

**Київський національний університет імені Тараса Шевченка**

***Рекомендації до лабораторних робіт  
із дисципліни “БІОАНАЛІТИЧНА ХІМІЯ” для студентів  
ОР МАГІСТР спеціальність 102-Хімія.  
ХІМІЧНІ ТА ІНСТРУМЕНТАЛЬНІ МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ  
БІОЛІГАНДІВ. ЗАСТОСУВАННЯ ФЕРМЕНТІВ В АНАЛІЗІ.***

**Навчальний посібник**

Редакція 2 (доповнена і перероблена)

ВПЦ «Київський університет»

Київ- 2024

УДК 543.2: 577.

Рекомендації до лабораторних робіт із дисципліни “Біоаналітична хімія” для студентів ОР магістр спеціальність 102-Хімія. Хімічні та інструментальні методи визначення біолігандів. Застосування ферментів в аналізі. Навчальний посібник. Редакція 2. (доповнена і перероблена). Упоряд.: д.х.н., доц. О.Ю. Тананайко, к.х.н., О.Б. Воловенко, к.х.н. В.М. Левчик - К.: ВПЦ “Київський університет”, 2024. - 84 с.

У навчальному посібнику дано коротку теорію та описи методик виконання лабораторних робіт з якісного та кількісного визначення біолігандів, а також ферментативних методів аналізу у межах курсу «Біоаналітична хімія». У другому виданні розширено і доповнено лабораторні роботи з визначення амінокислот та білків фотометричними і хроматографічними методами аналізу, а також розділ з ферментативного аналізу.

Посібник призначений для студентів хімічних спеціальностей вищих навчальних закладів, він також може бути корисним для студентів біологічних, медичних спеціальностей та харчових технологій.

Рецензенти: д.х.н., проф., директор Інституту високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка **І.В. Комаров**

к.х.н., доцент кафедри органічної хімії хімічного факультету хімії Київського національного університету імені Тараса Шевченка **О.В. Хиля**

Рекомендовано до друку  
Вченою радою хімічного факультету Київського національного університету імені Тараса Шевченка.  
Протокол № 11 від 29 травня 2024 р.

Ухвалено  
Науково-методичною радою Київського національного університету імені Тараса Шевченка.  
Протокол № 09-24 від 24 жовтня 2024 р.

© Київський національний університет імені Тараса Шевченка 2024

## ВСТУП

Навчальний посібник є доповненим другим виданням рекомендацій до лабораторних робіт, що виконуються в рамках курсу «Біоаналітична хімія», для студентів хімічних факультетів ОР магістр, спеціальність 102 - Хімія. Розробки включають лабораторні роботи з хімічних та інструментальних методів визначення основних класів біолігандів, а також роботи з ферментативних методів аналізу. До збірки увійшли класичні реакції, що застосовуються для якісного визначення біолігандів та методики кількісного визначення вуглеводів, ліпідів, амінокислот, нуклеїнових кислот, білків, зокрема: титриметричні, фотометричні, електрохімічні (потенціометрія, вольтамперометрія), особлива увага приділена хроматографічним методам аналізу. Остання тема присвячена ферментам - їх виділенню з біологічного матеріалу, визначенню активності та застосуванню в аналізі неорганічних і органічних сполук.

Більшість лабораторних робіт містить опис особливостей пробопідготовки при визначенні біолігандів у реальних об'єктах. У кінці кожної теми наведено контрольні запитання для перевірки якості засвоєння тем лекційного курсу, виконання лабораторних робіт та підготовки до контрольних робіт. У другому виданні розширено і доповнено лабораторні роботи з визначення амінокислот та білків фотометричними і хроматографічними методами аналізу, а також розділ з ферментативного аналізу.

Основна мета навчального посібника – ознайомити студентів хімічних спеціальностей з особливостями аналізу біомолекул та основами ферментативного аналізу, а також допомогти в освоєнні тем лекційного курсу.

Частина робіт, наведених у розробках, включена до лабораторного практикуму з біоаналітичної хімії хімічного факультету КНУ імені Тараса Шевченка.

Посібник буде цікавим окрім студентів хімічних спеціальностей, також для студентів біологічних, медичних спеціальностей та харчових технологій.

## Тема 1. ВУГЛЕВОДИ

**Вуглеводи (карбогідрати)**- це речовини, що містять карбонільну та кілька гідроксильних груп у своєму складі (альдегідо- або кетоспирти). *Моносахариди* - це прості вуглеводи, що не здатні гідролізувати. Моносахариди, що містять альдегідну групу, називаються альдози, а кетонну групу - кетози. Залежно від кількості атомів вуглецю в молекулі моносахариди діляться на: біози, тріози, тетрози, пентози, гексози і т.д. У складі вуглеводів міститься хіральний атом вуглецю, отже вони є оптично активними і мають *D*(-) та *L*(+) оптичні ізомери. В живих організмах превалюють *D*-ізомери вуглеводів. Окрім того, у твердому стані та переважно у розчинах моносахариди, починаючи з пентоз, існують у циклічній формі. При цьому утворюється ковалентний зв'язок між вуглецем карбонільної групи й киснем однієї з гідроксильних груп (для пентоз та гексоз - передостанньої), а згаданий атом вуглецю стає асиметричним (хіральним). У результаті в циклічній формі вуглеводів можливе існування двох типів стереоізомерів —  $\alpha$  і  $\beta$ . Моносахариди можуть вступати один з одним в реакцію конденсації за рахунок утворення глікозидного зв'язку. У результаті утворюються *олігосахариди*, а також *полісахариди*.

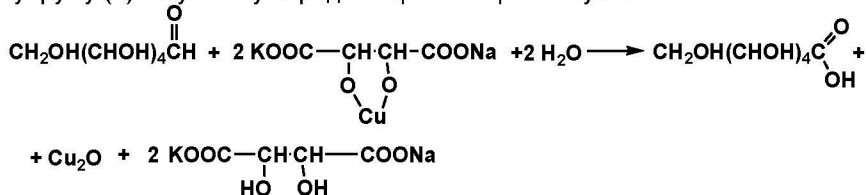
Нижче наведено типові якісні реакції визначення пентоз, гексоз, а також ди- та полісахаридів та методики кількісного визначення фруктози і лактози.

### Лабораторна робота № 1

#### 1. Якісні реакції на моносахариди

##### Дослід 1. Реакція Фелінга

Розчини альдоз в лужному середовищі відновлюють купрум (II) до одновалентного оксиду купрум(І), а самі окиснюються до альдонових кислот. В реакції використовують реактив Фелінга- тартратний комплекс купрум(II) в лужному середовищі. Реакція описується схемою:



Аналогічну реакцію дають аліфатичні альдегіди.

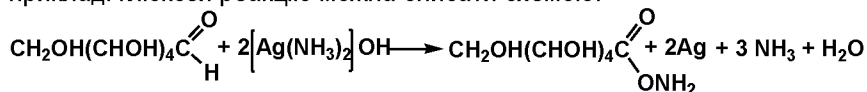
*Розчини, реактиви, обладнання:* розчин альдози (5% розчин глюкози), реактив Фелінга: розчин  $\text{CuSO}_4$ , 2% та лужний розчин сегнетової солі: 200 г тартратів натрію і калію та 150 г гідроксиду натрію розчиняють у воді та

доводять об'єм розчину до 1 л. Перед роботою змішують обидва розчини у рівних об'ємах. Пробірки.

*Хід роботи:* в пробірку вносять 1 мл глюкози та 1 мл реактиву Фелінга. Вміст пробірки перемішують та нагрівають на полум'ї до кипіння. Спостерігають утворення червоного осаду оксиду купруму (I).

### **Дослід 2. Реакція срібного дзеркала**

Альдози відновлюють аргентум (I) з його аміачного комплексу до металічного, окислюючись при цьому до кислоти (*проба Толленса*). На прикладі глюкози реакцію можна описати схемою:



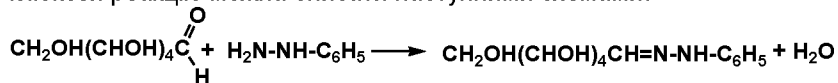
Реакція менш специфічна, ніж з солями купруму (II). Аналогічно з аргентумом (I) взаємодіють аліфатичні та ароматичні альдегіди, деякі кетони, ароматичні аміни, феноли. Прості кетони при кімнатній температурі з солями аргентуму не взаємодіють.

*Розчини, реактиви, обладнання:* 5% розчин глюкози, 1 моль/л розчин нітрату аргентуму, 5% розчин гідроксиду натрію, 10% водний розчин амоніаку. Пробірки.

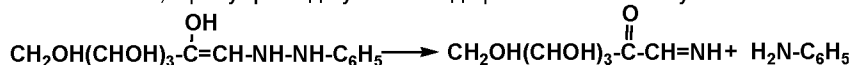
*Хід роботи:* в пробірку вносять 1 мл нітрату аргентуму, 1 мл гідроксиду натрію і розчин амоніаку до повного розчинення осаду гідроксиду аргентуму, що утворився. Потім у пробірку доливають 3 мл глюкози, перемішують, обережно нагрівають у полум'ї пальника і спостерігають появу блискучого дзеркального нальоту металічного срібла на стінках пробірки.

### **Дослід 3. Реакція з фенілгідазином**

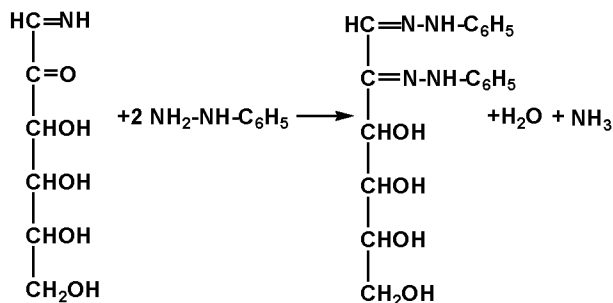
Гексози та пентози взаємодіють з гідазином або фенілгідазином з утворенням гідазонів або озазонів. Ця реакція характерна для альдегідів та кетонів. Реакція проходить у три стадії. Спочатку утворюється *фенілгідазон* у вигляді білих кристалів. На прикладі D-глюкози реакцію можна описати наступними схемами:



Далі таутомерна форма фенілгідазону перетворюється на *моноімін кетальдегід*, що супроводжується відщепленням аніліну:



Кетальдегід реагує ще з двома молекулами фенілгідразину з утворенням *озазону*, який випадає у вигляді жовтих кристалів:



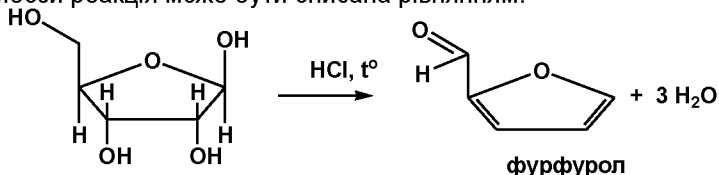
В залежності від вихідних моносахаридів, що беруть участь у реакції з фенілгідрaziном, утворюються озазони різного складу. Аналогічну реакцію з фенілгідрaziном дають всі прості оксиальдегіди та оксикетони.

*Розчини, реактиви, обладнання:* 5% розчин глюкози, насичені розчини фенілгідрaziну та ацетату натрію. Пробірки, водяна баня.

*Хід роботи:* у пробірку вносять 5 мл розчину глюкози, по 2 мл розчинів фенілгідрaziну та ацетату натрію, потім суміш у пробірці перемішують та поміщають у киплячу водяну баню на 30-40 хв. Після охолодження спостерігають утворення жовтих кристалів озазонів на дні пробірки.

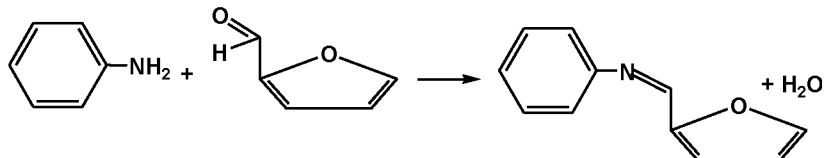
#### **Дослід 4. Утворення фурфуролів та реакції їх конденсації**

Під час нагрівання кетоз або пентоз з концентрованою сульфатною або хлороводною кислотами відбувається дегідратація моносахаридів з утворенням фурфуролів або оксиметилфурфуролів. Для рибози реакція може бути описана рівнянням:



Фурфуроли (оксиметилфурфуроли) утворюють забарвлені продукти конденсації з фенолами та ароматичними амінами, що покладено в основу їх якісного визначення. Так, наприклад, з аніліном утворюється продукт червоного кольору, з орцином у присутності слідових кількостей солей заліза (III) фурфурол утворює сполуку зеленого кольору, з

фенолом чи резорцином - вишнево- червоного, з  $\alpha$ -нафтолом чи тимолом утворюються трифенілметанові барвники, які при окисненні перетворюються на забарвлені у червоний колір хіноїдні сполуки. Реакція фурфуролу з аніліном може бути описана схемою:



*Розчини, реактиви, обладнання:* 0,5% розчини рибози, дезоксирибози та фруктози, концентровані HCl або H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; кристалічні фенол та резорцин, 1% спиртові розчини дифеніламіну,  $\alpha$ -нафтолу і тимолу. Пробірки, водяна баня

*Хід роботи:* в 5 пробірок вносять по 5 мл розчинів кетози чи пентози, далі в першу пробірку додають декілька кристалів фенолу, в другу - резорцину, в третю - 2 мл розчину дифеніламіну, в четверту – 2 мл  $\alpha$ -нафтолу, в п'яту – 2 мл тимолу. В усі пробірки обережно по стінці додають 1-1,5 мл концентрованої хлороводневої або сульфатної кислоти. Перші три пробірки нагрівають 10 хв на киплячій водяній бані. Дві останні залишають стояти при кімнатній температурі. Далі спостерігають за зміною забарвлення розчинів.

## 2. Дисахариди. Окисно- відновні властивості дисахаридів

Дисахариди- сполуки, що складаються з двох залишків моносахаридів, сполучених глікозидним зв'язком. Дисахариди за окисно-відновними властивостями діляться на два типи: *відновлюючі* та *невідновлюючі*. Молекули дисахаридів першого типу з'єднані через глікозидний зв'язок в положенні 1,4 (перший вуглець однієї молекули зв'язаний через кисневий місток з четвертим вуглецем другої молекули). При цьому другий напівацетальний гідроксил залишається вільний, і дисахариди вступають в реакції, характерні для альдоз, зокрема, відновлення купруму (II) чи арґентуму(I). До відновлюючих дисахаридів належать: мальтоза, лактоза, целобіоза. В молекулах дисахаридів другого типу, що з'єднані 1,1- глікозидним зв'язком, вільних напівацельних гідроксилів немає і вони не відновлюють купрум (II) або арґентум (I). До невідновлюючих дисахаридів належать, зокрема: сахароза, трегалоза. Відновлюючі властивості таких сахаридів повертаються після гідролізу.

### **Дослід 1. Порівняння окисно-відновних властивостей лактози, мальтози та сахарози**

*Розчини, реактиви, обладнання:* 2% розчини лактози, сахарози, мальтози, реактив Фелінга: розчин  $\text{CuSO}_4$  2% та лужний розчин сегнетової солі (200 г тартратів натрію і калію та 150 г гідроксиду натрію розчиняють у воді та доводять до об'єму 1 л. Перед роботою змішують обидва розчини у рівних об'ємах.); 1 М розчин нітрату аргентуму, 5% розчин гідроксиду натрію, 10% водний розчин амоніаку. Пробірки, водяна баня.

*Хід роботи:* в одну пробірку наливають 2 мл реактиву Фелінга, в іншу- 1 мл нітрату аргентуму (I), 1 мл гідроксиду натрію і розчин аміаку до повного розчинення осаду гідроксиду аргентуму (I), що спочатку утворився. Потім до кожної пробірки додають по 3 мл розчину дисахариду, що досліджується, перемішують, обережно нагрівають у полум'ї пальника і спостерігають за ефектом реакції. Відмічають, які з досліджуваних дисахаридів мають відновлюючі властивості, а які ні.

### **Дослід 2. Окисно-відновні властивості сахарози після гідролізу**

*Розчини, реактиви, обладнання:* 2% розчин сахарози, хлороводнева кислота концентрована, 1М розчин NaOH, пекарські дріжджі, реактив Фелінга, 1 М розчин нітрату аргентуму, 5% розчин гідроксиду натрію, 10% водний розчин амоніаку. Пробірки, водяна баня, універсальний індикаторний папір.

*Хід роботи.*

Кислотний гідроліз: в пробірку додають 2-4 мл сахарози, декілька краплин концентрованої хлороводневої кислоти і поміщають на киплячу водяну баню на 15 хв. Після чого суміш охолоджують, нейтралізують гідроксидом натрію за індикаторним папером до нейтрального значення рН і проводять вищезгадані реакції окиснення- відновлення (див дослід 1,2, с. 4). З частиною гідролізату проводять реакцію на фруктозу з резорцином (див дослід 4, с. 5).

Ферментативний гідроліз: Ферменти- сахараза та інвертаза, що знаходяться у пекарських дріжджах, каталізують процес гідролізу молекули сахарози на глюкозу та фруктозу.

1-1,5 г пекарських дріжджів розтирають у ступці з 10 мл води до одержання однорідної суміші. В дві пробірки наливають по 3 мл суміші дріжджів з водою. Одну пробірку ставлять на киплячу водяну баню на 10 хвилин для дезактивації ферменту та охолоджують під струменем води (холоста проба). Потім в обидві пробірки додають по 3 мл розчину сахарози і залишають стояти 5-10 хв. Осади відфільтровують, у



фільтраті проводять окисно- відновні реакції на моносахариди з солями купруму (II) чи арґентуму(I) (дослід 1,2, с.4). Спостерігають в якій пробі реакція відбувається, у якій- ні. Роблять відповідні висновки.

### 3. Якісні реакції на полісахариди

Полісахариди - це високомолекулярні природні вуглеводи, що здатні гідролізувати. Після кислотного гідролізу полісахариди розкладаються на моносахариди, які можна визначити за допомогою вищезгаданих реакцій. В той же час полісахариди мають специфічні реакції.

#### **Дослід 1. Реакція крохмалю та глікогену з йодом**

При взаємодії крохмалю або глікогену з молекулярним йодом утворюються адсорбційні сполуки, забарвлені відповідно у синій (крохмаль) та червоний (глікоген) кольори. Целюлоза не утворює таких сполук.

*Розчини, реактиви, обладнання:* 1% розчини крохмалю та глікогену, 0,05н розчин йоду. Пробірки, піпетки.

*Хід роботи:* в одну пробірку наливають 2 мл розчину крохмалю, в іншу 2 мл розчину глікогену. Далі до обох пробірок додають розчин йоду і вміст пробірок перемішують.

#### **Дослід 2. Гідроліз крохмалю та визначення глюкози**

При нагріванні крохмалю з мінеральними кислотами відбувається гідроліз полімеру з виділенням молекул глюкози, яка дає реакції, характерні для моносахаридів.

*Розчини, реактиви, обладнання:* 1% розчин крохмалю, концентрована хлороводнева кислота, реактив Фелінґа: розчин  $\text{CuSO}_4$  2% та лужний розчин сегнетової солі (200 г тартратів натрію і калію та 150 г гідроксиду натрію розчиняють у воді та доводять до об'єму 1 л. Перед роботою змішують обидва розчини у рівних об'ємах.). Пробірки, водяна баня.

*Хід роботи:* у дві пробірки наливають по 5 мл розчину крохмалю. В першу пробірку вносять 2-3 краплі концентрованої хлороводневої кислоти і кип'ятять на водяній бані 15 хв. Друга пробірка залишається без змін. Далі в обидві пробірки додають реактив Фелінґа і перевіряють окисно – відновні властивості розчинів у пробірках. Роблять відповідні висновки.

## Лабораторна робота № 2.

### Фотометричне визначення фруктози

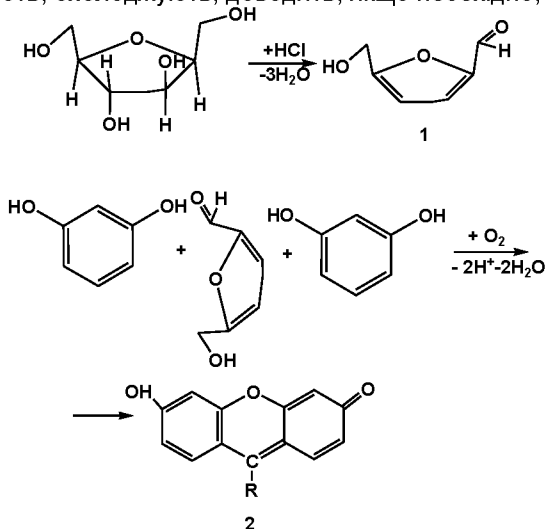
При нагрівання фруктози та її ефірів у середовищі концентрованої хлороводневої кислоти відбувається утворення оксиметилфурфуролу (1), який з резорцином дає продукт конденсації (2) рожевого кольору. Реакція проходить за схемою 1(с 10).

Інтенсивність забарвлення розчину пропорційна концентрації фруктози. Аналогічну реакцію дають інші кетози. Градувальний графік лінійний в діапазоні концентрацій фруктози  $1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$  моль/л.

*Розчини, реактиви, обладнання:* розчин фруктози  $10^{-4}$  М; концентрована хлороводнева кислота, 0,1% розчин резорцину у 98 % спирті.

Пробірки на 10мл з поділками, водяна баня, фотоелектроколориметр КФК, кювети з товщиною шару 0,5 см.

*Хід роботи:* у пробірку додають 1 мл досліджуваного розчину фруктози, 1 мл резорцину, 3 мл хлороводневої кислоти і 1 мл води. Суміш перемішують та ставлять на водяну баню при  $80^{\circ}\text{C}$  на 10 хв. Пробу виймають, охолоджують, доводять, якщо необхідно, об'єм



R- залишок оксиметилфурфуролу

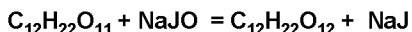
Схема 1.

розчину до 6 мл водою, переносять у кювету  $l = 0,5$  см та вимірюють інтенсивність забарвлення при  $\lambda = 450$  нм на КФК відносно води. Вміст фруктози у пробі визначають за градувальним графіком, який одержують аналогічно, використовуючи стандартний розчин фруктози. Для цього у 6 пробірок відбирають: 0,2; 0,4; 0,8; 1,0; 1,4; 1,8 та 2,0 мл розчину фруктози, додають інші компоненти як описано вище та, якщо необхідно, воду до загального об'єму суміші 6 мл. Далі проводять всі описані вище процедури. Важливо стежити за рівномірним нагріванням сумішей на водяній бані, оскільки неоднакове нагрівання може призводити до похибок визначення. За одержаними даними будують градувальний графік в координатах:  $A_{450} - C_{\text{фруктози}}$ , моль/л.

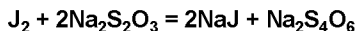
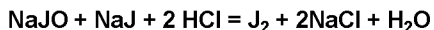
### Лабораторна робота № 3

#### Титриметричне визначення лактози в молоці

В основі методу лежить здатність альдегідної групи лактози окиснюватись в лужному середовищі йодатом, за реакцією:



Надлишок йодату, що не прореагував з вуглеводнем, переводиться у йод при підкисленні розчину і відтитровується тиосульфатом з використанням крохмалю як індикатору:



Визначення лактози у молоці проводять після осадження білку казеїну і жирів хлорводневою кислотою.

*Розчини, реактиви, обладнання:* молоко (нежирне), NaOH – 1 моль/л; NaF – 0,5 моль/л (2%); 1 М  $CH_3COOH$  розчини: йоду (0,1н), тиосульфату (0,1н); HCl – 1 моль/л, 1% водний розчин крохмалю. Мірні колби на 25 мл, конічні колби на 100 мл, скляні лійки, паперові фільтри (червона стрічка); піпетки на 5 і 10 мл, бюретки.

*Хід роботи:* у дві мірні колби на 25 мл вносять по 2,0 мл 1 М  $CH_3COOH$ , 1,5 мл NaF. В першу колбу додають 2,5 мл молока і дистильовану воду до мітки, в іншу тільки воду до мітки (холоста проба), перемішують і через 25-30 хв проби фільтрують через паперовий фільтр, або центрифугують протягом 5 хв при швидкості 1500 об/хв. У дві конічні колби переносять по 10 мл фільтрату (супернатанту) проб, додають 10 мл розчину йоду та, помішуючи, 5 мл NaOH до

знебарвлення розчину. Колби закривають та ставлять у темне місце. Через 20 хв до вмісту колб додають по 7 мл HCl та відразу титрують йод, що виділився, тіосульфатом. Коли розчин стане солом'яно – жовтим додають крохмаль і продовжують титрування, інтенсивно перемішуючи суміш, до зникнення синього забарвлення розчину (синій колір не повинен з'являтися протягом 1 хвилини після завершення титрування).

Масову концентрацію лактози у молоці ( $C$ , мг/мл) визначають за формулою:

$$C = \frac{(V_0 - V) \cdot C_N \cdot E \cdot 25}{V_M \cdot V_a}$$

де;  $V_0$  – об'єм тіосульфату, витрачений на титрування холостої проби, мл;  $V$  – об'єм тіосульфату, витрачений на титрування проби молока, мл;  $C_N$  – молярна концентрація еквіваленту розчину тіосульфату, моль/л;  $E$  – молярна маса еквіваленту лактози =  $\frac{1}{2} M_r$ ; 25 – загальний об'єм проби, мл;  $V_a$  – об'єм аліквоти, мл;  $V_M$  – об'єм проби молока, взятий для аналізу (2,5 мл).

Розраховують масову частку лактози в молоці ( $\omega$ , %) вважаючи, що густина молока становить 1,0 г/см<sup>3</sup>. Одержаний результат порівнюють з даними, наведеними на упаковці молока.

### Контрольні запитання

1. Які реакції застосовуються для якісного визначення кетоз і альдоз?
2. Які вуглеводи та за яких умов утворюють фурфуроли? У чому полягає метод їх подальшого визначення?
3. Охарактеризуйте методи кількісного визначення моносахаридів.
4. На чому ґрунтується метод кількісного визначення лактози?
5. Охарактеризуйте титриметричні методи визначення дисахаридів.
6. Охарактеризуйте хроматографічні методи визначення вуглеводів.
7. Що таке відновлюючі та невідновлюючі дисахариди? Наведіть приклади відповідних дисахаридів.
8. Назвіть етапи аналізу оліго- та полісахаридів.
9. Які методи якісного та кількісного визначення полісахаридів вам відомі?
10. Охарактеризуйте роль вуглеводів в живих організмах.

## ТЕМА 2. ЛІПІДИ

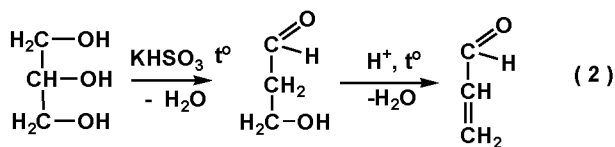
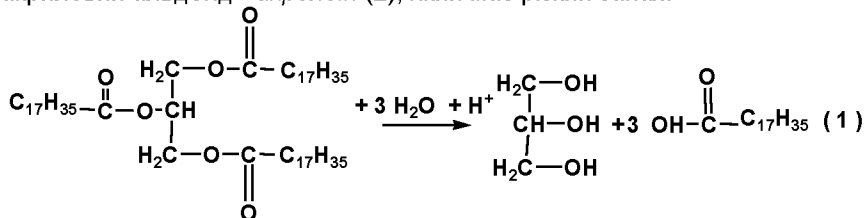
До ліпідів відносять жири та жироподібні сполуки. Всі ліпіди нерозчинні у воді та, в залежності від гідрофобності, розчинні в органічних розчинниках різної полярності (бензол, насичені та ненасичені вуглеводні, хлороформ, ацетон, діетиловий етер, етанол, сірковуглець та ін.). За хімічною природою ліпіди ділять на: нейтральні ліпіди (жири) або триацилгліцериди; фосфоліпіди; гліколіпіди; цереброзиди; гангліозиди; стерини та стериди; віск, тощо. Нижче наведено якісні реакції визначення триацилгліцеридів, фосфоліпідів та стеринів, а також деякі методики їх кількісного аналізу.

### Лабораторна робота № 1.

#### Якісні реакції на триацилгліцериди

##### 1. Виявлення гліцеролу

При нагріванні триацилгліцериду з гідросульфатом натрію або калію у кислому середовищі спочатку відбувається гідроліз молекули з утворенням карбонових кислот та гліцеролу (1), а потім відщеплення двох молекул води від гліцеролу та перетворення останнього на акриловий альдегід - *акролеїн* (2), який має різкий запах:



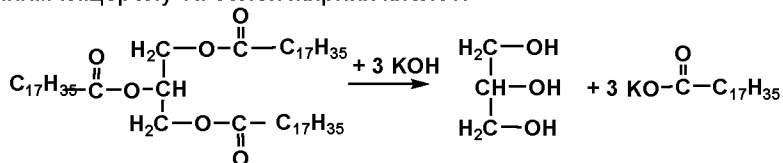
Акролеїн дає синє забарвлення з водним розчином нітропрусиду натрію, що містить піперидин. У лужному середовищі забарвлення стає червоно- фіолетовим.

*Розчини, реактиви, обладнання:* жир (соняшникова олія); 0,5 моль/л HCl; 0,05 моль/л KOH; сухий гідросульфат калію або натрію, розтертий у порошок; нітропрусид натрію та піперидин, змішані у співвідношенні 1:1. Пробірки, фільтрувальний папір, пальник.

*Хід роботи:* у пробірку поміщають 1 мл жиру, краплю кислоти, та на кінчику шпателя сухий гідросульфат калію або натрію. Суміш перемішують та обережно нагрівають у полум'ї пальника. З'являються білі пари акролеїну, що має характерний різкий запах. Пробірку прикривають фільтрувальним папером, змоченим у суміші нітропрусиду натрію та піперидину, і спостерігають забарвлення паперу в синій колір, який переходить у червоний, якщо пляму обробити лугом.

## 2. Виявлення жирних кислот

При взаємодії жирів з розчином лугу відбувається їх гідроліз з утворенням гліцеролу та солей жирних кислот:



Натрієві солі жирних кислот являють собою тверді, а калієві солі - рідкі мила. При взаємодії сильної кислоти з милом утворюються нерозчинні у воді жирні кислоти, які піднімаються на поверхню води.

*Розчини, реактиви, обладнання:* жир (соняшникова олія); HCl 1:1; KOH, 30% спиртовий розчин; пробірки, пробки з повітряним холодильником, водяна баня.

*Хід роботи:* у пробірку поміщають 0,5 мл рослинного масла, 10 мл гідроксиду калію, закривають пробкою з повітряним холодильником і нагрівають на киплячій водяній бані 30 хв. Спостерігають утворення мила. До 5 мл розчину мила додають 1-2 мл хлороводневої кислоти і спостерігають виділення вільних жирних кислот, що піднімаються на поверхню рідини.

## 3. Виявлення ненасичених жирних кислот

Ненасичені жирні кислоти здатні приєднувати галогени по місцях подвійних зв'язків. Розчин бромну або йоду при цьому знебарвлюється.

*Розчини, реактиви, обладнання:* жир (соняшникова олія); бромна або йодна вода, хлороформ, пробірки.

*Хід роботи:* у пробірку поміщають 1 - 2 мл рослинного масла, 2-3 мл хлороформу і додають декілька краплин бромної або йодної води. Спостерігають знебарвлення розчину галогену, що свідчить, про присутність ненасичених карбонових кислот у складі жиру.

## Лабораторна робота №2.

### Кількісне визначення триацилгліцеридів

#### 1. Визначення числа омилення жиру

Числом омилення жиру називається кількість гідроксиду калію (мг), що необхідна для нейтралізації всіх жирних кислот (вільних, а також тих, що входять до складу триацилгліцеридів) в перерахунку на 1,00 г жиру. Число омилення визначається після лужного гідролізу жиру шляхом титрування надлишку лугу, що не прореагував з жирними кислотами, хлороводневою кислотою з індикатором фенолфталеїном.

*Розчини, реактиви, обладнання:* соняшникова олія або твердий жир (масло, маргарин); 0,1% спиртовий розчин фенолфталеїну, 0,5 н HCl; 0,5 н KOH (спочатку готують 10 мл 10 моль/л водного розчину цього лугу, а потім розводять очищеним етанолом до необхідної концентрації), розчин лугу зберігають щільно закритим для попередження доступу вуглекислого газу.

Круглодонні колби на 50 мл зі шліфами, пробки з повітряним холодильниками, водяна баня, мірні піпетки, бюретки, конічні колби для титрування, аналітичні терези.

*Хід роботи:* в першу круглодонну колбу на 50 мл поміщають 0,5 мл олії або 0,50 г твердого жиру, зваженого на аналітичних терезах, (проба, що аналізується. **Жир попередньо нагрівається, щоб розплавитися**), в іншу - 0,5 мл дистильованої води (контрольна проба). В обидві колби додають по 15 мл спиртового розчину KOH, закривають пробкою з повітряним холодильником та нагрівають протягом 50 хв на киплячій водяній бані для повного гідролізу жиру та нейтралізації жирних кислот лугом. Далі колби охолоджують до 30-40°C, додають в кожну по 4 краплі фенолфталеїну і титрують вміст колб 0,5 н розчином HCl до повного зникнення рожевого забарвлення. Кількість KOH (мг), що пішла на нейтралізацію жирних кислот в перерахунку на 1,00 г жиру (число омилення, *ЧО*) розраховують за формулою:

$$ЧО = \frac{(V_0 - V)}{m} \cdot C_H \cdot E$$

де,  $V_0$  та  $V$  – об'єми стандартного розчину хлороводневої кислоти (мл), що були витрачені на титрування контрольної проби та проби, яка аналізується, відповідно;  $C_H$  – молярна концентрація еквіваленту розчину хлороводневої кислоти, моль/л;  $E$  – молярна маса еквіваленту KOH;  $m$  – наважка жиру (г).

## 2. Визначення кислотного числа жиру

Кислотним числом називається кількість гідроксиду калію (мг), що необхідна для нейтралізації лише вільних жирних кислот, що містяться в 1,00 г жиру. Кислотне число визначають титруванням спиртового розчину жиру гідроксидом калію.

*Розчини, реактиви, обладнання:* жир твердий (масло, маргарин) або соняшникова олія; 0,1% спиртовий розчин фенолфталеїну; 0,1н HCl; 0,1 н KOH, водний розчин, очищений етанол.

Бюретки, конічні колби для титрування на 50 мл, мірні піпетки, аналітичні терези.

*Хід роботи:* в конічну колбу для титрування вносять 5 мл спирту, додають 4 краплі фенолфталеїну. Якщо розчин став рожевий, то обережно по краплинах додають до нього HCl до зникнення забарвлення. Далі в розчин вносять 1,00 г жиру, зваженого на аналітичних терезах, (або 1,0 мл олії) та інтенсивно збовтують протягом хвилини для повного розчинення вільних жирних кислот в спирті. Одержану суміш титрують розчином лугу до появи незникаючого рожевого забарвлення, ретельно перемішуючи після додавання кожної порції титранту,. Титрування повторюють ще два рази. Розраховують середній об'єм лугу, що пішов на титрування, та обчислюють кислотне число жиру ( $KЧ$ ), тобто, кількість KOH (мг), що була витрачена на нейтралізацію вільних жирних кислот в 1,00 г жиру, за формулою:

$$KЧ = \frac{V \cdot C_H \cdot E}{m}$$

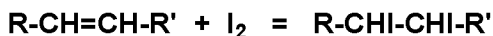
де,  $V$ - середній об'єм рочину лугу, що пішов на титрування, мл;  $C_H$  – молярна концентрація еквіваленту KOH, моль/л;  $E$ - молярна маса еквіваленту KOH,  $m$  – наважка жиру, г.

## 3. Визначення естерного числа жиру

Естерним числом називається кількість KOH у мг, необхідна для нейтралізації жирних кислот, які вивільнюються в результаті гідролізу триацилгліцеридів, в 1,00 г жиру. Даний показник розраховується як різниця між числом омилення (ЧО) та кислотним числом (КЧ) жиру.

## 4. Визначення йодного числа жиру

Йодним числом жиру називається кількість йоду в г, що взаємодіє з 100,0 г жиру. Цей показник свідчить про наявність ненасичених жирних кислот у складі жирів. Реакція відбувається за схемою:



де R та R' – алкільні радикали.



Визначення йодного числа проводять титриметрично, шляхом додавання стандартного розчину йоду до спиртового розчину жиру. Надлишок йоду, що не прореагував, відтитровують тіосульфатом натрію.

*Розчини, реактиви, обладнання:* жир твердий (масло, маргарин) або соняшникова олія; спиртовий розчин йоду, 0,2 н (свіжеприготовлений); водний розчин тіосульфату натрію 0,2 н;  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (льод) 0,1 н; 1% розчин крохмалю. Бюретки, конічні колби для титрування на 50 мл, мірні піпетки

*Хід роботи:* в першу колбу для титрування вводять 2,0 – 5,0 г твердого жиру або 5,0 г олії, зважених на аналітичних терезах (проба, що аналізується), в другу - 5 мл дистильованої води (контрольна проба). В обидві колби додають по 5 мл спиртового розчину йоду, 5 мл  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (льод) перемішують, закривають і залишають стояти в темному місці 1 год. Далі вміст колб титрують стандартним розчином тіосульфату натрію спочатку без крохмалю, а потім, коли розчин стане світло-жовтим, додають 1 мл крохмалю і продовжують титрування до зникнення синьо- бурого забарвлення. Титрування повторюють два- три рази і визначають середній об'єм тіосульфату, мл. Йодне число ( $Q$ ) розраховують за формулою:

$$Q = \frac{(V_0 - V) \cdot C_n \cdot E}{10 \cdot m}$$

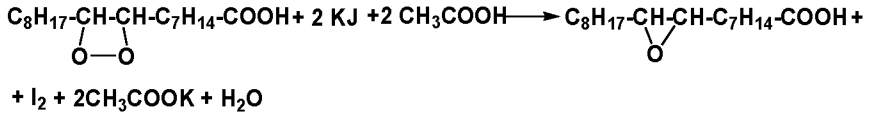
де,  $V_0$  та  $V$  середні об'єми стандартного розчину тіосульфату натрію, які пішли на титрування контрольної проби та проби, що аналізується відповідно, мл;  $C_n$  – молярна концентрація еквіваленту робочого розчину тіосульфату натрію, моль/л;  $E$ - молярна маса еквіваленту йоду в реакції приєднання по подвійному зв'язку,  $m$ - маса наважки жиру, г.

## 5. Визначення пероксидного числа ліпідів

Ненасичені жирні кислоти, що входять до складу ліпідів, зокрема нейтральних та фосфоліпідів, окиснюються при дії кисню повітря, пероксидних та гідрпероксидних радикалів з утворенням пероксидів жирних кислот. Швидкість ліпоокиснення залежить від кількості жирних кислот, кількості подвійних зв'язків в їх молекулах, температури, наявності каталізаторів, зокрема ферментів. Утворені пероксиди є нестійкими сполуками і розкладаються на кетони, альдегіди, ефіри, оксиди (з подальшим утворенням оксикислот), та інші сполуки. Надмірна кількість пероксидів жирних кислот та продуктів їх розкладу

шкідлива для організму. В жирах процес утворення пероксидів супроводжується їх прогіркненням.

Визначення кількості пероксидних груп в жирах базується на реакції окиснення йодиду калію пероксидами жирних кислот в середовищі ацетатної кислоти за реакцією:



Йод, який виділився, титрують тиосульфатом. Кількість пероксидних груп виражають через пероксидне число ліпідів, як кількість йоду (г), утвореного в результаті взаємодії з пероксидами жирних кислот, що містяться в 100,0 г жиру.

*Розчини, реактиви, обладнання:* жир - соняшникова олія (бажано прогіркла); льодяна ацетатна кислота; хлороформ, «хч»; насичений розчин калій йоду; 0,02 н розчин тиосульфату калію; 0,5 % розчин крохмалю. Бюретки, конічні колби для титрування на 250 мл, мірні піпетки

*Хід роботи:* в конічну колбу на 250 мл поміщають 5,0-10,0 г олії, зваженої на аналітичних терезах. Наважку розчиняють в 20 мл суміші ацетатної кислоти і хлороформу, взятих в об'ємному співвідношенні 2:1 і додають 5 мл насиченого розчину йодиду калію. Колбу закривають склом і ставлять в темне місце на 10 хв, після чого до вмісту колби додають приблизно 50 мл дистильованої води і титрують йод, що виділився, 0,02 н розчином тиосульфату натрію з індикатором крохмалем, який додають перед кінцем титрування. Паралельно титрують контрольну пробу, що не містила олії. Пероксидне число ліпідів ( $n$ ) розраховують за формулою:

$$n = \frac{(V_1 - V_0) \cdot C_n \cdot E}{10g}$$

де  $V_1$  та  $V_0$  – об'єми розчинів тиосульфату, що були витрачені на титрування проби що аналізується та контрольної проби відповідно, мл;  $C_n$  – молярна концентрація еквіваленту розчину тиосульфату натрію, моль/л;  $E$  – молярна маса еквіваленту йоду в реакції відновлення пероксидної групи кислоти;  $g$  - маса наважки олії,г.

Одержані результати кількісного визначення триацилгліцеридів у заразках масел та жирів порівнюють з відповідними значеннями, вказаними у державних стандартах України (ДСТУ) та технічних умовах (ТУ) для масел та жирів.

### Лабораторна робота № 3

#### Фотометричне визначення фосфоліпідів у сироватці крові

Фосфоліпіді осаджуються трихлорацетатною кислотою разом з білками. Осад мінералізують сульфатною кислотою та визначають у ньому вміст фосфору, на частку якого припадає 4% усередненої молекулярної маси фосфоліпідів. Загальний вміст фосфоліпідів визначають перемноживши отриманий результат масової концентрації фосфору на 25. Концентрацію фосфору визначають фотометрично за методом стандартів за реакцією утворення відновленої форми фосфорно- молібденової гетерополікислоти.

*Розчини, реактиви, обладнання:* сироватка крові (кров вносять у пробірку, витримують 30 хв на водяній бані при  $t = 30^{\circ}\text{C}$  і центрифугують протягом 15 хв при 3000 об/хв) або її імітат з добавкою фосфоліпідів; 10% розчин трихлорацетатної кислоти; розчин молібдату амонію, 1%; розчин аскорбінової кислоти, 1%; стандартний розчин дигідрогенфосфату калію (із вмістом фосфору 0,05мг/мл), концентрована сульфатна кислота.

Центрифуга, центрифужні пробірки, водяна баня, фотоелектроколориметр КФК 2МП, піпетки, пробірки, фотометричні кювети.

*Хід роботи:* у центрифужну пробірку наливають 0,2 мл сироватки крові, 2 мл дистильованої води, 3 мл розчину трихлорацетатної кислоти, суміш перемішують і через 1-2 хв центрифугують протягом 5 хв зі швидкістю 2000- 3000 об/хв. Надосадкову рідину зливають, не струшуючи пробірку. До осаду, що містить ліпопротеїди (білки та ліпіди) додають 1 мл концентрованої сульфатної кислоти, закривають пробкою з повітряним холодильником і нагрівають на киплячій водяній бані 20-30 хв (до знебарвлення розчину). Після закінчення мінералізації пробірку охолоджують і додають: 5 мл води, 1 мл молібдату амонію і 1 мл розчину аскорбінової кислоти, перемішують. Одночасно проводять реакцію зі стандартним розчином фосфату. Для цього до 1 мл стандартного розчину дигідрогенфосфату калію додають 1 мл сульфатної кислоти (1:1), 4 мл води, 1 мл молібдату амонію та 1 мл аскорбінової кислоти, перемішують. Через 15- 20 хв розчини переносять в кювети на 1 см і вимірюють на КФК оптичну густину кожного розчину відносно води при  $\lambda = 670$  нм. Розрахунок загального вмісту фосфоліпідів ( $m$ ) проводять за формулою:

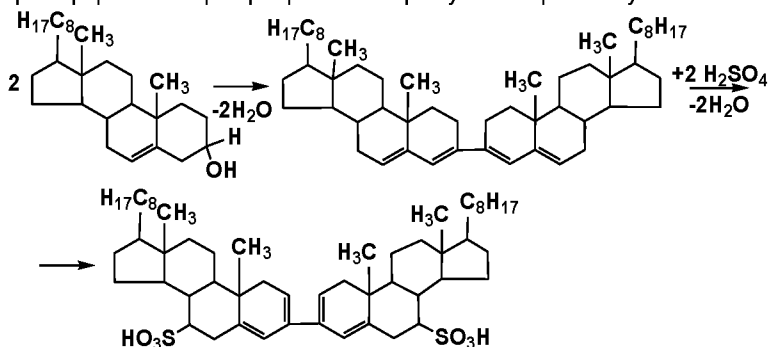
$$m(\text{мг} / \text{мл}) = \frac{A_1 \cdot Ca}{A_2 \cdot 0,2} \cdot 8 \cdot 25$$

де,  $A_1$  та  $A_2$  оптичні густини при  $\lambda = 670$  нм проби, що досліджується та стандартного розчину фосфату відповідно;  $C_a$  - концентрація фосфору у розчині, що містить добавку стандартного розчину дигідрофосфату калію (мг/мл); 0,2 - об'єм сироватки крові, взятий для аналізу, мл; 8 - об'єм розчину, що аналізується, мл; 25 - фактор перерахунку на фосфоліпід.

### Лабораторна робота №4

#### Фотометричне визначення холестеролу в сироватці крові

Холестерол надходить в організм людини з продуктами харчування тваринного походження а також синтезується в самому організмі. Холестерол необхідний для синтезу жовчних кислот, деяких гормонів та вітаміну D<sub>3</sub>. Нормальний вміст холестеролу в крові людини складає 140-260 мг/100 мл, його надлишок шкідливий для здоров'я. Одним з методів визначення холестеролу є фотометричний. Холестерол за присутності оцтового ангідриду та суміші оцтової і сульфатної кислот утворює продукт конденсації зеленого кольору, інтенсивність забарвлення якого пропорційна концентрації холестеролу. Реакція описується схемою :



*Розчини, реактиви, обладнання:* сироватка крові (кров вносять у пробірку, витримують 30 хв на водяній бані при  $t = 30^{\circ}\text{C}$  і центрифугують протягом 15 хв при 3000 об/хв) або її імітат з добавкою стандартного розчину холестеролу, стандартний розчин холестеролу 1,80 г/л (180,0 мг холестеролу розчиняють у 100 мл етанолу), суміш реактивів (150 мл оцтового ангідриду змішують на холоді з 30 мл льодяної ацетатної та 30 мл концентрованої сульфатної кислот. Сульфатну кислоту додають в останню чергу, постійно помішуючи суміш), одержаний розчин

зберігають у холодильнику в склянці з темного скла з притертою пробкою. Етанол, 96%.

Штатив з пробірками, піпетки, мірний циліндр, колба, водяна баня, термометр, фотоелектроколориметр, кювети на 0,5 см.

*Хід роботи:* у суху пробірку вносять 0,2 мл сироватки крові, додають 4,2 мл суміші реактивів (див. *Розчини, реактиви, обладнання*) та етанол до загального об'єму 5,0 мл, швидко перемішують і ставлять на водяну баню при 37°C. Через 20 хв розчин у пробірці забарвлюється у зелений колір. Вміст пробірки переносять в кювету з товщиною шару 0,5 см і вимірюють оптичну густину при  $\lambda = 540$  нм відносно води, як розчину порівняння. Визначення концентрації холестеролу проводять за градуовальним графіком, для побудови якого у 5 пробірок вводять такі кількості стандартного розчину холестеролу, щоб в них містилося, мг: 0,18; 0,26; 0,54; 0,72 і 0,90 досліджуваної речовини. Далі у кожен пробірку вводять 4,2 мл суміші реактивів та етанол до загального об'єму 5,0 мл, інтенсивно перемішують і поміщають на водяну баню при 37°C на 20 хв. Після цього вміст кожної пробірки переносять в кювету з товщиною шару 0,5 см і вимірюють оптичну густину розчину при  $\lambda = 540$  нм відносно води. За одержаними даними будують градуовальний графік в координатах:  $A_{540} - C_{\text{холестеролу}}$ , мг/пробі. Розраховують вміст холестеролу в невідомому зразку в мг/100мл.

### **Лабораторна робота №5**

#### **Розділення ліпідів методом тонкошарової хроматографії**

Ліпіди та жирні кислоти виділяють з біологічних об'єктів (наприклад, сироватки крові) шляхом екстракції сумішшю хлороформу та метанолу. Суміш ліпідів та жирних кислот в одержаному екстракті можна розділити методом тонкошарової хроматографії на пластинках "Silufol". Рухомою фазою є суміш полярних та неполярних органічних розчинників – гексан, етиловий естер ацетатної кислоти та ацетатна кислота. Одержану хроматограму обробляють парами йоду або розчинами ксантенових барвників - родаміну 6Ж чи дихлорфлуоресцеїну та визначають  $R_f$  компонентів суміші, роздивляючись хроматограму під ультрафіолетовими променями. По зменшенню значення  $R_f$  ліпіди можна розташувати в ряд: естери холестеролу ( $R_f = 0,9-0,8$ ); триацилгліцероли ( $R_f = 0,7-0,6$ ); жирні кислоти ( $R_f = 0,5$ ); холестерол ( $R_f = 0,3-0,4$ ); фосфоліпіди (практично на старті хроматограми).

*Розчини, реактиви, обладнання:* сироватка крові (кров вносять у пробірку, витримують 30 хв на водяній бані при  $t = 30^\circ\text{C}$  і центрифугують протягом 15 хв при 3000 об/хв) або суміш стандартних розчинів ліпідів;

суміш хлороформу та метанолу (1:1); рухома фаза: суміш n-гексану, етилового естеру ацетатної кислоти та льодяної ацетатної кислоти (об'ємне співвідношення = 80: 20: 1); 0,03% спиртовий розчин родаміну 6 Ж; хроматографічні пластини "Silufol" розміром 15 x 15 см; паперові фільтри; піпетки; капіляри; градуйовані пробірки на 10 мл; скляний стакан для хроматографії з кришкою; фарфорова чашка; водяна баня; термометр; лійки для фільтрування; фільтрувальний папір «синя стрічка», хроматоскоп

*Хід роботи:* відбирають у пробірку за допомогою піпетки 1 мл сироватки крові, додають 5 мл суміші хлороформу та метанолу (1:1), перемішують, витримують пробірку 5 хв на водяній бані при температурі 50°C і фільтрують для відділення водної фази через сухий паперовий фільтр, який потім промивають сумішшю розчинників. Фільтрат переносять у фарфорову чашку і обережно випарюють досуха на водяній бані при температурі не вище 80° С. Сухий залишок розчиняють в 1 мл суміші хлороформ: етанол (1:1). На пластинку "Silufol" на відстані 2 см від нижнього краю за допомогою капіляру наносять краплю одержаного екстракту ліпідів і підсушують. Пластину з нанесеною сумішшю поміщають у стакан для хроматографії, на дно якого налито рухому фазу, закривають кришкою та чекають доки фронт розчинника не підніметься вгору на відстань приблизно 0,5 см від верхнього краю пластини. Хроматограму виймають, висушують під тягою та обробляють спиртовим розчином родаміну 6Ж. Фіксують положення плям під хроматоскопом, розраховують  $R_f$  та визначають, ліпіди якого типу були у пробі.

### Контрольні запитання

1. Виберіть правильні відповіді:

1.1 А. Ліпіди; Б. Стериди; В. Фосфоліпіди; Г. Гліколіпіди;  
Д. Триацилгліцероли.

а) Відносяться до різних груп органічних сполук.

б) Є естерами жирних кислот та гліцерину.

в) Містять у своєму складі, крім залишків вищих карбонових кислот, гліцерину чи інших багатоатомних спиртів, фосфорну кислоту та азотовмісні основи.

г) Являють собою естери вищих карбонових кислот та поліциклічних спиртів

д) Містять разом із залишками багатоатомного спирту та вищої жирної кислоти також вуглеводневий залишок.

1.2 А. Йодне число; Б. Число омилення; В. Кислотне число;  
Г. Естерне число.

- а) Дозволяє оцінити вміст вільних жирних кислот у жири.
  - б) Свідчить про сумарний вміст в жири вільних та зв'язаних з гліцеролом жирних кислот.
  - в) Характеризує ступінь ненасиченості жирів.
  - г) Виявляє вміст у жири залишків жирних кислот, що зв'язані естерними зв'язками.
2. Для яких з наведених нижче жирних кислот характерне вільнорадикальне окиснення: стеаринова; пальмітинова; олеїнова; лінолева; пальмітоолеїнова ?
  3. Назвіть щонайменше п'ять функцій ліпідів в організмі.
  4. Назвіть основні функції холестеролу в організмі? На чому базується спектрофотометричний метод визначення цієї сполуки?
  5. У чому відмінність холестерину від холестеролу?
  6. На чому ґрунтується метод визначення загального вмісту фосфоліпідів у крові?

### **Тема 3. НУКЛЕІНОВІ КИСЛОТИ**

Нуклеїнові кислоти – це полімери, що складаються з нуклеотидів. До складу нуклеотидів входять азотовмісні основи (пуринові та піримідинові), пентоза та залишки фосфатної кислоти. Залежно від типу пентози (рибоза або дезоксирибоза) та природи замісників у піримідинових основах розрізняють рибонуклеїнові кислоти (РНК) та дезоксирибонуклеїнові кислоти (ДНК) відповідно. Якісні реакції дозволяють визначити складові компоненти нуклеїнових кислот після їх кислотного гідролізу.

Нуклеопротеїди- це складні білки, що містять білкову частину молекули та нуклеїнові кислоти. Такі сполуки легше виділити з тканин, ніж виокремити нуклеїнові кислоти. Нижче наведено якісні реакції та методика кількісного визначення нуклеїнових кислот після їх виділення з рослинного, тваринного матеріалу або дріжджів у вигляді нуклеопротеїдів.

#### ***Лабораторна робота №1***

#### **Виділення нуклеопротеїдів та їх якісні реакції**

##### **1. Виділення дезоксирибонуклеопротеїдів з тканин**

Дезоксирибонуклеопротеїди добре розчиняються в лугах та концентрованих розчинах солей і осаджуються після нейтралізації розчину луґу, або при розведенні розчину солі. Велика кількість

нуклеїнових кислот та нуклеопротейдів міститься у: дріжджах, тваринній печінці, молоках, зеленому горошку, цибулі.

*Розчини, реактиви, обладнання:* тканина тварин (селезінка, печінка), або молоки риби, або сухі дріжджі, розчин солей, що містить: 5% хлорид натрію та 0,04% цитрат натрію; 0,2% розчин NaOH. Фарфорова ступка, скляний порошок, скляні палички, пробірки звичайні і центрифужні, центрифуга, технічні терези.

*Хід роботи:* наважку тканини, зваженої на технічних терезах, (сухі дріжджі 4-5 г; печінка 6-8 г, цибуля 15-20г) подрібнюють та розтирають у ступці, додають 15 мл розчину хлориду натрію, що містить цитрат натрію (або 7.5 мл хлориду натрію і 7,5 мл цитрату натрію). Суміш переносять у центрифужні пробірки і центрифугують 15 хв при 1000 об/хв. У стакан наливають 20 мл води і, перемішуючи вміст склянкою паличкою, повільно, тонкою цівкою вливають центрифугат. Нерозчинні у воді дезоксирибонуклеопротейди випадають в осад у вигляді тонких ниток, які «намотують» на паличку. Якщо утворився осад, то його центрифугують 10 хв при 1000 об/хв. Частину осаду нуклеопротейдів або паличку, що містить нуклеопротейди, поміщають у чисту пробірку і додають 5 мл 0,2% луку для розчинення осаду. В одержаному розчині проводять якісну реакцію на пентозу. Частину осаду залишають для проведення кислотного гідролізу

## **2. Якісна реакція на пентозу**

Нуклеопротейди вступають в специфічні кольорові реакції, характерні для дезоксирибози, що входить до складу молекули, зокрема з дифеніламіном, який утворює з дезоксирибозою продукт конденсації синього кольору.

*Розчини, реактиви, обладнання:* лужний розчин дезоксирибонуклеопротейдів, 1% розчин дифеніламіну в суміші концентрованої сірчаної і льодяної оцтової кислоти (1:100). Пробірки, водяна баня.

*Хід роботи:* у пробірку додають 2 мл лужного розчину дезоксирибонуклеопротейду та 2 мл розчину дифеніламіну. Суміш нагрівають на киплячій водяній бані 15 хв. Під час нагрівання відбувається гідроліз дезоксирибонуклеопротейду і вивільнена дезоксирибоза реагує з дифеніламіном. Паралельно проводять холостий досвід без дезоксирибонуклеопротейду і порівнюють забарвлення у двох пробірках.



### 3. Виявлення пуринових основ

Метод ґрунтується на утворенні нерозчинних у воді комплексів пуринових основ з солями аргентуму (I), забарвлених у світло-коричневий колір. Перед проведенням реакції необхідно провести кислотний гідроліз нуклеопротеїдів для вивільнення пуринових основ.

*Розчини, реактиви, обладнання:* концентрований розчин амоніаку, 1% розчин нітрату аргентуму (I). Гідролізат нуклеопротеїдів: осад нуклеопротеїдів заливають 3-5 мл 1М  $\text{HClO}_4$ , переносять в колбу зі зворотним холодильником і кип'ятять на електричній плитці протягом 1 години (або витримують на киплячій водяній бані близько 40 хв). Рідину охолоджують. Гідролізат нуклеопротеїдів можна також одержати з дріжджів. Для цього 1 г пекарських дріжджів заливають 5-10 мл 5% сульфатної кислоти, суміш поміщають в колбу зі зворотним холодильником і кип'ятять протягом 1 години.

Пробірки, лійки, колба із зворотним холодильником, електрична плитка.

*Хід роботи:* до 1 мл гідролізату нуклеопротеїдів додають розчин амоніаку до лужного середовища і 0,5 мл розчину нітрату аргентуму (I). Через 3-5 хв утворюється пухкий світло-коричневий осад - комплекс пуринових основ з солями аргентуму.

### 4. Виявлення фосфорної кислоти

Залишки фосфорної кислоти, що входять до складу нуклеопротеїдів взаємодіють з молібденовою рідиною з утворенням фосфорномолібденової гетерополікислоти.

*Розчини, реактиви, обладнання:* гідролізат нуклеопротеїдів, розчин молібдату амонію 5%, пробірки, пальник.

*Хід роботи:* до 1 мл гідролізату нуклеопротеїдів додають 1 мл молібдату амонію та нагрівають до кипіння. Розчин забарвлюється у жовтий колір, а при стоянні випадає жовтий осад.

### 5. Виявлення білків у складі нуклеопротеїдів

Білки, що входять до складу нуклеопротеїдів, визначають за біуретовою реакцією. Купрум (II) утворює комплекс з продуктами гідролізу протеїдів – пептидами, забарвлений у червоно-фіолетовий колір.

*Розчини, реактиви, обладнання:* гідролізат нуклеопротеїдів, 10% розчин гідроксиду натрію, біуретовий реагент : 1,5 г  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ; 6,0 г тартрату натрію і калію, 30 г  $\text{NaOH}$ - змішати та розвести водою до 1 л. Реактив стійкий протягом місяця. Пробірки.

*Хід роботи:* у пробірку вводять 0,5 мл гідролізату, нейтралізують його розчином лугу за лакмусом, потім додають 0,5 мл біуретового реагенту, перемішують і спостерігають появу синьо- фіолетового забарвлення, що підтверджує присутність поліпептидів у гідролізаті.

## **Лабораторна робота №2**

### **Спектрофотометричне визначення загального вмісту нуклеїнових кислот за методом Спіріна**

Метод ґрунтується на вимірюванні оптичної густини розчинів нуклеїнових кислот в ультрафіолетовій області спектру і характеризується високою чутливістю і простотою виконання. Попередньо необхідно виділити нуклеїнові кислоти з біологічного матеріалу та провести їх гідроліз. Для цього тканини обробляють розчином  $\text{HClO}_4$ . Оптичну густину одержаної кислотної витяжки вимірюють при 270 та 290 нм, а потім розраховують різницю  $\Delta A = A_{270} - A_{290}$ , це робиться для того, щоб позбутися впливу фону. Визначенню заважають вільні нуклеотиди та інші сполуки, що поглинають світло при зазначених довжинах хвиль.

*Розчини, реактиви, обладнання:* тканина тварин (селезінка, печінка) молюки риби, сухі дріжджі,  $\text{HClO}_4$  - 0,2 та 0,5 моль/л.

Ступка, центрифужні пробірки, водяна баня, колба зі зворотним холодильником, стакан, пробірки на 10 мл, кювети з товщиною шару  $l = 1$  см, спектрофотометр.

*Хід роботи:* у центрифужну пробірку поміщають подрібнену наважку тканини (сухих дріжджей 4-5 г; печінки 6-7г, цибулі 20-30 г) та 10 -15 мл охолодженого 0,2 моль/л розчину  $\text{HClO}_4$ . Суміш ретельно перемішують і центрифугують 10 хв при 3000 об/хв. Центрифугат відкидають, осад промивають хлорною кислотою. Така процедура необхідна для видалення вільних нуклеотидів. Далі до осаду додають 15-20 мл 0,5 моль/л  $\text{HClO}_4$ , закривають пробкою зі зворотним холодильником і нагрівають на киплячій водяній бані 30 хв. При цьому відбувається кількісна екстракція нуклеїнових кислот з тканини та їх гідроліз. Гідролізати охолоджують, фільтрують через марлю, або вату, центрифугують 10 хв при 3000 об/хв. (або 15 -20 хв при 1500 об/хв.). Надосадкову рідину (супернатант) переносять в окрему пробірку, відбирають 1,0 мл супернатанту в мірну колбу на 50 мл і доводять до мітки розчином хлорної кислоти. На спектрофотометрі отримують спектр поглинання одержаного розчину у кюветі з товщиною шару 1 см

відносно 0,5 моль/л розчину  $\text{HClO}_4$  і вимірюють оптичну густину при  $\lambda = 270$  і  $290$  нм.

Вміст нуклеїнових кислот розраховують за фосфором. Вміст фосфору у гідролізаті нуклеїнової кислоти ( $C$ , мкг) розраховують за формулою:

$$C = (A_{270} - A_{290}) \cdot V / 0,19$$

де  $A_{270}$  і  $A_{290}$  відповідні значення оптичних густин гідролізату; 0,19-значення  $\Delta A$  ( $A_{270} - A_{290}$ ), що має гідролізат нуклеїнової кислоти, який містить 1 мкг фосфору в 1 мл розчину;  $V$  – об'єм гідролізату (1,0 мл). Одержане значення ( $C$ ) множать на 10 або 15 (враховують об'єм розчину  $\text{HClO}_4$ , яким заливали наважку тканин або дріжджів). Для перерахунку нуклеїнового фосфору на загальну кількість нуклеїнових кислот в гідролізаті (мкг) одержаний результат множать на середній перерахунковий коефіцієнт 10,3 (для ДНК-10,1, для РНК- 10,5).

### Контрольні запитання

1. Намалюйте та порівняйте структури первинних ланок молекул ДНК та РНК, в чому їх подібність, а у чому відмінність?
2. Що таке складні нуклеїнові кислоти? Наведіть приклади.
3. Що є продуктами гідролізу складних і простих нуклеїнових кислот?
4. За допомогою яких якісних реакцій можна виявити основні компоненти нуклеїнових кислот після їх гідролізу?
5. Які методи кількісного визначення нуклеїнових кислот вам відомі?
6. Що таке фрагментування молекули ДНК? Для чого даний підхід застосовується?
7. Що таке гібридизація молекули ДНК? Для чого застосовується метод гібридизації?
8. Що таке полімеразна ланцюгова реакція? Де вона використовується?

### Тема 4. АМІНОКИСЛОТИ

Амінокислотами називають сполуки, які містять первинні аміно- та карбоксильні групи. Залежно від положення аміногрупи у молекулі амінокислоти розрізняють  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, тощо амінокислоти. До складу білків входять  $\alpha$ -амінокислоти, в яких карбоксильна і аміно- групи приєднані до одного і того самого атома вуглецю. За своїми кислотно-основними властивостями амінокислоти – амфоліти. Усі амінокислоти окрім аміноацетатної (гліцину) містять хіральний атом вуглецю, тобто є оптично-активними: можуть повертати площину поляризованого світла вправо, або вліво. Відповідно існують два ряди оптичних ізомерів

амінокислот:  $D(-)$  та  $L(+)$ . Практично усі білки (протеїни) містять саме  $L(+)$  оптичні ізомери амінокислот. До складу протеїнів входять 20  $\alpha$ -амінокислот, що розрізняються за природою замісника біля другого атома вуглецю. Ці амінокислоти кодується генетичним кодом і називаються протеїногенними або стандартними амінокислотами. Окрім них в організмі продукуються й інші амінокислоти, що називаються непротеїногенними або нестандартними.

Нижче наведено якісні реакції на різні амінокислоти залежно від природи замісника, а також методики їх кількісного визначення хімічними та інструментальними методами аналізу.

## Лабораторна робота №1

### Якісні реакції на амінокислоти

#### 1. Реакція Міллона

Реакція Міллона є якісною реакцією на фенольний гідроксил тирозину. При нагріванні цієї амінокислоти з реактивом Міллона (нітрат меркурію (I та II) в 4 моль/л  $\text{HNO}_3$  що містить домішки  $\text{HNO}_2$ ) утворюється сіль орто-нітротирозину меркурію цеглисто-червоного кольору. Реакцію можна описати схемою 1.

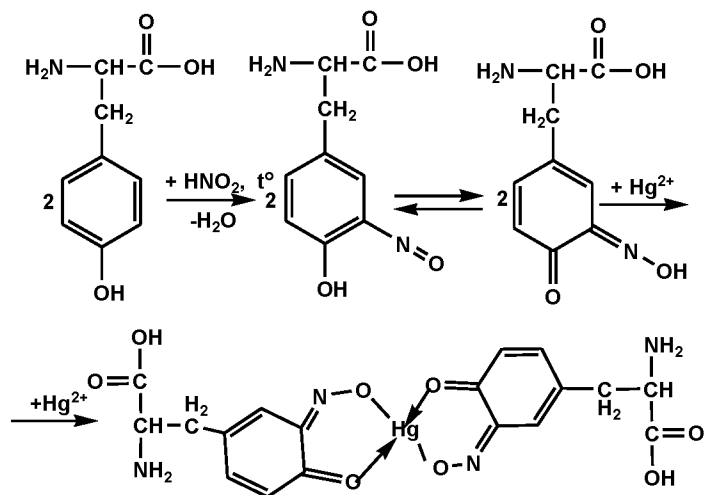


Схема 1.

Аналогічну реакцію дають феноли. Серед досліджуваних амінокислот реакція є специфічною. Таку ж реакцію дають і білки, до складу яких входить дана амінокислота

Розчини, реактиви, обладнання: 0,05 % розчин тирозину, або 1% водний розчин яєчного альбуміну, реактив Міллона (у 60 мл концентрованої нітратної кислоти розчиняють 40 г меркурію, потім ставлять на теплу водяну баню до припинення виділення бурих парів нітроген оксиду і перемішують. Після цього додають подвійний об'єм води і одержаний розчин ще раз розбавляють водою (1: 1.); пробірки, піпетки, газовий пальник.

*Хід роботи:* до 2 мл 0,1 моль/л розчину амінокислоти або білку альбуміну додають декілька краплин реактиву Міллона, суміш кип'ячать 1 хв на полум'ї газового пальника. Спостерігають утворення цеглисто-червоного осаду.

## 2. Ксантопротеїнова реакція

Ксантопротеїнова реакція характерна для ароматичних амінокислот (тирозин, триптофан, фенілаланін). Під дією нітратної кислоти бензольне ядро таких сполук нітрується з утворенням нітросполук жовтого кольору. В лужному середовищі колір нітросполук поглиблюється і переходить в оранжевий в результаті утворення нітрофенолятів. На прикладі фенілаланіну реакцію можна описати схемою 2:

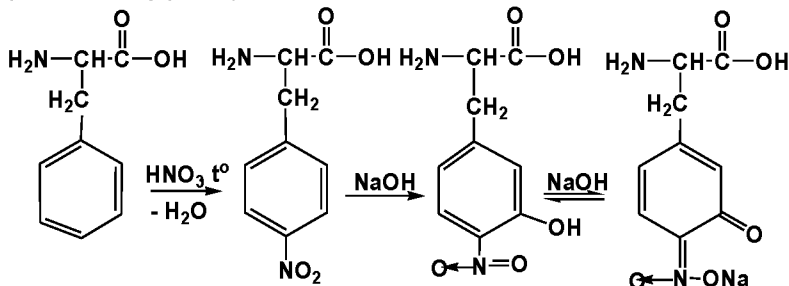


Схема 2.

Дана реакція характеризується високою чутливістю. Аналогічну реакцію дають інші ароматичні сполуки, зокрема, бензол, феноли а також білки, що містять залишки ароматичних амінокислот.

*Розчини, реактиви, обладнання:* 0,05 % розчин тирозину, або триптофану, або 1% водний розчин яєчного альбуміну, 4 моль/л розчин нітратної кислоти, 5 моль/л розчин  $\text{NaOH}$ ; пробірки, піпетки, газовий пальник.

*Хід роботи:* до 2 мл розчину амінокислоти або білку додають 0,5 мл нітратної кислоти, розчин кип'яють протягом 30 с і спостерігають утворення жовтого осаду. При додаванні до осаду лугу, колір суміші набуває оранжевого забарвлення.

### 3. Реакція Фоля

Реакція Фоля застосовується для визначення цистеїну та цистину-амінокислот, що містять у своєму складі слабкозв'язану сірку, а також білків, до складу яких входять ці амінокислоти. Суть визначення полягає в тому, що при кип'ятінні зазначених амінокислот з 6 М розчином лугу відбувається відщеплення сульфідної сірки. Останню легко відкрити за реакцією утворення чорного сульфїду плумбуму (II) або з нітропрусидом натрію за схемою 3:

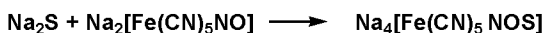
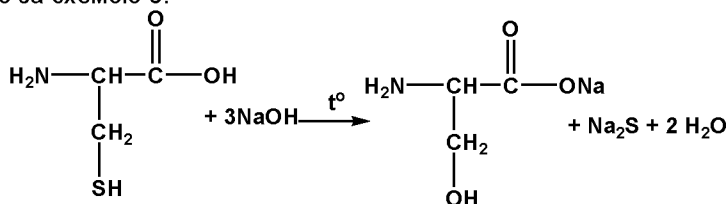


Схема 3.

Метіонін не вступає в реакцію Фоля, оскільки в даній амінокислоті сірка зв'язана міцно і не відщеплюється при дії лугу.

*Розчини, реактиви, обладнання:* 0,05 % розчин цистеїну або 1% розчин білку – яєчний альбумін або уреаса; 6 моль/л NaOH, 5% розчин ацетату плумбуму або розчин нітропрусиду натрію; пробірки, піпетки, газовий пальник.

*Хід роботи:* до 1 мл розчину цистеїну або білку додають 4-5 крапель 6М NaOH та обережно нагрівають 2 хв. Після охолодження до частини розчину додають 1 краплину ацетату плумбуму. Утворюється чорний або темно-коричневий осад. До другої частини додають 1-2 краплини нітропрусиду натрію і спостерігають зміну кольору суміші.

#### 4. Реакція на триптофан

Триптофан у кислому середовищі вступає в реакцію з альдегідами або гліоксильною кислотою (CHO-COOH), утворюючи забарвлені у червоний колір продукти конденсації. З формальдегідом забарвлення переходить у синє, якщо на продукт конденсації подіяти окисником - нітритом натрію. Реакція триптофану з формальдегідом відбувається за схемою 4:

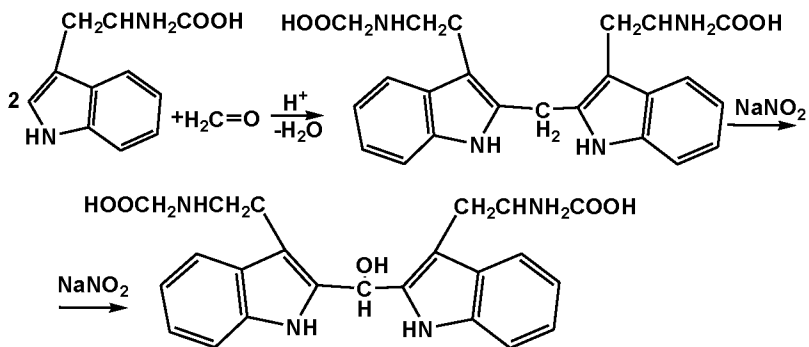


Схема 4.

*Розчини, реактиви, обладнання:* 0,01 % розчин триптофану; неочищена льодяна ацетатна кислота (містить гліоксильну кислоту як домішку); концентрована сульфатна кислота; 2,5% водний розчин формальдегіду; 9,5% розчин нітриту натрію. Пробірки, водяна баня, пальник, лід.

*Хід роботи:*

Реакція з гліоксильною кислотою. До 0,5 мл розчину триптофану додають 0,5 мл льодяної ацетатної кислоти, що містить гліоксильну кислоту. Одержану суміш нагрівають на полум'ї пальника, потім охолоджують, обережно по паличці приливають 1 мл концентрованої сульфатної кислоти. Пробірку поміщують на киплячу водяну баню та спостерігають утворення зверху червоно-фіолетового кільця.

Реакція з формальдегідом. До 2 мл розчину триптофану додають одну краплину розчину формальдегіду, суміш перемішують і повільно вливають порціями по краплях 6 мл конц. сульфатної кислоти, охолоджуючи пробірку на льоду. Суміш перемішують і через 10 хв додають розчин нітриту натрію. З'являється інтенсивно-синє забарвлення окисленого продукту конденсації молекул триптофану.

## 5. Реація Сакагучі на аргінін

Аргінін, аналогічно первинним амінам, вступає в реакцію конденсації з фенолами, зокрема  $\alpha$ -нафтолом. Реакцію проводять у присутності гіпоброміту натрію. Гіпоброміт окиснює аргінін, який далі взаємодіє з нафтолом з утворенням продукту конденсації червоного кольору за схемою 5:

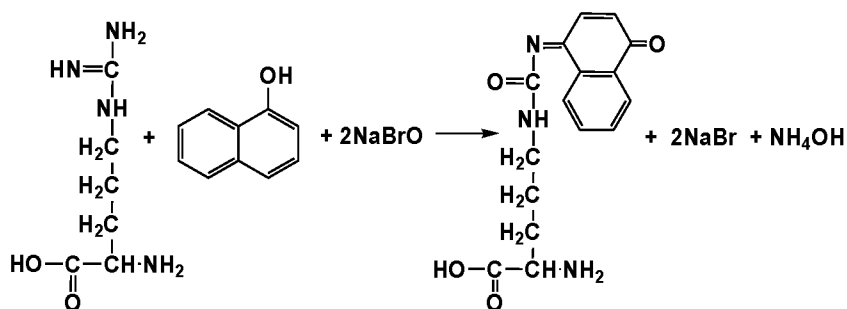


Схема 5.

*Розчини, реактиви, обладнання:* 0,01 % розчин аргініну або 1% розчин білку, 3М розчин NaOH; 0,1 % спиртовий розчин  $\alpha$ -нафтолу; 2% розчин гіпоброміту натрію, пробірки, піпетки.

*Хід роботи:* до 0,5 мл розчину амінокислоти, або білку додають 0,5 мл лугу, 3 краплини 0,1% розчину  $\alpha$ -нафтолу та після перемішування 2-3 краплини 2% розчину гіпоброміту натрію. Розчин забарвлюється у червоний колір.

## 6. Реакція Паулі на гістидин та тирозин

Визначення гістидину та тирозину ґрунтується на їх взаємодії у лужному середовищі з продуктом діазування сульфанілової кислоти – діазобензолсульфоною кислотою, в результаті чого утворюється продукт конденсації вишневого кольору. Дана реакція характерна також для ароматичних амінів та фенолів. Взаємодія відбувається за схемою 6 (с 33).

*Розчини, реактиви, обладнання:* 0,01 % розчин гістидину, 1% розчин сульфанілової кислоти в 2 моль/л HCl; 0,5% розчин нітриту натрію; 10% розчин карбонату натрію, пробірки, піпетки.

*Хід роботи:* до 1 мл розчину сульфанілової кислоти додають 2 мл розчину нітриту натрію, перемішують і охолоджують на льоду чи під



струменем холодної води, негайно приливають в пробірку 2 мл розчину гістидину, знову ретельно перемішують і додають 6 мл розчину

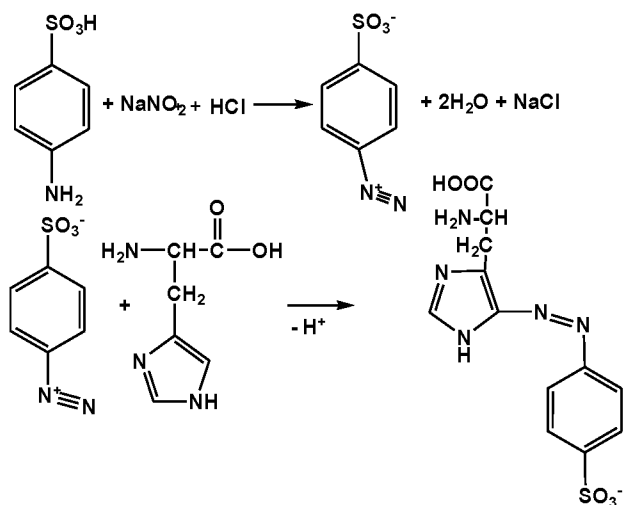


Схема 6.

карбонату натрію. Після перемішування розчин забарвлюється у вишнево-червоний колір.

### 7. Взаємодія з іонами купруму (II)

Амінокислоти під час нагрівання з сульфатом або карбонатом купруму (II) утворюють комплексну сполуку, що має синє забарвлення. Таку реакцію дають всі амінокислоти. Визначенню заважають аміни, амоніак та інші сполуки, що утворюють стійкі комплекси з іонами Cu (II). На прикладі гліцину реакція описується схемою 7:

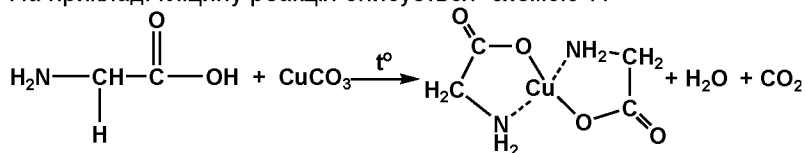


Схема 7.

Розчини, реактиви, обладнання: 1% розчин гліцину, сухий карбонат купруму (II), пробірки, пальник

*Хід роботи:* в пробірку вносять 1 мл розчину гліцину, на кінчику шпателя сіль купрум(II), суміш нагрівають до кипіння. Розчин забарвлюється в синій колір.

### 8. Реакція з нітритною кислотою

При взаємодії  $\alpha$ -амінокислоти з нітритною кислотою виділяється газоподібний азот, об'єм якого пропорційний кількості амінокислоти, що вступила в реакцію. Реакція може бути застосована для якісного та кількісного визначення  $\alpha$ -амінокислот. Замість нітритної кислоти можна взяти суміш нітриту натрію та ацетатної кислоти. На прикладі гліцину реакцію можна записати наступним чином:

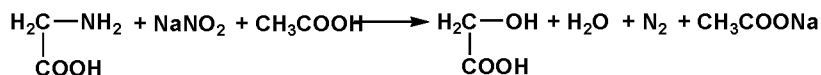


Схема 8.

*Розчини, реактиви, обладнання:* 1% розчин гліцину, 5% розчин нітриту натрію, льодяна ацетатна кислота, пробірки.

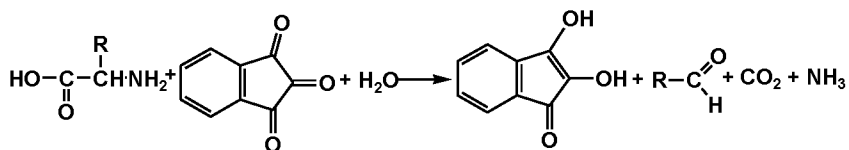
*Хід роботи:* в пробірку вносять 5 крапель розчину гліцину, 5 крапель нітриту натрію, дві краплі льодяної ацетатної кислоти й обережно збовтують. Спостерігають виділення газу.

## Лабораторна робота № 2

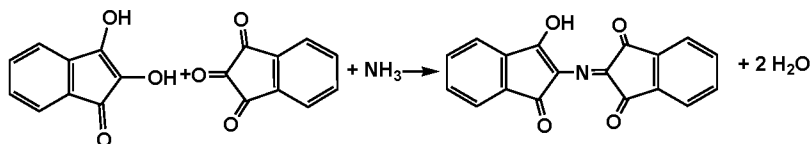
### Визначення амінокислот методами розподільчої хроматографії на папері та тонкошарової хроматографії

Для розділення амінокислот застосовується метод розподільчої (радіальної) хроматографії на папері або висхідної хроматографії у тонкому шарі оксиду силіцію (пластинах Silufol). Як рухома фаза застосовують суміш *n*-бутанолу, ацетатної кислоти та води. Положення амінокислот на папері або на поверхні пластини визначають за реакцією з нінгідрином. У присутності нінгідрину амінокислоти проявляються у вигляді плям, забарвлених у фіолетовий, жовтий, голубий та ін. кольори (в залежності від структури молекули амінокислоти).

В результаті взаємодії  $\alpha$ -амінокислот з нінгідрином (1,2,3-трикетогідринденгідратом) останній відновлюється, а амінокислоти окиснюються та розкладаються з утворенням  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$  та альдегідів:



Вівідновлений нінгідрин конденсується з амоніаком та другою молекулою нінгідрину в сполуку, що має фіолетовий колір:



У присутності органічних розчинників можливо також проходження побічних реакцій з утворенням продукту конденсації, що містить у своєму складі радикал (R) амінокислоти, що обумовлює різноманітне забарвлення (червоне, жовте, синє) сполук, що утворюються.

Нінгідрин взаємодіє також з первинними та вторинними амінами, пептидами.

*Розчини, реактиви, обладнання:* хроматографічний папір (фільтр “жовта стрічка”) або пластини Silufol, суміш розчинників, 100 мл (n-бутанол, льодяна ацетатна кислота, вода = 4:1:1) суміш амінокислот та їх стандартні 0,1 % водні розчини: лейцин, аспартат, лізин, гліцин. Свіжий розчин нінгідрину (9,5 мл 0,5% розчину нінгідрину в 95% ацетоні, 0,1 мл льодяної ацетатної кислоти, 0,4 мл дистильованої води).

Чашка Петрі для радіальної, або склянка для висхідної хроматографії, мікропіпетки чи капіляри, сушильна шафа, лінійка, годинник.

*Хід роботи.*

Радіальна хроматографія на папері. Хроматографічний папір вирізають у вигляді круга, діаметр якого на 0,5 см більше від діаметру чашки Петрі. Ножицями вирізають “ніжку” до центра кола хроматографічного паперу та відгинають її донизу. Олівцем ділять коло на 5 сегментів. На відстані 0,5 см від центру обережно капіляром наносять проби стандартних розчинів амінокислот та їх суміш. Папір підсушують над пальником та поміщають в чашку Петрі, де на дні налито суміш розчинників. Опускають до низу “ніжку”, закривають зверху другою половинкою чашки та чекають, поки фронт розчинника дійде майже до кінця паперу (1- 0,5 см від краю). Виймають папір, олівцем відмічають лінію фронту розчинника. Хроматограму обережно сушать над пальником і проявляють, обробляючи розчином нінгідрину, далі

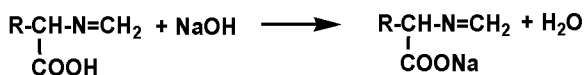
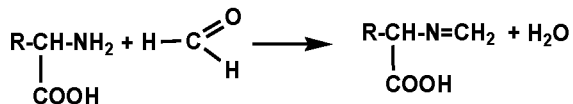
поміщають у сушильну шафу при 70° С на 10 хв. Порівнюють положення утворених забарвлених плям ( $R_f$ ) із стандартами амінокислот та роблять висновки про якісний склад суміші амінокислот.

Тонкошарова хроматографія. Беруть пластину Silufol і вирізають прямокутник розміром 4x10 см. На відстані 0,5 см від нижнього краю пластини обережно олівцем проводять лінію старту і наносять на неї капіляром стандарти амінокислот, а також невідому суміш цих кислот. Опускають пластину в хроматографічну склянку, що містить на дні рухому фазу, так, щоб лінія старту на пластині не була занурена в рідину. Закривають склянку зверху скляною кришкою й очікують, поки фронт розчинника підніметься вгору, не доходячи 0,5 см до верхнього краю пластини. Виймають пластину, олівцем відмічають лінію фронту розчинника. Далі виконують операції, як описано вище.

### Лабораторна робота № 3

#### Визначення амінокислот методом формольного титрування

Метод ґрунтується на титруванні карбоксильних груп амінокислот лугом. Аміногрупа, що входить до складу амінокислоти, заважає титруванню тому попередньо необхідно заблокувати аміногрупи кислот за допомогою формальдегіду. В результаті взаємодії амінокислоти з формальдегідом утворюється метиленамінокислота, яка є сильнішою, ніж амінокислота і відтитровується лугом у водному розчині. Реакція описується рівняннями:



Для амінокислот, що не містять додаткових аміно- та карбоксильних груп, за результатами титрування можна також встановити вміст їх  $\alpha$ -аміногруп, оскільки число карбоксильних груп і зв'язаних формальдегідом аміногруп еквівалентна. Даний метод не є достатньо точним для визначення числа аміногруп в суміші різних типів амінокислот, зокрема тих, що містять декілька кислотних або амінних угруповань, але завдяки своїй простоті та експресності він широко застосовується на практиці.

*Розчини, реактиви, обладнання:* 1% розчин гліцину (або водна витяжка амінокислот, одержана з біологічного матеріалу),  $\text{BaCl}_2$  сухий, паперовий фільтр “червона стрічка”, 0,1% спиртовий розчин фенолфталеїну; 0,05 моль/л розчин гідроксиду калію, 40% розчин формальдегіду, насичений розчин баритової води.

Колби для титрування на 100 мл, бюретки, піпетки, скляні лійки  
*Хід роботи.*

Визначення амінокислоти в стандартному розчині. Беруть дві колби для титрування. В першу колбу вносять 10 мл розчину амінокислоти і розводять водою в 2 рази, в другу наливають приблизно такий же об’єм води (холоста проба). В обидві колби додають по 3 краплі розчину фенолфталеїну і повільно з бюретки по краплях розчин лугу до забарвлення розчинів у слабкорозжевий колір. Потім в обидві колби вносять по 10 мл розчину формальдегіду, перемішують і продовжують титрування лугом до появи ледь помітного розжевого забарвлення, записують загальний об’єм лугу, що був витрачений на титрування амінокислоти та на холосту пробу. Титрування повторюють декілька разів і розраховують середні об’єми лугу.

Масову концентрацію амінокислоти ( $C$ , мг/мл) розраховують за формулою:

$$C = (V_1 - V_2) \cdot C_n \cdot E / V$$

де,  $V_1$  та  $V_2$  – середні об’єми розчину лугу, витрачені на титрування проби, що аналізується та холостої проби відповідно, мл;  $C_n$  – молярна концентрація еквіваленту розчину лугу, моль/л;  $E$  – молярна маса еквіваленту амінокислоти;  $V$  – об’єм розчину амінокислоти, взятий для титрування, мл.

Визначення амінокислот в біологічній пробі. В конічну колбу на 250 мл поміщають 25 мл водної витяжки амінокислот, додають 1 г  $\text{BaCl}_2$ , декілька краплин фенолфталеїну та перемішують. До суміші додають баритову воду до появи ледь помітного розжевого забарвлення. Колбу закривають і залишають стояти протягом 15 хв, її вміст розводять водою приблизно в 1,5 рази і фільтрують через фільтр “червона стрічка”. Осад на фільтрі обережно промивають 1-2 рази водою. Весь фільтрат збирають в мірну колбу на 100 мл и доводять до мітки водою. Готують дві колби для титрування. В одну вводять 40,0 мл аліквоти одержаного фільтрату (що відповідає 10 мл витяжки амінокислот), в іншу – приблизно 40 мл води (холоста проба). До обох колб додають по 5 крапель фенолфталеїну і, якщо розчин безбарвний, обережно по краплях 0,05 М луг до появи слабо- розжевого забарвлення. Колір розчинів має бути одноковий в обох колбах. Потім до кожної проби додають по 10 мл формальдегіду та титрують з бюретки розчином лугу до появи ледь помітного розжевого забарвлення.

Вміст амінокислот у водній витяжці оцінюють за масою амонійного азоту  $\alpha$ -аміногруп цих кислот ( $C$ , мг/мл), яку можна розрахувати за формулою:

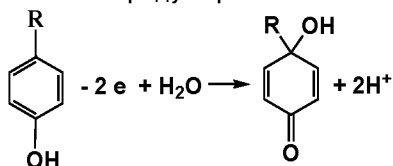
$$C = (V_1 - V_2) \cdot C_N \cdot E / V$$

де,  $V_1$  та  $V_2$  – об'єми розчину лугу, витрачені на титрування проби, що аналізується та холостої проби відповідно, мл,  $C_N$  – молярна концентрація еквіваленту розчину лугу, моль/л;  $E$  – молярна маса еквіваленту азоту  $\alpha$ -аміногрупи кислоти;  $V$  – об'єм водної витяжки амінокислот, взятий для титрування (10 мл - з урахуванням усіх розведень).

### Лабораторна робота № 4

#### Вольтамперометричне визначення тирозину

На поверхні графітового електроду тирозин окиснюється за схемою 1:



де R – залишок амінокислоти

Схема 1.

Наведена реакція лежить в основі визначення тирозину методом вольтамперометрії. Визначення проводять у циклічному варіанті. Електрохімічне окиснення тирозину на графітовому електроді досить специфічне для амінокислот. Наприклад, фенілаланін, що має структуру подібну до тирозину, але, на відміну від останнього, не містить замісників (крім залишку амінокислоти) у бензольному кільці не окиснюється за даних умов. Заважатимуть визначенню відновники, зокрема, феноли. Нижче наведено методику визначення тирозину із застосуванням методу циклічної вольтамперометрії.

*Розчини, реактиви, обладнання:* тирозин 0,01 моль/л водний розчин; фенілаланін 0,01 моль/л водний розчин; сульфатна кислота, 0,01 моль/л. Вольтамперометр АВА-2 з приставкою для зйомки в циклічному режимі, «Буревестник», Санкт-Петербург; триелектродна електролітична комірка з робочим вуглеситаловим електродом, хлорид-срібним електродом порівняння та допоміжним платиновим електродом; пробірки, піпетки.

*Хід роботи:* готують до роботи вольтамперометр та електроди, шліфують поверхню робочого електроду фільтрувальним папером до блиску (цю процедуру необхідно робити перед кожним виміром, щоб одержати відтворювані результати).

На початку роботи записують вольтамперограму фоновому розчину. Для цього у комірку вводять 10 мл розчину  $H_2SO_4$ , занурюють електроди, і запускають програму зйомки вольтамперограми в проміжку потенціалу від  $-0,9$  В до  $+0,5$  В, швидкість сканування:  $100$  мВ/с.

Далі у двох пробірках готують  $5 \cdot 10^{-4}$  моль/л розчини тирозину та фенілаланіну. Для цього в кожен пробірку вводять по  $0,5$  мл розчину тирозину або фенілаланіну та розбавляють до  $10$  мл розчином сульфатної кислоти. Одержаний розчин тирозину переносять в електролітичну комірку, занурюють в неї електроди та запускають програму зйомки в тих самих діапазонах, що і для розчину фоновому електроліту, одержують вольтамперограму амінокислоти, виймають з розчину та шліфують поверхню робочого електроду за допомогою фільтрувального паперу. Проводять аналогічні процедури з розчином фенілаланіну. Відмічають наявність або відсутність струму окиснення фенілаланіну. За допомогою комп'ютерної програми віднімають від одержаних вольтамерограм вольтамперограму фону та визначають  $E_{1/2}$  тирозину.

Задачу одержують у пробірці і розводять до  $10$  мл розчином сульфатної кислоти. Розчин переносять в електрохімічну комірку, занурюють в неї електроди та запускають програму зйомки вольтамперограми за описаних вище умов, знову виймають з розчину робочий електрод та шліфують його поверхню на фільтрувальному папері. За допомогою комп'ютерної програми віднімають від одержаної вольтамперограми фон і визначають величину граничного дифузійного струму ( $I_x$ ) для тирозину в розчині задачі. Вміст амінокислоти визначають за методом добавок. Для цього до розчину задачі в електролітичній комірці за допомогою мікропіпетки додають  $0,01$  мл стандартного розчину тирозину і знову за аналогічних умов записують вольтамперограму розчину з добавкою. Віднімають фон і визначають величину граничного дифузійного струму для тирозину в розчині задачі зі стандартною добавкою ( $I_{x+ст}$ ). Всі виміри повторюють тричі. Розраховують середні значення  $I_x$  та  $I_{x+ст}$ . Вміст тирозину в задачі ( $C_x$ , г) розраховують за рівнянням:

$$C_x = \frac{C_{ст} \cdot I_x \cdot 10}{(I_{x+ст}) - I_x}$$

де,  $C_x$  – кількість тирозину (г в  $10$  мл розчину, що аналізується);  $C_{ст}$  – концентрація добавки стандартного розчину тирозину в

досліджуваному об'ємі задачі (г/мл);  $I_x$  та  $I_{cm+x}$  – величини граничного дифузійного струму для розчину задачі та задачі зі стандартною добавкою тирозину відповідно,  $\mu A$ .

Зміною об'єму розчину задачі при введенні добавки нехтують, через незначний об'єм останньої (0,01 мл).

## **Лабораторна робота № 5**

### **Визначення суміші амінокислот методом рідинної хроматографії**

Хроматографічні методи – одні з найбільш популярних для визначення амінокислот. Оскільки амінокислоти слабо поглинають світло і лише в УФ області, для їх ідентифікації при хроматографічному аналізі застосовують методи дериватизації з утворенням продуктів, що активно поглинають світло в УФ та видимій області, або мають інтенсивну люмінесценцію. Такий підхід допомагає підвищити чутливість визначення амінокислот на декілька порядків.

Перша група методів включає іонну хроматографію зі спектроскопічним детектуванням. Розділення суміші амінокислот відбувається на сильно кислотному катіонообміннику за допомогою градієнтного елюювання буферами різної іонної сили. На виході з колонки проводять дериватизацію окремих амінокислот за допомогою **нінгідрину чи о-фталальдегіду**. Післяколонкова дериватизація може бути застосована для зразків, що містять невелику кількість компонентів буферу, зокрема солей та сечовини, оскільки ці речовини заважають дериватизації та детектуванню амінокислот. Для надійного детектування амінокислот таким способом кожна проба, що аналізується, повинна містити 5 – 10 мкг білку.

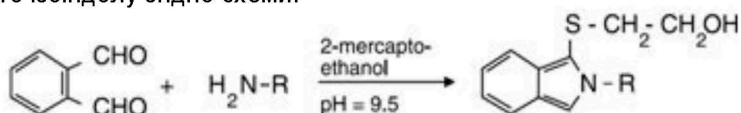
Інша група методів включає застосування вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Розділення амінокислот зазвичай відбувається на обернено- фазовій колонці октадецил силікагель (С18) в режимі градієнтного елюювання. В цих методах як правило проводять попередню дериватизацію вільних амінокислот (до їх розділення на колонці) за допомогою таких реагентів: **фенілізотіоціанату; о-фталальдегіду; 6-амінохінолін - N – гідроксисукциніміділ карбамату; диметиламіноазобензолсульфоніл хлориду (дабсил хлорид); диметиламінонафтілсульфоніл хлориду (дансил хлорид); 7-фтор-4- нітробензол-2- окса-1,3 –діазолу**. Техніка попередньої дериватизації дозволяє значно підвищити чутливість визначення амінокислот. Недоліком є те, що попередня дериватизація може дещо ускладнити ідентифікацію компонентів проби, через присутність у суміші,



що розділяється на колонці, окрім дериватів амінокислот ще й надлишку самих дериватизуючих реагентів та побічних продуктів реакції. Загальна характеристика реагентів та дериватизатів амінокислот для визначення методом ВЕРХ наведена в таблиці 1 (С 42):

### Ідентифікація амінокислот методом обернено-фазової ВЕРХ із застосуванням попередньої дериватизації о-фталальдегідом

о-Фталальдегід (ОФА) реагує з первинними амінами, що входять до складу амінокислот, у присутності тіольної сполуки (2-меркаптоетанолу чи N-ацетил-L-цистеїну) з утворенням флуоресцентного продукту-похідного ізоіндолу згідно схеми:



Для розділення продуктів дериватизації застосовується обернено-фазова ВЕРХ з флуоресцентним детектуванням. Сам реагент не має флуоресценції, отже його надлишок не заважатиме визначенню амінокислот.

*Мета роботи:* провести передколонкову дериватизацію амінокислот та їх подальше розділення і ідентифікацію методом обернено-фазової ВЕРХ.

Метод не можна використати для визначення вторинного аміну-імінокислоти проліну. Однак, пролін можна дериватизувати після окиснення гіпохлоритом натрію. Присутність окисника не впливає на результати визначення інших амінокислот.

Реакція дериватизації амінокислот відбувається швидко протягом декількох хвилин, однак продукт є нестабільним у часі. Отже, в даному методі дериватизацію краще проводити в автоматичному режимі з використанням автосамплера та змішувача і поєднувати з невідкладним хроматографуванням суміші на обернено-фазовій колонці в режимі градієнтного елюювання (елюент: комбінація суміші тетрагідрофуран – метанол – ацетат натрію). Флуоресцентне детектування проводять при довжинах хвиль:  $\lambda=348$  нм (збудження) та 450 нм (емісія). Межа виявлення амінокислот даним методом становить : 1,0 пмоль/проба.

*Розчини, реактиви, обладнання:* тетрагідрофуран (ТГФ) градієнтної чистоти для ВЕРХ; метанол градієнтної чистоти для ВЕРХ; деіонізована вода; меркаптоетанол; о-Фталевий альдегід (ОФА); Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O (фіксанал); натрій ацетат (ч.д.а.); амінокислоти: (аланін, гліцин, лізин,

фенілаланін, глутамін); біхромат калію (для приготування хромової суміші), деіонізована вода.

**Таблиця 1.** Розповсюджені реагенти, продукти дериватизації амінокислот та їх характеристика.

Реагент	Продукт деривати-зації	Спосіб детектування	Характери-стика деривату	Межа виявлення / діапазон лінійності
Фенілзотіо-ціанат	Фенілтіо-гідантіон	УФ $\lambda = 245$ нм	Стабільний кілька днів	1 пмоль/ 20 -500 пмоль
6-амінохінолін- <i>N</i> -гідрокси-сукциніміділ карбамату (АХК)	АХК-амінокислот а	Люмінесценція $\lambda = 250$ нм (збудження) 395 нм (емісія)	Стабільний протягом тижня	40 - 320 фмоль/ 2,5 - 200 пмоль
о-фталальдегід в присутності 2-меркаптоетанолу	Похідні ізоіндолу	Люмінесценція $\lambda = 348$ нм (збудження) 450 нм (емісія)	Неста-більний, необхідно відразу хроматогра-фувати	0,1 пмоль/ 1,0 пмоль – 0,1 нмоль
Диметиламіно-азобензилсульфоніл хлорид (дабсил хлорид) ДМАБСХ	Дабсил-аміно-кислота	Спектрофото-метрія, $\lambda = 436$ нм	Стабільний продукт, можна визначити пролін	1-3 пмоль
Диметиламіно-нафтілсульфоніл хлорид (дансил хлорид) ДМАНСХ	Дансил – аміно-кислота	УФ $\lambda = 254$ нм спектрофото-метрія $\lambda = 436$ нм люмінесценція $\lambda = 360$ нм (збудження) 460 нм (емісія)	Стабільний продукт	
9-фтор метил хлороформ (ФМХ)	ФМХ-аміно-кислота	Люмінесценція $\lambda = 260$ нм (збудження) 313 нм (емісія)	Стабільні продукти швидко утворю-ються	1 фмоль/ 0,1 – 50 пмоль
7-фторо-4-нітробензо-2-окса-1,3-діазол (ФНБД)	ФНБД-аміно-кислота	Люмінесценція $\lambda = 480$ нм (збудження) 530 нм (емісія)	Продукт утворю-ється при нагріванні; можна визначити пролін	10 фмоль

*Прилади, посуд:* рідинний хроматограф Agilent 1200 з діодно-матричним детектором (довжини хвиль: 190 - 950 нм); **Нерухома фаза:** колонка Eclipse XDB-C18 обернена фаза, силікагель з прищепленими октадецилсилільними групами, який підлягав ендкепінгу (4,6x150 мм, діаметр зерна: 5 мкм).

Колби ємністю 500 мл (2 шт.), 250 мл (2 шт.), 25 мл (6 шт.) та 50мл (1шт.); скляні віали; пластикові віали з корком (6 шт.); мірні циліндри ємністю 100 і 500 мл; скляні піпетки об'ємом 10, 5 та 1 мл.; мікропіпетки; шприц медичний на 5 мл (2шт.); мембранні фільтри (0,02мкм); електронні аналітичні терези; гумові корки, воронки.

*Підготовка лабораторного посуду.* Скляний посуд попередньо промити хромовою сумішшю, потім ретельно проточною водою, дистиллятом.

*Приготування розчинів:*

*Розчин натрій ацетату, 0,05 М.* Наважку  $\text{CH}_3\text{COONa}$  масою 0,82 г розчиняють в 200 мл деіонізованої води. Отриманий розчин фільтрують за допомогою мембранного фільтру.

**Елюент (А).** В колбу на 250 мл послідовно зливають 1,0 мл ТГФ (відбирають піпеткою), 19,0 мл  $\text{CH}_3\text{OH}$  (відміряють циліндром) і 180 мл 0,05 М розчину  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (відміряють циліндром). Одержаний розчин фільтрують через мембранний фільтр і закривають корком.

**Елюент (В).** Метанол

*Розчин натрій ацетату 0,01 М (25 мл):* готують відповідним розбавленням 0,05 М робочого розчину за допомогою бідистилляту (5,0 мл розчину ацетату натрію у мірній колбі на 25 мл і до мітки водою). Перед роботою розчин фільтрують через мембранний фільтр.

*Розчи боратного буфера  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  (рН=9,18).* Ампулу фіксаналу добре промивають содою та водою, розбивають, кількісно переносять у колбу ємністю 250 мл, доводять до мітки водою. Концентрація одержаного розчину складає 0,4 М. Або зважують на аналітичних терезах 1,90685 г бури і розчиняють у колбі на 25 мл.

*Розчин дериватизуючого реагенту.* Наважку ОФА масою 0,05 г переносять в ємність з темного скла, послідовно приливають 1,25 мл метанолу, 50  $\mu\text{L}$  меркаптоетанолу, 11,2 мл 0,4 М боратного буферу. Отриману суміш ретельно перемішують, закривають корком і зберігають в холодильнику (Реагент стабільний протягом тижня!). Перед роботою розчин фільтрують через мембранний фільтр.

*Розчини амінокислот.* Стандарти 0,1 М розчини амінокислот отримують шляхом розчинення у воді відповідної наважки кожної амінокислоти, зваженої на аналітичних терезах. Беруть наступні наважки: аланін-8,91мг; гліцин-7,5 мг; лізин-14,6 мг; фенілаланін-16,5 мг; глютамін-14,6 мг, далі їх переносять у пластикові віали і розчиняють в 1 мл води. Робочі  $1 \cdot 10^{-3}\text{M}$  розчини амінокислот готують розбавленням вихідних розчинів водою. Для

цього в колби на 25 мл вносять окремо по 250  $\mu\text{L}$  0.1 М розчину кожної амінокислоти, доводять до мітки водою і перемішують.

*Розчини стандарту тест-проби №1 ( $C = 2 \cdot 10^{-4}$  М).* В одну маленьку скляну віалу вносять по 200  $\mu\text{L}$   $1 \cdot 10^{-3}$  М розчину кожної амінокислоти, суміш перемішують. Перед роботою розчин фільтрують через мембранний фільтр.

*Розчини стандарту тест-проби №2 ( $C = 1 \cdot 10^{-4}$  М).* У віалу відбирають 250  $\mu\text{L}$  тест-проби №1 та додають 250  $\mu\text{L}$  бідистиляту. Перед роботою розчин фільтрують через мембранний фільтр

### **Процедура дериватизації за допомогою автосамплера Програмування автосамплера:**

Позиції віал:

Віала 1: тест-проби (№1, 2), досліджуваний зразок.

Віала 2: дериватизуючий реагент

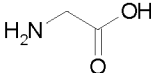
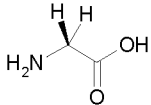
Віала 3: розчин ацетату натрію 0,01 М

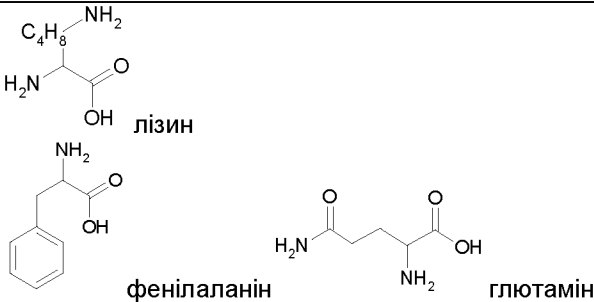
Віала 4: вода

### **Пробопідготовка:**

1. Відбір 2,5  $\mu\text{L}$  з віали 1.
2. Промивання голки у віалі 4.
3. Відбір 2,5  $\mu\text{L}$  з віали 2.
4. Промивання голки у віалі 4.
5. Змішування 6  $\mu\text{L}$  в повітрі з максимальною швидкістю, двічі.
6. Чекати 1 хвилину.
7. Відбір 10  $\mu\text{L}$  з віали 3.
8. Промивання голки у віалі 4.
9. Змішування 15  $\mu\text{L}$  в повітрі, 5 разів.
10. Введення

**Таблиця 2.** Параметри проведення визначення

Прилад	Рідинний хроматограф Agilent 1200
Колонка	Eclipse XDB-C18: обернена фаза, силікагель з прищепленими октадецилсилільними групами, який підлягав ендкепінгу Геометричні розміри: 4,6×150 мм Діаметр зерна: 5 мкм
Зразки	Водні розчини амінокислот з $C = 1 \cdot 10^{-4}$ М, $2 \cdot 10^{-4}$ М, дериватизуючий реагент,..  <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <chem>NC(=O)CO</chem>              гліцин         </div> <div style="text-align: center;"> <chem>NC(C)C(=O)O</chem>              аланін         </div> </div>

	 <p>лізін</p> <p>фенілаланін</p> <p>глутамін</p>
Температура колонки	37 °C
Склад елюента Гرادієнтний режим	2 хв 8% В : 92% А 3 хв 83% В: 17% А 5 хв-змінюється., 2 хв-утримується 54% А : 46% В 2хв-змінюється, 1хв- утримується 34%А : 66% В 3хв- змінюється, 2,6хв- утримується 20%А : 80% В 0,6мин- изменяется, 0.6мин- удерживается 8% А : 92% В
Швидкість потоку	2 мл/хв.
Детектор Діодно-матричний	Довжина хвилі 338 нм Ширина піка 4 нм Довжина хвилі фону: не задавати Ширина щілини 4 нм Ширина піка 0,1 хв, час відгуку

*Хід роботи:*

1. Включити хроматограф, а потім Хімстанцію.
2. Загрузити метод `aminacid.m`, і на його основі створити градієнтний метод аналізу зразка №1 (`aminoacid.m`). Використовувати інструментальні параметри, наведені вище.

***Вибирають Method / Load method.... (aminoacid .m)*** та зберігають його під новою назвою: ***Method / Save method as.... ( aminoacid\_1.m)***.  
***Редактують параметри метода***, використовуючи опцію ***Method/Edit entire method...*** По завершенні редагування метод зберігають ***Method / Save method as.... (aminoacid\_1 .m)***.

Звертають увагу на редагування 2-х розділів: **Інформація про метод, Інструментальні параметри**. В інструментальних параметрах особливу увагу звертають на встановлення параметрів роботи насоса

**(Set up pump instrument) 1, Injector program**, та на значення кожного параметра.

3. Проводять аналіз зразку №1 (**aminoacid\_1 .m**), використовуючи даний буфер 1 (100 ммоль). Запускають аналіз, використовуючи опцію Run Control/Sample info...
4. Проводять аналіз зразку №2 (**aminoacid\_2 .m**).
5. Звертають увагу на зміну тиску в ході аналізу та час утримання вихідних піків.
6. Аналогічно створюють другий-шостий методи аналізу, наприклад Lyz.m (лізин), і хроматографують всі амінокислоти окремо в цьому методі (для цього в позиції 1 замість зразка 1 ставлять окремо амінокислоти з концентрацією  $1 \cdot 10^{-4}$  M).
7. Аналогічно створюють метод аналізу для хроматографування розчину, що не містить амінокислоти (для цього в позиції 1 змінюють віалу зі зразком на воду) blank.m
8. Створюють метод аналізу для хроматографування гідролізату білку.
9. Проводять ідентифікацію амінокислот за часом утримання, спектрам. Роблять висновки про раціональність використання буферного розчину з меншою концентрацією натрій ацетату. Отримані дані вносять в таблицю 3.
10. Вимикають програму, прилад.

**Таблиця 3.** Параметри утримування амінокислот

Аналіт	Параметри утримування			
	$t_R$ , хв	$w_{1/2}$ , хв	$\alpha$	S, mAU·s
Аспаргін				
Глутамін				
Гліцин				
Аланін				
Фенілаланін				
Лізин				
Реагент				

Примітка:  $t_R$  – час утримування, хв;  $w_{1/2}$ , напівширина піку, хв;  $\alpha$  - коефіцієнт селективності; S- площа хроматографічного піка, mAU·s.

Теоретичний порядок вимивання амінокислот: *глутамін; гліцин; аланін; фенілаланін; лізин*

На основі проведених досліджень роблять **висновок** про експериментально отриманий порядок вимивання амінокислот у суміші і про присутність відповідних амінокислот у суміші, що аналізується.

### **Лабораторна робота № 6**

#### **Визначення енантіомерної чистоти ізомерів амінокислоти методом хіральної ВЕРХ**

Більшість амінокислот мають у своїй структурі хіральний центр. Відомо, що їх широко використовують як вихідні речовини для синтезу хіральних органічних сполук, у тому числі, пептидів. Енантіомери не різняться за хімічними і фізичними властивостями, а лише по різному обертають площину поляризованого світла. Тому їх розділення методами обернено-фазової і нормально-фазової хроматографії ускладнене. Для розділення суміші енантіомерів амінокислот а також контролю оптичної чистоти препарату амінокислоти застосовують хіральні нерухомі іонообмінні фази на основі модифікованого силікагелю.

Енантіомерний надлишок (enantiomeric excess **EE**) – це міра чистоти, яка використовується для хіральних сполук. **EE** визначають як абсолютну різницю між мольними частками двох енантіомерів ( $F_R$  і  $F_S$  відповідно):

$$EE = |F_R - F_S|, \text{ де } F_R + F_S = 1 \quad (1)$$

На практиці зручніше використовувати різницю відсоткового вмісту мажорного (основного) і мірного (неосновного) енантіомеру. В рацематі (суміші двох енантіомерів) вміст кожного з ізомерів становить 0,5 або 50%.

*Мета роботи:* визначення оптичної чистоти ізомеру амінокислоти: фенілаланіну, триптофану та гідроксифенілаланіну.

Для цього необхідно попередньо ідентифікувати часи виходу ізомерів суміші фенілаланіну, триптофану та гідроксифенілаланіну, перевірити, чи умови запропоновані виробником нерухомої фази є оптимальними для досягнення мети.

*Розчини, реактиви, обладнання:* **Хроматографічна система** Agilent 1100 з мас-аналізатором; **Нерухома фаза:** Chiralpak ZWIX (150x4.0 mm, 3 mkm), Chirobiotic TAG (250x4.6 mm, 5 mkm). **Елюент:** MeOH (50mM FA) : ACN (25mM DEA) : H<sub>2</sub>O , 49:49:2, MeOH 100%. Ультразвукова баня;

скляні віали; мірні циліндри ємністю 100 мл; скляні піпетки об'ємом 10, 5 та 1 мл.; мікропіпетки; електронні аналітичні терези; гумові корки, воронки, деіонізована вода.

*Хід роботи.*

1. Підготовка рухомої фази. Приготувати розчини (елюент) для елюювання рацемату із застосуванням хіральної колонки Chiralpak ZWIX.
2. Приготувати суміш рацематів і окремо кожен ізомер енілаланіну, триптофану та гідроксифенілаланіну. Для цього наважку зразків, масою 4 мг, зважену на аналітичних вагах, розчинити в ізопропанолі. Якщо сполуки не розчиняються додати кілька крапель метанолу.

*Підбір умов розділення рацемату.*

3. Вмикання приладу. Запуск робочої програми OpenLab (Chemstation). On-line, off-line режими роботи Хімстанції. Для з'єднання програми з приладом необхідно на панелі, де розташовані всі блоки хроматографа включити кнопку On.
4. Заміна розчинника (прокачування каналів, підготовка хроматографа до роботи).
5. Створити метод для елюювання рацемата з наступними параметрами:  
обрати один канал для подачі розчинника (перевірити, куди поставили розчинник);  
об'єм вводу проби – 5 або 10 мкл, Швидкість подачі елюента – 0,6 1,0 мл/хв;  
обрати довжину хвилі реєстрації компонентів суміші: 205, 215, 254 нм.
6. Після промивання каналів задати швидкість потоку 0,6 або 1,0 мл/хв та закрити вхідний кран.
7. Слідкувати за виходом колонки у рівноважний режим, (приблизно 20 хв). Після промивання і врівноваження колонки здійснити хроматографування зразка за допомогою запуску методу (Run Control / Sample info...).
8. Отримати хроматограми і на основі їх аналізу заповнити таблицю 1.

**Таблиця 1.** Результати хроматографування суміші амінокислот

Амінокислота	Колонка	Параметри колонки	Швидкість потоку, мл/хв	Час утримування, хв



9. Вколоти у хроматограф задачу з віалі і визначити оптичну чистоту ізомеру, використовуючи формулу (1) для визначення  $EE$ .

Зробити **висновок** про умови розділення компонентів суміші та можливість застосування методу для визначення оптичної чистоти дослідженого ізомеру.

**Рекомендована література:**

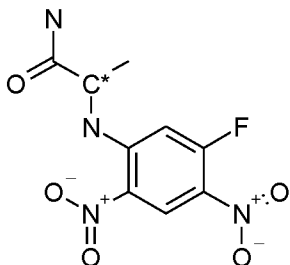
1. <https://chiraltech.com/chiral-selectors/specialty-chiral-selectors/>
2. <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/marketing/global/documents/204/100/t408131.pdf>

**Лабораторна робота № 7**

**Визначення енантіомерної чистоти ізомерів амінокислоти методом обернено-фазової ВЕРХ з попередньою дериватизацією**

Відомо, що амінокислоти містять щонайменше один хіральный центр і розділення рацемату амінокислот методом ВЕРХ в обернено-фазовому режимі хроматографування без попередньої модифікації молекули неможливе. В попередній лабораторній роботі розглядали розділення рацемату амінокислот із застосуванням хіральных нерухомих фаз, які є дорогавартісними і їх застосування в одиничних випадках є нераціональним. Більш доступним способом для виконання аналізу є дериватизація амінокислот хіральним реагентом з утворенням діастереомерів. Важливим завданням є вибір реагенту, що буде реагувати з амінокислотою в стехіометричному співвідношенні. Реакція повинна проходити швидко і не потребувати особливих умов проведення. Таким реагентом є Марві (FDAA, Marfey's Reagent, MR, 1-флуор-2-4-динітрофеніл-5-аланін амід) — порошок яскраво-жовтого чи помаранчевого забарвлення,  $M_r=272.19$ . (рис. 1).

**MR** реагує стехіометрично з аміногрупою енантіомеру/ів амінокислоти з утворенням стабільних діастереомерних дериватів, які можуть бути розділені методом рідинної хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням (LC-MS). Динітрофеніл-аланінамідна частина реагенту поглинає при 340 нм ( $\epsilon=30000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ) і забезпечує виявлення з чутливістю нмоль/проба.



**Рис. 1.1**-флуор-2-4-динітрофеніл-5-аланін амід (Марві, MR).

амінокислоти методом рідинної хроматографії з мас-спектрометричним детектором (LC/MS), використовуючи попередню дериватизацію амінокислоти за допомогою 1-фтор-2-4-динітрофеніл-5-L-аланін аміду.

*Розчини, реактиви, обладнання:* для реакції дериватизації використовують 1% розчин реагенту Марві в ацетоні (для приготування розчину на аналітичних терезах відважують 50 мг реагенту та додають 5 мл ацетону); готують 1,0 М розчин бікарбонату натрію та 2,0 М розчин соляної кислоти. Реакцію проводять в хроматографічній віалі, об'ємом 2,0 мл. Хроматографічне розділення проводять за допомогою хроматографічної системи з мас-аналізатором Agilent 1100. **Рухома фаза:** 0,1% розчин мурашиної кислоти у воді і в ацетонітрилі (для хроматографії), які готують в окремих колбах. **Нерухома фаза:** колонка YMC-Triart C18 (100x4.6 mm, 5 мкм). Бікарбонат натрію (NaHCO<sub>3</sub>), 1,0 М; HCl, 2,0 М; ацетонітрил (ACN), Деіонізована вода. Скляні віали; колби ємністю 500 мл (2 шт.), мембранні фільтри (0,02мкм); електронні аналітичні терези.

*Хід роботи:*

Амінокислоту дериватизують з L-MR і/або D-MR дотримуючись такої послідовності дій:

1. Відібрати 5 мкмоль аналіту та розчинити у 100мкл води;
2. Додати 200 мкл 1% L- або D-MR в ацетоні;
3. Додати 40 мкл 1,0 М бікарбонату натрію (NaHCO<sub>3</sub>);
4. Гріти реакційну суміш 1 годину при 40°C;
5. Охолодити реакційну суміш до кімнатної температури;
6. Додати 20 мкл 2,0 М HCl для нейтралізації бікарбонату натрію;
7. Після завершення нейтралізації та дегазації CO<sub>2</sub> в розчині, зразок розбавити 640мкл ACN і при необхідності відфільтрувати.

В результаті реакції L-MR з похідними D-, L-амінокислот утворюються LD-, LL-діастереомери. Для визначення енантіомерного надлишку амінокислоти дериватизацію можна проводити для енантіомеру і його рацемату з одним енантіомером MR, або ж у випадку відсутності рацемату амінокислоти, з LD-реагентами Марві.

*Мета роботи:* визначити енантіомерну чистоту ізомерів

## Аналіз дериватів методом LC-MS

Аналіз дериватизованого аналіту проводиться методом LC-MS. Умови розділення наведені в **табл. 1**.

**Таблиця 1.** Умови аналізу дериватів методом LC-MS

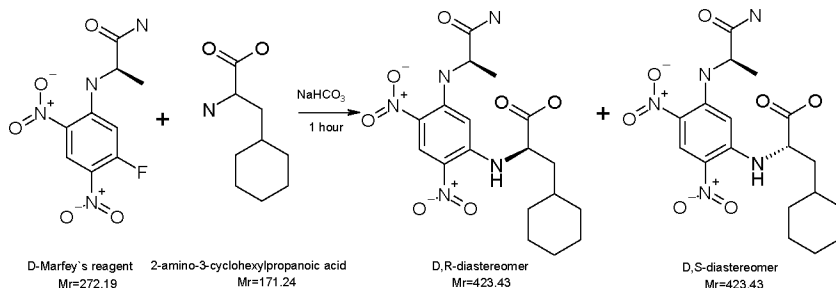
Колонка для аналізу	YMC-Triart C18 (100x4.6 mm, 5 mkm) Також можна використовувати колонки з прищепленими C3 і C8 групами на поверхні
Система для аналізу	H <sub>2</sub> O(0.1% FA)-ACN(0.1% FA), 10-90, 2.0 ml/min або слабша система H <sub>2</sub> O(0.1% FA)-ACN(0.1% FA), 10-60, 2.0 ml/min За необхідності систему можна посилити/послабити.
Тривалість аналізу	14 хв
Довжина хвили детектування	340нм
Target masses	Молекулярний іон (M) деривату (молекулярна маса + 1)

Спочатку проколюють аліквоту рацемату об'ємом 1-2 мкл в градієнтному режимі елюювання, змінюючи вміст ацетонітрилу з 10 до 90% за 10 хвилин. В режимі «offline» відкривають хроматограму рацемату. Використовуючи дані мас-аналізатора, перевіряють, чи відповідає M розділених на хроматограмі піків M піків досліджуваних діастереомерних дериватів. Якщо розділення піків відбувається до базової лінії і їх M співпадає з M піків рацемату, тоді у цій же системі аналізують діастереомер, отриманий з енантіомеру. У випадку, якщо рацемат не розділився до базової лінії, систему послаблюють/посилюють (проводять розділення в більш пологому градієнті: для «слабшої» системи обирають градієнт від 10 до 50% ацетонітрилу за 10 хв, а для більш «сильної» системи – 40-90% ацетонітрилу за 10 хв) для досягнення розділення рацемату до базової лінії.

Після розділення рацемату визначають енантіомерний надлишок (**EE**), згідно опису роботи №6.

**Приклад:** дериватизація 2-аміно-3-циклогексилпропанової кислоти. В процесі дериватизації утворюються діастереомерні пари згідно схеми, наведеної на рис 2., з M=424.43. На основі аналізу аліквоти аналіту в системі: YMC-Triart C18 (100x4.6 mm, 5 mkm), H<sub>2</sub>O(0.1% FA)-ACN(0.1% FA), градієнтне елюювання із зміною кількості ацетонітрилу з 10 до 90% за 10 хв, швидкість потоку рухомої фази - 2.0

ml/min отримали розділені піки дериватизованого рацемату,  $Ml=424.23$ . Діастереомери розділились до базової лінії. За таких самих умов проколюють деривати ізомерів: R-isomer+D-MR, S-isomer+D-MR. На основі аналізу отриманих хроматограм (рис.3, С 53) визначають енантіомерний надлишок (ЕЕ) як описано в лабораторній роботі №6.



**Рис. 2.** Схема реакції D-MR з рацематом 2-аміно-3-циклогексилпропанової кислоти з утворенням суміші діастереомерів.

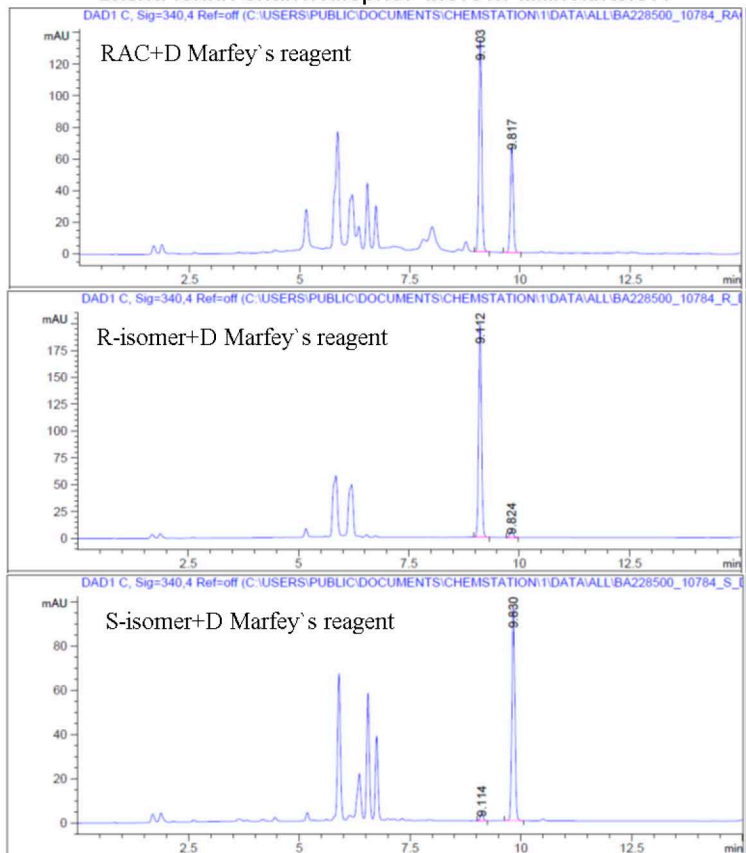
### Рекомендована література:

1. Navid J. Ayon, Amar Deep Sharma, William G. Gutheil LC-MS/MS-Based Separation and Quantification of Marfey's Reagent Derivatized Proteinogenic Amino Acid dl-Stereoisomers // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2019, 30, 3, 448–458.

### Контрольні запитання

1. Які хімічні та фізичні методи використовують для виявлення та кількісного визначення амінокислот?
2. Чи можна виявити окремі амінокислоти за допомогою біуретової реакції?
3. Які реакції використовують для виявлення циклічних амінокислот, зокрема тирозину?
4. За допомогою якої реакції визначають сірковмісні амінокислоти?
5. Для виявлення яких амінокислот застосовується ксантопротеїнова реакція? Що є продуктами даної реакції?
6. Які методи кількісного визначення загального вмісту амінокислот вам відомі?
7. Охарактеризуйте електрорхімічні методи визначення амінокислот.
8. Який принцип розділення амінокислот методом тонкошарової хроматографії та хроматографії на папері ?

9. Для чого потрібна дериватизація амінокислот при їх визначенні методом ВЕРХ?
10. Що таке оптична чистота енантіомерів, як її визначають?
11. Які хіральні колонки використовують для визначення енантіомерної чистоти ізомерів АК?
12. Чи використовують метод обернено-фазової хроматографії для визначення енантіомерної чистоти амінокислот?



**Рис. 3.** Хроматограми дериватів R-, S- 2-аміно-3-циклогексилпропанової кислоти. Умови хроматографування: YMC-Triart C18 (100x4.6 mm, 5 Роблять **висновок** про проходження реакції дериватизації та енантіомерну чистоту дериватизованого ізомеру амінокислоти.  $\mu\text{km}$ ),  $\text{H}_2\text{O}$ -CAN (0.1% FA), 10-90, 2.0 ml/min, Час хроматографування - 14 хв. Довжина хвилі детектування - 340нм. МІ дериватиту - 424.

## Тема 5. БІЛКИ

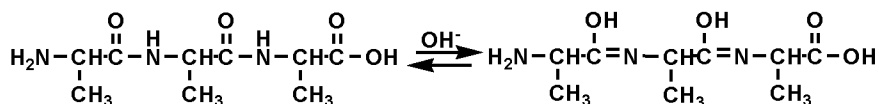
Білками називають складні високомолекулярні сполуки біологічного походження (біополімери), побудовані із залишків амінокислот, що сполучені пептидними зв'язками. Умовно речовини, що містять менше, ніж 50 ланок амінокислот називають *поліпептидами*, або просто *пептидами*, а більше, ніж 50 ланок- білками (*протеїнами*). Чіткої межі між ними не існує. За хімічною будовою білки бувають прості (*апопротеїни*) та складні (*глобупотеїни*). Нижче наведено методики визначення загального вмісту білків спектрофотометричним методом та ідентифікацію амінокислот, що входять до складу білку, методом ВЕРХ після кислотного гідролізу.

### Лабораторна робота № 1

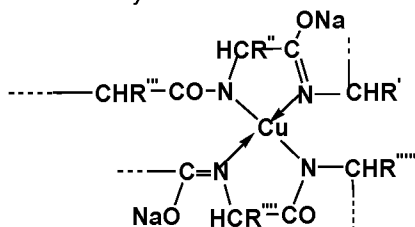
#### Визначення білків за біуретовою реакцією

Білки (поліпептиди) у лужному середовищі у присутності тартрату купруму (II) утворюють комплексні сполуки з іонами купруму, забарвлені у синьо – фіолетовий колір, інтенсивність забарвлення яких залежить від кількості пептидних зв'язків у молекулі білку та пропорційна концентрації білку у досліджуваному розчині. Продукти неповного гідролізу білку (пептиди) дають червоне чи рожеве забарвлення при проведенні біуретової реакції.

Попередньо у лужному середовищі відбувається єнолізація пептидних групи поліпептиду :



Єнольна форма поліпептиду взаємодіє з тартратом купруму (II) з утворенням комплексної сполуки:



де, R', R'', R''', R'''' – залишки амінокислот

Біуретова реакція характерна для сполук, що містять не менш, ніж два пептидних зв'язки. Аналогічний ефект дають також амінокислоти: аспарагін, пістидин, треонін, серін, деякі багатоатомні спирти, біурет (продукт димеризації сечовини). Визначенню заважають солі амонію та сполуки, що утворюють з купрумом (II) забарвлені комплекси.

Метод простий і надійний. Відповідність закону Бугера – Ламберта - Бера лежить в межах концентрацій білку 0,1 – 2 г/л. Межа визначення білку становить 0,05 г/л. Максимальна інтенсивність забарвлення комплексу проявляється через 15 хв та залишається стабільною протягом 7 год. Для визначення менших концентрацій білку застосовують більш чутливий метод Лоурі. Перевагою методу є те, що природа білку не впливає на утворення забарвленого комплексу. Для побудови градувального графіка можна використовувати розчин стандартного білку (альбумін сироватки крові).

*Розчини, реактиви, обладнання:* стандартний розчин білку (водний розчин яєчного альбуміну, 10мг/мл. Зважують на аналітичних терезах 1,00 г яєчного білку, переносять в мірну колбу на 100 мл і доводять до мітки водою), біуретовий реагент: 1,5 г  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ; 6,0 г тартрату натрію і калію, 30 г NaOH- змішати та розвести водою до 1 л. Реактив стійкий протягом місяця. 1.0 М розчин лугу.

Мірні колби на 25 мл, кювети на 2 см, фотоелектроколориметр.

*Хід роботи:* в 7 мірних колб на 25 мл вводять: 0, 10, 20, 40, 60, 80 мг альбуміну, в останній колбі одержують розчин з невідомим вмістом білку. Після цього в усі колби додають по 5 мл біуретового реагенту та доводять об'єм до мітки дистилатом. Вміст колб перемішують та через 30 хв вимірюють оптичну густину розчинів при  $\lambda=540$  нм,  $l = 2$  см відносно холостої проби, що не містить білку. За результатами вимірювань будують градувальний графік в координатах:  $A_{540}$  -  $S_{\text{альбуміну}}$ , мг. Вміст білку в невідомому зразку (мг) визначають за градувальним графіком.

*Визначення білку у м'ясі.*

*Отримання витяжки білку м'яса.* Зразок м'язової тканини подрібнюють та гомогенізують. Зважують 10-15 г гомогенізатору, поміщають його у мірну колбу на 100 мл, додають 20 мл дистильованої води, 10 мл 1М розчину NaOH, перемішують, доводять до мітки водою і ставлять у холодильник на 12 год. Після відстоювання розчин (не перемішують !) фільтрують через вату та паперовий фільтр, відкидаючи перші 15 мл.

Для фотометричного визначення білку у мірну колбу на 25 мл відбирають 0,1 - 0,2 мл фільтрату витяжки м'яса, додають 5 мл біуретового реагенту, доводять до мітки водою та перемішують. Далі проводять усі операції як описано у попередньому пункті при побудові

калібрувального графіка. Вміст білку у м'ясі розраховують за калібрувальним графіком у мг/г.

*Визначення білків у сироватці крові.* Свіже відібрану кров поміщають у центрифужну пробірку, нагрівають на водяній бані протягом 30 хв при 30-35°C та центрифугують 10 хв на швидкості 1500 об/хв. Якщо кров була відібрана раніше, а заморожена, тоді до 1 мл крові додають 1 мл ацетону і проводять усі операції, як описано вище. Отримують сироватку крові.

*Фотометричне визначення білків у сироватці крові.* У мірну колбу на 25 мл вводять 0,25 – 0,5 мл сироватки крові, додають 5 мл біуретового реагенту, доводять до мітки водою та перемішують. Далі проводять усі операції як описано у попередньому пункті при побудові калібрувального графіка. Вміст білку сироватці розраховують за калібрувальним графіком у мг/г.

## **Лабораторна робота № 2.**

### **Кількісне визначення білку за методом Лоурі**

Реакція, що лежить в основі методу полягає у відновленні суміші фосфорновольфрамової та фосфорномолібденової гетерополікислот (ГПК) – реактив Фоліна - тирозиновими та цистеїновими радикалами білкової молекули. В результаті утворюються відновлені форми ГПК синього кольору, інтенсивність забарвлення яких пропорційна концентрації білку. Забарвлення посилюється при введенні в систему іонів купруму (II) як результат утворення комплексу пептидів з іонами купруму (II) аналогічно біуретовому методу, також за літературними даними відомо, що іони купруму (II) каталізують реакцію відновлення жовтих ГПК до синіх.

Даний метод набагато чутливіший, ніж біуретовий і дозволяє визначити білок на рівні 1-2 мкг/мл. Визначенню заважають неорганічні та органічні відновники, розчини неіоногенних поверхнево-активних речовин, вуглеводи, комплексопи (ЕДТА), аміак.

*Розчини, реактиви, обладнання:* стандартний розчин білку (водний розчин яєчного альбуміну, 0,5 мг/мл), свіжеприготований лужний розчин купруму (II): 50 мл 2% карбонату натрію в 0,1 М розчині гідроксиду натрію змішують з 1 мл 0,5% розчину  $\text{CuSO}_4$  в 1% розчині тартрату натрію і калію; реактив Фоліна: 20 г фосфорновольфрамової і 5 г фосфорномолібденової ГПК розчиняють у 140 мл води, додають 10 мл 80% ортофосфорної кислоти та 20 мл концентрованої хлороводневої кислоти. Суміш кип'ятять зі зворотним холодильником протягом 10 год. Потім додають 30 г сульфату літію, 10 мл дистильованої води, 2-3



краплини бром у і знову кип'ятять без зворотного холодильника у витяжній шафі для видалення бром у. Розчин охолоджують, доводять до 200 мл водою і фільтрують. Перед роботою реактив розводять в два рази водою.

Мірні колби на 25 мл, скляні палички, піпетки, фотоелектроколориметр, кювети на 1 см.

*Хід роботи:* в мірну колбу на 25 мл відбирають 2 мл розчину білку, що аналізується, додають 2 мл тартратного комплексу купруму (II) в лужному середовищі, ретельно перемішують і залишають на 10 хв за кімнатної температури. Потім у суміш вносять 1 мл реактиву Фоліна, перемішують, доводять до мітки водою і залишають стояти 30 хвилин за кімнатної температури. Розчин має набути помітного синього забарвлення, інтенсивність якого вимірюють на фотоелектроколориметрі в кюветі  $l=1$  см при  $\lambda=670$  нм відносно холостого розчину, що не містить білку. Концентрацію білку визначають за градувальним графіком. Для цього в 6 мірних колб на 25 мл вводять таку кількість стандартного розчину альбуміну, щоб в кінцевому об'ємі розчину його концентрація становила, мкг/мл: 4; 10; 20 40; 60 та 100. Далі проводять усі операції як описано вище. Будують градувальник графік в координатах:  $A_{670}$  –  $C_{\text{білку}}$ , мкг/мл.

### **Лабораторна робота № 3.**

#### **Визначення білків за азотом**

Визначення білків за азотом базується на тому, що вміст цього елемента в білках приблизно однаковий і становить 16 мас %. По кількості азоту розраховують вміст білку у пробі. Для проведення аналізу органічну речовину мінералізують шляхом кип'ятіння з концентрованою сульфатною кислотою у присутності каталізаторів (оксид меркурію (II), сульфат купруму (II), елементарний селен), або окисників (пероксид водню, перманганат калію). При цьому органічний азот переводиться в неорганічний амонійний, який далі можна визначити спектрофотометрично з реактивом Неслера, або фенол-гіпохлоритним методом. Нижче наведено прискорений метод визначення мікрокількостей органічного азоту.

*Розчини, реактиви, обладнання:* проба біологічного матеріалу (білок курячого яйця); реактив Неслера (у мірній колбі на 1 л розчиняють 100 г  $\text{HgI}_2$  та 70 г  $\text{KI}$ , додають 500 мл розчину лугу, що містить 160 г  $\text{NaOH}$ , перемішують і доводять до мітки водою); пероксид водню, 30%; стандартний розчин  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (2мкг азоту в 1 мл) ; концентрована сульфатна кислота; 2н  $\text{KOH}$ .

Термостійкі пробірки на 10 мл, скляні палички, мірні колби на 100 і 25 мл, універсальний індикаторний папір, піпетки, фотоелектроколометр, кювети на 1 см.

*Хід роботи:* на аналітичних терезах зважують 0,03-0,06 г продукту що аналізується та поміщають у термостійку пробірку, приливають 2 мл  $H_2SO_4$  (конц) та 1-2 краплі пероксиду водню. Пробірку дуже обережно нагрівають на слабкому вогні 3 хв до розчинення проби та знебарвлення розчину. Якщо через 3 хв розчин залишився жовтого кольору, додають ще 2 краплі пероксиду водню і продовжують нагрівання 1-2 хв. При мінералізації проби уникають бурхливого кипіння розчину. Після повного окиснення органічних сполук, про що свідчить повне знебарвлення розчину, пробу переносять у мірну колбу на 100 мл, у яку попередньо налито 10-15 мл дистильованої води, охолоджують і доводять до мітки водою. Відбирають аликвотну частину розчину (10 мл) у колбу на 25 мл і нейтралізують розчин за допомогою 2 н розчину лугу до рН 9 (за індикаторним папером). До нейтралізованого розчину додають 1 мл реактиву Неслера та доводять до мітки водою. Аналогічно готують холосту пробу, що не містить біологічного матеріалу. Оптичну густину проби, що аналізується, вимірюють на КФК в кюветі  $l = 1$  см при  $\lambda = 440$  нм відносно холостої проби. Вміст азоту (мкг у пробі) визначають за градувальним графіком, для побудови якого в 6 мірних колб на 25 мл вводять 0, 2, 5, 10, 15, 20 мл стандартного розчину аміаку, додають 1 мл реактиву Неслера, доводять до мітки водою і вимірюють оптичну густину розчинів на КФК в кюветі  $l = 1$  см при  $\lambda = 440$  нм відносно холостої проби, що не містить азоту. За результатами вимірювань будують градувальник графік в координатах:  $A_{440} - C_{азоту}$ , мкг/25 мл.

Вміст білку в пробі, що аналізується, розраховують за азотом з урахуванням розведень, прийнявши, що масовий відсоток цього елемента в білку складає 16.

#### **Лабораторна робота № 4**

##### **Спектрофотометричне визначення білку з використанням аніонного барвника**

Деякі аніонні барвники, що застосовуються в якості кислотно-основних індикаторів, наприклад: метиловий оранжевий, бромкрезоловий зелений, брильянтовий голубий, бромфеноловий синій та інші, у водних розчинах при певному рН (нижче ізоелектричної точки білку) утворюють асоціати з позитивно зарядженими молекулами білку, що супроводжується зміною максимуму у спектрі поглинання барвника. Інтенсивність максимуму поглинання пропорційна концентрації білку в

розчині. Найчастіше даний метод застосовується для визначення альбумінів. Зокрема, бромфеноловий синій при рН 3,0 селективно зв'язується з альбумінами, що супроводжується появою довгохвильового максимуму при  $\lambda = 590$  нм у спектрі поглинання реагенту, який за даних умов без білку має максимум поглинання при  $\lambda = 440$  нм. Інтенсивність забарвлення пропорційна концентрації альбуміну в розчині. Нижня межа визначення білку за допомогою даного методу складає 50 мг/л.

*Розчини та реактиви:*

1. Фталатний буфер з **pH=3.0** (при використанні бромфенолового синього): до 100 мл розчину 0,1 М НСІ додають 4,58 г гідрофталату калію (можна взяти суху сіль з ампули для приготування стандартного буферу рН 4,01). Після цього одержаний розчин розводять дистильованою водою до 200 мл. Перевіряють значення рН буферу на рН-метрі; або фталатний буфер **pH=4,01** (при використанні бромкрезолового зеленого), готують з фіксаналу.
2. Розчин бромфенолового синього (БФС) (рК = 4) або бромкрезолового зеленого (БКЗ) (рК = 4,2),  $1 \cdot 10^{-3}$  моль/л. (50 мл).
3. Розчин альбуміну, 10 г/л (для цього наважку яєчного білку масою 1 г переносять в мірну колбу на 100 мл і доводять до мітки дистильованою водою).
4. Ізотонічний розчин, 154 мМ розчин NaCl (фізіологічний розчин). 0,9 г NaCl розчиняють у воді в мірній колбі на 100 мл і доводять до мітки водою.

*Хід роботи:*

У шість мірних колб на 25 мл вносять такі об'єми стандартного розчину альбуміну, мл: 0; 0,5 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 . До кожної колби додають по 3 мл буферу, суміш ретельно перемішують, потім додають по **0,5** мл розчину БФС (або БКЗ). Вміст кожної колби доводять водою до загального об'єму 15 мл.(див таблицю). Вміст колб ретельно перемішують, витримують 15 хв та вимірюють оптичну густину розчинів при  $\lambda = 590$  нм (620нм на СФ),  $l = 1,0$  см відносно дистилляту. Виходячи з одержаних даних будують градувальний графік. Вміст білку в невідомому зразку (мг) визначають за градувальним графіком. Для цього у дві мірні колби вводять по 0,010- 0,025 мл аліквоти розчину, що аналізується, далі проводять описані вище процедури. Вміст білку розраховують за результатами не менше, ніж двох вимірювань.

**Таблиця для побудови градувального графіку**

N колби	Об'єм р-ну альбуміну, мл	Об'єм води, мл	A <sub>590</sub>	Маса альбуміну, мг
1	0	11,5		
	0,5	11		
2	1	10,5		
3	2	9,5		
4	4	7,5		
5	6	5,5		
6	8	3,5		
7				X
8				X

#### **Визначення білку в м'ясі.**

*Отримання витяжки білку м'яса.* Зразок м'язової тканини подрібнюють та гомогенізують. Зважують 10-15 г гомогенізатору, поміщають його у мірну колбу на 100 мл, додають 20 мл дистильованої води, 10 мл 1М розчину NaOH, перемішують, доводять до мітки водою і ставлять у холодильник на 12 год. Після відстоювання розчин (не перемішують !) фільтрують через вату та паперовий фільтр, відкидаючи перші 15 мл.

Для фотометричного визначення білку у мірну колбу на 25 мл відбирають 0,03 - 0,05 мл фільтрату витяжки м'яса, додають 3 мл фталатного буферу, 0,5 мл розчину БФС (або БКЗ), доводять вміст кожної колби до загального об'єму 15 мл. Вміст білку у м'ясі у мг/г розраховують за калібрувальним графіком.

#### **Визначення білку в сироватці крові.**

*Отримання сироватки крові.* Свіже відібрану кров (свинячу або коров'ячу) поміщають у центрифужну пробірку, нагрівають на водяній бані протягом 30 хв при 30-35°C та центрифугують 10 хв на швидкості 1500 об/хв. Якщо кров була відібрана раніше, тоді до 1 мл крові додають 1 мл ацетону і проводять усі операції, як описано вище. Отримують сироватку крові.

*Фотометричне визначення альбуміну у сироватці.* У мірну колбу вводять 0,05 -0,07 мл сироватки крові, додають 3 мл фталатного буферу, 0,5 мл розчину БФС (або БКЗ), доводять вміст кожної колби до загального об'єму 15 мл. Визначення вмісту альбуміну у сироватці (мг/мл) проводять за калібрувальним графіком.

Для отримання більш точних результатів у кожному колбу, що використовується для побудови калібрувального графіка додають по 0,25 мл ізотонічного розчину NaCl.

### **Лабораторна робота № 5**

#### **Визначення амінокислот у білках методом ВЕРХ**

В об'єктах, що аналізуються, амінокислоти знаходяться у вільному стані, або входять до складу білків чи пептидів. До складу білкових молекул входить 20 основних видів амінокислот. При аналізі білкових молекул контроль вмісту амінокислот допомагає ідентифікувати білки та протеїни, встановити в них послідовність амінокислот, а також визначити нетипові амінокислоти в складі білків. Якщо об'єктом аналізу є пептиди чи білки, то необхідно провести попередній гідроліз пептидних зв'язків та вивільнити амінокислоти, а вже далі визначати їх у суміші.

**Мета роботи:** провести попередній кислотний гідроліз альбуміну та ідентифікувати амінокислоти, що входять до його складу методом ВЕРХ.

**Гідроліз білків.** Кислотний гідроліз - найбільш розповсюджений спосіб гідролізу білків та протеїнів, але деякі амінокислоти під час такої процедури можуть бути зруйновані, зокрема, повністю руйнується триптофан, аспаргін та глутамін втрачають амідні групи і переходять в аспарагінову та глутамінову кислоти. Частково руйнуються серин та треонін, окиснюється метіонін, цистеїн, як правило, переходить в цистин. Якщо гідроліз проводити у вакуумі (при пониженому тиску (26,7 Па)), чи в атмосфері інертного газу аргону, окиснення та часткового руйнування амінокислот можна уникнути. Незважаючи на це, кислотний гідроліз білків призводить до повної втрати триптофану, аспарагіну, глутаміну, що зменшує кількість видів амінокислот у суміші для подальшого визначення до 17.

Найбільш розповсюджений кислотний гідроліз білків –метод з використанням хлороводневої кислоти та фенолу. Фенол необхідний для того щоб запобігти хлоруванню тирозину

**Розчин для гідролізу:** 2н HCl, що містить від 0,1 до 1,0 % фенолу; 2н NaOH. Зменшити розкладання триптофану можна шляхом введення в суміш для гідролізу відновників: меркаптоетансульфонової чи тіогліколевої кислот.

Зменшити окиснення цистеїну до цистину можна шляхом додавання азиду натрію чи диметилсульфоксиду в розчин для гідролізу.

*Розчини, реактиви, обладнання:* бичачий сироваточний альбумін (сухий); розчин для гідролізу: 2 М HCl +0,1% фенолу; 2 М NaOH.

Скляні ампули на 5 мл; мембранний фільтр з діаметром пор 0,22 мкм; медичний шприц (5 мл); скляні віали на 1 мл (2 шт); деіонізована вода.

*Хід роботи:*

**Гідроліз білку.** Проба білку (бичачий сироваточний альбумін, БСА) висушується до повного видалення вологи, поміщається в ампулу, куди додається розчин для гідролізу з розрахунку: 4,0 мл розчину для гідролізу на 0,2 г висушеного білку. Гідроліз проводять при 110°C протягом 20 -24 год в інертній атмосфері (аргон), або під вакуумом в запаяній ампулі. Після завершення гідролізу ампулу охолоджують, відбирають 1 мл гідролізату, додають 1 мл 2 М NaOH, розбавляють водою в 200 раз. Для цього до аліквоти гідролізату (0,1 мл) додають 20 мл деіонізованої води. Відбирають 1 мл одержаного розчину гідролізату білку і фільтрують через мембранний фільтр з діаметром пор 0,22 мкм. Далі проводять передколонкову дериватизацію і розділення суміші дериватів амінокислот аналогічно опису *лабораторної роботи № 5, тема 4* (Ідентифікація суміші амінокислот методом ВЕРХ з попередньою дериватизацією).

### Контрольні запитання

1. Що таке первинна, вторинна, третинна і четвертинна структура білків?
2. Вкажіть, які з перерахованих нижче методів використовуються для розділення, а які для кількісного визначення білків: метод Лоурі; біуретова реакція; діаліз; фракційне осадження; електрофорез? Охарактеризуйте ці методи.
3. Які методи визначення загального вмісту білків вам відомі?
4. Порівняйте за чутливістю і селективністю фотометричні методики визначення білків.
5. Переваги та недоліки застосування аніонних барвників для фотометричного визначення білків.
6. Якими способами можна відокремити білки від низькомолекулярних сполук?
7. Що таке прості білки? Як провести гідроліз простих білків?
8. Що таке складні білки? Яким чином можна провести їх гідроліз?
9. Яким чином можна ідентифікувати і визначити амінокислоти, що входять до складу білку?
10. Як визначити вторинну, третинну та четвертинну структуру білків?

## Тема 6. ФЕРМЕНТИ

Ферменти (ензими) – це біологічні каталізатори білкової природи, які синтезуються в клітинах живих організмів, прискорюють і координують біохімічні реакції. Залежно від хімічного складу ферменти поділяють на прості та складні. Прості ферменти містять у своєму складі лише залишки амінокислот. Складні ферменти, окрім білкової частини, містять також небілкову, наприклад, кофермент.

Залежно від типу хімічної реакції, яку вони каталізують ферменти, ділять на 6 класів. Для ферментів характерна висока специфічність взаємодії з субстратом завдяки селективному зв'язуванню в активному центрі ферменту. На ферментативну активність впливають: температура, рН розчину, іонна сила, а також присутність інгібіторів та активаторів ферментів. Ферменти широко використовуються у кінетичних методах аналізу для кількісного визначення органічних та неорганічних сполук (субстратів, інгібіторів та активаторів) у складних об'єктах.

Нижче наведено методики виділення ферментів з природної сировини, визначення їх активності, а також впливу активаторів та інгібіторів на активність ферментів. Приведено методики ферментативного визначення субстратів та інгібіторів з використанням спектрофотометричних та електрохімічних методів аналізу.

### **Лабораторна робота № 1.**

#### **Амілаза. Визначення активності амілази слини за методом Вольгемута.**

Амілаза є ферментом, що каталізує гідроліз  $\alpha$ - глікозидного зв'язку крохмалю та глікогену до проміжних продуктів – декстринів. Активність амілази розраховується на основі визначення мінімальної кількості ферменту, здатного до повного гідролізу 1 мл 0,1% розчину крохмалю. Крохмаль можна визначити якісно за реакцією з йодом. Декстрини з йодом утворюють комплекси, забарвлення яких змінюється від фіолетового до жовтого (в залежності від повноти гідролізу). Висновок роблять на основі візуального спостереження за забарвленням йодокрохмального комплексу. Амілазна активність слини виражається об'ємом 0,1% розчину крохмалю (мл), що може бути повністю гідролізований 1 мл нерозведеної слини при  $t = 38^{\circ}\text{C}$  за 30 хв. Норма амілазної активності рівна 160 – 320 ум. од. Метод Вольгемута використовується в клінічній практиці для визначення амілазної активності крові, слини, сечі, у пивоварінні для визначення амілазної активності солоду. Різке підвищення амілазної активності в біологічних

рідинах ( в 10 – 30 разів) спостерігається при гострих панкреатитах, пухлинах підшлункової залози.

*Розчини, реактиви, обладнання:* розчин крохмалю 0,2%; 0,01н розчин йоду в йодиді калію; розчин слини: рот ополіскують 2-3 рази дистильованою водою для видалення залишків їжі, відмірюють 50 мл дистильованої води та ополіскують нею рот протягом 3 -5 хв у декілька прийомів, зібрану рідину фільтрують через вату. Вважають, що при цьому досягається розведення слини у 10 разів. Фільтрат використовують в якості джерела ферменту. 0,04 % розчин NaCl; 0,1 % розчин  $CuSO_4$ .

Штатив з пробірками, піпетки, крапельниці, водяна баня або термостат, термометр.

*Хід роботи:* у 8 пробірок вводять по 1мл дистилату. У першу вводять 1 мл розчину слини, перемішують, відбирають 1 мл одержаної суміші та переносять у другу пробірку. Відбирають з другої пробірки 1 мл розведеного розчину слини та переносять його у третю і т.д. З останньої пробірки відбирають 1 мл суміші та відкидають його. Таким чином, у кожній наступній пробірці вміст ферменту у двічі менший за попередню, а розведення становить: 1:20; 1: 40; 1:80; 1: 160; 1: 320; 1: 640; 1: 1280 і 1 : 2560 відповідно. Далі в усі пробірки додають по 1 мл розчину крохмалю, перемішують та гріють на водяній бані при 38°C протягом 30 хв. Пробірки охолоджують під струменем холодної води для припинення дії ферменту, додають по 2 краплини розчину йоду, перемішують та спостерігають за зміною забарвлення суміші. Відмічають, у якій пробірці з мінімальним вмістом ферменту відбувся повний гідроліз крохмалю (остання по рахунку пробірка в якій спостерігається жовте забарвлення). По кількості слини в даній пробірці розраховують амілазну активність слини.

Наприклад: жовтий колір спостерігається у пробірках №№ 1 - 4. Найменший вміст ферменту - у пробірці № 4, де слина була попередньо розведена у 160 разів. Ця кількість слини може гідролізувати 1 мл 0,2% крохмалю, а 1 мл нерозведеної слини у тих же умовах гідролізує:

$$a = \frac{1 \cdot 1 \cdot 0,2 \cdot 160}{1 \cdot 0,1} = 320 \text{мл}$$

0,1 % крохмалю. Отже, активність слини становить 320 ум.од.

### ***Вплив активаторів та інгібіторів на амілазну активність слини.***

*Вплив хлорид-іону на активність амілази.* Експеримент проводять аналогічно попередньому пункту, за винятком того, що у кожен пробірку замість води на початку додають по 1 мл 0,4 % розчину NaCl.



Отримують серію розчинів та оцінюють, як змінилася амілазна активність слини.

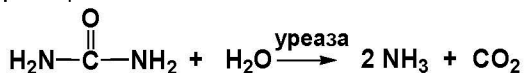
*Вплив солей купруму(II) на активність амілази.* Експеримент проводять аналогічно попередньому пункту, за винятком того, що у кожну пробірку замість води на початку додають по 1 мл 0,1 % розчину  $\text{CuSO}_4$ . Отримують серію розчинів та оцінюють, як змінилася амілазна активність слини.

На основі аналізу забарвлення розчинів у пробірках роблять **висновки** про амілазну активність слини, а також вплив активаторів та інгібіторів на амілазну активність.

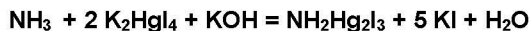
## **Лабораторна робота № 2.**

### **Уреаза. Вивчення реакцій. Визначення сечовини**

Уреаза каталізує розщеплення сечовини з утворенням  $\text{CO}_2$  та  $\text{NH}_3$  за реакцією:



Кількість аміаку, що утворився в результаті реакції, визначають фотометрично з реактивом Неслера:



За вмістом аміаку у розчині роблять висновок про активність ферменту та визначають вміст сечовини. Іони важких металів, зокрема меркурію (II), плюмбуму (II), арґентуму (I) інгібують дію уреазу в результаті зв'язування з залишками цистеїну ферменту. Зменшення швидкості реакції розкладу сечовини покладено в основу визначення іонів  $\text{Hg}$  (II),  $\text{Pb}$ (II),  $\text{Ag}$  (I).

### **1. Визначення питомої активності уреазу, специфічність дії уреазу, інгібування ферменту іонами важких металів.**

*Розчини, реактиви, обладнання:* 1% розчин сечовини ( $1,7 \cdot 10^{-3}$  моль/л), 1% розчин тіосечовини;  $5 \cdot 10^{-3}$  моль/л розчин  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  або  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ , реактив Неслера (у мірній колбі на 1 л розчиняють 100 г  $\text{HgI}_2$  та 70 г  $\text{KI}$ , додають 500 мл розчину луґу, що містить 160 г  $\text{NaOH}$ , перемішують і доводять до мітки водою); розчин селетової солі ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$  - 0,2 г / 100 мл); 1 моль/л  $\text{NaOH}$ , соєва мука - джерело

уреази (суху сою, останнього врожаю, подрібнюють блендером до порошкоподібного стану),  $1 \cdot 10^{-3}$  моль/л розчин хлориду амонію.

Штатив з пробірками, піпетки, крапельниці, фотоелектрокалориметр КФК 2МП, кювети на 0,5 см.

*Хід роботи.* Беруть три пробірки. У перші дві наливають по 0,5 мл розчину сечовини у третю пробірку вводять 0,5 мл тіосечовини, у першу і третю пробірки наливають по 1,5 мл дистильованої води, а у другу - 0,1 мл розчину  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ , або 0,5 мл  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  і 1,0 мл води; у кожен з трьох пробірок всипають по 8-10 мг сухої соєвої муки (зваженої на аналітичних терезах). Вміст пробірок закривають плівкою, витримують 20 хв на водяній бані (чи термостаті) при  $37^\circ \text{C}$ , охолоджують під струменем холодної води, додають у кожен по 1 мл  $\text{NaOH}$  і центрифугують (15-20 хв при 1500 об/хв.). В окремі пробірки відбирають по 0,05 мл аліквоти від кожного супернатанту, додають по 2,5 мл сегнетової солі, 0,5 мл реактиву Несслера, і по 2,0 мл води. Через 10 хв порівнюють інтенсивність забарвлення у трьох пробірках і вимірюють оптичну густину розчинів на КФК в кюветах  $l=0,5$  см при  $\lambda = 440$  нм відносно холостого розчину (див. нижче). Кількість утвореного у ході ферментативної реакції амоніаку розраховують за *градувальним графіком*. Для побудови градувального графіку у 6 пробірок вводять: 0, 0,1; 0,2; 0,5; 0,8; 1,0 мл стандартного розчину хлориду амонію. До кожного розчину додають по 2,5 мл сегнетової солі, 0,5 мл реактиву Несслера і води до загального об'єму 5 мл. Розчини перемішують і через 10 хв вимірюють оптичну густину на КФК в кюветах  $l = 0,5$  см при  $\lambda = 440$  нм відносно холостого розчину без хлориду амонію.

На основі проведених вимірювань розраховують питому активність (ПА) уреази у сої за формулою:

$$ПА = v/(tm),$$

де:  $v$  - кількість перетвореного субстрату, *мкмоль* (розраховують за кількістю утвореного амонію з урахуванням стехіометрії ферментативної реакції);  $t$  - час ферментативної реакції, *хв*;  $m$  - маса наважки соєвого борошна, *мг*.

ПА чисельно дорівнює кількості одиниць активності ферменту ( $\text{пМО}$ ) у зразку тканини;  $1\text{МО} = 1\text{мкмоль/хв}$ .

Роблять **висновки** про вплив природи субстрату та іонів важких металів на активність ферменту.

## 2. Визначення сечовини у крові уреазним методом

Метод базується на ферментативному гідролізі сечовини уреазою та наступному визначення амоніаку, що утворився, фотометрично з реактивом Несслера. Дія уреази на сечовину при  $\text{pH}=6$  являє собою реакцію нульового порядку, яка описується рівнянням:  $x=k \cdot t$ , де  $x$  -

кількість сечовини, що розщепилася,  $t$ - час дії ферменту (хв),  $k$ - константа швидкості реакції. Визначення сечовини проводять за методом фіксованого часу.

*Розчини, реактиви, обладнання:* препарат уреазу: соєва мука (10 мг на кожну пробу); розчин сечовини 0,05 г/л ( $8,5 \cdot 10^{-4}$  моль/л); реактив Неслера (у мірній колбі на 1 л розчиняють 100 г  $HgI_2$  та 70 г KI, додають 500 мл розчину лугу, що містить 160 г NaOH, перемішують і доводять до мітки водою); розчин сульфату цинку (7,5 г/ 100 мл); NaOH (1,5 г/100мл) 0,4 моль/л; розчин сегнетової солі ( $KNaC_4H_4O_6$  - 0,2 г/ 100 мл); **сироватка крові** (кров (1 мл) вносять у пробірку, додають 1 мл ацетону, витримують 30 хв на водяній бані при  $t = 30^\circ C$  і центрифугують протягом 15 хв при 1500 об/хв., осад відкидають, а рідину далі використовують в аналізі).

Штатив з пробірками; фільтри "червона стрічка"; лійки; піпетки на 1 та 5 мл, фотоелектроколориметр КФК-2МП, кювети з товщиною шару 0,5 см.

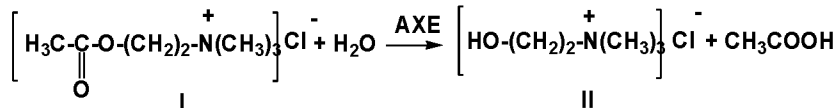
*Хід роботи:* у 7 центрифужних пробірок вносять по 1 мл дистильованої води. У першу додають 0,1 або 0,2 мл сироватки крові чи імітату сироватки крові, в інші: 0; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; та 0,25 мл стандартного розчину сечовини і відповідні кількості води до загального об'єму розчину 1,3 мл, після чого в кожну з пробірок всипають по 10 мг сухої соєвої муки (зваженої на аналітичних терезах). Вміст пробірок закривають корковими пробками, витримують 10 хв на водяній бані (чи у термостаті) при  $37^\circ C$ , охолоджують під струменем води, додають у кожну по 0,2 мл  $ZnSO_4$  та 2 мл NaOH для повного осадження білків, фільтрують або центрифугують. В чисті пробірки відбирають по 0,2 мл фільтрату (центрифугату), додають по 2,5 мл сегнетової солі та по 0,5 мл реактиву Неслера. Об'єм доводять до 5 мл бідистиллятом. Через 10 хв вміст пробірок фотометрують на КФК у кюветі з товщиною шару 0,5 см при  $\lambda = 440$  нм, використовуючі як розчин порівняння холосту пробу, оброблену аналогічно, але без сечовини. Вміст сечовини (моль/л) у сироватці крові визначають за градуювальним графіком, побудованим за результатами вимірювання оптичної густини розчинів, що містили стандартний розчин сечовини.

Норма вмісту сечовини у крові людини становить 2,5 – 8,5 ммоль/л.

### Лабораторна робота № 3.

#### Визначення активності ацетилхолінестерази

Ацетилхолінестераза (АХЕ) прискорює реакцію гідролізу нейромедіатора ацетилхоліну (I) з утворенням спирту –холіну (II) та ацетатної кислоти, в результаті чого змінюється рН розчину:



Мірою активності ферменту є величина зміни рН середовища. Фосфорорганічні пестициди інгібують дію ферменту, що лежить в основі ряду ферментативних методів визначення цих сполук.

*Реагенти та прилади:* 3,5% розчин ацетилхоліну; джерело ферменту- свіжа сироватка крові (кров вносять у пробірку, витримують 30 хв на водяній бані при  $t = 30^\circ\text{C}$  і центрифугують протягом 15 хв при 3000 об/хв. ).

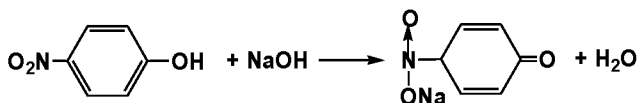
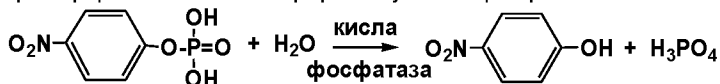
Пробірки, стакани, рН-метр, водяна баня, термометр.

*Хід роботи:* в рН-метричний стакан вносять 2,5 мл ацетилхоліну, 0,2 мл сироватки крові і 5 мл води, в інший стакан вносять ті ж компоненти, крім ацетилхоліну. Стакани прикривають склом та витримують протягом 60 хв при  $t = 37^\circ\text{C}$  на водяній бані, далі оходолжують до кімнатної температури і вимірюють рН розчинів рН метром. Мірою активності ферменту є різниця між значеннями рН розчину, що не містив, та того, що містив ацетилхолін.

### Лабораторна робота № 4.

#### Визначення активності кислої фосфатази у сироватці крові

Метод базується на властивості кислої фосфатази гідролізувати ефірний зв'язок в молекулі пара-нітрофенілфосфату. Утворений в результаті реакції вільний пара-нітрофенол у лужному середовищі дає інтенсивно жовте забарвлення. Кількість утвореного продукту реакції пропорційна активності ферменту. Реакція протікає за схемою:



Кисла фосфатаза часто застосовується як мітка в імуноферментних методах аналізу. Джерелом ферменту може бути сироватка крові.

*Реагенти та прилади:* сироватка крові (кров вносять у пробірку, витримують 30 хв на водяній бані при  $t = 30^{\circ}\text{C}$  і центрифугують протягом 15 хв при 3000g); розчин *n*-нітрофенілфосфату на цитратному буфері, рН 4,8 (0,410 г цитратної кислоти 1,125 г цитрату натрію та 0,165 г *n*-нітрофенілфосфату розчиняють приблизно в 70 мл бідистильованої води, об'єм розчину доводять водою до 100 мл); стандартний розчин *n*-нітрофенолу (0,0139 г реагенту розчиняють в 100 мл 0,02 моль/л розчину гідроксиду натрію), 0,1 і 0,02 моль/л розчини NaOH.

Піпетки, пробірки на 20 мл, водяна баня, термометр, КФК.

*Хід роботи:* у дві пробірки вносять по 5 мл розчину *n*-нітрофенілфосфату, витримують 5 хв на водяній бані при  $t = 37^{\circ}\text{C}$ , далі в одну пробірку додають 1 мл води (контрольна проба), а в іншу 0,1 мл сироватки крові і 0,9 мл води (проба, що аналізується). Вміст пробірок перемішують та витримують на водяній бані при  $t = 37^{\circ}\text{C}$  протягом 30 хв. Далі в обидві пробірки додають по 4 мл 0,1 М розчину гідроксиду натрію, перемішують та фотометрують пробу, що аналізується, на КФК при  $\lambda = 400$  нм у кюветі з товщиною шару  $l = 1$  см відносно контрольної проби.

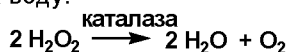
Кількість *n*-нітрофенолу, що утворився в результаті реакції, визначають за градувальним графіком. Для цього в 6 пробірок вводять 0; 1; 2; 3; 5 та 7 мл стандартного розчину *n*-нітрофенолу, додають по 3 мл 0,02 моль/л гідроксиду натрію і, якщо потрібно воду, щоб загальний об'єм всіх розчинів був 10 мл. Вміст пробірок перемішують, та фотометрують на КФК при  $\lambda = 400$  нм у кюветі з товщиною шару 1 см відносно холостої проби, що не містила *n*-нітрофенолу. За одержаними результатами будують градувальний графік в координатах  $A_{400}$  - мкмоль *n*-нітрофенолу у пробі.

Розраховують активність ферменту. За одиницю активності кислої фосфатази приймають такий об'єм сироватки крові (мл), що каталізує утворення 1 мкмоль *n*-нітрофенолу в 10 мл розчину за даних умов.

## Лабораторна робота № 5.

### Каталаза. Визначення активності ферменту

Каталаза прискорює реакцію розщеплення гідроген пероксиду на молекулярний кисень та воду:



Активність каталази оцінюють за кількістю гідроген пероксиду, що розщеплюється протягом 30 хв при дії на нього відповідної кількості ферменту. Визначення  $H_2O_2$  проводять перманганатометричним титруванням за його залишком в розчині після припинення ферментативної реакції.

Каталаза має найбільшу каталітичну активність у нейтральному середовищі при температурі  $37^\circ C$ . При підкисленні розчину дія ферменту припиняється.

*Розчини, реактиви, обладнання:* препарат каталази, свіжеприготований (середнього розміру картоплю зважують на технічних терезах, натирають на тертушці, настоюють у 100 мл дистильованої води протягом 30 хв та фільтрують через пористий паперовий фільтр);  $H_2SO_4$  (1: 4);  $3 \cdot 10^{-2}$  моль/л  $H_2O_2$ ; 0,05н  $KMnO_4$ .

Колби конічні, піпетки, бюретки, водяна баня або термостат.

*Хід роботи:* у дві конічні колби вносять по 2,5 мл препарату каталази, в першу (контрольна проба) додають 1,5 мл  $H_2SO_4$  (1: 4), до обох колб приливають по 5 мл гідроген пероксиду та витримують їх на водяній бані (у термостаті) при  $37^\circ C$  протягом 30 хв. Після завершення інкубації до другої колби додають 1,5 мл  $H_2SO_4$  (1: 4) та титрують вміст обох колб стандартним розчином  $KMnO_4$ . Записують об'єм стандартного розчину перманганату, витраченого на титрування. Вміст гідроген пероксиду, що розклався під дією ферменту ( $C$ , мг), розраховують за формулою:

$$C = (V_0 - V_1) \cdot M \cdot E$$

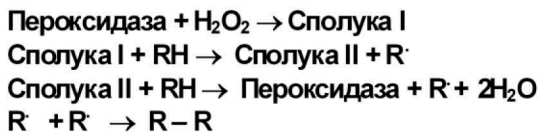
де,  $V_0$  та  $V_1$  об'єми стандартного розчину перманганату калію, що були витрачені на титрування контрольної проби та проби, що аналізується відповідно, мл;  $M$  – молярна концентрація еквіваленту розчину перманганату калію;  $E$  – молярна маса еквіваленту гідроген пероксиду.

Активність каталази розраховується як кількість гідроген пероксиду (мг), що був розкладений даною кількістю ферменту (одержаного з відомої наважки картоплі) в досліджуваному об'ємі розчину (9,0 мл).

### **Лабораторна робота № 6.**

#### **Визначення концентрації гідроген пероксиду за допомогою пероксидази фотометричним методом**

Пероксидаза каталізує реакцію окиснення органічного реагенту-донору протонів гідроген пероксидом за схемою:



де, RH- органічний відновник ( о-діанізидин, бензидин чи ортотолуїдин). В якості донора протонів можна також використовувати барвники класу триоксифлуоронів, зокрема бромпірогалоловий червоний (БПЧ). Утворення окисненої форми реагентів можна зафіксувати фотометрично за зміною забарвлення розчину. Так, в процесі окиснення бензидину можливе утворення продуктів I або II, забарвлених у синій колір. При подальшому окисненні утворюються слабо забарвлені сполуки III або IV (Схема 1).

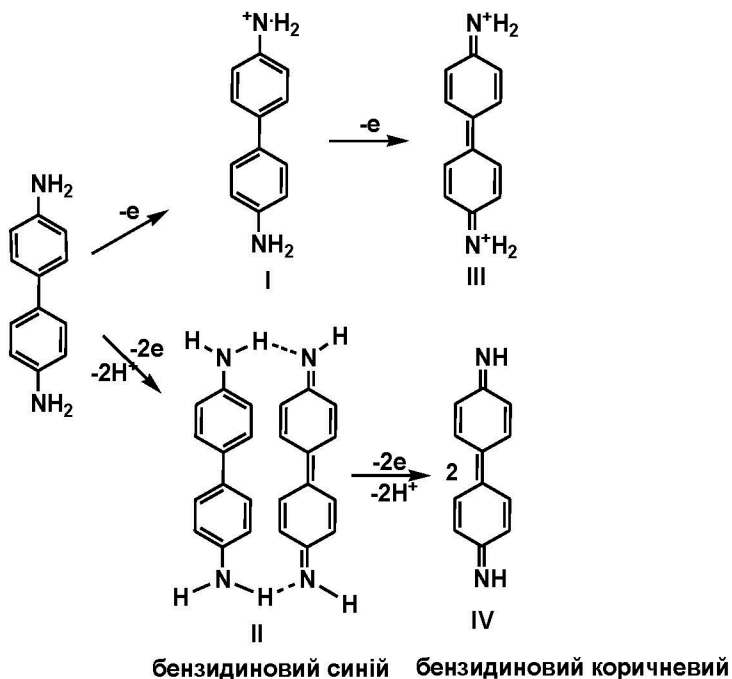


Схема 1

При окисненні БПЧ гідроген пероксидом у присутності пероксидази утворюється окиснена форма барвника, що супроводжується помітним зменшенням оптичної густини розчину БПЧ при λ = 540 нм.

За оптимальних умов при постійній концентрації органічного барвника та каталізатора швидкість зміни забарвлення розчинів пропорційна вмісту гідроген пероксиду. Визначення його концентрації проводять фотометрично за методами тангенсів, або фіксованого часу.

### **Визначення концентрації гідроген пероксиду з використанням бензидину**

*Розчини, реактиви, обладнання:* препарат пероксидази, свіжеприготований (середнього розміру картоплю, натирають на тертушці, настоюють у 100 мл дистильованої води протягом 30 хв та фільтрують через пористий паперовий фільтр) препарат стійкий протягом 2-3 год; або розчин гемоглобіну (43 мг препарату людського гемоглобіну зважують на аналітичних терезах і розчиняють в 1,0 мл бідистилату) або розчин пероксидази (5 мг препарату пероксидази хрону, 250 У/мг, зважують на аналітичних терезах і розчиняють в 1,0 мл бідистилату, розбавляють у 10 разів водою. Робочий розчин містить 0,5 мг/мл пероксидази);  $1 \times 10^{-3}$  моль/л водний розчин гідроген пероксиду;  $1 \times 10^{-2}$  моль/л спиртовий розчин бензидину, ацетатний буфер, рН = 5,0;

Пробірки, піпетки, кювети на 1 см, секундомір, фотоелектроколориметр КФК 2МП.

*Хід роботи: визначення за методом тангенсів.* Задачу одержують в пробірці. У 8 пробірок послідовно вводять: 2 мл ацетатного буферного розчину рН = 5,0; 2 мл бензидину, відповідну кількість гідроген пероксиду так, щоб його концентрація в кінцевому об'ємі (10 мл) становила,  $10^{-5}$  моль/л: 0; 1; 4; 8; 10; 20; 40. В останню пробірку вносять 1,0 мл задачі. В пробірки приливають певну кількість дистильованої води з таким розрахунком, щоб загальний об'єм реакційної суміші після додавання ферменту становив 10 мл. Реакцію починають введенням в кожную пробірку 0,5 мл розчину ферменту, (або 10 мкл  $6,6 \cdot 10^{-4}$  моль/л гемоглобіну, чи 10 мкл 0,5 мг/мл пероксидази) який додають до кожного розчину безпосередньо перед вимірюванням. Суміш перемішують, вмикаючи секундомір на початку перемішування, переносять у кювету  $l = 1$  см і вимірюють оптичну густину розчину при  $\lambda = 590$  нм через кожні 10 секунд протягом однієї хвилини. Розчин порівняння: дистильована вода.

За одержаними даними будують кінетичну криву в координатах:  $A_{590} - t$ , с. Швидкість реакції характеризують тангенсом кута нахилу початкової лінійної ділянки кінетичної кривої ( $\operatorname{tg} \alpha$ ). За одержаними даними будують градувальний графік в координатах:  $\operatorname{tg} \alpha$  - концентрація гідроген пероксиду, моль/л. Вміст гідроген пероксиду в невідомому розчині визначають за градувальним графіком.

Можна провести визначення за методом **фіксованого часу**. Для цього усі згадані вище розчини після зливання витримують 10 хв у



термостаті при  $t=+35^{\circ}\text{C}$ , охолоджують під струменем холодної води і вимірюють оптичну густину кожного розчину при довжині хвилі  $590\text{ нм}$ ,  $l = 1\text{ см}$ , розчин порівняння - вода. Будують градувальний графік у координатах: оптична густина розчину – концентрація  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### **Визначення концентрації гідроген пероксиду з використанням бромпірогаллолового червоного**

1. *Розчини, реактиви, обладнання:* препарат пероксидази, (розчин гемоглобіну «Fluka»  $6,6 \cdot 10^{-4}$  моль/л,  $M_r = 64500\text{ г/моль}$  (наважку  $43\text{ мг}$  розчиняють в  $1,0\text{ мл}$  бідистилляту) або пероксидаза хрону ( $0,1\text{ мг/мл}$ ): на аналітичних терезах зважують  $5\text{ мг}$  препарату пероксидази хрону,  $250\text{ У/мг}$ , розчиняють в  $1\text{ мл}$  бідистильованої води, отримують розчин  $5\text{ мг/мл}$ , робочий розчин пероксидази хрону ( $0,1\text{ мг/мл}$ ) готують шляхом розбавлення  $20\text{ мкл}$  вихідного розчину водою до  $1,0\text{ мл}$ ;  $0,01\text{ моль/л}$  розчин  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , рН  $5,6$ ;  $1 \cdot 10^{-4}$  моль/л водний розчин бромпірогаллолового червоного (БПЧ);  $2 \cdot 10^{-4}$  моль/л  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Трилон Б  $0,025\text{ М}$  розчин.

Пробірки, піпетки, кювети на  $1\text{ см}$ , секундомір, КФК 2МП.

*Хід роботи:* **визначення за методом тангенсів.** В  $6$  пробірок послідовно вносять:  $0 - 1\text{ мл}$  гідроген пероксиду з концентрацією  $5 \cdot 10^{-4}\text{ М}$ ;  $1,0\text{ мл}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$  з рН  $5,6$ , по  $0,5\text{ мл}$   $0,05\text{ н}$  розчину ЕДТА і додають по  $1,0\text{ мл}$   $1 \cdot 10^{-4}\text{ М}$  БПЧ. Суміш доводять водою, так, щоб кінцевий об'єм становив  $10\text{ мл}$ . Реакцію починають введенням  $15\text{ мкл}$   $6,6 \cdot 10^{-4}$  моль/л розчину гемоглобіну, або  $15\text{ мкл}$   $0,1\text{ мг/мл}$  розчину пероксидази хрону. Суміш швидко перемішують, переносять в кювету ( $l=1\text{ см}$ ) і вимірюють оптичну густину при  $\lambda=540\text{ нм}$  кожні  $30\text{ с}$  протягом перших  $4-5$  хвилин реакції відносно холостого. Холостий –  $10\text{ мл}$  води + фермент. Аналогічні процедури проводять з пробіркою, що містить  $1,0\text{ мл}$  задачі-розчин гідроген пероксиду невідомої концентрації. За отриманими даними будують залежність оптичної густини БПЧ від часу реакції. Швидкість реакції характеризують тангенсом кута нахилу ( $\text{tg } \alpha$ ) початкової прямолінійної ділянки кінетичної кривої. За одержаними даними будують градувальний графік у координатах:  $\text{tg } \alpha$  - концентрація гідроген пероксиду, моль/л, за яким визначають концентрацію пероксиду в невідомому розчині.

**Визначення за методом фіксованого часу.** Розчини, отримані аналогічно описаній вище процедурі, витримують  $20\text{ хв}$  у термостаті при  $t=+35^{\circ}\text{C}$ , потім їх охолоджують під струменем холодної води і вимірюють оптичні густини при  $\lambda=540\text{ нм}$  ( $l=1\text{ см}$ ), розчин порівняння – вода + фермент. Розраховують зміну оптичної густини розчинів:  $\Delta A_{540} = A_{540}^0 - A_{540}$ , де  $A_{540}^0$  – оптична густина розчину барвника без гідроген пероксиду,  $A_{540}$  – оптична густина розчину у присутності гідроген пероксиду.

Будують градувальний графік у координатах:  $\Delta A_{540}$  – концентрація гідроген пероксиду, моль/л, за яким визначають концентрацію пероксиду в невідомому розчині.

Роблять **висновки** про діапазон лінійності, межу виявлення і точність визначення гідроген пероксиду за описаними у роботі методиками.

### **Лабораторна робота № 7.**

#### **Визначення концентрації резорцину за інгібуючою дією на пероксидазу.**

Фенол та його похідні, зокрема резорцин, є інгібіторами пероксидази. Зменшення початкової швидкості реакції окиснення бензидину гідроген пероксидом, що каталізується пероксидазою, пропорційне вмісту інгібітора в досліджуваній пробі. Визначення фенолів проводять фотометрично за методом тангенсів. Крім фенолів інгібіторами пероксидази є іони важких металів, аміни. Заважаючий вплив іонів важких металів усувають введенням ЕДТА в реакційну суміш.

*Розчини, реактиви, обладнання:* препарат пероксидази: свіжеприготований (середнього розміру картоплю натирають на мілкій тертушці, настоюють у 100 мл дистильованої води протягом 30 хв та фільтрують через пористий паперовий фільтр), або (розчин гемоглобіну «Fluka»  $6,6 \cdot 10^{-4}$  моль/л,  $M_r = 64500$  г/моль (наважку 43 мг розчиняють в 1,0 мл бідистилату) або пероксидаза хрону (0,1 мг/мл): на аналітичних терезах зважують 5 мг препарату пероксидази хрону, 250 У/мг, розчиняють в 1 мл бідистильованої води, отримують розчин 5 мг/мл, робочий розчин пероксидази хрону (0,1 мг/мл) готують шляхом розбавлення 20 мкл вихідного розчину водою до 1,0 мл;  $1 \times 10^{-3}$  моль/л водний розчин гідроген пероксиду;  $1 \times 10^{-3}$  моль/л спиртовий розчин бензидину,  $2 \times 10^{-5}$  моль/л розчин резорцину, ацетатний буфер, рН = 5,0.

Пробірки, піпетки, кювети на 1 см, секундомір, фотоелектроколориметр КФК 2МП.

*Хід роботи:* задачу одержують в окремій пробірці. У 7 пробірок послідовно вводять: 2 мл ацетатного буферного розчину, 0,1 мл витяжки картоплі, (або 15 мкл розчину гемоглобіну, або 15 мкл 0,1 мг/мл розчину пероксидази хрону), розраховані об'єми стандартного розчину резорцину так, щоб його концентрація в кінцевому об'ємі розчину (12 мл) була відповідно,  $10^{-6}$  моль/л: 0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 та 5,0. В останню пробірку вводять 1,0 мл задачі, потім до кожної пробірки додають 2 мл етанольного розчину бензидину. Усі розчини доводять бідистильованою водою до загального об'єму 10 мл. Реакцію починають введенням 2,0

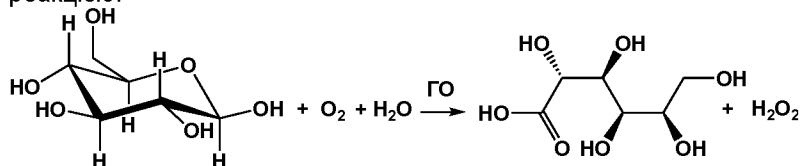
мл  $1 \times 10^{-3}$  моль/л гідроген пероксиду безпосередньо перед вимірюванням кожного розчину. Розчин швидко перемішують, включаючи при цьому секундомір, переносять в кювету  $b = 1$  см і вимірюють оптичну густину при  $\lambda = 590$  нм через кожні 10 с протягом 1 хвилини відносно води як розчину порівняння.

За одержаними даними будують кінетичні криві в координатах:  $A_{590} - t$ , с. Швидкість реакції характеризують тангенсом кута нахилу початкової лінійної ділянки кінетичної кривої ( $\text{tg } \alpha$ ). Градувальний графік будують в координатах  $\text{tg } \alpha$  - концентрація резорцину, моль/л. Вміст резорцину в задачі визначають за отриманим графіком.

### Лабораторна робота № 8.

#### Кількісне визначення глюкози за допомогою глюкозооксидази фотометричним методом

Метод базується на каталітичній дії ферменту глюкозооксидази (ГО) на процес окиснення глюкози у розчині до глюконової кислоти за реакцією:



Концентрація гідроген пероксиду, утвореного в результаті ферментативної реакції, пропорційна концентрації глюкози. Гідроген пероксид визначають фотометрично за допомогою ферменту пероксидази, що каталізує окиснення пероксидом органічного барвника-донора протонів – о-толідину (3, 3' – диметилбензидин), бензидину, або бромпірогаллолового червоного (БПЧ), аналогічно методиці описаній в лабораторній роботі №6. При цьому спостерігається утворення забарвленого у синій колір продукту реакції – окисненої форми о-толідину (бензидину), або знебарвлення розчину БПЧ. Концентрацію глюкози у невідомому розчині визначають за градувальним графіком.

1. *Розчини, реактиви, обладнання:* стандартний розчин глюкози (0,01 М), приготувати за один день до використання; фосфатні буферні розчини рН 6,8 7,4; розчин бромпірогаллолового червоного (БПЧ)  $1 \cdot 10^{-4}$  моль/л; розчин гемоглобіну, «Fluka»  $6,6 \cdot 10^{-4}$  моль/л  $M_r = 64500$  г/моль

(наважку 43 мг розчинили в об'ємі 1мл), або пероксидаза хрону (0,1 мг/мл): на аналітичних терезах зважують 5 мг препарату пероксидази хрону, 250 U/мг, розчиняють в 1 мл бідистильованої води, отримують розчин 5 мг/мл, робочий розчин пероксидази хрону (0,1 мг/мл) готують шляхом розбавлення 20 мкл вихідного розчину водою до 1,0 мл; розчин глюкозооксидази Type X - S from *Aspergillus niger*, активність 100 000-250 000 U/г, «Aldrich», 7,5 мг/мл (наважку 7,5 мг розчиняють у бідистильованій об'ємом 1,0 мл), трилон Б (ЕДТА) 0,025 моль/л розчин.

2. Скляні палички, стакани, пробірки, піпетки, штатив для пробірок, термостат; кювети на 1,0 см, КФК 2МП.

*Хід роботи.* Визначення глюкози проводять за **методом фіксованого часу**. Для побудови градувального графіку в 6 пробірок додають  $1 \cdot 10^{-2}$  моль/л розчин глюкози, щоб її концентрація в кінцевому об'ємі (10 мл) становила від  $1 \cdot 10^{-4}$  до  $1 \cdot 10^{-3}$  моль/л. До розчинів глюкози додають по 0,5 мл розчину фосфатного буферу з рН 6.86, по 0,5 мл 0,025 моль/л розчину ЕДТА, по 1,0 мл  $1 \cdot 10^{-4}$  моль/л розчину БПЧ і по 10 мкл  $6,6 \cdot 10^{-4}$  моль/л розчину гемоглобіну (або 10 мкл розчину пероксидази хрону, 0,1 мг/мл), доводять бідистильованою водою до загального об'єму 10 мл. Реакцію починають введенням 10,0 мкл  $5,5 \cdot 10^{-5}$  моль/л розчину глюкозооксидази, суміш перемішують і витримують 10 хв у термостаті при температурі 30-35°C (увага: всі проби треба витримувати однаковий час!). Пробірки виймають, охолоджують під струменем холодної води, переносять розчин з кожної пробірки в кювету ( $l = 1$  см) і вимірюють оптичну густину при  $\lambda = 540$  нм відносно холостого. Холостий розчин готують додаючи всі перелічені компоненти, крім глюкози та ферментів. За отриманими даними будують графік у координатах «оптична густина – концентрація глюкози, моль/л». Вміст глюкози в невідомому розчині визначають за градувальним графіком.

**Визначення глюкози у крові.** У центрифужну пробірку відбирають 5,0 мл цільної крові, додають 3,0 мл ацетону, перемішують, витримують 30 хв на водяній бані при температурі 35-40°C і центрифугують 10 хв при 3000 об/хв. Відбирають 0,8 - 1,5 мл супернатанту (сироватка) і проводять усі операції, описані вище. Окремо готують холосту пробу, що містить всі компоненти крім ферментів, а саме: сироватку крові, фосфатний буфер, ЕДТА, БПЧ та воду. Вміст глюкози у крові визначають за градувальним графіком. При розрахунках від оптичної густини розчинів, що вимірюються, віднімають оптичну густину холостої проби.

## **Лабораторна робота № 9**

### **Визначення глюкози з глюкозооксидазою вольтамперометричним методом**

Метод базується на каталітичній дії ферменту глюкозооксидази (ГО) на окиснення глюкози у розчині до глюконової кислоти за реакцією,

описаною у лабораторній роботі №8. Концентрація гідроген пероксиду, продукту ферментативної реакції, пропорційна концентрації глюкози у дослідженому розчині.

Гідроген пероксид, визначають методом циклічної вольтамперометрії з використанням планарного вуглецевого електроду. На поверхні електроду гідроген пероксид окиснюється при потенціалі +1,0 В. Струм окиснення пропорційний концентрації  $H_2O_2$ . Концентрацію глюкози у невідомому розчині визначають за градувальним графіком, побудованому з використанням стандартних розчинів глюкози.

Визначенню заважатимуть відновники, що можуть бути присутні у дослідженому розчині, зокрема аскорбінова кислота, яка окиснюється на поверхні вуглецевого електроду за тих саме умов, що і гідроген пероксид.

*Розчини, реактиви, обладнання:* стандартний розчин глюкози (0,01 М), приготувати за один день до використання; фосфатний буферний розчин рН 6,86 (готується з фіксаналу); розчин глюкозооксидази Туре X - S from *Aspergillus niger*, активність 100 000-250 000 U/g, «Aldrich», 7,5 мг/мл (наважку 7,5 мг розчиняють у бідистиляті об'ємом 1,0 мл); 0.01 моль/л  $KNO_3$

Скляні палички, стакани, бюкси, пробірки, піпетки. Планарний друкований вуглецевий електрод Orion HT (Іспанія), діаметр індикаторного електроду 4 мм, індикаторний і допоміжний електроди - вуглецева плівка; електрод порівняння- плівка AgCl; міні-потенціостат EmStat2 potentiostat (Palm-Sens, Нідерланди); термостат.

#### *Хід роботи.*

Під'єднують потенціостат до комп'ютера. Вмикають програму *PSTrace* на комп'ютері, запускають режим циклічної вольтамперометрії (умови: початковий потенціал -1.0 В, кінцевий потенціал 1,0 В; швидкість сканування 0,10 В/с; крок сканування: 0,01 В; час рівноваги 5 с; кількість сканувань-3). Вставляють планарний електрод у відповідний роз'єм потенціостату.

Визначення глюкози проводять за **методом фіксованого часу**. Для побудови градувального графіку в 6 пробірок додають  $1 \cdot 10^{-2}$  моль/л розчин глюкози, щоб її концентрація в кінцевому об'ємі (5 мл) становила від  $5 \cdot 10^{-4}$  до  $2 \cdot 10^{-3}$  моль/л. Далі до усіх розчинів додають по 0,5 мл розчину фосфатного буферу (рН 6.86) і 0,5 мл розчину  $KNO_3$ , доводять об'єм бідистилятом до 5,0 мл. Реакцію починають введенням у пробірку 20,0 мкл розчину глюкозооксидази. Окремо готують **холостий розчин** без глюкози і ферменту. Розчин у кожній пробірці перемішують і витримують 30 хв у термостаті при температурі  $(36 \pm 2)^\circ C$  (увага: всі проби треба витримувати однаковий час !). Пробірки виймають, охолоджують під струменем холодної води до кімнатної температури.

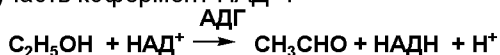
Відбирають мікропіпеткою з дозатором 100 мкл розчину з пробірки і

**обережно !** наносять його на поверхню друкованого електрода так, щоб розчин покрив індикаторний, порівняння і допоміжний електроди. Запускають програму і отримують циклічну вольтамперограму розчину. Кожний розчин вимірюють тричі. Аналізують лише останню з трьох отриманих вольтамперограм. Записують силу анодного струму при потенціалі 1,0 В. Від отриманих значень сили струму для розчинів з різною концентрацією глюкози віднімають силу струму холостого розчину, що не містив глюкозу ( $\Delta I$ , мкА). За отриманими даними будують графік у координатах «сила струму ( $\Delta I$ , мкА)– концентрація глюкози, моль/л». Вміст глюкози в невідомому розчині визначають за градувальним графіком.

### **Лабораторна робота № 10**

#### **Кількісне визначення етанолу з використанням алкогольдегідрогенази**

Алкогольдегідрогеназа (АДГ), фермент класу оксидоредуктаз, каталізує реакцію окиснення етилового спирту до відповідного альдегіду. В реакції бере участь кофермент НАД<sup>+</sup>:



Окиснення етанолу супроводжується утворенням еквімолярної кількості відновленої форми коферменту НАДН, що легко контролювати фотометрично за збільшенням оптичної густини розчину в ультрафіолетовій області спектру при  $\lambda=340$  нм. Визначення проводять за методом тангенсів, вимірюючи оптичну густину суміші одразу після зливання протягом перших 60 с. Визначенню заважають інші аліфатичні спирти, в першу чергу метанол, що взаємодіє аналогічно етанолу, ацетальдегід і формальдегід, які зсувають рівновагу реакції в протилежний бік, іони важких металів, що інгібують дію ферменту.

Молярна маса ферменту становить приблизно 150000. До складу даного білку входять чотири субодиниці, кожна з яких містить по одному активному центру з координованим іоном цинку (II).

*Розчини, реактиви, обладнання:* фосфатний буфер 0,06 моль/л, рН 8,5; 0,01 моль/л водний розчин етанолу; НАД, 0,015 моль/л водний розчин; алкогольдегідрогеназа пекарських дріжджів, 1 Е/ мл\*, свіже приготовлений розчин в 0,01 моль/л фосфатному буфері, рН 7,5.

Пробірки, штатив для пробірок, мірні піпетки, кювети з товщиною шару 0,5 см, фотоелектроколориметр КФК 2МП.

*Хід роботи:* у 8 пробірок наливають по 0,8 мл фосфатного буферу, рН 8,5, розраховану кількість етанолу, так щоб у кінцевому об'ємі

розчину (5,0 мл) концентрація спирту була відповідно,  $10^{-3}$  моль/л: 0; 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 4,0. В останню пробірку вводять 0,5 мл задачі. Далі в усі проби додають 2,0 мл розчину НАД і відповідну кількість бідистилляту, так, щоб об'єм розчину в кожній пробірці був 5,0 мл. Реакцію починають введенням 0,05 мл розчину ферменту. Фермент додають до кожного розчину безпосередньо перед вимірюванням. Вміст пробірки швидко перемішують, в цей момент

\*Е- міжнародна одиниця активності ферменту (така його кількість у молях, що каталізує перетворення 1 мкмоль субстрату за 1 хв за даних умов при  $t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ )

включають секундомір, переливають у кювету  $l = 0,5$  см, і вимірюють оптичну

густину розчину на КФК при  $\lambda = 340\text{ нм}$  через кожні 10 с протягом 1хв. Розчин порівняння: холостий, що не містить етанолу.

За одержаними даними будують кінетичні криві в координатах:  $A_{340} - t$ , с. Швидкість реакції характеризують тангенсом кута нахилу ( $\text{tg } \alpha$ ) початкової прямолінійної ділянки кінетичних кривих. Будують градувальний графік в координатах:  $\text{tg } \alpha$  - концентрація етанолу, моль/л. Вміст етанолу в невідомому розчині визначають за графіком.

### Контрольні запитання

1. Що є спільного і відмінного між ферментами і неорганічними каталізаторами?
2. Що таке активність ферменту? Способи вираження ферментативної активності. Що таке питома активність?
3. Які основні фізичні та хімічні фактори впливають на активність ферментів?
4. Яку реакцію каталізує амілаза слини? У чому проявляється специфічність дії амілази та як визначається її активність?
5. На чому ґрунтується визначення активності каталази?
6. Що таке кофактори та простетичні угруповання? В чому полягає їх роль у ферментативному каталізі? Назвіть кофактори (простетичні угруповання) каталази, пероксидази, глюкозооксидази.
7. Що таке кофермент? В чому полягає роль коферменту в процесі каталітичної дії ферменту? Наведіть приклади щонайменш трьох коферментів та каталітичних реакцій, в яких вони беруть участь.
8. Який кофермент бере участь в реакції окиснення етанолу, що каталізується алкогольдегідрогеназою? Напишіть схему перетворення цього коферменту.
9. Що таке інгібітори та активатори ферментів? Наведіть приклади.
10. Які види інгібування ферментів вам відомі? Наведіть приклади.

11. Потрапляння в організм людини метилового спирту в кількості 30 мл є дуже небезпечним і може спричинити смерть. Отруйним є продукт окиснення метанолу - формальдегід, що утворюється за участю алкогольдегідрогенази. Одним з методів лікування при цьому є введення надмірної кількості етанолу в організм. Поясніть, на чому базується така лікувальна дія етанолу. Напишіть рівняння відповідних реакцій.
12. У чому полягає принцип визначення важких металів з використанням уреазі?
13. На якому принципі базується визначення фосфорорганічних пестицидів за допомогою ферментативних методів аналізу?
14. Яким чином можна покращити вибірковість визначення глюкози вольтамперометричним методом ?

### Список рекомендованої літератури

- Holme D. J., Peck H.* Analytical Biochemistry.- London., 1998.
- Mikkelsen, S. R.* (2016). Bioanalytical Chemistry. John Wiley & Sons, Inc., 2016.
- Nelson, D.M., Cox, M.M.* Lehninger Principles of Biochemistry 8th Edition. W.H. Freeman 2021, 1248 p.
- Mázor L.* Methods of Organic Analysis (Comprehensive Analytical Chemistry), Elsevier Science, 1983, 529 p.
- Pérez Bendito D., Silva M.* Kinetic Methods in Analytical Chemistry, E. Horwood, 1988, 330 p.
- Biosensors: Fundamentals and Applications, by Anthony P. F. Turner (Ed.), Isao Karube (Ed.), George S. Wilson (Ed.). Oxford University Press, 1990, 786 p.
- Biosensors: An Introductory Textbook 1st Edition by Jagriti Narang (Author), C.S. Pundir (Author). Jenny Stanford Publishing; 1st edition (April 11, 2017), 160 p
- Shriner R., Hermann C., K., F., Morrill T.C., Curtin D. Y.* The Systematic Identification of Organic Compounds 8th Edition, Wiley, 2004, 736 p.
- Кучеренко М.Є.* Біохімія : підручник/ М.Є., Кучеренко, Ю.Д. Бабенюк, О.М. Васильєв. – К.: ВПЦ «Київський університет», 2002, 480 с.
- Кучеренко М.Є., Войціцький В. М., Бабенюк Ю. Д., Гаврилей В. І.* Біохімія. Практикум.- К. «Либідь», 1995, 136 с.
- Остапченко Л.І.* Біохімія.: підручник/ Л.І. Остапченко, Т.Р. Андрійчук, Ю.Д. Бабенюк та ін. –К.: ВПЦ «Київський університет», 2012, 796 с.
- Остапченко Л.І., Компанець І.В., Скопенко О.В., Синельник Т.Б., Кравченко О.О., Б, Береговий С.М.* Біохімія. Практикум. ВПЦ «Київський університет» 2018, 295 с.
- Ластухін Ю. О.* Хімія природних органічних сполук. Львів, 2005, 560 с.



Практикум з біологічної хімії/ Під ред. О. Я. Склярова.- К., 2002, 298 с  
*Ракс В. А. , Єсауленко А. М.* Сучасна хроматографія на гребені хвилі прогресу. Київ 2014, 162с.  
*Халаф В.А. , Зайцев В.М.* Пробовідбір і пробопідготовка у хроматографії.- К.: ВПЦ «Київський університет», 2014. – 235 с.

## ЗМІСТ

<b>Вступ</b> .....	3
<b>Тема 1. Вуглеводи</b> .....	4
Лабораторна робота № 1.	
1. Якісні реакції на моносахариди.....	4
2. Дисахариди. Окисно- відновні властивості дисахаридів.....	7
3. Якісні реакції на полісахариди.....	9
Лабораторна робота № 2 Кількісне визначення фруктози.....	10
Лабораторна робота № 3 Кількісне визначення лактози в молоці.....	11
Контрольні запитання.....	12
<b>Тема 2. Ліпіди</b> .....	13
Лабораторна робота №1. Якісні реакції на триацилгліцероли.....	13
Лабораторна робота №2. Кількісне визначення триацилгліцеридів.....	15
Лабораторна робота №3. Фотометричне визначення фосфоліпідів у сироватці крові.....	19
Лабораторна робота №4. Фотометричне визначення холестеролу в сироватці крові.....	20
Лабораторна робота №5. Розділення ліпідів методом тонкошарової хроматографії.....	21
Контрольні запитання.....	22
<b>Тема 3. Нуклеїнові кислоти</b> .....	23
Лабораторна робота № 1. Виділення нуклеопротейдів та їх якісні реакції.....	24
Лабораторна робота № 2 Спектрофотометричне визначення загального вмісту нуклеїнових кислот за методом Спіріна.....	26
Контрольні запитання.....	27
<b>Тема 4.</b>	
<b>Амінокислоти</b> .....	27
Лабораторна робота №1. Якісні реакції на амінокислоти.....	28
Лабораторна робота № 2 Визначення амінокислот методами розподільчої хроматографії на папері та тонкошарової хроматографії.....	34
Лабораторна робота № 3 Визначення амінокислот методом формольного титрування.....	36
Лабораторна робота № 4 Вольтамперометричне визначення тирозину.....	38
Лабораторна робота №5 Визначення суміші амінокислот методом рідинної хроматографії.....	40
Лабораторна робота №6. Визначення енантіомерної чистоти ізомерів амінокислоти методом хіральної ВЕРХ.....	47
Лабораторна робота №7. Визначення енантіомерної чистоти ізомерів амінокислоти методом обернено-фазової ВЕРХ.....	49
Контрольні запитання.....	52

<b>Тема 5. Білки.....</b>	<b>54</b>
Лабораторна робота № 1 Визначення білків за біуретовою реакцією.....	54
Лабораторна робота № 2 Кількісне визначення білку за методом Лоурі.....	56
Лабораторна робота № 3 Визначення білків за азотом.....	57
Лабораторна робота № 4 Спектрофотометричне визначення білку з використанням аніонного барвника.....	58
Лабораторна робота №5. Визначення амінокислот у білках методом ВЕРХ.....	61
Контрольні запитання.....	62
<b>Тема 6. Ферменти.....</b>	<b>63</b>
Лабораторна робота № 1 Амілаза. Визначення активності амілази слини за методом Вольгемута.....	63
Лабораторна робота № 2 Уреаза. Вивчення реакції. Визначення сечовини.....	65
Лабораторна робота № 3 Визначення активності ацетилхолінестерази.....	68
Лабораторна робота № 4 Визначення активності кислої фосфатази у сироватці крові.....	68
Лабораторна робота № 5 Каталаза. Визначення активності ферменту.....	69
Лабораторна робота № 6 Визначення концентрації гідроген пероксиду за допомогою пероксидази фотометричним методом.....	70
Лабораторна робота № 7 Визначення концентрації резорцину за інгібуючою дією на пероксидазу.....	74
Лабораторна робота №8. Кількісне визначення глюкози за допомогою глюкозооксидази фотометричним методом.....	75
Лабораторна робота №9. Визначення глюкози за глюкозооксидазою вольтамперометричним методом.....	76
Лабораторна робота № 10. Кількісне визначення етанолу з використанням алкогольдегідрогенази фотометричним методом .....	78
Контрольні запитання.....	79
Список літератури.....	80

Навчальний посібник

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Тананайко Оксана Юріївна  
Воловенко Олеся Богданівна  
Левчик Валентина Михайлівна

**Рекомендації до лабораторних робіт  
із дисципліни “БІОАНАЛІТИЧНА ХІМІЯ” для студентів ОР МАГІСТР  
спеціальність 102-Хімія.  
ХІМІЧНІ ТА ІНСТРУМЕНТАЛЬНІ МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ БІОЛІГАНДІВ.  
ЗАСТОСУВАННЯ ФЕРМЕНТІВ В АНАЛІЗІ.**