенсивність забарвлення вмісту пробірок підсилюється.

Завдання. Поясніть зміну забарвлення розчинів та запишіть сполуки на які перетворюються гліцин і аспарагін.

ДОСЛІД 7.2. РЕАКЦІЯ ФОЛЯ

Хід роботи. У три пробірки вносять:

-в пробірку № 1 – 1 мл водного розчину яєчного білка,

-в пробірку № 2–1 мл розчину рослинних альбумінів,

-в пробірку № 3 – 1 мл розчину желатини.

В кожну з пробірок додають по 2 мл розчину NaOH і по 1 мл реактиву Фоля. Вміст пробірок добре перемішують і поступово нагрівають на водяній бані до появи чорного осаду.

Завдання. Поясніть результати спостереження. Напишіть рівняння реакції Фоля для цистину.

ДОСЛІД 7.3. КСАНТОПРОТЕЇНОВА РЕАКЦІЯ НА АРОМАТИЧНІ АМІНОКИСЛОТИ

Хід роботи. У три пробірки вносять:

-в пробірку № 1 – 2 мл розчину триптофану,

-в пробірку № 2 – 3 мл розчину яєчного білку,

-в пробірку № 3 – 3 мл розчину желатини.

У кожну пробірку додають по 1 мл концентрованої HNO_3. Пробірки поступово нагрівають на водяній бані до появи забарвлення. Після охолодження до кімнатної температури в пробірки обережно по краплинах додають розчин NaOH до появи помаранчевого забарвлення.

Завдання. Поясніть результати спостереження. Напишіть рівняння реакції для триптофану і NaOH в присутності концентрованої нітратної кислоти.

ДОСЛІД 7.4. РЕАКЦІЯ АДАМКЕВИЧА

Хід роботи. У чотири пробірки вносять:

- в пробірку № 1 – 2 мл 0,1 % розчину триптофану,

- в пробірку № 2 – 2 мл водного розчину білкових альбумінів,

- в пробірку № 3 – 2 мл розчину желатини,

- в пробірку № 4 – 1 мл яєчного білку.

- в пробірку № 5 – 2 мл водного розчину яєчного білку.

В кожну пробірку додають по 1 мл льодової оцтової кислоти. Суміш спочатку повільно нагрівають на водяній бані до розчинення осаду, а потім охолоджують до кімнатної температури. В усі пробірки обережно, по стінці, щоб рідини не змішувались, додають по 1 мл концентрованої H_2SO_4. Через 10 хв. на межі двох рідин спостерігається утворення червоно-фіолетового кільця. Реакцію можна прискорити, якщо суміш помістити у киплячу водяну баню.

Завдання. Запишіть та поясніть результати спостереження.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ

1. Яка якісна реакція є характерною для всіх протеїногенних амінокислот?
2. Назвіть речовини, які є продуктами нінгідринової реакції.
3. Які з наведених якісних реакцій є позитивними для триптофану?
4. Чи входять до складу білку желатини залишки амінокислот цистину або цистеїну?
5. Які речовини можна ідентифікувати за допомогою ксантопротеїнової реакції?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 8

ІДЕНТИФІКАЦІЯ АМІНОКИСЛОТ МЕТОДОМ ПАПЕРОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Мета роботи: опанувати методику розділення та ідентифікації амінокислот за використання висхідної паперової хроматографії.

Реактиви*:* водні розчини (ω(х) = 1%) наступних амінокислот: α-аланіну, аспарагіну, лізину, гліцину, триптофану та глутамінової кислоти; три варіанти сумішей амінокислот; проявник: розчин нінгідрину (ω(х) = 0,5%) у водному розчині ацетону (ω(C_3H_6O) = 95%) система розчинників (n-бутанол, оцтова кислота і вода у співвідношенні 4:1:1).

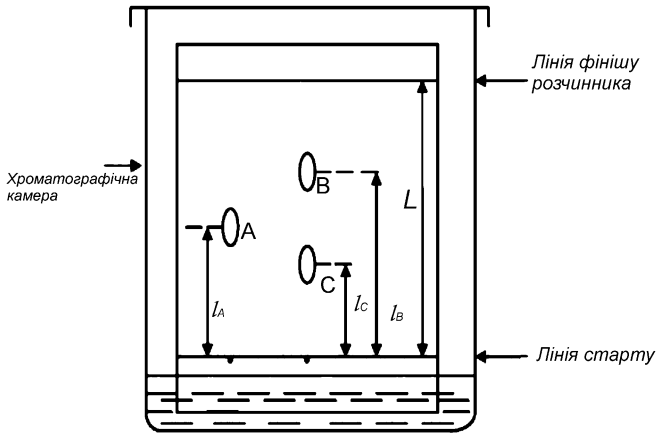
Обладнання: хроматографічний папір; ексикатор; пульверизатор; мікропіпетки; сушильна шафа; олівець; лінійка; годинник, гумові рукавички.

Теоретичні відомості

В якісному аналізі речовин часто використовують паперову і тонкошарову хроматографії та іонний обмін в колонках. Переваги паперової і тонкошарової хроматографій –простота і показовість розділення, можливість виявляти речовини за низьких концентрацій. Іонний обмін в колонках застосовують для відокремлення катіонів від аніонів в складних багатокомпонентних сумішах.

В паперовій хроматографії розділення речовин відбувається внаслідок розподілу їх між нерухомою фазою (водою, адсорбованою молекулами целюлози) і рухомою фазою. В якості рухомої фази використовують органічні розчинники, які змішуються або не змішуються з водою, інколи розчини електролітів. Для оцінки хроматографічного розділення речовин використовують показник R_f , який розраховують за формулою $R_f = \frac{l}{L}$, де l - відстань, що пройшла речовина, L - відстань, що пройшов розчинник. (Рис.

1.) Для розрахунку R_f зазвичай обирають точку в середині плями, розділення речовин є ефективним за умови $R_f(I) - R_f(II) \geq 1$.



На величину R_f впливають природа досліджуваних речовин, склад рухомої фази, тип хроматографічного паперу, час проходження хроматографії. Хроматографічний папір різниться за розмірами пор, тому різні сорти паперу забезпечують різну швидкість руху розчинника.

Рис. 8.1 – Паперова висхідна хроматографія

Необхідно враховувати, що швидкість руху розчинника в різних напрямах різна, тому смужки паперу слід нарізати вздовж волокна. Довжина *l* залежить від природи амінокислоти, зокрема визначається не її молекулярною масою, а ступенем спорідненості речовини до компонентів розчинника (табл. 1).

В якості рухомої фази для розділення амінокислот застосовують наступну суміш органічних розчинників: n-бутанол, оцтова кислота і вода у співвідношенні 4:1:1. Готують розчини амінокислот ($\omega_{(x)}$ = 1%), які використовують в якості «свідків» для контролю розділення сумішей. Паперову хроматографію можна здійснювати методом висхідного, горизонтального або радіального руху розчинника. За висхідної хроматографії рухома фаза (розчинник) рухається знизу вгору за рахунок капілярних сил. За низхідної хроматографії рухома фаза з верхньої частини камери під дією гравітаційних сил рухається вниз по хроматографічному паперу (проведення низхідної хроматографії вимагає спеціального обладнання, тому застосовується рідко). В горизонтальній або радіальній хроматографії розчинник підводиться до центру паперового диску, куди

нанесені краплі аналізованих сумішей. Радіальну хроматографію проводять в чашках Петрі однакового діаметру (дві кришки або дві основи) між якими поміщають паперовий диск дещо більшого діаметру з вирізаною по радіусу тонкою (2-3 мм) смужкою та загнутою вниз перпендикулярно диску. В нижню частину чашки наливають розчинник, куди опускають кінчик смужки. Плями зразків на проявленій радіальній хроматограмі мають форму еліпсів, тому що швидкість руху розчинника залежить від напряму паперового волокна.

Таблиця 8.1. − Стандартні величини R_f та забарвлення плям амінокислот на паперовій хроматограмі в системі розчинників: n-бутанол, оцтова кислота і вода

амінокислота	колір плями	R_f
лізин	червоно-фіолетовий	0,12
аспарагін	синій	0,12
гліцин	червоно-сірий	0,23
глутамінова кислота	фіолетовий	0,28
α-аланін	фіолетовий	0,3
триптофан	сіро-рожевий	0,5
лейцин	фіолетовий	0,7

Хроматографію припиняють, коли фронт розчинника підніметься не менше ніж 8-10 см (однак при цьому має залишитись не менше 1 см від верхнього краю хроматограми до лінії фінішу розчинника). Хроматограму виймають з камери висушують на повітрі (або над електричною плиткою) і проявляють, обприскуючи розчином нінгідрину.

Хід роботи.

Розчинник (n-бутанол, оцтова кислота і вода у співвідношенні 4:1:1) заливають в хроматографічну камеру (прозорий скляний стакан всередині ексикатору), вимірюють глибину розчинника в камері за допомогою

дерев'яної палички та лінійки (глибина має бути 0,5-1 см). Щільно закривають кришку ексикатору, для того, щоб відбулось насичення камери парами розчинника. Ексикатор ставлять у витяжну шафу.

З хроматографічного паперу *вздовж волокна* вирізають смужки відповідно до розмірів камери таким чином, щоб смужка була не коротшою за 11 см і при цьому не торкалась стінок камери. Всі операції з хроматографічним папером проводять *в гумових рукавичках.* У верхній частині смужки олівцем обережно позначають номер (назву) бригади. На відстані приблизно 1 і 2 см від нижнього краю смужки тонко заточеним простим олівцем обережно проводять дві паралельні лінії. Нижня лінія має відповідати лінії старту рухомого розчинника, верхня – лінії старту зразків амінокислот. *Відстань між лініями має бути не менше 1 см і плями нанесених зразків не повинні торкатися розчинника.* На лінії старту зразків амінокислот тонко заточеним олівцем ставлять крапки з відповідними скороченими підписами сумішей амінокислот № 1, № 2, № 3 та «свідків» - чистих розчинів амінокислот (наприклад, *С 1* – суміш амінокислот № 1; *Ala* – аланін, *Trp* – триптофан тощо). Крапки розташовують на відстані 1,5 см одна від одної. Нанесення зразків проводять за допомогою скляного капіляру, зануривши його в розчин і обережно торкаючись позначеної крапки на лінії старту зразків. Після першого нанесення (1 крапля - одне торкання) плямі дають підсохнути і наносять капіляром краплю зразку ще раз в ту ж саму точку. Діаметр утвореної плями має не перевищувати 3 мм. Кожна бригада наносить три зразка суміші і «свідки» - розчини 6 амінокислот: аланіну, аспарагіну, лізину, гліцину, триптофану та глутамінової кислоти. *Плями зразків добре висушують* на повітрі або над електричною плиткою.

Хроматограму з сухими плямами зразків фіксують за допомогою прищіпок (можна використати канцелярські скріпки) на тонкій дерев'яній паличці і обережно поміщають до хроматографічної камери. В рідкий розчинник має бути занурена лише нижня частина хроматограми до рівня старту розчинника. *Зразки ні в ніякому разі не мають торкатися*

розчинника. Ексикатор щільно закривають і залишають на хроматографування, слідкуючи за рухом розчинника. *Ексикатор з хроматограмами не можна рухати і переставляти протягом процесу проходження хроматографії.* Тривалість проходження хроматографії за зазначених вище умов 1,5-2 години.

Після того, як фронт розчинника підніметься на 8-10 см, хроматографію припиняють. Не можна допускати, щоб фронт розчинника піднявся до самого верху або за межі хроматограми (за таких умов не буде можливим коректне визначення L і R_f, крім того деякі речовини при перетіканні розчинника через край можуть бути втрачені).

Хроматограму виймають з камери висушують на повітрі або над електричною плиткою. Хроматограму обприскують з пульвелізатора розчином нінгідрину і проявляють протягом 5-10 хв витримування в сушильній шафі за температури 100-110^{o}C до появи забарвлених зон. Кожну кольорову пляму обводять олівцем, крапкою позначають центр плями. Відстань l, що пройшла кожна амінокислота вимірюють лінійкою від лінії старту зразку до центра плями, L - визначають від лінії старту до лінії фінішу розчинника. Розраховують R_f та за одержаними значеннями і забарвленням плям ідентифікують амінокислоти, що входять до складу сумішей (табл. 8.1). В якості контролю ідентифікації використовують плями речовин-свідків.

Завдання. Одержані результати заносять до таблиць 8.2 і 8.3. Роблять висновки про відповідність результатів стандартним значенням (таблиця 8.1). та про склад досліджуваних сумішей.

Таблиця 8.2 − Результати експерименту з висхідної паперової хроматографії амінокислот

		Відстань, що пройшов розчинник L =… см	
амінокислота	**колір плями**	l	R_f
лізин			
аспарагін			
гліцин			
глутамінова кислота			
α-аланін			
триптофан			
лейцин			

Таблиця 8.3 – Склад досліджуваних сумішей

Варіант суміші	Амінокислотний склад
Суміш № 1	
Суміш № 2	
Суміш № 3	

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ

1. Наведіть переваги паперової хроматографії у порівнянні з іншими методами розділення і ідентифікації амінокислот.
2. Які речовини виступають в якості рухомої і нерухомої фази при паперовій хроматографії?
3. Як розраховують величину R_f і для чого використовують «свідків» у хроматограмі?
4. Які вимоги до розмітки хроматограми?
5. Чим відрізняється висхідна, низхідна і радіальна хроматографія на папері?
6. Від яких чинників залежить довжина відстані, яку пройшла амінокислота на хроматограмі?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 9

ДЕНАТУРАЦІЯ ТА ОСАДЖЕННЯ БІЛКІВ

Денатурація білків під впливом високої температури. Осадження білків солями важких металів, неорганічними і органічними кислотами, етиловим спиртом

Мета роботи: ознайомлення з методами зворотної та незворотної денатурації білків, осадження білків і утворення стійких дисперсних систем.

Реактиви: водні розчини: яєчного білку*; оцтової кислоти (ω(CH_3COOH) = 1%); гідроксиду натрію (ω(NaOH) = 10%); ацетату плюмбуму (ω($Pb(CH_3COO)_2$ = 5%); сульфату міді (ω($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) = 5%); сульфатної кислоти (ω(H_2SO_4) = 20%); хлоридна кислота (ω(HCl) = 20%); трихлороцтової кислоти (ω(CCl_3COOH) = 10%); сульфосаліцилової кислоти (ω_x = 20%); етилового спирту (ω(C_2H_5OH) = 96%); насичений розчин NaCI; концентрована HNO_3; порошок NaCl.

*** Розчин яєчного білку**

Білок одного курячого яйця відокремлюють від жовтка, розчиняють в 10 кратному об'ємі дистильованої води, добре перемішують. Утворену емульсію фільтрують через марлю, складену в 3 шари. Зберігають в холодильнику.

Обладнання: пробірки; газові пальники або спиртівки, ліхтарик з червоним лазерним променем

Теоретичні відомості

У воді більшість білків утворюють дисперсні системи (суспензії та емульсії) за рахунок утворення молекулами білку заряджених та гідратованих колоїдних частинок, що відштовхуються одна від одної і тому не осідають. Порушення факторів, що стабілізують четвертинну (якщо така має місце), третинну і вторинну структури молекули білку, викликаючи її денатурацію, в більшості випадків призводить до нейтралізації заряду і осадження білків з розчинів та біологічних рідин. Дію різних денатуруючих факторів використовують в аналітичній біохімії і клінічних дослідженнях.

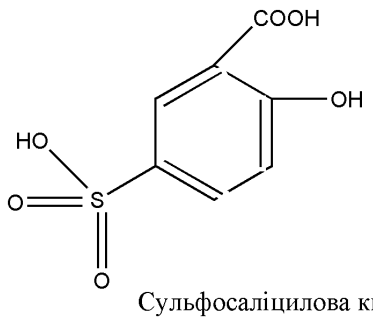
Осадження білку відбувається при кип'ятінні його розчину за значень pH середовища, які наближаються до його ізоелектричної точки. Кип'ятіння

білку в розчинах солей (наприклад, сульфату амонію, хлориду натрію) прискорює осадження в результаті того, що наявність іонів солі викликає швидку дегідратацію колоїдних білкових частинок. Кип'ятіння розчину білку в граничних значеннях pH (в кислому або лужному середовищі) не призводить до осадження білку, оскільки колоїдні частинки набули заряду і це є стабілізуючим фактором, що перешкоджає коагуляції.

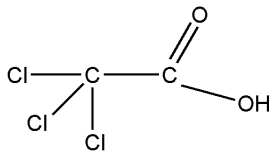
Органічні розчинники (спирт, діетиловий ефір, ацетон тощо) викликають дегідратацію та денатурацію білкових молекул. У випадках, коли дія органічного розчинника відбувається в м'яких умовах (низькі концентрації, без нагрівання, короткочасна дія), денатурація є оборотною. Денатурація та осадження білків плазми крові за методом Кона також є оборотним процесом. Осадженню білків органічними розчинниками сприяє присутність в розчині електролітів (наприклад NaCl).

Концентровані мінеральні кислоти (нітратна, сульфатна, соляна), викликають незворотну денатурацію білку і його осадження за рахунок утворених незаряджених комплексних сполук. При надлишку сульфурної і соляної кислот осаджений білок адсорбує аніони і утворюється стійка дисперсна система (адсорбційна пептизація). Нітратна кислота, осад білку не розчиняє.

Органічні кислоти незворотно осаджують білки з дисперсних систем. Різні кислоти відрізняються за силою дії. Найбільш ефективно і специфічно діють сульфосаліцилова і трихлороцтова кислота.



Сульфосаліцилова кислота



Трихлороцтова кислота

За дії трихлороцтової кислоти осаджуються тільки білки, а сульфосаліцилова крім білків осаджує також високомолекулярні продукти гідролізу білків – пептони і поліпептиди.

Солі важких металів (купруму, меркурію, цинку, срібла, свинцю) осаджують білки в результаті утворення комплексних сполук з SH- групами білків. Осад білку за надлишку солей деяких важких металів (ацетату свинцю, сульфату купруму) розчиняється. Це пов'язано з адсорбцією катіонів важких металів на поверхні колоїдних частинок, утворених молекулами білку. Однойменно заряджені частинки відштовхуються одна від одної і в результаті утворюється стійка дисперсна система, що опалесціює.

Осадження білків викликають реактиви, що діють також на алкалоїди. *Алкалоїди* – азотовмісні речовини основної природи, що мають виражену фізіологічну дію, представлені переважно гетероциклічними сполуками, похідними пурину, піридину, хіноліну, індолу тощо. До алкалоїдів належать морфін, папаверин, атропін, кофеїн, ефедрин та ряд інших сполук, важливих в фармакології та медицині. Реактиви на алкалоїди в загальних випадках викликають також денатурацію і осадження білків. До таких реактивів належать: танін, розчин йоду в KI, розчин йодистого вісмуту в KI, пікринова кислота тощо. Осадження білків загальними реактивами на алкалоїди обумовлено тим, що до складу амінокислот і алкалоїдів входять подібні гетероциклічні групи. Реактиви на алкалоїди утворюють нерозчинні сполуки з білками. Слабко лужне середовище, створене додаванням органічних кислот (наприклад, оцтової) сприяє перебігу реакції, а дія сильних мінеральних кислот гальмує процес. Утворений при коагуляції осад розчиняється в лужному середовищі.

ДОСЛІД 9.1. ТЕМПЕРАТУРНА ДЕНАТУРАЦІЯ ТА ОСАДЖЕННЯ БІЛКІВ

Хід роботи. У п'ять пробірок вносять по 2,5 мл розчину яєчного білку. Пробірку № 1 нагрівають на пальнику до кипіння. У пробірку № 2 додають 1

краплю розчину оцтової кислоти і нагрівають до кипіння. У пробірку № 3 додають 1,5 мл розчину оцтової кислоти і нагрівають до кипіння. У пробірку № 4 додають 2,5 мл насиченого розчину NaCI і нагрівають до кипіння. У пробірку № 5 додають 1,5 мл мл розчину NaOH і нагрівають до кипіння.

Завдання. Запишіть та поясніть результати спостережень.

ДОСЛІД 9.2. ОСАДЖЕННЯ БІЛКІВ СОЛЯМИ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

Хід роботи. У дві пробірки вносять по 1 мл водного розчину яєчного білку. У пробірку № 1 додають по краплям розчин $CuSO_4$, у пробірку № 2 – розчин ацетату свинцю, струшуючи до випадіння осаду (у пробірці № 1 утворюється осад блакитного кольору, у пробірці № 2 – білого). Через 5 хвилин в кожну пробірку знову додають по 1 мл розчину відповідної солі.

Завдання. Запишіть та поясніть результати спостережень.

ДОСЛІД 9.3. ОСАДЖЕННЯ БІЛКІВ МІНЕРАЛЬНИМИ КИСЛОТАМИ

Хід роботи. У п’ять пробірок вносять по 1 мл кислот: у пробірку № 1 – концентровану нітратну кислоту, у пробірку № 2 розчин хлоридної кислоти, у пробірку № 3 розчин сульфатної кислоти. До кожної пробірки по стінці обережно додають 1 мл розчину яєчного білку. На межі двох рідин утворюється біле кільце денатурованого білку. Обережно струшують вміст пробірок. Потім в кожну пробірку додають надлишок кожної кислоти, спостерігають за змінами дисперсних систем в пробірках.

Завдання. Запишіть та поясніть результати спостережень.

ДОСЛІД 9.4. ОСАДЖЕННЯ БІЛКІВ ОРГАНІЧНИМИ КИСЛОТАМИ

Хід роботи. У дві пробірки вносять по 2 мл водного розчину білку. Потім у пробірку № 1 додають 1 мл розчину трихлороцтової кислоти, а у пробірку № 3 додають 1 мл розчину сульфосаліцилової кислоти.

Завдання. Запишіть та поясніть результати спостережень.

ДОСЛІД 9.5. ОСАДЖЕННЯ БІЛКІВ ЕТИЛОВИМ СПИРТОМ

Хід роботи. У пробірку вносять 2 мл водного розчину білку, потім вносять на кінчику шпателя порошок NaCl, пробірку струшують до повного розчинення солі. Потім у пробірку обережно по краплинах додають 4 мл етилового спирту, сильно струшують. Через 5-8 хв. випадає осад. Після появи осаду, надосадову рідину обережно зливають (або відбирають). До вмісту пробірки з осадом, що залишився, додають 5 мл дистильованої води. Спостерігають за змінами, що відбуваються з вмістом пробірки протягом досліду.

Завдання. Запишіть та поясніть результати спостережень.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ

1. Що називають денатурацією білку?
2. Як впливає на розчин білку його кип’ятіння за різних значень pH?
3. За яких умов осаджений денатурований білок може розчинятися?
4. Як діють на альбуміни яєчного білку розчини неорганічних і органічних кислот?
5. Охарактеризуйте Метод Кона, який використовують для виділення білків крові.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 10

ГРУПИ КРОВІ ЗА СИСТЕМОЮ АВ0 ТА Rh МЕТОДИ ЇХ ВИЗНАЧЕННЯ

Визначення груп крові I (0), II (A), III (B), IV (AB) та резус фактору Rh^+, Rh^- за допомогою стандартних цоліклонів анти-А, анти-В, анти-D

Мета роботи: опанувати методику визначення груп крові за системою АВ0 та резус фактору за використання стандартних цоліклонів.

Реактиви: етиловий спирт ($\omega(C_2H_5OH)$ = 96%), стандартні цоліклони: Анти-А, анти-В, анти-D супер.

Обладнання: предметні скельця, скляні палички, стерильні скаліфікатори, стерильні піпетки Пастера, стерильні гумові рукавички, вата.

Теоретичні відомості

Групи крові за системою АВ0. У основі розділення людей на групи крові за системою АВ0 лежить наявність в еритроцитах аглютиногенів А і В, а в плазмі крові аглютинінів α і β. Аглютиногени (групові антигени системи АВ0) є глікозамінгліканами (до їх складу входять олігосахариди і амінокислоти), вони містяться в мембранах еритроцитів і утворюються в організмі людини в ембріональному періоді розвитку. Аглютиніни α і β (білки плазми крові, які функціонально є антитілами до антигенів) з'являються пізніше, їх титр в сироватці крові новонароджених в перші тижні життя низький. У крові людини не можуть бути присутніми одночасно групові антигени і антитіла до них (наприклад А і α або В і β), оскільки це може викликати аглютинацію (злипання) еритроцитів з білками плазми крові.

Залежно від наявності або відсутності в еритроцитах аглютиногенів А і В у людей і вищих приматів розрізняють чотири групи крові: групу I (0), II (A), III (B), IV (AB). Індивіди з групою I (0) не містять на мембранах еритроцитів антигенів А і В, а в їх сироватках містяться антитіла – аглютиніни α (анти-А) та β (анти-В). На мембранах еритроцитів групи II (A)

наявний антиген А, а в сироватці - аглютинін β (анти-В). Особини з групою III (В) мають на мембранах еритроцитів антиген В, а в сироватці крові аглютинін α (анти-А). У осіб з групою IV (АВ) на еритроцитах експресовані антигени А і В, натомість у сироватці крові відсутні аглютиніни α і β.

На основі системи аглютиногени-аглютиніни у тварин виділяють різну кількість груп крові: 4 групи крові у коней, 3 групи у овець, 3 групи у котів, 2 групи крові у собак.

Система резус Rh. Rh-антиген відкрили К. Ландштейнер та Вінер у 1940 р. Вчені виявили, що сироватка кролів, імунізованих еритроцитами мавпи макаки-резус, аглютинує еритроцити людини. Еритроцити мавп і людини містять спільний антиген, який назвали Rh-антигеном. Основним у системі резус є антиген Rh (D). Він є в еритроцитах 85% особин європейських народів, у решти 15% його немає. У представників монголоїдної раси цей антиген присутній у 95% особин. Кров, що містить антигени Rh (резус-фактор), називають резус-позитивною (Rh+). Кров, в якій резус-фактори відсутні, називають резус-негативною (Rh–). На сьогодні відомо, що система резус включає багато сполук в якості антигенів. Найбільш активним антигеном системи резус є антиген D, меншу активність мають антигени С, Е, d, c, e. У аборигенів Австралії в еритроцитах не виявлений жоден антиген системи резус.

Особливості гематрансфузії (переливання крові). При взаємодії однойменних аглютиногенів і аглютинінів (А з α; В з β) відбувається реакція гемаглютинації, тобто склеювання еритроцитів з білками плазми крові. Саме вивчення умов аглютинації еритроцитів призвело до відкриття груп крові і зробило можливим її переливання. При переливанні несумісної крові в результаті аглютинації і подальшого їх гемолізу розвивається гематрансфузійний шок, який найчастіше призводить до летальних наслідків.

Були розроблені правила переливання невеликих кількостей цільної крові (до 200 мл), відповідно до якого враховували наявність аглютиногенів в еритроцитах донора і аглютинінів в плазмі реципієнта. Плазму донора до

уваги не брали, оскільки вона сильно розбавлялася плазмою реципієнта. Згідно даного правила кров I групи можна переливати людям всіх груп крові (I, II, III, IV), оскільки в їх еритроцитах не містяться антигени А і В. Таким чином, людей з першою групою крові вважали універсальними донорами. Кров II групи можна переливати людям з II і IV групами крові, кров III групи – з III і IV. Кров IV групи можна переливати тільки людям з цією ж групою крові, а люди з IV групою крові є універсальними реципієнтами. При необхідності переливання великих кількостей крові цим правилом користуватися не можна.

Пізніше вченими було встановлено, що аглютиногени А і В існують в різних варіантах, що відрізняються за своєю активністю: A_1, A_2, A_3, A_4…, B_1, B_2… тощо. Активність знижується відповідно до порядку нумерації. Наявність в крові людей аглютиногенів з низькою активністю може привести до помилок при визначенні групи крові, і, відповідно, до переливання несумісної крові.

Також було виявлено, що у людей з I групою крові на мембрані еритроцитів є антиген Н. Цей антиген може також зустрічатись у людей з II, III і IV групами крові, проте у них він проявляється як прихована детермінанта. У людей з II і IV групами крові часто зустрічаються анти-Н-антитіла. Таким чином, при переливанні крові I групи реципієнтам з іншими групами крові можуть виникати ускладнення. У зв'язку з встановленими особливостями, на сьогодні переливають тільки кров від донора «своєї групи».

Система *резус Rh*, відрізняється за імунологією від системи АВ0, оскільки в нормі аглютиніни (антитіла) в плазмі не містяться. Однак, якщо кров резус-позитивного донора перелити резус-негативному реципієнту, то в організмі останнього утворяться специфічні антитіла (аглютиніни) до резус-фактора. При повторному переливанні резус-позитивної крові цій же людині у нього відбудеться аглютинація еритроцитів, тобто матиме місце «резус-конфлікт» за типом гематрасфузійного шоку. Таким чином, резус-

негативним реципієнтам можна переливати тільки резус-негативну кров. Резус-конфлікт також може виникнути під час вагітності, якщо кров матері резус-негативна, а кров плоду резус-позитивна. Резус-аглютиногени, проникаючи в організм матері (найбільша кількість потрапляє саме під час пологів), можуть викликати синтез в її крові антитіл. Така вагітність першого разу може протікати без особливих ускладнень. При наступній вагітності резус негативної матері (протягом найближчих 5-7 років) резус-позитивною дитиною, антитіла будуть проникати через плаценту, пошкоджувати еритроцити плоду, що може призвести до викидня або важкої гемолітичної анемії у новонароджених. З метою імунопрофілактики резус-негативній жінці відразу після пологів або аборту вводять сироватку, що містить анти-D-антитіла у високій концентрації, щоб блокувати синтез власних антитіл.

Окрім аглютиногенів системи АВ0 і резус-фактора останніми роками на мембрані еритроцитів виявлені і інші антигени, яких налічується більше 400. Найбільш важливими антигенними системами вважаються MNSs, P, Лютеран, Левіс (Lea), P, Келл, Даффі та ін. Лейкоцити також мають більше 90 антигенів. Лейкоцити містять антигени головного локуса НЛА - антигени гістосумісності, які мають важливий вплив на трансплантаційний імунітет.

Зважаючи на вищезазначене, стає зрозумілим, що будь-яке переливання крові від донора реципієнту – це складна імунологічна операція. Тому цільну кров переливають тільки за умов гострої загрози життю людини, якщо втрата крові перевищує 25 % від загального об'єму. Якщо крововтрата є меншою, необхідно вводити плазмозамінники, оскільки в даному випадку важливішим є відновлення саме об'єму циркулюючої крові. У інших випадках доцільно переливати компоненти крові, які необхідні організму. Наприклад, при анемії – еритроцитарну масу, при тромбоцитопенії – масу тромбоцитів при інфекціях або септичному шоці – гранулоцити.

Метод визначення груп крові за допомогою стандартних сироваток. Стандартні сироватки (плазма крові донора, відокремлена від клітин) готують на станції переливання крові і постачають в лабораторію в запаяних

ампулах з етикеткою, на якій позначена група і дата виготовлення. Під час процедури визначення групи крові краплю досліджуваної крові змішують із стандартними сироватками усіх чотирьох груп крові. Нанесіть на предметне скло по крупній краплі сироваток III і II групи, і з метою обов'язкового контролю – краплі сироваток I і IV групи. Протягом 5 хвилин, злегка похитуючи скло, спостерігають за краплями. Аглютинація виглядає у вигляді дрібних червоних крупинок, що поступово збільшуються в розмірі на фоні плазми, що яснішає. На підставі наявності або відсутності аглютинації роблять висновок про групу крові (рис 10.1.) Відсутність аглютинації в усіх чотирьох пробах служить доказом належності досліджуваної крові до I (0) групи крові. Якщо аглютинація відбулася з сироватками I (0) і III (B), то кров належить до II (A) групи. Якщо аглютинація відбулася з сироваткою II (A) і I (0) - те кров III (B) групи. У разі аглютинації в сироватках всіх трьох груп кров слід віднести до IV (AB) групи. З сироваткою IV групи аглютинації не відбувається ніколи, оскільки в ній відсутні аглютиніни.

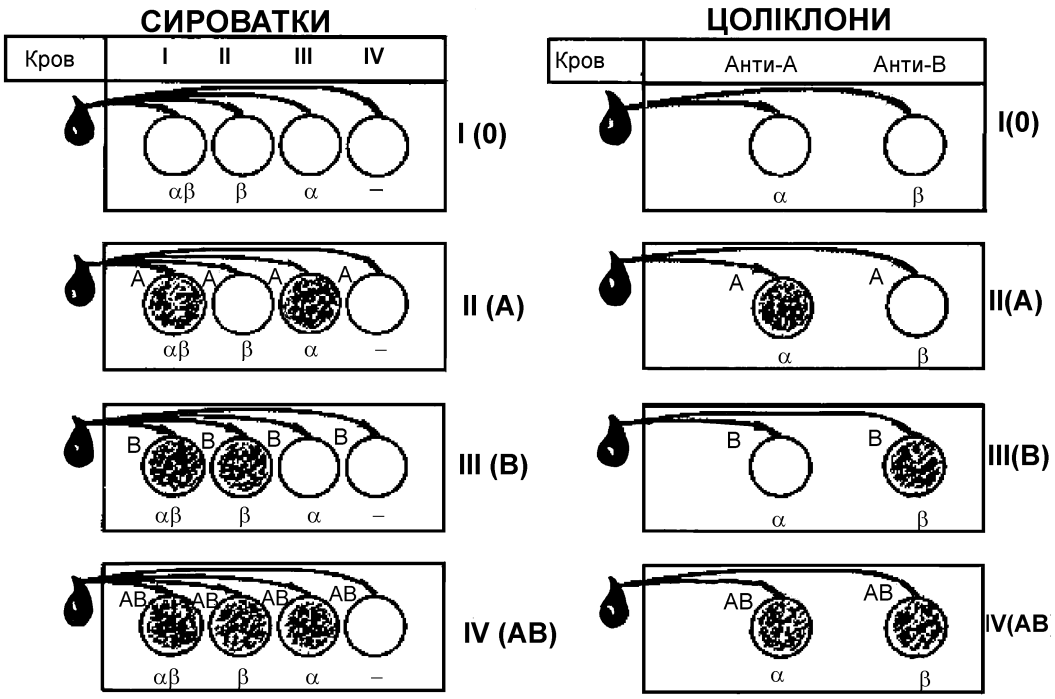


Рис. 10.1 − Методика визначення груп крові на основі стандартних сироваток, та синтетичних цоліклонів

Метод визначення групи крові за допомогою синтетичних цоліклонов. Цоліклони – це розчини, що містять аналоги аглютинінів α (анти-А) і β (анти-В). Для визначення резус-фактора використовують цоліклон анти-D. Синтетичні цоліклони є продуктом гібридомних клітинних ліній, одержаних в результаті злиття нормальних лімфоцитів мишей з клітинами мієломи мишей в поживному середовищі. Вперше гібридоми були одержані в 1975 р. Г. Келером і К. Мільштейном. Лімфоцити в результаті злиття не гинуть, натомість одержують здатність до безперервного поділу (властивість онко-клітин).

Індивідуальні гібридомні лінії продукують гомогенні антитіла тільки одного класу імуноглобулінів, повністю ідентичні за структурою і біологічною активністю. Антитіла, продуковані клітинами одного клону (*клон - група дочірніх клітин, одержаних шляхом поділу однієї соматичної клітини*) також є моноклональними. Таким чином, цоліклони анти-А і анти-В представляють собою розведену асцитну (не містить клітин крові) рідину мишей-носіїв відповідної гібридоми, в якій містяться специфічні імуноглобуліни, направлені проти групових антигенів еритроцитів людини А і В. Активність синтетичних цоліклонів є вищою, ніж у стандартних сироваток і вони не містять антитіл іншої специфічності, крім зазначеної, тому їх використання має переваги перед стандартними сироватками.

Процедура визначення групи крові полягає у змішуванні краплі нативної капілярної крові, взятої з пальця, з краплями стандартних цоліклонів і спостереженнями за аглютинацією на білій фарфоровій, пластиковій або скляній поверхні (рис. 10.1.). Найбільш чітка реакція аглютинації спостерігається за високої концентрації еритроцитів, ***тому для аналізу відбирають першу порцію крові з пальця без сильного надавлювання.*** Для аналізу також можна використати кров, стабілізовану за допомогою консервантів (глюгіцир, цитроглюкофосфат, гепарин тощо).

Хід роботи.

Процедуру визначення групи крові проводять в добре освітлюваному приміщенні за температури +15…+25°С. Реагенти (цоліклон анти-А і цоліклон анти-В) не повинні зберігатись відкритими, оскільки при висиханні активність антитіл знижується. Для кожного з реагентів використовують свою марковану піпетку. Цоліклон анти-А представляє собою прозору однорідну рідину рожевого забарвлення, має слабку опалесценцію. Цоліклон анти-В – рідина блакитного забарвлення, має слабку опалесценцію. Не дозволено використовувати цоліклони, якщо вони мають осад, помутніння або пластівці. Цоліклони дозволяють виявити присутність в еритроцитах крові групових антигенів A_1, A_2, B_1, B_2. Процедуру визначення групи крові проводять в наступній послідовності:

1. Взяття проби капілярної крові в стерильних умовах. Медпрацівник одягає стерильні гумові рукавички, протирає місце проколу пальця ватою, змоченою етиловим спиртом, і за допомогою стерильного скаліфікатора робить прокол пальця. Пробу крові (перші краплі включно)медичний працівник відбирає в стерильну піпетку Пастера.

2. На предметне скельце (під низ скельця кладуть білий папір для зручності візуального аналізу аглютинації) наносять по одній краплі цоліклонів: ліворуч – цоліклон анти-А (рожевий), праворуч – цоліклон анти-В (блакитний). *Краплі цоліклонів мають бути великими, співвідношення за об'ємом рідин цоліклон-кров має бути 10: 1.*

3. Поруч з краплями цоліклонів наносять по одній краплі відібраної капілярної крові. Кров капають обережно, при цьому потрібно слідкувати, щоб цоліклони не змішались між собою. Проводять змішування крапель крові і цоліклонів за допомогою індивідуальних для кожного зразку стерильних скляних паличок.

4. Проводять спостереження за реакцією аглютинації протягом 2-3 хвилин. Скельце при цьому можна злегка погойдувати . Позитивний результат аглютинації проявляється у вигляді дрібних червоних агрегатів, які

швидко зливаються і утворюють великі пластівці на фоні плазми, що яснішає.

5. Аналізують результати аглютинації. Якщо аглютинація відбулась лише з цоліклоном анти-А (рожевий) група крові пацієнта II (А); якщо з цоліклоном анти-В (синій) група крові пацієнта III (В), якщо аглютинація відбулась з обома цоліклонами - група крові IV (АВ), якщо не відбулась із жодним - група крові I (0). Результати спостереження заносять до таблиці 1.

6. Аналогічною є процедура роботи з цоліклоном анти-D супер. Відмінність лише в тому, що на скельці буде одна крапля крові и одна крапля цоліклону анти-D. Якщо аглютинація відбулась, то кров пацієнта резус позитивна (Rh^+), якщо не відбулась, то – резус негативна (Rh^-),

Завдання. Провести визначення групи крові та резус фактору за використання стандартних цоліклонів, результати занести до таблиць 1 і 2.

Таблиця 10.1 − Визначення групи крові за допомогою стандартних цоліклонів анти-А, анти-В

ПІБ _____	
Результат аглютинації з цоліклоном анти-А	Результат аглютинації з цоліклоном анти-В
Висновок щодо групи крові	

Таблиця 10.2 − Визначення резус фактору за допомогою стандартного цоліклону анти-D супер

ПІБ _____	
Результат аглютинації з цоліклоном анти-D	
Висновок щодо резус-фактору	

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ

1. Імунологічні основи виділення груп крові за системою АВ0.
2. За яких умов відбувається гемаглютинація?
3. В чому полягає відмінність утворення комплексу антиген-антитіло для групових антигенів (А і В) і резус фактору (антигену D)?
4. Чому вагітна резус-негативна жінка потрапляє в групу ризику резус-конфлікту?
5. Охарактеризуйте методику визначення груп крові за використання сироваток крові донорів різних груп.
6. Охарактеризуйте методику визначення груп крові за використання стандартних цоліклонів.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 11

ВПЛИВ УМОВ СЕРЕДОВИЩА НА ФЕРМЕНТАТИВНІ РЕАКЦІЇ. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ДІЇ ФЕРМЕНТІВ

Дослідження впливів pH середовища та температури на активність амілази та перебіг реакції гідролізу крохмалю. Дослідження перебігу реакції ферментативного розкладу пероксиду водню та визначення концентрації каталази за методом Баха і Опаріна.

Мета роботи: дослідити вплив температури та pH на активність амілази слини людини, розрахувати активність ферменту каталази, виділеного з рослинного матеріалу.

Реактиви: рослинний матеріал (картопля, морква, капуста, топінамбур, цибуля); водні розчини: крохмалю (ω(х) = 1%), сульфатної кислоти ($\omega(H_2SO_4)$ = 10%); перекису водню ($C(\frac{1}{2}H_2O_2)$ = 0,1 моль/л); перманганату калію ($C(\frac{1}{5}KMnO_4)$=0,1 моль/л); порошок $CaCO_3$; прокалений пісок; розчин Люголя* стандартні буферні розчини: pH = 3,5; pH = 6,86; pH = 9,18.

***Розчин Люголя**

1 г I_2 та 2 г KI розчиняють в 20 мл дистильованої води, а потім доводять водою до 300 мл

Обладнання: пробірки, колби конічні; стакани хімічні; порцелянові ступки з товкачиком; піпетки; бюретки; кристалізатор з льодяною водою, газовий пальник або спиртівка, водяна баня, термостат.

Теоретичні відомості

Ферменти (ензими) – біологічні каталізатори білкової природи, які синтезуються в клітинах живих організмів та забезпечують необхідні швидкість і координацію біохімічних реакцій. Назва походить від латинського *«fermentum»* – закваска та від грецького *«en»* – всередині *«zyme»* – дріжджі. Луї Пастер одним з перших почав вивчати ферментативні процеси спиртового бродіння цукристих речовин, яке здійснювали дріжджі. Розділ

біохімії, що вивчає структуру, властивості та механізми дії ферментів, називають *ензимологією.* Прийняті в ензимології позначення:

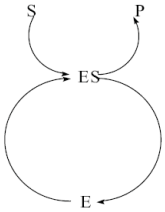
Е – фермент, ензим (*«enzyme»,* англ.) – біологічний каталізатор;

S – субстрат (*«substrate»*, англ.) – хімічна речовина, сполука, перетворення якої каталізує фермент;

Р – продукт (*«product»*, англ.) – сполука, що утворилася в результаті ферментативної реакції.

Ферменти відрізняються від каталізаторів неорганічної природи високою специфічністю до субстрату (абсолютною, груповою або стереохімічною). і вузькими межами оптимальної дії по відношенню до температури та pH середовища. Ферментам притаманні всі фізико-хімічні властивості білків. Прості ферменти складаються лише з білкової частини, а складні – з білкової частини *апоферменту* і небілкової частини: *кофактору* (представлений іоном металу) або *коферменту* (представлений низькомолекулярною органічною сполукою небілкової природи). Апофермент поєднується з небілковою частиною за рахунок водневих, іонних та міцних ковалентних зв'язків. У випадку, коли небілкова частина ферменту з’єднана з апоферментом ковалентними зв'язками, її називають *простетичною* ***групою*** (наприклад, ФАД, біотин, ліпоєва кислота). В інших випадках кофермент взаємодіє з ферментом тільки на час хімічної реакції (наприклад, $НАД^+$, $НАДФ^+$), при чому один і той же кофермент може зв’язуватись з різними апоферментами. Однак саме апофермент визначає специфічність дії того чи іншого ферменту.

Реакційна здатність ферменту зумовлена наявністю в його структурі активного центру, що містить амінокислотні радикали, одні з яких зв'язують субстрат, а інші – здійснюють хімічне перетворення субстрату. На рис. 3. представлена схема ферментативного процесу: S взаємодіє з Е, утворюється фермент-субстратний комплекс ES, субстрат перетворюється в Р, а Е вивільняється в незмінному стані і здатний вступати в новий цикл.



$$E + S \underset{K_{-1}}{\overset{K_{+1}}{\longleftrightarrow}} ES \xrightarrow{K_{+2}} E + P$$

Рис. 11.1 − Схема ферментативного процесу

Деякі ферменти мають *алостеричні* центри – ділянки для сполучення з низькомолекулярними сполуками *ефекторами* (модифікаторами). В результаті приєднання ефектору до алостеричного центру, змінюється конформація ферменту включно з активним центром, що призводить до підвищення або зниження каталітичної активності.

Ферменти поділяють на шість класів відповідно до типу реакцій, які вони каталізують:

оксидоредуктази – каталізують окисно-відновні реакції, до них належать дегідрогенази (каталізують реакції дегідрування), оксидази (приєднують кисень до субстратів), цитохроми (переносять електрони);

трансферази – каталізують міжмолекулярне перенесення функціональних груп (амінних, метильних, фосфатних, ацильних тощо). До трансфераз належать також кінази;

гідролази – каталізують реакції гідролізу і здатні розщеплювати складноефірні, пептидні, глікозидні та інші зв’язки;

ліази – каталізують реакції розщеплення ковалентних зв’язків між атомами C, O, N, S негідролітичним шляхом. До даної групи належать декарбоксилази.

ізомерази – каталізують реакції ізомеризації субстратів. До даної групи належать рацемази, епімерази;

лігази (синтетази) – каталізують реакції синтезу біомолекул з утворенням нового ковалентного зв'язку за рахунок енергії АТФ.

Швидкість ферментативних реакцій визначається співвідношенням концентрацій ферменту та субстрату і описується рівнянням Міхаеліса-

Ментен. За певної концентрації субстрату відбувається повне насичення ферменту субстратом, після чого зростання концентрації субстрату не приводить до зростання швидкості реакції. Концентрація насичення ферменту відповідає максимально можливій швидкості ферментативної реакції.

Активність ферментів і, відповідно, швидкість ферментативних реакцій, істотно залежить від температури, pH та спорідненості ферменту і субстрату. Залежність швидкості ферментативних реакцій від температури є нелінійною і описується кривою з одним максимумом (оптимальною температурою). Підвищення температури вище 40 ^{o}C викликає інактивацію ферменту в результаті денатурації білкової частини. Зниження температури зменшує активність ферменту, однак не викликає денатурації.

При проведенні біохімічних досліджень виникає необхідність кількісного визначення вмісту певних ферментів у біологічному матеріалі. Визначення концентрації у мг/г, мг/мл, моль/л для ферментів не є коректним, тому що для ряду ферментів точно не встановлена молекулярна маса або вона може суттєво відрізнятись у одного і того ж ферменту, виділеного з різних біологічних об'єктів.

Найчастіше концентрацію ферменту позначають числом одиниць активності на 1 г маси біологічного матеріалу. *Міжнародна одиниця активності* ***(МО)*** *відповідає такій кількості ферменту, яка каталізує перетворення 1 мкмоль субстрату за 1 хвилину.* Інша одиниця виміру ферментативної активності *катал (кат.) відповідає кількості ферменту, яка здатна перетворити 1 моль субстрату в продукт за 1 с.* Згадані одиниці пов'язані між собою наступним співвідношенням: 1 кат. = $6 \cdot 10^7$ МО або 1 МО = 16,67 нкат.

ДОСЛІД 11.1. ВПЛИВ РН СЕРЕДОВИЩА НА ПЕРЕБІГ ФЕРМЕНТАТИВНИХ РЕАКЦІЙ

Амілаза (α-амілаза, глікозил-гідролаза) – фермент травного тракту людини і тварин, належить до класу гідролаз і каталізує гідроліз крохмалю до олігосахаридів. В організмі людини амілаза утворюється переважно підшлунковою залозою, в невеликій кількості слинними залозами. Вміст загальної амілази крові людини в нормі становить 20-100 одиниць на 1 л плазми, панкреатичної амілази в нормі має не перевищувати показник 50 од/л. Перевищення показника свідчить про захворювання на панкреатит.

Хід роботи.

1. Приготувати препарат амілази слини. Для цього слід ополоснути ротову порожнину дистильованою водою для видалення залишків їжі; відміряти мірним циліндром 50 мл дистильованої води та набрати її в рот, а потім ополіскувати його протягом 3-5 хвилин, думаючи при цьому про смачну їжу; випустити у стакан з ротової порожнини рідину, яка містить амілазу; зібрану рідину відфільтрувати у чистий хімічний стакан.

2. У три пробірки за допомогою піпетки вносять по 1 мл розчину крохмалю. Після цього у пробірки додають по 5 мл буферних розчинів: у першу пробірку з pH 3,5; у другу – з pH 6,86; у третю – з pH 9,18.

Потім у кожну пробірку додають по 2 мл препарату амілази слини. Вміст пробірок добре перемішують і ставлять у термостат на 20-25 хвилин за температури 36-38 °С. Після завершення інкубації пробірок їх виймають з термостату та додають у кожну пробірку по декілька краплин розчину Люголя. Спостерігають за змінами забарвлення вмісту пробірок

Завдання. Запишіть результати спостережень та зробіть висновки щодо повноти гідролізу крохмалю за різних значень pH та щодо оптимальних умов дії ферменту.

ДОСЛІД 11.2. ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРИ НА ШВИДКІСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНИХ РЕАКЦІЙ

Хід роботи.

1. У чотири пробірки за допомогою піпетки вносять по 2 мл розчину крохмалю. Потім у перші три пробірки додають по 2 мл препарату амілази слини, а у четверту додають 2 мл препарату амілази, який спочатку нагрівають до кипіння на пальнику. Вміст пробірок добре перемішують.

2. Першу пробірку занурюють у кристалізатор з льодяною водою, другу ставлять на водяну баню (60-70 °С), а третю і четверту пробірки - у термостат за 36-38 °С. Усі пробірки інкубують протягом 20-25 хвилин. Після завершення інкубації до вмісту кожної пробірки додають по декілька крапель розчину Люголя. Спостерігають за зміною забарвлення вмісту пробірок.

Завдання. Запишіть результати спостережень та зробіть висновки щодо гідролізу крохмалю за різних температурних умов і виявіть температурний оптимум дії ферменту.

ДОСЛІД 11.3. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ КАТАЛАЗИ

Каталаза – надзвичайно поширений фермент класу оксидоредуктаз, він каталізує реакцію розкладу пероксиду водню до води та молекулярного кисню. Фермент міститься в клітинах рослин і тварин, він відсутній лише у анаеробних бактерій. Біологічна функція каталази – позбавлення організму надлишку пероксиду водню, який завжди утворюється в окисно-відновних процесах, однак є токсичним. Каталаза містить залізопорфіриновий комплекс в якості простетичної групи (коферменту).

Перетворення субстрату пероксиду водню каталазою відбувається за наступною схемою:

$$2R\text{-}FeOH + 2H_2O_2 \rightarrow 2R\text{-}FeOOH + 2H_2O \rightarrow 2R\text{-}FeOH + O_2 + 2H_2O$$

Метод визначення концентрації каталази за її активністю (за О. М. Бахом і О. І. Опаріним) базується на здатності пероксиду водню, що не розклався під дією каталази, кількісно взаємодіяти з розчином $KMnO_4$ у кислому середовищі:

$$2KMnO_4 + 5H_2O_2 + 3H_2SO_4 = 2MnSO_4 + K_2SO_4 + 8H_2O + 5O_2$$

З наведеного рівняння визначаємо коефіцієнт титру перманганату калію: 1 мл 0,1 н розчину перманганату калію *(розчин з молярною концентрацією еквівалентів розчиненої речовини (*$C=(\frac{1}{z}KMnO_4)$*, де z=5)* відповідає 1,7 мг (50 мк моль) пероксиду водню.

Хід роботи.

1. *Приготування водної витяжки каталази.*

Зробити наважку (2 г) рослинного матеріалу: картоплі, моркви, капусти, топінамбуру, цибулі). Точну масу наважки занести до табл. 11.2. Наважку розтерти у порцеляновій ступці з невеликою кількістю піску та 50 мл дистильованої води (воду додають порціями по 5-10 мл). Каталаза інактивується у кислому середовищі, тому для нейтралізації кислот, які можуть міститися в рослинному матеріалі, перед початком гомогенізації у ступку на кінчику шпателя додають $CaCO_3$. Гомогенат відстоюють 10 хвилин і відфільтровують у мірну колбу на 100 мл, ступку і товкачик промивають 20 мл води, зливаючи промивні води у колбу. Вміст колби доводять дистильованою водою до 100 мл.

2. *Проведення ферментативної реакції розкладу* H_2O_2.

У чотири конічні колби на 100 мл (колби *№1 і №2 – контроль, №3 і № 4 – дослід*) вносять по 10 мл 0,1 н розчину пероксиду водню. У колби 1 і 2 відразу додають по 5 мл розчину H_2SO_4. Потім у всі чотири колби вносять по 20 мл витяжки каталази.

Колби інкубують 30 хв за кімнатної температури (20-25°С), перемішуючи час від часу їх вміст. Після завершення інкубації у дослідні колби (№ 3 і № 4) додають по 5 мл розчину H_2SO_4 для повного припинення ферментативної реакції.

3. *Титрування перекису водню, що не розклався під дією каталази*

Вміст усіх колб титрують 0,1 н розчином перманганату калію до утворення стійкого блідо-рожевого забарвлення. Результати титрування заносять до таблиці 11.1:

Таблиця 11.1 − Результати титрування

	Кількість 0,1 н розчину $KMnO_4$, витраченого на титрування (мл)	
	Контроль	Дослід
1		
2		
середнє		

4. *Розрахунок активності каталази* (***C,*** МО/г), що міститься у екстракті, проводять за формулою: $C = \frac{(A - B) \cdot 50 \cdot V}{V_{АЛ} \cdot \tau \cdot m}$, де

A - об'єм 0,1 н розчину перманганату, витраченого на титрування контрольної проби, мл;

B - об'єм 0,1 н розчину перманганату, витраченого на титрування дослідної проби, мл;

50 - титр перманганату калію (1 мл 0,1 н розчину перманганату калію відповідає 50 мкмоль пероксиду водню);

V - об'єм водної витяжки ферменту (100 мл)

$V_{АЛ}$ - об'єм аліквоти каталази (20 мл)

m - маса наважки, г

τ - час, хв (30 хв)

Завдання: Одержати водну витяжку каталази, провести ферментативну реакцію розкладу пероксиду водню. Результати досліду занести до таблиці 11.2.

Таблиця 11.2 − Ферментативна активність каталази

Назва рослинного матеріалу	***m*** маса наважки, г	***C*** активність ферменту, МО/г	***C´*** активність ферменту, кат/г

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ

1. Що називають активним центром і алостеричним центром ферменту? Чи кожен фермент має алостеричний центр?
2. На які класи поділяють ферменти відповідно до типів біохімічних реакцій? До яких класів ферментів належать досліджені в роботі ферменти α-амілаза і каталаза?
3. Які оптимальні температура та pH середовища для дії амілази слини?
4. Вплив низьких та високих температур на перебіг ферментативних реакцій.
5. В яких одиницях вимірюють концентрації ферментів? Чому ці одиниці відрізняються від стандартних і якими є коефіцієнти переходу між ними?
6. Чому при проведенні ферментативного розкладу пероксиду водню 10%-й розчин сірчаної кислоти в контрольні колби додавали на початку інкубації, а в дослідні колби в кінці інкубації?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 12

ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА ВОДОРОЗЧИННІ І ЖИРОРОЗЧИННІ ВІТАМІНИ

Ідентифікація у водних розчинах вітамінів B_1 (тіаміну), B_3 (РР нікотинової кислоти), B_6 (піридоксину), С (аскорбінової кислоти). Ідентифікація в спиртовому розчині вітаміну Е (токоферолу)

Мета роботи: навчитись визначати за допомогою якісних реакцій присутність водорозчинних (тіаміну, нікотинової кислоти, піридоксину, аскорбінової кислоти) і жиророзчинних (токоферолів) вітамінів.

Реактиви: водні розчини вітамінів: B_1 (тіаміну) (ω(х) = 5%); B_6 (піридоксину) (ω(х) = 1%); С (аскорбінової кислоти) (ω(х) = 0,1%); вітамін РР (нікотинова кислота) в порошку; спиртовий розчин токоферолу (ω(х) = 0,1%); водні розчини: гідроксиду калію (ω(КОН) = 1%); нітриту натрію ($\omega(NaNO_2)$ = 5%); карбонату натрію ($\omega(Na_2CO_3)$ = 10%); оцтової кислоти ($\omega(CH_3COOH)$ = 10%); ацетату купруму ($\omega((CH_3COO)_2Cu)$ = 5%); червоної кров'яної солі ($\omega(K_3[Fe(CN)_6])$ = 1%); хлориду феруму III ($\omega(FeCl_3)$ = 1%); сульфанілової кислоти ($\omega(C_7H_7NO_3S)$ = 1%); концентрована HNO_3.

Обладнання: пробірки, колби, піпетки, стакани хімічні; спиртівки або газові пальники, ліхтарик з ультрафіолетовим променем.

Теоретичні відомості

Вітаміни – низькомолекулярні біоорганічні сполуки, необхідні для здійснення метаболічних процесів, які не синтезуються в організмі людини, а надходять з компонентами харчування. Добові потреби у вітамінах для людини складають міліграмові або мікрограмові кількості. Першим вітаміном, щодо якого було доведено його значення як необхідного фактора харчування, був *тіамін* (вітамін B_1), отриманий у 1911 р. польським дослідником К. Функом з рисових висівок. Сполука попереджала розвиток *бері-бері* (поліневриту, спричиненого тривалим споживанням полірованого

рису) і містила в своїй структурі аміногрупу, що стало основою запропонованої назви для всіх додаткових факторів харчування: вітаміни (*vitaminum* – амін життя, *лат)*. Відкриття перших вітамінів відбулось задовго до того, як з'ясували їх хімічну структуру, тому історично склалися назви вітамінів, що містять велику літеру латинського алфавіту з цифровим індексом; у сучасних назвах вітамінів вказують також їх хімічну природу та, в деяких випадках, основний біологічний ефект із префіксом «анти-».

Залежно від фізико-хімічних властивостей (розчинності у воді або в ліпідах) вітаміни поділяють на дві великі групи: *водорозчинні* та *жиророзчинні*.

Водорозчинні вітаміни

Вітамін B_1 (тіамін, антиневритний вітамін).

Вітамін B_2 (рибофлавін).

Вітамін B_3 (вітамін *РР,* нікотинова кислота або нікотинамід; антипелагричний вітамін).

Вітамін B_5 (пантотенова кислота, антидерматитний вітамін).

Вітамін B_6 (піридоксин, антидерматитний вітамін).

Вітамін B_9 (фолієва кислота, птероїлглутамат, антианемічний вітамін).

Вітамін B_{12} (кобаломін, антианемічний вітамін).

Вітамін Н (біотин, антисеборейний вітамін).

Вітамін С (аскорбінова кислота).

Вітамін Р (біофлавоноїди).

Водорозчинні вітаміни за умови їх надлишкового потрапляння в організм за рахунок гарного розчинення у воді швидко виводяться з організму.

Жиророзчинні вітаміни

Вітамін А (ретинол, аксерофтол, вітамін росту).

Вітамін К (філохінон, антигеморагічний вітамін).

Вітамін Е (токоферол, вітамін розмноження).

Вітамін F (комплекс поліненасичених жирних кислот).

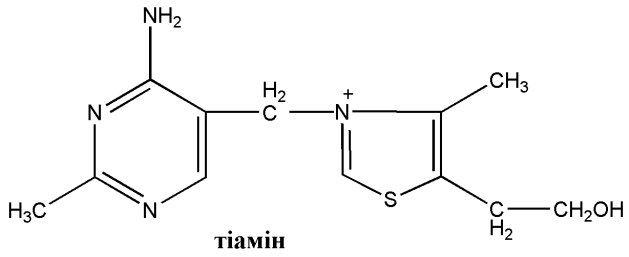
Вітамін D (холикальциферол, антирахітний вітамін).

Жиророзчинні вітаміни добре розчинні в жирах і легко накопичуються в організмі. За їх надлишкового потрапляння в організм може розвинутись *гіпервітаміноз*, що супроводжується серйозними порушеннями обміну речовин і навіть є можливими летальні наслідки.

Вітамінна недостатність − стан організму, що розвивається внаслідок зменшення (або відсутності) певного вітаміну. Супроводжується важкими розладами біохімічних і фізіологічних процесів і виникненням специфічної патології. Розрізняють *гіповітамінози* та *авітамінози* – патологічні стани, для яких властивими є, відповідно, відносна або повна недостатність вітаміну в організмі.

ДОСЛІД 12.1. ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТІАМІНУ ЗА ДОПОМОГОЮ ДІАЗОРЕАКТИВА

Перший вітамін, виділений в кристалічному вигляді. За хімічною будовою є продуктом конденсації піримідину і тіазолу, поєднаних метиновим містком.



тіамін

В організмі людини утворюється кофермент тіаміндифосфат (ТДФ**)** в результаті фосфорилювання вільного тіаміну в печінці, нирках, серцевому м'язі. Проявом недостатності вітаміну B_1 є накопичення в крові та внутрішніх тканинах надлишкового неокисненого пірувату. Клінічно це проявляється розвитком уражень периферичної нервової системи (поліневриту, що може супроводжуватись атрофічним паралічем кінцівок - «*бері-бері»*), виражених порушень міокарду, секреторної та моторної функцій шлунка. Тіамін п*оширений в продуктах рослинного походження (оболонка зерен злаків, горох, квасоля, соя). Міститься у висівках, пивних дріжджах, крупах (гречана, вівсяна). Добова потреба дорослої людини у вітаміні* 1,5-3,0 мг.

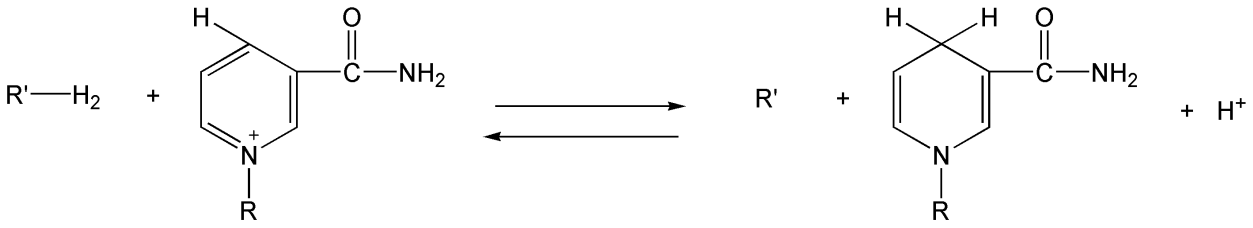
Суть якісного виявлення тіаміну в діазореакції полягає в здатності вітаміну у лужному середовищі утворювати з сумішшю розчину сульфанілової кислоти ($C_7H_7NO_3S$) і нітритом натрія (*діазореактивом*) складну комплексну сполуку помаранчевого або червоного кольору.

Хід роботи. У три пробірки вносять по 1 мл розчину сульфанілової кислоти і додають 1 мл розчину $NaNO_2$. Вміст пробірок перемішують, в результаті чого утворюється діазореактив. За допомогою мікропіпетки у пробірки додають розчин тіаміну не перемішуючи (у пробірку № 2 - одну краплю; у пробірку № 3 − три краплі, пробірка № 1 − контроль). Потім в кожну пробірку обережно по стінці додають 1 мл розчину Na_2CO_3. В присутності вітаміну спостерігаємо утворення кольорового кільця на межі рідин.

Завдання. Запишіть та поясніть результати спостережень.

ДОСЛІД 12.2. ВИЯВЛЕННЯ НІКОТИНОВОЇ КИСЛОТИ

Нікотинова кислота (РР, вітамін B_3), може синтезуватись в організмі людини з амінокислоти триптофану. Біологічна роль нікотинової кислоти полягає в тому, її похідне нікотинамід входить до складу коферментів НАД (нікотинамідаденіндинуклеотиду) і НАДФ (нікотинамідаденіндинуклеотид-фосфату), які містяться у багатьох універсальних ферментах оксидоредуктазах. $НАД^+$ і $НАДФ^+$ ферментативно відновлюються гідрогеном з утворенням відповідно НАДН, НАДФН і протонів H^+. Один атом приєднується до молекули коферменту в положенні 4 піримідинового кільця, другий атом віддає електрон з утворенням протону за схемою:

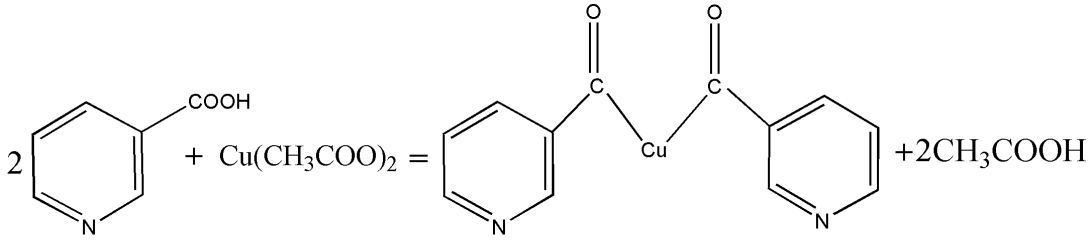


НАД$^+$ (НАДФ$^+$)
окиснена форма

НАДН (НАДФН)
відновлена форма + H$^+$

Окиснені форми НАД$^+$ і НАДФ$^+$ характеризуються флуоресценцією при опроміненні світлом λ= 440 нм.

При нагріванні нікотинової кислоти з ацетатом міді утворюється погано розчинний осад нікотинату міді:

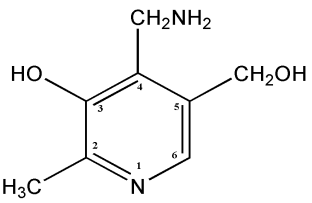


<u>Хід роботи</u>. У пробірку № 1 вносять 50 мг порошку нікотинової кислоти та додають 2 мл розчину оцтової кислоти. У пробірку № 2 (контроль) вносять лише 2 мл розчину оцтової кислоти. Пробірки обережно нагрівають на полум'ї пальника до кипіння. До нагрітих розчинів в обох пробірках додають 2 мл розчину ацетату міді і фіксують зміну забарвлення розчину. Пробірку охолоджують у штативі та слідкують за змінами у розчині. В темному місці при опроміненні пробірок ультрафіолетовим променем в пробірці № 1 спостерігають синю флуоресценцію.

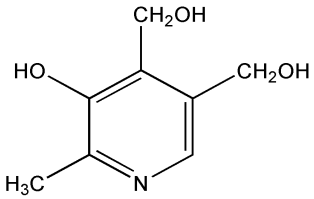
<u>Завдання.</u> Запишіть та поясніть результати спостережень.

<u>ДОСЛІД 12.3. ВИЯВЛЕННЯ ПІРИДОКСИНУ (ВІТАМІНУ B_6)</u>

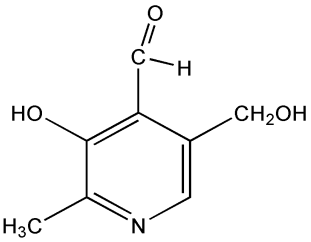
Терміном піридоксин об'єднують три близькі за дією та взаємно перетворювані в біологічних тканинах сполуки: піридоксол, піридоксаль та піридоксамін.



піридоксамін



піридоксол



піридоксаль

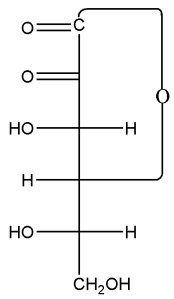
Біологічна дія вітаміну B_6 пов'язана з його участю в реакціях амінокислотного обміну. Його коферментними формами є піридоксальфосфат (ПАЛФ) та піридоксамінфосфат (ПАМФ), що беруть участь в реакціях трансамінування та деркарбоксилювання. В кислому та лужному середовищах або за умов нагрівання без доступу світла та окиснювачів вітамін B_6 не втрачає своїх біологічних властивостей, однак швидко руйнується за доступу світла.

Хід роботи. У пробірку вносять 1 мл 1 % водного розчину піридоксину та додають 2 краплі розчину $FeCl_3$. Вміст пробірки перемішують. При взаємодії піридоксину з розчином хлориду заліза (III) утворюється комплексна сіль феноляту заліза коричнево-червоного кольору. Слідкують за змінами забарвлення суміші.

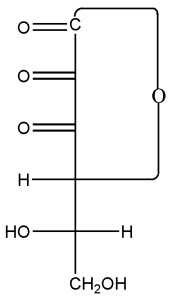
Завдання. Запишіть до протоколу результати спостережень.

ДОСЛІД 12.4. ВИЯВЛЕННЯ АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТИ (ВІТАМІНУ С)

Аскорбінова кислота (вітамін С) існує в двох формах: відновленій (АК) та окисненій (дегідроаскорбінова кислота − ДАК). Обидві форми досить легко трансформуються одна в одну, утворюючи в клітині окисно-відновну пару з редокс-потенціалом Е= +0,139 В. Завдяки розглянутій властивості молекула аскорбінової кислоти здатна брати активну участь в окисно-відновних процесах. АК може окиснюватись киснем повітря, пероксидом або іншими



L-аскорбінова кислота

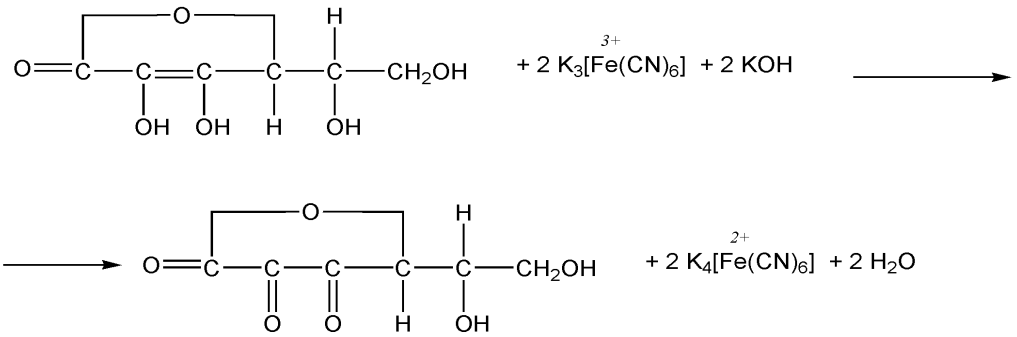


L-дегідроаскорбінова кислота

окисниками; ДАК відновлюватися цистеїном, глутатіоном, сірководнем. Виступаючи в якості коферменту аскорбінова кислота бере участь у реакціях гідроксилювання.

Якісний аналіз аскорбінової кислоти ґрунтується на окисно-відновних реакціях з 2,6-дихлорфеноліндофенолом, гексоціанофератом калію, нітратом срібла, метиленовим синім. При цьому окиснена форма 2,6-дихлорфеноліндофенолу (синій колір) і метиленовий синій відновлюються до безбарвної сполуки, а $K_3[Fe(CN)_6]$ відновлюється до $K_4[Fe(CN)_6]$, який з іонами Fe^{3+} дає забарвлену сполуку берлінську блакить $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$.

Окиснення аскорбінової кислоти червоною кров'яною сіллю ($K_3[Fe(CN)_6]$) відбувається за рівнянням:

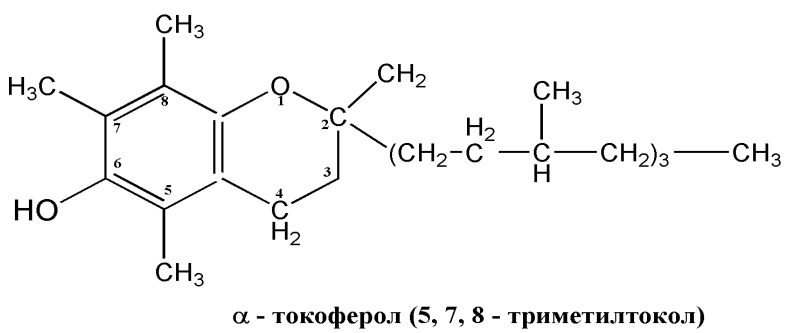


Хід роботи. У дві пробірки вносять по 1 мл розчину червоної кров'яної солі $K_3[Fe(CN)_6]$ та по 1 мл КОН. В пробірку № 1 додають та 1 мл розчину аскорбінової кислоти, у пробірку № 2 – 1 мл води. В обидві пробірки додають по краплинам 10-12 крапель розчину $FeCl_3$., постійно струшуючи вміст пробірки

Завдання. Занесіть до протоколу результати спостереження і напишіть рівняння реакцій.

ДОСЛІД 12.5. ВИЯВЛЕННЯ ВІТАМІНІВ ГРУПИ Е

Властивості вітаміну Е має група похідних *токолу* (2-метил-2(4',8',12'-



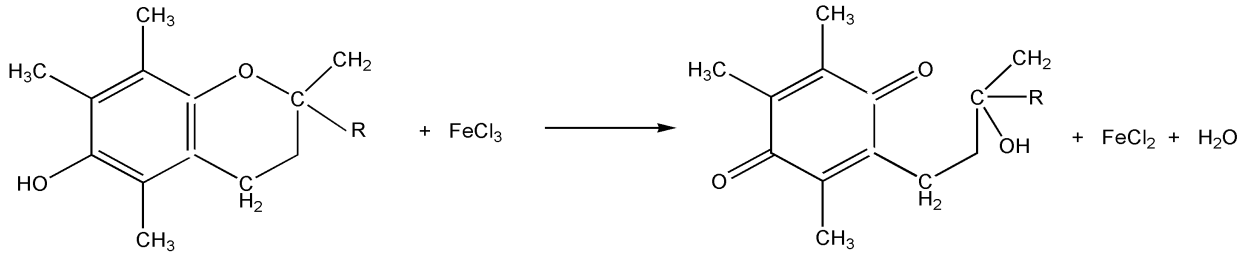
α - токоферол (5, 7, 8 - триметилтокол)

триметилтридецил)-6-хроманолу) α-β- γ-*токофероли,* що були виділені з олійних культур рослин. Найбільшу біологічну активність має α-токоферол (5,7,8-триметилтокол).

Токофероли − маслянисті рідини, які добре розчиняються в органічних розчинниках. Вітаміни групи Е за своєю біологічною дією є антиоксидантами, тобто перешкоджають розвитку ланцюгових реакцій пероксидного окиснення ненасичених жирних кислот, підвищують біологічну активність вітаміну А.

Якісними реакціями на виявлення α-токоферолу є реакція з концентрованою нітратною кислотою та реакція з хлоридом феруму (III).

Токофероли окиснюються, а сполука $FeCl_3$ відновлюється до $FeCl_2$.. В результаті реакції відбувається розрив піранового кільця токоферолу з утворенням γ-оксиалкілхінону.



α – токоферол **γ – оксиалкілхінон**

R -залишок фітолу

Хід роботи. В пробірку вносять 0,5 мл спиртового розчину токоферолу, додають по краплям 0,5 мл розчин $FeCl_3$, інтенсивно перемішують та обережно нагрівають на пальнику. Спостерігають за зміною забарвлення розчину.

Завдання. Занесіть до протоколу результати спостереження, напишіть рівняння реакції

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ

1. В чому полягає принцип надання назв та класифікації вітамінів?
2. Чому гіпервітаміноз характерний лише для жиророзчинних вітамінів?
3. Що таке діазореактив і який вітамін можна ідентифікувати за його допомогою?

4. Чи можна спостерігати флуоресценцію у водних розчинах сполук, до складу яких входять коферменти НАДН і НАДФН?
5. Який водорозчинний вітамін міститься в організмі у вигляді сполук, що становлять редокс-пару?
6. Який з досліджених в роботі вітамінів підвищує біологічну активність ретинолу (вітаміну А) і чому?

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Голуб Н. Б. Практикум з біологічної хімії / Н. Б. Голуб, О. А. Ігнатюк, Є. В. Кузьмінський . − К. : Видавничий дім «Компьютерпресс», 2008. − 80 с. ISBN 978-966-8846-13-7

2. Биохимия. Практикум / Н. Е. Кучеренко, Ю.Д. Бабенюк, А. Н. Васильев и др. −К. : Вища школа, Изд-во при Киев. ун-те, 1988. − 128 с.

3. Шапиро Д. К. Практикум по биологической химии / под. ред. А. С. Вечера − 2-е изд., перераб. и доп. − Минск : Высшейшая школа, 1976. − 288 с.

4. Биохимия. Учебник / Под. ред. Е.С. Северина. − 2-е изд., испр. − М : Гєотар-Мед, 2004. − 784 с. ISBN 5-9231-0390-7

5. Губський Ю. І. Біологічна хімія / Ю. І. Губський. − Київ-Тернопіль : Укрмедкнига, 2000. − 508 с. ISBN 966-7364-41-0

6. Страйер Л. Биохимия Пер. с англ. / Л. Страйер. − М. : Мир, 1984. − **Т. 1.** − 232 с.; − М. : Мир, 1985. − Т. 2. − 312 с.; − М. : Мир, 1985. − Т. 3. − 400 с.

7. Тюкавкина Н. А. Биоорганическая химия / Н. А. Тюкавкина, Ю. И. Бауков − 2-е изд., перераб. − М. : Медицина, 1991. − 528 с. − ISBN 5-225-00863-1