МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ВАСИЛЯ СТУСА
КАФЕДРА ФУНДАМЕНТАЛЬНОЇ ТА ПРИКЛАДНОЇ ХІМІЇ

Ю. О. Лесишина

БІОХІМІЯ

Методичні вказівки
до виконання лабораторних робіт
для здобувачів вищої освіти спеціальностей Е1 Біологія та біохімія, Е3 Хімія

Вінниця
2026

УДК 577.1(076.58)
Б 638

Затверджено на засіданні вченої ради
навчально-наукового інституту природничих наук ДонНУ імені Василя Стуса
(протокол № 7 від 20.02.2026)

Укладач:

Лесишина Ю. О., канд. хім. наук, доцент, доцент кафедри фундаментальної та прикладної хімії навчально-наукового інституту природничих наук ДонНУ імені Василя Стуса.

Рецензенти:

Жильцова С. В., канд. хім. наук, доцент, доцент кафедри фундаментальної та прикладної хімії навчально-наукового інституту природничих наук ДонНУ імені Василя Стуса.

Доценко О. І., канд. хім. наук, доцент, доцент кафедри біофізики і фізіології навчально-наукового інституту природничих наук ДонНУ імені Василя Стуса.

Б 638 Біохімія: методичні вказівки до виконання лабораторних робіт для здобувачів вищої освіти спеціальностей Е1 Біологія та біохімія, Е3 Хімія / уклад. Ю. О. Лесишина. Вінниця: ДонНУ імені Василя Стуса. 2026. 44 с.

Навчальне видання рекомендоване здобувачам спеціальностей Е1 Біологія та біохімія і Е3 Хімія для виконання лабораторних робіт з дисциплін «Біоорганічна хімія з основами біохімії», «Біохімія» за основними темами статичної і динамічної біохімії. Методичні вказівки до кожної лабораторної роботи містять стислі теоретичні дані, порядок виконання лабораторної роботи, рекомендації до оформлення одержаних результатів, контрольні питання для підготовки до виконання і захисту робіт.

УДК 577.1(076.58)

© Лесишина Ю. О., 2026
© ДонНУ імені Василя Стуса, 2026

ЗМІСТ

Лабораторна робота № 1 Якісне визначення простих і складних вуглеводів..... 4

Лабораторна робота № 2 Фізико-хімічні властивості та склад ліпідів. 7

Лабораторна робота № 3 Кольорові реакції на білки і амінокислоти..... 10

Лабораторна робота № 4 Визначення кислотно-основних властивостей амінокислот методом потенціометричного титрування 15

Лабораторна робота № 5 Кількісне визначення вмісту білка біуретовим методом 19

Лабораторна робота № 6 Специфічність дії та термолабільність ферментів..... 23

Лабораторна робота № 7 Вплив *pH* середовища на активність амілази слини 26

Лабораторна робота № 8 Вплив активаторів та інгібіторів на активність амілази слини 28

Лабораторна робота № 9 Визначення гідролітичної активності ліпази підшлункового соку 31

Лабораторна робота № 10 Визначення активності протеаз підшлункової залози..... 33

Лабораторна робота № 11 Кількісне визначення сечовини в біологічних рідинах спектрофотометричним методом 36

Лабораторна робота № 12 Кількісне визначення сечової кислоти у біологічних рідинах..... 39

Список рекомендованої літератури..... 42

Лабораторна робота № 1
ЯКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ПРОСТИХ І СКЛАДНИХ ВУГЛЕВОДІВ

Для якісного і кількісного визначення простих вуглеводів використовують реакції, які підтверджують наявність у їх складі функціональних груп – карбонільної (альдегідної або кетонної і гідроксильних груп -ОН). Якісне визначення дисахаридів часто ґрунтується на визначенні їх відновлювальних властивостей. Також для якісного визначення тих чи інших складних вуглеводів попередньо здійснюють їх кислотний або ферментативний гідроліз.

Дослід № 1. Реакція взаємодії вуглеводів з купрум (II) гідроксидом

Принцип реакції. Моносахариди і дисахариди реагують з гідроксидами важких металів з утворенням органічних солей – *сахаратів*. Так, під час взаємодії цих вуглеводів з нерозчинним у воді $Cu(OH)_2$ (осад блакитного кольору) відбувається розчинення осаду і утворення прозорого і забарвленого у синій колір розчину. Реакція аналогічна взаємодії $Cu(OH)_2$ з триатомним спиртом гліцерином і свідчить про те, що вуглеводи є багатоатомними спиртами.

Хід роботи

У пробірки наливають по 4 мл розчинів *D*-глюкози, мальтози, лактози та сахарози і додають по 2 мл 5 %-го розчину NaOH. Потім по краплях додають 5 %-й розчин $CuSO_4$ до утворення осаду і ретельно перемішують.

Що спостерігається? Зробіть висновок про наявність декількох гідроксильних груп у складі досліджуваних вуглеводів.

Розчини, що утворились, зберігають для наступного досліду.

Дослід № 2. Реакції окислення вуглеводів у лужному середовищі

Принцип реакцій. Моносахариди (альдози) і дисахариди, що містять вільну альдегідну групу, відносно легко окислюються у лужному середовищі до альдонових кислот, відновлюючи купрум (II) гідроксид (реактив Троммера) до яскраво-червоного купрум (I) оксиду; амоніачний розчин аргентум оксиду (реактив Толленса) до металічного срібла; реактив Фелінга тощо.

Хід роботи

а) проба Тромера. Розчини сахаратів, що одержали в попередньому досліді, нагрівають до кипіння. Що спостерігається?

б) реакція «срібного дзеркала». В окрему пробірку наливають 1 мл 0,5 %-го розчину $AgNO_3$ і додають по краплях розчин амоніаку. Спочатку утворюється сірий осад, який швидко розчиняється у надлишку амоніаку. До амоніачного розчину

аргентум (I) оксиду, що утворився, додають 3 мл *D*-глюкози. Пробірку ставлять у гарячу воду на 5–10 хв. Що спостерігається?

в) взаємодія вуглеводів з реактивом Фелінга. Реактив Фелінга – Cu^{2+}-вмісний хімічний реактив яскраво-синього кольору. В реакціях із вуглеводами, що містять вільну альдегідну групу, розчин реактиву Фелінга відновлюється з утворенням жовтого ($CuOH$) або червоного (Cu_2O) осадів.

У пробірки наливають по 0,5 мл реактиву Фелінга і по 0,5 мл розчинів *D*-глюкози, мальтози, лактози і сахарози. Суміші нагрівають до кипіння. Що спостерігається? Зробіть висновок про наявність вільної альдегідної групи у складі досліджуваних вуглеводів і здатність *D*-глюкози, мальтози, лактози та сахарози відновлювати означені вище реактиви.

Дослід № 3. Кислотний гідроліз сахарози

Принцип реакції. Кислотний гідроліз дисахаридів приводить до розщеплення глікозидного зв'язку і утворення відповідних моносахаридів. Як каталізатори зазвичай використовують розведені неорганічні кислоти (H_2SO_4, HCl).

Продукти гідролізу сахарози – *D*-глюкозу і *D*-фруктозу – виявляють за допомогою якісних реакцій.

Хід роботи

У пробірку наливають 5 мл розчину сахарози; додають 0,5 мл розведеної сульфатної кислоти і нагрівають на водяній бані 10–15 хв.

Після нагрівання гідролізат сахарози поділяють на дві пробірки. В одній вміст нейтралізують 10 %-м розчином $NaOH$, а потім додають 0,5 мл реактиву Фелінга і нагрівають на водяній бані.

До другої пробірки додають декілька крапель реактиву Селіванова (якісний реактив на фруктозу) і нагрівають на водяній бані. Що спостерігається?

Дослід № 4. Кислотний гідроліз крохмалю

Принцип реакції. Під дією неорганічних кислот за високої температури або під дією ферментів крохмаль підлягає поступовому гідролізу з утворенням полісахаридів меншої молекулярної маси – декстринів. Декстрини в міру зменшення розміру молекули за наявності йоду дають відповідно синьо-фіолетове, фіолетове, червоно-фіолетове, оранжеве та жовте забарвлення. Кінцевими продуктами гідролізу крохмалю є мальтоза і *D*-глюкоза, наявність яких можна підтвердити за допомогою якісних реакцій на альдози (див. дослід № 4).

Хід роботи

У 6 пробірок додають водопровідну воду (по ½ пробірки) і по 1–2 краплі розчину Люголя (розчин йоду у водному розчині калій йодиду).

У колбу об’ємом 100 мл наливають 40 мл клейстерного крохмалю і додають 2 мл розчину сульфатної кислоти з масовою часткою 20 %. Декілька крапель одержаної суміші додають з колби до першої пробірки з йодною водою, під час цього спостерігається утворення характерного синього кольору крохмалю з йодом. Колбу з крохмалем ставлять на металеву сітку, доводять розчин до кипіння і через кожні 2 хв відливають по декілька крапель гідролізату до чергової пробірки з йодною водою до зникнення кольору.

Кип’ятять вміст колби ще 5 хв, відливають 0,5 мл розчину і проводять реакцію з реактивом Фелінга. Для цього нейтралізують вміст пробірки 10 %-м розчином NaOH, додають 0,5 мл реактиву Фелінга і нагрівають до кипіння. Що спостерігається?

Результати лабораторної роботи оформлюють у вигляді табл. 1.1.

Таблиця 1.1 – Якісне визначення простих і складних вуглеводів

№	Назва реакції	Реактиви, що використовуються	Забарвлення, що спостерігається	Схема реакції	Принцип реакції

Завдання для самостійної роботи: вивчити теоретичний матеріал за темою, підготувати відповіді на контрольні питання.

Контрольні питання

1. Вуглеводи. Визначення. Основні біологічні функції вуглеводів.

2. Розподіліть перелічені нижче вуглеводи за класами відповідно до їх будови і здатності гідролізуватися: глюкоза, лактоза, фруктоза, рибоза, крохмаль, мальтоза, сахароза, глікоген, целюлоза (клітковина), глюкозамін.

3. Наведіть схему таутомерних перетворень *D*-глюкози. До складу якого з перелічених вище вуглеводів (контрольне питання № 2) входить β, *D*-глюкопіраноза?

4. У чому полягають відновлюючі властивості простих і складних вуглеводів? Наведіть схему відповідної реакції на прикладі *D*-мальтози.

5. У чому полягає біологічне значення реакції гідролізу крохмалю? Назвіть проміжні і кінцеві продукти цієї реакції.

Лабораторна робота № 2
ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ТА СКЛАД ЛІПІДІВ

Дослід 1. Розчинення та емульгування жирів

Принцип методу. Жири належать до неполярних органічних сполук, тому вони розчиняються тільки у неполярних органічних розчинниках (бензені, толуені, хлороформі та ін.). З водою жири утворюють нестійкі емульсії, які під час стояння швидко розшаровуються на жир та воду. Під час додавання до такої суміші будь-якого емульгатору (1 %-го розчину натрій карбонату, 1 %-го розчину мила, 1 %-го розчину калій гідроксиду) утворюються відносно стійкі емульсії.

Емульгатори – поверхнево-активні сполуки, що знижують поверхневий натяг крапель жиру на межі «жир – вода» і в такий спосіб перешкоджають їх злипанню у суцільний шар жиру.

Хід роботи

У шість сухих пробірок додають по 2 краплі жиру (тваринного або рослинної олії). В першу пробірку додають 2–3 мл бензену. В інші п'ять пробірок наливають точно по 2 мл дистильованої води. У другу пробірку додають кілька крапель 1 %-го розчину Na_2CO_3; у третю – кілька крапель 1 %-го розчину мила; у четверту пробірку – 1 %-й розчин KOH; у п'яту – кілька крапель жовчі, шоста пробірка – контрольна. Збовтують вміст усіх пробірок, ставлять їх по черзі у штатив і спостерігають утворення в пробірках 2–5 відносно стійких емульсій, а у шостій пробірці (контрольній) – розшаровування нестійкої емульсії на жир та воду.

Дослід 2. Виділення лецитину із яєчного жовтка і визначення його якісного складу

Лецитини (або фосфатидилхоліни) належать до класу гліцерофосфоліпідів, які внаслідок гідролізу утворюють залишки триатомного спирту гліцерину, вищих жирних кислот, фосфатної кислоти і аміноспирту холіну.

Свою назву лецитини отримали від грец. *λέκιθος* – «яєчний жовток», звідки ці сполуки були уперше виділені.

Для виділення лецитину із яєчного жовтка використовують етиловий спирт.

Хід роботи

Виділення лецитину з яєчного жовтка. 0,5–1 г відвареного яєчного жовтка ретельно розтирають у ступці з 10 мл гарячого етилового спирту. Охолоджену суміш фільтрують в окрему колбу або пробірку.

Гідроліз лецитину. До фільтрату додають 2–3 мл 10 %-го розчину NaOH і кип'ятять на водяній бані 15 хв.

Відкриття аміноспирту холіну. Холін під час нагрівання у лужному середовищі перетворюється на триметиламін $N(CH_3)_3$, який можна виявити за появою запаху оселедцевого розсолу:

$$N^+ + (CH_3)_3 - CH_2 - CH_2 - OH + NaOH \rightarrow N(CH_3)_3 \uparrow + \text{інші продукти реакції.}$$

Відкриття жирних кислот. Після закінчення гідролізу суміш охолоджують і додають по краплях 10 %-й розчин HCl, контролюючи реакцію середовища за допомогою універсального індикаторного паперу, який має набути червоного забарвлення. У кислому середовищі з гідролізату лецитину виділяються нерозчинні у воді жирні кислоти, які спливають на поверхню розчину. Жирні кислоти відфільтровують, а фільтрат використовують для наступних дослідів, поділяючи його на дві пробірки.

Відкриття гліцерину. Прозорий фільтрат, одержаний у попередньому досліді, нейтралізують 10 %-м розчином NaOH до появи лужного середовища і додають по краплях 1 %-й розчин $CuSO_4$ до утворення осаду $Cu(OH)_2$. Під час перемішування спостерігають розчинення осаду і утворення прозорого розчину яскраво-синього кольору.

Відкриття фосфатної кислоти. До іншої частини фільтрату обережно додають індикаторний реагент для виявлення фосфору (молібденовий реактив), вміст пробірки нагрівають на водяній бані до появи жовтого забарвлення.

$$H_3PO_4 + 12(NH_4)MoO_4 + 21HNO_3 \rightarrow$$
$$(NH_4)PO_4 \cdot 12MoO_3 \downarrow + 21NH_4NO_3 + 12H_2O.$$

Для виконання досліду можна також використовувати фармацевтичний препарат лецитину або соєвий лецитин, минаючи стадію виділення лецитину.

Дослід 3. Якісна реакція на жовчні кислоти (реакція Петтенкофера)

Жовчні кислоти – це група стероїдних кислот (похідних поліциклічного спирту холестерину), що входять до складу жовчі.

Принцип реакції. Під час взаємодії жовчних кислот із гідроксиметилфурфуролом утворюються забарвлені у червоно-фіолетовий колір продукти реакції. Гідроксиметилфурфурол є продуктом дегідратації фруктози (сахарози) під дією концентрованої сульфатної кислоти.

Хід роботи

До сухої пробірки додають 1 мл жовчі, 1 мл 20 %-го розчину сахарози, суміш ретельно перемішують скляною паличкою. Після цього обережно по стінці пробірки доливають 0,5 мл концентрованої H_2SO_4.

Через декілька хвилин на межі двох рідин спостерігають появу червоного кільця.

Результати лабораторної роботи оформлюють у вигляді табл. 2.1.

Таблиця 2.1 – Фізико-хімічні властивості і склад ліпідів

№	Назва реакції	Реактиви, що використовуються	Забарвлення, що спостерігається	Схема реакції	Принцип реакції

Завдання для самостійної роботи. Вивчити теоретичний матеріал за темою, підготувати відповіді на контрольні питання.

Контрольні питання

1. Ліпіди. Визначення. Назвіть основні класи ліпідів і їх біологічні функції.
2. Наведіть структурні формули п’яти вищих жирних кислот, які найбільш часто зустрічаються у складі ліпідів різних класів.
3. Охарактеризуйте будову, походження і основні фізико-хімічні властивості жирів.
4. Визначте підсумковий заряд гліцерофосфоліпіду лецитину у нейтральному, кислому і лужному середовищі.
5. Наведіть структурну формулу поліциклічного спирту холестерину. До якого класу ліпідів належить ця сполука? У чому полягає її біологічна роль?

Лабораторна робота № 3
КОЛЬОРОВІ РЕАКЦІЇ НА БІЛКИ І АМІНОКИСЛОТИ

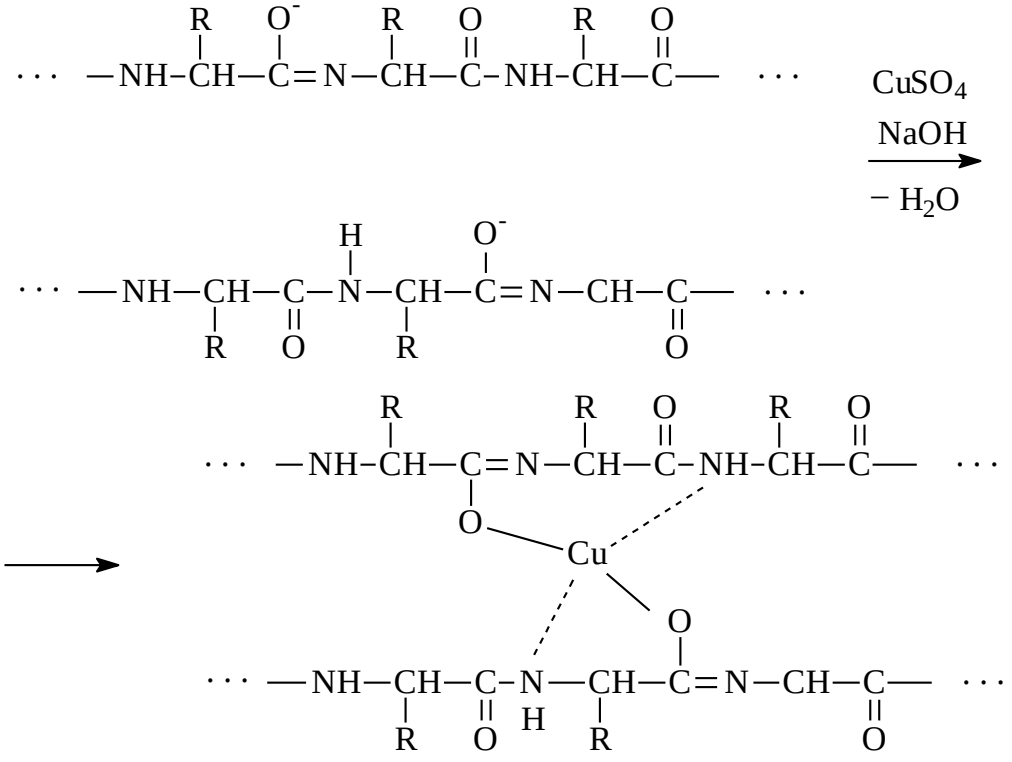
Кольорові реакції на білки зумовлені наявністю в їх молекулах тих чи інших амінокислот або утвореного ними хімічного угрупування. Тому кольорові реакції на білки використовують для доказу білкової природи речовини, визначення якісного та кількісного амінокислотного складу різноманітних білків.

Кольорові реакції на білки поділяються на два типи: *загальні* (або універсальні) і *специфічні*. До загальних реакцій належать біуретова (на пептидний зв'язок) і нінгідринова (на α-NH_2-групи амінокислот) реакції. До специфічних – реакції на окремі амінокислоти. Наприклад, ксантопротеїнова реакція (або реакція Мульдера) – на ароматичні амінокислоти, реакція Фоля – на сульфурвмісні амінокислоти, реакція Адамкевича – на триптофан і т. ін.

Дослід 1. Біуретова реакція (реакція Піотровського)

Принцип реакції. Під час додавання до лужного розчину білка розчину купрум (II) сульфату рідина набуває фіолетового забарвлення. Реакція зумовлена наявністю в молекулі білка ***пептидних зв'язків*** -*CO*-NH-, які під час взаємодії з іонами Купруму у лужному середовищі утворюють забарвлені комплексні сполуки.

Реакція перебігає за схемою:



Біуретову реакцію дають сполуки, у складі яких міститься не менше двох пептидних зв'язків. Інтенсивність забарвлення біуретового комплексу залежить

від кількості пептидних зв'язків, концентрації білка та іонів Купруму. Забарвлення розчину може змінюватися від синього до червоного з переважанням фіолетового.

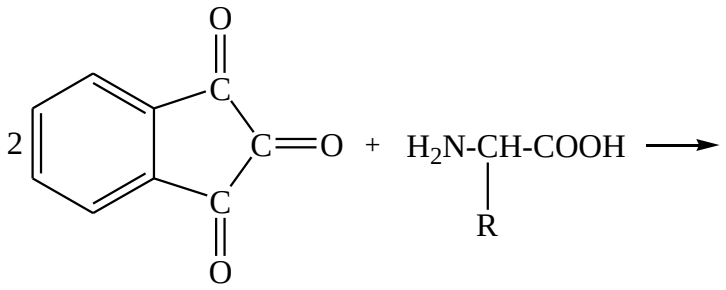
Хід роботи

Беруть чотири пробірки: у першу наливають 1 мл розведеного яєчного білка; у другу – 1 мл розчину желатину; у третю – 1 мл розчину альбуміну; у четверту – 1 мл розчину будь-якої амінокислоти.

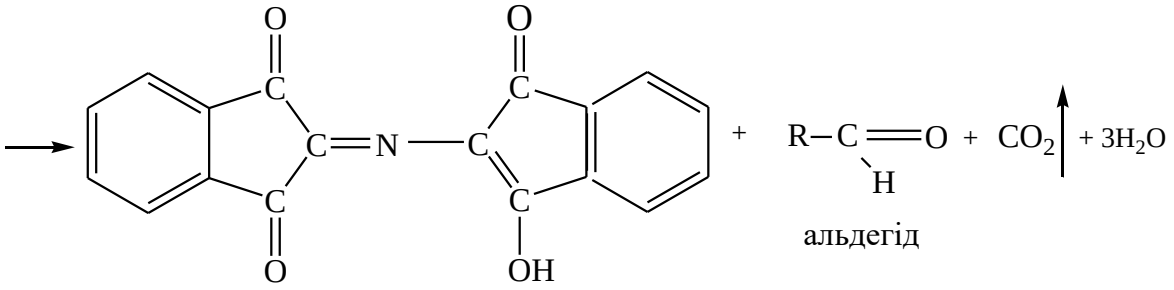
До кожної пробірки додають по 1 мл 10 %-го розчину $NaOH$ та 1–2 краплі 1 %-го розчину $CuSO_4$ і ретельно перемішують. Спостерігають за зміною забарвлення в пробірках та відзначають колір, що з'явився у кожній з них.

Дослід 2. Нінгідринова реакція

Принцип реакції. α-NH_2-групи амінокислот і пептидів взаємодіють з нінгідрином з утворенням комплексу синього або синьо-фіолетового кольору. Під час нагрівання амінокислот з нінгідрином відбувається окислювальне дезамінування α-NH_2-групи, виділення амоніаку і CO_2 та відновлювання нінгідрину. Відновлений нінгідрин реагує з амоніаком і молекулою окисленого нінгідрину з утворенням забарвленого продукту (пурпурний комплекс Руемана). Білки, пептиди та більшість вільних α-амінокислот з нінгідрином утворюють продукти блакитного, синього або синьо-фіолетового кольору; пролін і оксипролін – жовтого.



нінгідрин α-амінокислота



альдегід

пурпур Руемана

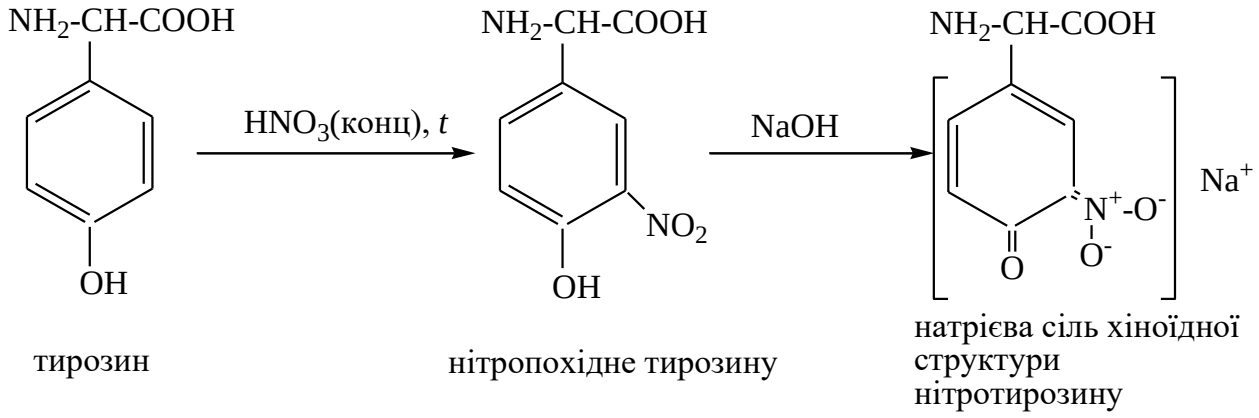
Хід роботи

Беруть чотири пробірки: у першу наливають 1 мл розведеного яєчного білка; у другу – 1 мл розчину желатину; у третю – 1 мл розчину альбуміну; у четверту – 1 мл розчину будь-якої амінокислоти.

До кожної пробірки додають по 5 крапель нінгідринового реактиву. Вміст пробірок перемішують і нагрівають на водяній бані за температури 70 °С протягом 5 хв. Спостерігають за зміною забарвлення в пробірках та відзначають колір, що з'явився у кожній з них.

Дослід 3. Ксантопротеїнова реакція (реакція Мульдера)

Принцип реакції. Більшість білків під час нагрівання з концентрованою нітратною кислотою дають жовте забарвлення, яке під час додавання розчину лугу або амоніаку переходить у помаранчеве. Ця реакція (ксантопротеїнова, або реакція Мульдера) характерна для ароматичних амінокислот (фенілаланіну, тирозину і триптофану). Під час дії концентрованої нітратної кислоти на білки, що містять ароматичні амінокислоти, відбувається нітрування бензольного ядра цих амінокислот з утворенням нітросполук жовтого кольору, які після додавання лугу перетворюються в солі хіноїдної структури, забарвлені у помаранчевий колір:



тирозин — нітропохідне тирозину — натрієва сіль хіноїдної структури нітротирозину

Аналогічно перебігає реакція нітрування фенілаланіну та триптофану.

Ксантопротеїнова реакція спостерігається на шкірі, нігтях, вовні, якщо на них потрапить концентрована нітратна кислота (жовте забарвлення), тому під час роботи з цією кислотою **обов'язково (!) надягають рукавички.**

Білки, у складі яких ароматичні амінокислоти відсутні, не дають ксантопротеїнової реакції. До таких білків належать сальмін (білок молок лосося), а також продукт гідролізу білка колагену – поліпептид желатин.

Хід роботи

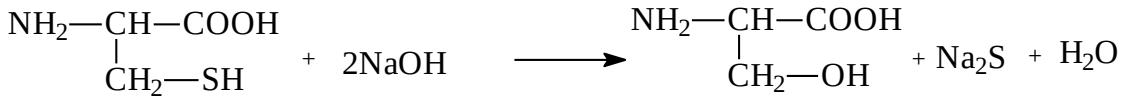
Беруть чотири пробірки: у першу наливають 1 мл розведеного яєчного білка; у другу – 1 мл розчину желатину; у третю – 1 мл розчину альбуміну; у четверту – 1 мл розчину будь-якої ароматичної амінокислоти.

До кожної пробірки додають по 3 краплі HNO_3(конц.) і обережно нагрівають. Спостерігають за зміною забарвлення в пробірках та відзначають колір, який з'явився у кожній з них. Після охолодження до пробірок додають по 15–20 крапель 20 %-го розчину NaOH.

Після закінчення досліду роблять висновок про вміст у складі досліджуваних білків ароматичних амінокислот.

Дослід 4. Реакція Фоля на сульфурвмісні амінокислоти

Принцип реакції. Під час кіп'ятіння сульфурвмісних амінокислот цистеїну та цистину в лужному середовищі від них легко відщеплюється сірка у вигляді гідроген сульфіду (H_2S), який у лужному середовищі утворює натрій сульфід (Na_2S). Для виявлення натрій сульфіду до розчину додають іони важких металів, наприклад, іони Плюмбуму, які з іонами Сульфуру утворюють нерозчинний осад плюмбум сульфіду чорного кольору (PbS):



$$Pb(CH_3COO)_2+2NaOH \longrightarrow Pb(OH)_2+2CH_3COONa$$

$$Pb(OH)_2+2NaOH \longrightarrow Na_2PbO_2+2H_2O$$

$$Na_2S+NaPbO_2+2H_2O \longrightarrow PbS\downarrow+4NaOH$$

Інтенсивність забарвлення залежить від кількості сульфурвмісних амінокислот у складі білка та від концентрації білка у розчині.

Амінокислота метіонін, хоч і містить у своєму складі Сульфур, реакції Фоля не дає через те, що Сульфур у ньому міцно зв'язаний з метильною групою, а не з Гідрогеном.

Хід роботи

Беруть чотири пробірки: у першу наливають 1 мл розведеного яєчного білка; у другу – 1 мл розчину желатину; у третю – 1 мл розчину альбуміну; у четверту – 1 мл розчину цистеїну.

До кожної пробірки додають по 5 крапель 10 %-го розчину NaOH і по 1 краплі 5 %-го $Pb(CH_3COO)_2$ і нагрівають до появи чорного осаду. На підставі одержаних результатів роблять висновок про вміст сульфурвмісних амінокислот у складі досліджуваних білків.

Результати лабораторної роботи оформлюють у вигляді табл. 3.1.

Таблиця 3.1 – Кольорові реакції на білки і амінокислоти

№	Назва реакції	Реактиви, що використовуються	Забарвлення, що спостерігається	Схема реакції	Принцип реакції

Завдання для самостійної роботи: вивчити теоретичний матеріал за темою, підготувати відповіді на контрольні питання.

Контрольні питання

1. Білки. Визначення. Основні біологічні функції білків.

2. Який тип зв’язку лежить в основі первинної структури молекули білка? За допомогою якої кольорової реакції його можна визначити? Наведіть схему цієї реакції для дипептиду гліцил-аланіну.

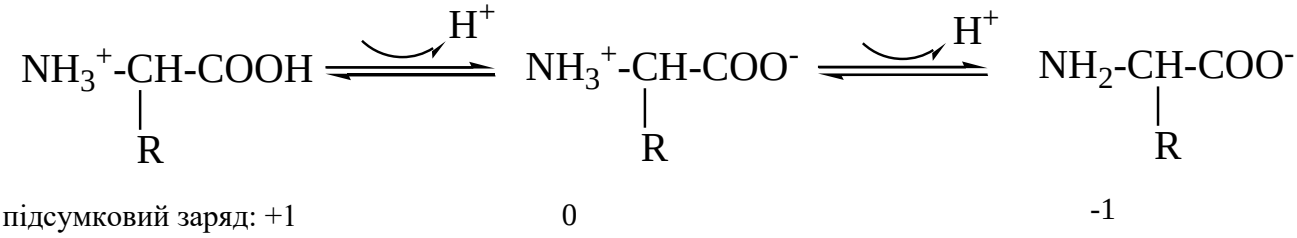
3. Наведіть схему реакції взаємодії будь-якої незамінної амінокислоти з нінгідрином. Назвіть вихідні сполуки і продукти реакції.

4. Наведіть приклад дипептиду, що містить в своєму складі залишок амінокислоти тирозину. Напишіть схему якісної реакції, за допомогою якої можна довести наявність у складі цього дипептиду ароматичної амінокислоти.

5. Які сульфурвмісні амінокислоти постійно зустрічаються у складі природних білків? Наведіть формули цих амінокислот. За допомогою якої кольорової реакції можна довести наявність цистеїну у складі білкової молекули?

Лабораторна робота № 4
ВИЗНАЧЕННЯ КИСЛОТНО-ОСНОВНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ АМІНОКИСЛОТ МЕТОДОМ ПОТЕНЦІОМЕТРИЧНОГО ТИТРУВАННЯ

Амінокислоти є амфотерними сполуками і проявляють властивості слабких кислот і основ. У нейтральному водному розчині більшість протеїногенних амінокислот присутні у вигляді біполярних іонів (цвіттер-іонів).



Додавання до розчину амінокислоти сильної кислоти або лугу буде приводити до переходу амінокислоти у катіонну або аніонну форму, відповідно. Залежно від хімічної природи амінокислот (наявність іонізованих *R*-груп) кількість кислоти або лугу, які необхідно додати для змінення величини підсумкового заряду амінокислоти, буде різною.

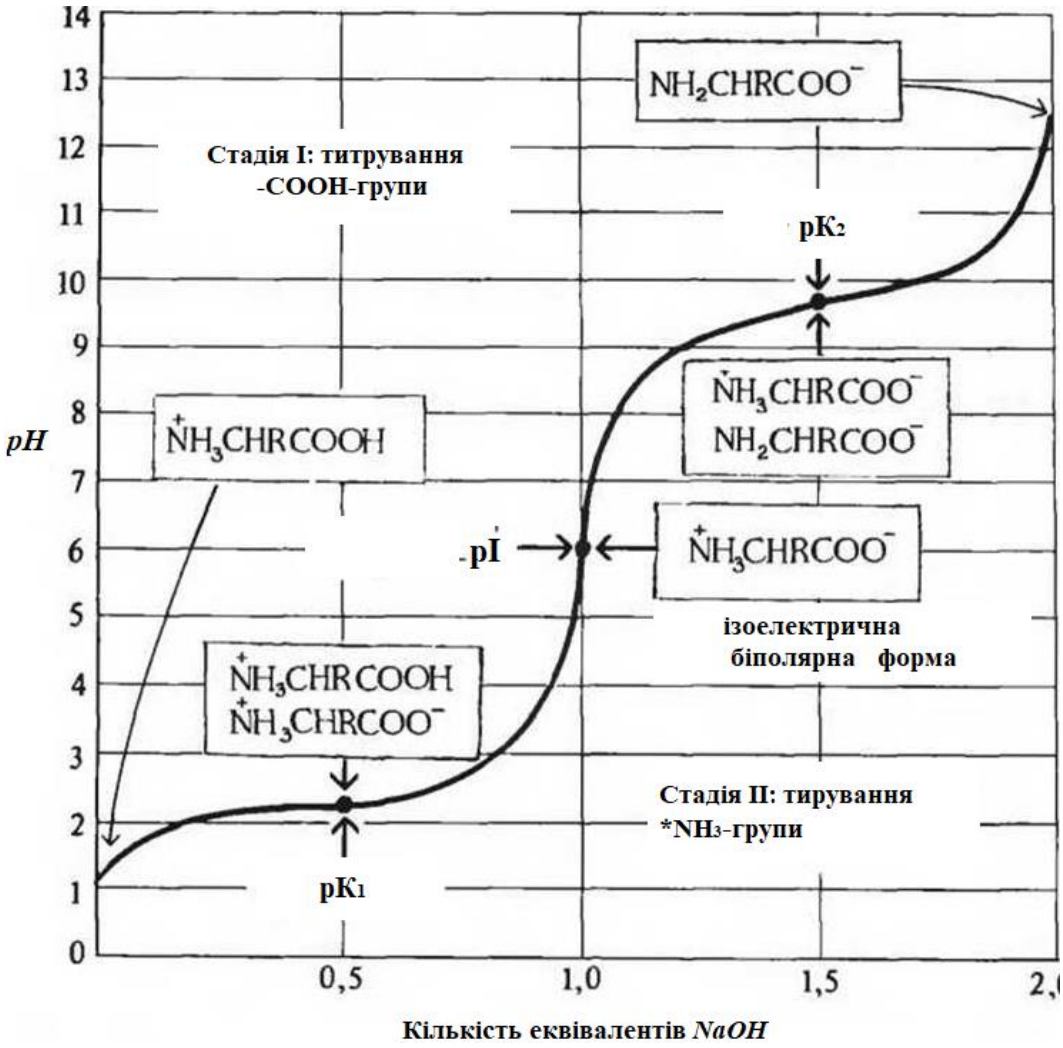
Значення *pH*, за якого підсумковий заряд амінокислоти дорівнює 0, називається ***ізоелектричною точкою*** **(pI).** Якщо за цього значення *pH* помістити амінокислоту в електричне поле, то вона не буде переміщатися ні до катода, ні до анода.

Перехід амінокислоти з однієї форми в іншу наочно відображають криві титрування амінокислот, які є графічним зображенням залежності величини *pH* розчину амінокислоти від об'єму доданого робочого розчину кислоти або лугу.

За допомогою кривої титрування можна обчислити константи дисоціації функціональних груп амінокислот, здатних приєднувати або віддавати H^+ (pK_1, pK_2, pK_R); величину pI; передбачити знак і величину підсумкового заряду будь-якої амінокислоти за будь-якого значення *pH* розчину; виявити області *pH*, за яких амінокислота буде чинити буферну дію (здатність зберігати сталість концентрації *pH* розчину під час додавання деякої кількості кислоти / лугу, а також під час розведення чи концентрування).

Варто зауважити, що криві титрування амінокислот зі здатною до іонізації R-групою, мають більш складну форму: на них виявляються три стадії, які відповідають трьом можливим станам іонізації відповідних функціональних груп.

Дані для побудови кривих титрування амінокислот можна одержати за допомогою ***методу потенціометричного титрування,*** який ґрунтується на вимірюванні різниці потенціалів між двома електродами (індикаторним і електродом порівняння), зануреними у розчин електроліту.



Індикаторний електрод – це електрод, який швидко і точно реагує на зміну концентрації речовини у процесі титрування.

Електрод порівняння – це електрод, потенціал якого залишається сталим у процесі титрування.

У досліджуваний розчин, за постійного перемішування (магнітною мішалкою), вливають з бюретки робочий розчин електроліту – титрант. Титрант додають невеликими порціями, спочатку по 0,5 мл, а потім обсяг зменшують у міру наближення до точки еквівалентності. Після кожного додавання титранту вимірюють *pH* розчину або електрорушійну силу (ЕРС) ланцюга. Найбільше змінення *pH* (ЕРС) відбувається поблизу точки еквівалентності. Титрування не припиняють, додаючи ще 3–4 мл титранту.

За отриманими даними будують інтегральну криву потенціометричного титрування: залежність *pH* розчину (під час титрування розчинів кислот і лугу) або ЕРС (в інших випадках) від кількості доданого титранту. За перегином кривої визначають точку еквівалентності, яка вказує на кількість титранту, витраченого на титрування. Розраховують концентрацію досліджуваного розчину, знаючи його обсяг, взятий на титрування, концентрацію і об’єм титранту.

Більш точно точку еквівалентності визначають за диференціальною кривою потенціометричного титрування $(\Delta pH/\Delta V)T = f(V)$. Пік на диференціальній кривій потенціометричного титрування відповідає точці еквівалентності, оскільки в точці перегину інтегральної кривої $pH = f(V)$ перша похідна $d\,pH/d\,V$ проходить через точку максимуму.

Для побудови диференціальної кривої будується графік, що відображає залежність відносної зміни *pH* розчину – $D\,pH/D\,V$ або $D\,E/D\,V$ ланцюга від кількості титранту. Оскільки під час титрування слабкої кислоти сильною основою виходить сіль, яка утворює в поєднанні зі слабкою кислотою буферний розчин, стрибок *pH* поблизу точки нейтралізації слабко виражений. Дуже слабкі кислоти можуть взагалі не мати різкого стрибка *pH.* Для них побудова диференціальної кривої обов'язкова.

Хід роботи

1. Підготовка *pH*-метра. Перед експлуатацією прилад необхідно увімкнути і прогріти протягом 15 хв. Щоб увімкнути прилад, необхідно затиснути кнопку ⏻ і утримувати її протягом 1–2 с. Для проведення калібрування електродів за допомогою буферних розчинів необхідно зайти у головне меню приладу, натиснувши кнопку МЕНЮ. За допомогою кнопок ▲ або ▼ перемістити рамку, що з'являється на екрані, на рядок «ТИП НАЛАШТУВАННЯ» і натиснути кнопку ВВЕДЕННЯ. Далі вибирають вид градуювання ДВОХТОЧКОВА. Для градуювання приладу використовуються два розчини. Далі промивають електродну систему і термодатчик дистильованою водою тієї ж температури, що і градуювальні розчини, залишкові краплі видаляють фільтрувальної папером. Поміщають електроди в перший розчин. Натискають і утримують протягом 2–3 с кнопку НАЛАШТУВАННЯ. На дисплеї приладу відображається значення ЕРС електродної системи і температура розчину. Під час встановлення стабільних показань ЕРС лунає звуковий сигнал. На підставі введених і виміряних даних прилад автоматично визначає і виводить на дисплей значення *pH* розчину за даної температури. Далі необхідно натиснути кнопку ВВЕДЕННЯ. Процедура градуювання по другому розчину є аналогічною.

Після закінчення прилад виводить на дисплей збережене в пам'яті значення електродної характеристики і автоматично переходить у режим вимірювань.

2. Визначення ізоелектричної точки амінокислоти

Для проведення титрування готують 0,1 М розчин амінокислоти у 0,1 М HCl об'ємом 40 мл. За постійного перемішування розчину (магнітною мішалкою) вимірюють початкову величину *pH* досліджуваного розчину. Далі вимірюють *pH* після додавання чергової порції (0,5 мл) 0,1 М розчину NaOH. Титрування закін-

чують, коли *pH* практично перестане змінюватися (3–4 точки). Результати титрування вносять у табл. 4.1.

Таблиця 4.1 – Результати титрування для визначення ізоелектричної точки амінокислот

№	$\boldsymbol{V}$**лугу, мл**	$\boldsymbol{pH}$	$\boldsymbol{D\,pH}$	$\boldsymbol{D\,V}$**лугу, мл**	$\boldsymbol{D\,pH/D\,V}$

Згідно з отриманими даними будують графіки залежності *pH* від обсягу титранту – інтегральний і диференційований – та визначають точку перегину на кривих титрування, що відповідають pI відповідної амінокислоти. Дані вносять у лабораторний журнал у вигляді відповідних графіків кривих титрування:

Рисунок 4.1 – Інтегральний графік залежності *pH* від обсягу титранту

Рисунок 4.2 – Диференційований графік кривої титрування амінокислоти

Результати порівнюють із довідковими даними.

Завдання для самостійної роботи. Вивчити теоретичний матеріал за темою, підготувати відповіді на контрольні питання.

Контрольні питання

1. Наведіть класифікацію протеїногенних амінокислот, що базується на полярності їх радикалів.
2. Дайте визначення поняттям pK_a, pI.
3. За допомогою рівняння Гендерсона–Хассельбаха та використовуючи літературні дані розрахуйте підсумковий заряд амінокислоти аланіну за *pH*: 5,4; 7,0; 8,7.
4. Які властивості розчинів амінокислот називають буферними?
5. У чому полягає принцип визначення ізоелектричної точки амінокислот методом потенціонметричного титрування?

Лабораторна робота № 5
КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ БІЛКА БІУРЕТОВИМ МЕТОДОМ

Принцип методу. Біуретовий метод кількісного визначення білка у біологічних рідинах ґрунтується на утворенні у лужному середовищі забарвленого комплексу пептидних зв'язків у складі білка з іонами Cu^{2+} (біуретова реакція). Інтенсивність забарвлення розчину, що під час цього виникає, прямо пропорційна концентрації білка і визначається за допомогою фотоколориметричного або спектрофотометричного методів аналізу.

Під час визначення білка за допомогою біуретового методу попередньо будують калібрувальний графік з використанням стандартного розчину білка (бичачого сироваткового альбуміну, сироваткового альбуміну людини або амінокислоти тирозину).

Під час визначення вмісту білка у дослідних пробах дотримуються тих самих умов, що і під час побудови калібрувального графіка.

Вміст білка у сироватці крові здорової людини становить 65–85 г/л. Тому, якщо об'єктом дослідження є розчин сироватки крові, його попередньо розводять у 10 разів: 1 мл сироватки крові доводять 1 % розчином NaCl або дистильованою водою до об'єму 10 мл.

У цьому випадку значення концентрації білка, знайдене за допомогою калібрувального графіка, помножують на коєфіцієнт розведення (×10).

Чутливість кількісного визначення білків біуретовим методом становить 2–10 мг білка в 1 мл проби.

Методика визначення концентрації речовини в розчині за допомогою фотоколориметричного (спектрофотометичного) методу аналізу. В основі кількісного аналізу за допомогою фотоколориметричного (спектрофотометричного) методу лежить закон Бугера–Ламберта–Бера, який описує залежність оптичної густини від концентрації речовини у розчині і товщини поглинаючого шару:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon c l},$$

де I_0, I – інтенсивність падаючого світла і світла, що проходить через досліджуваний розчин, відповідно;

ε – молярний коефіцієнт поглинання (екстинції), л/моль·см;

c – концентрація розчину, моль/л;

l – товщина шару (кювети), см.

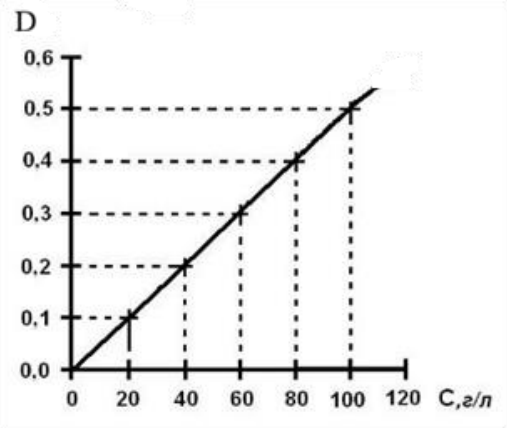
У практичній роботі зручніше користуватися логарифмічною формою запису закону Бугера–Ламберта–Бера:

$$D = lg(I_0/I) = \varepsilon c l,$$

де D – оптична густина.

Для побудови калібрувального графіка з вихідного стандартного розчину серією робочих розведень готують декілька розчинів (5–6) з відомою концентрацією розчинів досліджуваної речовини. Для кожного розчину вимірюють оптичну густину за визначеної довжини хвилі. Для визначення максимуму смуги поглинання (довжини хвилі) попередньо записують спектр поглинання досліджуваного розчину.

Потім будують графік залежності $D = f(C)$. Через накопичення точок у найкращий спосіб (методом найменших квадратів) проводять лінію – калібрувальний графік. Якщо закон Бугера–Ламберта–Бера в обраному діапазоні концентрацій виконується, то графік буде мати вигляд прямої лінії, яка перетинатиме точку 0.



Концентрацію речовини у розчині можна розрахувати, використовуючи рівняння прямої лінії $y = a \cdot x + b$, яке в координатах $D = f(C)$ матиме вигляд:

$$D = a \cdot C + b,$$

де a – тангенс куту нахилу прямої лінії на калібрувальному графіку;
b – відрізок, що відсікається від осі ординат прямою лінією на графіку.

Реактиви

Біуретовий реактив: 0,15 г $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ і 0,6 г натрієво-калієвої солі винної кислоти $KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$ розчиняють у 50 мл дистильованої води; до розчину за ретельного перемішування додають 30 мл 10 %-го розчину $NaOH$; 0,1 г KI і доводять дистильованою водою до 100 мл; **стандартний розчин альбуміну** з концентрацією 10 мг/мл; розведений у 10 разів **розчин сироватки крові.**

Хід роботи

У шість пробірок додають відповідні об’єми (зазначені у табл. 5.1) стандартного розчину білка і 1 %-го розчину $NaCl$ або дистильованої води і по 4 мл біуре-

тового реактиву. Вміст пробірок ретельно перемішують і залишають на 30 хв за кімнатної температури. Водночас у три пробірки додають по 1 мл розчину досліджуваного препарату, що містить від 1 до 10 мг білка, і 4 мл біуретового реактиву, і також залишають на 30 хв за кімнатної температури.

Одну із середніх проб (наприклад, вміст пробірки № 4) використовують для визначення максимуму поглинання біуретового комплексу в діапазоні довжини хвиль від 540 до 640 нм в кюветі товщиною 1 см. Як розчин порівняння використовують суміш тих самих розчинів, але замість розчину білка додають 1 %-й розчин NaCl або дистильовану воду.

За визначеної довжини хвилі вимірюють оптичну густину розчинів з відомою концентрацією білка і дослідної проби. Результати вносять у табл. 5.1.

Таблиця 5.1 – Дані для побудови калібрувального графіка і визначення концентрації білка у дослідній пробі

№	Стандартний розчин білка, мл	1 %-й р-н NaCl або дист. H_2O	Вміст білка у пробі, мг/мл	Концентрація білка у розчині, г/л	Робочий розчин біуретового реактиву, мл	Оптична густина
1	0,2	0,8			4,0	
2	0,4	0,6			4,0	
3	0,5	0,5			4,0	
4	0,6	0,4			4,0	
5	0,8	0,2			4,0	
6	1,0	0			4,0	
№	**Дослідна проба**	**1 %-й р-н NaCl або дист. H_2O**	**Робочий розчин біуретового реактиву, мл**	**Оптична густина**	**Концентрація білка у розчині, г/л**	**Концентрація білка у розчині, г/л, середнє значення**
1	1,0	–	4,0			
2	1,0	–	4,0			
3	1,0	–	4,0			

За даними досліду з визначення максимуму поглинання (довжини хвилі від 540 до 640 нм) будують графік з позначеним піком:

Рисунок 5.1 – Видимий спектр поглинання біуретового комплексу

За даними табл. 5.1 будують калібрувальний графік: по осі абсцис відкладають значення концентрації білка (C, г/л), а по осі ординат – значення оптичної густини (D). Результати вносять у лабораторний журнал у вигляді графіка, за допомогою якого визначають концентрацію білка у дослідній пробі:

Рисунок 5.2 – Залежність оптичної густини розчину білка від його концентрації

Завдання для самостійної роботи. Вивчити теоретичний матеріал за темою, підготувати відповіді на контрольні питання.

Контрольні питання

1. Який принцип лежить в основі кількісного визначення вмісту білка біуретовим методом?
2. Сформулюйте закон Бугера–Ламберта–Бера.
3. Наведіть схему реакції взаємодії фрагменту молекули білка з біуретовим реактивом.
4. Яка точність кількісного визначення вмісту білка біуретовим методом?
5. Який вміст загального білка в крові здорової дорослої людини відповідає нормі?

Лабораторна робота № 6
СПЕЦИФІЧНІСТЬ ДІЇ ТА ТЕРМОЛАБІЛЬНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ

Специфічність дії ферменту – це здатність ферменту каталізувати перетворення тільки одного або декількох субстратів. Розрізняють абсолютну субстратну специфічність, групову (або відносну) і стереоспецифічність ферментів.

Фермент амілаза слини (α-амілаза) характеризується груповою специфічністю дії, оскільки каталізує гідролітичне розщеплення α-(1→4)-глікозидних зв'язків у складі полісахаридів крохмалю і глікогену, дисахариду мальтози тощо. Фермент сахараза каталізує розщеплення β-(1→2)-глікозидних зв'язків у складі дисахариду сахарози, це фермент з абсолютною специфічністю дії.

Під час дослідження специфічності дії α-амілази і сахарази їх активність визначають або за зникненням субстратів (крохмалю і сахарози, відповідно), або за появою продуктів ферментативної реакції (мальтози, глюкози і фруктози). Для цього застосовують якісні реакції на відповідні сполуки.

Під **термолабільністю** розуміють залежність каталітичної активності ферментів від температури. Температура, за якої фермент є найбільш активним, називається *температурним оптимумом* даного ферменту. Під час кип'ятіння фермент повністю інактивується (втрачає свої каталітичні властивості) внаслідок теплової денатурації. За температури нижче 0 °С ферменти не інактивуються, але тимчасово зупиняють свою дію.

Реактиви

Розчин амілази слини: ротову порожнину обполіскують 2–3 рази водою для видалення залишків їжі. Відміряють 50 мл дистильованої води і обполіскують рот протягом 3–5 хв у декілька прийомів. Рідину збирають, фільтрують через вату, фільтрат використовують як джерело α-амілази.

Витяжка сахарази дріжджів: 2 г пекарських дріжджів розминають у ступці і ретельно розтирають, додаючи 10–15 мл дистильованої води. Суміш переносять у пробірку, яку ставлять на водяну баню за температури 37 °С на 10–15 хв. Суміш центрифугують за 3 000 об/хв протягом 10 хв. Надосадову рідину використовують як джерело сахарази.

0,5 %-й розчин крохмалю: 0,5 г крохмалю розтирають у невеликій кількості холодної дистильованої води. Пасту, що одержали, вливають у 80–90 мл киплячої води і ретельно перемішують. Перед застосуванням розчин охолоджують і доводять об'єм рідини до 100 мл.

0,5 %-й розчин сахарози; реактив Фелінга; розчин Люголя (розчин йоду у водному розчині йодиду калію).

Дослід 1. Специфічність дії ферментів амілази слини і сахарази

Хід роботи

У дві пробірки наливають по 1 мл 1 %-го розчину крохмалю та додають у першу пробірку 1 мл розчину слини, а до другої – 1 мл витяжки дріжджів. Вміст кожної пробірки перемішують і ставляють на водяну баню за температури 37 °С на 15 хв.

В інші дві пробірки наливають по 1 мл 1 %-го розчину сахарози. В першу пробірку додають 1 мл розчину слини, в другу – 1 мл витяжки дріжджів і залишають за цих же умов.

У цей період у пробірках під дією ферментів відбуваються реакції гідролізу крохмалю і сахарози.

Після закінчення в перші дві пробірки з крохмалем додають по 1 краплі розчину Люголя і спостерігають забарвлення, що з'явилось.

Зі вмістом двох інших пробірок (дослід із сахарозою) проводять реакцію з рідиною Фелінга. Для цього до кожної пробірки додають по 0,5 мл рідини Фелінга, перемішують і нагрівають до кипіння. Варто мати на увазі, що сахароза (невідновлюючий дисахарид) не містить вільних напівацетальних гідроксилів і реакції з рідиною Фелінга не дає, водночас як продукти її гідролізу – глюкоза і фруктоза – відновлюють рідину Фелінга до появи жовтого осаду купрум (I) гідроксиду ($CuOH$) або червоного осаду купрум (I) оксиду (Cu_2O).

Результати досліду оформлюють у вигляді табл. 6.1.

Таблиця 6.1 – Специфічність дії амілази слини і сахарази

№ досліду	Фермент	Субстрат	Контрольні реакції		Пояснення реакції
			з йодом	з рідиною Фелінга	
1	амілаза	крохмаль			
2	сахараза	крохмаль			
3	амілаза	сахароза			
4	сахараза	сахароза			

Дослід 2. Термолабільність амілази слини

Хід роботи

У три пробірки наливають по 1 мл розчину слини. В одній із пробірок розчин слини кип'ятять над полум'ям горілки з метою інактивації ферменту і швидко охолоджують холодною водопровідною водою. У другій пробірці розчин слини залишають за кімнатної температури. Третю пробірку з розчином слини тримають на льоді 5 хв. У всі три пробірки додають по 1 мл 1 %-го розчину крохмалю. Рідину у пробірках перемішують і залишають за кімнатної температури. Через 5 хв вміст другої і третьої пробірки поділяють на дві частини. З однією частиною проводять реакцію з розчином йоду, з іншою – реакцію з рідиною Фелінга (як

описано раніше). У пробірці, де фермент амілаза інактивований кип’ятінням, розщеплення крохмалю не відбувається. Результати оформлюють у вигляді табл. 6.2.

Таблиця 6.2 – Термолабільність амілази слини

№ досліду	Матеріал дослідження	Субстрат	Контрольні реакції		Пояснення реакції
			з йодом	з рідиною Фелінга	
1	свіжа слина	крохмаль			
2	кип’ячена слина	крохмаль			
3	охолоджена слина	крохмаль			

Завдання для самостійної роботи. Вивчити теоретичний матеріал за темою, підготувати відповіді на контрольні питання.

Контрольні питання

1. Ферменти. Визначення. Особливості ферментативних реакцій.
2. Охарактеризуйте основні властивості ферменту амілази слини: хімічна природа ферменту, клас, підклас, тип специфічності, залежність каталітичної активності ферменту від температури тощо.
3. Наведіть схему реакції гідролітичного розщеплення крохмалю за участі ферменту амілази слини.
4. Охарактеризуйте основні властивості ферменту сахарази: хімічна природа ферменту, клас, підклас, тип специфічності, залежність каталітичної активності ферменту від температури тощо.
5. Наведіть схему реакції гідролітичного розщеплення дисахариду сахарози за участі ферменту сахарази.

Лабораторна робота № 7
ВПЛИВ *pH* СЕРЕДОВИЩА НА АКТИВНІСТЬ АМІЛАЗИ СЛИНИ

Ферменти зазвичай активні у межах вузького інтервалу *pH*, який для більшості біологічних каталізаторів становить 6,0–8,0 одиниць. Значення *pH* середовища, за якого фермент проявляє свою максимальну активність, називають *оптимум pH* ($pH_{\text{опт}}$) даного ферменту.

Зміни *pH* середовища впливають на стан і ступінь іонізації кислотних і основних груп амінокислот у складі активного центру ферменту (зокрема, COOH-групи амінодикарбонових амінокислот, SH-групи цистеїну, імідазольного нітрогену гістидину, NH_2-групи лізину та ін.). У разі різких зсувів від $pH_{\text{опт}}$ молекули ферментів підлягають конформаційним змінам, які можуть призводити до втрати каталітичної активності як внаслідок денатурації білкової молекули, так і внаслідок зміни заряду функціональних груп в активному центрі ферменту.

Принцип методу. Амілазна активність слини вимірюється кількістю крохмалю, розщепленого 1 мл слини за певний проміжок часу (зазвичай 30 хв).

Вплив *pH* середовища на активність амілази слини можна виявити за зміною інтенсивності забарвлення розчину крохмалю, до якого додають слину, з йодом. Оптимальне значення *pH* середовища для амілази слини становить 6,8–7,2 одиниці. У кислому або лужному середовищі активність амілази слини суттєво знижується.

Реактиви

Розчин слини (див. лабораторну роботу № 5); 0,5 %-й розчин крохмалю; розчин Люголя (розчин йоду у водному розчині йодиду калію); фосфатні буферні розчини з *pH* від 5,8 до 8,0; для приготування буферних розчинів використовують різні об’єми 0,2 М натрій гідроортофосфату і 0,1 М лимонної кислоти.

Хід роботи

У сім пробірок додають розчини 0,2 М Na_2HPO_4 і 0,1 М лимонної кислоти в обсягах, що зазначені у табл. 7.1, одержуючи буферні розчини з різним значенням *pH* середовища.

Таблиця 7.1 – Вплив *pH* середовища на активність амілази слини

№	Об’єм 0,2 М розчину Na_2HPO_4, мл	Об’єм 0,1 М розчину лимонної кислоти, мл	Значення *pH* середовища	Об’єм 0,5 %-го розчину крохмалю, мл	Об’єм слини, мл	Забарвлення в реакції з йодом
1	5,8	4,2	5,6	1	0,5	
2	6,3	3,7	6,0	1	0,5	
3	6,9	3,1	6,4	1	0,5	
4	7,7	2,3	6,8	1	0,5	
5	8,7	1,3	7,2	1	0,5	

№	Об’єм 0,2 М розчину Na_2HPO_4, мл	Об’єм 0,1 М розчину лимонної кислоти, мл	Значення *pH* середовища	Об’єм 0,5 %-го розчину крохмалю, мл	Об’єм слини, мл	Забарвлення в реакції з йодом
6	9,4	0,6	7,6	1	0,5	
7	9,7	0,3	8,0	1	0,5	

Потім до кожної пробірки додають по 1 мл 0,5 %-го розчину крохмалю і по 1 мл розчину слини. Вміст пробірок ретельно перемішують і залишають на 10 хв у термостаті (або на водяній бані) за температури 37 °С. Після того пробірки охолоджують і додають до кожної по 1 краплі розчину Люголя, спостерігаючи забарвлення, що з’являється. Відзначають, за якого значення *pH* середовища відбувається найбільш повне розщеплення крохмалю під дією амілази слини (жовте або буре забарвлення з йодом).

Завдання для самостійної роботи. Вивчити теоретичний матеріал за темою, підготувати відповіді на контрольні питання.

Контрольні питання

1. Поясніть, чому активність ферментів залежить від *pH* середовища, у якому перебігає ферментативна реакція.
2. Наведіть графічну залежність активності ферментів від *pH* середовища.
3. Укажіть оптимальні значення *pH*, за яких проявляють максимальну активність ферменти: амілаза слини, пепсин, трипсин, аргіназа, кисла фосфатаза.
4. Дайте визначення поняття «буферний розчин».
5. Яку роль мають буферні розчини під час дослідження активності ферментів?

Лабораторна робота № 8
ВПЛИВ АКТИВАТОРІВ ТА ІНГІБІТОРІВ НА АКТИВНІСТЬ АМІЛАЗИ СЛИНИ

Під час визначення амілазної активності слини зручно спостерігати дію активаторів і інгібіторів. Так, NaCl у розведених розчинах прискорює дію амілази слини на крохмаль, розчин $CuSO_4$ дуже уповільнює дію ферменту.

Реактиви

Розчин слини (див. лабораторну роботу № 5); 0,1 %-й розчин крохмалю; 1 %-й розчин NaCl; 1 %-й розчин $CuSO_4$.

Хід роботи

1. В окремій (нульовій) пробірці розводять слину 1 : 10, для чого до 1 мл слини додають 9 мл дистильованої води.

2. Наливають у десять пронумерованих пробірок по 1 мл дистильованої води.

3. У першу пробірку додають 1 мл слини, розведеної в 10 разів (із нульової пробірки).

4. Перемішують вміст першої пробірки шляхом триразового всмоктування піпеткою рідини із пробірки, а потім випуску рідини із піпетки; 1 мл одержаного розчину переносять із першої пробірки в другу.

5. Перемішують у такий самий спосіб вміст другої пробірки і переносять 1 мл із другої пробірки в третю, тощо. Із десятої пробірки 1 мл рідини виливають як надлишок.

Внаслідок цього одержують ряд розведень слини, причому концентрація ферменту в кожній наступній пробірці буде у два рази меншою, ніж у попередній.

6. Починаючи з цього моменту, дослід проводять у трьох варіантах.

1-й варіант: наливають у всі 10 пробірок ще по 1 мл дистильованої води.

2-й варіант: для виявлення активуючої дії розчину NaCl у всі 10 пробірок замість 1 мл дистильованої води вносять по 1 мл 1 %-го розчину NaCl.

3-й варіант: для виявлення інгібуючої дії розчину $CuSO_4$ у всі 10 пробірок замість 1 мл дистильованої води вносять по 1 мл 1 %-го розчину $CuSO_4$.

7. Потім додають у всі 10 пробірок (починаючи з десятої, потім в дев'яту тощо) по 2 мл 0,1 %-го розчину крохмалю і перемішують вміст кожної пробірки. Додавання крохмалю треба починати з пробірки, яка містить у собі найменшу концентрацію амілази, оскільки розщеплення на холоді у ній іде дуже повільно і помилка через неодночасне додавання субстрату практично не позначиться на результатах визначення.

8. Водночас усі 10 пробірок ставлять у нагріту до 37 °С водяну баню.

9. Через 30 хв виймають пробірки із бані, швидко охолоджують їх під струмом холодної водопровідної води, перемішують вміст кожної пробірки і ставлять по порядку у штатив.

10. Доливають у кожну пробірку по 2 краплі розчину Люголя, перемішують і спостерігають у пробірках гаму кольорів від жовтого до синього. Жовте забарвлення свідчить про відсутність крохмалю, червоно-буре про наявність проміжних продуктів розщеплення (декстринів), синє – про наявність крохмалю або продуктів його початкового розщеплення.

Результати спостережень заносять у табл. 8.1.

Таблиця 8.1 – Залежність забарвлення вмісту пробірок від розведення слини

№	Відношення розведення слини	Забарвлення вмісту пробірки під час додавання розчину Люголя
1	1/20	
2	1/40	
3	1/80	
4	1/160	
5	1/320	
6	1/640	
7	1/1 280	
8	1/2 560	
9	1/5 120	
10	1/10 240	

11. Обчислюють амілазну активність слини в такий спосіб. У пробірці, де рідина забарвлена ще у синій колір, розщеплення крохмалю не сталося. Достатнє розщеплення крохмалю, очевидно, відбувається у тій пробірці, де немає синього відтінку. Наприклад, це спостерігається у п’ятій пробірці; а у шостій пробірці вже є синій відтінок. У п’ятій пробірці нерозведеної слини було 1/320 мл. Складають пропорцію:

1/320 мл нерозведеної слини розщеплює	2 мл 0,1 %-го розчину крохмалю,
а 1 мл слини розщеплює	Х мл розчину крохмалю
$x = \frac{1 \times 2}{1/320} = 640$ мл.	
Висновок: 1 мл нерозведеної слини розщеплює за 30 хв за температури 37 °С 640 мл 0,1 %-го розчину крохмалю.	

Під час порівняння результатів усіх трьох визначень виявляється різниця в активності амілази. Результати досліду оформляють у вигляді табл. 8.2.

Таблиця 8.2 – Вплив активаторів і інгібіторів на амілазну активність слини (ААС)

Фактор, що впливає на амілазну активність слини	**№ пробірки, в якій спостерігається розщеплення крохмалю**	**Величина амілазної активності**	**Пояснення реакції**
Нормальна ААС			
1 %-й NaCl			
1 %-й $CuSO_4$			

У нормі амілазна активність слини людини становить 260–320 одиниць.

Завдання для самостійної роботи. Вивчити теоретичний матеріал за темою, підготувати відповіді на контрольні питання.

Контрольні питання

1. Назвіть фактори, які можуть впливати на активність ферментів.
2. Які сполуки називають активаторами дії ферментів? Наведіть конкретні приклади.
3. Які сполуки називають інгібіторами дії ферментів? Наведіть конкретні приклади.
4. Які типи інгібування дії ферментів вам відомі?
5. Охарактеризуйте вплив катіонів і аніонів неорганічних солей на активність більшості ферментів.

Лабораторна робота № 9
ВИЗНАЧЕННЯ ГІДРОЛІТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ЛІПАЗИ ПІДШЛУНКОВОГО СОКУ

Активність ферментів ліпаз оцінюють за утворенням вільних жирних кислот внаслідок реакції гідролізу жиру (триацилгліцеринів). Кількість вільних жирних кислот визначають титруванням лугом у присутності індикатору фенолфталеїну.

Гідроліз жирів найзручніше спостерігати на прикладі витяжки з підшлункової залози (джерело ліпази) і молока як субстрату, триацилгліцерини якого знаходяться в емульгованому стані і під дією ліпази швидко розщеплюються на гліцерин та вільні жирні кислоти. Додавання до проби жовчі приводить до активації ліпази, внаслідок чого реакція гідролізу жиру перебігає швидше.

Фермент ліпаза входить до складу ферментного препарату ***панкреатину*** – висушеного екстракту вмісту підшлункової залози великої рогатої худоби.

Реактиви

Розчин панкреатину 5 %-й: 5 г сухого панкреатину розчиняють у 40–50 мл 2 %-го розчину натрій гідрокарбонату і додають 50–60 мл дистильованої води. *pH* середовища за фенолфталеїном має дорівнювати 8,0.

Молоко попередньо розведене дистильованою водою у співвідношенні 1:1; спиртовий розчин жовчі; 1 %-й спиртовий розчин фенолфталеїну, 0,05 н розчин NaOH.

Хід роботи

У три пробірки або колби наливають по 25 мл попередньо розведеного молока; у дві з них додають по 1 мл розчину панкреатину (джерело ліпази), а в третю – 1 мл дистильованої води.

В одну з пробірок, до яких додавали розчин панкреатину, додають 1 мл жовчі; до другої і третьої пробірки – по 1 мл дистильованої води. Вміст пробірок ретельно перемішують.

Потім з кожної пробірки відбирають по 4 мл суміші, переносять у колби для титрування, додають по 1–2 краплі 1 %-го розчину фенолфталеїну і відразу ж титрують 0,05 н розчином NaOH до появи блідо-рожевого забарвлення, яке не зникає впродовж 30 с.

Пробірки із залишками суміші поміщають у водяну баню або термостат за температури 37 °С. Наступний відбір проб (по 4 мл) і їх титрування проводять через кожні 10 хв. Роблять 4–5 таких визначень. Результати виражають у мл розчину лугу, який витрачається на кожне титрування. Отримані дані вносять у табл. 9.1.

Таблиця 9.1 – Результати визначення активності ліпази молока

Вміст суміші	**0 хв**	**10 хв**	**20 хв**	**30 хв**	**40 хв**
	Обсяг NaOH, мл				
Молоко, ліпаза, жовч					
Молоко, ліпаза, дистильована вода					
Молоко, дистильована вода					

За одержаними результатами будують графік залежності обсягу NaOH (в мл), який було використано на титрування кожної проби, від часу (у хв), і роблять висновок про активність ліпази:

Рисунок 9.1 – Графік залежності обсягу NaOH (в мл),
витраченого на титрування, від часу інкубації

Завдання для самостійної роботи. Вивчити теоретичний матеріал за темою, підготувати відповіді на контрольні питання.

Контрольні питання

1. Наведіть схему повного ферментативного гідролізу пальмітоолеостеарату за участі ферменту ліпази.
2. У якій частині шлунково-кишкового тракту дорослої людини відбувається цей процес?
3. Які умови є необхідними для активації ліпази і емульгування жирів у шлунково-кишковому тракті людини?
4. Охарактеризуйте основні властивості панкреатичної ліпази: хімічна природа ферменту, клас, підклас, тип специфічності, залежність каталітичної активності ферменту від температури тощо.
5. За допомогою якого методу кількісного аналізу можна довести глибину дії ліпази на триацилгліцерини молочного жиру?

Лабораторна робота № 10
ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ПРОТЕАЗ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ

Пептони, що утворюються під час перетравлювання білків у шлунку, а також білки, що потрапили до дванадцятипалої кишки у неперетравленому виді, підлягають дії протеаз підшлункового соку – *трипсину* і *хімотрипсину*.

Ці ферменти є складниками ферментного препарату панкреатину; легко розчиняються у воді та ізотонічному розчині NaCl.

Принцип методу. Метод визначення активності протеаз підшлункової залози ґрунтується на визначенні кількості амінокислоти тирозину, що утворюється внаслідок протеолізу білка казеїну за певних умов.

За одиницю протеолітичної активності беруть таку кількість препарату, яка за 1 хв за температури 37 °С каталізує гідроліз казеїну до таких продуктів гідролізу, які не осаджуються трихлороцтовою кислотою. Кількість цих продуктів є еквівалентною 1 мкмоль тирозину.

Реактиви

Розчин панкреатину: 0,025 г панкреатину розчиняють у 25 мл дистильованій воді.

1 %-й розчин казеїну у фосфатному буферному розчині з *pH* – 7,5; 10 %-й розчин трихлороцтової кислоти.

Спеціальний розчин: 10 мл фосфатного буферного розчину з *pH* 7,5; 100 мл 10 %-го розчину трихлороцтової кислоти і 200 мл розчину NaOH (0,34 моль/л) змішують у колбі місткістю 500 мл.

Розчин стандартного зразка тирозину: 0,0036 г тирозину розчиняють у 30 мл спеціального розчину у мірній колбі на 50 мл і доводять тим самим розчином до мітки. Перемішують і витримують 30 хв за кімнатної температури. Концентрація розчину тирозину ($C_{\text{тир}}$) – 0,4 мкмоль/л.

Хід роботи

У колбу об’ємом 25 мл додають 1 мл розчину панкреатину і 9 мл 1 %-го розчину казеїну. Суміш інкубують за температури 37 °С протягом 60 хв. Після закінчення відбирають 2 мл протеолізату, додають 2 мл 10 %-го розчину трихлороцтової кислоти і витримують 10 хв за кімнатної температури і центрифугують за 3 500 об/хв протягом 15 хв. Відбирають 2 мл надосадової рідини, додають 2 мл розчину 0,34 моль/л NaOH і визначають оптичну густину розчину на спектрофотометрі за довжини хвилі 280 нм у кюветі з товщиною шару 1 см.

Розчин порівняння готують так: 9 мл 1 %-го розчину казеїну і 1 мл дистильованої води інкубують за тих самих умов і обробляють, як і протеолізат.

Протеолітичну активність панкреатину (X) розраховують за формулою:

$$X = \frac{20 \cdot \Delta D}{60 \cdot P \cdot T} = \frac{\Delta D}{3 \cdot P \cdot T},$$

де ΔD – це різниця між оптичною густиною дослідної і контрольної проб;

T – тирозиновий коєфіцієнт;

P – наважка препарату, мг;

20 – розведення;

60 – час реакції, хв.

Протеолітична активність 1 мг препарату має бути не менше 0,1.

Визначення тирозинового коефіцієнта. У пробірках змішують різні обсяги розчинів стандартного зразка тирозину ($V_{\text{тир}}$) і спеціального розчину ($V_{\text{сп.розч.}}$) (див. табл. 10.1).

Таблиця 10.1 – Дані для визначення тирозинового коефіцієнта

№	$V_{\text{тир}}$, мл	$V_{\text{сп. розч}}$	$C_{\text{тир}}$, мкмоль/мл	Оптична густина
1	1,0	9,0		
2	2,0	8,0		
3	3,0	7,0		
4	4,0	6,0		
5	5,0	5,0		
6	6,0	4,0		
7	7,0	3,0		
8	8,0	2,0		
9	9,0	1,0		
10	10,0	–		

Вміст пробірок ретельно перемішують і залишають за кімнатної температури на 10 хв. Після закінчення часу визначають оптичну густину розчинів за довжини хвилі 280 нм у кюветі з товщиною шару 1 см.

Як розчин порівняння використовують спеціальний розчин.

За отриманими даними табл. 10.1 будують калібрувальний графік, за допомогою якого визначають тирозиновий коефіцієнт як тангенс кута нахилу прямої $D = f(C_{\text{тир}})$. Дані вносять у лабораторний журнал:

Рисунок 6 – Калібрувальний графік залежності оптичної густини (D) від концентрації тирозину ($C_{\text{тир}}$)

Завдання для самостійної роботи. Вивчити теоретичний матеріал за темою, підготувати відповіді на контрольні питання.

Контрольні питання

1. Які ферменти називають протеазами? У чому полягає механізм дії протеаз? Наведіть приклади.

2. Охарактеризуйте основні властивості протеази шлункового соку – пепсину: хімічна природа ферменту, клас, підклас, тип специфічності, залежність каталітичної активності ферменту від *pH* тощо.

3. Охарактеризуйте основні властивості протеаз підшлункового соку – трипсину і хімотрипсину: хімічна природа ферментів, клас, підклас, тип специфічності, залежність каталітичної активності ферменту від *pH* тощо.

4. У чому полягає принцип методу визначення активності протеаз підшлункового соку *in vitro?*

5. Наведіть схему гідролітичного розщеплення трипептиду *гліцил-тирозил-серину* під дією панкреатину.

Лабораторна робота № 11
КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ СЕЧОВИНИ В БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИМ МЕТОДОМ

Основним механізмом знешкодження амоніаку в організмі ссавців є біосинтез сечовини, який відбувається у клітинах печінки. Сечовина – це головний кінцевий продукт обміну білків і амінокислот. Виводиться сечовина з організму з сечею.

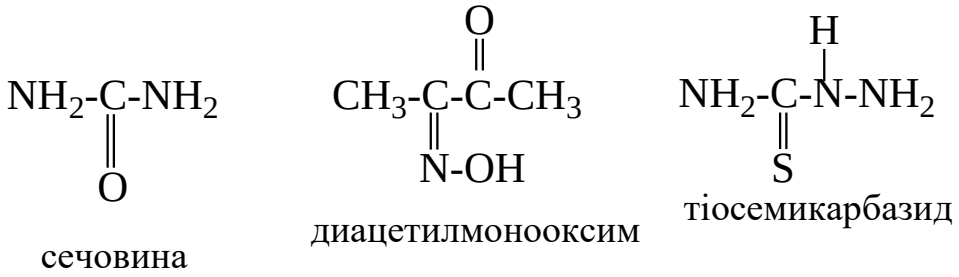
Рівень сечовини у сироватці крові залежить від швидкості її синтезу у печінці і виділення через нирки, а також від стану білкового обміну в організмі.

Вміст сечовини у сироватці крові здорової людини становить від 2,5 ммоль/л до 8,3 ммоль/л (15–50 мг/добу). Збільшення рівня сечовини відбувається у разі порушення функції нирок різної тяжкості; під час зневоднення організму; за надмірного споживання білка. Зменшення рівня сечовини спостерігається у разі захворювань печінки; на останніх термінах вагітності; за дієти з низьким вмістом білків та ін.

Вміст сечовини у сечі у нормі становить від 330 ммоль/добу до 580 ммоль/добу (20–35 г/добу).

Для визначення сечовини у сироватці крові і сечі часто застосовують два уніфіковані методи: хімічний – за кольоровою реакцією з диацетилмонооксимом і ферментативний – уреазний метод.

Принцип диацетилмонооксимного методу. У сильно кислому середовищі сечовина утворює з діацетилмонооксимом у присутності іонів Fe^{3+} і тіосемікарбазидом комплекс червоного (рожево-червоного) кольору. Інтенсивність забарвлення розчину прямо пропорційна концентрації сечовини у біологічній пробі.



сечовина диацетилмонооксим тіосемикарбазид

Набір реактивів для визначення сечовини

Реагент діацетилмонооксиму; реагент тіосемікарбазиду; калібрувальний розчин сечовини (10,0±0,5) ммоль/л; розчин трихлороцтової кислоти (50±2) %; концентрат розбавлювача; сироватка крові, сеча (розведення 1:100).

Приготування робочих розчинів

1. Розчин діацетилмонооксиму. У мірну колбу на 100 мл кількісно переносять вміст 1 ампули реагенту (5,0±0,5) мл, доливають дистильованою водою до мітки. Перемішують.

2. Розчин розбавлювача. У мірну колбу на 200 мл наливають 60–80 мл дистильованої води і додають, перемішуючи, вміст одного (100 мл) або двох (по 50 мл) флаконів з концентратом розбавлювача. Об'єм розчину доводять до мітки дистильованою водою. Перемішують.

3. Розчин тіосемікарбазиду. У мірну колбу на 100 мл кількісно переносять вміст 1 ампули реагенту тіосемікарбазиду (5,0±0,5) мл і доводять охолодженим до кімнатної температури розчином розбавлювача до мітки. Перемішують.

4. Калібрувальний розчин сечовини – готовий до роботи.

5. Розчин трихлороцтової кислоти. У мірну колбу на 50 мл переносять 50 %-й розчин трихлороцтової кислоти з ампули (5,0±0,5) мл і доводять розчин, перемішуючи, до мітки дистильованою водою.

Розчини 1, 2 та 5 стійкі за температури від 0 °С до 25 °С не більше 2 місяців.

Розчини 2 і 4 стійкі за температури від 0 °С до 25 °С протягом 24 місяців.

Хід роботи

У пробірки відмірюють послідовно, відповідно до табл. 11.1, біологічну рідину і робочі розчини. Для зменшення похибки аналізу необхідно дотримуватися вказаного порядку змішування розчинів.

Таблиця 11.1 – Дані для визначення вмісту сечовини у біологічних рідинах

Відміряти у пробірку	**Напівмікровизначення**			**Макровизначення**		
	Проба, мл					
	дослідна	**калібрувальна**	**холоста**	**дослідна**	**калібрувальна**	**холоста**
Біологічна рідина	0,01	–	–	0,02	–	–
Калібрувальний розчин	–	0,01	–	–	0,02	–
Фізіологічний розчин	–	–	0,01	–	–	0,01
Розчин тіосемікарбазиду	1,00	1,00	1,00	2,00	2,00	2,00
Розчин діацетилмонооксиму	1,00	1,00	1,00	2,00	2,00	2,00
Пробірки закривають ковпачками, перемішують вміст і одночасно поміщають у бурхливо киплячу водяну баню рівно на 10 хв. Потім пробірки швидко охолоджують у проточній холодній воді. Вимірюють оптичну густину калібрувальної і дослідної проби проти холостої проби за довжини хвилі 540–560 нм у кюветі товщиною 1 см. Забарвлення розчинів стабільне протягом 15 хв. Якщо після нагрівання розчин у пробірці з дослідною пробою мутний, то його центрифугують протягом 5 хв						
Розрахунок концентрації сечовини проводять за формулою:						
$$C = \frac{D_{\text{досл}}}{D_{\text{калібр}}} \times 10 \cdot [4{,}67],$$						
де C – концентрація сечовини у пробі, ммоль/л; 10,0[4,67] – калібрувальна концентрація сечовини [азоту сечовини], ммоль/л; $D_{\text{досл}}$ – оптична густина дослідної проби; $D_{\text{калібр}}$ – оптична густина калібрувальної проби						

Розрахуйте вміст сечовини у пробах, що досліджувались. Зробіть висновок.

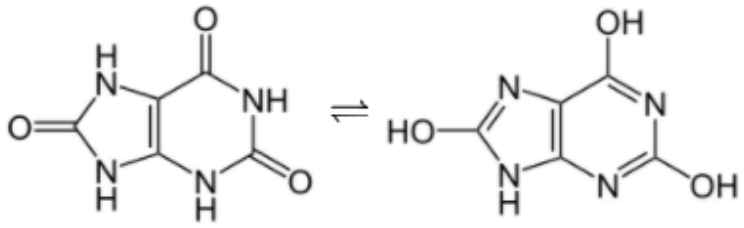
Завдання для самостійної роботи. Вивчити теоретичний матеріал за темою, підготувати відповіді на контрольні питання.

Контрольні питання

1. Яке біологічне значення має синтез сечовини в організмі людини і вищих тварин?
2. За яких патологічних станів рівень сечовини у сироватці крові підвищується (зменшується)?
3. У чому полягає сутність спектрофотометричного визначення сечовини у біологічних рідинах?
4. Наведіть схему реакції, яка лежить в основі уреазного методу визначення сечовини у біологічних рідинах.
5. Укажіть, до якого класу ферментів належить уреаза, який тип субстратної специфічності має цей фермент?

Лабораторна робота № 12
КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ СЕЧОВОЇ КИСЛОТИ У БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ

Сечова кислота (2,6,8-триоксипурин) є продуктом розпаду пуринових нуклеозидів, що входять до складу нуклеїнових кислот, макроергічних сполук (АТФ, АДФ, АМФ), деяких коферментів (НАД, ФАД та ін.).



Більша частина сечової кислоти, що надходить із тканин у кров, виділяється з сечею (до 75 %), решта виводиться з калом.

Вміст сечової кислоти у сироватці крові у нормі становить:

– чоловіки 262–452 мкмоль/л, (2,0–5,5 мг/100 мл);

– жінки 137–393 мкмоль/л, (2,3–6,6 мг/100 мл);

У сечі: 1,48–4,43 ммоль/добу, (250–750 мг/добу).

Порушення обміну сечової кислоти супроводжується або підвищенням (гіперурікемія), або зниженням її продукції (гіпоурікемія). Підвищення рівня сечової кислоти може свідчити про ниркову недостатність, але в основному пов’язане з подагрою.

Для визначення вмісту сечової кислоти у біологічних рідинах застосовують хімічні (відновлення фосфорновольфрамового реактиву, мурексидна проба), ферментативні (уриказний) та інші методи.

Принцип фосфорновольфрамового методу. Сечова кислота відновлює фосфорновольфрамову кислоту у лужному середовищі, внаслідок чого утворюються продукти синього кольору, інтенсивність забарвлення яких пропорційна вмісту сечової кислоти.

Набір реактивів для визначення сечової кислоти

1. Фосфорновольфрамовий реактив (100±2) мл
   Na_2WO_4 – (0,12±0,01) моль/л
   H_3PO_4 – (0,47±0,05) моль/л
   $LiSO_4$ – (0,29±0,02) моль/л
2. Розчин каталізатора (50±2) мл
3. Натрію вольфрамат (0,30±0,01) моль/л (50±2) мл
4. Калібрувальний розчин сечової кислоти (9,0±0,5) мл

(300±3) мкмоль/л або (5,04±0,05) мг%

Натрію карбонат (20,5±0,5) г

Сироватка крові; сеча, розведена дистильованою водою у 10 разів.

Приготування робочих розчинів

Реактиви 1–4 готові для застосування.

Розчин натрій карбонату. Для приготування розчину порошок натрій карбонату переносять у мірну колбу на 200 мл, додають 130–150 мл дистильованої води, перемішують до повного розчинення. Доводять об'єм до мітки дистильованою водою, за необхідності фільтрують.

Хід роботи

У пробірки відмірюють послідовно, відповідно до табл. 12.1, біологічну рідину і робочі розчини. Для зменшення похибки аналізу необхідно дотримуватися вказаного порядку змішування розчинів.

Таблиця 12.1 – Дані для визначення сечової кислоти у біологічних рідинах

Відміряти у пробірку	**Мікровизначення**			**Напівмакровизначення**		
	Проба, мл					
	дослідна	**калібрувальна**	**холоста**	**дослід**	**калібрувальна**	**холоста**
Дистильована вода	2,40	2,0	2,70	4,00	4,00	4,50
Біологічна рідина	0,30	–	–	0,05	–	–
Калібрувальний розчин сечової кислоти	–	0,30	–	–	0,50	–
Розчин каталізатора	0,15	0,15	0,15	0,25	0,25	0,25
Натрію вольфрамат	0,15	0,15	0,15	0,25	0,25	0,25
Перемішати, витримати (10±1) хв за кімнатної температури, центрифугувати (10±1) хв за 2 000–5 000 об/хв, відібрати необхідну кількість центрифугату (замість центрифугування допускається фільтрування отриманого розчину)						
Центрифугат (фільтрат)	1,00	1,00	1,00	2,00	2,00	2,00
Розчин натрій карбонату	0,50	0,50	0,50	1,00	1,00	1,00
Фосфорновольфрамовий реактив	0,30	0,30	0,30	0,60	0,60	0,60
Перемішати, витримати 30 хв за кімнатної температури, виміряти оптичну густину дослідної проби ($D_{\text{досл}}$) і калібрувальної проби ($D_{\text{калібр}}$) проти холостої проби за довжини хвилі 650 нм у кюветі з товщиною шару 1 см. Забарвлення стабільне протягом 30 хв						
Розрахунок концентрації сечовини проводять за формулою:						
$$C = \frac{D_{\text{досл}}}{D_{\text{калібр}}} \times 5{,}04\ (300),$$						
де C – концентрація сечової кислоти в пробі, мг% (мкмоль/л); 5,04 (300) – калібрувальна концентрація сечової кислоти, мг% (мкмоль/л); $D_{\text{досл}}$ – оптична густина дослідної проби; $D_{\text{калібр}}$ – оптична густина калібрувальної проби. Якщо дослідний розчин попередньо розводили, під час розрахунку концентрації сечової кислоти необхідно враховувати коефіцієнт розведення						

Розрахуйте вміст сечової кислоти у пробах, що досліджувались. Зробіть висновок.

Завдання для самостійної роботи. Вивчити теоретичний матеріал за темою, підготувати відповіді на контрольні питання.

Контрольні питання

1. Наведіть структурну формулу сечової кислоти. Охарактеризуйте основні фізико-хімічні властивості цієї сполуки.
2. Вкажіть основні джерела в організмі людини сечової кислоти екзогенного і ендогенного походження.
3. Вкажіть шляхи виведення сечової кислоти з організму людини.
4. Назвіть хімічні і ферментативні методи визначення сечової кислоти у сироватці крові і сечі.
5. У чому полягає клініко-діагностичне значення визначення вмісту сечової кислоти у сироватці крові і сечі?

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Лабораторні та семінарські заняття з біологічної хімії: навч. посіб. / Л. М. Вороніна, В. Ф. Десенко, А. Л. Загайко та ін. Харків: Від-во НфаУ; Оригінал, 2004. 384 с.

2. Introduction to Practical Biochemistry / G. Hegyi, J. Kardos, M. Kovács, A. Málnási-Csizmadia, L. Nyitray. Eötvös Loránd University. 2013. 211 p.

3. Копильчук Г. П., Николайчук І. М. Лабораторний практикум з біохімії. Чернівці: Чернівец. нац. ун-т ім. Ю. Федьковича. 2019. 144 с.

4. Інструкція до набору реактивів для визначення сечовини у біологічних рідинах діацетилмонооксимним методом «Сечовина-Д». ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика». 2020. 4 с.

5. Інструкція до набору реактивів для визначення сечової кислоти у біологічних рідинах. ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика». 2020. 4 с.

ДЛЯ НОТАТОК

Навчальне видання

Лесишина Юлія Остапівна

БІОХІМІЯ

Методичні вказівки
до виконання лабораторних робіт
для здобувачів вищої освіти спеціальностей Е1 Біологія та біохімія, Е3 Хімія

Редактор О. А. Солдатова
Технічний редактор Т. О. Важеніна-Гопрак

Підписано до друку 13.10.2026
Формат 60×84/16. Папір офсетний.
Друк – цифровий. Умовн. друк. арк. 2,55.
Тираж 30. Зам. 34.

Донецький національний університет імені Василя Стуса
21021, м. Вінниця, 600-річчя, 21
Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи
до Державного реєстру
серія ДК № 5945 від 15.01.2018