



МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНИЙ БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ

Факультет ветеринарної медицини
Кафедра фізіології та біохімії тварин

БІОХІМІЯ ТВАРИН

Робочий зошит для лабораторно-практичних занять

студента _____ групи _____ курсу

Викладач: _____
Прізвище, ім'я, по-батькові

Харків–2023

Затверджено
Науково-методичною радою факультету ветеринарної медицини ДБТУ
протокол № 5 від 07.06.2023 р
Схвалено на засіданні
кафедри фізіології та біохімії тварин ДБТУ
протокол № 15 від 28.03.2023 р.

Рецензенти:

Северин Р.В. - к. вет. н., доцент, завідувач кафедри епізоотології та мікробіології Державного біотехнологічного університету.

Вікуліна Г.В. – к.вет.н., доцент кафедри внутрішніх хвороб і клінічної діагностики тварин Державного біотехнологічного університету.

Біохімія тварин. Робочий зошит для лабораторно-практичних занять /
Приходченко В.О., Гладка Н.І., Денисова О.М., Якименко Т.І. – Харків:
ДБТУ, 2023. – 80 с.

Робочий зошит для вивчення однієї з дисциплін, що формують базову підготовку студентів факультету ветеринарної медицини. Лабораторні роботи охоплюють класичні та сучасні методи якісного та кількісного аналізів основних груп органічних сполук: вуглеводів, ліпідів, білків, нуклеїнових кислот, ферментів, вітамінів, гормонів тощо. Значну увагу приділено ветеринарно-біологічній спрямованості викладання наведеного матеріалу. Актуальність поставлених питань і конкретизація відповідей на них сприяє кращому засвоєнню пройденого матеріалу.

Для підготовки фахівців у вищих аграрних навчальних закладах III–IV рівнів акредитації за спеціальністю 211 – «Ветеринарна медицина».

Видання вперше

© Приходченко В.О., Гладка Н.І.,
Денисова О.М., Якименко Т.І., 2023

Мета та завдання навчальної дисципліни «Біохімія тварин»

Мета курсу – сформувати у студентів цілісну систему знань про хімічний склад живих організмів, фізико-хімічні і біологічні властивості природних сполук, основні шляхи обміну речовин, механізми регуляції та взаємозв'язку біохімічних перетворень, тобто оволодіти теоретичними основами метаболічних процесів та їх регуляції у тварин і практичними навичками їх вивчення.

Завдання курсу «Біохімія тварин» – вивчити основи життєдіяльності організмів, а саме: структуру, фізико-хімічні та біологічні властивості речовин, їх обмін і його регуляцію та зміни метаболічних процесів за допомогою як кормових, так і лікарських засобів з метою зміцнення здоров'я та підвищення рівня продуктивності тварин.

У результаті вивчення навчальної дисципліни студент повинен

знати:

- хімічні основи життєдіяльності організмів, зокрема хімічну будову та властивості природних сполук і їх комплексів, основні шляхи і механізми регуляції метаболізму, біохімічні механізми реалізації генетичної інформації;

- теоретичне і практичне значення біохімії, її взаємозв'язок з іншими природничими науками;

- новітні досягнення біохімії та перспективи їх використання у різних галузях народного господарства, особливо у ветеринарній медицині;

вміти: орієнтуватися в біохімічних дослідженнях на сучасному рівні, а саме: обирати відповідні фізико-хімічні і біохімічні методи й методологічні підходи та обладнання, відбирати біологічні зразки, володіти загальноприйнятими методиками з визначення у біологічних об'єктах різних метаболітів, показників за допомогою приладів біохімічної лабораторії з метою характеристики фізіологічного стану тварин та його змін.

ЗМІСТ

Загальні правила техніки безпеки при роботі студентів у навчальній хімічній лабораторії.....	5
----------------------------------------------------------------------------------------------	---

Частина I.

<i>Розділ 1. Основи фізичної та колоїдної хімії.....</i>	6
Тема 1: рН розчинів і біологічних рідин.....	6
Тема 2: Буферні розчини.....	9
Тема 3: Колоїдні розчини. Методи їх отримання та властивості.....	12
Тема 4: Колоїдні розчини. Електрокінетичні властивості колоїдів.....	17
Тема 5: Поверхневі явища та адсорбція.....	20

Частина II. Основи біохімії

<i>Розділ 2. Білки та нуклеїнові кислоти.....</i>	21
Тема 6: Білки. Якісні реакції на білки та амінокислоти	21
Тема 7: Фізико-хімічні властивості білків. Класифікація білків.....	24
Тема 8: Нуклеїнові кислоти.....	28
<i>Розділ 3. Біологічно активні речовини.....</i>	29
Тема 9: Жиророзчинні вітаміни.....	29
Тема 10: Водорозчинні вітаміни.....	30
Тема 11: Загальні властивості ферментів.....	33
Тема 12: Біологічне окиснення. Оксидоредуктази.....	37
Тема 13: Гормони. Якісні реакції на гормони.....	38
<i>Розділ 4. Хімія та обмін вуглеводів.....</i>	41
Тема 14: Хімія вуглеводів.....	41
Тема 15: Обмін вуглеводів.....	44
<i>Розділ 5. Хімія та обмін ліпідів.....</i>	48
Тема 16: Хімія ліпідів.....	48
Тема 17: Обмін ліпідів.....	51
<i>Розділ 6. Обмін білків та нуклеїнових кислот. Взаємозв'язок та регуляція процесів метаболізму.....</i>	55
Тема 18: Обмін простих білків. Біологічна роль, потреба і засвоєння...	55
Тема 19: Обмін білків. Біосинтез білків.....	57
Тема 20: Обмін білків. Загальні і специфічні шляхи перетворення амінокислот.....	59
Тема 21: Обмін складних білків.....	63
<i>Розділ 7. Функціональна біохімія.....</i>	65
Тема 21: Біохімія крові.....	65
Рекомендована література.....	68

ЗАГАЛЬНІ ПРАВИЛА ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ ПРИ РОБОТІ СТУДЕНТІВ У НАВЧАЛЬНІЙ ХІМІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ

1. Перебуваючи в хімічній лабораторії, необхідно суворо дотримуватись загальних правил техніки безпеки, пам'ятати, що будь-яке порушення може призвести до нещасного випадку.

2. У хімічній лабораторії працювати тільки в медичних халатах та шапочках. Довге волосся має бути акуратно підібране.

3. На робочому місці залишати тільки необхідні речі (книгу, зошити, ручки), всі інші речі (портфелі, сумки, одяг) зберігати в спеціально відведеному для цього місці.

4. Кожен студент повинен працювати за закріпленим за ним місцем, перехід на інше робоче місце без дозволу викладача не допускається. Категорично забороняється виконувати в лабораторії роботи, не пов'язані із виконанням навчального практикуму. Реактиви після їх використання необхідно ставити на спеціально відведене місце.

5. Роботи з концентрованими кислотами, лугами слід проводити обережно, під витяжною шафою, щоб виключити можливість їх потрапляння в очі, а також появи опіків і пошкодження одягу. Для уникнення нещасних випадків не працювати з леткими та легкозаймистими речовинами поблизу запаленого пальника.

6. Користуватись горючими і токсичними речовинами (галогени, концентровані кислоти, луги, сірководень і т.д.), а також проводити досліди, які супроводжуються виділенням шкідливих парів, газів, дозволяється тільки у витяжній шафі. При нагріванні речовин у пробірці – не направляти її отвір у бік іншого студента, який працює, або до себе.

7. Не можна залишати в лабораторії без нагляду включені фотоелектроколориметри, водяні бані, газові пальники, центрифуги тощо.

8. При опіках: а) сильними лугами – необхідно промити уражені ділянки тіла водою і накласти компрес, змочений 1% розчином оцтової кислоти; б) сильними кислотами – необхідно промити уражені ділянки тіла водою і накласти компрес, змочений 1% розчином соди; в) фенолом – необхідно розтерти побілілу від опіку ділянку до нормального стану шкіри, а потім промити водою і накласти пов'язку з гліцерином.

9. Не виливати в раковину вміст пробірок з концентрованими кислотами та лугами. Не кидати папір, сірники, побитий посуд у водостічну раковину, для цього користуватись ємностями для сміття.

10. Після закінчення роботи привести в порядок своє робоче місце, протерти полиці і стіл вологою ганчіркою, поставити посуд з реактивами на відведене місце, виключити воду та газ.

11. Після ознайомлення з правилами роботи в лабораторії, студент бере на себе письмові зобов'язання строго їх дотримуватися, про що підтверджує, розписуючись у журналі викладача.

ЧАСТИНА I

Розділ 1. Основи фізичної та колоїдної хімії

ТЕМА 1. рН РОЗЧИНІВ І БІОЛОГІЧНИХ РІДИН

Мета: Вивчити біологічну дію іонів, особливо H^+ та OH^- - іонів, явище іонного антагонізму, принципи методів вимірювання рН.

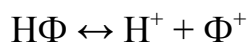
Завдання: Засвоїти методи колориметричного і електрометричного визначення рН розчинів і біологічних рідин.

Запитання для самопідготовки:

1. Поняття про іони. Біологічна дія іонів.
2. Досліди Жака Леба і його висновки. Іонний антагонізм.
3. Фізіологічно еквілібровані розчини. Їх властивості і призначення.
4. Іонний добуток води.
5. Водневе число (сН) і водневий показник (рН) та їх значення для нейтрального, кислого і лужного середовищ.
6. Що таке активна кислотність? Від чого вона залежить?
7. Методи визначення рН.
8. Колориметричний метод визначення рН, принцип методу, його переваги та недоліки.
9. Індикатори: визначення, механізм дії.
10. Що таке зона віражу індикатора?
11. Що таке універсальний індикатор?
12. Принцип електрометричного методу визначення рН.
13. рН-метри, їх призначення та застосування.
14. Величини рН крові сільськогосподарських тварин.

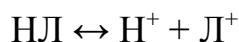
Індикаторами називаються речовини, що змінюють своє забарвлення в залежності від рН середовища.

За хімічною будовою індикатори – це органічні сполуки, що проявляють у водних розчинах властивості слабких кислот або слабких основ, у яких недисоційовані молекули мають одне забарвлення (або безбарвні), а що утворилися з них іони – інше. Індикатори, молекули яких безбарвні, а забарвлені тільки іони, називаються *одноколірними* (наприклад, фенолфталеїн):



Фенолфталеїн безбарвний → *червоний*

Індикатори, молекули яких мають одне забарвлення, а що утворилися з них іони – інше, називаються *двоколірними* (наприклад, лакмус):



Лакмус червоний → *синій*

Ступінь забарвлення одноколірного індикатора прямо пропорційно залежить від концентрації забарвленого іона: чим більше концентрація, тим інтенсивніше забарвлення.

Ступінь двоколірного забарвлення індикатора залежить від співвідношення концентрацій недисоційованих молекул та іонів, що у свою чергу визначає рН розчину.

Залежність ступеня дисоціації індикаторів від реакції середовища визначається формулою: $[H^+] = K \times \frac{[HInd]}{[Ind^-]}$

Інтервал значень рН, у межах якого спостерігається зміна забарвлення індикатора, називається *зоною переходу або зоною виражу індикатора*. Суміш індикаторів, підібраних так, що зони їх переходу перекривають шкалу рН (1-14) називається *універсальним індикатором*.

Лабораторні роботи:

1. Колориметричний метод визначення рН

Принцип методу. Метод заснований на зміні характеру або інтенсивності забарвлення досліджуваного розчину при додаванні до нього індикатора.

Обладнання та реактиви. Досліджувані розчини: хлоридна кислота (HCl) – 0,1н розчин; оцтова кислота (CH₃COOH) – 0,1н розчин; вода дистильована; вода водопровідна, а також біологічні рідини – сироватка крові, сеча. Обладнання: фарфорові чашки, піпетки градуйовані на 1 мл.

1.1. Визначення рН розчинів за допомогою індикаторного паперу різних зразків

Хід роботи.

1. У фарфорові чашки налити приблизно по 0,5 мл досліджуваних розчинів.
2. Опустити в розчин смужку індикаторного паперу.
3. Порівняти характер забарвлення індикатора з кольоровою шкалою та відповідно до неї визначити рН розчинів.

1.2. Визначення рН розчину за допомогою універсального індикатора (з точністю±1)

Хід роботи.

1. У фарфорові чашки налити приблизно по 0,5 мл досліджуваних розчинів.
2. Додати по 2 краплі універсального індикатора.
3. Перемішати.
4. Порівняти характер забарвлення розчину з кольоровою шкалою і визначити рН розчинів.

2. Електрометричний метод визначення рН

Принцип методу. Метод ґрунтується на визначенні електрорушійної сили (ЕРС), що виникає за рахунок різниці потенціалів між стандартним електродом (електрод порівняння) і електродом визначення. Потенціал стандартного електрода – постійний, потенціал електрода визначення – змінюється в залежності від рН розчину, в який він занурюється.

Обладнання та реактиви. Досліджувані розчини: хлоридна кислота (HCl) – 0,1н розчин; оцтова кислота (CH₃COOH) – 0,1н розчин; вода дистильована; вода водопровідна, а також біологічні рідини – сироватка крові, сеча. Обладнання: рН-метр, хімічні стакани на 50 мл.

Хід роботи.

Прилад для визначення рН електрометричним методом (рН-метр) попередньо налаштовується для роботи, згідно доданої до приладу інструкції.

Після калібрування приладу приступають до вимірювання рН досліджуваних розчинів. Перед кожним дослідженням електроди промивають дистильованою водою і просушують фільтрувальним папером.

1. У чистий хімічний стакан наливають досліджувану рідину (20-25 мл), занурюють у нього електроди і вимірюють приблизне рН по нижній шкалі значень при включених кнопках на панелі "рН" і "1-14".
2. Прилад переводять у діапазон вимірювань у відповідності з наближеним рН, для чого натискають кнопки (відповідно) "1-4", "4-9", "9-14". Параметри відраховують по верхній шкалі значень в межах показань встановленого діапазону.

Після кожного вимірювання електроди і стакан для досліджуваної рідини 5-6 разів ретельно промивають дистильованою водою.

Точність визначення за допомогою рН-метра: $\pm 0,05 \dots 0,005$.

Отримані дані оформляють у вигляді таблиці.

№ пробірки	Досліджуванний розчин	Значення рН, отримане за допомогою			
		паперов. індикатору	універсального індикатору	рН-метру	Характер серед-ща
1.					
2.					
3.					
4.					
5.					
6.					

У висновках дати порівняльну характеристику вивчених методів визначення рН (їх переваги і недоліки); вказати від чого залежить активна кислотність (рН) досліджуваних розчинів.

Висновки: _____

ТЕМА 2. БУФЕРНІ РОЗЧИНИ. МЕТОДИ ОДЕРЖАННЯ ТА ВЛАСТИВОСТІ

Мета: Вивчити основні методи одержання і властивості буферних розчинів, механізм їх дії та роль в біології.

Завдання: Освоїти методику приготування буферних розчинів, визначення буферної ємності різних біологічних рідин.

Запитання для самопідготовки:

1. Які розчини називаються буферними?
2. Які властивості мають буферні розчини?
3. З яких компонентів складаються буферні системи?
4. Наведіть формули буферних систем крові.
5. Наведіть формули гемоглобінової, гідрокарбонатної та фосфатної буферних систем. Покажіть на хімічних реакціях механізм їх дії.
6. Покажіть механізм буферної дії білків і амінокислот на прикладі конкретної амінокислоти.
7. Покажіть на прикладі хімічних реакцій механізм дії ацетатної буферної системи.
8. Чому не має буферної дії дистильована вода?
9. Від чого залежить рН буферного розчину?
10. Залежить рН буферного розчину від розведення? Чому?
11. Що таке буферна ємність? Як вона змінюється?
12. Змінюється буферна ємність при розведенні? Чому?
13. Чи проявляють буферні розчини стійкість до дії кислот і лугів або тільки до однієї з цих речовин?
14. Що таке резервна лужність?
15. Чому дорівнює рН крові і завдяки яким факторам підтримується його сталість?
16. Яким методом і в яких одиницях вимірюється буферна ємність розчину?

17. Чому організму необхідна сталість рН крові?
18. Чи мають буферні властивості біологічні рідини: слина, сеча, лімфа? Якщо так, то завдяки чому?
19. Які буферні системи обумовлюють буферну ємність крові?
20. Ацидоз та алкалоз: характер захворювань, різновиди, причини.
21. В чому проявляється негативна дія ацидозу та алкалозу на клітинному рівні?

Буферними називаються розчини, які здатні стійко підтримувати сталість рН при додаванні до них кислот або лугів, а також при їх розведенні. рН буферних розчинів, у першу чергу, залежить від співвідношення концентрацій компонентів буферного розчину:

$$[H^+] = K \frac{[кислота]}{[сіль]}; \quad [H^+] = K \frac{[сіль]}{[основа]}.$$

При розведенні буферного розчину рН його практично не змінюється, оскільки співвідношення компонентів не змінюється.

Здатність розчинів протистояти зміні рН середовища при додаванні кислот чи лугів називається буферною дією (або буферністю) і кількісно виражається **буферною ємністю**.

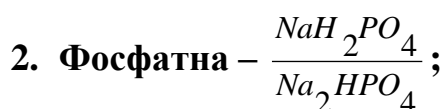
Буферна ємність вимірюється кількістю сильної кислоти або основи, яку необхідно додати до 1 л розчину, щоб змінити його рН на одиницю. В результаті розведення буферного розчину буферна ємність зменшується пропорційно до ступеня розбавлення, оскільки її величина залежить від концентрації компонентів буфера.

Характерною особливістю живих організмів є їх здатність підтримувати сталість рН внутрішнього середовища організму. Кров вищих тварин має досить постійну концентрацію іонів Гідрогену, і в межах норми можливі лише незначні зміни рН крові.

Таблиця значень рН крові с.-г. тварин

Тварини	рН крові
Кінь	7,32
ВРХ	7,36
Баран	7,82
Свиня	7,97

Стійкість рН крові досягається завдяки наявності в ній ряду буферних систем:



3. Гемоглобінова – $\frac{H\text{Hb}}{K\text{Hb}}$;
4. Оксигемоглобінова – $\frac{H\text{HbO}_2}{K\text{HbO}_2}$;
5. Білкова – $\frac{H - Pr (\text{плазми})}{Na - Pr (\text{плазми})}$ та інші.

Лабораторні роботи:

1. Приготування буферних розчинів

Принцип методу. Активна кислотність буферних розчинів залежить від природи хімічних речовин, що утворюють буферну систему і від співвідношення цих речовин у розчині. Змінюючи співвідношення компонентів буферу, можна приготувати буферний розчин з різним значенням рН.

Обладнання та реактиви. Оцтова кислота, 0,1н розчин; натрію ацетат, 0,1н розчин; індикатор метил-рот; рН-метр; штатив з пробірками, піпетки градуйовані.

Хід роботи.

1. У попередньо пронумеровані пробірки наливають розчини оцтової кислоти та ацетату натрію в співвідношеннях (мл), наведених у таблиці.
2. Приготовлені суміші ретельно перемішують.
3. Додають до них по три краплі (в усі пробірки однаково) індикатора метил-роту.
4. За характером забарвлення визначають, однакове чи різне рН приготовлених сумішей.

**На одному робочому місці індикатор до приготованих сумішей не додають і використовують їх для вимірювання рН електрометрично за допомогою рН-метра.*

5. Одержані дані записують у таблицю і роблять висновок, в якому дають пояснення: від чого залежить рН буферного розчину.

Досліджуваний розчин	Номер пробірки		
	№1	№2	№3
0,1н розчин CH ₃ COOH (мл)	9 мл	5 мл	1 мл
0,1н розчин CH ₃ COONa (мл)	1 мл	5 мл	9 мл
рН за метил-ротом*			
рН, виміряне на рН-метрі			

Висновок: _____

2. Вплив розведення на рН буферного розчину і його буферну ємність

Принцип методу. Буферні розчини здатні підтримувати сталість рН за умов додавання до них невеликих кількостей кислот, лугів або при їх розведенні нейтральним розчинником. В останньому випадку зменшується концентрація обох компонентів буферу як кислотного, так і лужного, а співвідношення між ними залишається незмінним. Оскільки рН буферного розчину залежить від співвідношення його компонентів, розведення не впливає на рН буферу, тоді як концентрація буферних речовин зменшується, а отже зменшується і сила (ємність) буферного розчину.

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками, піпетки градуйовані, бюретка, 0,1н оцтова кислота; 0,1н розчин натрію ацетату; вода дистильована; індикатор універсальний; фенолфталеїн; 0,1н розчин натрію гідроксиду.

Хід роботи.

2.1. Приготування нерозбавлених і розбавлених буферних розчинів:

1. У три пробірки відміряють по 2 мл розчину оцтової кислоти і стільки ж розчину ацетату натрію.
2. Вміст пробірки №1 перемішують і залишають без змін.
3. До вмісту пробірки №2 додають 4 мл води (розведення вдвічі).
4. В пробірку №3 додають 12 мл води (розведення в 4 рази).
5. Розчини перемішують і використовують:
 - 1) для вимірювання рН приготованих буферів;
 - 2) для вимірювання буферної ємності буферів.

2.2. Визначення впливу розведення на рН буферного розчину:

1. Пронумерувати три нових пробірки.
2. Перенести в них по 2 мл приготовлених у роботі 2.1. буферних розчинів: в 1-у – нерозбавленого, у 2-у – розбавленого вдвічі, в 3-ю – розбавленого в 4 рази.
3. В кожному з цих пробірок додати по 2-3 краплі (однаково) універсального індикатора і за характером забарвлення визначити, чи змінилось рН розчину внаслідок його розведення. Якщо ні, то обґрунтуйте чому?

Висновок: _____

2.3. Визначення впливу розведення буферного розчину на його буферну ємність:

1. Пронумерувати три нових пробірки.
2. В них вливають по 2 мл приготовлених у роботі 2.1. (відповідно) нерозбавленого, розбавленого вдвічі і розбавленого в чотири рази буферних розчинів.
3. В кожному з цих пробірок приливають по 2-3 краплі фенолфталеїну.

4. Титрують з бюретки 0,1н розчином натрію гідроксиду, при цьому рахують краплі до появи рожевого забарвлення. Кількість крапель гідроксиду є умовною мірою буферної ємності даних буферів по відношенню до луку.

Одержані дані записують у вигляді таблиці і роблять висновки, відповідаючи на поставлені запитання:

1. Однакова чи різна буферна ємність досліджуваних буферів?

2. Як впливає розведення на буферну ємність розчину?

Ступінь розбавлення буферу	Кількість буферу, мл	pH по універсальному індикатору	Кількість буферу, мл	Кількість крапель гідроксиду по фенолфталеїну
Нерозбавлений	2		2	
Розбавлений в 2 рази	2		2	
Розбавлений в 3 рази	2		2	

Висновок: _____

3. Буферна ємність біологічних рідин

Принцип методу. Біологічні рідини містять у своєму складі речовини, що утворюють буферні системи, а тому проявляють буферну дію. Буферну ємність вимірюють шляхом титрування цих рідин кислотою (**лужний резерв**) або лугом (**кислотний резерв**).

Обладнання та реактиви. Колби на 50 мл, піпетки градуйовані, бюретки, натрію гідроксид, 0,1н розчин; хлоридна кислота, 0,1н розчин; фенолфталеїн; метил-рот; сироватка крові; сеча.

3.1. Визначення буферної ємності по відношенню до луку (кислотний резерв)

Хід роботи.

1. В одну конусну колбу відміряють 5 мл сироватки крові.
2. У другу – 5 мл сечі.
3. У кожну з них додають по три краплі фенолфталеїну.
4. Титрують із бюретки лугом, рахуючи кількість крапель до появи рожевого забарвлення. *Результати записують у таблицю.*

3.2. Визначення буферної ємності по відношенню до кислоти (лужний резерв)

Хід роботи.

1. В одну конусну колбу відміряють 5 мл сироватки крові.

2. В другу – 5 мл сечі.
3. У кожен додають по три краплі метил-роту.
4. Титрують з бюретки хлоридною кислотою, рахуючи краплі до зміни жовтого забарвлення в рожеве. *Результати записують у таблицю.*

Рідина для досліджу	Кількість, мл	Кількість крапель NaOH по фенолфталеїну	Кількість, мл	Кількість крапель HCl по метил-роту
Сироватка крові	5		5	
Сеча	5		5	

Відповісти на питання:

1. Яка з досліджуваних рідин має більшу буферну ємність?

2. По відношенню до якої речовини (кислоти чи лугу) буферна ємність у біологічних рідин виражена більше?

3. Які буферні системи містяться в сироватці крові?

ТЕМА 3. КОЛОЇДНІ РОЗЧИНИ. МЕТОДИ ЇХ ОДЕРЖАННЯ ТА ВЛАСТИВОСТІ

Мета: Вивчити методи одержання колоїдних розчинів та їх молекулярно-кінетичні та оптичні властивості.

Завдання: Оволодіти конденсаційними методами одержання колоїдних розчинів та ознайомитися з характерними ознаками, за якими їх відрізняють від істинних розчинів.

Запитання для самопідготовки:

1. Дисперсні системи: поняття, класифікація. Гомогенні та гетерогенні дисперсні системи. Колоїдні розчини або мікрогетерогенні дисперсні системи.
2. Колоїдний стан: золь, гель, драглі.
3. Методи одержання та очищення колоїдних розчинів.
4. Молекулярно-кінетичні властивості колоїдних розчинів: дифузія, броунівський рух, осмотичний (онкотичний) тиск.
5. Оптичні властивості колоїдних розчинів: опалесценція, ефект Фарадея-Тіндалля (світлорозсіювання).

6. Будова колоїдної міцели.
7. Що таке ядро, адсорбційний і дифузний шар, колоїдна міцела?
8. Що таке дзета-потенціал і як він виникає?
9. Чим відрізняються між собою колоїдна гранула і колоїдна міцела?
10. Написати рівняння реакції одержання колоїдного розчину та послідовні етапи формування міцел: а) берлінської блакиті, б) гідроксиду заліза.
11. Макрогетерогенні дисперсні системи (суспензії та емульсії). Їх відмінність від золів.

Лабораторні роботи:

1. Приготування колоїдних розчинів каніфолі і фенолфталеїну та спостереження явища опалесценції

Принцип методу. Колоїдні розчини каніфолі та фенолфталеїну одержують методом заміни розчинника (різновидність конденсаційних методів). Каніфоль і фенолфталеїн добре розчиняються у спирті, з яким утворюють істинні розчини, але майже нерозчинні у воді. Вода ж добре розчиняє спирт – вихідний розчинник. Якщо змішати спиртові розчини названих речовин з водою, то молекули каніфолі або фенолфталеїну втрачають розчинність і будуть конденсуватись з утворенням агрегатів колоїдної ступені дисперсності.

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками, піпетки на 1-2 мл, каніфоль, 1% спиртовий розчин; фенолфталеїн, 1% спиртовий розчин; вода дистильована.

Хід роботи.

1. У дві пробірки наливають по 3-4 мл дистильованої води.
2. Додають в одну з них 3-4 краплі спиртового розчину каніфолі, а в другу – 6-8 крапель фенолфталеїну (пересвідчившись, що вони прозорі і не мають здатності до опалесценції).
3. Перемішують.
4. Отримані розчини розглядають в прохідному і відбитому світлі.

Спостерігають здатність одержаних розчинів до зміни характеру їх забарвлення в променях світла, що проходять через розчин (набувають оранжевого кольору) та відбитих від нього (виникає блакитно-синій колір).

*Здатність колоїдних розчинів змінювати характер забарвлення в світлі, що проходить через них і що відбивається від них, називається **опалесценцією**.*

Ця оптична властивість характерна тільки для колоїдних розчинів, частки яких завдяки своїм розмірам (1-100 нм) викликають дифракцію білого променя. В істинних та в грубодисперсних системах (суспензіях і емульсіях) вона не проявляється. Чому?

Спостереження та висновки: _____

2. Приготування золю берлінської блакиті

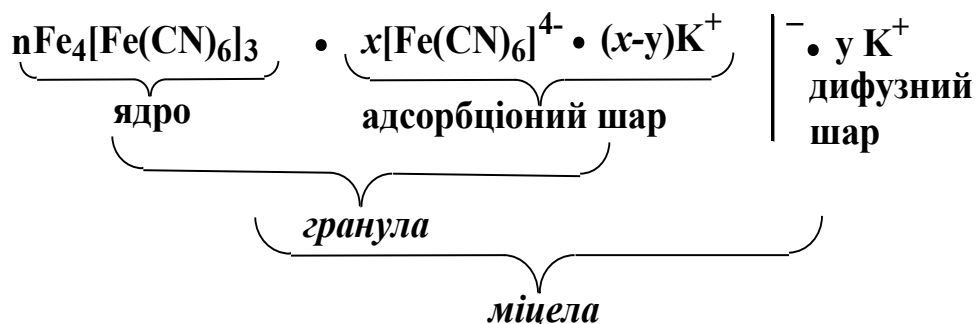
Принцип методу. При взаємодії надлишку гексаціаноферату (II) калію з хлоридом заліза (III) утворюється гексаціаноферат (II) заліза (берлінська блакить), речовина малорозчинна у воді. Її частинки конденсуються до розмірів колоїдної дисперсності і стабілізуються молекулами гексаціаноферату (II) калію (що є у надлишку).

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками, гексаціаноферат (II) калію, 1% розчин; хлорид заліза (III), 2% розчин.

Хід роботи.

1. У пробірку наливають 4-5 мл розчину гексаціаноферату (II) калію.
2. Додають 1-2 краплі 2%-го розчину хлориду заліза (III). Утворюється сіль – гексаціаноферат (II) заліза (берлінська блакить).

Про утворення колоїдного розчину (золю) берлінської блакиті свідчить поява характерного блакитного забарвлення, якого набуває розчин.



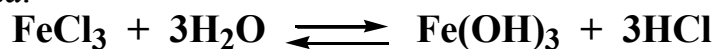
де: $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ – потенціалвизначаючі іони

K^+ – протиіони

Одержаний колоїдний розчин залишають для наступного досліду.

3. Приготування золю гідроксиду заліза (III)

Принцип методу. В основі досліду лежить реакція гідролізу хлориду заліза (III), солі, утвореної сильною кислотою та слабкою основою. В реакції гідролізу ця сіль утворює гідроксид заліза $\text{Fe}(\text{OH})_3$, практично нерозчинний у воді. Його частинки конденсуються в міцели колоїдної дисперсності і адсорбують на своїй поверхні з розчину електроліт FeOCl (оксихлорид заліза), який утворюється як додатковий продукт реакції з деякої частини гідроксиду заліза:



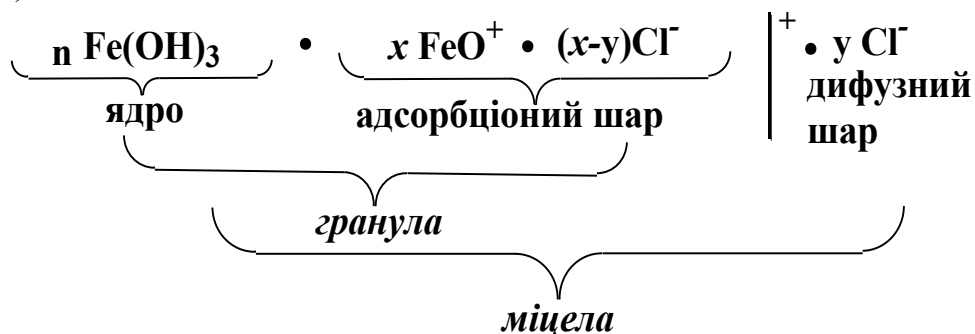
Іонним стабілізатором для $\text{Fe}(\text{OH})_3$ є FeOCl (оксихлорид заліза), що утворюється в результаті наступної реакції:



Молекула стабілізатора дисоціює у реакції:



Далі з названих речовин утворюється колоїдна міцела золю гідроксиду заліза (III):



де: FeO^+ – потенціалвизначаючі іони

Cl^- – протіони

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками, водяна баня, хлорид заліза (III), концентрований розчин; дистильована вода.

Хід роботи.

1. У дві пробірки наливають по 4-5 мл дистильованої води.
2. Нагрівають в одній з них воду до кипіння.
3. В обидві пробірки (з холодною і гарячою водою) додають по 3-4 краплі концентрованого розчину хлориду заліза (III).

У якій із пробірок утворився колоїдний розчин? Одержаний золь гідроксиду заліза (III) залишають для наступного дослідю.

Спостереження та висновки: _____

4. Визначення знаку заряду колоїду

Принцип методу. Відомо, що поверхня капілярів фільтрувального паперу у воді заряджається негативно. Якщо в забарвлений розчин колоїду занурити одним кінцем смужку фільтрувального паперу, то вода буде підніматись по капілярам смужки, а разом з нею буде підніматись і колоїдна речовина, якщо її міцели заряджені негативно. Позитивно заряджені колоїдні міцели зв'язуються електростатичними силами з негативно зарядженими стінками капілярів і разом з водою по смужці паперу підніматися не зможуть.

Обладнання та реактиви. Хімічні склянки на 100 мл; скляні палички; канцелярські скріпки; смужки фільтрувального паперу; одержані в попередніх дослідах колоїдні розчини гідроксиду заліза (III) і гексаціаноферату (II) заліза (берлінської блакиті).

Хід роботи.

1. В одну хімічну склянку наливають золь гідроксиду заліза (III).
2. В другу – золь берлінської блакиті.
3. На скляних паличках за допомогою скріпок фіксують смужки фільтрувального паперу, регулюючи їх довжину (по висоті хімічної склянки) таким чином, щоб кінець смужки занурювався у розчин, але не торкався до дна і стінок склянки.
4. Скляну паличку кладуть на стінки склянки. Вільний кінець фільтрувального паперу повинен зануритись у досліджуваний колоїдний розчин на 2-3 мм.
5. Результати досліду враховують через 10-15 хвилин.

Спостереження і висновки: _____

5. Спостереження ефекту Фарадея-Тіндаля (демонстративно)

Принцип методу. При пропусканні в колоїдний розчин через отвір малого діаметру яскравого світла, останнє розповсюджується в колоїдному розчині у вигляді конусу, що світиться, за рахунок розсіяння світла колоїдними частинками. Вперше цей ефект спостерігав М. Фарадей і пояснення йому дав Д. Тіндаль.

Обладнання та реактиви. Джерело яскравого світла (електролампа на 200 ват); фанерний або інший ящик з боковим отвором діаметром 1-2 мм (передня стінка ящика відкрита для спостережень), всередині ящик потрібно обклеїти темним папером; плоскі ємності; каніфоль, 1% спиртовий розчин; флуоресцеїн, 5% розчин; перманганат калію, 1% розчин; суспензія крейди (або глини) у воді.

Хід роботи.

1. Встановлюють джерело світла як можна ближче до бокового отвору ящика.
2. В ящик послідовно поміщають плоскі склянки з розчинами досліджуваних речовин. Склянки повинні щільно прилягати до бокової стінки ящика, а боковий отвір повинен співпадати з центром бокової стінки склянки.
3. Коли промінь світла проходить через колоїдний розчин, що знаходиться в склянці, *спостерігається утворення конуса, що світиться*. Це явище носить назву ефекту Фарадея-Тіндаля.

4. По черзі в камеру поміщають посудини з розчинами берлінської блакиті (колоїдний розчин), перманганату калію (істинний розчин) і крейди (суспензія).

В істинних розчинах (розчин перманганату калію) це явище відсутнє, тобто такий розчин залишається «оптично пустим». Суспензії і емульсії також не дають ефекту Фарадея-Тіндаля – вони каламутні і, завдяки великим розмірам часток дисперсної речовини, світло зовсім не пропускають.

ТЕМА 4. КОЛОЇДНІ РОЗЧИНИ.

ЕЛЕКТРОКІНЕТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ КОЛОЇДІВ

Мета: Закріпити теоретичні знання студентів про головні електрокінетичні властивості колоїдів та їх практичне використання.

Завдання: Ознайомити студентів з електрофорезом колоїдів, явищами коагуляції колоїдів електролітами та колоїдного захисту. Навчити студентів визначати ІЕТ колоїдів (білків).

Запитання для самопідготовки:

1. Електрокінетичні властивості колоїдних розчинів. Електрофорез та його практичне використання.
2. Міцелярна будова колоїдних частинок. Виникнення електрокінетичного потенціалу.
3. Види стійкості колоїдних систем: кінетична та агрегативна. Фактори агрегативної стійкості у гідрофобних та гідрофільних колоїдів.
4. Виникнення електричного заряду в розчинах ВМС (на прикладі білків). Вплив амінокислотного складу та рН середовища на заряд білка (позитивний чи негативний).
5. Ізоелектричний стан та ізоелектрична точка (ІЕТ) колоїдів.
6. Гідратна оболонка гідрофільних колоїдів.
7. Коагуляція колоїдів – причини, механізм. Коагуляція колоїдів електролітами. Правило Гарді-Шульце.
8. Види коагуляції у розчинів ВМС – оборотна (висолювання) та необоротна (з денатурацією).
9. Колоїдний захист: визначення, механізм, біологічне значення.
10. Драгли – їх будова та властивості. Тиксотропність драглів і синерезис.
11. Седиментація колоїдів.

Лабораторні роботи:

1. Електрофорез гідрозолу берлінської блакиті (демонстративно)

Принцип методу. При пропусканні через колоїдний розчин постійного електричного струму спостерігається переміщення колоїдних частинок до протилежно зарядженого електроду. Це явище називається *електрофорезом*.

Прилади та реактиви. Випрямляч, який здатний давати постійний струм напругою 100-120 В і силою до 10 мА; U-подібна трубка, закріплена в штативі; мідні електроди; золь гексаціаноферату (II) заліза.

Хід роботи.

1. В U-подібну трубку заливають золь берлінської блакиті.
2. Занурюють в розчин два електроди, які підключають до випрямляча. Режим електрофорезу 100-120 В напруги і 4-5 мА за силою струму.
3. Через деякий час спостерігають просвітлення розчину в одному коліні трубки та підсилення забарвлення в іншому коліні за рахунок збільшення концентрації колоїду, що переміщується в процесі електрофорезу.

Спостереження ведуть протягом 5-10 хвилин.

Висновки: _____

2. Коагуляція золю гідроксиду заліза електролітами

Принцип методу. Якщо до ліофобного колоїду додати розчин електроліту, то іони останнього, що мають заряд, протилежний заряду гранули, будуть адсорбуватись на колоїдних частинках і позбавляють їх заряду. Електронейтральні частинки об'єднуються між собою, що з рештою призводить до коагуляції колоїду. Коагулююча дія іонів тим вище, чим вище їх заряд (правило Гарді-Шульце).

Прилади та реактиви. Колби на 100 мл; бюретки на 25-50 мл у штативі; піпетки градуйовані на 5 та 10 мл; золь гідроксиду заліза; натрію хлорид, 1М розчин; натрію сульфат, 0,01М розчин; калію гексаціаноферат (III), 0,001М розчин.

Хід роботи.

1. У три колби відміряють по 5 мл золю гідроксиду заліза.
2. Титрують із бюретки до перших ознак помутніння (початок коагуляції):
 - А) вміст 1-ої колби – розчином натрію хлориду;
 - Б) вміст 2-ої – 0,01 М розчином натрію сульфату;
 - В) вміст 3-ої – 0,001 М розчином калію гексаціаноферату (III).
3. Результати титрування заносять в таблицю, а об'єми розчинів електролітів перераховують на 0,001 М концентрацію.

Результати записують у таблицю.

Електроліт – коагулятор	Осаджуючий іон і величина його заряду	Концентрація електроліту (вихідна)	Кількість електроліту, необхідна для коагуляції, мл
NaCl	Cl ⁻	1 М	
Na ₂ SO ₄	SO ₄ ²⁻	0,01 М	
K ₃ [Fe(CN) ₆]	[Fe(CN) ₆] ³⁻	0,001 М	

Висновки: _____

3. Колоїдний захист

Принцип методу. Якщо високомолекулярні сполуки (ВМС), наприклад, білки, додати до мінерального колоїду, відбувається їх адсорбція на поверхні міцел гідрофобного колоїду. Оскільки білки є гідрофільними колоїдами, то вони передають свою підвищену стійкість до коагуляції і гідрофобному колоїду. Стабілізація золь гідрофобних колоїдів шляхом введення в них невеликої кількості ВМС, називається *колоїдним захистом*.

Обладнання та реактиви. Колби на 50 мл; піпетки градуйовані; бюретка на 25-50 мл; золь гідроксиду заліза; желатин, 0,5% розчин; калію гексаціаноферат (III), 0,001М розчин.

Хід роботи.

1. У колбу відміряють 5 мл золь гідроксиду заліза (гідрофобний колоїд).
2. Додають 1 мл розчину желатину (гідрофільний колоїд).
3. Перемішують.
4. Суміш титрують із бюретки 0,001М розчином гексаціаноферату (III) калію до помутніння розчину (початок коагуляції).
5. Порівнюють об'єми електроліту, які визвали коагуляцію колоїду в досліді 2 і досліді 3, записують висновки.

Висновки: _____

4. Визначення ізоелектричної точки (ІЕТ) білка

Принцип методу. Стан колоїду, коли загальний заряд всіх колоїдних міцел в розчині рівний нулю, називають *ізоелектричним станом*.

Значення рН, за якого білок переходить в ізоелектричний стан, називають *ізоелектричною точкою (ІЕТ)*. В цьому стані білок найменш стійкий і легко коагулює.

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками; піпетки; буферні розчини з рН 4,5; 6,0; 6,5; молоко.

Хід роботи.

1. Пронумерувати три пробірки.
2. Відміряти в них по 2 мл буферних розчинів із різним значенням рН: у першу пробірку з рН 4,5, у другу – з рН 6,0, у третю – з рН 6,5.
3. У кожну пробірку прилити по дві краплі молока.
4. Перемішати.
5. Визначити пробірку з тим значенням рН, де білок випадає в осад (коагулює). Це і буде ІЕТ білка.

Висновки: _____

ТЕМА 5. ПОВЕРХНЕВІ ЯВИЩА ТА АДСОРБЦІЯ

Мета: Закріпити теоретичні знання студентів про явища в гетерогенних системах, їх значення для організму тварин.

Завдання: Освоїти хроматографічний метод розділення суміші речовин.

Запитання для самопідготовки:

1. Поверхневі явища на межі поділу фаз, вільна енергія поверхні (ВЕР) і поверхневий натяг.
2. Методи вимірювання поверхневого натягу.
3. Поверхнево-активні речовини (ПАР) – особливості їх будови, властивості, застосування. Роль ПАР у живому організмі.
4. Вільна енергія поверхні та її практичне використання.
5. Адсорбція – механізм, види. Роль адсорбційних процесів в організмі тварин, використання в побуті та дослідницьких роботах.
6. Хроматографія – принцип методу, призначення, види.
7. В'язкість розчинів. Методи вимірювання в'язкості.

Лабораторна робота:

1. Хроматографія рослинних пігментів

Принцип методу. Розділ рослинних пігментів базується на різному коефіцієнті розподілу, тобто на різному співвідношенні швидкості руху речовини до швидкості руху розчинника або різній адсорбційній спорідненості суміші пігментів до адсорбенту.

Обладнання та реактиви. Фарфорова ступка з пестиком; хімічна склянка на 250 мл; лійка; паперові фільтри; скляні палички; смужка

фільтрувального паперу; скляний пісок; свіже зелене листя; ацетон, 85% водний розчин; крейда (порошок).

Хід роботи.

1. У фарфорову ступку поміщають подрібнене зелене листя (2-3 г), засипають скляним піском і розтирають до однорідної маси.
2. До одержаної маси додають 0,2-0,3 г розтертої крейди і 8-10 мл ацетону.
3. Суміш ретельно перемішують і фільтрують у хімічну склянку.
4. В одержаний профільтрований екстракт занурюють смужку фільтрувального паперу, заздалегідь закріпленого скріпкою на скляній паличці. Папір занурюють в екстракт на 2-3 мм так, щоб він не торкався до дна і стінок склянки.
5. Через 20-30 хвилин спостерігають розподіл різнозбарвлених пігментів зеленого листя по зонам на папері.

Спостереження і висновки: _____

ЧАСТИНА II. ОСНОВИ БІОХІМІЇ

Біохімія – це наука, яка вивчає хімічний склад органів і тканин тварин, структуру і властивості компонентів клітин, обмін речовин та енергії в організмі.

Історично біохімія тісно пов'язана з біоорганічною хімією, що вивчає структуру і властивості речовин, які містять Карбон, і фізіологією, яка вивчає функції живих організмів, а в практичній діяльності спеціалістів досягнення цієї науки широко використовуються у годівлі тварин та їх відтворенні; при з'ясуванні патогенезу та діагностиці різних хвороб, їх лікуванні та профілактиці; в організації гігієни утримання тварин та вивченні патологічної фізіології.

У живому організмі постійно відбуваються витрати енергії, яка поглинається із зовнішнього середовища в складі кормів і перетворюється клітиною в корисну енергію для забезпечення всіх видів діяльності організму. Нормальний перебіг процесів життєдіяльності організму потребує збереження сталого хімічного складу його клітин, органів і організму в цілому (гомеостаз). Ця сталість забезпечується здатністю живих систем відтворювати, ресинтезувати і оновлювати зруйновані речовини завдяки реакціям синтезу.

Історично склались три форми досліджень в біохімії, в відповідності з якими цю науку умовно ділять на три підрозділи.

Статична біохімія – досліджує хімічний склад організму, тобто якісний склад і структуру сполук, а також кількісний їх вміст у біологічних об'єктах.

Динамічна біохімія – досліджує хімічні перетворення речовин і енергії в організмі і значення цих перетворень для процесів життєдіяльності.

Функціональна біохімія – розкриває зв'язки між структурою хімічних сполук і процесами їх перетворення, з одного боку, і функцією тканин і органів – з іншого.

Біохімія розвивається дуже інтенсивно, має пізнавальне і велике практичне значення для тваринництва, рослинництва, генетики, мікробіології, вірусології, медицини та ветеринарної медицини взагалі.

Розділ 2. Білки та нуклеїнові кислоти

ТЕМА 6. БІЛКИ. ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА БІЛКИ ТА АМІНОКИСЛОТИ

Мета: перевірити та закріпити теоретичні знання студентів з розділу «Білки», ознайомити їх з методами якісного визначення білків та амінокислот.

Завдання: навчити студентів проводити якісний аналіз розчинів та біологічних рідин для визначення в них білків і окремих амінокислот.

Запитання для самопідготовки:

1. Білки: визначення, розповсюдження в природі, біологічне значення білків.
2. Різноманітність білків, чим вона обумовлена?
3. Елементарний склад білків. Молекулярна маса білків та методи її визначення.
4. Амінокислотний аналіз білків. Методи його визначення.
5. Як поділяються амінокислоти в залежності від їх будови?
6. Що значить нейтральні, кислі та лужні амінокислоти; циклічні та ациклічні амінокислоти; ароматичні та гетероциклічні амінокислоти? Навести приклади.
7. Будова окремих (замінних і незамінних) амінокислот. Утворення пептидного зв'язку.
8. Рівні структурної організації білків: первинна, вторинна, третинна та четвертинна структури.
9. Типи хімічних зв'язків у білковій молекулі: головні і додаткові.
10. Глобулярні та фібрилярні білки.
11. Кольорові реакції на білки (з нінгідринном, біуретова, ксантопротеїнова, на сульфурвмісні амінокислоти, аргінін, тирозин та інші). Їх практичне значення.

Лабораторні роботи:

Якісні реакції на білки та амінокислоти

1. Реакція з нінгідринном

Принцип методу. При нагріванні розчинів α -амінокислот або речовин, що містять вільні аміногрупи (білки, пептиди), з нінгідринном утворюються комплексні сполуки, що мають блакитне, фіолетове або червоне забарвлення.

Хід роботи.

1. Беруть 3 пробірки.
2. В 1-у вносять 1 мл дистильованої води (контроль).
3. У 2-у – 1 мл розчину амінокислоти (дослід 1).
4. У 3-ю – 1 мл розчину білка (дослід 2).
5. В усі пробірки прилити по 2-3 краплі розчину нінгідрину.
6. Вміст пробірок перемішати і кип'ятити на спиртівці 1-2 хвилини.

Отримані результати оформити у вигляді таблиці:

Пробірки	Спостереження	Висновки
Контроль		
Дослід 1		
Дослід 2		

2. Біуретова реакція

Принцип методу. В лужному розчині речовини, які містять не менше двох пептидних зв'язків (білки, пептиди, біурет), з сульфатом міді утворюють комплексні солі, забарвлені від рожевого до фіолетового (а іноді навіть синього) кольору.

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками; спиртівка; гідроксид натрію, 30% розчин; сульфат міді, 1% розчин; білок, 0,2% розчин; амінокислота, 0,1% розчин; сечовина кристалічна.

Хід роботи.

1. Спочатку одержують біурет, для чого в суху пробірку насипають 0,5-1,0 г сечовини і нагрівають до плавлення останньої та виділення газу – амоніаку (визначають за запахом). Пробірку охолоджують і одержаний біурет розчиняють у 2-3 мл води (перша пробірка).
2. У другу пробірку наливають 2-3 мл розчину білка.
4. У третю – таку ж кількість розчину амінокислоти (гліцин).
5. У кожну з трьох пробірок прилити по 1-2 мл 30% розчину гідроксиду натрію і по 2-3 краплі розчину сульфату міді.
6. Вміст пробірок добре перемішують і порівнюють забарвлення.

Спостереження і висновки: _____

3. Ксантопротеїнова реакція

Принцип методу. При нагріванні з концентрованою нітратною кислотою розчини фенолу, ароматичних амінокислот і білків, до складу яких входять ароматичні амінокислоти, нітруються і їх нітропохідні забарвлюють розчин у жовтий колір. Забарвлення змінюється до помаранчевого після нейтралізації розчином гідроксиду натрію.

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками; спиртівка; білок, 0,2% розчин; фенол, 0,1% розчин; гідроксид натрію, 20% розчин; нітратна кислота, концентрована.

Хід роботи.

1. Беруть 3 пробірки.
2. В 1-у вносять 1-2 мл білка, у 2-у – стільки ж фенолу, і в 3-ю – води.
3. До всіх пробірок приливають по 8-10 крапель нітратної кислоти і підігрівають (обережно) до появи забарвлення.
4. Пробірки охолоджують і по краплях додають надлишок 20% розчину гідроксиду натрію для нейтралізації нітратної кислоти.

Спостереження і висновки: _____

4. Реакція на триптофан

Принцип методу. Триптофан утворює комплекс вишнево-червоного кольору з оксиметилфурфуролом, який виникає при взаємодії сахарози з сульфатною кислотою внаслідок реакції дегідратації.

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками; піпетки; сахароза, 10% розчин; сульфатна кислота, концентрована; білок, 0,2% розчин.

Хід роботи.

1. В одну пробірку наливають 1-2 мл розчину білка.
2. Додають 2-3 краплі розчину сахарози, перемішують.
3. Обережно по стінці приливають 1 мл сульфатної кислоти.
4. Подібним чином проводять реакцію з водою.

Спостереження і висновки: _____

5. Реакція на сульфурвмісні амінокислоти

Принцип методу. Білок при нагріванні з розчином гідроксиду натрію руйнується з утворенням сульфїду натрію, який з оцтовокислим свинцем перетворюється на сульфїд свинцю темно-коричневого кольору.

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками; спиртївка; білок, 0,2% розчин; гідроксид натрію, 20% розчин; ацетат свинцю, 5% розчин.

Хід роботи.

1. В першу пробірку налити 1-2 мл розчину білка і такий же об'єм 20% розчину гідроксиду натрію.
2. У другу пробірку налити 1-2 мл води і 20% розчину гідроксиду натрію (1:1).
3. Пробірки нагріти до кипіння (обережно) і кип'ятити 2-3 хвилини.
4. В обидві пробірки додати декілька крапель (4-5) оцтовокислому свинцю.

Спостереження і висновки: _____

6. Реакція на аргінін

Принцип методу. Білки, до складу яких входить аргінін, дають червоне забарвлення з гіпобромїтом натрію і α -нафтолом в лужному середовищі.

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками; спиртївка; гідроксид натрію, 10% розчин; α -нафтол, 0,04% спиртовий розчин; гіпобромїт натрію; білок, 0,2% розчин.

Хід роботи.

1. В пробірку наливають 2-3 мл розчину білка.
2. Додають 3-5 крапель 10% розчину гідроксиду натрію, 3-5 крапель α -нафтолу та 2-3 краплі гіпобромїту натрію (можна трішки підігріти).

3. Таким же чином для порівняння проводять дослід з водою.

Спостереження і висновки: _____

ТЕМА 7. ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ БІЛКІВ. КЛАСИФІКАЦІЯ БІЛКІВ.

Мета: перевірити знання студентів про фізико-хімічні властивості білків (коагуляція зворотна і незворотна, денатурація, електрокінетичні властивості, класифікація та характеристика простих і складних білків).

Завдання: вивчити методи розділення білків, дію на білки різних факторів, що викликають їх коагуляцію (кислоти, солі, температура, деякі органічні речовини), визначення ізоелектричної точки.

Питання для самопідготовки:

1. Колоїдні властивості розчинів білка: дифузія, онкотичний тиск, броунівський рух, опалесценція та ефект Фарадея – Тіндаля.
2. Електрофорез, коагуляція (оборотна і необоротна) і седиментація.
3. Осадження білків солями лужних і важких металів, мінеральними і органічними кислотами, алкалоїдними реактивами. Дія на білки лугів.
4. Прості білки: визначення, класифікація (альбуміни і глобуліни, гістони і протаміни, глютеліни і проламіни, протеноїди або структурні білки), особливості їх будови, фізико-хімічні властивості, окремі представники.
5. Складні білки: визначення, класифікація (нуклеопротеїни, хромопротеїни, глікопротеїни, фосфопротеїни, ліпопротеїни, металопротеїни).
6. Характеристика кожної з груп. Окремі представники:
 - нуклеопротеїнів (рибо- і дезоксирибонуклеопротеїни),
 - хромопротеїнів (гемоглобін, міоглобін, цитохроми та ін.),
 - глікопротеїнів (фібриноген, муцини),
 - фосфопротеїнів (казеїноген, ововітеллін, іхтулін та ін.),
 - металопротеїнів (трансферин, церулоплазмін та ін.).
7. Поняття про простетичні групи. Будова гема та його похідні.

Лабораторні роботи:

Реакції осадження білків

Принцип методу. Осадження білків буває зворотне і незворотне. Вони оснований на втраті здатності до розчинення в першому випадку без хімічних перетворень молекули, а в другому – за рахунок глибоких змін в їх просторовій структурі (денатурації).

1.Зворотне осадження (висолювання) білків.

В його основі лежить тимчасова втрата гідратної оболонки і позбавлення білкових молекул електричного заряду. Такі зміни з боку білків виникають в концентрованих розчинах нейтральних солей лужних металів, а також при дії спирту. При усуненні факторів коагуляції осад білка легко розчиняється і знову переходить у стан золю.

Принцип методу. Під дією солі чи іншого фактору осадження білок втрачає гідратну (водну) оболонку, молекули якої більш активно зв'язуються іонами солі або спирту. Паралельно з дегідратацією колоїдних міцел вони також стають електронейтральними завдяки адсорбції на них противоіонів електроліту. Втративши фактори захисту, молекули білка об'єднуються між собою і утворюють осад.

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками; розчин яєчного білка; насичений розчин сульфату амонію.

Хід роботи.

1. В пробірку наливають 2-3 мл розчину білку.
2. Додають рівний об'єм розчину сульфату амонію.

За цих умов утворюється осад білка, який при змішуванні з водою знову розчиняється.

2. Виділення окремих фракцій яєчного білка методом висолювання

Принцип методу. В складі яєчного білка є альбуміни (низькомолекулярні) і глобуліни (високомолекулярні) білки. Глобуліни випадають в осад при напівнасиченій концентрації сульфату амонію, а альбуміни – при повній насиченості останнього.

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками; лійка з фільтром; сульфату амонію, насичений розчин; сульфат амонію, порошок.

Хід роботи.

1. У пробірку наливають 2-3 мл розчину яєчного білку.
2. Додають 2-3 мл насиченого розчину сульфату амонію. Утворюється осад.
3. Вміст пробірки відфільтровують у чисту пробірку.
4. До прозорого фільтрату додають кристалічний сульфат амонію до повної насиченості фільтрату. *За цих умов утворюється осад альбумінів.* Про це свідчить утворення в пробірці білої каламуті. Таким чином, при напівнасиченості розчину білка сульфатом амонію в осад випадають білки з більш великими розмірами молекул – глобуліни, а при створенні насиченого розчину в осад випадають менші за розмірами і масою білки – альбуміни.

Денатурація білків

Під дією зовнішніх факторів може відбуватися порушення структурної організації білкової молекули при збереженні первинної структури. При

цьому білок втрачає свої нативні фізико-хімічні та біологічні властивості. Цей процес називається денатурацією. В основі денатурації лежить руйнування зв'язків, які стабілізують вищі структури білків (четвертинна, третинна, вторинна). Більшість білків денатурують при нагріванні їх розчинів вище 50-60°C, хоча відомі термофільні бактерії, білки яких витримують температуру до 90°C. До хімічних чинників, що спричиняють денатурацію, належать кислоти, луги, органічні розчинники (спирт, ацетон), детергенти, алкалоїди, солі важких металів (олова, ртуті, міді, кадмію та ін.). Найкраще білки денатурують у дуже кислих (рН≈1,0) середовищах.

Механізм денатурації білка при підвищеній температурі пов'язаний з перебудовою структури білкової молекули, в результаті чого зменшується її розчинність. Присутність солей і рН середовища відіграють важливу роль у випаданні в осад денатурованого при нагріванні білка. Найбільш повне і швидке осадження відбувається в ізоелектричній точці білка (pI), тобто при такому значенні рН середовища, при якому колоїдні частинки білка є найменш стійкими і сумарний заряд молекули дорівнює нулю. Білки, які проявляють кислотні властивості (тобто мають високий вміст глутамінової та аспарагінової кислот), осаджуються у слабокислому середовищі, а білки, які проявляють лужні властивості (мають високий вміст аргініну, лізину та гістидину), – у слаболужному. У сильнокислих і сильнолужних розчинах денатурований при нагріванні білок не випадає в осад, оскільки білкові молекули перезаряджаються (або відбувається посилення наявного заряду) і несуть в першому випадку позитивний, у другому – негативний заряд.

3. Теплова денатурація білків

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками; спиртівка; білок, 0,2% розчин; молоко; скляні трубочки.

Хід роботи.

1. В 1-у пробірку наливають 2 мл яєчного білка, в 2-у – 2 мл молока.
2. Обидві пробірки нагрівають до кипіння.

Спостереження і висновки: _____

4. Денатурація білків яйця і молока в ізоелектричному стані

ІЕТ яєчних білків дорівнює 4,6; ІЕТ казеїногена молока – 4,7; їх ізоелектричні точки знаходяться в слабокислій зоні рН.

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками; спиртівка; білок, 0,2% розчин; молоко; оцтова кислота, 1% розчин; скляні трубочки.

Хід роботи.

1. В 1-у пробірку наливають 2 мл яєчного білка, в 2-у – 2 мл молока.

2. В обидві пробірки додають по 1 краплі 1%-го розчину оцтової кислоти і нагрівають.
3. Спостерігають появу осаду білка і порівнюють швидкість осадження білків у цьому досліді зі швидкістю цього ж процесу в попередньому.

Висновки: _____

5. Денатурація білків при дії солей важких металів

Катіони солей важких металів з білками утворюють нерозчинні солі, які і випадають в осад.

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками; білок, 0,2% розчин; сульфат міді, 1% розчин; ацетат свинцю, 5% розчин.

Хід роботи.

1. У дві пробірки наливають по 2 мл розчину яєчного білка.
2. В 1-у пробірку добавляють 1-2 краплі розчину ацетату свинцю.
3. В 2-у – 1-2 краплі розчину сульфату міді.
4. Спостерігається утворення осаду білка, який не розчиняється в надлишку води.

Висновки: _____

6. Денатурація білків при дії мінеральних та органічних кислот

Мінеральні та органічні кислоти викликають зміни просторової структури білків, що супроводжується незворотною втратою їх нативних властивостей, в тому числі і здатності до розчинення у воді.

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками; концентровані нітратна, сульфатна, трихлороцтова та сульфосаліцилова кислоти; білок, 0,2% розчин.

А. Хід роботи.

1. У дві пробірки наливають по 2 мл розчину яєчного білка.
2. В 1-у пробірку додають 1 краплю сульфатної кислоти, в 2-у – одну краплю нітратної кислоти.
3. Спостерігають утворення осаду.

Висновки: _____

Б. Хід роботи.

1. У дві пробірки наливають по 2 мл розчину яєчного білка.
2. В 1-у пробірку додають 1-2 краплі розчину трихлороцтової кислоти.
3. В 2-у – 1-2 краплі розчину сульфосаліцилової кислоти.

4. Спостерігають утворення осаду.

Висновки: _____

7. Денатурація білків при дії органічних сполук

Принцип методу. Танін, фенол та формальдегід, утворюючи з білками нерозчинні у воді комплекси, денатурують білки. Ця властивість таніну була використана в процесі обробки шкіри тварин (дублення) у шкіряній промисловості. Фенол застосовується як дезінфікуючий засіб. Формальдегід використовується як дезінфікуючий, консервуючий та дубильний засіб для анатомічних препаратів, а також для виробництва уротропіну (консервант у харчовій промисловості).

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками; розчини таніну, фенолу та формальдегіду (40%); розчин оцтової кислоти, 1%; білок, 0,2% розчин.

Хід роботи.

1. В три пробірки наливають по 2 мл розчину яєчного білка.
2. У 1-у пробірку додають рівний об'єм насиченого розчину фенолу.
3. В 2-у пробірку – рівний об'єм формаліну.
4. У 3-ю – 3-4 краплі розчину таніну (підкислюють 1%-м розчином оцтової кислоти).
5. Пробірки з фенолом і формаліном залишають на 15-20 хвилин.
6. Спостерігають денатурацію білка.

Висновки: _____

ТЕМА 8. НУКЛЕЇНОВІ КИСЛОТИ (теоретичне заняття)

Мета: перевірити і закріпити знання студентів про будову і біологічну роль нуклеїнових кислот.

Запитання для самопідготовки:

1. Визначення та біологічна роль нуклеїнових кислот.
2. Структурні компоненти нуклеїнових кислот: азотисті основи, пентози, фосфатна кислота.
3. Нуклеозиди і нуклеотиди (склад, будова, назви).
4. Види нуклеїнових кислот – РНК і ДНК. Їх відмінності.
5. ДНК: будова, біологічна роль. Поняття комплементарності. Комплементарні ланцюги ДНК. Правила Чаргаффа.

6. Особливості будови РНК. Різновиди РНК (транспортна, матрична, рибосомальна). Їх біологічна роль.
7. Азотисті основи, що входять до складу РНК. Вуглеводний компонент РНК.
8. Азотисті основи, що входять до складу ДНК. Вуглеводний компонент ДНК.
9. Поняття про кодони (триплетти) і антикодони.
10. Вільні нуклеотиди та макроергічні сполуки (АТФ, ГТФ, УТФ, ЦТФ): будова, біологічна роль.
11. Написати тринуклеотид, до складу якого входить аденін, цитозин, урацил.
12. Написати фрагмент (з трьох нуклеотидів) однієї з полінуклеотидних ланцюгів ДНК. Як з'єднуються комплементарні азотисті основи в подвійній спіралі ДНК? Показати (формулами) утворення водневих зв'язків між комплементарними нуклеотидами.
13. Які азотисті основи називаються мінорними?

***Розділ 3. Біологічно активні речовини.
Вітаміни. Ферменти. Гормони.***

ТЕМА 9. ЖИРОРОЗЧИННІ ВІТАМІНИ

Мета: закріпити теоретичні знання студентів про жиророзчинні вітаміни: А, D, Е, К, F, Q.

Завдання: навчити студентів експрес-методам кількісного визначення каротину в сироватці крові та жовтку яйця.

Питання для самопідготовки:

1. Вітаміни: визначення, розповсюдження в природі (джерела для людей і тварин).
2. Зв'язок між вітамінами і ферментами. Номенклатура вітамінів.
3. Авітамінози, гіповітамінози, гіпервітамінози. Причини їх виникнення.
4. Жиророзчинні вітаміни (А, D, Е, К, F, Q) – будова, розповсюдження, провітаміни.
4. Вітамін А – поширення в природі, синоніми назви, провітаміни (каротиноїди), хімічна будова, джерела для тварин, засвоєння і перетворення в активну форму. Роль в обміні речовин. Основні ознаки а- та гіповітамінозу.
5. Вітамін D – поширення в природі, провітаміни і шляхи їх перетворення на активний стан. Роль в обміні речовин. Ознаки авітамінозу.

6. Вітаміни Е, К – хімічна будова, поширення в природі, шляхи забезпечення тварин. Роль в обміні речовин. Головні ознаки гіповітамінозів.

Каротиноїди – провітаміни вітаміну А. Кількість каротиноїдів в сироватці крові тварин на практиці використовується як показник забезпеченості організму вітаміном А.

Норма каротиноїдів у сироватці крові (мг%):

ВРХ – 0,3 (зима, весна) – 3,0 (літо, осінь); *Кінь* – 0,03 – 0,3 (відповідно).

Рівень концентрації каротиноїдів у жовтку яєць визначає їх придатність до інкубації, оскільки цей показник є ознакою забезпеченості майбутнього ембріона вітаміном А. Придатними для інкубації вважаються яйця курей, у жовтку яких каротиноїдів міститься 15-30 мкг/г.

Лабораторні роботи:

1. Визначення вмісту каротину в жовтку курячих яєць і сироватці крові

Принцип методу. Концентрація каротину визначається в екстракті петролейного ефіру з яєчного жовтка (сироватки крові) на основі вимірювання світлопоглинання на фотоелектроколориметрі (ФЕК) та послідуєчого розрахунку за калібрувальним графіком.

Обладнання та реактиви. Пробірки центрифужні, градуйовані з пробками; бюретки; піпетки на 2 мл з грушею; вимірювальні циліндри (5-10 мл); центрифуга; ФЕК; сироватка крові; яєчний жовток; спирт етиловий; петролейний ефір; ізотонічний розчин хлориду натрію.

Хід роботи.

1. У 1-у пробірку поміщають 1 г жовтка і 1 мл фізіологічного розчину хлориду натрію.
2. Перемішують скляною паличкою до однорідної маси (за необхідності нагрівають на водяній бані при 38-40°C).
3. У 2-у пробірку наливають 2 мл сироватки крові.
4. В обидві пробірки додають по 2 мл спирту етилового.
5. Закривають пробками і енергійно перемішують вміст протягом 2 хвилин, щоб викликати денатурацію білків і звільнити від них каротин.
6. Вільний каротин із пробірки екстрагують петролейним ефіром. Для цього в обидві пробірки додають (із бюретки) по 4 мл петролейного ефіру, пробірки щільно закривають пробками і енергійно струшують 5-10 хв. Вручну або в шутель апараті.
7. Для розділення рідини в пробірках їх центрифугують при 2,0-3,0 тис. об/хв протягом 5 хвилин.
8. По закінченні центрифугування верхній прозорий забарвлений у жовтий колір шар рідини обережно (!) відбирають сухою піпеткою з грушею і переносять у вимірювальний циліндр.

9. Об'єм екстракту в циліндрі доповнюють петролейним ефіром до 4 мл і перемішують.

10. Після цього визначають оптичну густину отриманого екстракту каротину на ФЕК у кюветах з робочою довжиною 5 мм (синій світлофільтр) проти петролейного ефіру.

Розрахунок кількості каротину проводять на основі одержаних на фотоелектрокалориметрі даних і заздалегідь підготовленому калібрувальному графіку.

Вміст каротину виражають в мкг/г жовткової маси яйця або мг% в сироватці крові.

Розрахунки та висновки: _____

ТЕМА 10. ВОДОРОЗЧИННІ ВІТАМІНИ

Мета: вивчити окремі водорозчинні вітаміни, розповсюдження їх у природі, хімічну будову, участь їх в обміні речовин, основні ознаки нестачі у тварин.

Завдання: студенти повинні опанувати метод кількісного визначення вітаміну С в кормах і молоці, навчитися проводити якісні реакції для виявлення водорозчинних вітамінів у природних об'єктах (молоко, сироватка крові, окремі корми).

Запитання для самопідготовки:

1. Розповсюдження в природі вітамінів: В₁, В₂, В₃, В₅, В₆, фолієвої кислоти, В₁₂, С, біотину і синоніми їх назв.
2. Хімічна будова вітамінів В₁, В₂, В₃, В₅, В₆, С.
3. Зв'язок водорозчинних вітамінів з ферментами.
4. В утворенні яких коферментів беруть участь вітаміни групи В?
5. Наведіть формули коферментів ТПФ, ФМН, ФАД, NS-CoA, НАД, НАДФ, ПФ.
6. На які види обміну речовин впливають вітаміни В₁, В₂, В₃, В₄, В₅, В₆, В₁₂, С, фолієва кислота, біотин?
7. Головні ознаки нестачі в організмі того чи іншого з названих вітамінів.

Лабораторні роботи:

1. Якісна реакція на вітамін В₁

Принцип методу. Розчини, що містять у своєму складі вітамін В₁, з діазореактивом у лужному середовищі забарвлюються в жовто-рожевий колір.

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками; вітамін В₁, 0,001% водний розчин; натрію гідроксид, 5% розчин; діазореактив (приготований перед проведенням досліду).

Хід роботи.

1. У пробірці змішують 4 мл розчину гідроксиду натрію і 6 мл діазореактиву.
2. Суміш розділяють рівними об'ємами в три пробірки і добавляють: в першу пробірку – 1-2 мл води; в другу – 1-2 мл розчину вітаміну В₁; в третю – 1-2 мл молока. Порівняйте кінцевий результат.

Яке забарвлення характерне для позитивної реакції на В₁?

Спостереження та висновки: _____

2. Якісна реакція на вітамін С

Принцип методу. В присутності вітаміну С гексаціаноферат (III) калію перетворюється на гексаціаноферат (II) калію, а останній з хлоридом заліза (III) здатний до утворення берлінської блакиті.

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками; гексаціаноферат (III) калію, 1% розчин; хлорид заліза, 1% розчин; молоко свіже; корм свіжий.

Хід роботи.

1. Готують водну витяжку з корму. Для цього 2-5 г корму розтирають у ступці, заливають водою у співвідношенні 1:10. Одержану суміш переносять у циліндр, доводять об'єм до 100 мл і фільтрують.
2. Беруть чотири пробірки: в першу наливають 2-3 мл розчину вітаміну С; в другу – 2-3 мл води; в третю – 2-3 мл молока і в четверту – 2-3 мл витяжки корму.
3. В усі пробірки приливають 5-6 крапель гексаціаноферату (III) калію і таку ж кількість хлориду заліза (III).
4. Спостерігають за проявом реакції.

Яка ознака характерна для позитивної реакції на вітамін С?

Спостереження та висновки: _____

3. Кількісне визначення вітаміну С у молоці і кормах

Принцип методу. При титруванні розчину, в якому міститься вітамін С, розчином 2,6-дихлорфеноліндофенолу останній знебарвлюється. Коли весь вітамін С буде відтитрований, то наступна крапля розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу забарвлює титруємий розчин у рожевий колір (в кислому середовищі). Кількість витраченого розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу буде пропорційна вмісту в досліджуваному розчині вітаміну С.

Обладнання та реактиви. Вимірювальний циліндр на 100 мл; лійка; ступка; паперовий фільтр; колби конусні; мікробюретка, 2 мл; піпетки градуйовані; ваги; корм (силос, трава, капуста та ін.); молоко свіже; хлоридна кислота, 2% розчин; 2,6-дихлорфеноліндофенол, 0,001 н розчин.

Хід роботи.

1. Наважку корму (5-10 г) ретельно подрібнюють ножицями і розтирають у фарфоровій ступці, заливають дистильованою водою (1:10), настоюють 10-15 хвилин, переносять у вимірювальний циліндр і доводять водою до 100 мл, фільтрують у чисту посудину.
2. У конусну колбу на 50-100 мл переносять 5 мл фільтрату (витяжки вітаміну С з корму).
3. В іншу таку ж колбу відміряють 5 мл розбавленого в 4 рази (1:3) молока.
4. В третю колбу – 20 мл дистильованої води (контроль).
5. В усі три колби приливають по 1 мл хлоридної кислоти, а в першу і другу – ще по 15 мл води.
6. Підготовлені таким чином проби титрують із мікробюретки 0,001 н розчином 2,6-дихлорфеноліндофенолу (обережно, краплями!) до появи рожевого забарвлення, яке не зникає протягом 30 секунд.

Розрахунок ведеться за формулами:

$$1. X = \frac{C \times (A - B) \times K \times 0,088 \times 100}{5}, \text{ де}$$

X – вміст вітаміну С в молоці, мг%;

K – коефіцієнт перерахунку на титр;

A – об'єм 2,6-дихлорфеноліндофенолу (мл), який пішов на титрування дослідного розчину;

B – об'єм 2,6-дихлорфеноліндофенолу (мл), який пішов на титрування води;

C – ступінь розведення молока (4 рази);

0,088 – кількість вітаміну С, яка еквівалентна 1 мл розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу, мг;

100 – коефіцієнт для перерахування на 100 мл проби;

5 – кількість розведеного молока, взятого для титрування.

$$2. X = \frac{K \times V \times (A - B) \times 0,088 \times 100}{5 \times m}, \text{ де}$$

X – вміст вітаміну С в кормі, мг%;

V – загальний об'єм витяжки з корму, мл;

A – кількість 2,6-дихлорфеноліндофенолу (мл), що пішла на титрування дослідної проби, мл;

B – кількість 2,6-дихлорфеноліндофенолу (мл), що пішла на титрування контрольного розчину, мл;

0,088 – кількість вітаміну С, яка еквівалентна 1 мл розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу, мг;

100 – коефіцієнт для перерахунку у мг%;

5 – об'єм витяжки з корму, який брали для титрування, мл;
 m – маса наважки корму, взята для одержання витяжки, г.

Розрахунки та висновки:

а) _____

б) _____

ТЕМА 11. ЗАГАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ФЕРМЕНТІВ

Мета: перевірити теоретичні знання студентів з розділу «Ферменти». Ознайомити студентів з методами, які дозволяють визначити активність деяких ферментів та вивчити їх загальні властивості.

Завдання: навчити студентів визначати активність ферментів і вплив на неї умов зовнішнього середовища.

Запитання для самопідготовки:

1. Ферменти: визначення, розповсюдження, хімічна природа, відмінність від мінеральних каталізаторів.
2. В чому полягає вплив ферментів на субстрати?
3. Теорії каталітичної дії ферментів (адсорбційна, утворення фермент-субстратних комплексів).
4. Будова ферментів – апоферменти, коферменти, холоферменти.
5. Назвіть відомі вам коферменти.
6. Привести структурні формули ТПФ, ФАД, N^5-CoA , НАД, ПФ. Дати їм повні назви.
7. Загальні властивості ферментів – термолабільність, чутливість до зміни рН, специфічність дії та її види.
8. Інгібітори та активатори ферментів.
9. Каталітичні центри ферментів, як вони утворюються?
10. На якому рівні структурної організації ферментів, як білків, проявляється їх каталітична активність? Дати пояснення.
11. Чим викликана втрата активності ферментів при зміні навколишньої температури і рН середовища?
12. Алостеричні центри та їх призначення.
13. Ізоферменти (дати визначення), їх біологічна роль.
14. Номенклатура ферментів.

15. Принцип класифікації ферментів. Основні класи ферментів.
15. Оксидоредуктази (визначення), окремі підкласи (дегідрогенази, цитохроми, допоміжні та додаткові оксидоредуктази), навести приклади реакцій, які вони каталізують.
16. Трансферази (визначення), навести приклади реакцій, які вони каталізують.
17. Гідролази (визначення), окремі підкласи (пептидази, глікозидази, естерази), навести приклади реакцій, які вони каталізують.
18. Ліази – визначення, навести приклади реакцій, які вони каталізують.
19. Ізомерази – визначення, навести приклади реакцій, які вони каталізують.
20. Лігази – визначення, навести приклади реакцій, які вони каталізують.
21. Роль ферментів у ветеринарії.

Лабораторні роботи:

1. Вплив температури на активність ферментів (термолабільність амілази слини)

Принцип методу. В оптимальних умовах амілаза слини гідролізує крохмаль до мальтози, і він не виявляється в розчині реакцією з йодом. Коли температуру середовища понизити, активність амілази гальмується і вона або зовсім не гідролізує крохмаль, або гідролізує його тільки до декстринів, що дають з йодом фіолетове чи буро-червоне забарвлення, коли ж фермент зовсім не діє на крохмаль, то останній залишається незмінним, на що вказує поява синього забарвлення з йодом.

Обладнання та реактиви. Хімічна склянка, 50 мл; піпетки градуйовані; водяна баня на 37°C; штатив з пробірками; склянка з льодом; крохмаль, 1% розчин; реактив Люголя; амілаза (свіжозібрана слина, в розведенні 1:10-20).

Хід роботи.

1. Пронумерувати чотири пробірки.
2. В усі пробірки наливають по 1 мл розбавленої слини, що містить активну амілазу.
3. Рідину в пробірці №2 кип'ятять 1-2 хвилини, прогріваючи весь час пробірку знизу доверху.
4. Вміст 4-ої пробірки охолоджують у склянці з льодом.
5. В усі пробірки приливають по 3-4 мл розчину крохмалю.
6. Перемішують і інкубують при різних температурах:
 - 1-у та 2-у пробірки – на водяній бані при 37°C;
 - 3-ю пробірку – залишають в штативі при кімнатній температурі;
 - 4-у пробірку – поміщають у склянку з льодом (0°C).
7. Через 5-6 хвилин всі пробірки переносять в штатив і приливають до них по 1-2 краплі реактиву Люголя, перемішують вміст кожної пробірки і спостерігають забарвлення кожної із них.

Спостереження, результати дослідів і висновки записують у таблицю.

№	Температура інкубації	Забарвлення з йодом	Продукти гідролізу
1	37 °C		
2	100 °C		
3	20 °C		
4	0 °C		

Спостереження та висновки: _____

2. Вплив рН середовища на активність ферментів (амілази)

Принцип методу. При оптимальному для дії амілази значенні рН середовища крохмаль повністю гідролізується і не виявляється в реакції з йодом.

Обладнання та реактиви. Буферні розчини з рН 5,0; 6,8; 8,0. Решта – як і в попередньому досліді.

Хід роботи.

1. В три пронумеровані пробірки наливають по 2-3 мл буферних розчинів з різним значенням рН (відповідно до таблиці).
2. У кожну добавляють по 1 мл розведеної слини і 4-5 мл розчину крохмалю.
3. Перемішують та інкубують протягом 5-6 хвилин на водяній бані при температурі 37°C.
4. У кожну пробірку приливають по 1-2 краплі реактиву Люголя.

Результати досліджень записують у таблицю:

№ пробірки	рН середовища	Забарвлення з йодом	Продукти гідролізу
1.	5,0		
2.	6,8		
3.	8,0		

Спостереження та висновки: _____

3. Специфічність дії ферментів

Ферменти мають високу специфічність дії і цим забезпечують перебіг з великою швидкістю лише певних реакцій з величезного різноманіття можливих перетворень в мікропросторі клітин і цілісному організмі, регулюючи тим самим інтенсивність обміну речовин. Розрізняють ферменти з *відносною (груповою) та абсолютною специфічністю*. Доведено наявність *стереоспецифічності*, обумовленої існуванням оптично ізомерних L- і D-форм або геометричних (цис- і транс-) ізомерів хімічних речовин.

Принцип методу. У випадку, коли фермент діє на субстрат (крохмаль і сахарозу), то в реакційній суміші виявляються кінцеві продукти гідролізу, тоді як сам субстрат не виявляється.

Обладнання та реактиви. Сахароза, 2% розчин; реактив Фелінга; водяна баня; суспензія дріжджів (1:10), що містить в собі сахаразу. Решта – як в досліді 1.

3.1. Дія амілази і сахарози на крохмаль

Хід роботи.

1. Беруть 2 пробірки, наливають в них по 4-5 мл крохмалю.
2. У першу пробірку приливають 1 мл розведеної слини, а в другу – 1 мл суспензії дріжджів.
3. Вміст пробірок перемішують і інкубують у водяній бані при температурі 37°C протягом 8-10 хвилин.
4. По закінченні інкубації в обидві пробірки додають по 1-2 краплі розчину Люголя. *Спостереження і висновки записують у таблицю.*

3.2. Дія амілази і сахарози на сахарозу

Хід роботи.

1. В дві пробірки наливають по 2 мл сахарози.
2. В одну з них наливають 1 мл розбавленої слини, а в другу – 1 мл суспензії дріжджів (сахараза).
3. Перемішують, інкубують 8-10 хвилин на водяній бані при температурі 37°C.
4. У кожену пробірку наливають 3-4 мл реактиву Фелінга.
5. Нагрівають до кипіння.

Спостереження записують у таблицю:

№	Фермент	Субстрат	Забарвлення	Продукти гідролізу
1.	Амілаза	Крохмаль		
2.	Сахараза	Крохмаль		
3.	Амілаза	Сахароза		
4.	Сахараза	Сахароза		

Загальний висновок:

4. Вплив інгібіторів і активаторів на активність амілази слини

Принцип методу. Відомо, що одні речовини збільшують активність ферменту (активатори), а інші – гальмують або подавляють її зовсім (інгібітори).

Про активність амілази говорять на підставі повного чи часткового гідролізу крохмалю за рівний проміжок часу (по реакції з реактивом Люголя).

Обладнання та реактиви. Сульфат міді, 1% розчин; хлорид натрію, 1% розчин; решта як в досліді 1.

Хід роботи.

1. У три пробірки наливають по 1 мл розбавленої слини.
2. У першу пробірку доливають 1 мл води, у другу – 1 мл хлориду натрію, у третю – 1 мл сульфату міді.
3. В усі три пробірки додають по 3-4 мл крохмалю.
4. Перемішують, інкубують на водяній бані при температурі 37°C протягом 5-6 хвилин.
5. У кожен пробірку додають по 1-2 краплі реактиву Люголя.

Спостереження та висновки: _____

ТЕМА 12. БІОЛОГІЧНЕ ОКИСНЕННЯ. ОКСИДОРЕДУКТАЗИ

Мета: закріпити знання студентів про систему ферментів, які каталізують реакції, пов'язані з обміном енергії; механізми тканинного дихання і пов'язаного з ним забезпечення тканин енергією.

Завдання: вивчити ферменти дихального ланцюга; засвоїти методи якісного визначення оксидоредуктаз у біологічних об'єктах.

Запитання для самопідготовки:

1. Поняття про процеси біологічного окиснення.
2. Оксидоредуктази: визначення поняття, хімічна структура.
3. Основні підкласи оксидоредуктаз: дегідрогенази (піридинзалежні і флавінзалежні); цитохроми, допоміжні і додаткові – особливості будови, біологічна роль.

4. Коферменти дегідрогеназ (НАД, НАДФ, ФМН, ФАД), будова, механізм участі в реакціях окиснення. Написати структурні формули окиснених (НАД, ФАД) і відновлених (НАДН+H⁺ і ФАДН₂) коферментів.
5. Простетичні групи цитохромів, різновиди цитохромів.
6. Дихальний ланцюг або ланцюг переносу електронів (ЛПЕ) – визначення, склад, призначення. В яких морфологічних структурах локалізований дихальний ланцюг?
7. Завдяки чому в дихальному ланцюгу відбувається послідовна передача електронів від однієї ланки до іншої?
8. Що слід розуміти під терміном «спряження окиснення з фосфорилуванням»? Які речовини при цьому утворюються?
9. Чому в одному випадку в дихальному ланцюгу утворюється дві молекули АТФ, а в іншому – три?
10. Написати формулу АТФ. Скільки кДж енергії може звільнитися при її розпаді?
11. Які фактори викликають роз'єднання окиснення і фосфорилування?
12. Роль коферменту Q (убіхінон) в реакціях тканинного дихання.

Лабораторні роботи:

1. Виявлення сукцинатдегідрогенази м'язів

Принцип методу. Сукцинатдегідрогеназа окиснює янтарну кислоту і в анаеробних умовах передає атоми Гідрогену на метиленову синь, яку відновлює в безколірну форму. Якщо сукцинатдегідрогеназа відсутня, то знебарвлення метиленової сині не відбувається.

Обладнання та реактиви. Ступка з пестиком; хімічна склянка на 100-200 мл; штатив з пробірками; скляний пісок; водяна баня; піпетки; свіжа м'язова тканина; янтарна кислота, 3% розчин, нейтральний; метиленова синь, 0,001% розчин; ТХУ, 20% розчин; соняшникова олія.

Хід роботи.

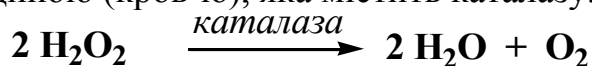
1. Попередньо подрібнені ножицями м'язи або печінку (2-3 г) розтирають у ступці зі скляним піском до однорідної маси при поступовому додаванні розчину янтарної кислоти (1:50).
2. В дві пробірки наливають по 2-3 мл одержаного гомогенату.
3. В першу пробірку (контроль) додають 2 мл ТХО (денатурує та інактивує фермент), у другу – таку ж кількість води (дослід).
4. В обидві пробірки додають 0,5-1,0 мл метиленової сині, перемішують і додають по 2-3 краплі олії (для створення анаеробних умов).
5. Інкують на водяній бані при 38-40°C протягом 10 хвилин.
6. Після закінчення інкубації порівнюють зміни в дослідній і контрольній пробірках. Після цього енергійно струшують вміст другої пробірки.

Що при цьому спостерігається? Чому?

Спостереження та висновки: _____

2. Якісна реакція на каталазу крові

Принцип методу. Каталаза розщеплює пероксид водню, про що можна свідчить бурхливе виділення молекулярного кисню при змішуванні пероксиду водню з рідиною (кров'ю), яка містить каталазу.



Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками; піпетка; свіжа кров; пероксид водню, 3% розчин; ТХО, 20% розчин.

Хід роботи.

1. У дві пробірки налити по 1-2 мл води і по 2-3 краплі крові.
2. В першу пробірку (контроль) додати 1-2 мл трихлороцтової кислоти (ТХО) для інактивації ферменту.
3. В обидві пробірки додати по 3-5 крапель пероксиду водню.

Дати пояснення явищам, які спостерігали.

Спостереження та висновки: _____

ТЕМА 13. ГОРМОНИ. ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА ГОРМОНИ

Мета: закріпити теоретичні знання студентів з теми «Гормони». Ознайомити студентів з деякими якісними реакціями на гормони.

Завдання: студенти повинні оволодіти методами якісного визначення інсуліну, адреналіну та фолікуліну.

Запитання для самопідготовки:

1. Дати визначення терміну «Гормони». Місце їх утворення.
2. Загальні уявлення про вплив гормонів на обмін речовин.
3. Нейрогормональна система організму.
4. Молекулярні механізми дії гормонів.
5. Клітина-мішень і орган-мішень. Поняття про рецептори.
6. Гіпофункція і гіперфункція ендокринної залози. Характеристика цих явищ.
7. Класифікація гормонів за хімічною природою.
8. Механізм дії гормонів на обмін речовин в організмі через вторинних посередників.

9. Механізм дії гормонів стероїдної природи.
10. Рилізінг-фактори гіпоталамусу. Хімічна природа, механізм дії.
11. Гормони передньої долі гіпофізу (аденогіпофізу). Тропні гормони. Хімічна природа, механізм дії, їх органи-мішені.
12. Гормони середньої долі гіпофізу.
13. Гормони задньої долі гіпофізу (нейрогіпофізу) – вазопресин і окситоцин. Хімічна природа, механізм дії, прояви гіпо- та гіперфункції.
14. Гормони щитоподібної залози (тиреоїдні). Хімічна природа, механізм дії, орган-мішень. Вплив на обмін речовин. Прояви гіпо- та гіперфункції залози.
15. Гормон кальцитонін. Хімічна природа, механізм дії, орган-мішень. Вплив на обмін речовин. Прояви гіпо- та гіперфункції.
16. Гормон паращитоподібної залози. Хімічна природа, механізм дії, орган-мішень. Вплив на обмін речовин. Прояви гіпо- та гіперфункції.
17. Гормони підшлункової залози. Хімічна природа, механізм дії, орган-мішень. Вплив на обмін речовин. Прояви гіпо- та гіперфункції.
18. Гормони коркової зони надниркових залоз. Хімічна природа, механізм дії, орган-мішень. Вплив на обмін речовин. Прояви гіпо- та гіперфункції.
19. Гормони мозкового шару надниркових залоз. Хімічна природа, механізм дії, орган-мішень. Вплив на обмін речовин. Прояви гіпо- та гіперфункції.
20. Гормони статевих залоз. Хімічна природа, механізм дії, орган-мішень. Вплив на обмін речовин. Прояви гіпо- та гіперфункції.
21. Жіночі статеві гормони. Хімічна природа, механізм дії, орган-мішень. Вплив на обмін речовин. Прояви гіпо- та гіперфункції.
22. Чоловічі статеві гормони. Хімічна природа, механізм дії, орган-мішень. Вплив на обмін речовин. Прояви гіпо- та гіперфункції.
23. Тканинні гормони – калікреїни, ангіотензин, простагландини, гастрин, секретин, ентерогастрин.

Лабораторні роботи:

1. Якісні реакції на інсулін

Інсулін є гормоном білкової природи, в молекулі якого поліпептидні ланцюги з'єднані дисульфідними зв'язками. Інсулін дає позитивну біуретову реакцію та реакцію на сірковмісні амінокислоти.

1.1. Біуретова реакція

Принцип методу. В лужному розчині при додаванні сульфату міді поліпептиди утворюють комплексні солі, забарвлені у фіолетовий колір.

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками; розчин інсуліну; спиртівка; гідроксид натрію, 30% розчин; сульфат міді, 1% розчин.

Хід роботи.

1. До 1-2 мл розчину інсуліну додають рівний об'єм розчину гідроксиду натрію.

2. Додають 1-2 краплі розчину сульфату міді.

Спостереження та висновки: _____

1.2. Реакція на сульфурвмісні амінокислоти

Принцип методу. При нагріванні з лугом від сульфурвмісних амінокислот відщеплюється Сульфур у вигляді гідроген сульфід (H_2S), який виявляють в реакції з ацетатом свинцю (з'являється коричневе забарвлення).

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками; спиртівка; розчин інсуліну; гідроксид натрію, 20% розчин; ацетат свинцю, 5% розчин.

Хід роботи.

1. До 1-2 мл розчину інсуліну додають рівний об'єм розчину гідроксиду натрію.
2. Вміст пробірки кип'ятять 1-2 хвилини.
3. Додають 2-3 краплі розчину оцтовокислого свинцю.

Спостереження та висновки: _____

2. Реакція адреналіну з йодом

Адреналін здатний легко окиснюватися з утворенням ряду біологічно активних сполук.

Принцип методу. При нагріванні розчину адреналіну з йодом утворюються продукти окиснення адреналіну, які забарвлені в червоний колір.

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками; спиртівка; розчин адреналіну; реактив Люголя.

Хід роботи.

1. В першу пробірку наливають 1-2 мл води.
2. У другу – 1-2 мл адреналіну.
3. В обидві пробірки додають по 2 краплі розчину йоду.
4. Пробірки злегка підігрівають.

Спостереження та висновки: _____

3. Реакція фолікуліну з реактивом Фоліна

Принцип методу. За допомогою реактиву Фоліна підтверджують наявність фенольної групи в молекулі фолікуліну (синє забарвлення).

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками; спиртівка; розчин фолікуліну; реактив Фоліна; розчин гідроксиду натрію.

Хід роботи.

1. У пробірку наливають 1-2 мл фолікуліну.
2. Додають рівний об'єм розчину гідроксиду натрію.
3. Вносять кілька крапель реактиву Фоліна.

Спостереження та висновки: _____

4. Реакція фолікуліну з сульфатною кислотою

Принцип методу. При взаємодії фолікуліну з сульфатною кислотою утворюється складний ефір, забарвлений у жовтий колір.

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками; піпетки; водяна баня; фолікулін, спиртовий розчин; сульфатна кислота концентрована.

Хід роботи.

1. У пробірку наливають 1-2 мл спиртового розчину фолікуліну.
2. Обережно додають 5-6 крапель сульфатної кислоти.
3. Нагрівають на водяній бані до появи жовтого забарвлення.

Спостереження та висновки: _____

Розділ 4. Хімія та обмін вуглеводів

ТЕМА 14. ХІМІЯ ВУГЛЕВОДІВ

Мета: перевірити теоретичні знання студентів з теми «Вуглеводи», ознайомитися з методами, які забезпечують визначення наявності вуглеводів у розчинах.

Завдання: навчити студентів виконувати якісні реакції на вуглеводи.

Запитання для самопідготовки:

1. Визначення, класифікація та біологічна роль вуглеводів.
2. Моносахариди, їх класифікація (тріози, пентози, гексози).
3. Тріози: будова і біологічна роль (гліцериновий альдегід, діоксиацетон, фосфорні ефіри тріоз).
4. Пентози: будова і біологічна роль рибози, дезоксирибози і рибулози. Фосфорні ефіри пентоз: рибозо-1-фосфат; рибозо-5-фосфат.
5. Гексози: глюкоза, галактоза і фруктоза. Будова та біологічна роль їх похідних (фосфорні ефіри, аміноспирти, уронові кислоти).

6. Дисахариди: визначення, будова, глікозидний зв'язок між залишками моносахаридів, значення окремих дисахаридів у тваринництві (сахароза, трегалоза, мальтоза, лактоза, целобіоза).
7. Полісахариди: визначення, класифікація, відмінності у складі та будові гомо- і гетерополісахаридів.
8. Гомополісахариди: крохмаль, глікоген, клітковина, інουλін, хітин. Їх склад, будова, властивості, біологічна роль. Амілоза і амілопектин, особливості їх будови. Продукти гідролізу крохмалю і клітковини.
9. Кислі та нейтральні гетерополісахариди. Склад, структура і біологічна роль гіалуронової, хондроїтинсульфатної кислоти і гепарину.

Лабораторні роботи:

1. Реакція з α -нафтолом та тимолом

Принцип методу. У сильноокислому середовищі вуглеводи утворюють з α -нафтолом та тимолом комплекси фіолетового і червоного забарвлення.

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками; сульфатна кислота, концентрована; α -нафтол, 2% спиртовий розчин; тимол, 1% спиртовий розчин; сахароза (або інший вуглевод), 1% розчин.

Хід роботи.

1. Взяти 4 пробірки.
2. У першу і третю налити по 2 мл води.
3. У другу і четверту – по 2 мл розчину сахарози.
4. У першу і другу пробірки додати по 5-6 крапель α -нафтолу, перемішати.
5. У третю і четверту – по 5-6 крапель тимола, перемішати.
6. В усі пробірки прилити по стінках (**не перемішувати!**) 1-2 мл концентрованої сульфатної кислоти (**обережно!**).

Спостереження внести в таблицю.

№ пробірки	Реактиви		Забарвлення розчину
1	2 мл H ₂ O	α -нафтол	
2	2 мл розчину сахарози	α -нафтол	
3	2 мл H ₂ O	тимол	
4	2 мл розчину сахарози	тимол	

Спостереження та висновки: _____

2. Реакція з реактивом Фелінга

Принцип методу. Моно- і дисахариди, що здатні до окиснення, в лужному середовищі відновлюють гідроксид міді (II), який міститься в рідині Фелінга, в оксид міді (I) червоного кольору, по утворенні якого можна визначити наявність відновлювальних вуглеводів.

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками; спиртівка; глюкоза, 1% розчин; реактив Фелінга.

Хід роботи.

1. Взяти дві пробірки.
2. В одну налити 2-3 мл розчину глюкози.
3. У другу – 2-3 мл дистильованої води.
4. В обидві пробірки додати по 2-3 мл реактиву Фелінга.
5. Пробірки нагріти до кипіння.

Спостереження та висновки: _____

3. Виявлення фруктози (реакція А. Ф. Селіванова)

Принцип методу. При нагріванні розчину фруктози і речовин, які містять фруктозу, остання дегідратується з утворенням 5-оксиметилфурфуролу, який в свою чергу з резорцином утворює комплекс рожево-червоного забарвлення.

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками; спиртівка; фруктоза (натуральний мед); глюкоза, 1% розчин; реактив Селіванова (0,05% розчин резорцину у 20% розчині соляної кислоти).

Хід роботи.

1. Взяти три пробірки.
2. У першу налити 1-2 мл розчину фруктози (меду).
3. У другу – стільки ж розчину глюкози.
4. У третю – 1-2 мл дистильованої води.
5. В усі пробірки прилити по 1-2 мл реактиву Селіванова.
6. Вміст пробірок доводять до кипіння. Кип'ятять не більше 20-30 секунд.

Спостереження та висновки: _____

4. Кислотний ступінчастий гідроліз крохмалю

Принцип методу. При нагріванні крохмалю з концентрованою сульфатною кислотою відбувається поступовий його гідроліз з утворенням проміжних (декстрини, мальтоза) та кінцевих (глюкоза) продуктів, які можна виявити за кольоровою реакцією з йодом та реактивом Фелінга.

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками; водяна баня; крохмаль, 1% розчин; сульфатна кислота, концентрована; розчин Люголя; рідина Фелінга; гідроксид натрію, 10% розчин.

Хід роботи.

1. В пробірку наливають 5-6 мл розчину крохмалю.

2. Додають 3-4 краплі концентрованої сульфатної кислоти.
3. Поміщають пробірку в киплячу водяну баню.
4. Через 3-5 хвилин, а далі через кожні 5 хвилин, з пробірки відбирають по 1 мл гідролізату в чотири чисті пробірки (попередньо їх пронумерувати).
5. Залишок гідролізату ділять на дві рівні частини. Одну з яких використовують для реакції з йодом, а іншу – для реакції з реактивом Фелінга, попередньо її вміст нейтралізують розчином гідроксиду натрію.
6. В усі пробірки (окрім останньої) додають приблизно по 2 мл дистильованої води, 1-2 краплі розчину Люголя.
7. Перемішують і спостерігають специфічне забарвлення отриманих гідролігатів.
8. Нейтралізований гідролізат, змішаний з реактивом Фелінга, нагрівають до кипіння.

Спостереження і висновки: _____

ТЕМА 15. ОБМІН ВУГЛЕВОДІВ

Мета: закріпити теоретичні знання студентів з теми «Обмін вуглеводів».

Завдання: студенти повинні ознайомитися з сучасними методами кількісного визначення вуглеводів у крові сільськогосподарських тварин та опанувати один з них.

Запитання для самопідготовки:

1. Біологічна роль вуглеводів.
2. Перетравлення вуглеводів у різних відділах шлунково-кишкового тракту тварин.
3. Особливості перетравлення вуглеводів у жуйних; де і під дією яких факторів відбувається перетравлення.
4. Бродіння в передшлунках, головні види бродіння.
5. У вигляді яких кінцевих продуктів відбувається всмоктування вуглеводів у різних тварин?
6. Концентрація вуглеводів у крові тварин різних видів та механізм її регуляції. Гіперглікемія, гіпоглікемія, глюкозурія.

7. Головні шляхи використання глюкози в організмі.
8. Глікогенез – визначення, послідовність реакцій (схема). Глюкогенез, гліконеогенез.
9. Окиснення вуглеводів в анаеробних умовах. Гліколіз та глікогеноліз. Молекулярні механізми. Біологічне призначення, енергетична ефективність.
10. Шляхи використання молочної кислоти, яка утворилася в результаті анаеробного окиснення глюкози.
11. Окиснення молочної кислоти в аеробних умовах. Енергетична ефективність її окиснення до піровиноградної та оцтової кислот.
12. Механізм окиснювального декарбокислування піровиноградної кислоти та інші шляхи її перетворення. Утворення та роль щавелево-оцтової кислоти.
13. Цикл трикарбонових кислот: визначення, послідовність реакцій, біологічне призначення.
14. Енергетична ефективність аеробного окиснення глюкози – повного та на окремих етапах.
15. Пентозний і глюкуронідний шляхи окислення глюкози – біологічне призначення.
16. Можливі причини порушення вуглеводного обміну.
17. Зв'язок обміну вуглеводів та інших речовин.

У результаті процесів гідролізу вуглеводів у шлунково-кишковому тракті в кров активно всмоктуються моносахариди, в основному – глюкоза. Наявність глюкози в крові називається *глюкоземією*. Рівень глюкози в крові є величиною постійною, яка регулюється ендокринною системою (гормонами). Підвищений рівень глюкози в крові називається *гіперглікемією*, знижений – *гіпоглікемією*.

Гіперглікемія може бути *аліментарною*, тобто не патологічною, яка виникає відразу після великого прийому вуглеводів з їжею. У цьому випадку рівень цукру знижується до норми протягом 2 годин.

Також гіперглікемія може бути *патологічною*, пов'язаною з недостатнім синтезом або не активацією основного гіпоглікемічного гормону підшлункової залози – інсуліну. В цьому випадку розвивається тяжке захворювання – *цукровий діабет*.

Концентрація глюкози в крові різних видів тварин

Вид тварин	Кількість глюкози	
	ммоль/л	мг%
Велика рогата худоба (корови)	3,3-4,4	60-80
Дрібна рогата худоба (вівці, кози)	2,2-3,33	40-60
Свині	3,33-5,55	80-100

Кролі	5,54-11,09	100-200
Коні	3,05-5,27	75-95
Собаки	3,03-4,83	60-87
Кішки	3,9-6,1	70-110
С.-г. птиця (кури, качки, гуси та ін.)	5,34-8,40	120-200

Для визначення цукру в крові запропоновано багато способів. Раніше широко використовувався метод Хаггедорна-Йенсена. Цей метод має один істотний недолік, який полягає в тому, що він заснований на використанні редуруючих властивостей не тільки глюкози, але й інших речовин, які також мають ці властивості.

В даний час найбільш розповсюдженим, зручним та інформативним у плані визначення саме рівня вмісту глюкози є *глюкозооксидазний метод*.

Лабораторні роботи:

1. Кількісне визначення глюкози в крові (метод Хаггедорна-Йенсена)

Принцип методу. Глюкоза здатна відновлювати гексаціаноферат (III) калію, надлишок якого визначається йодометрично. Кількість глюкози знаходять по даним йодометрії, використовуючи таблицю Хаггедорна-Йенсена.

Обладнання та реактиви. Мікропіпетка на 0,1 мл; піпетки на 1, 2, 3 та 5 мл; мікробюретка на 2 мл; штатив з пробірками (звичайними) і окремо з широкими (цукровими) пробірками; лійки 3-4 см; водяна баня; вата гігроскопічна; вимірвальні колби на 200 мл і 1000 мл; сульфат цинку, 0,45% розчин; гідроксид натрію, 0,1н розчин; гексаціаноферат (III) калію, 0,165% лужний розчин, хлорцинкйодистий реактив; оцтова кислота, 3% розчин; тіосульфат натрію, 0,005н розчин; крохмаль, 1% розчин; кров свіжа не згорнута.

Хід роботи. Дослідження проводять в 2-х пробах: перша – дослідна (з кров'ю); друга – контрольна (без крові).

1.1. Отримання безбілкового фільтрату крові:

1. У дві пробірки, які помічені буквами «К» і «Д» (контроль і дослід), наливають по 5 мл 0,45% розчину сульфату цинку.
2. Додають по 1 мл 0,1н розчину гідроксиду натрію і перемішують.
3. Утворюється білий осад гідроксиду цинку.
4. За допомогою мікропіпетки або дозатора в розчин гідроксиду цинку дослідної пробірки додають 0,1 мл крові. (Мікропіпетку двічі промити розчином гідроксиду цинку, набираючи і випускаючи з неї розчин в пробірку). Друга пробірка залишається контрольною.

- Обидві пробірки ставлять на 3 хвилини в киплячу водяну баню для повної денатурації білків плазми крові.
- Вміст пробірок фільтрують через змочений водою фільтр у спеціальні великі «цукрові» пробірки, які також відмічені «К» і «Д».
- Осад зі звичайних пробірок двічі промивають (по 3 мл) дистильованою водою і виливають на фільтр відповідних пробірок.

**1.2. Відновлення глюкозою крові гексаціаноферату (III) калію
(визначення глюкози):**

- В дві «цукрові» пробірки додати (точно!) по 2 мл 0,165%-го лужного розчину гексаціаноферату (III) калію.
- Ставлять пробірки в киплячу водяну баню на 15 хвилин.
- Пробірки охолоджують під холодною водою.

**1.3. Визначення надлишку гексаціаноферату (III) калію,
що не вступив у реакцію з глюкозою:**

- У кожную пробірку додають за допомогою піпеток по 3 мл хлорцинкйодистого реактиву.
- Додають по 2 мл 3%-го розчину оцтової кислоти і по 5-6 крапель розчину крохмалю.
- Перемішують, і йод, що виділився, титрують з мікробюретки 0,005н розчином тіосульфату натрію до знебарвлення синього кольору розчину.

Результати визначення записують у таблицю.

№ проби	Призначення проби	Результати титрування (р-н $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, мл)	Кількість глюкози, мг% (за таблицею)	Вміст глюкози в крові, мг% (Д-К)
1	Дослід			
2	Контроль			

Примітка: Контроль в даному випадку показує, що в реактивах присутні домішки речовин, які мають, як і глюкоза, відновлювальні властивості. Відновлюючу дію цих речовин переводять в кількість глюкози по кількості відновленого реактиву і віднімають її від загальної кількості глюкози і домішок, яку знаходять по дослідній пробі. Для полегшення розрахунку кількість цих речовин виражають в мг% глюкози.

Отримані результати і висновки: _____

**2. Визначення глюкози в біологічних рідинах
глюкозооксидазним методом**

Принцип методу. Глюкоза в присутності глюкозооксидази окиснюється Оксигеном повітря до глюконової кислоти та перекису водню.

Останній в присутності пероксидази вступає в реакцію з фенолом і 4-амінофенозоном з утворенням хіноніміну червоно-фіолетового кольору, який визначається фотометрично.

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками; набір для визначення глюкози у біологічних рідинах глюкозооксидазним методом; ФЕК.

Хід роботи.

А. СИРОВАТКА КРОВІ, СЕЧА

Аналіз проводиться у відповідності зі схемою, представленою в таблиці 1.

Таблиця 1.

Варіант аналізу з використанням МОНОРЕАГЕНТУ						
Відміряти в пробірку, мл	Калібрувальна або дослідна проба			Холоста проба		
	Макро	Напів-мікро	Мікро	Макро	Напів-мікро	Мікро
Калібрувальний або аналізований розчин	0,04	0,02	0,01	–	–	–
Фізіологічний розчин	–	–	–	0,04	0,02	0,01
Монореагент	4,00	2,00	1,00	4,00	2,00	1,00
Варіант аналізу з використанням БІРЕАГЕНТУ						
Калібрувальний або аналізований розчин	0,04	0,02	0,01	–	–	–
Фізіологічний розчин	–	–	–	0,04	0,02	0,01
Буферний розчин	2,00	1,00	0,50	2,00	1,00	0,50
Ензими	2,00	1,00	0,50	2,00	1,00	0,50
Змішати, витримати 20 хвилин при кімнатній температурі (від +18 до +25 °С), або 12 хвилин при 37 °С. Виміряти оптичну густину калібрувальної (Е кал.) або дослідної проби (Е досл.) проти холостої на ФЕК при 500-546 нм, у кюветі 10 або 5 мм.						

Б. ЦІЛЬНА КРОВ з використанням стабілізатору (плазма крові).

Для отримання плазми 0,1 мл цільної капілярної крові змішують з 0,9 мл розчину антикоагулянту і центрифугують 10 хвилин при 2000 об/хв для осадження еритроцитів. Для аналізу використовують надосадову рідину. Калібрувальний розчин глюкози розводять у 10 разів (0,1 мл

калібрувального розчину глюкози 10 ммоль/л змішують з 0,9 мл фізіологічного розчину).

Аналіз проводиться відповідно до схеми, наведеної в таблиці 2.

Таблиця 2.

Варіант аналізу з використанням МОНОРЕАГЕНТУ						
Відміряти в пробірку, мл	Калібрувальна або дослідна проба			Холоста проба		
	Макро	Напів-мікро	Мікро	Макро	Напів-мікро	Мікро
Калібрувальний або аналізований розчин	0,40	0,20	0,10	–	–	–
Фізіологічний розчин	–	–	–	0,40	0,20	0,10
Монореагент	4,00	2,00	1,00	4,00	2,00	1,00
Варіант аналізу з використанням БІРЕАГЕНТУ						
Калібрувальний або аналізований розчин	0,04	0,02	0,01	–	–	–
Фізіологічний розчин	–	–	–	0,40	0,20	0,10
Буферний розчин	2,00	1,00	0,50	2,00	1,00	0,50
Ензими	2,00	1,00	0,50	2,00	1,00	0,50
Змішати, витримати 20 хвилин при кімнатній температурі (від +18 до +25 °С), або 12 хвилин при 37 °С. Виміряти оптичну густину калібрувальної (Е кал.) або дослідної проби (Е досл.) проти холостої на ФЕК при 500-546 нм, у кюветі 10 або 5 мм.						

Розрахунок концентрації глюкози

$$C = 10,0 \times K \times \frac{E_{оп.}}{E_{досл.}},$$

де C – концентрація глюкози (ммоль/л),

K – коефіцієнт розведення.

НОРМА ВМІСТУ ГЛЮКОЗИ

- в капілярній крові 3,38-5,55 ммоль/л;
- в сироватці, плазмі крові 4,22-6,11 ммоль/л;
- у сечі 0-1,11 ммоль/л.

Отриманий результат і висновки: _____

Розділ 5. Хімія та обмін ліпідів

ТЕМА 16. ХІМІЯ ЛІПІДІВ

Мета: перевірити теоретичні знання студентів з теми «Ліпіди».

Завдання: навчити методам, що дозволяють в лабораторних умовах перевірити ряд фізико-хімічних властивостей жирів.

Запитання для самопідготовки:

1. Ліпіди: визначення, розповсюдження в природі, біологічна роль.
2. Класифікація ліпідів: прості ліпіди (тригліцериди, воски, стероли і стериди) і складні ліпіди (фосфоліпіди, гліколіпіди, сульфоліпіди).
3. Вищі карбонові кислоти (насичені і ненасичені), які входять до складу ліпідів.
4. Жири (тригліцериди): визначення, хімічна будова, фізичні (розчинність, температура плавлення) і хімічні (омилення, прогоркання) властивості. Біологічна роль жирів. Кислотне та йодне числа жиру, їх практичне значення.
5. Воски: хімічний склад, будова, біологічна роль.
6. Стероли та стериди: хімічна будова, біологічна роль (на прикладі холестеролу, 7-дегідрохолестеролу та ергостеролу).
7. Фосфоліпіди (фосфатиди):
 - гліцерофосфатиди: хімічна будова, біологічна роль фосфатидної кислоти, лецитинів, кефалінів, серинфосфатидів, ацетальфосфатидів;
 - сфінгофосфатиди: хімічний склад, будова, біологічна роль.
8. Гліколіпіди (цереброзиди, гангліозиди): хімічний склад, особливості будови, поширення у природі, біологічна роль.

Лабораторні роботи:

1. Розчинність жирів у різних розчинниках (демонстративно)

Принцип методу. Лабораторна робота ґрунтується на властивості жирів розчинятися в різноманітних розчинниках.

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками; піпетки; рослинний жир; хлороформ; диетиловий ефір; етиловий спирт; ксилол; вода дистильована.

Хід роботи.

1. Пронумерувати 5 пробірок.
2. В пробірки внести по 2-3 краплі олії.
3. З бюреток, що стоять на окремому столі прилити:
 - у першу – 2-3 мл води;
 - у другу – стільки ж диетилового (медичного) ефіру;
 - у третю – хлороформу;
 - у четверту – спирту;
 - у п'яту – ксилолу.
4. Вміст кожної пробірки енергійно перемішати.

Спостереження записати в таблицю.

№ пробірки	Розчинник	Результат
1	Вода	
2	Ефір	
3	Хлороформ	
4	Спирт	
5	Ксилол	

Висновки: _____

2. Одержання жирової емульсії

Принцип методу. Жир з водою утворює нестійку емульсію. Для її стабілізації використовують детергенти (поверхнево-активні речовини – *емульгатори*).

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками; рослинний жир; розчин мила; розчин білка; жовч; хлоридна кислота, 0,1н розчин; гідрокарбонат натрію, 0,1н розчин.

Хід роботи.

1. Взяти шість пробірок (1-а з них – контрольна).
2. В кожну внести по 2-3 краплі олії та по 2-3 мл води.
3. У 2-у пробірку прилити 1 мл розчину мила.
4. У 3-ю – 1 мл розчину білка.
5. У 4-у – 1 мл розчину гідрокарбонату натрію.
6. У 5-у – 3-5 крапель жовчі.
7. У 6-у – 1 мл розчину хлоридної кислоти.
8. Вміст пробірок ретельно перемішати і залишити на 2-3 хвилини в штативі.

Спостереження і висновки: _____

3. Визначення йодного числа жиру

Принцип методу. Метод заснований на здатності ненасичених карбонових кислот, що містяться в жирі, приєднувати йод за місцем розриву подвійних зв'язків. Надлишок йоду визначається титрометрично.

Йодне число показує ступінь ненасиченості жиру.

У нормі йодне число жиру становить:

- ✓ Жир тваринного походження: яловичий – 27-47; баранячий – 31-46; свине сало – 46-66;
- ✓ Жир рослинного походження: соняшникова олія – 129-136; конопляна олія – 145-162.

Обладнання та реактиви. Конусна (плоскодонна кругла) колба з пробкою; градуйовані піпетки; жир; хлороформ; розчин йоду, 0,1н; розчин тіосульфату натрію, 0,1н; розчин крохмалю, 1,0%.

Хід роботи.

1. В колбу внести 1 г жиру.
2. Додати 5 мл хлороформу (із бюретки).
3. Додати точно 5 мл спиртового розчину йоду.
4. Закривають пробкою, ретельно перемішують і поміщають у темне місце.
5. Через 30 хвилин додають 1 мл крохмалю.
6. Титрують із бюретки розчином натрію тіосульфату до зникнення синього забарвлення.
7. Результати титрування записують в зошит і проводять розрахунки йодного числа за формулою:

$$X = \frac{0,127 \times K \times (A - B) \times 100}{m}, \text{ де}$$

X – йодне число (кількість грамів йоду на 100 г жиру);

$0,127$ – еквівалент 1 мл розчину грамам металевого йоду;

A – кількість розчину йоду (5 мл), доданого до проби;

B – кількість розчину йоду (еквівалентна об'єму натрію тіосульфату), що залишилась після реакції з жиром;

K – коефіцієнт поправки на титр (1);

m – наважка (г) жиру, взятого для проведення реакції (1,0);

100 – коефіцієнт для перерахунку на 100 г.

Розрахунки та висновки: _____

4. Визначення кислотного числа жиру

Принцип методу. Метод заснований на титрометричному визначенні вільних карбонових кислот, що містяться в 1 г жиру.

Кислотне число – це кількість мг КОН, яка йде на нейтралізацію вільних карбонових кислот, що містяться в 1 г жиру. Жир – це складний ефір гліцерину та вищих карбонових кислот; при зберіганні він гідролізується з утворенням вільних карбонових кислот. Чим «старіше» жир, тим більше його кислотне число. Тобто кислотне число показує ступінь свіжості жиру.

Обладнання та реактиви. Конусні або плоскодонні колби на 50 мл; піпетки; бюретка; нейтральна суміш спирту з ефіром (1:2); свіжий та старий жир; гідроксид калію, 0,1н розчин; фенолфталеїн.

Хід роботи.

1. В одну колбу вносять 1,0 г свіжого жиру.
2. В іншу – 1,0 г старого жиру.
3. Розчиняють жир. Для цього додають у колби по 5 мл спиртово-ефірної суміші (суміш наливати з бюретки).
4. Приливають по 2-3 краплі фенолфталеїну.
5. Титрують вміст колб розчином калію гідроксиду (обережно) до появи рожевого забарвлення, яке утримується протягом 1 хвилини.

На підставі результатів титрування роблять розрахунки за формулою:

$$X = \frac{V \times 5,6 \times K}{m};$$

де: X – кількість (мг) КОН, що витрачається на титрування 1 грама жиру (кислотне число);

$5,6$ – кількість (мг) КОН, що еквівалентна 1 мл 0,1н розчину калію гідроксиду;

V – об'єм розчину (мл) КОН, що пішов на титрування проби;

K – коефіцієнт поправки на титр (1);

m – наважка жиру, г (1).

У нормі кислотне число дорівнює 1,2–2,5 мг КОН на 1 г жиру.

На основі виконаного дослідження роблять висновок про якість жиру в першій і другій пробах; при цьому виходять з того, що кислотне число свіжого жиру не повинно перевищувати 2,5.

Розрахунки та висновки: _____

ТЕМА 17. ОБМІН ЛІПІДІВ

Мета: закріпити знання про обмін ліпідів, енергетичну ефективність окиснення жирів, молекулярні механізми синтезу карбонових кислот, жирів, гліцерофосфатидів та деяких сторонах порушення молекулярних механізмів обміну карбонових кислот.

Завдання: засвоїти напівкількісні експрес-методи визначення кетонових тіл в молоці, сечі, сироватці крові.

Запитання для самопідготовки:

1. Хімічна будова і біологічна роль ліпідів (жирів, фосфоліпідів, стеролів, гліколіпідів і т.д.).
2. Перетравлення ліпідів у різних відділах шлунково-кишкового тракту, роль в цьому процесі жовчних кислот.
3. Засвоєння продуктів перетравлення ліпідів. Холеїнові кислоти.
4. Синтез тригліцеридів і фосфоліпідів у стінці кишківника. Роль фосфатидної кислоти як проміжного продукту в цих реакціях.
5. Гідроліз жирів у тканинах і подальше використання продуктів гідролізу.
6. Окиснення гліцерину: послідовність реакцій і енергетична ефективність.
7. Окиснення карбонових кислот. β -Окиснення та окиснення в циклі трикарбонових кислот. Енергетичний ефект.
8. Як розрахувати кількість АТФ, що утворюється при повному окисненні тригліцеридів (на прикладі трипальмітату, тристеарату).
9. Кетонові тіла – місце та механізм утворення, використання в організмі.
10. Порушення утворення та використання кетонових тіл. Причини і наслідки. Кетонемія, кетонурія.
11. Роль вуглеводів в обміні жирів.
12. Синтез та використання в організмі фосфоліпідів.
13. Біосинтез карбонових кислот.
14. Біосинтез холестеролу та інших стеролів. Вихідні продукти і місце біосинтезу.
15. Особливості окиснення ненасичених карбонових кислот.

Жовчні кислоти відіграють важливу роль у процесах травлення і всмоктування ліпідів: емульгування жирів, активація панкреатичної ліпази, утворення змішаних транспортних міцел.

У нормі жовчні кислоти підлягають ентерогепатичній циркуляції і виводяться з організму через кишківник. Нормальна сеча, як правило, їх не містить. При механічній жовтяниці жовчні кислоти з'являються в сечі і їх кількість збільшується, якщо закупорка жовчних проток триває протягом більш значного проміжку часу. Жовчні кислоти в сечі можуть бути і при паренхіматозній (вірусній) жовтяниці.

Лабораторні роботи:

1. Виявлення жовчних кислот у сечі

1.1. Проба Гея

Принцип методу. Жовчні кислоти мають властивість зменшувати поверхневий натяг сечі.

Обладнання та реактиви. Хімічна склянка на 50 мл; порошок сірки; сеча.

Хід роботи.

1. У склянку налити 20-30 мл сечі.
2. На її поверхню просіяти через марлю тонко подрібнений порошок сірки.
3. Спостерігати як швидко осяде порошок на дно склянки.

За відсутності жовчних кислот у сечі сірка залишиться на поверхні сечі навіть при струшуванні склянки.

Проба стає позитивною при концентрації жовчних кислот і їх солей в сечі вище 0,01%.

1.2. Реакція Петенкофера

Принцип методу. При взаємодії жовчних кислот з оксиметилфурфуролом утворюються продукти їх конденсації, що обумовлює червоно-фіолетове забарвлення. Оксиметилфурфурол утворюється з фруктози (сахарози) при взаємодії з концентрованою сульфатною кислотою.

Обладнання та реактиви. Чашка Петрі; скляні палички; сахароза, 10% розчин; сульфатна кислота, концентрована; сеча.

Хід роботи.

1. В чашку Петрі наносять 2-3 краплі сечі.
2. Додають 2 краплі 10% розчину сахарози і ретельно перемішують скляною паличкою.
3. Додають 7 крапель концентрованої сульфатної кислоти і знову перемішують.
4. Через кілька хвилин спостерігають появу червоного забарвлення, яке з часом переходить у червоно-фіолетове.

Спостереження і висновки: _____

Ліпіди крові представлені ТАГ, холестеролом, його ефірами і фосфатидами. Виділення всіх цих речовин з крові засновано на їх розчинності в органічних розчинниках. Порушення вуглеводного обміну (цукровий діабет) і супроводжується порушенням обміну жирів, що веде до утворення *кетонових тіл*. Тому при виникненні глюкозурії (присутності

цукру в сечі) або гіперглікемії виникає необхідність визначення кетонових тіл (ацетону, ацетооцтової і β -гідроксималяної кислот) в сечі. Глюкозурія без ацетонурії можлива при підвищеному вживанні в їжу вуглеводів, ацетонурія без глюкозурії – при голодуванні.

Нормальні показники (мг%) кетонових тіл у тварин: корови, телята – 4,0-6,0; свині – 0,25-2,0.

Підвищені показники можуть виникати при кетозі, голодуванні, кахексії, токсичній диспепсії, передпологових токсикозах, гіпотонії, атонії передшлунків, тимпанії рубця, лейкозі.

2. Якісні реакції на ацетонові (кетонові тіла)

2.1. Реакція Лібена

Принцип методу. Реакція ґрунтується на властивості ацетону (пропан-2-он) перетворюватися в йодоформ за наявності йоду в лужному середовищі.

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками; гідроксид натрію, 10% розчин; розчин Люголю; сеча.

Хід роботи.

1. До 1-2 мл розчину сечі (патологічної).
2. Додати кілька крапель розчину Люголя.
3. Додати 5-6 крапель 10 % розчину NaOH до знебарвлення розчину.
4. Спостерігати появу жовтого осаду йодоформу, що має характерний запах.

Пробу Лібена використовують для виявлення ацетону у сечі.

2.2. Реакція Легала

Принцип методу. Ацетон і ацетооцтова кислота утворюють із натрію нітропрусидом помаранчево-червоне забарвлення у лужному середовищі. Після підкислення крижаною оцтовою кислотою з'являється сполука вишневого кольору.

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками; гідроксид натрію, 10% розчин; натрію нітропрусид, 10% розчин; крижана оцтова кислота; сеча.

Хід роботи.

1. До 1-2 мл розчину сечі (патологічної) додати 5-6 крапель 10% розчину NaOH.
2. Додати кілька крапель нітропрусиду натрію.
3. Спостерігати появу або відсутність червоного забарвлення, яке свідчить про наявність ацетону.

Інтенсивність забарвлення посилюється від додавання оцтової кислоти.

2.3. Проба Ланге

Принцип методу. Ацетон та ацетооцтова кислота з натрію нітропрусидом у лужному середовищі утворюють продукти реакції, забарвлені у червоний колір.

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками; піпетки; натрію нітропрусид, 10% свіжоприготований розчин; крижана оцтова кислота; натрію гідроксид, 10% розчин; сеча.

Хід роботи.

1. До 1-2 мл розчину сечі (патологічної) додати 0,5 мл концентрованої оцтової кислоти.
2. Додати кілька крапель натрію нітропрусиду.
3. Перемішати і обережно нашарувати 1-2 мл 30 % розчину NaOH.
4. На межі розділу двох рідин спостерігаємо утворення червоно-фіолетового кільця.

Спостереження і висновки: _____

3. Експрес-метод напівкількісного визначення кетонових тіл у крові, сечі та молоці

Принцип методу. Ацетон та ацетооцтова кислота з нітропрусидом натрію в лужному середовищі утворюють комплексну сполуку, яка забарвлена в рожево-фіолетовий колір. Час появи забарвлення залежить від кількості кетонових тіл.

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками; піпетки градуйовані на 1, 5, 10 мл; предметне скло; хімічний стакан на 50 мл; електроплитка; реактив на кетонові тіла (нітропрусид натрію – 1,5 г; сульфат амонію – 50 г; карбонат натрію безводний – 25,0 г; всі реактиви ретельно розтирають до однорідного порошку і зберігають у закритому посуді із темного скла в сухому місці); сироватка крові; свіжа сеча; свіже молоко; концентрована оцтова кислота; пероксид водню.

Визначення ацетону і ацетооцтової кислоти

Хід роботи.

1. На 3 предметних скла наносять 0,1-0,2 г сухого реактиву на кетонові тіла.
2. У першу пробу додають 2-3 краплі сироватки крові, в другу пробу – 2-3 краплі сечі, в третю – 2-3 краплі молока.

Оцінка отриманого результату. Якщо рожево-фіолетове забарвлення з'являється одразу ж – у пробі 50-80 мг% кетонових тіл і більше; через 1 хвилину – 30-50 мг%; слабке забарвлення через 3 хвилини – 10-30 мг% кетонових тіл; через 5 хвилин – до 10 мг%.

Після якісної оцінки концентрації кетонових тіл пробу розводять дистильованою водою у співвідношенні 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 і т.д. з таким розрахунком, щоб при кінцевому розведенні проби в ній орієнтовно залишилось 10 мг% кетонових тіл. Наприклад; в пробі 30-50 мг% кетонових тіл. Знайшли, що позитивна реакція (через п'ять хвилин) з'являється при

розведенні 1:6, а негативна – при розведенні 1:7. Тоді в вихідній пробі міститься: $10 \text{ мг}\% \times 6 = 60 \text{ мг}\%$ кетонівих тіл. *Слід пам'ятати, що реакція на ацетооцтову кислоту в пробі втричі чутливіше, ніж на ацетон.*

Для визначення β -оксималяної кислоти 10 мл сироватки крові (сечі або молока) змішують у склянці з рівним об'ємом води та декількома краплями оцтової кислоти. Кип'ятять у витяжній шафі, щоб рідина випарувалась до половини початкового об'єму. При цьому ацетон відганяється, а ацетооцтова кислота руйнується. Рідині дають прохолоннути і переливають у пробірку. До неї додають 1 мл пероксиду водню, нагрівають протягом однієї хвилини і дають прохолоннути. β -Оксималяна кислота за цих умов окиснюється до ацетооцтової кислоти, визначення концентрації якої проводять за вищеописаною методикою з нітропрусидом натрію.

Спостереження і висновки: _____

***Розділ 6. Обмін білків та нуклеїнових кислот.
Взаємозв'язок та регуляція процесів метаболізму.***

**ТЕМА 18. ОБМІН ПРОСТИХ БІЛКІВ.
БІОЛОГІЧНА РОЛЬ, ПОТРЕБА ТА ЗАСВОЄННЯ.**

Мета: закріпити теоретичні знання про значення білків у годівлі тварин, механізм їх перетравлення та засвоєння у різних видів тварин.

Завдання: навчитись визначати кількість білків у сироватці крові тварин за методом Лоурі, з біуретовим реактивом і рефрактометрично.

Запитання для самопідготовки:

1. Біологічна роль білків, їх вміст у різних продуктах тваринного і рослинного походження.
2. Біологічна повноцінність білків. Замінні і незамінні амінокислоти.
3. Потреба тварин у білках.
4. Поняття про азотистий баланс, його види. Дати визначення позитивного та негативного азотистого балансу, азотистої рівноваги.
5. Ферменти травних соків на білки в шлунку, тонкому кишківнику, їх активування та механізм дії. Проміжні та кінцеві продукти перетравлення білків в організмі.
6. Особливості травлення білків у жуйних. Біологічна доцільність впливу на білки та інші азотисті речовини корму бактерій та найпростіших.
7. Всмоктування (засвоєння) продуктів перетравлення білків.

8. Гниття білків у товстому відділі кишківника і наступні перетворення продуктів гниття (індол, скатол, фенол, путресцин та ін.) в організмі.
9. Формування амінокислотного фонду тканин та головні шляхи використання амінокислот в організмі.
10. Ендогенні та екзогенні амінокислоти.

При видаленні формених елементів крові залишається *плазма*, при видаленні з неї фібриногену – *сироватка крові*.

Загальна кількість білків у плазмі крові – величина постійна.

Нормальні показники (г%):

корови – 7,2 -8,76;	коні – 6,5-7,5;
телята – 5,0-6,5;	лошата – 5,8-6,6;
свиноматки – 7,2-8,8;	кури – 4,5-6,0;
поросята – 5,0-6,5;	курчата – 2,5-3,5.

Знижені показники: голодування, нефротичний набряк, вагітність, затяжний сепсис.

Підвищені показники: дегідратація, проноси, блювання, гострі запалення, флегмони, сепсис, тяжкі інфекції.

Лабораторні роботи:

1. Кількісне визначення білків в крові за методом Лоурі

Принцип методу. Тирозин, який знаходиться в білках тваринного походження (його концентрація в білках відносно постійна), з реактивом Фоліна дає синє забарвлення, інтенсивність якого залежить від абсолютної концентрації білка в розчині. Інтенсивність забарвлення розчину визначають на ФЕК за ступенем світлопоглинання (екстинції) розчину. Потім на основі знайденої екстинції за калібрувальним графіком знаходять концентрацію білка.

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками; мікропіпетки; ФЕК; калібрувальний графік; реактив Фоліна; сироватка крові розбавлена 1:20-1:50.

Хід роботи.

1. Взяти дві пробірки.
2. В першу (дослід) додати 0,1 мл досліджуваної сироватки крові (розбавленої) і 9,0 мл реактиву С. Перемішати.
3. У другу (контроль) внести 9,1 мл реактиву С.
4. Обидві пробірки залишити в штативі та через 15 хвилин в них додати 0,9 мл реактиву Фоліна. Суміш одразу ж (!) перемішують і залишають у штативі для розвитку забарвлення.
5. Через 15 хвилин дослідну пробу фотометрують на ФЕК проти контролю в кюветах з робочою довжиною 10 мм зі світлофільтром № 8 (червоний).

Концентрацію білка знаходять за калібрувальним графіком, який будують на основі вимірювання екстинції розчинів з різною, наперед відомою, концентрацією білка.

Розрахунки та висновки: _____

2. Кількісне визначення білків у крові біуретовим реактивом

Принцип методу. Білок у лужному середовищі з реактивом, який містить Купрум, утворює комплексну сполуку, яка забарвлює розчин у фіолетовий колір, інтенсивність якого пропорційна концентрації білка в розчині. Реакція обумовлена наявністю в білках пептидних зв'язків.

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками; мікропіпетка; піпетки градуйовані; термостат або водяна баня; ФЕК; хлорид натрію, 0,85% розчин; біуретовий реактив; сироватка крові.

Хід роботи.

1. У пробірку вносять 0,1 мл сироватки крові; 2,4 мл хлориду натрію і 2,5 мл біуретового реактиву. Вміст пробірки ретельно перемішують, уникаючи утворення бульбашок повітря.
2. Поміщають на водяну баню при 37 °С на 30 хвилин для розвитку забарвлення.
3. Інтенсивність забарвлення (світлопоглинання) вимірюють на ФЕК при зеленому світлофільтрі в кюветах з робочою довжиною 10 мм проти кювети, яка містить суміш розчинів хлориду натрію і біуретового реактиву (1:1).

Побудова калібрувального графіка

1. Із сироватки крові з відомою концентрацією білка готують стандартний розчин, який містить 400 мг% білка (розбавляють сироватку крові розчином хлоридом натрію).
2. В ряд пронумерованих пробірок вносять послідовно 0,2; 0,3; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 мл стандартного розчину.
3. У кожній з пробірок об'єм доводять хлоридом натрію до 2,5 мл.
4. Додають по 2,5 мл біуретового реактиву, перемішують та інкубують в термостаті при 37 °С протягом 30 хвилин.
5. Після закінчення інкубації проби фотометрують на ФЕК і на основі одержаних результатів будують калібрувальний графік.

Результати та висновки: _____

ТЕМА 19. ОБМІН БІЛКІВ. БІОСИНТЕЗ БІЛКІВ

Мета: закріпити знання студентів про використання амінокислот (екзогенних та ендогенних) у тканинах, у біосинтезі білків, молекулярних механізмах цих процесів.

Завдання:освоїти метод рефрактометричного визначення білків у сироватці крові.

Запитання для самопідготовки:

1. Головні джерела амінокислот у тканинах (ендогенні та екзогенні амінокислоти).
2. Роль катепсинів у забезпеченні тканин амінокислотами.
3. Головні шляхи використання амінокислот.
4. Біосинтез білків – місце біосинтезу та головні етапи.
5. Транскрипція – де відбувається, які фактори беруть участь?
6. Рекогніція – де відбувається, які умови необхідні?
7. Трансляція – де відбувається, за участю яких факторів?
8. Поняття про кодони, гени, цистрони, антикодони.
9. Теорії регуляції біосинтезу білків.
10. Як відбувається активація амінокислот, що залучаються до реакцій біосинтезу білків?
11. Роль аміноацил-тРНК-синтетаз у біосинтезі білків.
12. На основі якого принципу відбувається транскрипція?
13. Яку роль в біосинтезі білка виконує тРНК?
14. Роль мРНК (іРНК) в біосинтезі білків. Звідки вона з'являється в клітині? Що таке інформосоми?
15. Що таке триплетний код, як він формується?
16. Чому код називається виродженням?
17. Джерела енергії для біосинтезу білків? Роль у цьому процесі АТФ та ГТФ.

Лабораторні роботи:

1. Визначення кількості білків у сироватці крові рефрактометричним методом

Принцип методу. Метод ґрунтується на здатності різних середовищ по-різному заломлювати промені світла, які проходять через них. В сироватці крові показник заломлення (коефіцієнт рефракції) світла залежить головним чином від концентрації в ній білків. Мінеральні речовини та інші складові частини сироватки практично не впливають на її рефракцію. Рефракція сироватки вимірюється за допомогою приладу, який називається *рефрактометр*.

Обладнання та реактиви. Рефрактометр; фільтрувальний папір; вата; скляні палички; суміш спирту з ефіром (1:1); сироватка крові; вода дистильована.

Хід роботи.

1. Скляні призми камери рефрактометра очищають ватою, змоченою водою, просушують сумішшю спирту з ефіром і фільтрувальним папером.
2. Скляною паличкою наносять на нижню призму камери дві краплі дистильованої води і закривають камеру.
3. Прилад встановлюють до світла і наводять межу світла і тіні на перехрестя ліній.

При 20°C прилад повинен показувати рефракцію води, рівну 1,3333. Це значить, що він правильно налаштований і може бути використаний для послідууючого визначення рефракції сироватки крові.

4. Камеру відкривають, призми просушують фільтрувальним папером і на нижню призму наносять дві-три краплі сироватки крові.
5. Камеру закривають і знаходять показник рефракції.

Визначення рефракції проводять тричі і з трьох показників знаходять середнє. При невідповідності температури на кожен градус (проти 20°) роблять поправку, додаючи при більш високій температурі до одержаного показника 0,0001 чи віднімаючи при більш низькій температурі від нього цю величину.

Використовуючи знайдений коефіцієнт рефракції, за таблицею визначають відповідний вміст білка в сироватці крові.

Показник заломлення	Білок, %	Показник заломлення	Білок, %	Показник заломлення	Білок, %
1,3420	3,50	1,3451	5,30	1,3482	7,09
1,3421	3,56	1,3452	5,36	1,3483	7,14
1,3422	3,62	1,3453	5,41	1,3484	7,20
1,3423	3,67	1,3454	5,47	1,3485	7,27
1,3424	3,72	1,3455	5,54	1,3486	7,35
1,3425	3,80	1,3456	5,61	1,3487	7,42
1,3426	3,87	1,3457	5,68	1,3488	7,48
1,3427	3,94	1,3458	5,73	1,3489	7,53
1,3428	3,99	1,3459	5,79	1,3490	7,58
1,3429	4,05	1,3460	5,85	1,3491	7,63
1,3430	4,10	1,3461	5,90	1,3492	7,68
1,3431	4,16	1,3462	5,96	1,3493	7,73
1,3432	4,21	1,3463	6,01	1,3494	7,79
1,3433	4,27	1,3464	6,07	1,3495	7,85
1,3434	4,32	1,3465	6,12	1,3496	7,92
1,3435	4,38	1,3466	6,17	1,3497	7,99

1,3436	4,43	1,3467	6,23	1,3498	8,06
1,3437	4,49	1,3468	6,28	1,3499	8,12
1,3438	4,54	1,3469	6,34	1,3500	8,17
1,3439	4,60	1,3470	6,41	1,3501	8,23
1,3440	4,66	1,3471	6,48	1,3502	8,28
1,3441	4,71	1,3472	6,55	1,3503	8,33
1,3442	4,76	1,3473	6,60	1,3504	8,38
1,3443	4,81	1,3474	6,66	1,3505	8,44
1,3444	4,89	1,3475	6,71	1,3506	8,49
1,3445	4,96	1,3476	6,77	1,3507	8,58
1,3446	5,03	1,3477	6,82	1,3508	8,63
1,3447	5,09	1,3478	6,88	1,3509	8,71
1,3448	5,15	1,3479	6,93	1,3510	8,76
1,3449	5,20	1,3480	6,98	1,3511	8,81
1,3450	5,25	1,3481	7,03	1,3512	8,86

Наприклад. Показник рефрактометра при 18 °С становить 1,3477. У цьому випадку поправка на температуру: $0,0001 \times 2 = 0,0002$. Отже, істинна рефракція сироватки становить $1,3477 - 0,0002 = 1,3475$; що за таблицею відповідає концентрації білка в сироватці крові, рівному 6,71 %.

Розрахунки та висновки: _____

ТЕМА 20. ОБМІН БІЛКІВ. ЗАГАЛЬНІ І СПЕЦИФІЧНІ ШЛЯХИ ПЕРЕТВОРЕННЯ АМІНОКИСЛОТ

Мета: закріпити знання про шляхи перетворення амінокислот, що не використовуються для біосинтезу білків.

Завдання: засвоїти методики визначення креатиніну та сечовини в сироватці крові.

Запитання для самопідготовки:

1. Біосинтез амінокислот у тварин. Замінні та незамінні амінокислоти.
2. Декарбоксілювання амінокислот.
3. Шляхи дезамінування амінокислот, у тому числі дезамінування амінокислот у тварин.
4. Первинне та остаточне знешкодження аміаку: місце і механізм синтезу сечовини.

5. Шляхи виведення сечовини з організму у різних видів тварин (з однокамерним шлунком і у жуйних).
6. Особливості знешкодження аміаку у птахів.
7. Обмін окремих амінокислот (гліцину, серину, цистеїну, метіоніну, аспарагінової кислоти, гістидину та інших).
8. Синтез креатину, креатиніну, карнозину.
9. Кетогенні амінокислоти.
10. Залишковий азот крові – його компоненти та кількісні зміни в зв'язку з віком і станом організму.
11. Взаємозв'язок обміну амінокислот з обміном інших речовин.

Креатинін є нормальною складовою частиною сечі і одним із кінцевих продуктів азотистого обміну. Він є ангідридом креатину і утворюється з макроергічної сполуки креатинфосфату в результаті відщеплення фосфатної кислоти. Кількість креатиніну, що виводиться з сечею прямо залежить від вмісту фосфокреатину в м'язах. Кількість креатиніну в сечі буде змінюватися і залежно від вмісту креатину в їжі (особливо в білковій). Підвищеною екскрецією креатиніну (гіперкреатинінурія) супроводжуються гарячкові стани, гострі інфекції, цукровий і нецукровий діабет. Гіперкреатинінурія з одночасною креатинурією зазвичай свідчить про патологію поперечно-смугастих м'язів (м'язова дистрофія, атрофія, міастенія). Гіпокреатинурія спостерігається при захворюваннях нирок, астмі, при хронічному нефриті з уремією, при м'язовій атрофії після перенесених інфекцій, в літньому віці і при аліментарній дистрофії.

Лабораторні роботи:

1. Визначення вмісту креатиніну у сироватці крові

Принцип методу. При взаємодії креатиніну з пікриновою кислотою у лужному середовищі утворюється сполука помаранчевого кольору, інтенсивність забарвлення якої пропорційна концентрації креатиніну в сироватці крові.

Обладнання та реактиви. Набір реактивів для визначення креатиніну; ФЕК; мірні циліндри; штатив з пробірками; дозатори піпеткові; піпетки; сироватка крові.

Хід роботи.

Визначення проводиться в центрифужних пробірках, які заповнюють наступним чином:

Дослідна проба:

1. Внести в пробірку 0,5 мл досліджуваної сироватки.
2. Додати 1,5 мл насиченого розчину пікринової кислоти.
3. Витримують 5 хвилин.
4. Поміщають колбу в киплячу водяну баню на 20 секунд.

5. Центрифугують протягом 15 хвилин.
6. У чисту пробірку відбирають 1,0 мл центрифугату.
7. Додають 0,05 мл 10%-го розчину NaOH.
8. Перемішують і доводять об'єм розчину дистильованою водою до 2,5 мл.
9. Витримують 10 хвилин.
10. Колориметрують на ФЕК у кюветі з товщиною 10 мм (500-560 нм) проти холостої проби.

Калібрувальна проба:

1. У пробірку внести 0,5 мл калібрувального розчину креатиніну.
2. Додати 1,5 мл насиченого розчину пікринової кислоти.
3. Через 20 хвилин відбирають в іншу пробірку 1,0 мл отриманого розчину.
4. Додають 0,05 мл 10% -ного розчину NaOH.
5. Перемішують і доводять об'єм розчину дистильованою водою до 2,5 мл.
6. Витримують 10 хвилин.
7. Колориметрують на ФЕК в кюветі з товщиною 10 мм (500-560 нм) проти холостої проби.

Холоста проба:

Готується аналогічно калібрувальній, з тією різницею, що замість калібрувального розчину креатиніну використовують дистильовану воду.

Розрахунок вмісту креатиніну в пробі проводять за формулою:

$$C = C_{ст.} \times \frac{E_{досл.}}{E_{кал.}}, \text{ де}$$

C – концентрація креатиніну в досліджуваній сироватці, мкмоль/л;

$C_{ст.}$ – концентрація креатиніну в калібрувальній пробі – 188,4 мкмоль/л;

$E_{досл.}$ – оптична щільність дослідної проби;

$E_{кал.}$ – оптична щільність калібрувальної проби.

У нормі в сироватці крові креатиніну міститься:

- Люди: чоловіки 61-115 мкмоль/л; жінки 53-97 мкмоль/л.
- Собаки (середнє значення по всіх породах) 2,9-8,9 ммоль/л

Розрахунки та висновки: _____

Сечовина (діамід вугільної кислоти) є основним кінцевим продуктом знешкодження аміаку в організмі. Нормальний вміст сечовини в крові людини коливається в межах 2,5-8,3 ммоль/л, у ВРХ – 3,3-6,7 ммоль/л, у собак 3,5–9,2 ммоль/л. Близько 75% сечовини виділяється з сечею. Концентрація сечовини в крові залежить від інтенсивності її синтезу і виділення.

Визначення сечовини є діагностичним тестом, який характеризує не тільки стан білкового обміну, але і функціональний стан нирок та печінки. Збільшення концентрації сечовини в крові (азотемія) відзначається при хворобах нирок (порушеннях їх видільної функції), при підвищеному розпаді білків, надмірному білковому харчуванні, у разі зневоднення організму (відносна азотемія), при отруєнні фосфором. Зниження рівня сечовини в крові та виділення її з сечею спостерігається при захворюваннях печінки (дистрофія печінки, цироз, паренхіматозна жовтяниця), пов'язаних з порушенням її здатності до утворення сечовини; при нефриті, ацидозі, уремії.

2. Визначення вмісту сечовини в сироватці крові колориметричним методом

Принцип методу. Сечовина утворює з диацетилмонооксимолом при наявності тіосемікарбазиду і солей феруму в сильноокислому середовищі при нагріванні комплекс рожево-червоного кольору. Інтенсивність забарвлення пропорційна вмісту сечовини в сироватці крові.

Обладнання та реактиви. Набір реактивів для визначення сечовини; ФЕК; водяна баня; центрифуга лабораторна; мірні циліндри; штатив з пробірками; дозатори піпеткові; піпетки; сироватка крові.

Хід роботи.

У пробірки послідовно відміряють (згідно з таблицею) розчин диацетилмонооксимолу, біологічного розчину або фізіологічного розчину і тіосемікарбазиду. Для зменшення похибки аналізу рекомендується дотримуватися порядку змішування розчинів згідно з таблицею.

	Калібрувальна або дослідна проба, мл	Холоста проба, мл
Розчин диацетилмонооксимолу	1,0	1,0
Біологічний розчин або калібрувальний розчин сечовини	0,01	–
Фізіологічний розчин	–	0,01
Розчин тіосемікарбазиду	1,0	1,0

Пробірки закривають алюмінієвою фольгою, перемішують і поміщають в киплячу водяну баню на 10 хвилин. Потім пробірки швидко охолоджують у холодній воді. Колориметрують у кюветі 10 мм проти холостої проби.

Якщо розчин після нагрівання в першій пробірці мутніє, його центрифугують 5 хвилин або осаджують розчином ТХО. Після змішування всіх компонентів реакційного розчину не рекомендується витримувати проби до початку кип'ятіння більше, ніж 20 хвилин.

Концентрацію сечовини розраховують за формулою:

$$C = \frac{E_{\text{досл.}}}{E_{\text{кал.}}} \times 16,65, \text{ де}$$

C – концентрація сечовини в досліджуваній сироватці, ммоль/л;
 $16,65$ – концентрація сечовини в калібрувальній пробі (ммоль/л);
 $E_{\text{досл.}}$ – оптична щільність дослідної проби;
 $E_{\text{кал.}}$ – оптична щільність калібрувальної проби.

Розрахунки та висновки: _____

ТЕМА 21. ОБМІН СКЛАДНИХ БІЛКІВ

Мета: на основі співбесіди зі студентами закріпити знання про обмін нуклеїнових кислот та інших простетичних груп складних білків (на занятті головну увагу приділити вивченню обміну нуклеїнових кислот та гему хромопротеїнів).

Завдання: освоїти методику визначення сечової кислоти в сироватці крові.

Запитання для самопідготовки:

1. Перетравлення і засвоєння складних білків (нуклеопропротеїнів, хромопротеїнів, глікопротеїнів, ліпопротеїнів, фосфопротеїнів) – місце перетравлення, кінцеві продукти цього процесу.
2. Перетворення продуктів перетравлення нуклеїнових кислот у тканинах.
3. Кінцеві продукти катаболізму аденіну, гуаніну, цитозину, урацилу, тиміну. Послідовність реакцій їх утворення.
4. Синтез пуринових та піримідинових нуклеотидів.
5. Синтез РНК – транскрипція – вихідні речовини, ферменти, місце синтезу, принцип, який лежить в основі транскрипції.
6. Синтез ДНК – редуплікація (реплікація), місце редуплікації, вихідні продукти, принцип реплікації; ферменти, які приймають участь в цих реакціях.
7. Перетворення гема при катаболізмі хромопротеїнів.
8. Вихідні продукти та головні етапи синтезу гема.
9. Білірубін та білівердин, перетворення їх в стеркобілін та уробілін.
10. Сечова кислота та алантоїн – вихідні продукти і механізм утворення.

Сечова кислота відноситься до важливих нітрогенвмісних складових частин сечі. Сечова кислота у людини, приматів, більшості тварин, птахів і деяких рептилій є кінцевим продуктом пуринового обміну. В інших рептилій і деяких ссавців сечова кислота розщеплюється до алантоїну і у риб – до аллантоїнової кислоти і сечовини. Її кількість залежить як від вмісту пуринів в їжі, так і від кількості нуклеїнових кислот, які розпалися в організмі. При гарячкових станах, лейкемії виділення сечової кислоти збільшується. Солі сечової кислоти (урати) є головною складовою частиною відкладень, що виникають при подагрі в хрящах, сухожильних пазухах і слизових сумках суглобів.

Лабораторні роботи:

1. Визначення сечової кислоти в сироватці крові

Принцип методу. Сечова кислота відновлює фосфорно-вольфрамовий реактив, в результаті чого утворюються нижчі оксиди вольфраму синього кольору. Інтенсивність забарвлення пропорційна кількості сечової кислоти.

Обладнання та реактиви. Набір реактивів для визначення сечової кислоти; ФЕК; водяна баня; центрифуга лабораторна; мірні циліндри; штатив з пробірками; дозатори піпеткові; піпетки; сироватка крові.

Хід роботи.

Дослідна проба:

1. У пробірку вносять 1,6 мл дистильованої води.
2. Додають 0,2 мл сироватки крові та 0,1 мл розчину сульфатної кислоти.
3. Перемішують.
4. Додають 0,1 мл вольфрамату натрію.
5. Перемішують і через 10-20 хвилин центрифугують при 3000 об/хв.
6. У чисту пробірку відбирають 0,6 мл центрифугату.
7. Додають послідовно 0,3 мл розчину карбонату натрію та 0,2 мл реактиву Фоліна.
8. Перемішують і через 30 хвилин фотометрують у кюветі 10 мм при довжині хвилі 670 нм проти холостої проби.

Холоста проба:

Ставлять як дослідну, але замість центрифугату додають 0,6 мл води.

Калібрувальна проба:

Ставлять як дослідну, але замість сироватки додають 0,2 мл калібрувального розчину сечової кислоти. Стадію центрифугування виключають.

Концентрацію сечової кислоти в сироватці крові розраховують за формулою:

$$X = \frac{E_{\text{досл.}}}{E_{\text{кал.}}} \times C, \text{ де}$$

X – концентрація сечової кислоти в досліджуваній сироватці (ммоль/л);

C – концентрація сечової кислоти в калібрувальній пробі (0,3 ммоль/л);

$E_{\text{досл.}}$ – оптична щільність дослідної проби;

$E_{\text{кал.}}$ – оптична щільність калібрувальної проби.

Розрахунки та висновки: _____

Розділ 7. Функціональна біохімія

ТЕМА 22. БІОХІМІЯ КРОВІ

Мета: вивчити фізико-хімічні властивості та хімічний склад крові, її функції. Перевірити теоретичні знання з розділів «Біохімія крові» і «Обмін мінеральних речовин». Ознайомити студентів з методами кількісного визначення вмісту кальцію, магнію і фосфору в біологічних рідинах.

Завдання: засвоїти методи кількісного визначення кальцію та фосфору в крові сільськогосподарських тварин.

Питання для самопідготовки:

1. Головні функції крові для життєдіяльності організму.
2. Фізико-хімічні властивості крові, сироватки, лімфи: рН, осмотичний тиск, питома вага, в'язкість.
3. Що таке цілісна, стабілізована і дефібринована кров?
4. Сироватка, плазма крові. Дати їм визначення. Як їх отримати?
5. Назвіть буферні системи крові. Яка їх роль у підтримці кислотно-лужного стану?
6. Які речовини складають загальний і залишковий азот крові?
7. Білки плазми, місце їх синтезу, фізико-хімічні властивості, біологічна роль (альбуміни, глобуліни, фібриноген, ферменти).
8. Хімічний склад плазми (сироватки) крові, співвідношення між водою і сухими речовинами.
9. Мінеральні речовини крові сільськогосподарських тварин.
10. Яку роль виконують кальцій, магній і фосфор в обмінних реакціях організму.
11. Вміст кальцію, магнію і фосфору в крові сільськогосподарських тварин.
12. Принцип методу визначення кальцію в сироватці крові.
13. Принцип методу визначення магнію в безбілковому фільтраті крові.
14. Принцип визначення неорганічного фосфату в безбілковому фільтраті крові.

Лабораторні роботи:

1. Кількісне визначення кальцію в сироватці крові

Принцип методу. Кальцій визначають методом титрування із застосуванням комплексонів. Одним із них є мурексид, який в комплексі з кальцієм утворює сполуку забарвлену в рожевий колір. Іншим комплексоном є трилон Б, який має більшу спорідненість з кальцієм, ніж з мурексидом.

При титруванні досліджуваної рідини, до якої додаємо мурексид, розчином трилону Б, останній зв'язує кальцій, відщеплюючи його від сполуки з мурексидом. В еквівалентній точці весь кальцій переходить у комплексну сполуку з трилоном і розчин набуває фіолетового забарвлення.

Обладнання та реактиви. Набір реактивів для визначення кальцію; ФЕК; піпетки; дозатори піпеткові; сироватка крові.

Хід роботи.

1. У циліндр на 25 мл за допомогою піпетки переносять 1 мл сироватки крові.
2. Доводять дистильованою водою до мітки і цей розчин виливають у конічну колбу позначену «Д».
3. У конічну колбу позначену «К» за допомогою циліндра вносять 25 мл дистильованої води (контроль).
4. У колби додають по 2 мл 10% розчину NaOH і сухого мурексиду (на кінчику лопатки). З'являється рожеве забарвлення.
5. Вміст колб титрують з мікробюретки 0,01н розчином трилону Б до переходу рожевого забарвлення в фіолетове. Об'єм трилону Б (V_d і V_k) записують для розрахунку за формулою:

$$Ca = (V_d - V_k) \times K \times 0,2 \times 100, \text{ де}$$

V_d – кількість 0,01н розчину трилону Б, витраченого на титрування дослідної проби, мл;

V_k – кількість 0,01н розчину трилону Б, витраченого на титрування контрольної проби, мл;

K – поправочний коефіцієнт 0,01н розчину трилону Б (0,5);

0,2– кількість кальцію, еквівалентна 1 мл 0,01н розчину трилону Б, мл;

100– перерахунок у мг%.

Розрахунки та висновки: _____

2. Кількісне визначення неорганічного фосфору в сироватці крові

Принцип методу. Неорганічний фосфор визначають у безбілковому фільтраті сироватки крові колориметричним методом. Аніон фосфатної

кислоти дає кольорову реакцію в присутності молібдату амонію і аскорбінової кислоти. Інтенсивність синього забарвлення пропорційна концентрації фосфату в сироватці крові.

Обладнання та реактиви. Набір реактивів для визначення неорганічного фосфору; ФЕК; піпетки; дозатори піпеткові; сироватка крові.

Хід роботи.

1. У центрифужну пробірку налити 2 мл сироватки крові.
2. Додати 6 мл дистильованої води і 2 мл ТХО.
3. Ретельно перемішати паличкою і залишити на 5 хвилин.
4. Центрифугують 10 хвилин при 3000 об/хв.
5. Осад білка, який утворився, відділяють фільтруванням, причому фільтрують рідину в градуйовану центрифужну пробірку. Як тільки відфільтрується 5 мл рідини, фільтрування припиняють і в центрифужній пробірці проводять кольорову реакцію на фосфор.
6. У пробірку додають 2 мл розчину молібдату амонію та 1 мл розчину аскорбінової кислоти; об'єм рідини доводять дистильованою водою до мітки 10 мл і перемішують.
7. Через 5-10 хвилин забарвлені розчини колориметрують на ФЕК з червоним світлофільтром (№ 8) проти води в кюветах з товщиною 10 мм.

Концентрацію неорганічного фосфору, мг% в сироватці крові знаходять за стандартною кривою.

ВМІСТ ФОСФОРУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ (мг/мл)

- Корова – 4,0-5,0;
- Кінь – 3,5-5,0;
- Свиня – 3,0-4,0;
- Вівці – 3,5-5,0.

Висновки: _____

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Кононський О.І. Фізична і колоїдна хімія: Підручник. – 2-е вид., доп. і випр./ О.І. Кононський – К.: Центр учбової літератури, 2009. – 312с.
2. Чечоткін О.В. Біохімія с.-г. тварин / О.В. Чечоткін, В.І. Воронянський, М.І. Карташов. – Харків, РВВ ХЗВІ, 2000 р. – 464 с.
3. Губський Ю.І. Біологічна хімія. Підручник / Ю.І. Губський. – Київ – Вінниця: НОВА КНИГА, 2009. – 664 с.
4. Практикум з біологічної хімії. Навчально-методичний посібник для студентів с.-г. закладів освіти III-IV рівнів акредитації / під редакцією професора О.В. Жегунова. – Харків: «БУРУН і К», 2014. – 304с.
5. Біохімія. Практикум / Л. І. Остапченко, І. В. Компанець, О. В. Скопенко та ін. – К. : Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2018. – 296 с.
6. Система MOODLE. Кафедра фізіології та біохімії тварин, 2023.

Навчальне видання

ПРИХОДЧЕНКО Віта Олександрівна
ГЛАДКА Наталія Іванівна
ДЕНИСОВА Ольга Миколаївна
ЯКИМЕНКО Тетяна Ігорівна

БІОХІМІЯ ТВАРИН
Робочий зошит

Формат 60x84/16. Гарнітура Times New Roman
Папір для цифрового друку. Друк ризографічний.
Ум. друк. арк. 74,40.
Наклад ___ пр.
Державний біотехнологічний університет
61002, м. Харків, вул. Алчевських, 44

