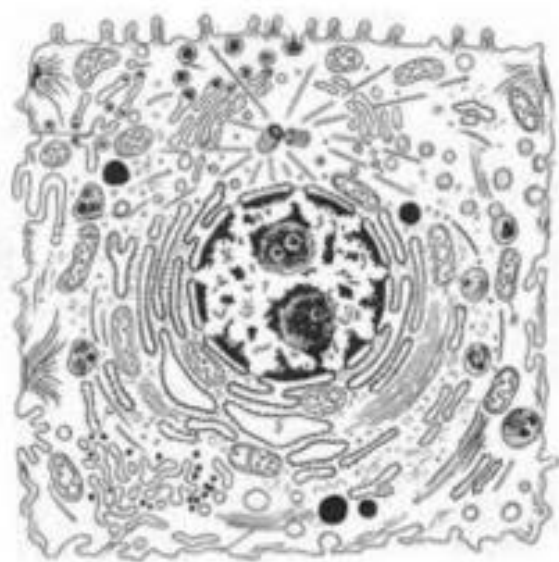


С.І. Цехмістренко, О.І. Кононський,
О.С. Цехмістренко

Біохімія тварин
з основами фізичної
і колоїдної хімії

П р а к т и к у м



*С.І. Цехмістренко, О.І. Кононський,
О.С. Цехмістренко*

**Біохімія тварин
з основами фізичної і
колоїдної хімії**

Практикум

*Рекомендовано Міністерством
освіти і науки України як навчальний посібник
для студентів аграрних вищих навчальних закладів*

Київ
2011

УДК 636:612.015:541.1(076)

ББК 28.902

Ц 55

Гриф надано Міністерством освіти і науки України

(лист від 07.12.2010 № 1/11-11100)

Рецензенти:

Запорожець М.Ф. – доктор біологічних наук, професор Вінницького державного аграрного університету;

Данчук В.В. – доктор сільськогосподарських наук, професор Подільського державного аграрно-технічного університету.

Цехмістренко С.І., Кононський О.І., Цехмістренко О.С.

Біохімія тварин з основами фізичної і колоїдної хімії. Практикум: Навч. посіб., 2011. – 216 с.

ISBN

Практикум складається із розділів, передбачених програмою дисципліни для студентів аграрних вузів.

У кожний розділ внесені практичні роботи щодо якісних та кількісних методів визначення речовин. Описанню практичної роботи передує коротке теоретичне введення.

У посібнику використано сучасну українську хімічну термінологію хімічних елементів та їх сполук.

Рекомендовано для аграрних навчальних закладів III–IV рівнів акредитації зі спеціальностей: «Ветеринарна медицина», «Технологія виробництва та переробки продукції тваринництва», «Водні біоресурси».

ISBN

© Цехмістренко С.І.,
Кононський О.І.,
Цехмістренко О.С. 2011

ПЕРЕДМОВА

Біохімія тварин з основами фізичної і колоїдної хімії належить до загальнобіологічних дисциплін, що формують теоретичну підготовку фахівців, які будуть працювати в аграрному секторі.

На жаль, вища аграрна освіта не має практикуму з цієї дисципліни, який би забезпечував повноцінну підготовку фахівців у галузі тваринництва. Навчальні посібники, якими користувалися майбутні спеціалісти у галузі ветеринарії та зоотехнії, стали бібліографічною рідкістю.

Практикум з біохімії тварин з основами фізичної і колоїдної хімії створений співробітниками кафедри органічної та біологічної хімії Білоцерківського національного аграрного університету. Він написаний у повній відповідності з програмами, які рекомендовані для аграрних вузів зі спеціальностей: «Ветеринарна медицина», «Технологія виробництва та переробки продукції тваринництва», «Водні біоресурси».

Автори прагнули якомога більше уваги приділити розвиткові у студентів навичок самостійної роботи. Корисним, без сумніву, є коротке теоретичне введення до кожної теми, хімізм реакцій дослідження та контрольні питання.

На кафедрі ми прагнемо особливу увагу приділяти ретельному проведенню кожної з лабораторних робіт, які пропонуються, що базується на розумінні їх хімічної сутності та практичного значення, а також кваліфікованому їх протоколюванню. У практикумі зібрані як класичні, так і сучасні методи дослідження, що широко використовуються у клініко-біохімічних лабораторіях.

В основу практикуму покладений багаторічний досвід проведення лабораторно-практичних занять на кафедрі органічної та біологічної хімії Білоцерківського національного аграрного університету.

Автори із вдячністю приймуть до уваги всі зауваження та побажання щодо оформлення та змісту практикуму.

І. ФІЗИЧНА ХІМІЯ

1. ПОВЕРХНЕВИЙ НАТЯГ І МЕТОДИ ЙОГО ВИЗНАЧЕННЯ

Абсолютна більшість реакцій обміну речовин у живих організмів відбувається у рідкому стані. *Рідина* – агрегатний стан речовин, що сполучає у собі риси твердого стану (збереження об'єму, певної міцності на розрив) і газоподібного (мінливість форми) станів. У рідинах сила притягання і кінетична енергія молекул приблизно зрівноважені. Для рідин характерний ближній порядок у розміщенні частинок (молекул, атомів) і мала відмінність у кінетичній енергії теплового руху молекул та їх потенціальної енергії взаємодії. Тепловий рух молекул рідини складається з коливань біля положень рівноваги і порівняно рідких перескоків з одного рівноважного положення в інше, з чим зв'язані текучість та інші ознаки рідин.

Рідини мають винятково велике значення в житті живих організмів. Зокрема, організм тварин на 65,9 % складається з води. *Вода* – середовище, де відбуваються всі біохімічні реакції, що обумовлюють існування живого організму. Вода – хімічна основа всіх, без винятку, біологічних рідин. *Біологічні рідини* – полідисперсні системи, в яких розмір розчинених речовин різний – від десятків мкм ($1 \text{ мкм} = 10^{-6} \text{ м}$) до часточок нм ($1 \text{ нм} = 10^{-9} \text{ м}$). Біологічними рідинами є кров, лімфа, ліквор, травні соки, молоко, сеча тощо. Вивчення змін фізичних і хімічних властивостей біологічних рідин тваринного організму має велике значення у діагностиці хвороб тварин. Серед таких властивостей особливе місце належить поверхневому натягу.

Поверхневий натяг – робота, що затрачується на утворення одиниці площі поверхні розділу фаз (тіл) за постійної температури. Поверхневий натяг рідин часто визначають як силу, що діє на одиницю довжини контуру поверхні розділу фаз і прагне вкоротити цю поверхню до мінімуму.

Робота 1. Спостереження за кулеподібною формою крапель аніліну у воді

Поверхневий натяг є наслідком дії міжмолекулярних сил. Поверхневий шар рідини, що складається з одного або декількох шарів молекул, утворює своєрідну молекулярну плівку, яка за своїми властивостями відрізняється від головної маси рідини. Так, молекула,

що знаходиться у середині рідини, оточена з усіх сторін іншими молекулами і піддається рівномірному притяганню ними, надаючи таку ж дію і на них. Якщо одна рідина не розчиняється в іншій, то крапля першої рідини внаслідок існування поверхневого натягу приймає форму кулі.

Хід роботи. У хімічну склянку наливають дистильовану воду, нагрівають до кипіння і поміщають у піщану баню. Додають декілька крапель аніліну. Спостерігають за формою утворення крапель аніліну. Після того, як анілін потрапляє у воду, виникає плівка. Анілін нагрівається, плівка руйнується і краплі аніліну осідають на дно склянки. Через деякий час краплі знову з'являються на поверхні, нагріваються і знову осідають. Процес утворення і руйнування крапель повторюється декілька разів до охолодження рідин.

Робота 2. Якісна проба на поверхнево-активні та поверхнево-неактивні речовини

Поверхнево-активні речовини (ПАР) – хімічні сполуки, здатні концентруватися на поверхні розділу фаз, викликати зменшення поверхневого (міжфазового) натягу. Типовими ПАР є органічні речовини, молекули яких мають полярну будову, тобто містять ліофільні та ліофобні (звичайно гідрофільні та гідрофобні) групи атомів. Це, як правило, водорозчинні сполуки. Гідрофільні групи забезпечують розчинність ПАР у воді, гідрофобні (найчастіше вуглеводні) за достатньо високої молекулярної маси сприяють їх розчинності у неполярних середовищах. Молекула ПАР складається з двох частин – гідрофільної (полярної) і гідрофобної (неполярної). Є іонні (мила, штучні миючі засоби типу алкілсульфатів тощо) ПАР.

Поверхнево-неактивні, або *поверхнево-інактивні речовини* (ПІР) – сполуки, які мало або зовсім не впливають на стан поверхневого натягу. Це здебільшого неорганічні сполуки.

ПАР знаходять широке використання у промисловості (наприклад, для збагачення руди, флотації), побуті (мила і штучні миючі засоби), медицині та тваринництві, в агрономії.

Хід роботи. У чашку Петрі наливають 10–20 мл дистильованої води. Додавають 0,2–0,3 г дрібного порошку Сульфур, щоб покрити тонким шаром воду. Піпеткою або склянкою паличкою в центр чашки по черзі вноситься розчин сульфату купруму, хлориду натрію, етанолу, бензину і розчин мила. Якщо речовина поверхнево-

активна, то частки Сульфуру будуть переміщуватися на периферію чашки, в бік більшого поверхневого натягу.

Робота 3. Визначення величини поверхневого натягу етанолу сталагмометричним методом

Поверхневий натяг води та її густина залежать від температури навколишнього середовища (табл. 1):

Таблиця 1 – Поверхневий натяг і густина води на межі з повітрям

Температура, °С	Поверхневий натяг, мН/м	Густина, г/см ³	Температура, °С	Поверхневий натяг, мН/м	Густина, г/см ³
0	75,64	0,9999	22	72,44	0,9978
5	74,92	1,0000	23	72,28	0,9976
10	74,22	0,9997	24	72,13	0,9973
11	74,07	0,9996	25	71,97	0,9971
12	73,33	0,9995	30	71,18	0,9957
13	73,78	0,9994	35	70,38	0,9941
14	73,64	0,9993	40	69,56	0,9922
15	73,49	0,9991	45	68,74	0,9902
16	73,31	0,9990	50	67,91	0,9881
17	73,19	0,9988	60	66,18	0,9832
18	73,05	0,9986	70	64,42	0,9778
19	72,90	0,9984	80	62,61	0,9718
20	72,75	0,9982	90	60,75	0,9553
21	72,59	0,9980	100	58,85	0,9584

Існує ряд методів визначення поверхневого натягу. Найбільше поширення мають методи капілярного підняття рідини, відриву кільця, продавлювання бульбашок і сталагмометричний (метод відриву крапель). Найбільш зручний у роботі останній.

Для визначення поверхневого натягу цим методом використовується прилад – сталагмометр (рис. 1). *Сталагмометр* – товстостінна капілярна трубка, що містить розширення, вище і нижче якого є мітки А і Б. Нижній кінець трубки відшліфований. Капля відривається тоді, коли її маса практично дорівнює силі поверхневого натягу.

Для розрахунків використовують формулу:

$$\sigma = \frac{q \times \rho \times n_1}{q \times n}$$

де σ – поверхневий натяг дослідної рідини, σ_1 – поверхневий натяг води, ρ – густина дослідної рідини, ρ_1 – густина води, n – кількість крапель дослідної рідини, n_1 – кількість крапель води.

Хід роботи. Сталагмометр вертикально закріплюють у штативі. У чашку Петрі наливають етанол і через гумову трубку, надіту на верхній кінець сталагмометра, засмоктують спирт до верхньої мітки. Після цього рідину зі сталагмометра випускають і підраховують кількість крапель. Підрахунок закінчують тоді, коли досліджувана рідина досягне рівня нижньої мітки. Дослід повторюють декілька разів і для кінцевого розрахунку використовують середню кількість числа крапель. Розходження між окремими вимірами не повинно бути більше 1–2-х крапель. Потім визначають кількість крапель води, що вміщуються в об'ємі сталагмометру. У разі відсутності на сталагмометрі дрібних поділок вираховується загальна кількість крапель в об'ємі від верхньої до нижньої кільцевих міток приладу.



Рис. 1. Сталагмометр: 1 – розширена резервуару; А, Б – верхня і нижня мітки.

Робота 4. Визначення поверхневого натягу розчинів різних спиртів

Різні спирти мають неоднакову величину поверхневого натягу. Зі збільшенням величини радикалу зростає поверхнева активність речовин. Зокрема, в гомологічному ряду карбонових кислот із нормальною будовою радикалу поверхнева активність їх за відношенням до води зростає у 3,2 рази на кожен групу $-\text{CH}_2-$ (правило Траубе).

Хід роботи. Готують 0,2 М розчини спиртів: метанолу, етанолу, пропанолу, бутанолу, пентанолу. Визначають величину їх поверхневого натягу (див. попередню роботу). Одержані цифрові дані відображають у вигляді графіка, де на осі ординат відмічають величину поверхневого натягу, а на осі абсцис число атомів карбону відповідного спирту.

Робота 5. Визначення присутності солей жовчних кислот у сечі за поверхневим натягом

Жовчні кислоти – природні поверхнево-активні речовини, які знижують поверхневий натяг багатьох поживних речовин у тонкій кишці, подрібнюють їх краплі на дрібні частинки, що всмоктуються

мікрворсинками або стають доступними для дії гідролітичних ферментів за пристінкового і порожнинного травлення (наприклад, жирів та інших ліпідів). Вони знаходяться у вільному стані або у вигляді солей, таких як холева, дезоксихолева, літохолева кислоти, а також натрієві солі глікохолевої та таурохолевої кислот. За деяких захворювань печінки (фасціольоз) і нирок (нефрит) вони виявляються в сечі та можуть бути діагностичною ознакою.

Принцип методу базується на тому, що жовчні кислоти та їх солі знижують поверхневий натяг сечі (нерідко до 35 мН/м). У клінічно здорових тварин поверхневий натяг становить 57–68 нМ/м.

Хід роботи. У чашку Петрі наливають 10–20 мл сечі і вносять декілька кристаликів "сірчастого цвіту". За поверхневого натягу 50 мН/м і менше він змочується і випадає на дно чашки. У разі відсутності жовчних кислот – залишається на поверхні рідини.

Контрольні питання

1. Що таке поверхневий натяг і які причини його виникнення? 2. Яке значення поверхневого натягу у житті організму людини і тварин. 3. Як змінюється величина поверхневого натягу клітин і біологічних рідин за окремих хвороб і захворювань? 4. Якими одиницями вимірюється поверхневий натяг? 5. Що таке поверхнево-активні та поверхнево-інактивні речовини? Наведіть приклади. 6. Наведіть приклади використання ПАР у народному господарстві, побуті, агрономії, ветеринарії, тваринництві, медицині. 7. Які вам відомі методи визначення величини поверхневого натягу? 8. Що таке "правило Траубе" і як воно впливає на поверхневий натяг різних спиртів і карбонових кислот? 9. Які біологічно активні речовини в харчовому каналі тварин зменшують величину поверхневого натягу? Охарактеризуйте значення цього явища. Наведіть приклади.

2. АДСОРБЦІЯ

Адсорбція (лат. *ad* – на, при; *sorbio* – поглинаю) – поглинання певних речовин (адсорбтивів) з газової або рідкої фаз поверхневим шаром твердого тіла (адсорбентом), або рідини. Адсорбція виникає в результаті наявності в адсорбенті поверхневої енергії. Молекули (атоми), що знаходяться на поверхні твердого тіла або рідини, мають незаповнені силові поля. Завдяки цьому молекули рідини або газу, що потрапляють на таку поверхню, затримуються нею. Адсорбенти, як правило, мають велику питому поверхню – до декількох сотень квадратних метрів на 1 г (наприклад, активоване вугілля).

Розрізняють два види адсорбції – фізичну і хімічну. Фізична адсорбція – результат взаємодії дисперсних сил і сил електростатичного характеру адсорбенту і адсорбтиву (адсорбату). Фізична адсорбція

в ряді випадків посилюється хімічною взаємодією між адсорбентом і адсорбтивом. У таких випадках адсорбція називається хімічною.

У практиці часто зустрічається явище абсорбції. *Абсорбція* (лат. *absorbio* – поглинання) – поглинання речовини (речовин) з навколишнього середовища всією масою адсорбенту.

У техніці як адсорбенти використовуються здебільшого пористі тіла з дуже розвинутою внутрішньою поверхнею: активоване вугілля, силікагелі, активні оксиди алюмінію (Al_2O_3), цеоліти. Пористі адсорбенти містять мікропори (еквівалентний радіус $r < 0,7$ нм), супермікропори ($0,7$ нм $< r < 1,5$ нм), мезопори ($1,5$ нм $< r < 100$ нм) і макропори ($r > 100$ нм). Під час адсорбції мікро- і супермікропори можуть заповнюватися повністю, а в мезо- і макропорах утворюється мономолекулярний шар (часто і полімолекулярні шари) адсорбенту (адсорбентів). За високого відносного тиску в мезопорах відбувається капілярна конденсація. Велике значення у процесі адсорбції газів і парів мають мікропори.

Величина адсорбції залежить від природи адсорбенту. Так, наприклад, активоване вугілля у багато разів краще адсорбує, ніж звичайне. Крім цього, адсорбція залежить від температури і тиску, концентрації адсорбенту і природи пористої поверхні. Інтенсивність адсорбції зменшується з підвищенням навколишньої температури. За однакової температури речовина краще адсорбується з розведених розчинів, ніж із концентрованих. Величина адсорбції залежить від природи розчинника: чим краще розчиняється речовина в розчиннику, тим гірше вона адсорбується. Величина адсорбції визначається вуглецевим радикалом органічних сполук. Наприклад, у разі подовження радикалу на одну групу CH_2 , величина адсорбції збільшується в середньому в 3 рази (правило Траубе).

Процес, зворотний адсорбції, називають *десорбцією* або *елюцією*. Вона здійснюється самостійно або за допомогою інших адсорбентів. Десорбції сприяють підвищення температури і зменшення тиску.

Адсорбція широко використовується в техніці (очищення та осушення газів, твердих речовин, рідин), медицині та ветеринарії (для лікування кормових отруєнь організму), побуті (для очищення води від шкідливих домішок). Явище адсорбції лежить в основі конструкції протигазів. Адсорбційні процеси в техніці проводять за допомогою спеціальних апаратів – адсорберів.

Величина адсорбції газу або твердих речовин на твердому адсорбенті вимірюється в молях на 1 грам адсорбенту.

Робота 1. Залежність величини адсорбції від природи адсорбтиву

Різні речовини неоднаково адсорбуються одним і тим же адсорбентом. Це явище краще всього можна спостерігати у розчинах різних барвників.

Хід роботи. У пробірку наливають 5 мл 0,01 % розчину еозину, додають 5 мл 0,01 % розчину метиленового синього. Перемішують. Вміст пробірки ділять навпіл. У першу пробірку додають пучку активованого вугілля і фільтрують. Порівнюють забарвлення фільтрату із вмістом другої пробірки. За забарвленням фільтрату і суміші визначають який з барвників краще адсорбується.

Робота 2. Залежність величини адсорбції від природи розчинника

На величину адсорбції впливає природа розчинника. Органічні розчинники добре змочують адсорбенти (наприклад, активоване вугілля), а вода – погано.

Хід роботи. В одну пробірку наливають 2 мл водного розчину метиленової синьки, в другу – спиртового розчину такої ж концентрації. В обидві пробірки додають пучку активованого вугілля. Вміст пробірок перемішують і через деякий час фільтрують.

Робота 3. Адсорбція активованого вугілля на межі розділу двох фаз

Процес адсорбції є наслідком дії міжмолекулярних сил адсорбенту і адсорбтиву. Вона найкраще проявляється на межі фаз: рідкої і газоподібної, рідкої і твердої, рідкої і рідкої (у випадку нерозчинності двох рідин одна в одній).

Хід роботи. Беруть 15 мл 1 % суспензії активованого вугілля у воді, додають 5–10 мл бензену або хлороформу. Збовтують. Після розділення рідин на два шари (вода і бензен, або вода і хлороформ) на їх межі розміщується ще один шар – активоване вугілля. Пояснити причину явища.

Робота 4. Елюція метиленового синього

Елюція – витиснення частинок адсорбтиву розчинником. Використовується для відновлення адсорбуючих властивостей адсорбенту.

Хід роботи. У пробірку наливають 5–6 мл 0,01 % розчину метилового синього і додають пучку активованого вугілля. Виникає *адсорбційний комплекс* – барвник і адсорбент. Фільтрують. До осаду, що залишився на фільтраті, приливають декілька мл 90° етанолу. З комплексу витісняється барвник.

Робота 5. Фарбування вовни

Фарбування – надання різним матеріалам (вовні, текстилю, шкірі, хутру, паперу, пластмасі, дерев'яним і залізним виробам тощо) стійкого кольору за допомогою різних барвників. На матеріалі барвники утримуються силами Ван-дер-Ваальса і хімічними (ковалентними, іонними, водневими) зв'язками.

Хід роботи. У 3 пробірки наливають по 5 мл 0,05 % розчину метилового синього. У першу пробірку вносять 5 крапель дистильованої води, в другу – 2 н розчину хлоридної кислоти, у третю – їдкого натрію. У кожен пробірку вносять по декілька шматочків білої вовни або шерстяних ниток, залишають на 20–30 хв, після чого зливають розчини і старанно промивають вовну або нитки холодною водою. Вовна інтенсивно пофарбувалася в лужному середовищі, слабо – у нейтральному і не пофарбувалася в кислому.

Робота 6. Хроматографічне розділення барвників на папері

Хроматографія – метод розділення та аналізу суміші різних речовин на складові компоненти. Розділення речовин хроматографічним методом полягає в тому, що суміш газів або багатокомпонентний розчин пропускають через адсорбент. Останній поглинає різні складові частини суміші з різною швидкістю. Виникає зональний розподіл компонентів уздовж адсорбенту. Такий розподіл називають хроматограмою.

Розрізняють різні види хроматографії: за характером середовища, в якому проводяться розділення; за механізмом розділення (молекулярну, іонообмінну, осадову і розділювальну) та за способом проведення (колонкову, капілярну, паперову і токсикомарову).

Хроматографією виділяють речовини в чистому вигляді із сумішей. Хроматографічний метод вперше розробив російський ботанік І.С. Цвет (1904 р.). Найбільш доступними є методи паперової хроматографії. Для проведення такої хроматографії використовуються спеціальний папір з чистої целюлози. За допомогою такого

методу розділяють суміші різних барвників, амінокислот, пігментів, гормонів, вітамінів тощо.

Хід роботи. Готують суміш барвників. Для цього у 100 мл 50° етанолу розчиняють 0,2 г метиленового червоного, 0,2 г фенолфталеїну, 0,04 г бромтимолового синього та 0,04 г тимолового синього.

На смужку хроматографічного паперу (2×20 см) піпеткою наносять краплю суміші барвників і відмічають це місце чорним олівцем. Папір переносять у витяжну шафу і висушують. Після цього на це ж місце наносять ще одну краплю суміші барвників. Папір повторно висушують. Висушений папір переносять у пробірку, в яку попередньо налито 4–5 мл суміші органічних розчинників (20 мл бутанолу, 5 мл етанолу і 25 мл дистильованої води). Пробірку закривають корком, в який закріплюють верхню частину паперу. Відбувається адсорбція. Після того, як суміш розчинників підніметься на висоту 15 см, папір виймають і поміщають у сушильну шафу. Олівцем відмічають місце підняття складових частин суміші. На верхній ділянці паперу виникає 4 плями: верхня – від тимолового синього, друга – від бромтимолового синього, потім – від метиленового червоного, найнижча – від фенолфталеїну. Для кращої диференціації папір зрошують спочатку розчином аміаку, потім розбавленим розчином хлоридної кислоти.

Контрольні питання

1. Що таке адсорбція і абсорбція? 2. Які фактори впливають на величину адсорбції? 3. Що таке ізотерма адсорбції і як вона характеризується? 4. Чим відрізняється фізична адсорбція від хімічної? 5. Як вимірюється величина адсорбції? 6. У чому полягає суть хроматографічного аналізу? 7. Що вам відомо про застосування адсорбції у промисловості, ветеринарії, медицині?

3. ХІМІЧНА КІНЕТИКА І КАТАЛІЗ

Хімічна кінетика – вчення про швидкість, механізми та закономірності перебігу хімічних реакцій. Розрізняють гомогенні та гетерогенні хімічні реакції. Хімічні реакції, що відбуваються в межах однієї фази, вважають *гомогенними*. Вони відбуваються в усьому об'ємі реагуючої системи. Хімічні реакції, що проходять на межі двох фаз, називаються *гетерогенними*. У живій та неживій природі мають місце реакції, в яких одні стадії є гомогенними, інші – гетерогенними. Такі хімічні реакції називаються гомогенно-гетерогенними.

Розрізняють моно-, бі- і тримолекулярні реакції. Під час проходження мономолекулярних хімічних реакцій в елементарному акті

бере участь лише один вид молекул, бімолекулярних – два види молекул, тримолекулярних – три види молекул.

Швидкість кожної хімічної реакції залежить від природи реагуючих речовин, їх концентрації та температури, а також від наявності каталізаторів.

Каталізаторами називають речовини, що здатні змінювати швидкість хімічних реакцій, а самі в кінці реакції залишаються незмінними. Каталізатори ділять на позитивні та негативні. Перші з них прискорюють хід хімічних реакцій, другі – уповільнюють. Останні нерідко називають *інгібіторами*. Кількість каталізатора, як правило, є незначною порівняно з кількістю реагентів. Для каталізаторів характерні ряд властивостей: висока каталітична активність, зворотність та специфічність дії, вплив на каталітичні властивості різних сторонніх речовин. Останні можуть послаблювати або підсилювати дію каталізаторів. Перші найчастіше представлені різними отрутами, другі вважають активаторами.

Розрізняють такі види каталізу: гомогенний, гетерогенний, автокаталіз і ферментативний каталіз. Каталіз називається *гомогенним*, коли каталізатор і реагенти складають однорідну газову або рідинну суміш (фазу). *Гетерогенним*, або контактним каталізом називають такий каталіз, за якого реагуючі речовини і каталізатор знаходяться в різних агрегатних станах і хімічні реакції відбуваються на поверхні каталізатора. *Автокаталізом* називають такий вид каталізу, коли каталізатором є один із продуктів хімічної реакції (наприклад, іони Гідрогену кислоти, що виникають під час її дисоціації після омилення естеру). *Ферментативний* каталіз відбувається з участю біологічних каталізаторів білкової природи, які називаються *ферментами*. Такий вид каталізу є типовим для всіх живих організмів (людини, тварин, рослин, мікробів, вірусів). Ферментативний каталіз є різновидністю мікрогетерогенного каталізу.

Збільшення швидкості хімічної реакції під впливом каталізаторів відбувається внаслідок зменшення енергії активації реагентів. *Енергія активації* (E) характеризує енергетичний бар'єр, який треба подолати, щоб перевести реагуючі молекули в активний стан. Наприклад, для розщеплення сахарози на глюкозу і фруктозу під впливом каталізатора сульфатної кислоти, енергія активації дорівнює 134400 Дж/моль. Якщо використати як каталізатор фермент

інвертазу, то енергія активації для даної реакції буде становити 40420 Дж/моль.

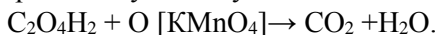
Робота 1. Залежність швидкості хімічної реакції від концентрації реагуючих речовин і температури

Швидкість хімічної реакції прямо пропорційна концентрації реагуючих речовин або реагентів і температури. З підвищенням температури на 10 °С збільшується число зіткнень між молекулами лише на 1,5 %, а швидкість реакції зростає на 100–300 %. Відповідно до правила Вант-Гоффа, у разі підвищення температури на кожні 10 °С швидкість хімічної реакції зростає в 2–4 рази. Правило справедливе для вузького інтервалу температур: від 0 до 100 °С.

Вплив концентрації реагентів на швидкість хімічної реакції

Хід роботи. У три колби вносять по 5 мл розчину 25 % сульфатної кислоти та по 2,5 мл 0,3 % розчину щавлевої кислоти. У другу і третю колби додають дистильовану воду відповідно 25 мл і 50 мл. У всі три колби доливають по 2 мл 0,6 % розчину перманганату калію та відмічають час знебарвлення розчинів.

У кожній колбі реакція буде відбуватися за схемою:



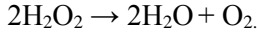
Вплив температури на швидкість хімічних реакцій

Хід роботи. У дві колби наливають по 5 мл розчину 25 % сульфатної кислоти, по 2 мл 0,3 % розчину щавлевої кислоти та по 20 мл дистильованої води. Вміст однієї колби нагрівають до температури 50–70 °С. У кожну колбу доливають по 2 мл 0,6 % розчину перманганату калію та відмічають час знебарвлення розчинів.

Робота 2. Гетерогенний каталіз

За гетерогенного каталізу каталізатор і реагуючі речовини знаходяться в різних агрегатних станах.

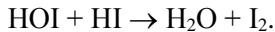
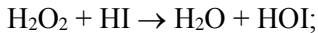
Хід роботи. У 2 пробірки наливають по 2–5 мл 3 % розчину пероксиду гідрогену і 1–2 мл 0,1 н розчину гідроксиду натрію. У першу пробірку додають 0,5 г порошку оксиду марганцю (MnO_2), у другу – 0,5 г активованого вугілля. Пероксид гідрогену розкладається:



До отвору кожної пробірки підносять тліючу соснову скалку і спостерігають за її горінням. Над другою пробіркою інтенсивність горіння буде слабша, оскільки виділений кисень буде адсорбцюватися активованим вугіллям.

Робота 3. Гомогенний каталіз

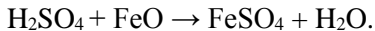
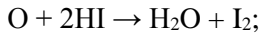
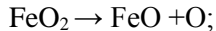
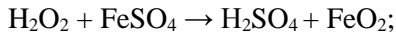
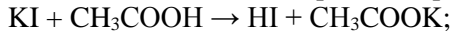
За гомогенного каталізу реагуючі речовини і каталізатор знаходяться в одному агрегатному стані. Прикладом такого каталізу може бути окиснення йодиду гідрогену пероксидом гідрогену в присутності сульфату феруму (II). За звичайних умов такий процес протікає повільно:



Каталізатор, яким для даної реакції є сульфат феруму, прискорює реакцію.

Хід роботи. Беруть дві колби – дослідну і контрольну. У кожную колбу вносять по 50 мл 0,5 % розчину оцтової кислоти, по 1 мл 1 % розчину йодиду калію та по 2–3 краплі крохмалю. У дослідну колбу вносять 1 краплю 5 % розчину FeSO_4 . Потім в обидві колби додають по 1 мл 1 % розчину H_2O_2 .

В обох колбах відбуваються реакції розкладу пероксиду гідрогену, але в присутності каталізатора ці реакції проходять набагато швидше. У дослідній колбі, де є каталізатор, хімізм реакцій такий:



Контрольні питання

1. Що таке хімічна кінетика і що вона вивчає? 2. Що називається швидкістю хімічної реакції і як вона вимірюється? 3. Як швидкість хімічних реакцій залежить від концентрації реагуючих речовин і температури? 4. Охарактеризуйте кінетичне рівняння хімічної реакції. 5. Які вам відомі типи хімічних реакцій? 6. Що таке енергія активізації? 7. Що таке каталіз і каталізатор? 8. Які види каталізу вам відомі? Дайте їм характеристику. 9. Які ви знаєте види каталізу? 10. Що таке гомогенний каталіз? Наведіть приклади гомогенного каталізу. 11. Що таке гетерогенний каталіз? Які особливості гетерогенного каталізу? Наведіть приклади гетерогенного каталізу. 12. Що таке ферментативний каталіз? Які його особливості?

4. ОСМОС І МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ ОСМОТИЧНОГО ТИСКУ

Осмос (грец. *osmos* – тиск, поштовх) – однобічна дифузія розчинника через напівпроникну перегородку (мембрану), що відділяє розчин від чистого розчинника або розчину з меншою концентрацією розчиненої речовини. Через таку перегородку (мембрану) легко проходять молекули розчинника і затримуються молекули розчиненої речовини. Внаслідок осмосу вирівнюються концентрації розчинів по обидва боки мембрани. Напівпроникними перегородками є поверхнева клітинна мембрана, сечовий міхур, слизові оболонки кишково-шлункового тракту, штучні плівки (целофан, пергамент тощо). Свіжоосаджений фероціанід купруму, що має желеподібну структуру, також проявляє властивості таких мембран.

Осмос є наслідком другого начала термодинаміки, відповідно до якого всі спонтанні незворотні процеси в ізольованій системі направлені в бік наближення до рівноважного стану і припиняються, коли настає стан динамічної рівноваги. Осмос наближає систему до рівноваги в результаті вирівнювання концентрації розчиненої речовини по обидва боки мембрани.

Існує два види осмосу – *ендоосмос* і *екзоосмос*. Осмос, направлений в середину обмеженого об'єму рідини напівпроникною перегородкою, називають ендоосмосом, зовні – екзоосмосом.

Тиск, з яким молекули розчинника діють на напівпроникну мембрану, називається *осмотичним*. Він дорівнює надлишковому зовнішньому тиску, який необхідно прикласти з боку розчину, щоб припинити осмос і досягти стану осмотичної рівноваги. Вант-Гофф (1887) встановив, що осмотичний тиск розбавлених розчинів неелектролітів підпорядковується газовим законам і може бути вирахований за рівнянням Менделєєва-Клапейрона:

$$P_{\text{осм}} = c \times R \times T,$$

де c – молярна концентрація розчиненої речовини; R – універсальна газова стала; T – абсолютна температура.

Розбавлені розчини неелектролітів підпорядковуються також закону Авогадро.

Вант-Гофф ці закономірності об'єднав у закон: *розчинена речовина містить у розбавленому розчині стільки молекул, скільки вона б їх мала у газовому стані за тієї самої температури, того ж самого об'єму та тиску газу, який дорівнює осмотичному тиску розчину.*

Осмотичний тиск розчинів електролітів більше осмотичного тиску розчинів неелектролітів тієї ж молярної концентрації. Це пояснюється дисоціацією молекул електроліту на іони, що призводить до збільшення концентрації активних частинок, обумовлюючих величину осмотичного тиску. Для розчинів електролітів вводиться коефіцієнт Вант-Гоффа (i), який показує, у скільки разів осмотичний тиск розчину електроліту ($P_{\text{осм. ел.}}$) більше осмотичного тиску розчину неелектроліту ($P_{\text{осм. неел.}}$) тієї ж концентрації:

$$i = \frac{P_{\text{осм.ел.}}}{P_{\text{осм.неел.}}}$$

Величина i залежить від природи електроліту та його концентрації в розчині. Для розбавлених розчинів електролітів коефіцієнт Вант-Гоффа (i) можна вираховувати за формулою:

$$i = 1 + \alpha (N - 1),$$

де α – ступінь дисоціації; N – кількість іонів, на яку розпадається одна молекула електроліту.

Для розбавлених розчинів електролітів i можна прийняти рівним N , і тоді осмотичний тиск визначають за формулою:

$$P_{\text{осм. ел.}} = i \times c \times R \times T.$$

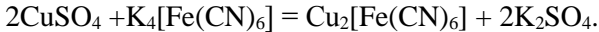
Осмоз і осмотичний тиск відіграють важливу роль у підтримці на фізіологічному рівні концентрацій окремих поживних та інших речовин, розчинених у біологічних рідинах організму. Явище осмосу має місце під час всмоктування поживних речовин у шлунково-кишковому тракті, виділенні продуктів кінцевого обміну нирками, потовими залозами, у процесах секреції травних соків, в утворенні молочними залозами молока тощо. За рахунок осмосу відбувається регуляція водно-мінерального обміну, зокрема розподілення води між тканинами і клітинами. Значення осмотичного тиску необхідно враховувати у ветеринарній і зоотехнічній практиці. Так, у разі внутрішньовенних ін'єкцій осмотичний тиск фізіологічного розчину або розчинів лікарських речовин, що вводять у кров, повинен бути такий самий, як у крові (*ізотонічний*). Це дозволяє запобігти *плазмолізу* (за підвищеного тиску рідини) або розриву еритроцитів, *гемолізу* (за низького тиску рідин, які вводять у кров). Ліки, як правило, готують на основі фізіологічних розчинів, в яких осмотичний тиск такий самий, як у крові тварин. Це враховується під час штучного запліднення, коли сперма зберігається і вводиться в піхву самок в ізотонічних поживних середовищах.

Робота 1. Ендо- та екзоосмос

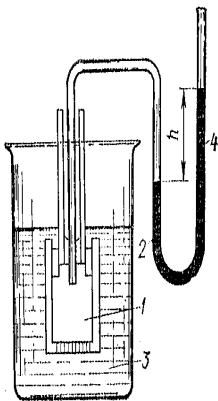
Хід роботи. Беруть два мішечки з напівпроникної перегородки (мембрани), представлені колодієвою плівкою. У перший такий мішечок наливають 10 мл 3 % розчину Йоду в розчині йодиду калію і вміщують у колбу, заповнену 5 % розчином крохмалю. У другий мішечок наливають розчин крохмалю і вміщують у колбу, заповнену розчином Йоду в розчині йодиду калію. Під час зіткнення обох розчинів виникає синє забарвлення. У першому мішечку відбувся екзоосмос, у другому – ендоосмос.

Робота 2. “Штучна клітина” Траубе (ендоосмос)

Вимогам напівпроникної перегородки відповідає мембрана, що утворюється за взаємодії сульфату купрум(II) та гексацианоферату калію:



Хід роботи. Пробірку або циліндр заповнюють 5 % розчином сульфату купрум(II) і опускають у розчин кристалік $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Через декілька хвилин на поверхні кристалу утворюється суцільна плівка $\text{Cu}_2[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, що пропускає частинки води, але затримує частинки сульфатів купрум(II) і калію. У результаті різної концентрації розчинника (води) всередині оболонки і зовні вода проникає через оболонку всередину “штучної клітини”. Оболонка розтягується. Виникає розтягнута порожнина, через деякий час її вирости, які нагадують водорості, розгалужуються та в результаті зростаючого осмотичного тиску рвуться і знову виникають.



Робота 3. Осмометричний метод визначення осмотичного тиску

У практичній роботі виникає необхідність визначення величини осмотичного тиску. Існує ряд методів визначення осмотичного тиску. Найстарішим з них є осмометричний метод. Він був впроваджений Пфедфером (1877), який сконструював простий осмометр. Осмометр можна зробити у звичайних умовах лабораторії (рис. 2).

Рис. 2. **Схема осмометру:** 1 – осмометр; 2 – манометр; 3 – ємність із розчинником; 4 – висота підняття стовпчика ртуті після осмосу.

Хід роботи. Беруть скляну трубку і один отвір герметично закривають напівпроникною перегородкою (мембраною). Нею може бути колодієва плівка, стінка свинячого сечового міхура. У так званий «обмежений простір» наливають 5–10 мл 70 % розчину сахарози підфарбованого червоним конго. Ємність закривають гумовим корком з отвором, в який вмонтована зігнута скляна трубка. «Обмежений простір» поміщають у склянку, заповнену водою і закріплюють до штативу. Утворився простий осмометр. Відбувається осмос. Розчинник (вода) поступово проникає через напівпроникну перегородку в першу ємність, прагнучи вирівняти концентрацію розчинника. Об'єм розчину в «обмеженому просторі» збільшується. Якщо трубку з'єднати з манометром, то можна виміряти осмотичний тиск.

Коли рідина перестає витікати із зігнутої трубки, настає осмотична рівновага. Осмотичний тиск у даному випадку буде дорівнювати гідростатичному, який можна розрахувати за формулою:

$$P = h \times \rho \times g,$$

де h – висота підняття розчину, ρ – густина розчину, g – прискорення сили тяжіння.

Робота 4. Визначення осмотичного тиску плазмолітичним методом

Використання цього методу ґрунтується на порівнянні осмотичного тиску невідомого розчину з осмотичним тиском плазми крові, середовища, в якому в природних умовах в організмі тварин знаходяться еритроцити.

Кожний еритроцит зовні покритий поверхневою плазматичною мембраною. Вона має отвори, що по обидва боки можуть пропускати молекули води, газів, поживних речовин, продуктів метаболізму. Між осмотичним тиском у середині еритроциту і осмотичним тиском у плазмі крові існує рівновага, що дозволяє йому повноцінно виконувати свої функції в життєдіяльності організму, тому і саму плазму відносно еритроцитів та інших клітин крові вважають ізотонічним розчином. Метод, що ґрунтується на визначенні осмотичного тиску в порівнянні з осмотичним тиском плазми крові, називається *плазмолітичним*. Розчини, осмотичний тиск яких однаковий з осмотичним тиском еритроцитів, називають *ізотонічними*. Розчини, які мають менший осмотичний тиск, ніж еритроцити і плазма крові, називаються *гіпотонічними*. У таких умовах еритроцити в результаті ендосмосу всмоктують через поверхневу плазматичну мембрану молекули розчинника і лопаються: настає явище гемо-

лізу, гемоглобін виходить в навколишнє середовище, забарвлюючи його в яскраво-червоний колір. Розчини, в яких осмотичний тиск більший, ніж в еритроцитах, називають *гіпертонічними*. У цих умовах еритроцити віддають в навколишнє середовище розчинник (воду), зморщуються і осідають на дно посудини. Таке явище називають *плазмолізом*.

Плазмолітичний метод простий і легкодоступний. Він дозволяє швидко, без ніяких приладів, визначити осмотичний тиск будь-якого розчину порівняно з осмотичним тиском плазми крові (6,8–7,3 атм, або 686,8–737,3 Па).

Хід роботи. Беруть три пробірки. У першу пробірку наливають 2 мл 0,2 % розчину хлориду натрію, в другу – 2 мл 0,85 % розчину хлориду натрію (його концентрація відповідає концентрації солі в плазмі крові, тобто він є ізотонічним розчином), у третю – 4 % розчину хлориду натрію. У кожен пробірку вносять по 2 краплі свіжої крові та струшують. Через півгодини спостерігають за результатами. У першій пробірці кров стає «лакова» (гемоліз), у третій пробірці – на дні спостерігається тонкий наліт еритроцитів (плазмоліз).

Робота 5. Визначення осмотичного тиску розчину кріоскопічним методом

Осмотичний тиск $P_{осм}$ визначають за рівнянням Менделєєва-Клапейрона:

$$P_{осм} = c \times R \times T.$$

У багатьох випадках важко визначити концентрацію розчинів. Цей метод ґрунтується на визначенні пониження точки замерзання розчину порівняно з температурою замерзання чистого розчинника.

Різниця між температурою замерзання розчинника і розчину називається *депресією* (Δt). Таку залежність можна виразити рівнянням:

$$\Delta t = t_{p-ка} - t_{p-ну}.$$

Відповідно до закону Рауля, температура замерзання розчину неелектроліту прямо пропорційна концентрації розчиненої речовини:

$$\Delta t = K \times m,$$

де K – депресія розчину; m – кількість молів розчиненої речовини (речовин) у 1000 мл розчинника (молярна концентрація).

Молярна концентрація розведених розчинів (за законом Рауля) практично відповідає молярній концентрації (кількості молей розчиненої речовини чи речовини в 1 л розчину), тобто $c = m$.

Коефіцієнт пропорційності, або криоскопічна стала, для деяких розчинників такий: вода – 1,86; бензен – 5,1; нафталін – 6,9; нітробензен – 6,9; фенол – 7,3. Враховуючи те, що $\Delta t = K \times c$, то $c = \Delta t / K$, осмотичний тиск можна визначити за формулою:

$$P_{\text{осм}} = \frac{\Delta t \times R \times T}{K}$$

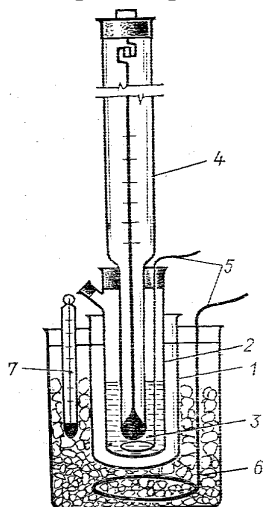
Хід роботи. Для визначення температур замерзання розчину і розчинника використовують апарат Бекмана або криоскоп (рис. 3), основною робочою деталлю якого є термометр Бекмана. Шкала термометра градуйована на $5-6^\circ$, ціна кожної поділки шкали – $0,01^\circ$. За допомогою лупи, крім сотого значення, можна приблизно визначити тисячні частини градуса.

Робота складається з двох етапів: визначення температур замерзання розчинника та розчину.

Під час монтування апарату Бекмана скляний циліндр заповнюють дрібнозернистим льодом або снігом (75 % об'єму), додаючи певну кількість хлориду натрію або води, щоб температура суміші знаходилась у межах $3-5^\circ$. У внутрішню пробірку наливають розчинник, закривають корком, в який вмонтований термометр Бекмана, і переносять у широкую пробірку, що виконує функції кожуха. Зібраний прилад поміщають у циліндр з охолоджуючою сумішшю. Поступово охолоджуючи розчинник (це досягається перемішуванням великою мішалкою охолоджуючої суміші та малою мішалкою перемішуванням розчинника), визначають його температуру замерзання. Потім пробірка з розчинником розморожується та її вміст виливається.

На другому етапі аналогічно визначається температура замерзання розчину. Врахувавши депресію, визначають осмотичний тиск.

Рис. 3. Апарат Бекмана: 1 – зовнішня пробірка; 2 – внутрішня пробірка; 3 – дослідний розчин; 4 – термометр Бекмана; 5 – мішалка; 6 – охолоджуюча суміш; 7 – термометр.



Контрольні питання

1. Що таке осмос і які існують види осмосу? 2. Що таке напівпроникна мембрана і які вам відомі природні та штучні напівпроникні мембрани? 3. Яке значення має осмос у житті рослинного і тваринного організмів? 4. У чому суть і які причини осмотичного тиску? 5. Яким законам підпорядковується осмотичний тиск? Дайте визначення і математичне обґрунтування цих законів. 6. У чому суть визначення осмотичного тиску осмометричним методом? Охарактеризуйте цей метод. 7. У чому суть визначення осмотичного тиску плазмолітичним методом? Що таке гемоліз, плазмоліз і тургор? 8. Які розчини називають ізотонічними, гіпотонічними і гіпертонічними? Наведіть приклади використання таких розчинів у ветеринарній і зоотехнічній практиці та побуті. 9. Дайте характеристику криоскопічному методу визначення осмотичного тиску і законів, на яких він ґрунтується.

5. РЕАКЦІЯ СЕРЕДОВИЩА І МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ВОДНЕВИХ ІОНІВ

Вода – внутрішнє середовище живих організмів, де відбуваються всі хімічні реакції, що обумовлюють їх існування. Вода складає 75 % біомаси Землі та 65,9 % загальної маси тваринного організму. У складі окремих видів тваринних організмів міститься до 98–99 % води (наприклад, у медуз). Вміст води у тканинах тваринного організму різний. Так, у крові та лімфі вміст води досягає 92–98 %, а в кістковій тканині – 16–46 %. Жива клітина у середньому містить 85 % води.

Для води, як середовища, де відбуваються головні процеси життєдіяльності, характерна нейтральна реакція середовища. У різних органах, тканинах і навіть частинах клітини значення такого середовища різне. Наприклад, слина у дорослих тварин характеризується слаболужною реакцією, шлунковий сік – дуже кислою, секрет кишкових залоз – лужною. Для клінічно здорових організмів характерний *гомеостаз* (грец. *homiois* – подібний і *stasis* – стан) – відносна динамічна сталість внутрішнього середовища (крові, лімфи, тканинної рідини) і стійкість головних фізіологічних функцій (кровообігу, дихання, терморегуляції, обміну речовин тощо). Реакція середовища крові є важливим показником гомеостазу. Зрушення такої реакції в кислий бік називається *ацидозом*, у лужний – *алкалозом*. Обидва ці стани для організму є небажаними та загрожують порушенням головних функцій і навіть загибеллю. У практичній роботі ветеринарного лікаря і технолога виробництва досить часто виникає необхідність визначити реакцію середовища у біологічних рідинах, сумішах поживних речовин, продуктах рослинництва та

тваринництва (молоці, молочних продуктах, м'ясі), лікувальних засобах тощо.

Вода як середовище, в якому протікає більшість хімічних реакцій обміну речовин, є слабким електролітом. Вона дисоціює на іони:



Для води, відповідно до закону діючих мас, існує константа дисоціації:

$$K = \frac{[\text{H}^+] \times [\text{OH}^-]}{\text{H}_2\text{O}}.$$

Величина константи дисоціації води за 25 °С дорівнює $1,8 \times 10^{-16}$. Методом електропровідності встановлено, що концентрація іонів Гідрогену у воді за температури 22 °С дорівнює 10^{-7} моль-іон/л.

У зв'язку з тим, що у воді знаходиться надзвичайно мала кількість дисоційованих молекул, концентрацію недисоційованих молекул води приймають за константу. Якщо це виразити в молях, то на 1 л води одержують таке її число:

$$[\text{H}_2\text{O}] = \frac{1000}{18} = 55,56 \text{ моль/л.}$$

Якщо цю величину ввести у попереднє рівняння, то матимемо такий його вираз:

$$[\text{H}^+] \times [\text{OH}^-] = 55,56 \times K.$$

Коли у виведене вище рівняння поставити цифрове значення константи дисоціації води, вираз добутку вільних іонів $[\text{H}^+]$ і $[\text{OH}^-]$ набуде такого вигляду:

$$[\text{H}^+] \times [\text{OH}^-] = 55,56 \times 1,8 \times 10^{-16} = 10^{-14}.$$

Наведене вище рівняння називають *іонним добутком води*, яке за постійної температури є величиною сталою. З рівняння випливає, що в добутку, який дорівнює певному числу, жодний із множників не може дорівнювати нулю. Таким чином, у будь-якому водному розчині основ, кислот або солей присутні іони H^+ та іони OH^- , а величина добутку їх концентрацій залишається величиною сталою. За теорією електролітичної дисоціації, носіями кислотних властивостей є іони H^+ , лужних – іони OH^- . У нейтральному водному розчині концентрація іонів Гідрогену і гідроксилу є рівною, тобто $c\text{H}^+ = c\text{OH}^-$, або $[\text{H}^+] = [\text{OH}^-] = 10^{-7}$.

Таким чином, у кислих розчинах концентрація іонів Гідрогену буде більша, ніж 10^{-7} (10^{-6} ; 10^{-5} і т.д.), а у лужних – менша ніж 10^{-7}

(10^{-8} ; 10^{-9} і т.д.). Концентрації іонів Гідрогену і гідроксилу – взаємно пов’язані величини. Знаючи концентрацію іонів Гідрогену, можна визначити у розчині концентрацію іонів гідроксилу і навпаки. Наприклад, маємо 0,01 н розчин хлоридної кислоти. Концентрація іонів Гідрогену тут дорівнює 10^{-2} моль-іонів/л. Для визначення концентрації іонів гідроксилу користуються формулою іонного добутку води:

$$[\text{H}^+] \times [\text{OH}^-] = 10^{-14};$$
$$[\text{OH}^-] = 10^{-14} / [\text{H}^+] = 10^{-12}.$$

Концентрація іонів Гідрогену у розчинах називається *водневим числом*, гідроксильних – *гідроксильним числом*. Водневе або гідроксильне число – надзвичайно малі величини і незручні для практичного використання. С. Серенсен (1909 р.) ввів поняття *водневий показник* (рН). Величина водневого показника дорівнює від’ємному значенню десяткового логарифма концентрації іонів Гідрогену:

$$\text{pH} = -\lg [\text{H}^+].$$

Літера “р” позначає датське слово “potenz” – показник, літера “Н” – символ Гідрогену. Для нейтральних розчинів, у тому числі й для дистильованої води, рН 7 (за температури 25 °С), для кислих – рН < 7, для лужних – рН > 7.

За логарифмування іонного добутку води одержують числа, зручні для практичного користування.

Водневий і гідроксильний показники є спряженими величинами. Наприклад, рН розчину дорівнює 5. Необхідно визначити числове значення рОН. Використовують формулу: рН + рОН = 14.

У практичній роботі здебільшого виникає потреба більш конкретно диференціювати реакцію середовища, ніж його характеристика – “нейтральне”, “кисле” і “лужне”. За допомогою сН і рН значення різних середовищ позначають так: сильнокисле (сН від 10^0 до 10^{-2} , або рН від 0 до 2), кисле (сН від 10^{-2} до 10^{-5} , або рН від 2 до 5), слабокисле (сН від 10^{-5} до 10^{-7} , або рН від 5 до 7), нейтральне (сН 10^{-7} , або рН 7), слаболужне (сН від 10^{-7} до 10^{-9} , або рН від 7 до 9), лужне (сН від 10^{-9} до 10^{-12} , або рН від 9 до 12) і сильнолужне (сН від 10^{-12} до 10^{-14} , або рН від 12 до 14).

Різні біологічні рідини характеризуються певною реакцією середовища. Зокрема, рН шлункового соку у людей становить 1,5–

2,0; у великої рогатої худоби – 2,17–3,14; крові у людини – 7,36, у великої рогатої худоби – 7,36–7,50.

Величина рН, як міра кислотності розчинів і біологічних рідин, застосовується в усіх галузях хімії, біології, медицини, ветеринарії, тваринництва, технології.

Робота 1. Визначення загальної, активної і потенційної кислотності

Загальна кислотність розчинів – кількість молей лугу, яка витрачається на титрування 1 л дослідного розчину. Вона характеризує кількість кислотореагуючих речовин, що містяться у розчині. Еквівалентні за концентрацією розчини різних кислот мають однакову загальну кислотність. Наприклад 1 % ацетатна і 1 % хлоридна кислоти мають однакову загальну кислотність. Загальна кислотність складається з активної і потенційної кислотностей.

Активна кислотність визначається концентрацією іонів Гідрогену у розчині. *Потенційна кислотність* характеризується вмістом у певному об'ємі кислоти, молекули якої знаходяться у недисоційованому стані. Потенційна кислотність – це різниця між загальною і активною кислотностями.

Хід роботи. В одну колбу об'ємом 50–100 мл наливають 5 мл 0,1 н розчину хлоридної кислоти, у другу – 5 мл 0,1 н розчину ацетатної кислоти. У кожну колбу додають по 2–3 краплі розчину фенолфталеїну і титрують 0,1 н розчином гідроксиду натрію до появи рожевого забарвлення. Роботу повторюють і для розрахунків використовують середньоарифметичне значення кількості затраченого на титрування розчину гідроксиду натрію.

Для розрахунків загальної кислотності користуються формулою:

$$X = \frac{a \times 1000 \times 0,1}{5},$$

де а – кількість лугу, витрачена на титрування, мл; 1000 – перерахунок на 1 л; 0,1 – нормальність взятих розчинів; 5 – об'єм дослідного розчину, мл.

Цифрові значення активної кислотності одержують із результатів робіт 2 і 3. За різницею між загальною і активною кислотностями отримують потенційну кислотність для розчинів обох кислот.

Робота 2. Колориметричний метод визначення рН

Колориметричний (лат. *color* – колір + грец. *metrio* – міряю) метод визначення рН ґрунтується на здатності деяких сполук, що ви-

користуються як індикатори, змінювати своє забарвлення залежно від рН розчинів.

Індикаторами називаються речовини, які за своїми властивостями є слабкими електролітами, ступінь дисоціації їх молекул залежить від концентрації у розчині водневих іонів (сН), мають забарвлені іони (аніони чи катіони), використовуються, крім визначення рН, для встановлення кінцевої точки під час титрування або величини окисно-відновного потенціалу.

Розрізняють кислотно-основні (наприклад, лакмус, фенолфталеїн), окисно-відновні (метиленовий синій), комплексометричні, хемілюмінесцентні та адсорбційні індикатори. Найбільше використання мають індикатори перших двох груп. За забарвленням індикатори класифікують на дві групи – одно- і двокольорові. *Однокольорові* індикатори мають лише одне забарвлення у кислому або лужному середовищі. Прикладом такого індикатора є фенолфталеїн, який не має кольору в кислому середовищі та набуває малинового забарвлення у лужному. Індикатори, що мають у лужному середовищі одне забарвлення, а у кислому інше, називають *двокольоровими*. До таких індикаторів належать метилоранж і лакмус. Метилоранж у недисоційованому стані має оранжеве забарвлення. У кислому середовищі його молекули, як слабкі основи, дисоціюють на іони. Катіони метилоранжу обумовлюють червоне забарвлення різної інтенсивності у середовищі за рН від 3,1 до 4,4. Крім цього, у лабораторній практиці використовують універсальні та індивідуальні індикатори. За допомогою універсального індикатора, до складу якого входить набір кількох індикаторів, проводять наближене визначення рН розчинів. Індивідуальний індикатор дозволяє більш надійно і точно визначити рН, оскільки у кожного такого індикатора існує певний інтервал зміни забарвлення (*зона виражу індикатора*) залежно від сН. Використання індикаторів для визначення рН розчинів лежить в основі колориметричного методу визначення рН. Для визначення рН цим методом найчастіше користуються приладом Міхаеліса.

Визначення рН дослідного розчину універсальним індикатором

Універсальний індикатор являє собою суміш кількох індикаторів (метиленового червоного, бромтимолового синього і фенолфта-

леїну). Зони віражу таких індикаторів є перехідними за рН від 4,0 до 10,5.

Хід роботи. У фарфорову чашку (палетку) вносять 2–3 мл дослідного розчину і додають декілька крапель універсального індикатора. Суміш перемішують скляною паличкою. Утворене забарвлення порівнюють з еталонами кольорової шкали, яка входить до набору приладу. У разі збігу кольорів грубо визначають рН ($\pm 0,5$).

Визначення рН дослідного розчину за допомогою індивідуального індикатора

Для більш точного визначення рН використовують індивідуальний індикатор, у зону віражу якого входить попередньо визначене рН. Метод дозволяє визначити рН дослідного розчину з точністю до $\pm 0,1$.

Хід роботи. У пробірку наливають 6 мл дослідного розчину і додають 1 мл вибраного індикатора. Суміш перемішують скляною паличкою і залишають на 2–3 хв. Виникає рівномірне забарвлення. Пробірку поміщають у середнє гніздо компаратора і підбирають еталон (запаюну пробірку із забарвленим розчином), що має однакове забарвлення з дослідним розчином. За показником еталону і визначають рН. Під час визначення рН потрібно тримати компаратор перед білим фоном, що дає контрастність забарвлення. Коли забарвлення дослідної рідини знаходиться між забарвленням двох поряд розміщених еталонів, то величина рН має середнє значення. Наприклад, колір розчину схожий до кольору еталонів зі значеннями 5,6 та 5,8. Значення рН буде 5,7.

Визначення рН слабозабарвлених і каламутних розчинів

У лабораторній та клінічній практиці часто доводиться визначати рН рідин, що мають забарвлення або є каламутними. Такими рідинами є сеча, слина, шлунковий сік, секрет підшлункової залози, жовч. Їх рН визначають так, як і прозорих рідин, допускаючи модифікації, направлені на компенсування забарвлення або каламутності.

Хід роботи. У пробірку наливають 6 мл дослідної рідини, додають 1 мл вибраного індикатора, перемішують скляною паличкою і через 2–3 хв поміщають у середнє гніздо компаратора. По обидва боки від пробірки з дослідною рідиною розміщують еталони. Для усунення похибки, зумовленої наявністю каламутності, проти кожного еталону поміщають пробірку із 7 мл дослідної рідини без ін-

дикатора, а проти середнього гнізда – пробірку із 7 мл дистильованої води. Визначають рН як у попередній роботі.

Робота 3. Електрометричний метод визначення рН

Колориметричний метод дозволяє визначити рН різних розчинів і біологічних рідин з точністю до $\pm 0,1$. Для більш точного визначення рН застосовують електрометричні або потенціометричні методи, за допомогою яких можна визначити рН різних рідин, у т.ч. і забарвлених, із точністю до $\pm 0,01$.



Рис. 4. рН-метр.

Електрометричний або потенціометричний метод визначення рН ґрунтується на вимірі електрорушійної сили, що виникає внаслідок різниці потенціалів між електродами визначення та порівняння, які поміщаються у розчин.

Електродами порівняння найчастіше є скляні електроди, а електродами визначення – каломельний і хлоросрібний стандартні електроди, з відомим значенням електродного потенціалу. Такі електроди є складовими частинами приладів для визначення рН – потенціометра або рН-метра. Для визначення рН розчинів у лабораторіях використовують рН-метри різних марок (рис. 4). Під час роботи з рН-метром керуються відповідною інструкцією, що додається до приладу заводом-виробником. Загальним правилом для роботи з кожним рН-метром є те, що перед вимірюванням рН розчину або біологічної рідини прилад прогрівають 15–20 хв. Перед роботою прилад калібрують, використовуючи для цього стандартні буферні розчини.

Хід роботи. У склянку наливають розчин з невідомим значенням рН і занурюють електроди рН-метра. Знімають показання рН розчину. Після роботи електроди старанно промивають дистильованою водою і занурюють у склянку з нею. Воду слід міняти 7–10 разів. Після відмивання електродів можна приступати до вимірювання рН інших розчинів. Метод точний. Дозволяє визначити рН розчинів з точністю до $\pm 0,001$, у т.ч. забарвлених і каламутних.

Контрольні питання

1. Що таке реакція середовища і як вона визначається? 2. Що таке іонний добуток води? 3. Визначте c_{OH} , коли відомо, що c_{H} розчину дорівнює 10^{-3} . 4. Ви-

значте сН, коли відомо, що сОН розчину дорівнює 10^{-9} . 5. Що таке сН і як з його допомогою позначають різну реакцію середовища? 6. Що таке рН і як з його допомогою позначається реакція різних середовищ? 7. Дайте визначення загальної, активної і потенційної кислотності. Наведіть приклади. Яке значення у клінічній практиці має визначення цих кислотностей? 8. Що таке індикатори? Яка їх хімічна природа? Як вони класифікуються? Наведіть приклади різних індикаторів. 9. Що таке зони віражу індикатора? 10. У чому полягає суть колориметричного методу визначення рН? 11. Яке значення має визначення рН розчинів у хімії, технології, медицині, ветеринарії і тваринництві? 12. Напишіть шкали різних значень сН і рН і покажіть зв'язок між ними.

6. БУФЕРНІ РОЗЧИНИ

Буферними розчинами називають розчини, що містять у своєму складі буферні системи. Буферні системи – це суміші слабких кислот та їх солей, утворених із лужними металами (наприклад, CH_3COOH і CH_3COONa), або слабких кислот та їх солей, утворених із сильними кислотами (наприклад, NH_4OH і NH_4Cl). Розчинником для буферних систем найчастіше є вода. Такі розчини підтримують певну концентрацію іонів водню (сН) у разі додавання до них сильних кислот, лугів, а також розбавлення та концентрування.

Розрізняють природні та штучні буферні розчини. Прикладом штучних буферних розчинів є розчини ацетатної буферної системи (ацетатна кислота і ацетат натрію), або амонійної буферної системи (гідроксид амонію і хлорид амонію). Отже буферні розчини є водними розчинами добре дисоційованої солі кислоти та слабкої кислоти, або розчини слабкої основи і добре дисоційованої солі цієї основи. Природними буферними розчинами можуть бути різні біологічні рідини – кров, лімфа, ліквор, молоко тощо. Основними буферними системами крові є гемоглобінова і оксигемоглобінова (до 81 % загальної маси), білкова (10 %), гідроксокарбонатна (7 %), фосфатна (1 %) і кислотна (близько 1 %). З їх допомогою організм підтримує рН крові на певному рівні, не допускаючи зрушень у кислоту (*ацидоз*) або лужну (*алкалоз*) сторони.

Природні буферні системи знаходяться у водах світового океану, в ґрунтах, в організмах рослин, тварин і людини, де виконують функцію регуляторів, підтримуючи активну реакцію середовища на певних рівнях. Штучні буферні розчини готують у лабораторіях і використовують для різноманітних цілей: визначення рН буферним методом, створення оптимальних умов для ферментативного каталізу, приготування кровозамінників, середовища для багатьох лі-

карських засобів, розчинників для сперми у разі штучного запліднення самок, для різних видів хімічного аналізу під час фізіологічних, хімічних, біохімічних, гістохімічних, електронно-мікроскопічних та інших досліджень.

Робота 1. Приготування ацетатних буферних розчинів із заданим значенням рН

Існує ряд прописів приготування буферних розчинів із різним значенням рН – Уолпола, Спангофа, Мак-Ільвейна, Міхаеліса, Серенсена, Берстона, Мак-Мануса і Мауера. Змінюючи кількісні співвідношення кислоти та її солі в одному і тому ж об'ємі розчину, можна одержати розчини з різними значеннями рН. Для приготування буферних розчинів необхідно використовувати дистильовану воду. Хімічні реактиви повинні мати марку х.ч. Особливу увагу в розрахунках слід звернути на молекулярну масу і наявність у реактивах кристалізаційної води.

Хід роботи. У 6 пробірок наливають 0,1 н розчин ацетатної кислоти і 0,1 н розчин ацетату натрію у кількостях, як вказано у табл. 2:

Таблиця 2

	Пробірки					
	1	2	3	4	5	6
Кількість кислоти, мл	4,5	4,0	2,5	1,5	1,0	0,5
Кількість солі, мл	0,6	1,0	2,5	3,5	4,0	4,5
Значення рН	3,76	4,05	4,53	4,99	5,20	5,57

У кожену пробірку додають по 3 краплі індикатора метилового червоного. Залежно від рН буферного розчину в пробірках виникає забарвлення різного кольору. Надалі цей ряд пробірок слугує кольоровою шкалою для визначення рН невідомого розчину. При цьому з'являється забарвлення, яке порівнюють із забарвленням у пробірках кольорової шкали. Відповідність кольорів свідчить про однакову концентрацію водневих іонів.

Робота 2. Буферний метод визначення концентрації водневих іонів

Метод ґрунтується на порівнянні кольору досліджуваного розчину, в який додають певний індикатор, із кольором розчину в пробірці-еталоні, що містить буферний розчин з відповідним значенням рН з тим же самим індикатором.

Хід роботи. До 5 мл невідомого розчину додають 2–3 краплі індикатора метилового червоного. Виникає забарвлення, яке порівнюють із кольоровою шкалою, приготовленою у попередній роботі. Відповідність кольору в обох пробірках свідчить про однакову концентрацію в них водневих іонів.

Робота 3. Вплив розведення на рН буферного розчину

У лабораторній практиці нерідко виникає необхідність виявляти концентрацію водневих іонів у розведених розчинах, а також у каламутних і забарвлених. Властивість буферних розчинів не змінювати рН під час розбавлення використовується для визначення реакції середовища сечі. Сеча – біологічна рідина, яка містить всі продукти обміну речовин. За показниками лабораторних досліджень сечі аналізують загальний стан організму тварин, захворювання окремих систем та органів. Сеча має колір від світло-жовтого до темно-коричневого. Визначити рН нерозведеної сечі важко і у ряді випадків неможливо колориметричним методом. У разі розведення сечі в 20–25 разів зникає забарвлення і каламутність, що дозволяє визначити рН колориметричним методом.

Розведення буферних розчинів у 10–20 разів майже не відбивається на значенні їх рН і тільки дещо підвищуються лише після со- того знаку, що не має істотного значення в лабораторній практиці, де розбавлення буферних розчинів у 100 і 1000 разів використовується рідко.

Хід роботи. У три пробірки наливають по 5 мл одного з буферних розчинів, приготовлених раніше у попередній роботі (наприклад, у пробірці № 4). Розчин готується з розчинів кислоти і солі у відповідних кількісних співвідношеннях. Розчин першої пробірки розбавляють дистильованою водою в два рази, другої – у три рази, третьої – залишають нерозбавленим. У кожен пробірку наливають по 5 крапель метилового червоного. В усіх розчинах забарвлення не змінюється, оскільки буферні розчини підтримують рН на постійному рівні.

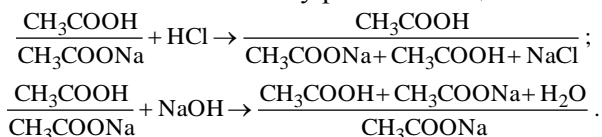
Робота 4. Вплив кислот і лугів на рН буферних розчинів

Активна кислотність або основність буферних розчинів майже не змінюється під час додавання до них невеликих кількостей сильної кислоти чи лугу. Ця властивість має винятково важливе значення для організму тварин або людини, оскільки у ході їх житте-

діяльності у них надходять або утворюються значні кількості кислих або основних продуктів метаболізму, а реакція середовища залишається сталою, створюючи необхідний гомеостаз (наприклад, рН крові людини становить 7,36). Так, в організмі людини щодоби утворюється в перерахунку на 1 л розчин хлоридної кислоти 20–30 л кислоти. Наявність в організмі буферних систем не допускає розвитку ацидозу.

Хід роботи. У пробірку, що містить буферний розчин із рН 5,57 (див. роботу 1), вносять 2–3 краплі індикатора метилового червоного. Додають краплями 0,1 н розчин хлоридної кислоти. Колір розчину практично не змінюється (до певної межі). У другу пробірку, що містить 5 мл буферного розчину з рН 3,76, вносять 2–3 краплі метилового червоного і додають краплями 0,1 н розчин гідроксиду натрію. Колір розчину практично не змінюється (до певної межі).

Під час додавання кислоти або лугу один із компонентів буферного розчину буде зв'язувати іони H^+ чи OH^- у малодисоційовані сполуки та викликати утворення речовин, збільшення концентрації яких суттєво не впливає на величину рН. Хімізм цих такий:



Реакція середовища буде залишатися практично без змін, поки у розчині будуть знаходитися всі компоненти буферної системи.

Робота 5. Визначення буферної ємності розчинів

Для характеристики буферних розчинів введено величину – буферну ємність. *Буферною ємністю* називають еквівалентну масу сильної кислоти або лугу, виражену в молях, яку необхідно додати до 1 л буферного розчину, щоб змінити рН на ± 1 .

Під час визначення буферної ємності до 1 л розчину додають певну кількість кислоти або лугу (кількість розчину можна зменшити в 10 і 100 разів, враховуючи це під час розрахунків). Для визначення буферної ємності за лугом чи кислотою використовують формулу:

$$B = \frac{E \times 100}{|pH_1 - pH_0|},$$

де B – буферна ємність; E – еквівалентна маса лугу або кислоти; pH_0 – початковий водневий показник; pH_1 – кінцевий водневий показник.

Буферна ємність зростає зі збільшенням концентрації складових частин буферної суміші, а також з наближенням відношення їх концентрацій до одиниці. Буферна дія системи припиняється в тому випадку, коли один з її компонентів витрачається на 90 %.

Хід роботи. Беруть дві колби. У першу колбу наливають 10 мл ацетатного буферного розчину з рН 5, у другу – 10 мл 0,00001 н розчину HCl з рН 5 (тут вся хлоридна кислота знаходиться в дисоційованому стані). В обидві пробірки додають по 3 краплі індикатора метилового червоного. Виникає забарвлення, однакове для обох колб. Вміст колб титрують 0,1 н розчином гідроксиду натрію до появи лимонно-жовтого забарвлення (рН 6). Вираховується різниця в кількості лугу, що витратили на титрування обох розчинів, а також буферна ємність першого і другого розчинів.

Після визначення буферної ємності кожного розчину вираховувати, у скільки разів буферна ємність буферного розчину більше буферної ємності розчину хлоридної кислоти.

Робота 6. Визначення буферної ємності сироватки крові

Буферна ємність сироватки крові в основному обумовлена наявністю трьох буферних систем – білкової, бікарбонатної і фосфатної.

Хід роботи. У дві колби наливають по 5 мл сироватки крові (рН 7,4). У першу колбу додають 2 краплі індикатора (фенолфталеїну) і титрують 0,1 н розчином їдкого натрію до появи слабого рожевого забарвлення (рН 8,4). У другу колбу додають 2 краплі індикатора метилового оранжевого і титрують 0,1 н розчином хлоридної кислоти до появи оранжево-рожевого забарвлення (рН 3,4). Вираховують буферну ємність за формулою:

$$B = \frac{N \times a \times b \times 1000}{|pH_1 - pH_0|},$$

де B – буферна ємність; N – нормальність кислоти або лугу; a – кількість кислоти або лугу, що витратили на титрування, мл; pH₀ – водневий показник рідини до титрування; pH₁ – водневий показник рідини після титрування; b – кількість рідини, взятої для дослідження, мл.

Контрольні питання

1. Дайте визначення термінів "буферна система" і "буферний розчин". 2. Як класифікуються буферні розчини? Наведіть приклади окремих видів буферних систем. 3. Охарактеризуйте особливості внутрішнього складу і механізму дії ацетатної буферної системи. 4. Як приготувати розчин із заданим значенням рН? 5. Які вам відомі властивості буферних систем? 6. Як можна визначити буферну

емність розчинів і біологічних рідин за лугом і кислотою? 7. Як можна визначити рН невідомого розчину буферним методом? 8. Яке значення буферних систем у лабораторній практиці та у життєдіяльності рослин, тварин і людини? 9. Які вам відомі буферні системи крові? 10. В якому кількісному співвідношенні треба змішати 0,5 н розчин ацетатної кислоти і ацетату натрію, щоб одержати буферний розчин із рН 5. Константа дисоціації ацетатної кислоти – $1,75 \times 10^{-5}$.

II. КОЛОЇДНА ХІМІЯ

1. ОДЕРЖАННЯ КОЛОЇДНИХ РОЗЧИНІВ

Колоїдна (грец. *kolla* – клей і *eidos* – вид) *хімія* – наука, яка вивчає одержання, склад, внутрішню будову, фізичні та хімічні властивості дисперсних систем. Дисперсні системи (лат. *dispersio* – розсіяний, розсипаний) – фізико-хімічні системи, які складаються з розділених частинок (дисперсна фаза), розміщених в навколишньому (дисперсному) середовищі: газі, рідині чи твердому тілі. Розміри частинок дисперсної фази (кристаликів, крапельок, бульбашок) називають *ступенем дисперсності*, величина якої зворотна розміру частинок. Крім цього, дисперсні частинки розрізняють і за іншими ознаками, найчастіше за агрегатним станом дисперсної фази і дисперсного середовища.

За розміром частинок дисперсної фази дисперсні системи класифікують на молекулярно-іонні (менше 1 нм), колоїдні (1–100 нм), грубодисперсні (більше 100 нм).

Залежно від агрегатного стану дисперсійного середовища і дисперсної фази можливі різні дисперсні системи (табл. 3).

Таблиця 3 – **Класифікація дисперсних систем за агрегатним станом фаз**

Дисперсійне середовище	Дисперсна фаза		
	Газ	Рідина	Тверде тіло
Газове	Суміш газів	Туман	Пил, дим
Рідке	Піни	Емульсії	Суспензії
Тверде	Тверді тіла з газовими включеннями (пемза)	Тверді тіла з рідкими включеннями (перли)	Тверді золі (рубінове скло)

Ступінь дисперсності дозволяє розрізнити гомогенні та гетерогенні дисперсні системи. До гомогенних дисперсних систем належать газові суміші, рідкі та тверді речовини, де частинки дисперсної фази подрібнені до молекул, атомів та іонів. При цьому між частинками дисперсної фази і дисперсного середовища відсутня поверх-

ня розділу. Прикладом таких дисперсних систем можуть бути розчини глюкози у воді (молекулярно-дисперсна система) і кухонної солі у воді (іонно-дисперсна система). Вони є справжніми розчинами, де розмір частинок дисперсної фази не перебільшує 1 нм.

У зв'язку з тим, що об'єктом колоїдної хімії є вивчення дисперсних систем, її нерідко тепер називають *дисперсологією*. Термін "колоїдна хімія" є традиційним і ним користуються вже майже 150 років. З усіх дисперсних систем у житті живих організмів найбільше значення мають колоїдні дисперсні системи, або колоїдні розчини. Як відомо, хімічною основою існування живого організму є обмін у ньому білків. Білки у середньому складають 18–21 % загальної сирої маси організму і до 45–50 % його сухої маси. Більшість білків розчиняються у воді, яка у середньому складає 65 % організму тварин, утворюючи колоїдні розчини. Молекулярно-дисперсні та іонно-дисперсні системи фактично є справжніми розчинами їх вивчають у курсі фізичної хімії. Колоїдні і грубодисперсні системи (суспензії та емульсії) є об'єктами вивчення колоїдної хімії. Розрізняють дві групи колоїдних розчинів: рідкі (золі) і драгелеподібні (гелі). Всі процеси життєдіяльності, що відбуваються у живих організмах, пов'язані з колоїдним станом матерії. У кожній живій клітині біополімери (білки, нуклеїнові кислоти, глікозаміноглікани, глікоген тощо) знаходяться у вигляді дисперсних систем і, перш за все, у колоїдному стані.

Колоїдні розчини широко поширені і в неживій природі. Ними є нафта, ґрунти, тканини, каучук, пластичні маси, штучні волокна. Багато харчових продуктів є колоїдними розчинами: молоко, кисляк, хліб, м'ясо тощо. Багато лікарських препаратів (сироватки, вакцини, антигени) є колоїдними розчинами. Колоїдними розчинами є фарби.

За природою колоїдні розчини класифікують на природні (наприклад, розчини білків, нуклеїнових кислот, полісахаридів) і штучні (наприклад, водні розчини Сульфурю, каніфолію тощо). Всі способи одержання колоїдних розчинів ділять на три групи: дисперсні, конденсаційні та пептизація. *Диспергування* – тонке подрібнення твердих чи рідких тіл до розміру колоїдних частинок. Подрібнення можна проводити механічно, за допомогою ультразвукових коливань і електричним способом. Розрізняють спонтанне і примусове диспергування. У першому випадку речовина, з якої утворюється

дисперсна фаза, спонтанно взаємодіє з молекулами розчинника, відбувається руйнування сил міжмолекулярного зчеплення частинок дисперсної фази і виникають частинки колоїдного розчину (1–100 нм), що й створює дисперсну систему. Примусове диспергування проводиться за допомогою спеціальних приладів – колоїдних і кулькових млинів, ультразвукових установок тощо. Щоб запобігти агрегації частинок дисперсної фази, у розчинник додатково вводять стабілізуючу речовину – стабілізатор, яка адсорбується частинками, сприяє їх змочуванню.

Під час одержання колоїдних розчинів методом конденсації молекули та іони речовин, які мають розмір менше 1 нм, під впливом різних факторів ущільнюються до розмірів колоїдних частинок (1–100 нм). Розрізняють методи фізичної і хімічної конденсації. У першому випадку для одержання колоїдних розчинів з істинних використовуються фізичні фактори – заміна дисперсного середовища, зниження навколишньої температури, концентрації водневих іонів тощо. Це призводить до утворення частинок дисперсної фази. Для одержання колоїдних розчинів методами хімічної конденсації використовуються хімічні реакції – окиснення, відновлення, гідролізу або обміну, які призводять до утворення молекул, що мають низьку розчинність і здатні укрупнюватися до розміру колоїдних. У разі використання методів пептизації проводиться руйнування агрегатів, які виникли за коагуляції дисперсних систем, використовуючи для цього дисперсне середовище і пептизатори та спеціальні стабілізатори.

Робота 1. Одержання гідрозолей Сульфуру та каніфоліу методом пониження розчинності

Сульфур і каніфоліу добре розчинні в органічних розчинниках, особливо в етанолі. У разі заміни органічного розчинника на воду розчинність Сульфуру та каніфоліу різко падає – виникають колоїдні розчини.

Хід роботи. Готують два розчини: 2 % спиртовий розчин Сульфуру та 3 % спиртовий розчин каніфоліу. Для приготування спиртового розчину беруть розтерту сірку ("сульфатний цвіт"), протягом декількох діб настоюють на етанолі, потім фільтрують і зберігають в окремій склянці з притертим корком. У дві колби наливають по 10–50 мл дистильованої води. У першу додають декілька

крапель спиртового розчину Сульфуру, у другу – каніфолію. Утворюється два колоїдних розчини (золі) молочно-білого кольору, які здатні до опалесценції.

Робота 2. Одержання золю парафіну

Парафін – суміш насичених вуглеводів C_{18} – C_{38} , переважно аліфатичного жирного ряду, з нормальною будовою карбонового ланцюга. Температура плавлення парафіну – 40–65 °С, густина – 0,830–0,915 г/см³ (за 15 °С). Парафін – не розчинний у воді та етанолі, розчиняється у більшості органічних розчинників. Широко використовується в медицині та ветеринарії для лікувальних цілей, у побуті – для приготування свічок, у промисловості – для виготовлення паперу тощо.

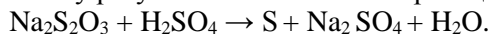
Хід роботи. У пробірку наливають 0,5 мл 2 % спиртового розчину парафіну і додають 10 мл дистильованої води, перемішують. Виникає золь парафіну.

Робота 3. Одержання гідрозолу Сульфуру методом окиснення

Колоїдний розчин Сульфуру можна одержати у разі взаємодії тіосульфату натрію та концентрованої хлоридної кислоти.

Хід роботи. У колбу наливають 50 мл дистильованої води, насипають 50 г тіосульфату натрію. Одержаний розчин виливають у крапельну лійку. У хімічну склянку (об'ємом 300 мл), наливають 38 мл концентрованої сульфатної кислоти (густина 1,84 г/см³) і занурюють її в охолоджувальну суміш (дрібно побитий лід із хлоридом натрію). У цю ж склянку під тягою (у витяжній шафі) краплями додають розчин тіосульфату натрію. Випадає густа маса світло-жовтого кольору. У склянку, дотримуючись правил техніки безпеки, обережно наливають 100 мл дистильованої води (роботу проводять у витяжній шафі, із захисними окулярами). Суміш нагрівають 30–40 хв. Утворюється колоїдний розчин.

Золь утворюється у результаті такої хімічної реакції:



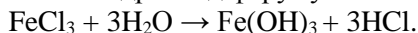
Робота 4. Одержання золю гідроксиду феруму методом гідролізу

Робота є ілюстрацією методу хімічної конденсації, коли дисперсна тверда фаза утворюється у результаті хімічної реакції. Частинки

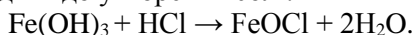
такої фази мають кристалічну будову. Гідроксид феруму не розчинний у воді, тому у момент утворення їх молекули конденсуються між собою до розмірів колоїдних. При цьому на їх поверхні адсорбуються іони електроліту і система набуває агрегативної стійкості.

Хід роботи. У колбу наливають 50 мл дистильованої води і доводять до температури кипіння. У киплячу воду додають краплями 3–5 мл 2 % розчину хлориду феруму. Спочатку у колбі знаходиться істинний розчин хлориду феруму, який має жовте забарвлення. Потім відбувається його гідроліз, формування колоїдних частинок (міцел) гідроксиду феруму, що призводить до утворення колоїдного розчину. Останній має червоно-цегляний колір.

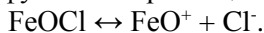
Спочатку утворюється гідроксид феруму:



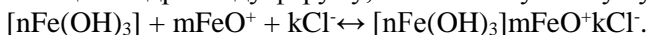
Частина молекул гідроксиду феруму взаємодіє з хлоридною кислотою, що призводить до утворення солі:



Сіль дисоціює на іони, які надалі використовуються для утворення адсорбційного і дифузного шарів міцели гідроксиду феруму:



Виникає міцела гідроксиду феруму, яка має таку схему будови:



Робота 5. Утворення гідрозолу Аргентуму методом відновлення

Золь Аргентуму проявляє бактерицидні властивості, що дозволяє його використовувати для лікувальних цілей у медицині та ветеринарії.

Хід роботи. У конічну колбу наливають 100 мл дистильованої води, додають 10 мл 0,1 н розчину нітрату аргентуму і декілька крапель 1 % розчину таніну (як відновник). Розчин доводять до кипіння, після чого краплями додають 1 % розчин карбонату калію, старанно перемішують після кожної краплі.

Гідрозоль Аргентуму утворюється у результаті комплексу складних хімічних реакцій. Танін ($\text{C}_{78}\text{H}_{52}\text{O}_{46}$) у разі окиснення перетворюється у флобафен ($\text{C}_{76}\text{H}_{52}\text{O}_{49}$). У ході відновлення утворюється золь жовто-коричневого кольору.

Робота 6. Одержання золь йодиду аргентуму реакцією подвійного обміну

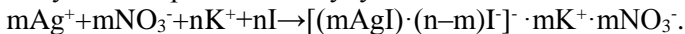
Препарати Йоду широко використовуються у медичній і ветеринарній клінічній практиці як бактерицидні речовини. Одним із таких препаратів є золь йодиду аргентуму. Його найчастіше одержують із нітрату аргентуму та йодиду калію за допомогою реакції подвійного обміну. Залежно від концентрації реагентів одержують позитивно або негативно заряджені міцели йодиду аргентуму.

Хід роботи. У колбу із бюретки наливають 3 мл 0,01 н розчину йодиду калію. Потім поступово, за сильного збовтування, додають 2 мл 0,01 н розчину нітрату аргентуму. У другу колбу наливають 2 мл 0,01 н розчину йодиду калію і 3 мл 0,01 н розчину нітрату аргентуму. Утворюється два колоїдних розчини йодиду аргентуму, які заряджені протилежно.

Залежно від надлишку у суміші того чи іншого реагента міцела має різний за знаком заряд. Наприклад, за $m > n$ вона має таку схему будови:



За $m < n$ будова і заряд міцели будуть іншими:



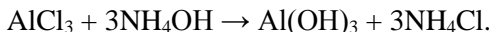
Робота 7. Одержання золю гідроксиду алюмінію методом пептизації

Пептизація – розщеплення агрегатів (частіше осадів), які виникли внаслідок коагуляції дисперсних систем, на первинні частинки дисперсної фази під впливом рідкої фази (наприклад, води), або спеціальних речовин (пептизаторів). Пептизація – один із методів одержання колоїдних розчинів та грубодисперсних систем, зокрема суспензій (наприклад, суспензій глини та інших речовин). Розрізняють декілька видів пептизації: адсорбційну, дисоціаційну та хімічну. Прикладом дисоціаційної пептизації може бути одержання золю гідроксиду алюмінію.

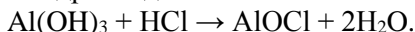
Хід роботи. До 20 мл 1 % хлориду алюмінію (III) краплями додають концентрований розчин аміаку. Виникає осад, який багаторазово промивають дистильованою водою (до зникнення каламуті) і переносять у хімічну склянку. До осаду доливають 500 мл дистильованої води і краплями додають 0,1 н розчин хлоридної кислоти.

Осад поступово розчиняється і зникає зовсім. Утворюється золь гідроксиду алюмінію.

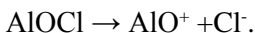
Робота проходить у декілька етапів. Спочатку виникає агрегат гідроксиду амонію:



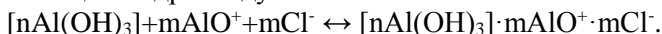
Після додавання хлоридної кислоти частина молекул гідроксиду алюмінію взаємодіє з гідроксидом амонію:



Утворена у результаті такої взаємодії сіль дисоціює на іони, які слугують джерелом для формування адсорбційного і дифузного шарів міцели:



Виникає міцела гідроксиду алюмінію:



Контрольні питання

1. Що таке дисперсні системи? З чого вони складаються? 2. Дайте класифікацію дисперсних систем і наведіть окремі приклади. 3. Що таке золь і гель? Що таке ліофільний і ліофобний золь? Наведіть приклади. 4. Яке значення колоїдних розчинів у промисловості, побуті, медицині та ветеринарії? Наведіть приклади. 5. Які вам відомі способи одержання колоїдних розчинів? Як їх класифікують? 6. Що таке дисперсні методи одержання колоїдних розчинів? Які прилади використовуються для таких методів? 7. Розкрийте суть методів фізичної та хімічної конденсації, за допомогою яких одержують колоїдні розчини. 8. У чому суть використання пептизації як методу одержання колоїдних розчинів? Наведіть приклади.

2. МЕТОДИ ОЧИСТКИ КОЛОЇДНИХ РОЗЧИНІВ

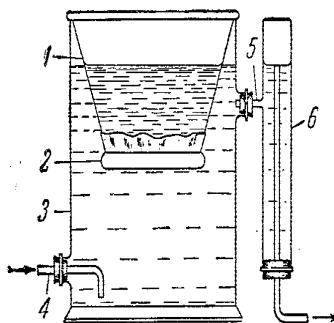
Колоїдні розчини, які одержують за допомогою різних методів, у своєму складі здебільшого містять домішки, переважно низькомолекулярних речовин. Вони виникають внаслідок забрудненості реагентів або з'являються у разі недоброякісного зберігання, у ході хімічної взаємодії між їх компонентами. Наприклад, у разі одержання колоїдного розчину йодиду аргентуму з нітрату аргентуму та йодиду калію у системі обов'язково присутня певна кількість інших компонентів, зокрема, залишається нітрат калію (див. попередню тему). Наявність домішок негативно впливає на якість та стійкість колоїдних розчинів. Це стосується як ліофобних золей (наприклад, гідроксидів феруму чи алюмінію, йодиду аргентуму чи гідрозолу аргентуму), так і ліофільних розчинів високомолекулярних сполук (ВМС) – білків, нуклеїнових кислот, глікозаміногліка-

нів тощо. Особливо ретельно необхідно очищати колоїдні розчини (ліофіли і ліофоби), які використовують у хімічному і біохімічному аналізах, у медичній і ветеринарній практиці як лікувальні засоби.

Існує ряд методів очистки колоїдних розчинів і розчинів ВМС. Основними є діаліз, електродіаліз, компенсаторний діаліз, вивідіаліз, ультрафільтрація, електроультрафільтрація, електродекантація, діаліз за низьких тисків тощо.

Основою цих методів є діаліз (грец. *dialysis* – подвійне розщеплення). Діалізом називають метод очистки колоїдних розчинів (золів) і розчинів ВМС від низькомолекулярних домішок (рис. 5), що ґрунтується на властивостях напівпроникних мембран, які відокремлюють золі від чистого розчинника, пропускають через свої пори молекули та іони і не пропускають великі за розмірами колоїдні частинки. Забруднений золь наливають у ємність, дном якої є напівпроникна мембрана (колодій, сечовий міхур, пергамент). Ємність із золем занурюють у більшу ємність із проточною водою. Відбувається діаліз.

Рис. 5. Діалізатор: 1 – лійка; 2 – напівпроникна мембрана; 3 – скляна ємність; 4 – трубка для надходження води; 5 – трубка для виливання води; 6 – автоматичний сифон.



Робота 1. Виготовлення напівпроникної мембрани

Для одержання напівпроникної мембрани часто використовують розчин колодію. Звичайний колодій являє собою 4 % розчин моно- і динітроцелюлози у суміші 96° етанолу і діетилового етеру (1:1).

Хід роботи. У колбу наливають колодій, який через 3–10 хв виливають поступовим обертанням посуду. Виникає плівка, що покриває стінки колби. Колбу залишають на певний час для випарування діетилового етеру (5–10 хв). Колбу обполіскують водою для видалення залишків етанолу. Шар колодієвої плівки за допомогою ножа чи леза бритви підрізають біля горловини колби. Між плівкою і стінкою колби наливають воду, після цього витягують колодієвий мішечок. Його закріплюють на скляному патроні або на

просвердленому гумовому корку за допомогою гумових кілець і колодію та використовують у наступних роботах.

Робота 2. Діаліз золю гідроксиду феруму

Діаліз широко використовується у лабораторній і клінічній практиці для очистки колоїдних розчинів і розчинів високомолекулярних речовин від шкідливих і непотрібних домішок. Типовим прикладом використання діалізу може бути очистка золю гідроксиду від домішок хлоридної кислоти, яка завжди присутня за його утворення.

Хід роботи. У приготовлений раніше діалізатор наливають гарячий розчин гідроксиду феруму, що має червоно-бурий колір. Через 10–15 хв беруть пробу води, що витікає з діалізатора, і досліджують її на наявність хлору, використовуючи розчин нітрату аргентуму.

Робота 3. Діаліз розчину білка, забрудненого хлоридом натрію

Білки – високомолекулярні органічні сполуки, побудовані із залишків амінокислот. Вони складають структурну і функціональну основу живих організмів, оскільки з їх діяльністю пов'язано існування самої матерії. В організмі людини і тварин білки виконують ряд життєво важливих функцій: структурну, каталітичну, захисну, транспортну, енергетичну, спадкову тощо. З діяльністю білків пов'язані всі головні прояви життя: подразливість, скоротливість, здатність до росту, розвитку, розмноження, активної регуляції хімічного складу організму, систем, тканин, клітини, пристосованість до навколишнього середовища, травлення і виділення кінцевих продуктів обміну, в цілому – здоров'я і продуктивність тварин. Розмір молекул білків досягає розміру міцел колоїдних систем. Фактично одна молекула білка у воді може утворювати одну міцелу. Наприклад, розмір молекули альбуміну – $3,8 \times 15$ нм, гемоглобіну – $4 \times 5,7$, γ -глобуліну – $4,4 \times 28,5$, β -глобуліну – $3,7 \times 19$, β -ліпопротеїну – $18,5 \times 18,5$, фібріногену – 4×70 нм. Молекули білків не проходять через пори напівпроникних мембран. Це явище використовується для очистки білків від низькомолекулярних домішок, що знаходиться своє впровадження на біофабриках для одержання сироваток для лікування різних інфекційних хвороб, виготовлення високоякісних вакцин та антигенів тощо.

Хід роботи. У виготовлений раніше діалізатор (див. роботу 1) поміщають 2–5 мл розчину білка, забрудненого хлоридом натрію.

Включають проточну воду. Через деякий час (5–15 хв) беруть пробу проточної води (2–3 мл) і досліджують на наявність у ній іонів хлору (за допомогою проби з нітратом аргентуму).

Робота 4. Відмінність колоїдних розчинів від істинних

Для колоїдних розчинів характерні ряд властивостей: молекулярно-кінетичні, оптичні, електрокінетичні. Найлегше відрізнити колоїдні та істинні розчини за допомогою двох ознак – явищ дифузії та діалізу.

Дифузія в колоїдних розчинах

Дифузія (лат. *diffusio* – поширення) – самовільний процес вирівнювання концентрації колоїдних частинок по всьому об'єму розчину за рахунок їх броунівського руху.

Хід роботи. У 3 пробірки наливають по 5–7 мл гарячого 3 % розчину желатину. У першу пробірку додають 2–3 краплі фенолфталеїну і декілька крапель 0,1 н розчину NaOH до появи рожевого забарвлення. Пробірки витримують деякий час за кімнатної температури до застигання. Після цього у першу пробірку наливають 1–2 мл 0,1 н розчину HCl, підфарбованого колоїдним розчином конго червоним чи іншим барвником. У другу пробірку наливають 1–2 мл 10 % розчину CuSO₄, у третю 2–3 мл 2 % розчину берлінської блакиті Fe₄[Fe(CN)₆]₃. Через добу проводять оцінку явища дифузії у різних пробірках. Дослід свідчить, що найбільша швидкість дифузії у першій пробірці, де дуже швидко знебарвлюється фенолфталеїн (у колоїдний розчин швидко проникають іони Гідрогену). Значно повільніше проходить дифузія у другій пробірці, що видно за переміщенням блакитних іонів купруму Cu²⁺. Дифузія не спостерігається у третій пробірці, в яку додавався колоїдний розчин берлінської блакиті.

Діаліз колоїдних розчинів

Явище діалізу теж дозволяє відрізнити колоїдний розчин від справжнього.

Хід роботи. У колоїдний мішечок наливають 5–10 мл 0,5 % розчину крохмалю і поміщають у склянку з 1 % розчином I₂ у KI. Через деякий час (3–5 хв) виникає посиніння розчину крохмалю. Розчин Йоду не змінює свого забарвлення.

Контрольні питання

1. Які ви знаєте методи очистки колоїдних розчинів? 2. Що таке діаліз і у чому його суть? 3. Що таке електродіаліз і в яких випадках він використовується для очистки колоїдних розчинів? 4. Які прилади використовуються і як вони працюють за компенсаторного діалізу та вивідіалізу? 5. Що таке "штучна нирка" і для яких цілей вона використовується? 6. У чому полягає суть використання методу ультрафільтрації для очистки колоїдних розчинів від неpotрiбних і шкiдливих домішок?

3. ВЛАСТИВОСТІ КОЛОЇДНИХ РОЗЧИНІВ

Для колоїдних розчинів характерний ряд властивостей, що відрізняють їх від істинних розчинів, а також від грубодисперсних систем – суспензій і емульсій. Їх умовно можна поділити на 3 групи – молекулярно-кінетичні, оптичні та електрокінетичні.

Молекулярно-кінетичні властивості колоїдних розчинів визначаються величиною, формою та інтенсивністю руху колоїдних частинок. Серед них виділяють такі: броунівський рух, дифузія, флуктуація, осмос, осмотичний тиск, мембранна рівновага Доннана, ультрацентрифугування, седиментація і седиментаційна рівновага.

Оптичні властивості колоїдних розчинів обумовлені специфічною взаємодією променів світла з міцелами. Ці властивості обумовлені зіставністю розмірів частинок дисперсної фази колоїдних розчинів із довжиною хвилі світла. Це дозволяє використовувати оптичні методи дослідження для визначення форми, розмірів, будови, швидкості переміщення колоїдних частинок. До оптичних властивостей колоїдних розчинів належать: забарвлення колоїдів (у неорганічних золей ці частинки мають широкий діапазон забарвлення – від фіолетового до пурпурного, у ліофілів – білий з різними відтінками), опалесценція, розсіювання світла (явище Фарадея-Тиндаля), ультрамікроскопія, електронна мікроскопія, нефелометрія.

Електрокінетичні властивості колоїдних розчинів обумовлені наявністю в їх міцелах подвійного електричного заряду, утвореного двома шарами протіонів – адсорбційного та дифузного. До таких властивостей належать: електрофорез, електроосмос, ізоелектричний стан (ІЕС), ізоелектрична точка (ІЕТ), коагуляція.

Робота 1. Осмос і осмотичний тиск золей

Явище осмосу обумовлено прагненням системи до термодинамічної рівноваги і вирівнювання концентрації розчинів по обидва боки мембрани. Під час осмосу виникає осмотичний тиск, що чисельно дорівнює надлишковому зовнішньому тиску, який необхідно

прикласти з боку розчину, щоб припинити осмос. Колоїдні розчини мають незначний тиск. Причиною є те, що лінійні розміри колоїдних частинок, зазвичай, на 2–3 порядки більші від молекул дисперсної фази ліофобного золю. Відповідно до цього осмотичний тиск за однакових вагових концентрацій частинок буде на декілька порядків менший. Наприклад, осмотичний тиск золю золота у разі концентрації 1 мг/л і $T=273\text{ }^\circ\text{K}$ і розміру частинок 25 нм дорівнює $3,63 \cdot 10^{-6}$ Па (або $3,63 \cdot 10^{-11}$ атм). Осмотичний тиск 1 % розчину золю аргентуму має осмотичний тиск 0,00045 атм, сахарози – 0,725 атм.

Хід роботи. Внутрішній циліндр осмометра заповнюють 0,5 % водним розчином конго червоного, зовнішній – водою. Залишають на 30–60 хв. Об'єм розчину у внутрішньому циліндрі осмометра, який обмежений напівпроникною мембраною, збільшується, що і зафіксовано за позначками манометра.

Робота 2. Явище Фарадея-Тиндаля

Під час пропускання променів світла через колоїдний розчин виникає світловий конус. У колоїдних розчинах частинки дисперсної фази мають менші лінійні розміри, ніж довжина хвилі падаючого світла. Відбувається дифракція світла. Явище відкрито у лабораторії М. Фарадея його учнем Д. Тиндалем (1868). Явище, крім колоїдних розчинів, характерне для розчинів високомолекулярних сполук, суспензій. На основі цього методу створені оптичні прилади, за допомогою яких диференціюють колоїдні розчини від істинних, визначають форму, розміри і концентрацію міцел, фізико-хімічні властивості дисперсних систем. До таких приладів, перш за все, належать: ультрамікроскоп, нефелометр і фотоколориметр.

Хід роботи. Беруть дві прямокутні ємності, обклеєні чорним папером. У кожній такій ємності на папері роблять невеликий отвір для світла. В одну з них наливають 3 % розчин сахарози, у другу – золю гідроксиду феруму. Між ємностями розміщують джерело світла (наприклад, електричну лампочку), промені якої збільшуваними лінзами направляють у пророблені отвори. Спостерігають за проходженням світла в обох розчинах.

Робота 3. Явище електрофорезу

Електрофорез (грец. *elektron* – янтар і *phoresis* – нести) – рух частинок дисперсної фази під впливом зовнішнього електричного поля. Відкритий російським хіміком Ф.Ф. Рейсом (1807). Використову-

ється у біохімічному аналізі (наприклад, для розділення білкових фракцій сироватки крові), у клінічній практиці (для введення у хворий організм лікарських засобів), у промисловості (для обезводнення торфу, фарб, очищення глин, для осадження натурального та штучного каучуків із латексів, для боротьби з туманами і димами тощо).

Хід роботи. У шматок сиріої глини розмірами 8 ×4×15 см поміщають дві скляні трубки діаметром 1,5–2 см. В обидві трубки насипають добре помитий кварцовий пісок (приблизно 0,5 см³). У трубки наливають воду з таким розрахунком, щоб її верхній рівень знаходився на 2–3 см вище шару піску. У пробірки вставляють мідні електроди, з'єднані з акумуляторною батарейкою з напругою 2 В. Через півгодини відмічають, в якій пробірці рівень золю знизився і цим самим визначають знак заряду колоїдних частинок.

Результат. У трубці з позитивним електродом через шар піску проходять частинки глини – виникає каламутна суспензія, а у трубці з негативним електродом рівень води підвищується.

Робота 4. Визначення заряду колоїдної частинки методом капілярного аналізу

Метод ґрунтується на відношенні колоїдних міцел до заряду поверхні носія, де вони розміщені. Зокрема, таким носієм може бути фільтрувальний папір. Під час занурення у воду фільтрувального паперу стінки його капілярів заряджаються негативно. Якщо у водному розчині знаходяться колоїдні частинки, заряджені позитивно, їх підняття вверх по капілярах паперу неможливе, бо вони осідають на стінках капілярів у результаті взаємодії (коагуляції) позитивно заряджених частинок дисперсної фази і негативно заряджених частинок стінок капілярів фільтрувального паперу. Коли міцела має негативний заряд, стінки капілярів фільтрувального паперу є своєрідним шляхом для пересування міцел із розчинником.

Хід роботи. Беруть чотири пробірки. У кожную з них наливають по 5–6 мл 1 % розчину одного з барвників: у 1-шу – метиленового синього, у 2-гу – основного фуксину, у 3-тю – кислого фуксину, у 4-ту – еозин. У кожную пробірку занурюють смужку фільтрувального паперу, підвішеного на однаковій висоті від пробірок. Через 20 хв визначають висоту підняття кожного барвника на смужці фільтрувального паперу.

Робота 5. Коагуляція золю гідроксиду феруму

Коагуляція (лат. *coagulatio* – згущення) – об'єднання дрібних частинок у дисперсних системах у більш крупні під впливом сил зчеплення. Коагуляція виникає внаслідок дії електролітів (хімічна коагуляція), високих температур (термічна коагуляція), електричного струму (електрична коагуляція), перемішування (механічна коагуляція) тощо. У разі дії шкідливих факторів зменшується інтенсивність броунівського руху, порушується подвійний заряд міцел, частинки агрегують, і у вигляді пластівців випадають в осад або спливають на поверхню розчину. Коагуляції належить велике значення у процесі виготовлення продуктів харчування (сирів, кефірів), виділення каучуків з латексу, випадання дощу, згортання крові за різних травм тощо. Коагуляція може мати й негативне значення (наприклад, підвищене згортання крові призводить до тромбозів, білків молока – до його скипання і т.д.).

Хід роботи. У три пробірки наливають по 5 мл свіжоприготовленого розчину гідроксиду феруму. Вміст першої пробірки з бюретки титрують 5 М розчином хлориду феруму (до появи каламуті), другої – 0,01 М розчином сульфату натрію, третьої – 0,001 М гексаціаноферату (II) калію. Роблять висновки щодо впливу на коагуляцію зарядів іонів.

Робота 6. Захист міцел гідрофобних колоїдних розчинів

Колоїдний захист – підвищення стійкості гідрофобних колоїдних систем шляхом додавання до них гідрофільних колоїдів. Захисна дія обумовлена адсорбцією ліофільних частинок поверхнею ліофобних міцел. Захисні властивості мають білки (желатин, яєчний і сироватковий альбуміни), полісахариди (крохмаль, декстрин), деякі напівколоїди (стеарат і олеат натрію), сапоніни тощо. Захисна дія окремих ліофільних колоїдів характеризується числами – золотим, рубіновим, срібним, залізним. Зокрема, *золотим числом* вважають найменшу кількість ліофільного колоїду в міліграмах (у перерахунку на суху речовину), яка може захистити 10 мл 0,006 % золю золота від коагуляції під час додавання до нього 1 мл 10 % розчину хлориду натрію.

Хід роботи. У дві пробірки наливають по 5 мл свіжоприготовленого розчину гідроксиду феруму. У першу пробірку додають

1 мл 1 % розчину білка (наприклад, яєчного), у другу – 1 мл дистильованої води. Потім до одержаних розчинів додають по 1 мл 5 % розчину хлориду натрію. Через 5 хв спостерігають за помутнінням в обох пробірках.

Контрольні питання

1. Які вам відомі молекулярно-кінетичні властивості колоїдних розчинів? Дайте кожній властивості характеристику. 2. Назвіть головні оптичні властивості колоїдних розчинів. 3. Дайте характеристику головних електрокінетичних властивостей колоїдних розчинів. 4. Покажіть будову колоїдної частинки на прикладі йодиду аргентуму. 5. Що визначає стійкість дисперсних систем? Наведіть приклади причин стійкості колоїдних розчинів гідроксиду феруму. 6. Що таке коагуляція, які є види коагуляції і яка кінетика коагуляції? 7. Чим визначається швидкість коагуляції і від чого вона залежить? 8. Що таке “колоїдний захист”, для чого він проводиться і який його механізм? 9. Намалуйте схему захищеної частинки йодиду аргентуму розчином білка. 10. Що таке “золоте число”, для чого його вживають, яке воно має значення у медичній і ветеринарній клінічній практиці?

4. В'ЯЗКІСТЬ

В'язкість – результат внутрішнього тертя між окремими шарами рідини, що рухаються із різними швидкостями. В'язкість характеризує опір дії зовнішніх сил, спричиняючи їх витікання. У разі ламінарного витікання (шарами) середовища в'язкість проявляється в тому, що за зрушення суміжних шарів середовища відносно один одного виникає сила, протилежна тій, що спричиняє зрушення. Опір, який отримує рідина під час руху одних її шарів відносно інших, називають *динамічною в'язкістю*, або внутрішнім тертям. Величину, зворотну динамічній в'язкості, називають *текучістю* рідини. В'язкість чистих рідин за сталої температури – величина постійна, характерна для кожної окремої рідини. У разі розчинення в рідині різних речовин її в'язкість підвищується.

В'язкість – важлива фізико-хімічна константа рідин. У медичній та ветеринарній клінічній практиці вивчається в'язкість крові, плазми і сироватки крові, лімфи, ліквору, травних соків тощо. Зокрема, в'язкість крові зростає за жовчекам'яної хвороби, фасціольозу, попадання в організм гемолітичних отрут, зменшується – через отруєння йодидами, хініном та іншими сильнодіючими речовинами. Розрізняють *динамічну* і *кінематичну* в'язкості, в ряді випадків використовують і відносну в'язкість.

В'язкість рідин залежить від природи розчиненої речовини, температури, тиску, наявності домішок. Найбільше відбивається на

в'язкості температура навколишнього середовища. Так, в'язкість води за температури 0 °С становить $1,7675 \times 10^{-3}$ Па·с, а 100 °С – $0,2829 \times 10^{-3}$ Па·с.

У практичній роботі користуються величиною *відносної* в'язкості, яка характеризує відношення в'язкості дослідної рідини до в'язкості води за однакової температури:

$$Z = \frac{\eta}{\eta_0},$$

де z – відносна в'язкість; η – в'язкість дослідної рідини; η_0 – в'язкість води.

Найчастіше у клініці визначають відносну в'язкість цільної крові та в'язкість сироватки крові. Так, відносна в'язкість цільної крові становить 4,7–6,0, а сироватки крові – 1,5–2,0 (залежно від виду тварин). В'язкість крові залежить від вмісту еритроцитів. Наприклад, відносна в'язкість крові за $6,7 \times 10^6$ еритроцитів у 1 мм^3 дорівнює 6,5; $8,4 \times 10^6$ – 17,2; $9,4 \times 10^6$ – 21,0.

В'язкість цільної крові та сироватки зростає за багатьох інфекційних та інвазійних хвороб, нестачі питної води, тяжкої тривалої роботи тощо.

Робота 1. Визначення в'язкості за допомогою капілярного віскозиметра

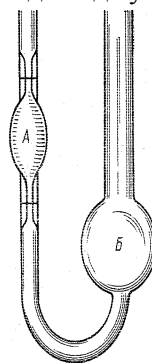
Віскозиметр – це U-подібна трубка, яка складається з двох колін: вузького і розширеного (рис. 6). У праве коліно наливають воду і грушею засмоктують її у ліве коліно вище верхньої мітки. Секундоміром визначають середній час витікання води (від верхньої до нижньої мітки). Аналогічні визначення проводять із досліджуваною рідиною.

У зв'язку з тим, що за однакової висоти стовпчиків рідин їх тиск пропорційний густині цих рідин, то для визначення в'язкості дослідної рідини можна використати таке рівняння:

$$\eta = \eta_B \times \frac{\rho \times t}{\rho_B \times t_B},$$

де η – в'язкість дослідної рідини; η_B – в'язкість води; ρ – густина дослідної речовини; ρ_B – густина води; t – час витікання дослідної речовини з резервуару; t_B – час витікання води.

Рис. 6. **Віскозиметр:** резервуар лівого (А) і правого (Б) коліна.



Для проведення розрахунків динамічної в'язкості величини густини води та інших речовин, а також в'язкість води за даної температури беруть із таблиць.

Для визначення відносної в'язкості (z) дослідної рідини в'язкість і густину води беруть рівними одиниці. У такому випадку відносна в'язкість буде визначатися за формулою:

$$Z = P \frac{t}{t_B}$$

Робота 2. Вплив температури на в'язкість рідини

Коефіцієнт в'язкості рідин значною мірою залежить від температури. З підвищенням температури в'язкість рідин зменшується. За низьких температур в'язкість окремих рідин (скла, смоли, деяких рослинних масел) настільки збільшується, що вони втрачають текучість, твердість і за своїми багатьма властивостями нагадують тверді тіла.

Хід роботи. У віскозиметр наливають 0,5 % розчин желатину. Широке коліно віскозиметра використовується для місця розміщення термометра. Віскозиметр із термометром занурюють на півгодини в стакан з льодовою водою, а після цього визначають час витікання розчину желатину за температури 0 °С. Приладу дають нагрітися і визначають час витікання розчину за температури 20 °С, поміщаючи його в теплу воду. Можна і втретє визначати час витікання розчину за температури 40 °С. За кожного визначення часу слід цю роботу проводити 2–3 рази, вибравши середнє значення. За цих же умов визначають час витікання дистильованої води за кожної температури.

Робота 3. Вплив концентрації розчиненої речовини на в'язкість розчину

В'язкість розчинів залежить від концентрації розчинених у розчиннику речовин.

Хід роботи. У п'ять пробірок наливають 1 % гарячого розчину желатину і гарячої дистильованої води за схемою (табл. 4).

Таблиця 4

Компонент	Пробірки				
	1	2	3	4	5
1 % розчин желатину, мл	1,0	2,5	5,0	7,5	10
Дистильована вода, мл	9,0	7,5	5,0	2,5	–
Отримана концентрація розчину, %	0,1	0,25	0,5	0,75	1,0

Визначають за допомогою віскозиметра в'язкість розчинів желатину різної концентрації.

Після кожного вимірювання записують результати. Будують графік, крива якого показує залежність в'язкості від концентрації розчину.

Робота 4. Вплив концентрації водневих іонів (сН) на в'язкість

В'язкість розчинів залежить від концентрації водневих іонів (рН). Найбільш виразно це видно у ферментативному каталізі, оскільки ферменти являють собою білкові каталізатори ліофільного характеру.

Хід роботи. У п'ять пробірок налити по 5 мл 1 % розчину желатину і додати по 5 мл таких розчинів (табл. 5).

Таблиця 5

№ суміші	Розчин, що додається	рН суміші	В'язкість, що визначена після переміщення суміші
1	0,2 н НСІ	Близько 1,5	
2	0,01 н НСІ	Близько 2,5	
3	Дистильована вода	Близько 5,0	
4	0,02 н NaOH	Близько 12	
5	0,2 н NaOH	Близько 13	

В утворених сумішах розчину желатину з різними розчинами буде і різна в'язкість, яку визначають за допомогою віскозиметра (див. роботу 1). Звертають увагу на те, що найменша в'язкість розчину желатину буде в ізоелектричній точці (рН 4,9).

Робота 5. Зміни в'язкості зі старінням розчину

За однакової процентної концентрації та температури в'язкість рідин із часом зростає. Причини тут різні. Однією з них може бути збільшення об'єму частинок дисперсної фази за рахунок сольватації. Зменшується швидкість броунівського руху, ступінь дифузії, збільшується седиментація частинок.

Хід роботи. Визначають в'язкість 1 % розчину желатину за кімнатної температури. Спостерігають за в'язкістю через декілька годин (вона зростає). Через добу в'язкість розчину настільки зросте, що він не протікає через капіляр віскозиметра.

Записати в'язкість щойно приготовленого розчину. Показати в'язкість розчину через кілька годин після приготування. Пояснити причини збільшення в'язкості.

Контрольні питання

1. Що таке в'язкість і які причини її виникнення? 2. Які вам відомі види в'язкості? 3. В яких одиницях вимірюється в'язкість? 4. Як визначаються динамічна і відносна в'язкості? 5. Які фактори впливають на величину в'язкості розчинів? 6. Яке значення має в'язкість у промисловості, транспорті і побуті? 7. Яке значення в'язкості в житті тваринного організму? Наведіть приклади на рівні організму, тканин і клітин. 8. Як змінюється в'язкість крові та сироватки у разі патології? 9. Яке діагностичне значення має відносна в'язкість біологічних рідин?

5. СПОСОБИ ОДЕРЖАННЯ І ВЛАСТИВОСТІ РОЗЧИНІВ ВИСОКОМОЛЕКУЛЯРНИХ СПОЛУК (ВМС)

Високомолекулярні сполуки (ВМС) – хімічні речовини з молекулярною масою від декількох тисяч до десятків і сотень мільйонів. Розчини ВМС – термодинамічно стійкі молекулярно-дисперсні системи. Розмір частинок дисперсної фази таких систем складає від 1 до 100 нм. На відміну від ліофобних золів, такі розчини стійкі без присутності стабілізаторів. Розчини ВМС характеризуються окремими властивостями ліофобних золів: частинки дисперсної фази не проникають через напівпроникні мембрани, вони повільно дифундують. Для таких розчинів характерний низький осмотичний тиск, висока в'язкість, мембранна рівновага Доннана, явище седиментації, ефект Фарадея-Тиндаля, ультрамікроскопія, електронна мікроскопія, наявність подвійного електричного заряду, ІЕС і ІЕТ, вони здатні до електрофорезу та електроосмосу, під впливом шкідливих для них фактів (нагрівання, дії світлової енергії, електролітів тощо) коагулюють. На відміну від золів розчинення ВМС протікає без стабілізаторів. Ці розчини мають перемінну концентрацію (найчастіше – високу). Значна кількість біологічно важливих сполук здатні утворювати розчини ВМС – білки, нуклеїнові кислоти, полісахариди (крохмаль, глікоген, глікозаміноглікани), деякі ліпіди.

Міцели ліофобних золів утворюються з багатьох тисяч і навіть мільйонів молекул низькомолекулярних речовин. Наприклад, у міцелі гідроксиду заліза нараховується 500–600 тис. молекул $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Частинка дисперсної фази розчину ВМС стійка відносно дії шкідливих факторів, порівняно з ліофобними золями. Найчастіше така частинка представлена однією молекулою ВМС колоїдної

дисперсності (1–100 нм). Стійкість гідрофільних частинок ВМС найчастіше визначається двома факторами: подвійним електричним шаром і наявністю сольватної оболонки, що в свою чергу складається з двох шарів – щільного внутрішнього шару чітко орієнтованих дипольних молекул води і зовнішнього рухливого дифузійного шару. Частинки ВМС відносно стійкі до коагуляції. Коагуляцію можна викликати двома шляхами – понизити електричний заряд або зруйнувати сольватну (гідратну) оболонку. Перше, зазвичай, досягають додаванням до розчину ВМС розчинів електролітів, друге – додаванням в систему речовин, що забирають воду гідрофільної частинки, позбавляючи її сольватної оболонки. Найчастіше для цього використовують етанол, ацетон та інші гідрофільні засоби. Нерідко обидва фактори стійкості ліофільних частинок розчинів ВМС досягаються додаванням значних кількостей сульфатів натрію, амонію, магнію тощо. В останньому випадку настає висолування ВМС із розчинів.

Розчини ВМС часто використовуються для підвищення стійкості золів. Метою такого використання ВМС є надання гідрофільності та стійкості ліофобним частинкам дисперсної фази. Це і визначає захисні властивості ВМС. Мірою захисної дії ВМС є „золоте число”. Недостатня кількість добавленої гідрофільної речовини в ліофобний золь зменшує його стабільність і одержало назву *сенсibiliзація*.

У разі змішування двох різних гідрофільних розчинів ВМС часто замість гомогенної суміші утворюється емульсія, яка виникає внаслідок зневоднення одного розчину за рахунок іншого. Відбувається розділення суміші на два шари, перший з яких є розведеним розчином більш гідрофільної речовини, другий – концентрованим розчином менш гідрофільної речовини. Таке явище прийнято називати *комплексною коацервацією*. Коацервація спостерігається і під час висолування ВМС з їх розчинів, коли проходить злиття водних оболонок декількох частинок в одну (мікрокоацервація). З виникненням коацервантів у світовому океані зв'язують походження життя на Землі (О.І. Опарін, 1966).

Робота 1. Одержання розчину крохмалю

Крохмаль ($C_6H_{10}O_5)_n$ – головний резервний полісахарид рослин, складається з двох фракцій: амілози і амілопектину. *Амілоза* – лінійний полісахарид, складається із залишків α -глюкози (200–1000

залишків), з'єднаних між собою за типом 1,4. Молекулярна маса 200 тис.–1 млн, легко розчиняється у воді, із розчином Йоду утворює темно-синій колір. *Амілопектин* – розгалужений полісахарид, молекула якого побудована із залишків α -глюкози, з'єднаних між собою зв'язками 1,4 і 1,6. Із розчином Йоду в КІ утворює червоно-фіолетове забарвлення. Молекулярна маса досягає 2 млн. Вміст крохмалю в зерні рису складає 80 %, пшениці – 75, кукурудзи – 72, жита – 70, ячменю – 65, вівса – 58, проса – 57, бульбах картоплі – до 25 %. Крохмаль – цінний харчовий продукт, важлива сировина для харчової промисловості, використовується для виготовлення паперу, тканин, важливе джерело для одержання глюкози, етилового спирту тощо.

Хід роботи. У пробірку насипають 0,5 г розтертого крохмалю і додають 10 мл дистильованої води. Перемішують і переливають у хімічну склянку, в яку додають 90 мл дистильованої води і нагрівають до кипіння. Утворюється 0,5 % розчин крохмалю, який поступово перетворюється у клейстер.

Робота 2. Одержання розчину казеїну

Казеїн – складний білок, що належить до групи фосфопротеїдів. Міститься у молоці різних видів ссавців у вигляді попередника *казеїногену*. Зокрема, молоко корови в середньому містить 3,2 % білків, 80 % яких – це казеїноген. Казеїноген під впливом сичужного ферменту хімозину перетворюється в казеїн. При цьому від молекули казеїногену відщепляється пептид і утворюється молекула казеїну. Молекулярна маса казеїну – 75–100 тис. Казеїн – повноцінний білок, містить повний набір незамінних амінокислот, особливо багатий метіоніном (близько 3,5 %), лізином (6,9), лейцином (12,1) і валіном (7 %). Має високу харчову цінність. Крім цього, використовується для виробництва фарб, клеїв, штучних волокон, пластиків, штучних харчових продуктів.

Хід роботи. У колбу наливають 5 мл 1 н. розчину ацетату натрію, додають 0,2 г казеїну і 10–13 мл дистильованої води. Нагрівають на водяній бані до 40–50 °С. Казеїн розчиняється, потім розчин охолоджують і додають до мітки 50 мл дистильовану воду. Одержують розчин казеїну.

Одержаний розчин білка досліджують на наявність опалесценції, явища Фарадея-Тиндаля та інших властивостей. Розчин білка використовують для наступних робіт.

Робота 3. Відношення ліофобного золю і розчину желатину до коагуляції

Міцела неорганічного золю має два шари – адсорбційний і дифузний. Частинки дисперсної фази розчинів високомолекулярних сполук, крім цих шарів, мають сольватну (якщо розчинник вода – гідратну) оболонку, яка захищає міцелу від шкідливої дії сторонніх іонів, зміни рН тощо.

Хід роботи. Беруть дві пробірки. У першу пробірку наливають 5 мл золю берлінської блакиті, в другу – 5 мл 0,5 % розчину желатину. В обидві пробірки додають по декілька крапель насиченого розчину хлориду натрію.

Під час внесення коагулянту золь берлінської блакиті швидко коагулює. Така ж кількість коагулянту не викликає коагуляцію розчину желатину.

Робота 4. Захисна дія желатину для ліофобних колоїдів

Желатин – суміш білкових речовин тваринного походження. Його одержують на м'ясокомбінатах методом виварювання кісток, хрящів, сухожилків, шкіри та інших відходів обробки туш. Фактично желатин є сумішшю поліпептидів (молекулярна маса 50–70 тис.) та їх агрегатів (молекулярна маса до 300 тис.). Утворюється з колагену за тривалої лужної обробки сировини з послідовною екстракцією водою за температури 50–100 °С. Процес супроводжується денатурацією колагену, розщепленням його поліпептидних ланцюгів, гідролізом амідів. Желатин використовують у харчовій промисловості, в мікробіології (як поживне середовище для мікроорганізмів), для приготування фотоемulsій, проклеївки вищих сортів паперу, виготовлення різних фарб.

Хід роботи. У дві пробірки наливають по 5 мл золю берлінської блакиті. У першу пробірку додають 1 мл дистильованої води, у другу – 1 мл свіжоприготовленого 0,5 % розчину желатину і перемішують. В обидві пробірки вносять по 1 мл 0,02 М розчину нітрату амонію, перемішують і спостерігають за явищем коагуляції. Коагуляція відбувається в першій пробірці.

Робота 5. Визначення ізоелектричної точки желатину

Колоїдна частинка (міцела) має подвійний електричний шар: адсорбційний і дифузний. Вона може існувати до тих пір, поки між величинами зарядів адсорбційного і дифузного шарів існує електростатичний потенціал, або *дзета-потенціал* (ξ). Коли ξ -потенціал дорівнює нулю, колоїдна частинка перестає існувати, а цей стан називають *ізоелектричним станом* (ІЕС). ІЕС досягають внесенням у колоїдні розчини або в розчини ВМС різних електролітів. Реакцію середовища, за якого настає ІЕС, називають *ізоелектричною точкою* (ІЕТ). ІЕТ встановлена для багатьох біополімерів. Так, для яєчного білка вона настає за рН 4,8; для альбуміну сироватки крові – рН 4,7; для гемоглобіну – рН 6,7.

Хід роботи. У п'ять пробірок відповідно до наведеної схеми вносять розчини (табл. 6).

Таблиця 6

	№ пробірки				
	1	2	3	4	5
0,1 н. CH_3COOH	1,8	1,4	1	0,6	0,2
0,1 н. CH_3COONa	0,2	0,6	1	1,4	1,8
рН суміші	3,8	4,4	4,7	5,1	5,7
0,5 % розчин желатину, мл	1	1	1	1	1
Етанол, мл	4	4	4	4	4
Ступінь каламутності					

Перемішують і через 5 хв за п'ятибальною шкалою оцінюють ступінь каламутності в кожній пробірці.

Робота 6. Коацервація у розчинах ВМС

Коацервація (лат. *coacervatio* – збирання, накопичення) – розшарування колоїдної системи або розчину ВМС з утворенням колоїдних накопичень (коацерватів) у вигляді двох різних за консистенцією шарів рідин або крапель. Коацервація може виникати в результаті часткової дегідратації дисперсної фази колоїду або розчину ВМС, при цьому є початковою стадією коагуляції. За теорією О.І. Опаріна (1966), коацервація відіграла важливу роль на ранніх етапах виникнення життя на Землі.

Коацервація під час висолювання

Хід роботи. У пробірку наливають 1 мл 5 % розчину альбуміну і поступово додають насичений розчин сульфату натрію до

виникнення каламуті. Утворюється коацерват. Його розглядають під мікроскопом.

Комплексна коацервація

У пробірку наливають 1 мл свіжоприготовленого 5 % розчину гуміарабіку або 5 % розчину крохмалю, перемішують і додають до появи каламуті декілька мл 5 % розчину желатину. Виникають коацервати. Їх розглядають під мікроскопом.

За обох видів коацервації у пробірках через декілька годин виникає два шари коацерватів – більш густий (нижній) і рідкий (верхній).

Контрольні питання

1. Які речовини належать до ВМС? 2. Як ВМС класифікується за будовою молекул? 3. Які вам відомі властивості і способи одержання ВМС? 4. Назвіть особливості головних властивостей розчинів ВМС. 5. Охарактеризуйте головні молекулярно-кінетичні, оптичні та електрокінетичні властивості розчинів ВМС. 6. Намалуйте схеми будови міцелі ліофобного золю і частинки дисперсної фази розчину ВМС. Що є спільного і яка різниця між ними? 7. Що вам відомо про в'язкість розчинів ВМС? 8. Що таке ІЕС і ІЕТ розчинів ВМС? Яке значення вони мають? 9. Що таке коацервація? 10. Які вам відомі види коацервації?

6. ЕМУЛЬСІЇ

Емульсії (лат. *emulgeo* – виштовхую) – грубодисперсні системи, в яких крапельки однієї рідини знаходяться у іншій. Рідини, які утворюють емульсії, частіше всього не розчинні одна в одній та різняться між собою фізико-хімічними властивостями. Розміри кульок дисперсної фази в емульсіях коливаються в широких межах – від 0,1 до 50 мкм. Емульсії широко поширені в природі та промисловості. Ними є молоко, вершкове масло, ячний жовток, маргарин, майонез, нафта, молочний сік рослин-каучуконосів. Спеціальні емульсії використовують як лікарські засоби в медицині та ветеринарії (наприклад, емульсії синтоміцину і стрептоциду), у рослинництві (для зниження шкідників сільськогосподарських культур) тощо.

Існує два головних типи емульсій – „олія у воді” (О/В) і „вода в олії” (В/О).

Для приготування стійких емульсій використовують стабілізатори (емульгатори), поверхнево-активні речовини, які здатні знижувати поверхневий натяг на межі розділу двох фаз – дисперсної фази і дисперсного середовища. Для емульсій О/В такими поверхнево-активними речовинами є гідрофільні колоїди (наприклад, білки), для емульсій В/О – олеофільні колоїди. Емульгаторами для

емульсій першого типу є желатин, альбумін, казеїн, гуміарабік, лецитин, танін, глини, мила лужних металів. Для емульсій другого типу – ланолін, холестерин, каучук, деякі етери целюлози, природні смоли (живиця), мила дво- та тривалентних металів (Кальцію, Цинку, Алюмінію), сажа та інші речовини.

Перехід емульсій одного типу в інший називається зворотністю фаз. Цей процес досягається у разі додавання до емульсії протилежного емульгатора.

Робота 1. Одержання емульсії олії

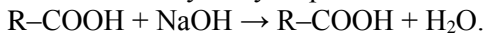
Емульсія олії у воді – типова емульсія першого типу (O/V), або пряма емульсія. Природною емульсією такого типу може бути молоко, де жирові кульки емульговані у водному розчині.

Хід роботи. У пробірку наливають 5 мл дистильованої води, додають 5–6 крапель олії, закривають корком і струшують. Утворюється емульсія, яка з часом руйнується (емульсії – нестійкі термодинамічні системи), що призводить до утворення двох шарів: олії (верхнього) і води (нижнього). Таке руйнування відбувається внаслідок злиття крапель олії в суцільну масу. Таке злиття називають *коалесценцією*.

Емульсію можна стабілізувати з допомогою емульгаторів, або стабілізаторів. Такими речовинами є ПАР – звичайне мило, жовч та інші. Дія емульгаторів обумовлена здатністю їх молекул або іонів концентруватися на межі дисперсної фази і дисперсного середовища. Такі молекули створюють навколо крапель оболонку, яка перешкоджає коалесценції і коагуляції.

Для стабілізації емульсії у пробірку додають декілька крапель одного зі стабілізаторів – розчин господарського мила, або каустичної соди (дві останні речовини можуть взаємодіяти з жирними кислотами, які завжди є в олії, утворюючи мила). При цьому утворюється стійка емульсія молочно-білого кольору.

Якщо молекули олії позначити як „жир”, а вільні жирні кислоти як R–COOH, то за взаємодії з лугом утворюється мило:



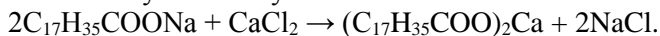
Робота 2. Одержання стійкої емульсії без участі стабілізаторів

Стітку емульсію можна одержати шляхом підбирання ряду речовин, що стабілізують одна одну в стані емульсії.

Хід роботи. У склянку з водою через капіляр випускають суміш, яка складається з 3 мл касторової або лляної олії, мінеральної олії, 25 мл 95° етанолу, 0,1 г твердого мила і 0,1 г камфори. Крапельки самостійно диспергуються, що призводить до утворення стійкої емульсії.

Робота 3. Обернення фаз емульсії

У ряді випадків емульгатор або стабілізатор може змінювати тип емульсії. Наприклад, якщо до емульсії типу О/В, стабілізованої стеаратом натрію, додати розчин хлориду кальцію, утворюється нерозчинне мило – стеарат кальцію і відбудеться обернення фаз емульсії: виникає емульсія типу В/О:



Хід роботи. У пробірку наливають 2–3 мл розчину олеату натрію і додають 2 мл керосину, бензену або толуену. Пробірку закривають корком і струшують – виникає однорідна емульсія. Для визначення типу емульсії 1 мл такої суміші переносять у другу пробірку і додають декілька розтертих частинок барвника судану, який розчиняється в органічних розчинниках і є нерозчинним у воді. Пробірку струшують – утворюється емульсія, яку наносять на предметне скло і розглядають під мікроскопом за малого збільшення. У випадку, коли забарвлюються крапельки органічних розчинників, то такий тип емульсії належить до першого типу – О/В. Коли забарвлене середовище, а крапельки не забарвлені, то такий тип емульсії належить до другого типу – В/О. До залишку одержаної емульсії в першій пробірці додають декілька капель 1 % розчину хлориду кальцію, перемішують і одержують емульсію. Декілька крапель такої емульсії переносять на предметне скло і розглядають під мікроскопом. Відбулось обернення фаз емульсії.

Контрольні питання

1. Що таке емульсія і до яких дисперсних систем її відносять? 2. Дайте схеми будови частинок емульсій різних типів. 3. Які вам відомі способи одержання емульсій? Дайте їм характеристику. 4. Що таке стабілізатори, або емульгатори? Які з них вам відомі? Який механізм їх дії? 5. Що таке обернення фаз емульсії? Наведіть приклади. 6. Які вам відомі емульсії? 7. Яке значення мають емульсії в харчуванні людини і тварин, в медицині, ветеринарії та побуті?

7. ГЕЛІ

Гелі (лат. *gelo* – застигаю) – драглеподібні чи тверді колоїдні системи, які втратили текучість. У гелі частинки дисперсної фази, з'єднуючись між собою, утворюють сітчасту структуру (каркас), комірки яких заповнені дисперсійним середовищем, найчастіше – водою. Для них характерні деякі властивості твердих тіл: зберігають форму, міцність, еластичність, пружність. Типові гелі утворюються, здебільшого, за злипання дисперсних частинок золів і мають вигляд драглистих осадів. Вони широко розповсюджені у природі – це м'ясо риб і тварин, мінерали (агат, опал), каучук та гума, клеї й текстильні волокна, желатин і оболонки клітин та їх структур, роги, нігті й волосся, продукти харчування (сири, кисле молоко, мармелад, хліб і хлібопродукти).

Залежно від природи дисперсійного середовища гелі поділяють на гідрогелі, алкогалі, бензогалі, ацетонові гелі. Сухі гелі називають *ксерогелями* (крохмаль, сухий желатин). Багаті на дисперсійне середовище гелі – *ліогелі* (кисіль, холодець, розчин мил і мийних засобів). Холодцеподібні осадки, які утворюються під час коагуляції ліофобних золів ($\text{Fe}(\text{OH})_3$, H_2SiO_3 тощо) відносять до *коагелів*. Вони, як правило, складаються з частинок дисперсної фази різного розміру. За будовою частинок, що утворюють каркас, характером та міцністю зв'язків розрізняють еластичні (органічного походження) та нееластичні (неорганічного походження) гелі. Гелі ділять на природні та штучні. Прикладом перших є желатин, агар-агар, тканини і клітини тварин та рослин. Штучні гелі – це синтетичні каучуки, нітроцелюлоза, ацетилцелюлоза тощо. Еластичні гелі називають *драглями*.

Робота 1. Одержання гелю желатину методом драглювання

Драглювання – процес перетворення легкорухливої або малотекучої рідини у гелі або драгли, що мають еластичність, пружність і пластичність. Цим методом одержують гелі ліофобних колоїдно-дисперсних систем і розчинів ВМС. Сполучення колоїдних частинок у каркас може бути неміцним, тому незначне струшування системи призводить до руйнування гелю і відновлення золю, які через деякий час можуть перетворитися в гель. Здатність дисперсних систем відновлювати вихідну структуру, зруйновану механічним втручанням, називається *тиксотропією*.

Хід роботи. У колбочку насипають 4 г желатину і додають 20 мл води. Залишають суміш на 5–10 хв. До набухлої суміші додають 30 мл води і нагрівають до кипіння. Розчин, що утворився, ділять навпіл. Одну частину виливають в чашку Петрі. Через певний час розчин тужавіє.

Робота 2. Залежність часу драглювання від температури та концентрації розчину

Процес переходу золю або розчину ВМС у гель залежить від багатьох факторів. З пониженням температури золю зменшується швидкість дифузії його частинок, сповільнюється броунівський рух, виникають і зміцнюються міжмолекулярні контакти, формуються просторові комірки каркасу. З підвищення концентрації золю або розчину ВМС прискорюється утворення гелю.

Хід роботи. Для роботи використовують 8 % розчин желатину із попередньої роботи. Беруть 3 пробірки. У першу пробірку наливають 6 мл розчину желатину, у другу – 4 мл, у третю – 2 мл. До вмісту другої пробірки додають 4 мл, а до третьої – 6 мл води. Одержують розчини із концентрацією желатину 8 %, 4 і 2 %. Поміщають пробірки у холодну воду (10 °С) і визначають час драглювання (желатинування) за утворенням невитікаючого гелю. Пробірки нагрівають до 40 °С до плавлення їх вмісту. Поміщають пробірки у льодяну воду (0 °С) і визначають час драглювання.

Спостерігають закономірність: чим нижча температура і вища концентрація розчину, тим швидше відбувається желатинування.

Робота 3. Набухання зерна

Набухання – збільшення об'єму твердого тіла в результаті вибіркового поглинання ним із навколишнього середовища рідини або вологи (пари). Ступінь набухання залежить від природи дисперсної фази та дисперсійного середовища, температури, рН, наявності домішок тощо. Набухання має велике значення у багатьох фізіологічних процесах, що проходять у живих організмах. Наприклад, проростанню зерна передують набухання. Перетравлювання кормів розпочинається з їх набухання під дією травних соків. Ступінь набухання залежить від реакції середовища. У гелях білка мінімум набухання спостерігається при ІЕТ.

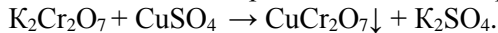
Хід роботи. У скляну лійку з фільтром поміщають кашку із гіпсу. В неї вносять декілька бобів гороху. Через 10 хв, коли гіпс

затвердіє, його виймають і ставлять у чашку Петрі вершиною до верха. Через деякий час (1–3 год) гіпсовий блок руйнується внаслідок набухання гороху.

Робота 4. Одержання кілець Лізеганга

Для гелів характерні ті ж властивості, що й для золів. Вони проявляються дещо по-іншому – відбивається наявність у системі каркасної структури. Дифузія у гелях відбувається своєрідно. Тут спостерігається періодичність відкладення осадів у ході реакцій обмінного розкладу. Це явище було вивчено німецьким хіміком Р. Лізегангом (1896), тому концентричні кола одержали назву кілець Лізеганга.

Хід роботи. Готують 1% розчин агар-агару кип'ятінням у воді протягом 5–8 хв. Додають однакову кількість 1% розчину $K_2Cr_2O_7$. Гарячу суміш виливають у пробірки на три четверті їх об'єму і охолоджують. Після утворення гелю в пробірки наливають декілька крапель 1% розчину сульфату купруму. Виникають концентричні кільця осаду, які направлені до дна пробірки. Формування кілець продовжується впродовж кількох років. Відбувається дифузія двох розчинених речовин – виникає забарвлений осад дисперсної фази:



Робота 5. Синерезис гелю (згустку) крові

Із часом гелі старіють, їх поверхня покривається крапельками і шарами збідненого розчиною речовиною дисперсійного середовища. Виникає ущільнений гель і рідкий золь. Це явище називається *синерезисом*. Синерезис відбувається в гелях гідроксидів і солей, білків та полісахаридів, спостерігається під час згортання крові, скисання молока, черствіння хліба. Позитивним синерезисом є виділення сироватки у процесі приготування сирів.

Хід роботи. У вузьку пробірку наливають 1 мл крові. Проходить її згортання – утворюється кров'яний згусток, що являє собою гель, утворений із ниток фібрину і формених елементів крові.

Контрольні питання

1. Що таке гелі? 2. Яке значення гелів в живій природі, харчовій промисловості, побуті, тваринництві, ветеринарії. 3. У чому полягає суть одержання гелів за допомогою драглювання та набухання? 4. Охарактеризуйте основні фізико-хімічні властивості гелів. 5. У чому полягає суть старіння гелів?

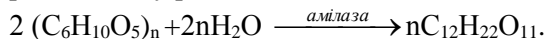
III. ЗАГАЛЬНА БІОХІМІЯ

Загальна біохімія вивчає біохімічні процеси, що відбуваються в організмах людини, тварин, рослин, мікробів і вірусів, обумовлюючи їх життєдіяльність. Ці процеси характеризуються подібними хімічними реакціями анаболізму і катаболізму, спільними для всіх живих організмів. Для різних організмів характерні особливості, які обумовлені їх місцем у філогенетичному ряді, умовами існування, експлуатації, віком, породою і навіть лінією. Загальна біохімія вивчає закономірності обміну у тваринному організмі основних поживних речовин – вуглеводів, ліпідів, білків, нуклеїнових кислот, вітамінів, ферментів, води та мінеральних сполук. Обмін цих сполук здебільшого відбувається у чотири етапи: перетравлювання, всмоктування, проміжний і кінцевий обміни. За допомогою окремих біохімічних методик вивчають механізми перебігу реакцій обміну речовин у тваринному організмі та їх регуляцію залозами внутрішньої секреції (гормонами) та біологічно активними сполуками (ферментами, вітамінами тощо).

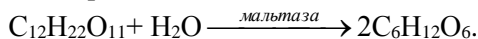
1. ХІМІЯ ТА ОБМІН ВУГЛЕВОДІВ

Вуглеводи – головна складова частина раціону абсолютної більшості тварин. Зокрема, у жуйних (корови, вівці, кози, верблюди) вуглеводи складають більше 90 % сухої маси раціону. За добу людина повинна в середньому споживати більше 500 г вуглеводів. Вуглеводи представлені моно-, ди- і полісахаридами. Головними полісахаридами корму рослинного походження є клітковина і крохмаль. У шлунково-кишковому тракті полісахариди під дією ферментів тваринного і мікробного походження розщеплюються до моносахаридів. Ферменти, що гідролізують складні вуглеводи, належать до класу гідролаз підкласу глікозидаз.

Перетравлювання вуглеводів розпочинається у ротовій порожнині під дією ферментів слини амілази і мальтази. Так, корми, що містять у своєму складі полісахариди крохмаль, інулін і глікоген, підлягають гідролітичному розщепленню:

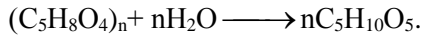


Мальтоза під впливом ферменту мальтази розщеплюється до двох молекул моносахаридів:



Найвища активність амілази у слині людини і мавп, найнижча – у собак і кішок.

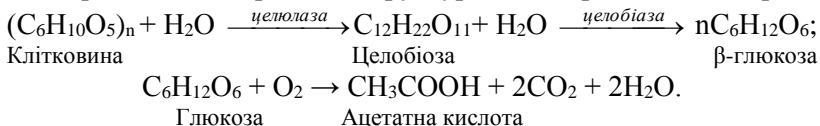
У ротовій порожнині корми знаходяться недовго (1–5 хв). Потім вони через глотку, стравохід і шлунок направляються в тонкий відділ кишечника, де і закінчується перетравлення під впливом ферментів підшлункової залози і кишечника – амілази, мальтази, інвертази і лактази. Із полісахаридів і дисахаридів кормів під дією цих ферментів утворюються моносахариди: глюкоза, фруктоза, галактоза тощо. Певна частина моносахаридів і дисахаридів утворюється під час розщеплення інших складних цукрів, у тому числі пентозанів. Це, в основному, пентози – рибоза, дезоксирибоза, ксилоза, арабіноза, ксилулоза та інші:



Деяка частина пентоз (рибоза і дезоксирибоза) утворюються за рахунок гідролізу нуклеопротейдів і нуклеїнових кислот кормів.

Клітковина, що міститься у рослинних кормах, у шлунково-кишковому тракті більшості сільськогосподарських тварин, за винятком жуйних, не розщеплюється (відсутні ферменти) і не засвоюється. У жуйних тварин кормові маси з ротової порожнини надходять по стравоходу в передшлунки (в усіх жуйних – рубець, сітку, книжку, у верблюдов – рубець та сітку), потім – у сичуг.

У передшлунках клітковина під впливом ферментів, що синтезуються симбіозними мікроорганізмами (бактеріями, актиноміцетами, дріжджами, мікроскопічними грибами, водоростями), спочатку розщеплюється до целобіози, потім до β-глюкози, потім до низькомолекулярних жирних кислот, які всмоктуються слизовими оболонками шлунково-кишкового тракту, після чого використовуються організмом тварин для структурних і енергетичних потреб:



Другий етап обміну вуглеводів – всмоктання переважно проходить у тонкому відділі кишечника. Моносахариди, певна частина продуктів перетравлення клітковини (низькомолекулярні жирні кислоти) всмоктуються слизовою оболонкою передшлунків. Близько 10 % моносахаридів всмоктуються слизовою оболонкою шлунка. У тонкому відділі кишечника частина моносахаридів (фруктоза,

галактоза, маноза) таутомеризуються у глюкозу. Моносахариди у вигляді фосфатів і частково у вільному стані через систему ворітної вени надходять у печінку. У печінці відбувається біосинтез глікогену, інших біологічно важливих речовин. Зокрема, у людей 3–5 % глюкози крові використовується для біосинтезу глікогену, 30–35 % – ліпідів, 60–70 % є джерелом хімічної енергії, яка використовується для потреб клітин, тканин, органів та організму в цілому. В усіх клітинах організму відбувається проміжний обмін вуглеводів.

Якщо тварина переважно вживає рослинний корм, то на біосинтез глікогену в середньому використовується до 10–12 % глюкози, яка всмокталась у кров, і близько 40 % витрачається на біосинтез жирів та інших речовин. У крові людини і тварин знаходиться певна кількість глюкози, яка є показником гомеостазу організму і використовується як діагностичний тест для оцінки стану обміну речовин у клінічно здорових і хворих організмів. Зокрема, кількість глюкози у крові великої рогатої худоби становить 2,22–6,11 ммоль/л; овець та кіз – 2,22–3,61; коней – 3,33–6,11; свиней – 2,22–13,87; курей – 7,21–14,49 ммоль/л.

У клітинах і тканинах безперервно відбувається біосинтез різних вуглеводів, їх перетворення і розпад зі звільненням хімічної енергії. Зокрема, під час розпаду 1 г глікогену звільняється близько 15756 кДж енергії, яка використовується для енергетичних і пластичних потреб організму, його органів, тканин і клітин. Розпад вуглеводів проходить двома взаємозв'язаними шляхами: анаеробним і аеробним. Частина вуглеводів у тканинах і клітинах розпадаються іншими біохімічними шляхами, переважно за допомогою апотомічного, або пентозофосфатного шляху окиснення вуглеводів.

Останній етап обміну вуглеводів – кінцевий, або виділення продуктів метаболізму. Продукти обміну в основному виділяються через нирки (утворення складових частин сечі), потові залози (у складі поту) та товстий відділ кишечника (із калом).

Вуглеводний обмін, як і обмін інших поживних речовин, регулюється нервовою системою, гормонально, переважно гормонами підшлункової залози (інсуліном і глюкагоном) і надниркових залоз (адреналіном, норадреналіном і глюкостероїдами). Різноманітні порушення вуглеводного обміну, в основному патологічного характеру (*гіпоглікемія, гіперглікемія та глюкозурія*), у клінічній лабораторній практиці досліджуються біохімічними методами.

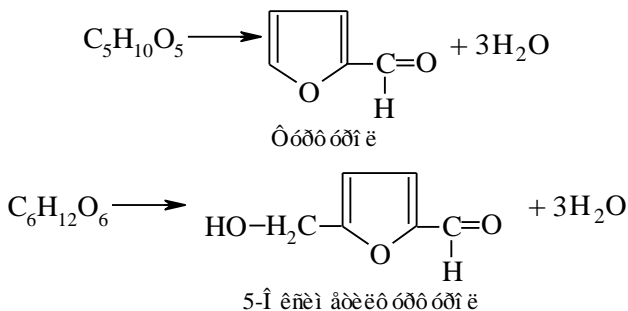
Для оцінки характеру та інтенсивності вуглеводного обміну у здоровому і хворому організмі часто використовують якісні та кількісні дослідження хімічних складових частин сечі, рідше – калу та слизу. Під час оцінки стану вуглеводного обміну виникає необхідність виявлення вуглеводів в окремих субстратах, визначення їх кількості, оцінки діяльності окремих ланок вуглеводного обміну.

Робота 1. Загальна реакція на вуглеводи з α -нафтолом

α -Нафтол вступає в реакцію конденсації з продуктами розпаду вуглеводів, які належать до різних груп.

Хід роботи. Беруть чотири пробірки. У першу пробірку наливають 1 мл 1 % розчину глюкози, у другу – 1 % розчину сахарози, у третю – 1 % розчину крохмалю, у четверту – 1 мл води і вносять маленький шматочок паперу (чиста клітковина, розмір паперу – 2–3 мм). У кожену пробірку додають по 2 краплі свіжого 10 % розчину α -нафтолу. Потім обережно по стінках пробірок наливають 1,0–1,5 мл концентрованої сульфатної кислоти, не допускаючи змішування її з водою. На межі двох шарів виникає фіолетове кільце, яке свідчить про наявність у розчині вуглеводів. Якщо суміш збовтати, то по всьому її об'єму виникає фіолетове забарвлення і відбувається значне нагрівання. У пробірках із крохмалем і клітковиною забарвлення виникає через 10–15 хв.

Затримка у виникненні забарвлення у третій та четвертій пробірках пояснюється тим, що у них проходить гідроліз полісахаридів (під впливом концентрованої сульфатної кислоти) до моносахаридів через ряд стадій. Після утворення моносахаридів (α -D- і β -D-глюкоз) відбувається їх перетворення в 5-оксиметилфурфурол, який після реакції з α -нафтолом конденсується у фіолетовий продукт реакції зі складною будовою молекул:



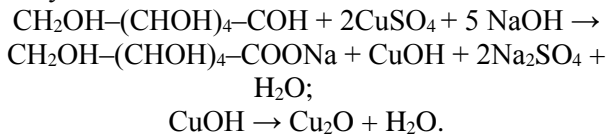
Робота 2. Якісні реакції на моносахариди

Вуглеводи – багатоатомні альдегідо- або кетоспирти (альдози і кетози). Відкриття у субстратах вуглеводів ґрунтується на взаємодії функціональних груп із різноманітними реагентами. Моносахариди можуть окиснюватися до відповідних кислот, при цьому відновлювати метали з їх солей та оксидів.

Взаємодія моносахаридів із гідроксидом купруму (реакція Троммера)

Хід роботи. У пробірку наливають 2–3 мл глюкози, додають 1 мл 10 % розчину сульфату купруму та 0,2 мл 10 % розчину гідроксиду натрію. Нагрівають верхній шар. У ньому виникає червоний осад оксиду купруму (I).

У лужному середовищі альдози відновлюють метали з їх оксидів, а самі при цьому окиснюються до відповідних альдонових кислот:



Взаємодія моносахаридів з купрум-тартратним комплексом (реакція Фелінга)

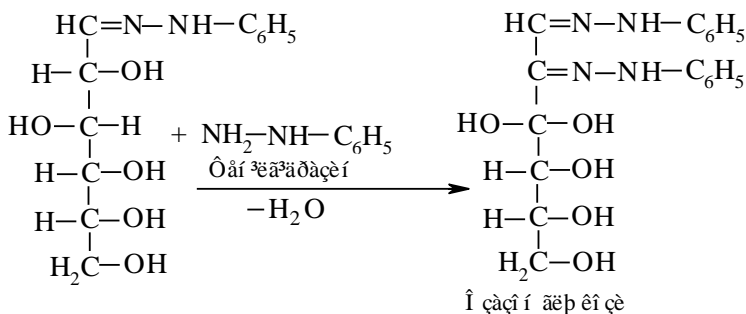
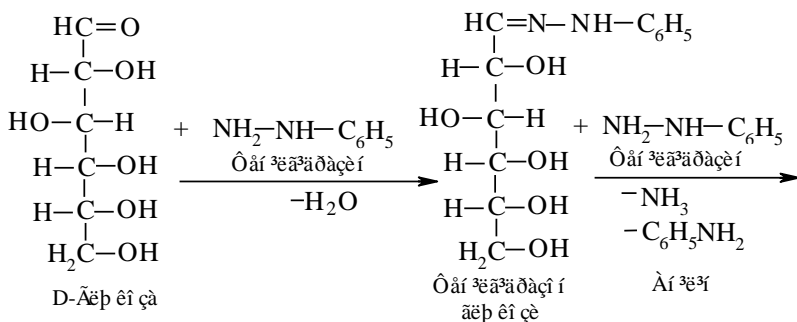
Хід роботи. У пробірку наливають 1–2 мл 30 % розчину гідроксиду натрію, 0,5 мл 2 % розчину сульфату купруму і 2–3 мл 10 % розчину сегнетової солі (калій-натрій тартратнокислий) і 0,5 мл 1 % розчину глюкози. Нагрівають. На дні пробірки утворюється темно-коричневий осад оксиду купруму (I).

Хімізм реакції аналогічний попередній роботі. Перевагою реактиву Фелінга є те, що купрум у надлишку реактиву не випадає в осад у вигляді $\text{Cu}(\text{OH})_2$.

Взаємодія моносахаридів із фенілгідазином (одержання озозанів)

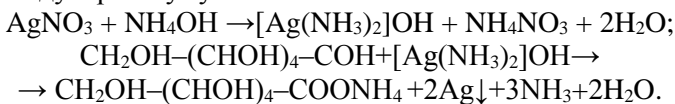
Хід роботи. У пробірку наливають 5 мл 5 % розчину глюкози, 0,3 мл льодяної ацетатної кислоти і 0,2 мл розчину фенілгідазину. Нагрівають у водяній бані. На дні пробірки утворюється жовтий кристалічний осад озозанів.

Реакція відбувається у три стадії:



Взаємодія моносахаридів з аміачним розчином оксиду аргентуму (реакція „срібного дзеркала”)

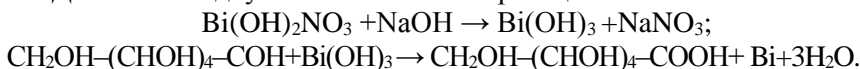
Хід роботи. У пробірку наливають 1–2 мл 3 % розчину нітрату аргентуму і краплями, до повного розчинення утвореного при цьому осаду, додають концентрований аміак. Потім до суміші додають 2 мл 5 % розчину глюкози. Обережно нагрівають. Спостерігають за появою на стінках металічного срібла або випадання чорного осаду Аргентуму:



Взаємодія моносахаридів із солями вісмуту (реакція Ніландера)

Хід роботи. У пробірку наливають 3 мл 5 % розчину глюкози, 1 мл 5 % розчину гідроксиду натрію та на кінчику шпателью нітрат гідроксиду вісмуту. Обережно нагрівають. На дні пробірки утворюється чорний осад металічного Вісмуту.

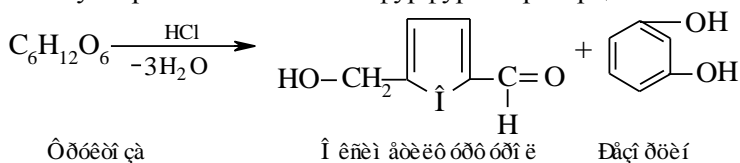
Дані зміни відбуваються за такими реакціями:



Виявлення фруктози реакцією Селіванова

Хід роботи. У пробірку наливають 3 мл 5 % розчину фруктози і додають 1 мл реактиву Селіванова (розчин резорцину у хлоридній кислоті). Нагрівають у водяній бані. З'являється вишнево-червоне забарвлення.

Під час нагрівання фруктози чи інших кетоз із хлоридною кислотою утворюється оксиметилфурфурол і резорцин:



Взаємодія моносахаридів з оцтовокислим купрумом (реакція Барфедда)

Хід роботи. У пробірку наливають 3 мл 5 % розчину глюкози і вносять 3 мл реактиву Барфедда (6,7 г оцтовокислого купруму розчинити у 100 мл води і долити 1 мл концентрованої ацетатної кислоти) та нагрівають. На дні пробірки утворюється темно-коричневий осад оксиду купруму:



Робота 3. Якісні реакції дисахаридів

Дисахариди за типом зв'язків класифікують на відновлювальні (мальтозний тип) і невідновлювальні (трегалозний тип). У відновлюючих дисахаридів зберігається вільний глюкозидний гідроксил, який за таутомерії здатний перетворюватися в альдегідну групу і вступати у реакції, які характерні для альдоз.

Взаємодія дисахаридів з мідно-тартратним комплексом (реакція Фелінга)

Хід роботи. У три пробірки окремо вносять по 2–3 мл розчинів сахарози, мальтози, лактози. У кожную пробірку додають по 2–3 мл реактиву Фелінга. Всі пробірки ставлять на 2–3 хв у киплячу воду баню. Відмічають, які дисахариди відновлюють гідроксид купруму.

У лужному середовищі відновлювальні дисахариди відновлюють метали, а самі при цьому окиснюються до відповідних біоно-вих кислот (хімізм див. у роботі 2).

Якісна реакція на сахарозу

Хід роботи. У пробірку наливають 2–3 мл 10 % розчину сахарози. Додають декілька крапель водного розчину нітрату кобальту (1:50) і в надлишку 10 % розчину NaOH з'являється фіолетове забарвлення.

Інверсія сахарози

Хід роботи. У пробірку наливають 2–5 мл 10 % розчину сахарози, додають 1 мл 10 % розчину сульфатної кислоти. Суміш перемішують і кип'ячать упродовж 5 хв. Охолоджений гідролізат ділять навпіл. У першу пробірку додають 10 % розчин NaOH до виникнення нейтрального середовища (контролюють лакмусовим папірцем). Проводять реакцію Троммера для відкриття глюкози. У другу пробірку додають 1 мл реактиву Селіванова і відкривають фруктозу.

Робота 4. Кольорова реакція виявлення глікогену і крохмалю

Крохмаль – головний резервний полісахарид, що утворюється у хлоропластах і амілопластах, відкладається у клітинах рослин у вигляді крохмальних зерен, міститься у насінні, бульбах, коренях і цибулинах. Крохмаль – важлива поживна речовина для тварин і людини. Зерно рису містить близько 80 % крохмалю, пшениці – 75, кукурудзи – 72, жита – 70, ячменю – 65, вівса – 56, проса – 57, бульби картоплі 12–25 %. Крохмаль складається із двох фракцій: амілози і амілопектину. Молекула амілози має лінійну структуру, складається з 200–1000 залишків глюкози, з'єднаних між собою глікозидними зв'язками за типом 1,4. Із Йодом утворює темно-синє забарвлення. Амілопектин має розгалужену молекулу, що побудована з 5000–6000 залишків α -D-глюкози, з'єднаних між собою за типом 1,4 та 1,6. Молекулярна маса амілози – 20 тис., амілопектину – 100 тис. Калорійність крохмалю висока – близько 20 кДж/г.

Глікоген – тваринний крохмаль, цінна енергетична речовина тканин і клітин організму тварин і людини. Молекула глікогену побудована з 2400–300000 залишків молекул α -D-глюкози, при цьому молекулярна маса становить від 400 тис. до 50 млн. Із розчином Йоду утворює червоно-фіолетове забарвлення.

Хід роботи. Беруть дві пробірки. У першу з них наливають 2–5 мл 1 % розчину крохмалю, у другу – 1 % розчину глікогену. У першу пробірку додають 1 краплю розчину Люголя (у 100 мл дистильованої води розчиняють 20 г йодиду калію та 10 г кристалічного Йоду). Виникає синє забарвлення. Вміст пробірки ділять на три частини і поміщають в окремі три пробірки. У першу з них додають 1–2 мл 10 % розчину гідроксиду натрію, у другу 2–3 мл 40 % етилового спирту, третю пробірку залишають без змін. Усі три пробірки нагрівають у водяній бані за температури 80–100 °С протягом кількох хвилин. У всіх трьох пробірках зникає синє забарвлення. Пробірки охолоджують. Через деякий час у третій пробірці з'являється синє забарвлення.

У пробірку з розчином глікогену додають 1–2 краплі розчину Люголя. Перемішують. Виникає червоно-буре забарвлення. Після додавання декількох кристаликів хлориду натрію забарвлення стає більш інтенсивним, а двох-трьох крапель 10 % розчину гідроксиду – зникає. Зникнення забарвлення спостерігається під час нагрівання, а відновлення – після охолодження.

Забарвлення розчинів полісахаридів після додавання розчину Йоду обумовлене виникненням комплексної сполуки полісахаридів у результаті абсорбції молекулами крохмалю і глікогену молекул Йоду. Зникнення забарвлення після нагрівання обумовлено процесом десорбції, відновлення після охолодження – адсорбцією.

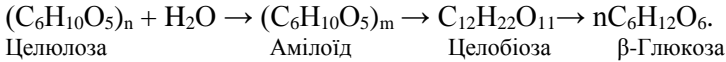
Робота 5. Гідроліз клітковини

Клітковина або *целюлоза* – полісахариди рослин, які формують основу оболонок клітин. У листках рослин міститься до 30 %, у деревині – до 40–70, у волокнах бавовни – до 95–98 % чистої клітковини. Клітковина – хімічна основа кожного рослинного корму. Молекула клітковини складається з 6–12 тис. залишків β -глюкози. У передшлунках жуйних клітковина під впливом мікробних ферментів целюлози і целобіози гідролізується до β -D-глюкози, яка піддається різним видам бродіння (спиртовому, оцтовокислому, молочнокислому, маслянокислому тощо). При цьому утворюються жирні кислоти, які всмоктуються слизовими оболонками передшлунків. Вони використовуються тканинами і клітинами організму для структурних і енергетичних потреб організму. Ферментативне

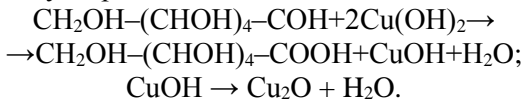
розщеплення клітковини до β -D-глюкози можна проводити помірною дією на неї мінеральних кислот, зокрема, сульфатною.

Хід роботи. У пробірку поміщають шматочок вати і заливають розчином сульфатної кислоти. Через 15–20 хв вата розчиняється. Розчин розводять у 10–15 разів і кип'ятять. Відбувається гідроліз клітковини. Розчин нейтралізується 40 % розчином гідроксиду натрію. Після нейтралізації суміш доводять до лужної реакції середовища додаванням лугу. Додають декілька крапель 1 % розчину сульфату купруму. Нагрівають. На дні пробірки випадає жовтий осад гідроксиду купруму, або червоний осад оксиду купруму (І).

За тривалого кип'ятіння (близько години) відбувається повний гідроліз клітковини до β -D-глюкози:



Надалі β -D-глюкоза вступає в реакцію з гідроксидом купруму, що призводить до утворення глюконової кислоти:



Робота 6. Перетравлювання вуглеводів

Вуглеводи корму в кишково-шлунковому тракті під впливом ферментів слини, підшлункової залози і кишкового соку перетравлюються до моносахаридів – пентоз і гексоз. В епітеліальному шарі слизової оболонки кишечника значна кількість фруктози, галактози, манози та деяких інших гексоз таутомеризується у глюкозу. Моносахариди у вигляді фосфатів або в чистому вигляді засвоюються слизовою оболонкою кишечника, надходять у систему ворітної вени та печінку, де відбувається їх “розподілення” для різноманітних пластичних і енергетичних потреб організму.

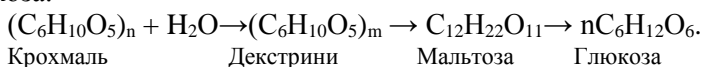
Хід роботи. У вісім пробірок восять розчини за схемою (табл. 7):

Таблиця 7

Компоненти	№ пробірки							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1 % розчин крохмалю, мл	1,0	–	1,0	–	1,0	–	1,0	–
Суспензія целюлози, мл	–	1,0	–	1,0	–	1,0	–	1,0
Слина, мл	1,0	1,0	–	–	1,0	1,0	–	–
Шлунковий сік, мл	–	–	1,0	1,0	1,0	1,0	–	–
Панкреатин, мл	–	–	–	–	–	–	2,0	2,0

Усі пробірки переносять на 30 хв у термостат за температури 37 °С. Після цього з усіма пробірками проводять реакцію Троммера на виявлення мальтози (у випадку целюлози – целобіози) і глюкози. Для цього у кожену пробірку наливають по 1–2 мл 10 % розчину гідроксиду натрію і додають по 5–6 крапель 1 % розчину сульфату купруму. Суміш перемішують і протягом 1–2 хв нагрівають у водній бані або на газовому пальнику. Поява червоного осаду оксиду купруму свідчить про наявність у пробірці глюкози і мальтози.

За ферментативного гідролізу крохмалю утворюються спочатку декстрини (аміло-, еритро-, ахро- і мальтозодекстрини), мальтоза і глюкоза:



Мальтозу виявляють за допомогою реакції Троммера (див. попередні роботи).

Робота 7. Визначення вмісту цукру в крові за методом Хагедорн-Інсена

Цукор у крові в основному представлений глюкозою, частково – фруктозою й глікогеном. Уміст цукру у різних тварин різний. Його вміст залежить від виду, віку, статі, фізіологічного стану організму тощо (табл. 8).

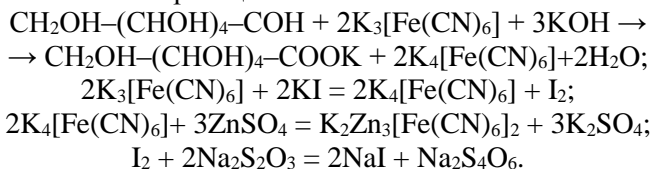
Таблиця 8 – Вміст цукру у крові різних видів тварин

Тварина	Вміст глюкози, ммоль/л	Тварина	Вміст глюкози, ммоль/л
Кінь	3,33–6,11	Курка	7,21–14,49
Корова	2,22–6,11	Індичка	7,21–11,65
Вівця	2,22–3,61	Качка, гуска	8,32–10,22
Коза	2,22–3,61	Собака	3,38–5,56
Свиня	2,22–13,87		

Вивчення кількості цукру в крові дозволяє одержати уявлення про стан вуглеводного обміну в організмі. Наприклад, збільшення кількості цукру в крові свідчить про *гіперглікемію*, яка часто настає у разі захворювання цукровим діабетом. Зменшення кількості цукру в крові (*гіпоглікемія*) свідчить про недостатність глікогенсинтезуючої функції печінки, що проявляється за гепатитів.

Хід роботи. У дві пробірки наливають по 1 мл 0,1 н розчину їдкого натрію і додають по 5 мл 0,45 % розчину сульфату цинку. Утворюється коагулянт – драглистий осад гідроксиду цинку.

З вуха кроля мікропіпеткою набирають 0,1 мл крові, старанно витирають кінчик піпетки ватою і видувають кров у першу пробірку з гідроксидом цинку. Мікропіпетку тричі промивають вмістом пробірки, періодично набираючи в неї і випускаючи одержану суміш. У другу пробірку, що є контролем (“сліпа” проба), наливають 0,1 мл дистильованої води. Обидві пробірки поміщають у киплячу водяну баню на 3–5 хв. Уміст кожної пробірки фільтрують через попередньо промиту гарячою водою вату або паперовий фільтр. Пробірки двічі промивають дистильованою водою (2 мл) і фільтрують через цю ж вату у відповідні склянки. Після цього до кожного фільтрату доливають із мікробюретки по 2 мл 0,005 н гексаціаноферату (III) калію, і ставлять обидві склянки на 15 хв у киплячу водяну баню. Потім склянки охолоджують і в кожну доливають по 3 мл потрібного хлор-цинк-йодистого розчину та по 2 мл 3 % розчину оцтової кислоти. Рідина жовтіє від Йоду, який виділився. У кожну склянку додають по 2 краплі крохмалю і титрують 0,005 н розчином тіосульфату натрію з мікробюретки до зникнення синього забарвлення. Хімізм реакцій:



Роблять розрахунки, користуючись наведеною нижче таблицею 9. Наприклад, на титрування контрольної склянки витратили 1,9 мл $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, що відповідає 0,017 мг цукру (за таблицею). На титрування дослідної склянки витратили 0,82 мл $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, що відповідає 0,209 мг цукру. Із кількості цукру, знайденого для дослідної проби (0,209), віднімають число, знайдене для контрольної проби (0,017), і одержують 0,192 мг.

Таким чином, в 0,1 мл крові міститься 0,192 мг глюкози, а в 100 мл крові 192 мг глюкози, або 192 мг%. Для переведення мг% у ммоль/л необхідно величину у мг% помножити на коефіцієнт 0,5551:

$$192 \text{ мг}\% \times 0,5551 = 106,58 \text{ ммоль/л.}$$

Таблиця 9 – Визначення вмісту цукру у крові за Хагедорн-Іенсеном

Na ₂ S ₂ O ₃ , мл	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
0,0	0,385	0,382	0,379	0,376	0,373	0,370	0,367	0,364	0,361	0,358
0,1	0,355	0,352	0,350	0,348	0,345	0,343	0,341	0,338	0,336	0,333
0,2	0,331	0,329	0,327	0,325	0,332	0,321	0,318	0,316	0,314	0,312
0,3	0,310	0,308	0,306	0,304	0,302	0,300	0,298	0,296	0,294	0,292
0,4	0,290	0,288	0,286	0,284	0,282	0,280	0,278	0,276	0,274	0,272
0,5	0,270	0,268	0,266	0,264	0,262	0,260	0,259	0,257	0,255	0,253
0,6	0,251	0,249	0,247	0,245	0,243	0,241	0,240	0,238	0,236	0,234
0,7	0,232	0,230	0,228	0,226	0,224	0,222	0,221	0,219	0,217	0,215
0,8	0,213	0,211	0,209	0,208	0,206	0,204	0,202	0,200	0,199	0,197
0,9	0,195	0,193	0,191	0,190	0,188	0,186	0,184	0,182	0,181	0,179
1,0	0,177	0,175	0,173	0,172	0,170	0,168	0,166	0,164	0,163	0,161
1,1	0,159	0,157	0,155	0,154	0,152	0,150	0,148	0,146	0,145	0,143
1,2	0,141	0,139	0,138	0,136	0,134	0,132	0,131	0,129	0,127	0,125
1,3	0,124	0,122	0,120	0,119	0,117	0,115	0,113	0,111	0,110	0,108
1,4	0,106	0,104	0,102	0,101	0,099	0,097	0,095	0,093	0,092	0,090
1,5	0,088	0,086	0,084	0,083	0,081	0,079	0,077	0,075	0,074	0,072
1,6	0,070	0,068	0,066	0,065	0,063	0,061	0,059	0,057	0,056	0,054
1,7	0,052	0,050	0,048	0,047	0,045	0,043	0,041	0,039	0,038	0,036
1,8	0,034	0,032	0,031	0,027	0,026	0,025	0,024	0,022	0,020	0,019
1,9	0,017	0,015	0,014	0,012	0,010	0,008	0,007	0,005	0,003	0,002

Робота 8. Кількісне визначення цукру в крові за Покровським та Крайко

Хід роботи. У дослідну пробірку беруть 1 мл води, 0,05 мл крові та залишають на 5 хв для гемолізу. Потім додають 5 крапель насиченого розчину пікринової кислоти, старанно перемішують і центрифугують 10 хв за 4000 об/хв. До центрифугату додають 5 крапель 10 % розчину гідроксиду натрію і поміщають у киплячу водяну баню на 3 хв. Після охолодження колориметрують на ФЕК (рис. 7) із зеленим світлофільтром.



Рис. 7. Фотоелектроколориметр.

Для побудови калібрувальної кривої готують стандартні розчини глюкози. Спочатку готують вихідний розчин глюкози: у мірній колбі розчиняють 0,2 г глюкози на 100 мл дистильованої води. Для одержання розчину глюкози різної концентрації роблять розведення вихідного розчину в 10-ти пробірках згідно із вказівками табл. 10:

Таблиця 10

№ пробірки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Розчин глюкози, мл	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,5	5,5	6,0
Дистильована вода, мл	8,5	8,0	7,5	7,0	6,5	6,0	5,5	5,0	4,5	4,0
Вміст глюкози, мг%	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120

Стандартні розчини оброблюють аналогічно дослідним.

Результат. Спочатку знаходять оптичну густину розчину. За калібрувальною кривою визначають вміст цукру в мг%. Знайдену величину множать на коефіцієнт 0,0555. Одержаний результат виражає вміст глюкози в ммоль/л.

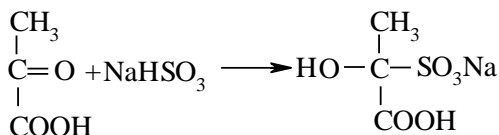
Робота 9. Кількісне визначення піровиноградної кислоти в біологічних рідинах

Піровиноградна кислота займає центральне місце у ході метаболічних реакцій. Вона є своєрідною з'єднувальною ланкою між обміном білків, жирів і вуглеводів. Піровиноградна кислота – кінцевий продукт анаеробної фази і початковий продукт аеробної фази розщеплення вуглеводів. Її кількість змінюється у разі уражень печінки, гіповітамінозів. Середній вміст піровиноградної кислоти у крові становить 0,11–0,17 ммоль/л.

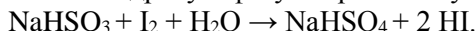
Хід роботи. У колбу вносять 1 мл дослідної біологічної рідини (наприклад, сечі або сироватки крові) і додають 0,5 мл 0,1 % розчину 2,4-динітрофенілгідразину в 2 н розчині НСІ. Вміст колби перемішують і додають 25 мл толуену та інтенсивно струшують. Після розділення рідин із верхнього шару, що містить толуен, відбирають 1 мл розчину і переносять у пробірку, в яку влито 2 мл 2,5 % спиртового розчину КОН і знову перемішують. Розчин набуває червоно-оранжевого забарвлення. Через 10 хв проби колориметрують проти контролю із синім світлофільтром. Контрольна проба на реактиви містить 1 мл води замість дослідної рідини. Решту реактивів у контрольну пробу додають у тій же кількості і послідовності, як і в дослідній пробі.

Попередньо проводять аналогічні реакції з такими ж об'ємами реактивів зі стандартними розчинами піровиноградної кислоти. За результатами досліджень будують калібрувальну криву, відкладають на осі ординат концентрацію піровиноградної кислоти, а на осі абсцис – екстинцію стандартних розчинів. Дослідні показники порівнюють із показниками калібрувальної кривої.

Метод ґрунтується на здатності піровиноградної кислоти у кислому середовищі утворювати забарвлені сполуки із гідросульфідом натрію:



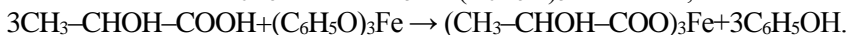
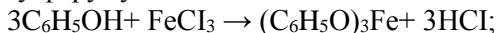
Надлишок внесеного гідросульфату натрію зв'язується Йодом:



Робота 10. Відкриття молочної кислоти в м'язовому екстракті

Молочна (лактатна) кислота у разі окиснення перетворюється у піровиноградну. Вона також утворюється під час зброджування вугледів під впливом молочнокислих бактерій.

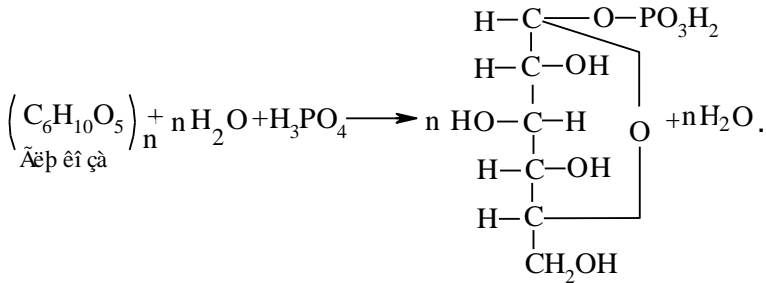
Хід роботи. 30 г м'язів старанно ріжуть ножицями, а потім розтирають у ступці, додаючи невеликими порціями 60–100 мл дистильованої води. Одержану суміш переносять у колбу, струшують впродовж 10 хв і фільтрують через декілька шарів марлі. Потім у дві пробірки наливають по 10 мл розчину фенолу і додають краплями розчин хлориду феруму (III). В результаті реакції утворюється фенолят феруму і виникає фіолетове забарвлення. Потім в одну із пробірок додають екстракт м'язової тканини. Фіолетове забарвлення в цій пробірці переходить у зеленувато-жовте за рахунок утворення лактату феруму:



Робота 11. Використання неорганічного фосфору у реакціях гліколізу і глікогенолізу

Більшість хімічних реакцій, що становлять основу анаеробного і аеробного перетворень вугледів у тканинах і клітинах тварин-

ного організму, пов'язані із приєднанням до різних проміжних продуктів залишків фосфатної кислоти та їх перенесенням з одного субстрату до іншого з утворенням кінцевих макроергічних сполук – АТФ. Так, у результаті цих реакцій з одної молекули глюкози утворюється до 36 молекул АТФ: 2 – за рахунок анаеробного гліколізу, 6 – у результаті окиснення двох молекул НАД· Н+Н⁺, що виникли під час гліколітичної оксиредукції, 30 – за рахунок ЦТК. Першим етапом гліколізу є фосфорилування глюкози під впливом ферменту фосфоглюкокінази з утворенням глюкозо-6-фосфату. Якщо анаеробне розщеплення починається з глікогену, то останній під впливом ферменту фосфорилази і у присутності фосфатної кислоти розщеплюється до глюкозо-1-фосфату:

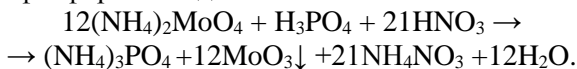


Гліколіз і глікогеноліз супроводжуються зменшенням у тканинах і клітинах кількості неорганічного фосфору, що можна виявити за допомогою ряду хімічних реакцій.

Хід роботи. У дві пробірки наливають по 2 мл 3 % розчину крохмалю (субстрат замість глікогену), по 1 мл 0,1 н розчину фториду натрію (для гальмування подальшого збільшення у пробірках кількості неорганічного фосфату) та по 2 мл фосфатного буферу з рН 7,2. У другу пробірку (контроль) додають 5 мл 10 % розчину трихлорацетатної кислоти (для гальмування ферментативних реакцій). На терезах зважують дві наважки по 100 мг подрібненої м'язової тканини щойно убитої тварини. Наважки переносять в обидві пробірки – дослідну і контрольну, добре перемішують вміст обох пробірок скляними паличками (їх не слід виймати з пробірок). Обидві пробірки ставлять у термостат за температури 37–38 °С, час від часу перемішуючи вміст. Через 30 хв у дослідну пробірку додають 5 мл 10 % розчину трихлорацетатної кислоти. З кожної пробірки

переносять по 2 мл фільтрату у відповідні (дослідну і контрольну) мірні пробірки (з міткою 10 мл) і додають по 1 мл 2,5 % розчину молібдату амонію та по 1 мл 0,1 % розчину аскорбінової кислоти (як відновлювач). Об'єм суміші в обох пробірках доводять дистильованою водою до мітки 10 мл. Через кілька хвилин порівнюють інтенсивність забарвлення в обох пробірках.

М'язова тканина у вигляді фосфатів містить ряд проміжних продуктів обміну вуглеводів (глюкозо-6-фосфат, глюкозо-1-фосфат, фруктозо-1,6-дифосфат, 3-фосфогліцериновий альдегід, діоксіацетонфосфат, 1,3-дифосфогліцеринова кислота, 3-фосфогліцеринова кислота, фосфопіровиноградну кислоту та ін.), а також макроергічні сполуки і продукти їх розщеплення (АТФ, АДФ, АМФ). Під впливом різних ферментів гліколізу і глікогенолізу, а також ЦТК відбувається їх розщеплення з утворенням неорганічних фосфатів, які вступають у реакцію з молібдатом амонію, утворюючи фосфоромолібдат амонію:



Забарвлення вмісту дослідної пробірки менш інтенсивне. У ній менше неорганічного фосфору (фосфатної кислоти), який використовується під час реакцій гліколізу.

Робота 12. Анаеробний гліколіз у м'язовій тканині

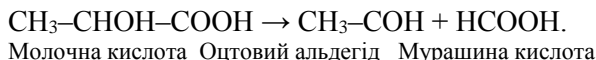
Гліколіз – анаеробний процес перетворення глюкози у тканинах тваринного організму з виділенням хімічної енергії (у вигляді АТФ) та з утворенням молочної кислоти (за достатньої кількості у тканинах кисню кінцевим продуктом гліколізу є піровиноградна кислота). Якщо процес починається з розщеплення глікогену, то його називають *глікогенолізом*. У скелетних м'язах обидва процеси виражені однаковою мірою, у центральній нервовій системі та у міокарді переважає гліколіз. Процес анаеробного розщеплення глюкози і глікогену найбільш активно відбувається у м'язовій тканині, яка і є найбільш зручним об'єктом вивчення цих процесів. Під час розпаду глюкози і глікогену до молочної кислоти звільняється енергія, яка використовується для м'язової роботи і багатьох синтетичних процесів в організмі. Під час гліколізу або глікогенолізу в АТФ акумулюється близько 35–40 % всієї вивільненої хімічної енергії. Решта 60–65 % енергії розсіюється у вигляді теплоти. Коє-

фіцієнт корисної дії анаеробного гліколізу клітин чи тканин дорівнює 0,35–0,40.

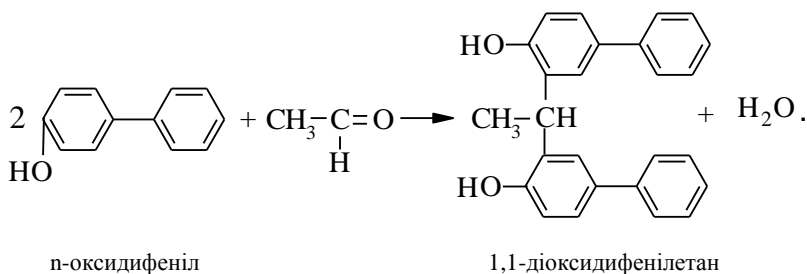
Надалі молочна або піровиноградна кислота, що містить велику кількість хімічної енергії, включається в аеробний шлях окиснення вуглеводів. Під час аеробних перетворень вуглеводи окиснюються до вуглекислого газу і води з вивільненням енергії у вигляді АТФ.

Хід роботи. У дві пробірки (контрольну і дослідну) наливають по 2 мл фосфатного буферного розчину (рН 7,2) і додають по 1 мл 1 % розчину крохмалю. У контрольну пробірку додають 3 мл 10 % розчину трихлорацетатної кислоти (ТХА) як осаджувач та інгібітор ферментів. Беруть шматочок м'яза щойно убитої тварини (миші, щура, морської свинки, кролика або курки) і подрібнюють його ножицями. В обидві пробірки вносять по 0,5 г подрібненої м'язової тканини, перемішують скляною паличкою і ставлять у термостат за 37–38 °С на 30 хв, періодично перемішуючи суміш. У дослідну пробірку наливають 3 мл 10 % розчину трихлорацетатної кислоти і перемішують. У дві чисті пробірки через паперові фільтри фільтрують вміст контрольної і дослідної пробірок. Із кожної пробірки набирають по 1 мл безбілкового фільтрату і переносять у відповідні чисті пробірки з міткою на 5 мл. Після цього до суміші (для осадження вуглеводів) додають по 0,5 мл 20 % розчину сульфату купрум(ІІ) і 0,5 г кристалічного оксиду кальцію (ІІ). Додають дистильовану воду до мітки 5 мл, перемішують скляними паличками. Через 30 хв центрифугують або фільтрують через невеликий паперовий сухий фільтр. Відбирають 0,5 мл центрифугату (або фільтрату) і поміщають у сухі пробірки, охолоджуючи у воді з льодом. В обидві пробірки додають по одній краплі 4 % розчину сульфату купрум(ІІ), потім, не припиняючи охолодження льодом, поступово краплями доливають 3 мл концентрованої сульфатної кислоти. Обидві пробірки переносять на 5 хв у киплячу водяну баню. Охолоджують. У кожну пробірку із мікропіпетки додають по 0,1 мл розчину параоксидифенілу (0,1 г параоксидифенілу розчиняють у 1 мл 5 % розчину їдкового натрію і доливають 9 мл дистильованої води) і ставлять у термостат на 30 хв за температури 37 °С. Потім пробірки переносять на 2 хв у киплячу воду. Виникає фіолетове забарвлення, більш інтенсивне у дослідній пробірці, де є значна кількість молочної кислоти.

Молочна кислота, яка утворюється під час глікогенолізу або гліколізу, виявляється у безбілковому фільтраті після осадження білків розчином трихлорацетатної кислоти. Надалі відбувається звичайне осадження полісахаридів розчином сульфату купруму і кристалічним оксидом кальцію. Під впливом концентрованої сульфатної кислоти і розчину сульфату купруму молочна кислота розкладається з утворенням ацетатного альдегіду і мурашиної кислоти:



Оцтовий альдегід у разі взаємодії з п-оксидифенілом утворює 1,1-діоксидифенілетан:



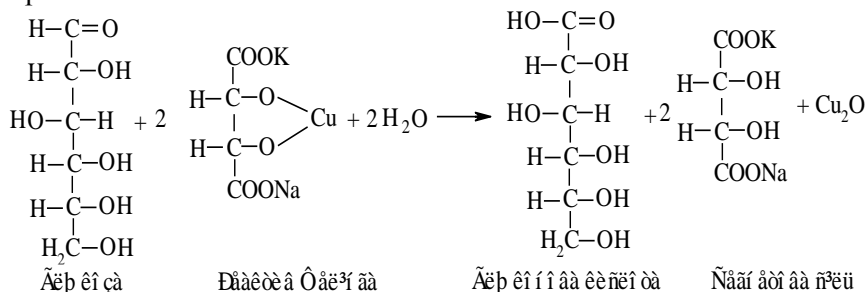
Останній у розчині сульфатної кислоти поступово окиснюється і конденсується у продукт зі складною будовою молекули, забарвлений у фіолетовий колір. Забарвлення у контрольній пробірці менш інтенсивне. Кількість молочної кислоти тут незначна і кінцевого продукту реакції утворилось дуже мало.

Робота 13. Визначення кількості цукру у сечі за методом Фелінга

Метод ґрунтується на окисно-відновних властивостях глюкози, яка за будовою є п'ятиатомним альдегідоспиртом. У нормі в сечі цукру немає. Поява глюкози у сечі – *глюкозурія*. Вона може мати аліментарний та патологічний характер. Причиною глюкозурії аліментарного походження є надмірна кількість вуглеводів у раціонах тварин, печінка яких не здатна перетворити глюкозу крові у глікоген. Патологічна глюкозурія частіше всього виникає у разі цукрового діабету.

Хід роботи. 20 мл сечі розбавляють дистильованою водою в 2–3 рази. У колбу наливають 5 мл реактиву Фелінга, додають 15 мл дистильованої води і кип'яють. Суміш титрують розбавленою сечею до появи блідо-жовтого забарвлення. Найбільш точні результати вмісту цукру у сечі одержують за її витрати на титрування у кількості 2,5–5 мл, що відповідає вмісту глюкози від 0,5 до 1 %.

Визначення кількості глюкози у сечі ґрунтується на її взаємодії з реактивом Фелінга:



Для розрахунків враховують розбавлення сечі та здатність 5 мл глюкози відновлювати 1 мл реактиву Фелінга. Вміст глюкози у сечі визначають за формулою:

$$X = \frac{0,025 \times 100 \times b}{a}$$

де X – вміст глюкози у сечі, %; 0,025 – кількість глюкози, необхідної для відновлення 5 мл реактиву Фелінга, г; a – кількість сечі, витраченої на титрування, мл; b – розведення сечі.

Робота 14. Кількісне визначення глюкози антроновим методом Моріса

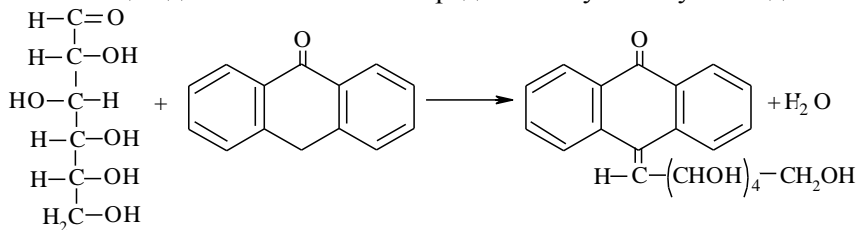
Глюкоза в присутності концентрованої сульфатної кислоти утворює похідну сполуку фурфуролу, яка конденсується з антроном, що призводить до утворення забарвленої речовини.

Хід роботи. В одну пробірку вносять 2.5 мл дослідного розчину, у другу – 2,5 мл стандартного розчину глюкози із концентрацією 20 мг/мл, в третю – 2,5 мл дистильованої води. У кожену пробірку вносять по 5 мл 0,2 % спиртового розчину антрону. Одержані розчини набувають синього забарвлення. Їх колориметрують проти вмісту третьої пробірки. Масову концентрацію глюкози вираховують за формулою:

$$C = \frac{C_0 \times E_1}{E_2 \times V},$$

де С – концентрація глюкози, мкг/л; E₁ – екстинція дослідного розчину; E₂ – екстинція контрольного розчину; C₀ – масова концентрація глюкози у стандартному розчині; V – об'єм дослідної проби, мл.

Реакцію для глюкози можна представити у такому вигляді:



Робота 15. Визначення кількості цукру у сечі поляриметричним методом



Рис. 8. Поляриметр.

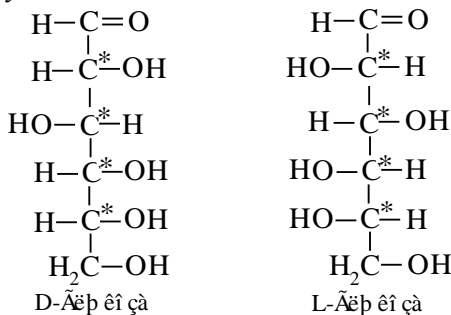
Метод ґрунтується на властивостях глюкози як оптично активної речовини обертати вправо площину поляризованого променя світла. Існує пряма залежність між концентрацією глюкози, що міститься у сечі або в іншому розчині, і величиною кута обертання площини поляризації.

Для визначення кількості цукру у біологічних рідинах використовують різні моделі поляриметрів, в основі яких знаходиться призма Ніколя (рис. 8).

Хід роботи. У пробірку вносять 5–10 мл сечі та кип'ятять. При цьому білки випадають в осад. Додають пучку активованого вугілля для поглинання пігментів сечі. Звільнена від білків і пігментів сеча фільтрується. Прилад встановлюють на позначку 0. Трубку поляриметра заповнюють дистильованою водою, закривають склом і закручують, слідкуючи, щоб у трубку не потрапили бульбашки повітря. Для цього вода наливається так, щоб утворився випуклий меніск, який після цього зрізається покривним склом. Досягають рівномірного освітлення поля зору. Потім у прилад встановлюється трубка, заповнена сечею. Наявність у ній глюкози призводить до

появи у полі зору в центрі темної смуги. Обертання диску аналізатора дозволяє одержати рівномірне затемнення потрібного поля зору.

В основі визначення кількості глюкози поляриметричним методом лежить фізичне явище – здатність глюкози як оптично-активної речовини обертати промінь поляризованого світла. Ациклічна форма глюкози має чотири асиметричні атоми карбону, що обумовлюють таку активність:



Показники приладу визначають за шкалою. Розрахунок проводять за формулою:

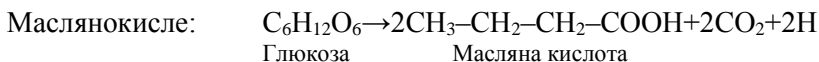
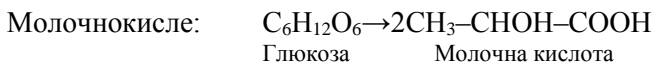
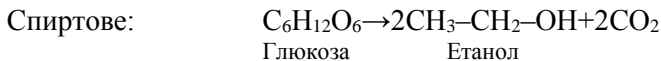
$$C = \frac{\alpha \times 100}{b \times 52,8},$$

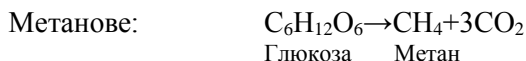
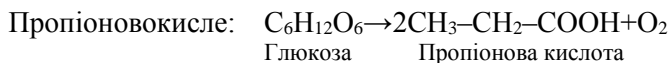
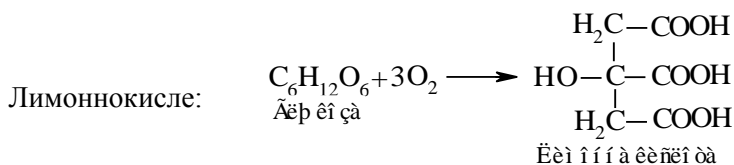
де C – концентрація цукру в сечі, %; α – кут відхилення поляризованого променя світла, градуси; b – довжина трубки, дм; 52,8 – кут питомого обертання глюкози.

Отже, для визначення кількості цукру в сечі необхідно визначити кут обертання поляризованого променя світла дослідною рідиною.

Робота 16. Визначення кількості глюкози у сечі методом бродіння

Під впливом відповідних мікроорганізмів або виділених із них ферментів відбувається бродіння моносахаридів. Бродіння буває різних типів:





Бродіння має велике значення у виробництві вин, етанолу, пива, оцту, а також у процесах життєдіяльності та продуктивності жуйних тварин тощо.

Серед усіх видів бродіння особливе місце займає спиртове. До такого бродіння здатні в основному гексози (пентози не бродять), до яких, у першу чергу, належить глюкоза.

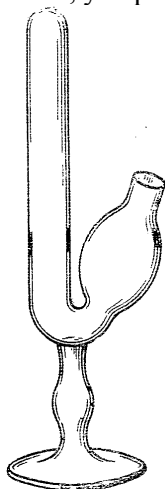
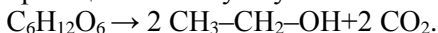


Рис. 9. Бродильна трубка.

Хід роботи. 0,5 г дріжджів розтирають у ступці з 2–3 мл досліджуваної сечі. Після цього у розтерту масу додають ще 10–15 мл сечі, яку заздалегідь прокип'ятили, щоб уникнути дії мікроорганізмів, що є у свіжій сечі. Додавляють 5 % розчин виннокам'яної кислоти до кислої реакції середовища (контролюють лакмусовим папером). Одержану рідку масу наливають у бродильну трубку так, щоб закрите коліно було заповнене повністю сумішшю, а широка відкрита частина – наполовину (рис. 9). Бродильну трубку поміщують у термостат на 30–60 хв за температури 37–40 °С. Виділення бульбашок вуглекислого газу і накопичення його у запаяному коліні трубки свідчить про проходження в суміші спиртового бродіння. Паралельно можна поставити два контролі: перший на зброджувальну силу дріжджів (у трубку замість сечі вносять 0,5 % розчин глюкози), у другу – на вміст цукру у дріжджах (для цього дріжджі розчиняють підкисленою дистильованою водою).

Під впливом ферментів, що містяться у клітинах дріжджових грибків, відбувається поступовий розклад глюкози з утворенням кінцевих продуктів реакції – етанолу і вуглекислого газу:



Підсумки досліду проводяться за кількістю вуглекислого газу, що накопичився в закритому коліні бродильної трубки. На позначках відповідній кількості газу відповідає певна концентрація спирту. Коли проводяться і контрольні дослідження на зброджувальну силу дріжджів і на вміст цукру в них, то результати досліджень слід записати за формою, представленою у табл. 11:

Таблиця 11

Досліджувана сеча і дріжджі	Результати проб			
	Троммера	Фелінга	«Срібного дзеркала»	Бродіння

Контрольні питання

1. Класифікація вуглеводів і представники окремих груп. 2. Напишіть структурні формули відомих вам моносахаридів. 3. Напишіть структурні формули відомих вам дисахаридів мальтозного і трегалозного типів будови. 4. Напишіть структурні формули головних гомополісахаридів і дайте їм коротку характеристику. 5. Що таке глікозамінглікани? 6. Наведіть структурні формули гепарину, кератинсульфату, дерматансульфату, гіалуронової і хондроїтинсульфатної кислот. 7. Дайте характеристику головним етапам обміну вуглеводів у організмі. 8. Як регулюється вуглеводний обмін у тваринному організмі? 9. Що може бути причиною гіпер- і гіпоглікемії? 10. Що таке глюкозурія? Яке їх значення у клінічній діагностиці?

2. ХІМІЯ І ОБМІН ЛІПІДІВ

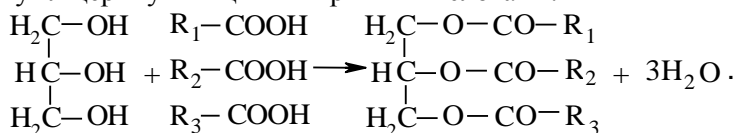
Ліпіди – жири і жироподібні речовини, в основному похідні вищих жирних кислот та спиртів. Розрізняють прості (нейтральні жири, діольні ліпіди, воски, стерини і стериди) і складні (фосфатиди, гліколіпіди, сульфатиди) ліпіди. Прості ліпіди є переважно похідними двох компонентів – спиртів і вищих жирних кислот (крім стеринів), складні – трьох і більше: спиртів, вищих жирних кислот (або альдегідів), неорганічних кислот (фосфатної, сульфатної), вуглеводів (моно- і олігосахаридів), азотистих сполук (холіну, коламіну, серину тощо). До ліпідів іноді відносять деякі інші речовини, що не є похідними жирних кислот (убіхінони, терпени, простагландини

тощо). Фізичні та хімічні властивості ліпідів залежать від наявності в їх молекулах різних груп як полярних ($-\text{COOH}$; $-\text{OH}$; $-\text{NH}_2$ тощо), так і неполярних (вуглеводневих ланцюгів). Більшість ліпідів – поверхнево-активні речовини, розчинні в органічних розчинниках і мало розчинні або зовсім не розчинні у воді. Одержують із природних джерел, іноді органічним синтезом. Ліпіди – головний компонент біологічних мембран клітин і тканин, створюють в організмі тварин енергетичні резерви, виконують захисні функції. Ліпіди – головна складова частина кормів тваринного, рослинного і мікробіального походження. Вони широко використовуються в різних галузях промисловості і, перш за все, харчової, парфумерної, фармацевтичної тощо.

Обмін ліпідів у тваринному організмі складається із чотирьох етапів: перетравлювання, всмоктування, проміжного і кінцевого обмінів.

Робота 1. Виявлення жирів

Нейтральні жири – естери, утворені молекулою триатомного спирту гліцерину і вищими жирними кислотами:



Жири бувають простими (залишки ВЖК представлені однією кислотою) і складними (ВЖК представлені різними кислотами). Жири – складова частина кормів. Так, вміст жирів у зерні ріпаку становить 36–40 %; льону – 28,9–49,0; соняшнику – 29–57; кукурудзи – 5; вівса – 3; пшениці – 1–1,8 %. Багаті на жири корми тваринного походження. Молоко корови у середньому містить 3,6 % жиру.

Жири рослинного походження, як правило, називають *оліями* (крім пальмітинового масла). ВЖК тут в основному представлені ненасиченими жирними кислотами – олеїною, лінолевою, ліноленою. Жири тваринного походження називають *салом* (за винятком вершкового масла). Вони містять залишки насичених жирних кислот (стеаринової, пальмітинової), частково ненасичених кислот.

Жири – високоенергетичні речовини. За тканинного окиснення 1 г жиру утворюється 9,3 ккал енергії, 1 г вуглеводів – 4,3; білків – 4,1 ккал. Жири слугують джерелом ендогенної води: у разі окиснен-

ня 100 г жиру у тканинах утворюється 107 г води, є добрими розчинниками вітамінів (А, D, Е, F, К), виконують захисні функції.

Жири виявляють фізичними і хімічними методами. Прикладом першого з них може бути проба на утворення жирної плями, другого – акролейнова проба.

Проба на утворення жирної плями

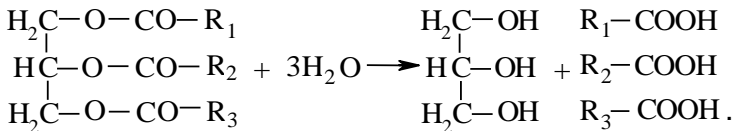
Хід роботи. Скляною паличкою на папір наносять краплю жиру. Виникає жирова пляма, яка не зникає під час нагрівання.

Акролейнова проба

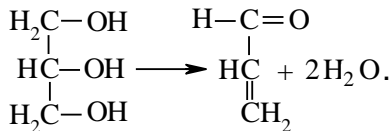
Робота дозволяє відкрити у складі жирів і гліцеринфосфатидів гліцерин.

Хід роботи. У пробірку поміщають 2–3 г свинячого сала та 1–3 г гідросульфату натрію, старанно перемішують і нагрівають. Через деякий час з'являється запах акролейну (роботу бажано проводити під тягою).

Робота ґрунтується на гідролізі жирів до гліцерину і вищих жирних кислот:



Надалі від гліцерину відщеплюється вода і він перетворюється в акролейн, газ з різким і неприємним запахом, характерним для кухні:



Робота 2. Емульгування жиру

Емульгування – необхідний процес для засвоювання ліпідів у шлунково-кишковому тракті тварин. Ліпіди нерозчинні у воді та розчиняються в органічних розчинниках. Для всмоктування ліпідів ворсинками тонкого відділу кишечника необхідно, щоб вони попередньо були емульсовані до дрібних часток. Такий розмір часточок ліпідів дозволяє їм бути засвоєними організмом тварини. Зокрема, в емульсованому стані ліпіди можуть з'єднуватися з активними

центрами ліполітичних ферментів, деякі, надзвичайно малі частинки, можуть проникати у канальці мікрворсинок клітин епітеліального шару слизової оболонки тонкого кишечника і потрапляти у лімфатичні капіляри ворсинок, надходити у лімфатичну систему організму. Так, до 10 % продуктів гідролізу всмоктується у вигляді моно- і дигліцеридів, 80 % – у вигляді кінцевих продуктів гідролізу (гліцерину і ВЖК). Емульсії – нестійкі дисперсні системи, які швидко руйнуються. Їх стійкість у системі підтримують розчини білка, жовчі, мил, деяких солей та інших поверхнево-активних речовин. Зменшення поверхневого натягу системи перешкоджає злипанню крапель ліпідів і дозволяє організму їх засвоювати. Природною емульсією є молоко.

Розчинність жирів

Хід роботи. У шість сухих пробірок поміщають по 3–6 крапель олії. У пробірки вносять по 2–3 мл органічних розчинників: у 1-шу – бензин, у 2-гу – бензен, у 3-тю – хлороформ, у 4-ту – чотирихлористий карбон, у 5-ту – хлороформ, у 6-ту етанол. Спостерігають різну здатність розчинників розчинювати жир.

Вплив різних речовин на стійкість емульсії

Хід роботи. У шість пробірок поміщають по 3–6 крапель олії та по 3–4 мл дистильованої води. У першу пробірку додають декілька крапель 1 % розчину білка, у другу – 1 % розчину їдкоого калію, у третю – 1 % розчину гідрокарбонату натрію, у четверту – 1 % розчину мила, у п'яту – розчин жовчі, шосту пробірку залишають без змін (контроль). Усі пробірки поміщають на 5–10 хв у гарячу водяну баню, після чого переносять у штатив і спостерігають за утворенням у перших п'яти пробірках стійкої емульсії (особливо у п'ятій пробірці). У контрольній пробірці емульсія нестійка, утворилось два шари: верхній – жир, нижній – вода.

У першій серії дослідів оцінюють розчинність жирів у різних розчинниках, у другій – здатність різних речовин емульгувати жири.

Робота 3. Виділення холестерину із тканин мозку

Холестерин (холестерол) – тетрациклічний ненасичений спирт із класу стеринів, важливий компонент тваринного організму. Утворює естери з ВЖК – стериди. Більше всього холестерину міститься в нервовій тканині (2 % від загальної маси), у печінці (0,3–0,9 %), у кістках (0,25 %). Холестерин найчастіше одержують із

тканин мозку великої рогатої худоби. Він входить до складу неомилених фракцій, і під впливом етанолу випадає у вигляді білих твердих кристалів, що зумовило частину його назви (лат. *choll* – жовч). Його вперше одержали із жовчі (грец. *stereos* – твердий). Холестерин і його естери – складові частини багатьох клітинних мембран. Він є попередником багатьох гормонів (статевих, кортико-стероїдів), жовчних кислот і вітамінів групи D. У крові сільськогосподарських тварин в середньому міститься 0,2 % холестерину, у плазмі лактуючих корів – 0,2, у крові людини – 0,18–0,26 % холестерину. Порушення балансу надходження і виведення холестерину призводять до зміни його вмісту в тканинах і крові. Підвищення концентрації холестерину у плазмі крові (*гіперхолестеринемія*), порушення у системі ліпопротеїдів, що транспортують холестерин, спричиняє ряд захворювань: атеросклероз, ксантоматоз та ожиріння печінки.

Хід роботи. 3–5 г мозку великої рогатої худоби розтирають у ступці з 5–10 г гіпсу. Одержану масу наносять дерев'яною лопаточкою на скляну пластинку (10×10 см) і висушують у сушильній шафі за температури 60 °С або над полум'ям пальника. Утворену суху масу скальпелем переносять у суху пробірку, додають 5–6 мл хлороформу і збовтують 5–10 хв. Екстракт фільтрують. З екстрактом проводять ряд кольорових реакцій на виявлення холестерину.

Робота 4. Якісні реакції на холестерин

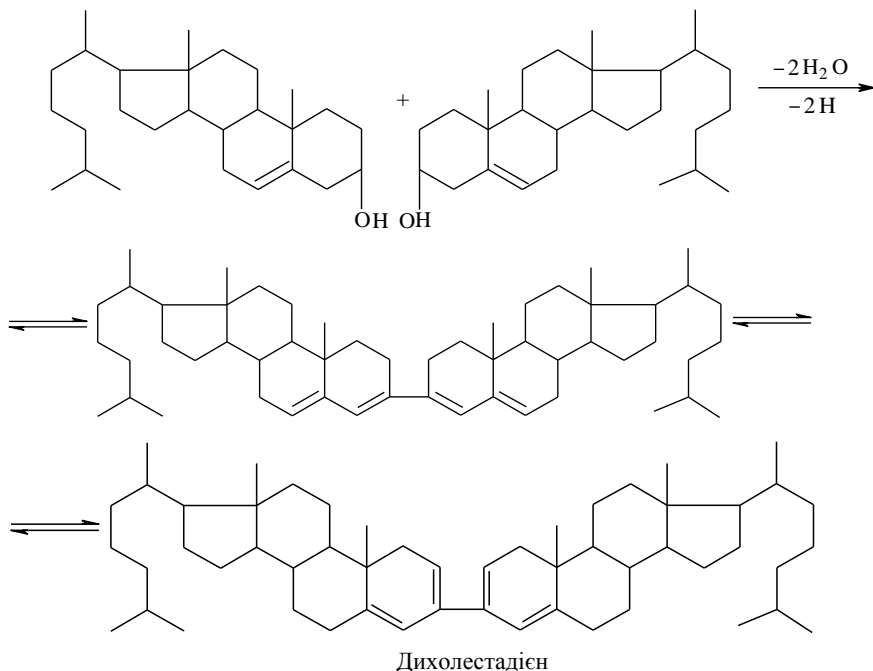
Ці реакції дозволяють швидко і надійно виявляти у різних субстратах холестерин.

Реакція Лібермана-Бурхарда

Хід роботи. У пробірку наливають 1–2 мл хлороформного екстракту холестерину, додають 10 крапель ацетатного ангідриду 1–2 краплі концентрованої сульфатної кислоти. Суміш збовтують. Через деякий час вона спочатку забарвлюється в червоний, потім у червоно-фіолетовий колір, фіолетовий, синій і, нарешті, в зелений колір. За незначного вмісту холестерину може виникати зразу зелене забарвлення. Реакція лежить в основі кількісного визначення холестерину.

Для всіх 3-х реакцій характерний один і той же хімізм. Під дією сульфатної кислоти відбувається дегідратація холестерину і подальше його окиснення. Надалі відбувається конденсація циклів з

утворенням кінцевого продукту зеленого кольору – дихолестадієну із формулою $C_{54}H_{86}$ або $C_{54}H_{88}$:



Реакція із сульфатною кислотою

Реакцію відкриття холестерину у тваринних тканинах розробив італійський вчений Х. Шіфф (1834–1915), ім'ям якої вона названа.

Хід роботи. У пробірку наливають 1 мл хлороформного екстракту холестерину, одержаного у попередній роботі. Обережно по стінці пробірки наливають 1 мл концентрованої сульфатної кислоти. На межі двох рідин виникає кільце червоного кольору.

Під дією водовіднімаючих сполук холестерин перетворюється у ненасичений вуглеводень зі спряженими подвійними зв'язками – холестерилєн, який із сульфатною кислотою та ацетатним ангідридом утворює забарвлені комплексні сполуки.

Реакція Сальковського

Хід роботи. Після проведення попередньої роботи суміш обережно струшують і перемішують вміст пробірки. Залишають на 5–10 хв. Суміш розділяється на 2 шари: верхній шар забарвлюється в

червоний колір, нижній – жовто-оранжевий, із зеленою люмінесценцією (рідина в прохідному світлі прозора і забарвлена в жовто-червоний колір, у відбитому – каламутна, із зеленим відтінком). Після додавання до нижнього шару декількох крапель концентрованої ацетатної кислоти рідина забарвлюється в рожево-червоний колір, люмінесценція зберігається.

Реакція Вітта

Хід роботи. До 2 мл хлороформного екстракту холестерину додають рівний об'єм суміші формаліну з концентрованою сульфатною кислотою, збовтують. Утворюється 2 шари: верхній – вишневого кольору і нижній – буро-червоного кольору, з інтенсивною люмінесценцією. Зливають верхній (хлороформний) шар у другу пробірку і додають до залишку 2–3 краплі ацетатного ангідриду. Відбувається зміна забарвлення – вишневе забарвлення переходить у синє. Відкрита німецьким хіміком-органіком О.Н. Віттом (1853–1915).

Реакція Чугаєва

Хід роботи. У пробірку наливають 1 мл хлористого бензоїлу, додають 5–10 крапель розчину холестерину в ацетатній кислоті та 0,1–0,2 г хлориду цинку. Пробірку обережно нагрівають на невеликому полум'ї. Виникає малинове забарвлення. Робота проводиться у витяжній шафі.

Робота 5. Виявлення лецитину та відкриття продуктів його гідролізу

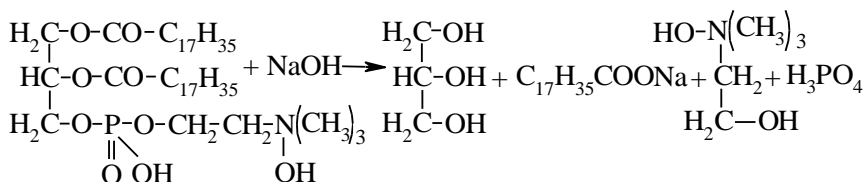
Лецитин – фосфатид, що міститься у тканинах головного і спинного мозку (12–35 %), жовтка курячого яйця (6–12 %), легенях, міокарді, нирках. Використовується організмом для синтезу ацетилхоліну. Застосовують всередину (у вигляді драже) при лікуванні хвороб нервової системи, анеміях, загальному знеситенні. На лецитин багаті також деякі рослинні корми: насіння соняшнику (38 %), льону (36 %), боби сої (35 %) тощо.

Виділення та виявлення лецитину

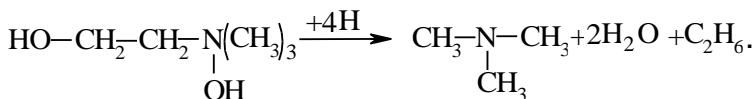
Хід роботи. У хімічну склянку вносять половину ячного жовтка і доливають 15 мл гарячого етанолу. Суміш нагрівають і фільтрують. У суху пробірку наливають 3 мл ацетону і краплями доливають одержаний фільтрат – утворення каламуті свідчить про випадання осаду лецитину. У другу пробірку наливають 5 мл одер-

жаного фільтрату, додають 2 мл 10 % розчину NaOH і кип'ять протягом 20 хв. Відбувається гідроліз фосфатидів.

За лужного гідролізу лецитину утворюється гліцерин, солі вищих жирних кислот, холін та фосфатна кислота:



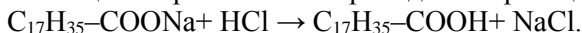
Холін, що відщепився, далі розщеплюється з появою характерного запаху оселедців:



Виявлення вищих жирних кислот

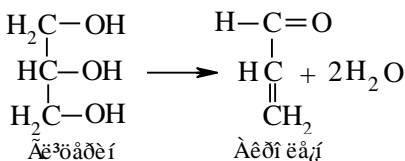
Хід роботи. До одержаного лужного гідролізату додають 2–3 мл води і краплями 10 % розчин хлоридної кислоти до виділення вільних жирних кислот, які з'являються на поверхні у вигляді нерозчинних пластивців. Виділені жирні кислоти відфільтровують. Прозорий фільтрат нейтралізують 10 % розчином луку за наявності фенолфталеїну до рожевого забарвлення та випарюють на водяній бані.

Виділення вищих жирних кислот проходить за реакцією:



Виявлення гліцерину

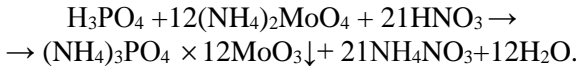
Хід роботи. Половину сухого залишку переносять у другу пробірку, додають 0,5 г гідросульфату калію і нагрівають на полум'ї. При цьому утворюється акролеїн із характерним запахом. Акролеїн утворюється під час дегідратації гліцерину:



Виявлення фосфатної кислоти

Хід роботи. Другу половину сухого залишку спалюють у тиглі з невеликою кількістю нітрату калію і карбонату натрію (1:2) до знебарвлення суміші. Після охолодження суміш розчиняють у 2 мл концентрованої нітратної кислоти. Розчин із тигля виливають у пробірку, додають 5 мл молібденового реактиву і нагрівають. Розчин набуває жовтого кольору.

Утворення жовтого осаду фосфоромолібдату амонію вказує на наявність у розчині фосфатної кислоти:



Робота 6. Визначення хімічних констант жирів

Для жирів характерні окремі стабільні показники, які називають *константами* жиру. Розрізняють фізичні та хімічні константи (табл. 12). До *фізичних* констант належить в'язкість, густина, температура топлення, застигання, коефіцієнт заломлення світла, число рефракції. *Хімічні* константи – це число омилення, кислотне число, йодне число, число Рейхарда-Мейсля тощо.

Таблиця 12 – Фізичні і хімічні константи деяких жирів

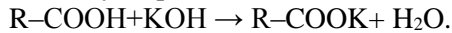
Константи	Вид жиру			
	вовчий	свинячий	баранячий	Молочний (корови)
В'язкість при 60 °С / при 40 °С	3,6 / –	3,56 / –	3,6 / –	– / 4,6
Густина при 15 °С, г/см ³	0,937– 0,953	0,915– 0,923	0,937– 0,961	0,920– 0,944
Температура топлення, °С	42–52	36–48	44–55	28–36
Температура застигання, 0 °С	34–38	26–32	32–45	18–23
Коефіцієнт заломлення світла (при 40 °С)	1,456– 1,458	1,457– 1,461	1,456– 1,458	1,453– 1,457
Число рефракції	46–49	44,8–53	46–48,5	42–45
Число омилення	190–200	193–200	192–206	212–247
Число Рейхарда-Мейсля	0,2–0,6	0,3–0,9	0,1–0,7	20–37
Йодне число	32–47	45–56	31–48	25–45
Кислотне число	0,1–0,6	0,3–0,9	0,1–0,2	
Пероксидне число, % Йоду	0,02	0,08	0,08	0,02
Вміст вологи, %	0,2–0,3	0,25–0,3	0,2–0,3	0,9–1,0
Калорійність, ккал/100 г	950,5	950,9	944,9	912,0
Засвоєння, %	80–94	96–98	80–90	93–98,5

Визначення кислотного числа жиру

Кислотне число – важлива фізико-хімічна константа, що характеризує природу і якість різних рослинних і тваринних жирів. Кислотне число визначається кількістю мг КОН, яка витрачається на нейтралізацію вільних жирних кислот, що містяться в 1 г жиру. У разі недоброякісного зберігання під впливом різноманітних шкідливих факторів, перш за все, мікробного походження, відбувається гідроліз молекул жирів і кількість вільних жирних кислот у ньому збільшується, жир псується. Псування жирів найбільш характерне для тих тваринних жирів, до складу яких входить велика кількість ненасичених жирних кислот і, перш за все, для риб'ячого жиру. Збільшення кислотного числа характерно для згірклих жирів.

Хід роботи. У колбу вносять 1 г досліджуваного жиру (коли жир рідкий із густиною 0,9, його беруть 1,1 мл) і додають декілька крапель 0,1 % спиртового розчину фенолфталеїну. Суміш титрується 0,1 н розчином КОН до появи знову рожевого забарвлення.

Під час титрування вільні жирні кислоти вступають у реакцію з лугом, що призводить до утворення солей:



Кислотне число визначають за формулою:

$$X = \frac{a \times 5,6 \times T \times 1000}{n},$$

де X – кислотне число; a – кількість мл 0,1 н розчину КОН, що витрачена на титрування, мл; T – титр 0,1 н розчину КОН; 5,6 – кількість гідроксиду калію, що міститься в 1 мл 0,1 н розчину, мг; n – наважка жиру, г.

Визначення числа омилення жиру

Число омилення – кількість мг КОН, що використовується на нейтралізацію вільних і зв'язаних жирних кислот, які утворилися за гідролізу 1 г жиру. Число омилення характеризує природу і якість жиру.

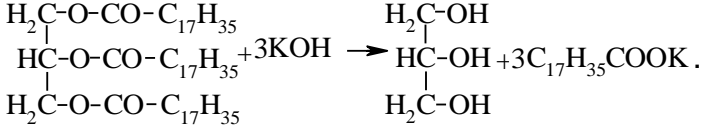
Хід роботи. У колбу з оберненим холодильником або у пробірку, в яку вставлена довга трубка, вносять 0,5 г досліджуваного жиру. Додають 1,5 мл 0,5 н спиртового розчину їдкою калію і нагрівають протягом 15 хв на киплячій водянній бані. Після нагрівання у суміш додають 2–3 краплі спиртового розчину фенолфталеїну і титрують 0,5 н розчином хлоридної кислоти до зникнення рожевого забарвлення.

Число омилення визначають за формулою:

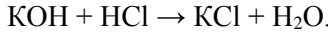
$$X = \frac{(B - A) \times 28,05}{n}$$

де X – число омилення; A – кількість 0,5 н розчину КОН, що використана на омилення проби, мл; B – кількість 0,5 н розчину НСІ, що витратили на титрування надлишку КОН, мл; 28,05 – кількість гідроксиду калію, що відповідає 1 мл 0,1 н розчину хлоридної кислоти; n – наважка жиру, г.

Під впливом гідроксиду калію і нагрівання відбувається гідроліз жиру:



Надлишок КОН титрують розчином НСІ:

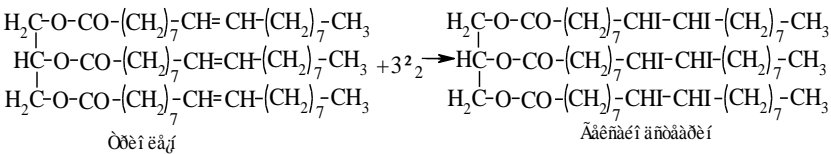


Визначення йодного числа жиру

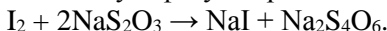
Йодне число характеризує наявність у складі жирів залишків ненасичених жирних кислот і визначається кількістю грамів Йоду, яку може зв'язувати 100 г жиру. Визначення йодного числа базується на властивості ненасичених жирних кислот приєднувати Йод та інші галогени за місцем розриву подвійного зв'язку. Йодне число характеризує ступінь ненасиченості жиру і його стійкість до зберігання.

Хід роботи. У колбу поміщають 0,2 г досліджуваного жиру, додають 10 мл спирту і 10 мл 0,1 н спиртового розчину Йоду. Вміст перемішують і залишають на 15–20 хв. Одночасно проводять контроль з тією різницею, що замість жиру в колбу додають 0,2 г води. Через 15–20 хв вміст обох колб титрують 0,1 н розчином тіосульфату натрію до появи слабожовтого забарвлення. До сумішей додають 1 мл розчину крохмалю й продовжують титрувати розчином тіосульфату натрію до знебарвлення.

В основі визначення йодного числа жирів лежить здатність ненасичених жирних кислот, залишки яких входять до складу молекул жирів, приєднувати атоми галогенів:



Йод контрольної проби і його надлишок у досліджуваній пробі відтитрують розчином тіосульфату натрію:



Йодне число досліджуваного жиру вираховують за формулою:

$$X = \frac{(B - A) \times 0,01269 \times 100}{n},$$

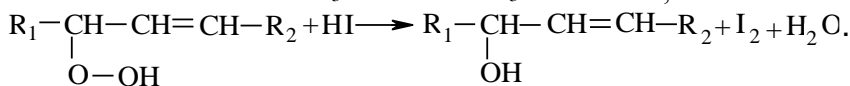
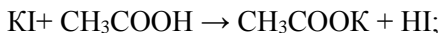
де X – йодне число; A – кількість 0,1 н розчину тіосульфату натрію, що витратили на титрування дослідної проби, мл; B – кількість 0,1 н розчину тіосульфату натрію, що витратили на титрування контрольної проби, мл; 0,01269 – кількість Йоду, що відповідає 1 мл 0,1 н розчину тіосульфату натрію, г; n – наважка жиру, г.

Визначення пероксидного числа жиру

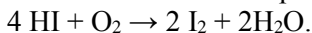
Пероксидне число виражається у % Йоду, що витратили на титрування гідропероксидів, які містяться у 1 г жиру. Гідроперокси легко піддаються розпаду, в результаті якого утворюються різні сполуки: альдегіди, оксикислоти, кетокислоти, які мають різкий запах і неприємний смак, чим зумовлюють вади жирів.

Хід роботи. У колбу з притертим корком вносять 1 г жиру, зваженого з точністю до 0,001 г, додають 20 мл суміші хлороформ-безводної ацетатної кислоти (1:1) та 0,5 мл насиченого розчину йодиду калію. Перемішують і залишають у темному місці на 3 хв. Потім приливають 100 мл дистильованої води та 1 мл 1 % розчину крохмалю і титрують із бюретки 0,01 н розчином гіпосульфїту натрію до зникнення синього забарвлення. Для перевірки чистоти реактивів одночасно проводять контрольний дослід без жиру.

Виділення Йоду пов'язане із взаємодією пероксидів та йодистоводневої кислоти:



Якщо у жирі пероксиди відсутні, то виділення Йоду за 3–5 хв не відбувається. Після цього Йод може виділитися внаслідок окиснення йодистоводневої кислоти киснем повітря:



Пероксидне число визначають за формулою:

$$X = \frac{k \times (V_1 - V_2) \times 0,00127 \times 100}{n},$$

де X – пероксидне число, % Йоду; k – коефіцієнт поправки на титр розчину; V_1 – кількість 0,01 н розчину гіпосульфїту натрію, затраченого на титрування досліджуваного розчину, мл; V_2 – кількість 0,01 н розчину гіпосульфїту натрію, затраченого на титрування контрольного розчину, мл; 0,00127 – кількість Йоду, що еквівалентна 1 мл 0,01 н розчину гіпосульфїту натрію, г; n – наважка жиру, г.

Робота 7. Визначення дії ліпази і впливу жовчі на перетравлення жиру молока

Перетравлення жирів у шлунково-кишковому тракті відбувається під впливом ліпаз травних соків. Під впливом панкреатичної ліпази у тонкій кишці відбувається розщеплення нейтральних жирів до гліцерину та жирних кислот.

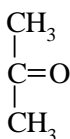
Головна частина жирів (95–97 %) гідролізується у тонкій кишці, у шлунку розщеплюється лише незначна кількість емульгованого жиру (близько 3–5 %), головним чином жиру молока. Перетравлення складається з двох процесів: емульгування і гідролітичного розщеплення жиру. Емульгування відбувається під впливом солей жовчних кислот, вищих жирних кислот, моногліцеридів, NaHCO_3 , CO_2 , білків тощо. Жирові краплі подрібнюються, утворюючи найдрібнішу жирову емульсію внаслідок різкого зменшення поверхневого натягу, розпаду їх на дрібні частинки і утворення адсорбату – жир + ліпаза. В активних центрах ферменту ліпази відбувається розщеплення молекул жиру на гліцерин і жирні кислоти. Жовч сприяє емульгуванню жиру, активує підшлункову ліпазу і забезпечує всмоктування продуктів гідролізу, перш за все, жирних кислот, утворюючи з ними розчинні у воді комплекси: холеїнові кислоти. Жовчні кислоти утворюються з холестерину. Вони містяться в жовчі у вільному і зв'язаному (у вигляді парних сполук) станах.

Хід роботи. У три конічні колби наливають по 5 мл свіжого молока. У першу колбу додають 0,5 мл дистильованої води, у другу і третю – по 0,5 мл розчину жовчі. Потім до всіх колб приливають по 1–2 краплі фенолфталеїну і титрують вільні жирні кислоти молока 0,1 н розчином їдкою натрію до слаборожевого забарвлення. Суміш залишають на декілька хвилин для стабілізації забарвлення. Потім у перші дві колби додають по 10 мг панкреатину. Вміст колб перемішують і залишають за кімнатної температури (можна у водній бані за температури 37–40 °С) на 15 хв. Відбувається гідроліз жиру у перших двох колбах. Через кожні 15 хв протягом 1–2-х годин кількість жирних кислот, утворених у результаті гідролізу,

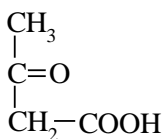
визначають титруванням 0,01 н розчином їдкого натрію до появи слаборожевого забарвлення. Активність ліпази у перших двох колбах виражається у кількості мл розчину їдкого натрію, що витрачена на титрування. У третій колбі забарвлення не змінюється.

Робота 8. Відкриття кетонових тіл у сечі

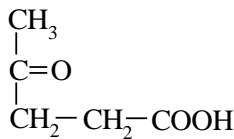
У разі неповного окиснення жирних кислот в організмі тварин утворюються кетонові тіла, представлені β -оксимасяною, ацетоацетатною кислотами і ацетоном:



Ацетон



Ацетоацетатна кислота



β -оксимасяна кислота

У клінічно здорових тварин у крові міститься 0,06–0,07 г/л кетонових тіл, у разі захворювання кетозами – 0,48–0,50 г/л. Вміст кетонових тіл у сечі здорових тварин становить 0,09–0,10 г/л, а за кетозів – 2,5–3,0 г/л. *Кетози* виникають у разі цукрового діабету, гепатитів, різноманітних отруєнь, надлишкового вмісту у раціонах концентратів, інтенсивного маслянокислого бродіння у передшлунках жуйних після тривалого голодування. Збільшення вмісту кетонових тіл у крові називають *кетонемією*, у сечі – *кетонурією*.

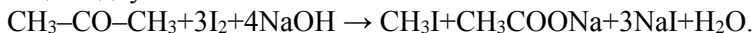
Якісні реакції на ацетон

У клінічній біохімії найчастіше використовують дві реакції на виявлення ацетону у сечі людей і тварин – проба Лібена і Легалья.

Проба Лібена

Хід роботи. На часове скло наносять 1–2 краплі водного розчину Йоду в йодиді калію (розчин Люголя), 4–5 крапель 2 н розчину їдкого натрію і додають 1–2 краплі сечі або розчину ацетону. Випадає осад і з'являється запах йодоформу.

Реакція відбувається за схемою:

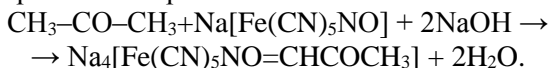


Проба Легалья

Хід роботи. На часове скло наносять 4–5 крапель 10 % розчину нітропрусиду натрію, 1–2 краплі сечі або водного розчину ацетону та 1–2 краплі 2 н розчину їдкого натрію. Виникає червоне забарв-

лення, яке після додавання декількох крапель концентрованої ацетатної кислоти стає червоно-фіолетовим або пурпурно-фіолетовим (у вигляді кільця, за обережного нашарування кислоти).

У лужному середовищі утворюються складні продукти реакцій, забарвлені в червоний колір:



Під дією концентрованої ацетатної кислоти утворюється продукт вишнево-червоного або червоно-фіолетового кольору:



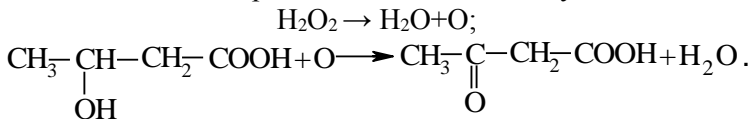
Виявлення β-оксимасляної кислоти

β-оксимасляна кислота виявляється шляхом окиснення її в ацетоацетатну після видалення із досліджуваних рідин ацетону і ацетоацетатної кислоти.

Хід роботи. У склянку наливають 10–15 мл сечі, 10–15 мл дистильованої води та 3–4 краплі концентрованої ацетатної кислоти. Склянку поміщають у водяну баню, суміш випарюють до половини об'єму, охолоджують і переливають у пробірку. До суміші додають 1 мл 3 % розчину пероксиду гідрогену. Протягом 1–2 хв нагрівають і охолоджують. Відбувається перехід β-оксимасляної кислоти в ацетоацетатну. Для її виявлення вміст пробірки ділять навпіл і проводять кольорові реакції з нітропрусидом натрію та хлоридом феруму (III).

У першу пробірку з досліджуваною сечею краплями додають 10 % розчин хлориду феруму (III) до припинення утворення осаду фосфатів. Розчин фільтрують і до фільтрату додають ще декілька крапель хлориду феруму (III). Виникає вишневе забарвлення.

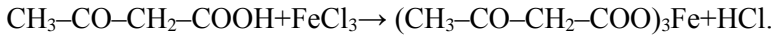
Після додавання до суміші розчину пероксиду гідрогену β-оксимасляна кислота переходить в ацетоацетатну:



β-оксимасляна кислота

Ацетоацетатна кислота

У першій пробірці після взаємодії ацетоацетатної кислоти із розчином хлориду феруму (III) утворюється ацетоацетат феруму вишневого кольору:



У другій пробірці, аналогічно з ацетоном, у лужному середовищі утворюються продукти реакції, забарвлені у червоний колір (див. попередню роботу).

Якісна реакція на ацетоацетатну кислоту

Ацетоацетатна кислота, як і ацетон (див. вище), у лужному середовищі з розчином нітропрусиду натрію утворює оранжево-червоне забарвлення, яке у присутності ацетатної кислоти набуває вишнево-червоного і червоно-фіолетового відтінків.

Хід роботи. Беруть дві пробірки. У першу пробірку наливають 0,5 мл сечі клінічно здорової тварини, у другу – 0,5 мл сечі тварини, хворої на цукровий діабет. В обидві пробірки додають по 0,5 мл розчину їдконого натрію і по 5–7 крапель 10 % розчину нітропрусиду натрію. У першій пробірці виникає червоне або оранжево-червоне забарвлення. Якщо додати декілька крапель концентрованої ацетатної кислоти, колір розчину стає вишнево-червоним, або червоно-фіолетовим. Хімізм реакцій у першій пробірці аналогічний такому у попередній роботі.

Робота 9. Якісне визначення жовчних кислот

Жовчні кислоти утворюються в печінці та виділяються із жовчю у вигляді парних сполук. Вони беруть участь в емульгуванні та всмоктуванні жирів, активізують ліпазу. У разі захворювань печінки та жовчного міхура (жовчнокам'яна хвороба) порушується перетравлення та всмоктування ліпідів та жиророзчинних вітамінів.

Жовчні кислоти можуть бути виявлені якісно. Вони утворюють забарвлені сполуки з оксиметилфурфуролом, який утворюється внаслідок дії концентрованої сульфатної кислоти на розчин сахарози або фруктози.

Хід роботи. У пробірку наливають 2 мл розбавленої жовчі або розчину жовчних кислот, додають 0,5 мл 5 % розчину сахарози і струшують. Обережно по стінці доливають 1 мл концентрованої сульфатної кислоти. На межі шарів виникає осад і червоно-фіолетове кільце внаслідок утворення оксиметилфурфуролу, який із жовчними кислотами утворює забарвлені сполуки. Вміст пробірок охолоджують і змішують. Вся рідина забарвлюється у вишнево-червоний колір.

Робота 10. Кількісне визначення жиру у тканинах за Сокслетом

Кількість жиру визначають екстрагуванням наважки тканини в апараті Сокслета, який складається із трьох частин: зворотного холодильника (1), екстрактора (2) та колби (3), герметично з'єднаних між собою (рис. 10).

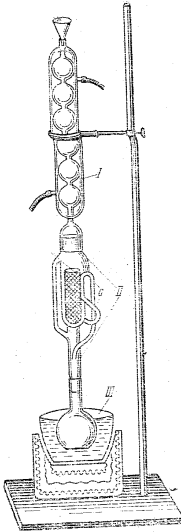


Рис. 10. Апарат Сокслета.

Хід роботи. 3–5 г дослідної тканини (м'язи, печінка) подрібнюють ножицями, поміщають у сушильну шафу за температури 102–106 °С і висушують до постійної маси. Висушені наважки подрібнюють у ступці і переносять у пакетики із фільтрувального паперу. Пакетики із дослідним матеріалом зважують (із точністю до 0,001 г) і поміщають в екстрактор апарату Сокслета. Всі частини апарату герметично з'єднують, прилад поміщають на водяну баню. Через верх холодильника екстрактор і колбу заповнюють діетиловим етером у кількості, що дорівнює двом об'ємам екстрактора. Потім у холодильник пропускають воду, а колбу нагрівають. Під час екстракції слідкують за тим, щоб кількість розчинника у колбі не перевищувала 2/3 її об'єму. Екстрагування проводять впродовж 6–10 год і закінчують тоді, коли на фільтрувальному папері після нанесення декількох крапель етеру, взятого з екстрактора, не буде проявлятися жирна пляма. Після екстракції пакетики з матеріалом виймають із апарату Сокслета, висушують у сушильній шафі за температури 102–106 °С до постійної маси. Пакетики зважують на аналітичній вазі і за різницею між масою пакетика до і після екстракції визначають кількість жиру за формулою:

$$X = \frac{(B - A) \times 100}{n},$$

де X – вміст жиру, %; B – маса пакетика з наважкою до екстракції, г; A – маса пакетика з наважкою після екстракції, г; n – наважка дослідного матеріалу, г; 100 – коефіцієнт переведення у відсотки.

Робота 11. Визначення загальних ліпідів у сироватці крові

Загальні ліпіди у плазмі крові сільськогосподарських тварин у середньому складають близько 0,7 % (табл. 13). Кров містить усі фракції ліпідів, що знаходяться у тканинах і клітинах.

Таблиця 13 – Вміст ліпідів у крові людини

Фракції ліпідів	Вміст ліпідів, мг/л	Фракції ліпідів	Вміст ліпідів, мг/л
Загальні ліпіди	400–800	Ефіровз'язувальний холестерин	90–190
Фосфоліпіди	150–380		
Загальний холестерин	159–250	Триацилгліцериди	50–180
Вільний холестерин	40–70	Вільні жирні кислоти	0,5–0,8

Ліпіди у крові знаходяться у вигляді α - і β -ліпопротеїдів, хіло-мікронів і вільних жирних кислот. Збільшення вмісту ліпопротеїдів у сироватці крові називають *гіперліпопротеїнемією*. Це явище спостерігається у перші години після прийому кормів (4–5 год) і має назву аліментарна *гіперліпопротеїнемія*. Через деякий час (12–14 год) кількість ліпопротеїдів нормалізується. Патологічна гіперліпопротеїнемія спостерігається за механічної і паренхіматозної жовтяниці, діабету, захворювань нирок, лептоспірозу, фасціольозу та інших захворювань. Існує декілька типів гіперліпопротеїнемії: спадкова, "транспортна" (за мобілізації жирів із жирових депо) тощо.

Хід роботи. В одну пробірку наливають 0,1 мл сироватки крові, у другу – 0,1 мл води. В обидві пробірки додають по 5 мл концентрованої сульфатної кислоти. Пробірки старанно перемішують і поміщають на 10 хв у киплячу водяну баню. Після охолодження з дослідної і контрольної проб у відповідні сухі пробірки піпетками переносять по 0,2 мл гідролізату. У кожену пробірку додають по 3 мл фосфорно-ванілінової суміші (4 частини концентрованої фосфатної кислоти та 1 частина 0,6 % розчину ваніліну), старанно перемішують і залишають стояти 45 хв за кімнатної температури. Інтенсивність забарвлення вимірюють на ФЕКу проти контролю за зеленого світлофільтру.

Спочатку під впливом сульфатної кислоти відбувається гідроліз ліпідів до складових частин (жирів – до гліцерину і ВЖК, стеридів – до холестерину і ВЖК, фосфатидів – до спиртів, ВЖК, фосфорної кислоти та азотистих основ). Надалі продукти розпаду молекул ліпідів взаємодіють із сульфанілиновим реактивом, утворюючи забарвлені сполуки складної будови, вміст яких визначають колориметричним методом. Ці сполуки мають складну молекулярну структуру, яка достатньо не вивчена.

Робота 12. Визначення загального холестерину у сироватці крові за методом Ілька

Уміст загального холестерину у сироватці крові нелактуючих корів становить у середньому 195 мг на 100 мл, у т.ч. ефірів холестерину – 169,4 і вільного холестерину – 26,4 мг на 100 мл, а у лактуючих корів відповідно 152,7; 132,3 і 20,4 мг на 100 мл (Є.А. Васильєва, 1987). У сироватці крові на естери холестерину у середньому припадає 60–70 % загального холестерину, 30–40 % стеридів. У сироватці крові відношення вільного холестерину до зв'язаного – величина постійна. У клінічній практиці часто спостерігається порушення холестеринового обміну. Збільшення вмісту холестерину у плазмі крові називають *гіперхолестеринемією*, що спостерігається за діабету, менінгіту, атеросклерозу, мікседеми, деяких форм гепатитів та інших хвороб. Зменшення вмісту холестерину у плазмі крові називають *гіпохолестеринемією*, що спостерігається за хронічної серцевої недостатності, гострих інфекційних захворювань, деяких видів панкреатитів, гіпертиреозу та інших хвороб.

Хід роботи. У дві сухі пробірки вносять по 2 мл робочого розчину, що складається з 1 частини ацетатної кислоти, 5 частин ацетатного ангідриду та 1 частини концентрованої сульфатної кислоти. У першу пробірку вносять 0,1 мл негемолізованої сироватки (останню додають поступово, не допускаючи її стікання по стінці пробірки), у другу – 0,1 мл води. Суміш струшують (10–12 разів) і поміщають у термостат (37 °С) на 20 хв. Інтенсивність забарвлення розчинів вимірюють на ФЕКу проти контролю з червоним світлофільтром.

Холестерин у присутності суміші сульфатної й ацетатної кислот та ацетатного ангідриду утворює забарвлені продукти. Інтенсивність забарвлення залежить від кількості холестерину у крові. Хімізм процесів складний і недостатньо вивчений.

Уміст холестерину визначають за стандартною кривою, побудованою за значеннями екстинції розчинів холестерину різної концентрації.

Контрольні питання

1. Що таке ліпіди і як вони класифікуються? 2. Назвіть і напишіть структурні формули головних груп ліпідів. 3. Дайте характеристику нейтральних жирів і визначення головних фізичних і хімічних констант жиру. 4. Напишіть структурні форми відомих вам фосфоліпідів. 5. Що таке стерини і стериди? 6. Які головні

стерини і стериди ви знаєте? 7. Що таке гліколіпіди?. 8. Що таке сульфатиди? 9. Як відбувається перетравлювання ліпідів? 10. Яке значення має жовч у перетравленні ліпідів? 11. Напишіть структурні формули головних жовчних кислот. 12. Як відбувається перетравлювання різних груп ліпідів? 13. Як відбувається всмоктування різних ліпідів? 14. Як проходить ресинтез ліпідів у тонкому кишечнику? Чим представлені ліпіди крові? 15. Як проходить проміжний обмін різних ліпідів? 16. Скільки молекул АТФ утворюється під час окиснення стеаринової кислоти та за рахунок яких хімічних процесів це проходить? 17. Як регулюється обмін ліпідів в організмі тварин? 18. Які Вам відомі порушення обміну ліпідів і як вони проявляються? 19. Що таке кетони та як вони проявляються? 20. Напишіть хімізм утворення ацетонових або кетонових тіл в організмі тварин.

3. ХІМІЯ І ОБМІН БІЛКІВ

Білки – високомолекулярні органічні сполуки, побудовані із залишків α -амінокислот, які з'єднані між собою пептидними зв'язками. Білки складають структурну і функціональну основу кожного живого організму. В організмі білки виконують ряд життєво важливих функцій: структурну, каталітичну, захисну, транспортну, енергетичну, спадкову та інші.

Білки у середньому складають 18–21 % від загальної маси організму і до 40–50 % його сухої маси. Білки характеризуються складною будовою молекул і комплексом фізико-хімічних властивостей, що у цілому і визначає різноманітність їх функцій у процесі існування живої матерії.

У складі молекул білків у середньому міститься 50–55 % Карбону, 21–24 % Оксигену, 15–18 % Нітрогену, 6,5–7,5 % Гідрогену, 0,3–2,5 % Сульфуру, 0–2 % Фосфору, 0,3–0,00001 % мікроелементів (Ферум, Купрум, Манган, Бром, Йод тощо). Білки мають високу молекулярну масу – від декількох тисяч до 320 млн. У разі нагрівання білків з концентрованими кислотами чи лугами, або під впливом специфічних ферментів (наприклад, пепсину) білки розщеплюються до уламків своїх молекул (альбумоз, пептонів, поліпептидів) і кінцевих продуктів (α -амінокислот).

Більшість білків добре розчиняється у воді. Вони утворюють типові водні розчини високомолекулярних сполук (ВМС), що є ліофільними колоїдними системами, для яких характерні молекулярно-кінетичні, оптичні та електрокінетичні властивості. На основі цих властивостей ґрунтується ряд методів якісного і кількісного визначення білків у біологічних рідинах (візуальної фотометрії, електрофотометрії, колориметрії, спектрального аналізу тощо). Для

розчинів білків характерні властивості колоїдних розчинів. Під впливом різних факторів білки можуть із розчинів випадати в осад. Реакції осадження бувають зворотними та незворотними. Вони використовуються для виявлення білків у біологічних рідинах та їх розділення на окремі фракції. Коагульовані білки втрачають свої нативні властивості і, перш за все, свою попередню здатність розчинятися і називаються *денатурованими*. Ця особливість дає можливість виявити білки, вивчати їх хімічний склад та властивості.

Білки – похідні амінокислот, амфотерні сполуки, одночасно мають кислі (карбоксильні) та основні (аміно) групи, тобто можуть проявляти властивості основ і кислот. За певного значення рН, характерного для кожного білка, дисоціація кислих і основних груп білкової молекули зрівнюється і заряд амфотерного іона білка дорівнює нулю. Таке значення рН розчину називають *ізоелектричною точкою білка* (ІЕТ). У ІЕТ розчини білка найменш стійкі та легко руйнуються під впливом різних факторів. ІЕТ спостерігається для яєчного білка за рН 4,8, для гемоглобіну – рН 6,7. Крім карбоксильних і аміних груп, молекули білків мають інші функціональні групи – сульфгідрильні, гідроксильні, дисульфідні, імінні тощо. Наявність цих груп дає можливість молекулам білків вступати у хімічну взаємодію з певними реактивами, що дозволяє зробити якісний і кількісний аналізи їх молекул.

Зараз відомо понад 2000 індивідуальних білків тваринного, рослинного і мікробного походження. Більше того, дослідники відмічають, що лише в одній клітині таких білків нараховується близько 10 000. Білки класифікують на дві великі групи: прості (*протеїни*) і складні (*протеїди*). Протеїни у результаті гідролізу розщеплюються до амінокислот, протеїди – на прості білки (вони, у свою чергу, до амінокислот) і протетичну групу. Протеїни ділять на підгрупи: альбуміни, глобуліни, гістони, протаміни, проламіни, глутеліни і протеноїди. Особливе значення у клінічній біохімії має вивчення білків перших двох підгруп – альбумінів і глобулінів, зокрема, визначення альбуміно-глобулінового коефіцієнта (А/Г), наявності γ -глобулінів та їх кількість.

Залежно від природи протетичних груп, розрізняють такі підгрупи складних білків: нуклеопротеїди, хромопротеїди, фосфопротеїди, ліпопротеїди, глікопротеїди і протеїдні комплекси. Вивчення вмісту та кількості таких білків у різних біологічних субстратах

(сироватці крові, лімфі, лікворі, травних соках, сечі) нерідко використовують для вивчення біохімічних закономірностей існування живої матерії і як діагностичні ознаки у клінічній практиці.

Лабораторний практикум включає роботи, за допомогою яких студент може виділити білки з різних субстратів, виявити їх у різних біологічних рідинах, вивчити деякі їх властивості, дослідити окремі ланки обміну білків в організмі тварин, встановити порушення білкового обміну.

Робота 1. Екстракція білків із м'язової тканини

М'язова тканина складає більше 40 % загальної маси тварини. У скелетних м'язах міститься 72–80 % води і 20–28 % сухого залишку. 16–20 % (або 80–85 % всього сухого залишку) складають білки. Розрізняють три групи білків поперечносмугастих м'язів: саркоплазми (міоген, міоглобін, глобулін і міоальбумін), міофібрил (міозин, актин, актоміозин, тропоміозин) і м'язової строми (колаген, еластин, неїрокератин та деякі інші). Екстрагентом білків саркоплазми і міофібрил найчастіше є 5 % розчин хлориду калію.

Хід роботи. У ступку поміщають 2 г м'яза, подрібненого ножицями до маленьких шматочків. Додають 2 мл 5 % розчину хлориду калію, декілька грамів скляного піску і розтирають до однорідної маси – гомогенату. До гомогенату додають ще 3 мл 5 % розчину хлориду калію і знову розтирають 5 хв. Одержаний екстракт зливають у дві центрифужні пробірки, залишаючи у ступці скляний пісок. Пробірки зрівноважують на центрифужній вазі, додаванням в одну з них певної кількості розчину хлориду калію. Після зрівноваження пробірки центрифугують 15 хв за 1500–2000 об/хв. Потім у чисті пробірки зливають надосадову рідину, залишаючи у центрифужних пробірках осад, в який ввійшли клітини і волокна сполучнотканинної строми, білки сарколеми тощо. З екстрактом проводять якісні і кількісні реакції на білки.

Робота 2. Виділення казеїну з коров'ячого молока

Казеїн – головний білковий компонент молока, повноцінний білок, фосфопротеїд. Молоко корови містить 2,9–4,0 % білків, з яких 45–55 % складає α -казеїн, решта дві інші фракції – β - і γ -казеїни. Молекула казеїну містить залишки всіх незамінних амінокислот. Казеїн багатий лейцином, валіном, лізином, метіоніном і триптофаном. Казеїн – цінна поживна речовина для новонароджених і мо-

лодих тварин, людини, джерело фосфору для отвердіння кістяка, багатьох білків, фосфатидів, макроергічних сполук (наприклад, АТФ) і ферментів, є головною складовою частиною творогу і сирів. Використовується для виготовлення деяких пластмас, клеїв, штучних волокон. Для казеїну характерні кислі властивості. У молоці він знаходиться у вигляді розчиненої кальцієвої солі. Після підкислення казеїн випадає в осад у вигляді білих пластівців, які легко виділяються із розчину методом фільтрування.

Хід роботи. У склянку вносять 3 мл молока і 7 мл дистильованої води. Перемишують і додають 10–15 крапель 1 % розчину хлоридної кислоти, не допускаючи її надлишку (у разі надлишку кислоти казеїн розчиниться). Суміш перемишують. Через 3–5 хв виникає крихкий осад. У склянку додають 10 мл дистильованої води і через 10 хв зливають. До осаду знову додають 10 мл дистильованої води, перемишують і виливають у лійку з паперовим фільтром. З осаду вимивається хлоридна кислота. Промитий осад переносять у колбу зі зворотним холодильником, додають 6 мл 10 % розчину гідроксиду натрію і нагрівають протягом години на піщаній бані. Відбувається гідроліз казеїну – відщеплюється ортофосфорна кислота. Колбу охолоджують, після чого додають 20–30 крапель концентрованої нітратної кислоти для нейтралізації лугу. Нейтралізацію проводять до слабокислої реакції на лакмус. Випадає осад, що містить високомолекулярні продукти неповного гідролізу казеїну. Суміш відстоюють і фільтрують. Із фільтратом проводять біуретову реакцію на виявлення білка і молібденову пробу на виявлення фосфатної кислоти.

Для проведення молібденової проби у чисту пробірку вносять 10 крапель молібденового реактиву і 5 крапель гідролізату. Кип'ятять декілька хвилин. За наявності фосфорної кислоти рідина забарвлюється в лимонно-жовтий колір. Після охолодження випадає кристалічний осад комплексної сполуки.

Ортофосфорна кислота відкривається за допомогою молібденового реактиву:



Ортофосфорна кислота зв'язана із залишками оксіамінокислот у молекулах фосфопротеїдів естерним зв'язком. Спочатку від молекули білка під час гідролізу відщеплюються складні ефіри цих

амінокислот, потім вони гідролізуються до вільних амінокислот і фосфатної кислоти.

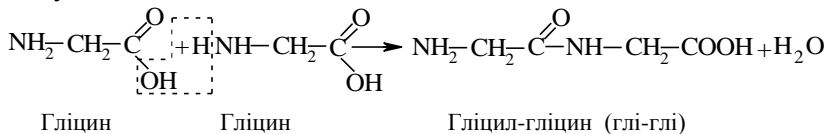
Робота 3. Кольорові реакції на білки

Наявність білків у розчинах і біологічних рідинах виявляють за допомогою ряду кольорових реакцій. Ці реакції характерні для залишків амінокислот, що складають хімічну основу молекули білка.

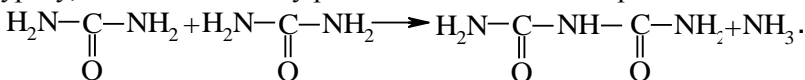
На лабораторно-практичних заняттях кольорові реакції на білки проводять в основному з яєчним альбуміном, який є повноцінним білком, в його молекулу входять усі незамінні амінокислоти, і желатином – типовим неповноцінним білком сполучнотканинного походження, у складі молекул якого переважають залишки заміних амінокислот, зокрема, гліцину та імінокислоти проліну.

Біуретова реакція

Біуретова реакція дозволяє виявити у молекулах білків пептидні зв'язки (–CO–NH–), за допомогою яких залишки амінокислот з'єднують між собою:



Свою назву біуретова реакція одержала від похідного сечовини – біурету, який виявляють у розчинах за допомогою реакції:



Крім білків і продуктів їх гідролізу (альбумоз, пептонів, поліпептидів, дипептидів) біуретову реакцію дає біурет, про що говорилось вище, оксамід, гістидин, аспарагін і деякі інші сполуки:



У разі дії на білки сульфату купруму у присутності гідроксиду натрію виникає фіолетове забарвлення, зумовлене утворенням мід-

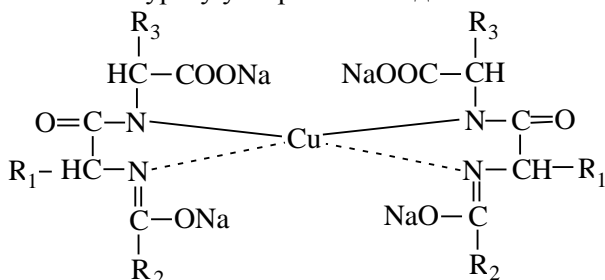
ного комплексу білка. Це свідчить про те, що у складі молекули білка є три- і поліпептидні угруповання. Сполуки, що мають у своєму складі дипептидні угруповання типу біурету, дають синє забарвлення.

Хід роботи. Беруть три пробірки. У першу пробірку поміщають декілька грамів кристалічної сечовини і нагрівають на слабкому вогні. Сечовина спочатку плавиться, потім маса тужавіє. Нагрівання припиняють і дають пробірці охолонути. Виникає біурет і виділяється аміак. До одержаного біурету додають 1 мл 10 % розчину їдкого натрію і збовтують. У суміш додають 1–2 краплі 1 % розчину сульфату купруму. Після збовтування виникає рожеве забарвлення.

У другу і третю пробірки наливають по 1 мл 10 % розчину їдкого натрію і по 1–2 краплі 1 % розчину сульфату купруму. Виникає фіолетове забарвлення різної інтенсивності.

Наявність пептидних зв'язків у молекулах біурету, білка і желатину дозволяє цим сполукам реагувати в лужному середовищі із сульфатом купруму, що призводить до утворення кольорових комплексних сполук. Інтенсивність і характер забарвлення цих комплексів залежить від кількості пептидних зв'язків у молекулах біурету, білків і продуктів їх гідролізу. Інтенсивність забарвлення дозволяє використовувати біуретову реакцію для кількісного визначення білків у біологічних рідинах.

У разі виявлення біурету утворюється мідна комплексна сіль:



Êî ì ì äâñîí à ñ³èü

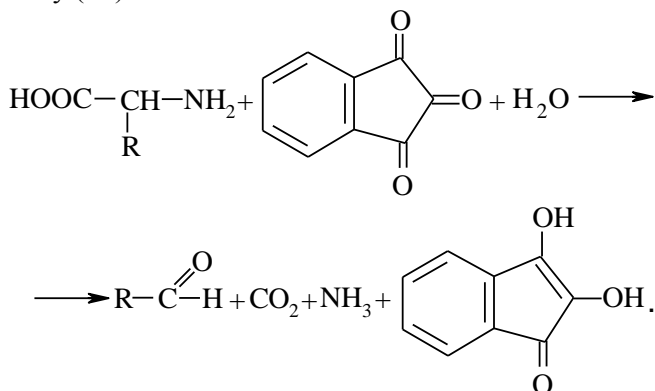
Нінгідрінова реакція

Нінгідрин, або трикетогідриндегідрат – реагент для виявлення α-амінокислот і їх фотометричного визначення.

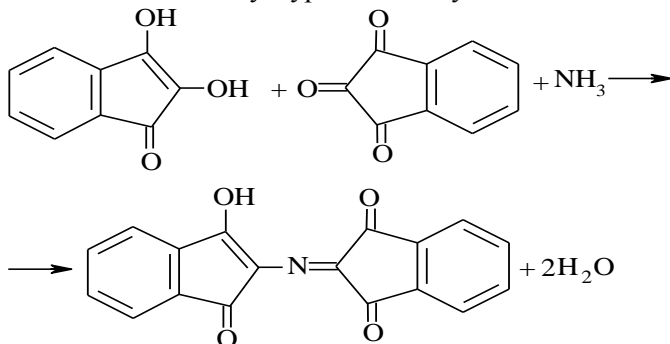
Хід роботи. Беруть три пробірки. У першу пробірку наливають 1 мл 0,2 % розчину гліцину, у другу – 1–2 мл 0,2 % розчину яєчно-

го білка, у третю – 1 мл 0,2 % розчину желатину. В усі пробірки додають по 5–6 крапель розчину нінгідрину і нагрівають. Виникає фіолетово-синє (іноді фіолетово-рожеве) забарвлення, яке з часом стає синім.

За нагрівання з нінгідрином α -амінокислоти та їх залишки у складі молекул білків окиснюються і розпадаються на альдегід, оксид карбону (IV) і аміак:



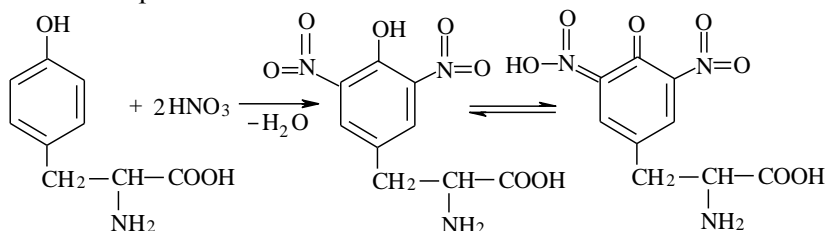
Надалі аміак вступає у реакцію з нінгідрином, утвореним у ході нагрівання дикетоксигідриненом, що призводить до утворення синьо-фіолетового комплексу мурексидної будови:



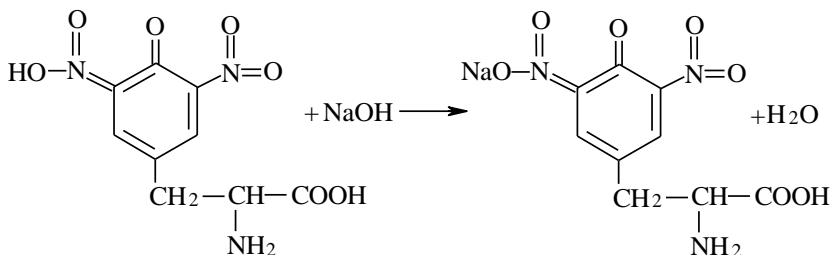
Ксантопротеїнова реакція

Хід роботи. У першу пробірку наливають 1 мл 0,1 % розчину фенолу. У другу і третю пробірки наливають по 1 мл 0,2 % розчинів яєчного білка і желатину і додають у всі пробірки по 5–6 крапель концентрованої нітратної кислоти. Виникає осад білків. Пробірки

нагрівають, потім охолоджують і у кожному з них обережно додають 1 мл концентрованого розчину аміаку, або 10 % розчину гідроксиду натрію. У перших двох пробірках з'являється осад лимонно-жовтого кольору, а в третій пробірці забарвлення ледь помітне за рахунок домішок інших білків. Жовте забарвлення осаду поступово переходить в оранжеве. Ксантопротеїнова реакція дозволяє виявити у складі білків ароматичні амінокислоти тирозин, фенілаланін і гетероциклічну амінокислоту триптофан. Їх ядра нітруються, що призводить до утворення нітропохідних білків, забарвлених у жовтий колір:



Під час внесення у суміш аміаку, або лугу виникають азогрупування, які обумовлюють перебудову бензольного ядра і появу оранжевого забарвлення:



Утворення жовтих плям на шкірі у разі попадання на неї нітратної кислоти пов'язано з утворенням її білками нітропохідних.

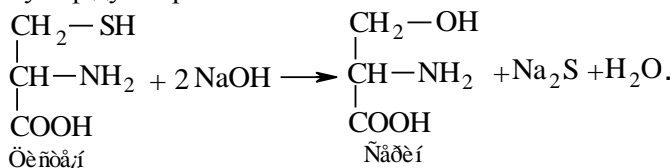
*Реакція на сірковмісні амінокислоти (цистин і цистеїн)
у білках (реакція Фоля)*

Сірковмісні амінокислоти – це цистеїн, цистин і метіонін. Цистеїн і цистин – складові частини багатьох білків, особливо похідних шкіри. Залишок цистеїну, який входить до складу білкової мо-

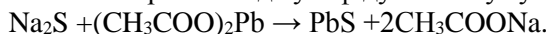
лекули і містить сульфгідрильну групу –SH, зв’язує частину активних центрів ферментів. Метіонін є донором метильних груп.

Хід роботи. В одну пробірку наливають 1 мл 1 % розчину яєчного білка, у другу – 1 мл 1 % розчину желатину, у третю – 1 мл 1 % розчину міозину. У кожену пробірку додають по 5 крапель 30 % розчину гідроксиду натрію і по одній краплі 5 % розчину ацетату плюмбуму і нагрівають до кипіння. Випадає темно-коричневий або чорний осад.

Під впливом гідроксиду натрію під час нагрівання відбувається частковий гідроліз молекул білків. Утворюються сірковмісні амінокислоти (цистеїн, цистин і метіонін), які руйнуються з утворенням сульфїду натрію:



Сульфїд натрію за взаємодії з ацетатом плюмбуму утворює темно-коричневий або чорний осад сульфїду плюмбуму:

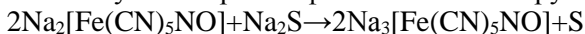


Проба на сірковмісні амінокислоти з нітропрусидом натрію

Реакція дозволяє відкрити у складі білків амінокислотні залишки цистеїну, цистину і метіоніну.

Хід роботи. Беруть дві пробірки. У першу поміщають 1–2 мл нерозбавленого білка, у другу – 1–2 мл розчину густого желатину. У кожену з пробірок додають по 1–2 мл 10 % розчину їдкого натрію і кип’ятять. Під час кип’ятіння виділяється аміак, який встановлюють за посинінням червоного лакмусового папірця або за запахом. Охолоджують і додають по 1 мл свіжоприготовленого 5 % розчину нітропрусиду натрію – виникає червоно-фіолетове забарвлення.

Перші дві реакції проходять, як і у попередньому досліді. Надалі нітропрусид натрію вступає у реакцію із сульфїдом натрію і утворює комплексну сіль червоно-фіолетового кольору:



Нітропрусид натрію

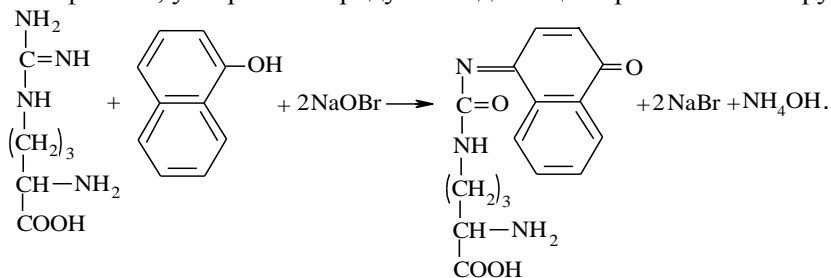
Забарвлений комплекс

Реакція виявлення залишків аргініну в молекулах білка

Аргінін вперше одержано із гідролізату паростків люпину в 1886 році. Входить до складу майже всіх білків. Простаміни сперми риб містять до 84 % залишків амінокислот від загальної маси.

Хід роботи. Беруть 4 пробірки. У першу пробірку наливають 1 мл 0,2 % розчину яєчного білка, у другу – 1 мл 0,2 % розчину желатину, у третю – 1 мл 0,2 % розчину міозину, у четверту – 1 мл 0,2 % розчину аргініну. У всі пробірки додають по 1 мл 10 % розчину гідроксиду натрію, по 0,5 мл 0,1 % спиртового розчину α -нафтолу і по 0,5 мл 2 % розчину гіпоброміту натрію, який має жовте забарвлення. Спостерігають за появою рожевого, потім червоного забарвлення різної інтенсивності у чотирьох пробірках.

Аргінін у присутності α -нафтолу окиснюється гіпобромітом натрію, втрачаючи одну аміногрупу. Окиснений аргінін сполучається з α -нафтолом, утворюючи продукт конденсації червоного кольору:



Аргінін

α -Нафтол

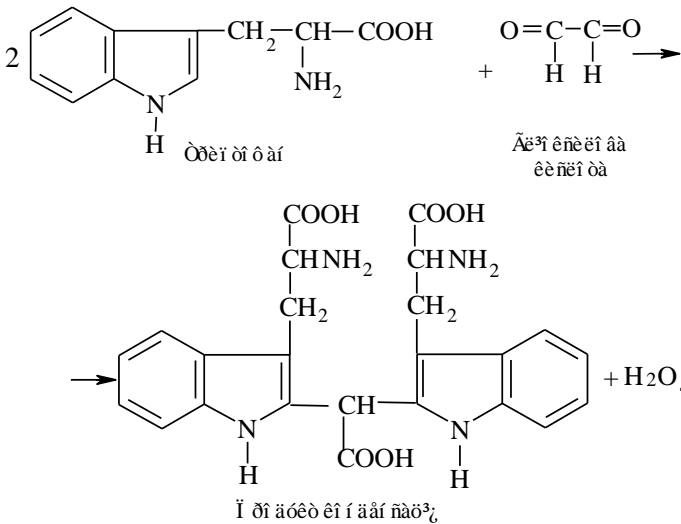
Продукт конденсації червоного кольору

Реакція виявлення триптофану за Адамкевичем

Триптофан – незамінна амінокислота, на яку багаті повноцінні білки.

Хід роботи. У першу пробірку вносять 1 мл 1 % розчину білка курячого яйця, додають 1 мл концентрованої ацетатної кислоти. Нахиливши пробірку, нашаровують близько 1 мл концентрованої сульфатної кислоти, не допускаючи змішування рідин. Через деякий час на межі двох рідин виникає червоно-фіолетове кільце. Аналогічну роботу проводять у другій пробірці, де замість білка курячого яйця поміщають 1 % розчин желатину. Кільце не виникає, так як у складі молекули желатину немає залишків триптофану.

В основі кольорової реакції лежить взаємодія триптофану з гліоксиловою кислотою, що призводить до утворення продукту конденсації, забарвленого у червоно-фіолетовий колір:



Нафтолова проба на вуглеводне угруповання у глікопротеїдах
Окремі білки, наприклад, глікопротеїди, містять у своєму складі залишки вуглеводів.

Глікозамінглікани (муцини) – слизові виділення епітеліальних покривних оболонок харчового каналу, дихальних і сечовивідних шляхів, слинних залоз. Виконують захисні та бактерицидні функції. Молекула глікопротеїдів складається з простого білка і глікозамінглікану. Глікозамінглікани найчастіше представлені гіалуроновою і хондроїтинсульфатною кислотами, гепарином, гепарин-сульфатом, дерматин-сульфатом, кератин-сульфатом і деякими іншими. Їх раніше називали муцинами і відносили до мукопротеїдів, а глікозамінглікани називали мукополісахаридами, оскільки вони вперше були одержані зі слизу (лат. *mucus* – слиз).

Хід роботи. У пробірку наливають 2 мл розчину слини і додають 4–5 крапель концентрованої ацетатної кислоти. Випадає осад муцину. Зливають надосадову рідину, осад використовують для досліджень. У другу пробірку наливають 0,5 мл 1 % розчину желатину. У кожену пробірку додають по 1 мл концентрованої сульфат-

ної кислоти і по 0,5 мл 0,2 % спиртового розчину α -нафтолу. Виникає фіолетове забарвлення різної інтенсивності.

У результаті дії сульфатної кислоти відбувається розпад вуглеводної частини білка, утворюється фурфурол і його похідні, які з α -нафтолом утворюють фіолетовий продукт конденсації.

Результати за якісними реакціями на білки внести у табл. 14.

Таблиця 14

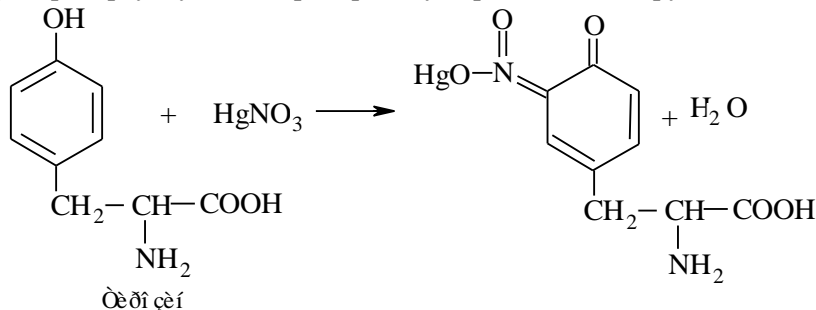
Реакція	Матеріал для дослідження	Реактиви	Забарвлення продуктів реакції	Чим обумовлена реакція

Якісна реакція на тирозин (реакція Мілона)

За допомогою реакції Мілона у складі білкових молекул виявляється залишок фенолу, а саме він входить до складу амінокислоти тирозин.

Хід роботи. У першу пробірку наливають 1 мл 1 % розчину фенолу, у другу – 1 мл 0,2 % розчину яєчного білка, у третю – 1 мл 0,2 % розчину желатину. В усі пробірки додають по 0,5 мл реактиву Мілона (у 30 мл концентрованої нітратної кислоти розчиняють 20 г ртуті на холоді) і обережно нагрівають. У першій та другій пробірках розчин забарвлюється у темно-червоний колір. У третій пробірці забарвлення розчину не змінюється, оскільки у молекулі желатину відсутні залишки тирозину. При цьому за надлишку реактиву Мілона може проходити ксантопротеїнова реакція, що дає жовте забарвлення.

Під час нагрівання яєчного білка з реактивом Мілона виникає нітросполука тирозину, яка, вступаючи у реакцію з нітратом ртуті, утворює ртутну сіль ніротирозину червоного кольору:



Робота 4. Реакції осадження білків

Розчини білків – нестійкі термодинамічні системи. Під дією фізичних і хімічних факторів вони можуть руйнуватися, що призводить до утворення осадів. Білки утворюють ліофільні розчини. Більшість колоїдних систем білків є мономолекулярними – молекули білків мають розміри колоїдних частинок (1–100 нм). У міцелі розрізняють ядро, що складається з однієї молекули білка, адсорбційний і дифузний шари, сольватну (гідратну) оболонку. Знак заряду адсорбційного шару визначає знак заряду міцели (рис. 11). Стійкість білка у водному розчині залежить від наявності подвійного електричного заряду міцели, величини дзета-потенціалу і водної оболонки. Після втрати міцелою водної оболонки (дегідратації) та втрати заряду частини білка легко коагулюють (злипаються) і випадають в осад.

Випадання білків в осад спостерігається під впливом різних факторів. В одних випадках спостерігається зворотна коагуляція, після якої білок може бути переведений знову в розчин після усунення дії шкідливих факторів (частіше за додавання розчинників). У цих умовах зберігається нативна структура білкової молекули (первинна, вторинна, третинна і четвертинна).

В інших умовах розчини білка осаджуються незворотно. Фактори, що спричиняють незворотне осадження білків, можуть бути різними: дія високих температур, солей важких металів, концентрованих розчинів сильних неорганічних і органічних кислот, лугів, алкалоїдних реактивів. Відбувається *денатурація* білкової молекули – порушується її структура (первинна, вторинна, третинна і четвертинна), руйнується гідратна оболонка.

Реакції осадження білків з їх водних розчинів використовуються для різних цілей. Перш за все, для виявлення і кількісного ви-

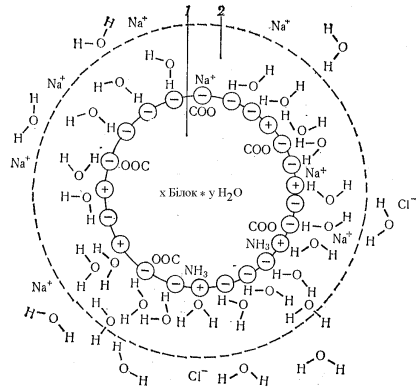


Рис. 11. Схема будови молекули білка у водному розчині, який стабілізований розчином NaCl: 1 – молекула білка; 2 – сольватна оболонка.

значення білків у біологічних рідинах, розділення білків на фракції, виділення білків із розчину для їх подальшого вивчення тощо.

I. Реакції зворотного осадження білків

За дії реагентів, що викликають зворотне осадження білків, в міцелах не відбувається глибоких змін і одержані осади знову можуть бути розчинені у вихідному розчиннику. Молекули білків при цьому зберігають свої властивості та в них не спостерігаються глибокі зміни рівнів структурної організації. До зворотних реакцій осадження білків, перш за все, слід віднести більшість реакцій висолювання, а також осадження етанолом, ацетоном, або у разі короткочасної дії низьких температур.

Висолювання білків

Висолювання – осадження білків концентрованими розчинами нейтральних солей лужних і лужноземельних металів. При цьому найчастіше використовуються сульфат амонію $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$, хлорид натрію (NaCl) , сульфат натрію (Na_2SO_4) , сульфат магнію (MgSO_4) і деякі інші нейтральні солі. Як відомо, білкові молекули мають гідрофільні властивості. Наявність водної оболонки не дає білковим міцелам з'єднуватися між собою та утримує їх у розчині. Другим фактором, що обумовлює стійкість білкової міцели, є однойменний заряд частинок, що сприяє їх відштовхуванню. Цей заряд у більшості випадків негативний.

Гідрофільність молекул білка обумовлена наявністю гідрофільних груп: $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{SH}$ та інших. Вони взаємодіють із диполями води, утворюючи гідрофільну оболонку різної товщини. Під час додавання у розчин білка нейтральних солей їх молекули дисоціюють на іони, які адсорбуються на поверхні міцел білків, що робить частинки електронейтральними. У разі значної концентрації солей відбувається дегідратація міцел, вони втрачають седиментаційну стійкість і випадають в осад.

Такі осади є зворотними. Під час внесення у розчин білка значної кількості вихідного розчинника відбувається десорбція іонів, які сприяли коагуляції, і розчин білка при цьому переходить у вихідне положення. Іони, що викликали коагуляцію, можна вивести діалізом.

Різні фракції білків для осадження потребують певних концентрацій нейтральних солей. Зокрема, концентровані розчини сульфата амонію висолюють майже всі білки. Глобуліни випадають в осад

за дії на суміш білків напівнасиченого розчину сульфату амонію. Для виділення альбумінів розчин сульфату амонію повинен бути насиченим. Глобуліни висолюються тільки насиченими розчинами хлориду натрію та сульфату магнію. Якщо підкислити розчин білків і довести їх рН до ізоелектричної точки, то для осадження слід використовувати більш низькі концентрації хлориду натрію і сульфату магнію.

Хід роботи. У пробірку наливають 3–4 мл сироватки крові, приливають такий самий об'єм насиченого розчину сульфату амонію і добре збовтують. Випадає осад білків глобулінів. Через 3–6 хв розчин фільтрують – у фільтраті залишається альбумін. До фільтрату додають добре розтертий порошок сульфату амонію до повного насичення розчину (поки нова кількість реактиву залишається нерозчиненою). Випадає ще один осад – альбумін. Осад альбуміну відфільтровують. Із фільтратом проводять біуретову реакцію (робота 1) – вона негативна. Отже у фільтраті відсутні білки. Осад альбуміну переносять із фільтратом у пробірку і додають 3–5 мл води, енергійно збовтують протягом 5–8 хв, при цьому альбумін розчиняється у воді.

Висолування білків сульфатом магнію і хлоридом натрію

Хід роботи. У дві пробірки наливають по 2–3 мл сироватки крові. У першу пробірку за енергійного збовтування додають до повного насичення порошок сульфату магнію (добре розтертий), у другу – сульфату натрію. Через декілька хвилин в обох пробірках виникають осади глобулінів. Розчини фільтрують. У фільтрати обох пробірок додають по 2 краплі ацетатної кислоти. Випадають осади альбумінів. Через 3–5 хв альбуміни фільтрують. Із фільтратом проводять біуретову реакцію (робота 1). Вона негативна. Осад альбумінів переносять із фільтратів у пробірки і додають по 3–5 мл дистильованої води, енергійно збовтують 5–8 хв. При цьому осади розчиняються у воді, що свідчить про зворотність реакції висолування.

Осадження білків етанолом і ацетоном

Органічні розчинники (етанол, ацетон, діетиловий етер) здатні осаджувати білки з нейтральних або слабокислих розчинів. Зокрема, під час додавання до водного розчину білка етанолу можна досягти такої концентрації, коли випадає осад білка. Концентрація етанолу для розчинів різних білків різна. Концентрований розчин

спирту зв'язує воду, що призводить до дегідратації міцел та їх коагуляції. Коагуляція відбувається швидше і за менших концентрацій коагулянту за наявності нейтральних солей. Солі дисоціюють, що призводить до утворення катіонів і аніонів. Іони солей зв'язуються міцелами і нейтралізують їх заряд. Це зменшує стійкість колоїдних розчинів білків і зумовлює їх коагуляцію. Аналогічну дію на міцели білків має ацетон. Якщо осадження проводити короткий час і за низьких температур, то молекули білків майже не змінюють своєї будови і після додавання певної кількості розчинника (води) відновлюють колоїдний стан і осад розчинюється. Таким чином, така коагуляція є зворотною. За допомогою осадження, змінюючи рН, концентрації етанолу і за підтримки низьких температур, із плазми крові можна виділити значну кількість білкових фракцій, у т.ч. γ -глобулінів, ферментів, антитіл.

Хід роботи. У чотири пробірки наливають по 2–3 мл розчину білка. У другу і четверту пробірки додають по кілька кристаликів хлориду натрію. У пробірки 1 і 2 повільно наливають 96° етанол, енергійно збовтують, поки не з'явиться осад. Порівнюють, в якій із пробірок швидше став утворюватись осад білків. У пробірки 3 і 4 додають ацетон до тих пір, поки не випаде осад. За додавання ацетону суміш енергійно змішують. Спостерігають, коли у кожній пробірці випав осад. Надосадову рідину зливають, додають 2–5 мл води і збовтують. Осад розчинюється, оскільки осадження білків зворотне. Якщо осад тримати тривалий час у розчині спирту чи в ацетоні, відбувається денатурація білків і після додавання води він не розчиняється – осадження незворотне.

II. Реакції незворотного осадження білків

До цієї групи реакцій осадження належать такі реакції, під впливом яких у міцелах білків відбуваються глибокі та незворотні зміни. Перш за все, незворотно руйнується сольватна оболонка міцел, інактивуються гідрофільні групи $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{SH}$, що знаходяться на поверхні білкової молекули і зв'язують молекули та іони води, порушується четвертинна, третинна, вторинна і навіть частково або повністю первинна структура білкових молекул. Проходить денатурація білкових молекул.

До цієї групи реакції осадження відносять осадження білків солями важких металів, алкалоїдними реактивами, мінеральними та органічними кислотами, кип'ятінням.

Осадження білків солями важких металів

У разі додавання у розчин білків солей важких металів (феруму, купруму, плюмбуму, цинку, меркурію, аргентуму та ін.) виникають незворотні осади, білки з такими солями утворюють нерозчинні у воді сольові та комплексні сполуки. На відміну від висолювання білків солями лужних і лужноземельних металів для дії важких металів необхідна невелика їх концентрація. У разі надлишку у розчині деяких таких солей (сульфатів аргентуму, купруму і плюмбуму) осад білків, що утворився, може знову розчинитися. Відбувається пептизація, яка зумовлена надлишком адсорбованих осадом іонів, і перезарядка білкового комплексу. Виникає новий розчин комплексу білка з металом. Такі білкові осади, що виникають у результаті дії солей важких металів, нерозчинні у первинному розчиннику, воді, і слабких розчинах солей. Не настає розчинність і після діалізу або розведення великою кількістю води. Тут має місце незворотне осадження білків, обумовлене явищем денатурації.

Здатність білків міцно зв'язувати іони важких металів використовується у клінічній практиці. З метою запобігання всмоктуванню отруйних для організму людини або тварини іонів використовують ячний білок або молоко. Зокрема, вони використовуються як антидот під час отруєння солями меркурію (сулемою), плюмбуму (за використання недоброякісного посуду), або купруму (у разі окиснення мідного посуду). Іноді ячний білок і молоко використовують під час отруєння хімікатами, що містять солі важких металів. Наприклад, препарат гранозан, який використовують для боротьби із садовими шкідниками, потрапивши у шлунок (у жуйних передшлунки), утворює нерозчинні комплексні сполуки важких металів із білками, що призводить до припинення всмоктування отруйних іонів у тонкому відділі кишечника.

Незворотне осадження білків солями важких металів використовується як для виділення білків із водних розчинів, так і для звільнення рідин від білків (зокрема, під час визначення кількості цукру у крові за методом Хагедорн-Іенсена).

Хід роботи. У 4 пробірки наливають по 1–2 мл 1 % розчину білка. У першу пробірку додають декілька крапель 0,5 % розчину ацетату плумбуму, у другу – 5 % розчину сульфату купрум(II), у третю – 3 % розчину нітрату аргентуму, у четверту – 0,5 % розчину сулеми (обережно, отрута!). В усіх пробірках утворюються осад. У перші дві пробірки додають надлишок відповідних солей – осад розчиняється. Якщо у 3-тю пробірку додати надлишок нітрату аргентуму, осад не розчиняється. У пробірку з осадом після додавання розчину сулеми додають 7–8 крапель насиченого розчину хлориду натрію – осад розчиняється.

Осадження білків алкалоїдними реактивами

Білки з водних розчинів можуть осаджуватись алкалоїдними реактивами – пікриною, фосфорномолібденовою, фосфорновольфрамною, залізоціаністою кислотами, таніном, йодидом меркурію, жовтою кров'яною сіллю тощо. Осаджувальна дія алкалоїдних реактивів у більшості випадків обумовлена наявністю у білках і алкалоїдах (наприклад, у таніні) і алкалоїдних реактивах (наприклад, у пікринової кислоти) аналогічних лужних азотистих (наприклад, індольних, фенольних, імідазольних, пірольних) угруповань. У сполуках, що виникають внаслідок такої взаємодії, алкалоїд або алкалоїдний реактив виступають як аніон, а молекула білка – як катіон. Це вимагає такі реакції осадження проводити у кислому середовищі. При цьому збільшується дисоціація аніонних груп і білкові залишки стають своєрідними катіонами. Це дозволяє їм активно взаємодіяти з негативно зарядженими іонами, алкалоїдними реактивами. Основні білки, у складі молекул яких переважають залишки діамінодикарбонових амінокислот (аргініну, лізину, оксипізіну), осаджуються алкалоїдними реактивами у нейтральному середовищі.

Хід роботи. У чотири пробірки наливають по 1–2 мл розчину білка, підкислюють їх 1–2-ма краплями 1 % розчину ацетатної кислоти. У першу пробірку додають 1–2 краплі насиченого розчину таніну, у другу – насиченого розчину пікринової кислоти, у третю – 2–3 краплі 5 % розчину гексаціаноферату калію, у четверту – 1–2 краплі розчину йодиду меркурію у йодиді калію. Спостерігають за утворенням осадів білків та їх кольором.

Осадження білків мінеральними кислотами

Мінеральні кислоти викликають незворотне осадження білків з їх водних розчинів. Кислоти здатні руйнувати гідратну оболонку міцел. Після дегідратації іони кислот можуть утворювати з білками солеподібні сполуки. Незворотно руйнуються четвертинна, третинна, вторинна і навіть первинна структури білкових молекул. Надлишок мінеральних кислот, за винятком нітратної, спричинює розчинення осаду. Ця властивість нітратної кислоти широко використовується у клінічній практиці для якісного і кількісного визначення білків у біологічних рідинах, зокрема у сечі.

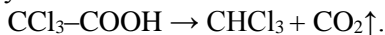
Хід роботи. У 3 пробірки наливають по 1 мл концентрованої кислоти: у першу – хлоридної, у другу – сульфатної, у третю – нітратної. У кожну пробірку обережно додають по 1–2 мл 1 % розчину білка. На межі двох рідин виникає осад білка у вигляді білих кілець. Обережно збовтують вміст кожної із пробірок, і відмічають розчинність білків у перших двох пробірках та відсутність у третій.

Осадження білків органічними кислотами

Механізм дії окремих органічних кислот, що зумовлюють осадження білків, аналогічний дії мінеральних кислот. З цією метою найчастіше використовують трихлорацетатну і сульфосаліцилову кислоти.

Хід роботи. У дві пробірки наливають по 1–2 мл 1 % розчину білка і додають у першу пробірку декілька крапель 3 % розчину трихлорацетатної кислоти, у другу – декілька крапель 20 % розчину сульфосаліцилової кислоти. Спостерігають за утворенням осаду.

Осадження білків розчином трихлорацетатної кислоти використовують для повного звільнення біологічних рідин від білка, зокрема, для осадження білків сироватки крові. Після осадження білків у сироватці залишаються в розчиненому стані продукти розпаду білків: залишковий нітроген (сечовина, аміак, амінокислоти). Якщо після осадження білків треба видалити трихлорацетатну кислоту, необхідно фільтрат прокип'ятити, при цьому утворюються хлороформ і оксид карбону:



Осадження білків кип'ятінням

Більшість білків під час кип'ятіння випадають в осад внаслідок денатурації їх молекул. Відбувається незворотне осадження білків.

Такі осадки, як правило, не можуть розчинитися у первинному розчиннику. Проте є виняток, зокрема, деякі білки денатуруються кип'ятінням зворотно. Наприклад, фермент трипсин, який денатурується короточасним кип'ятінням і випадає в осад після короточасного охолодження, спонтанно переходить у розчинну форму та відновлює свою ферментативну активність.

Температура згорання для кожного білка різна. Більшість білків денатурує за температури 50–55 °С. Деякі білки витримують високі температури і тривале кип'ятіння. Наприклад, фермент аденілаткіназа зберігає свою ферментативну активність навіть за температури 100 °С. Механізм теплової денатурації пов'язаний з внутрішньомолекулярною перебудовою структури білкової молекули. Перш за все проходить розрив слабких водневих зв'язків, що формують вторинну і третинну структури білкової молекули. Відбуваються глибокі зміни у специфічній внутрішній структурі білка. Зникає типова конфігурація білкової молекули, за якої просторово утримувались пептидні ланцюги і гідрофільні групи ($-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{SH}$).

Зв'язки між окремими пептидними ланцюгами руйнуються, складки пептидних ланцюгів розриваються і з середини на поверхню білкової молекули виходять гідрофобні радикали та нерозчинні у воді групи. Потім проходить сполучення окремих білкових молекул у великі агрегати, що осідають під впливом сили тяжіння в осад.

Тепловій денатурації білка сприяє зміна навколишнього середовища і присутність солей у розчині. Найбільш повне осадження білків під час кип'ятіння спостерігається за ізоелектричної точки, коли сумарний заряд адсорбційного і дифузного шарів міцели дорівнює нулю.

Слід відмітити, що у сильнокислих і лужних розчинах не відбувається коагуляції денатурованих білків. Причиною такого явища є перезарядка білкової міцели: у кислому середовищі вона заряджається позитивно внаслідок пригнічення дисоціації кислих груп, а у лужному – негативно, оскільки відбувається перехід катіонних груп у недисоційований стан. Одноименні електричні заряди обумовлюють відштовхування таких міцел, не дають їм зблизитися, злипатися і утворювати осадки. У сильнокислотних розчинах коагуляція може виникати у тому випадку, коли у розчин вносяться електроліти, які здатні нейтралізувати електричний заряд. Такими реагентами частіше всього є нейтральні солі.

Хід роботи. У п'ять пробірок наливають реактиви, як вказано у табл. 15.

Таблиця 15

Речовина	Номер пробірки				
	1	2	3	4	5
1 % розчин білка, мл	1	1	1	1	1
1 % розчин ацетатної кислот, мл	–	0,2	–	–	–
Концентрована ацетатна кислота, мл	–	–	0,2	0,2	–
Насичений розчин NaCl, мл	–	–	–	0,2	–
10 % розчин NaOH, мл	–	–	–	–	0,5
Результат (наявність осаду)					

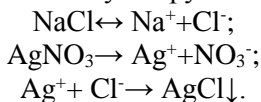
Уміст пробірок перемішують і кип'ятять. Спостерігають за утворенням осаду. У першій пробірці відбувається поступове випадання білка в осад, у другій і четвертій – осад випадає швидше і повніше, у третій і п'ятій – осад взагалі не утворюється.

Робота 5. Очищення білків методом діалізу

Діаліз – очищення розчинів білків через напівпроникні мембрани від низькомолекулярних органічних і мінеральних домішок. Завдяки дифузії можна звільнити білки від домішок, які виникають внаслідок забруднення розчинів, утворення продуктів гідролізу білків (амінокислот і низькомолекулярних пептидів тощо).

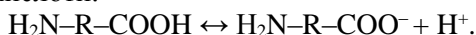
Хід роботи. У колодієвий мішечок (рис. 5) вносять 10–15 мл розчину білка, що містить домішки кухонної солі і поміщають в ємність із дистильованою водою. Через годину з цієї ємності, де знаходиться колодієвий мішечок з білком, відбирають по 2–3 мл води і поміщають у дві пробірки. У першу пробірку додають 1–2 краплі розчину нітрату аргентуму – випадає білий осад іонів хлориду аргентуму. У другу пробірку додають 1–2 краплі 1 % розчину сульфату купруму та 1 мл 10 % розчину їдкого натрію. Збовтують. Фіолетове забарвлення не виникає (біуретова реакція негативна).

Внаслідок діалізу через напівпроникну мембрану у воду проникають іони натрію і хлору. Після додавання декількох крапель нітрату аргентуму утворюється осад хлориду аргентуму, що є типовою реакцією на виявлення іону хлору:

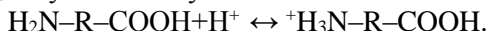


Робота 6. Визначення ізоелектричної точки білка

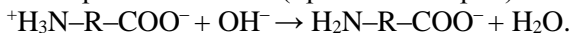
Білки – амфотерні електроліти. У складі їх молекул є велика кількість кислих і основних груп. Кислотними групами в основному є карбоксильна група залишків моноамінодикарбонових амінокислот, фенольні гідроксикислоти (залишки тирозину) і сульфгідрильні групи (цистеїну і метіоніну). Основні властивості білка обумовлені, перш за все, наявністю в їх молекулах залишків діаміномонокарбонових (аргініну, лізину, оксилізину, орнітину) і діамінодикарбонових (цистину) амінокислот, а також імінних угруповань (проліну та оксипроліну). У разі дисоціації карбоксильних груп білок має властивості слабкої кислоти:



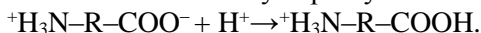
Іони Гідрогену можуть приєднуватися до аміногруп білкової молекули, при цьому білок набуває властивості слабкої основи:



У лужних розчинах молекула білка проявляє властивості аніону. Наприклад, у разі втрати протону групи $-\text{NH}_3^+$ за дії їдкої натрію виникає натрієва сіль білка (протеїнат натрію):



У кислих розчинах білкова молекула реагує як катіон:



Біполярний іон білка Катіон білка

Отже, фактором, який визначає дію молекули білка як аніону або катіону, є концентрація водневих іонів у розчині. Підвищення концентрації іонів Гідрогену (кисле середовище) зменшує дисоціацію кислотних груп молекул білків і переводить їх у катіони, зменшення концентрації іонів Гідрогену (лужне середовище), навпаки, знижує лужну дисоціацію і переводить молекули білків в аніони. Змінюючи концентрацію водневих іонів, можна досягти такого стану, коли дисоціація кислотних груп білків буде дорівнювати дисоціації лужних груп. При цьому число позитивних зарядів амфотерного іону білка зрівняється з кількістю негативних зарядів і заряд молекули білка у цілому стане дорівнювати нулю. Такий стан називають *ізоелектричним станом* (ІЕС), а рН розчину, за якого настає такий стан, називають *ізоелектричною точкою* (ІЕТ) білка. За ІЕТ в електричному полі частинки білків не можуть пересуватися ні до аноду, ні до катоду. Білок знаходиться у вигляді амфотерного іону, що має рівну кількість груп, які мають негативні

заряди. За інших значень рН частинка білка може мати переважну кількість або негативних, або позитивних зарядів.

Розчини білків у ІЕТ найменш стійкі. У цьому випадку відштовхування одноіменно заряджених частинок, які обумовлюють стійкість колоїдного розчину білка, припиняється, і стабілізуючим фактором у білкових міцелах залишається лише сольватна (гідратна) оболонка. Додавання у такий розчин речовин, що можуть вбирати воду (наприклад, нейтральних солей, солей важких металів), руйнує, призводить до руйнування гідратної оболонки, що сприяє коагуляції частинок білка і вони випадають в осад.

Для більшості білків ІЕТ близька до нейтрального значення, але трохи зсунута у кислу сторону. Це свідчить, що в білках переважають залишки моноамінодикарбонових кислот і в нейтральних розчинах вони реагують як слабкі кислоти. Значно менше зустрічається білків, у молекулах яких переважають залишки діаміномонокарбонових і діамінодикарбонових кислот. Їх ІЕТ знаходиться у слаболужній зоні (рН від 7 до 9). В ІЕТ білок має мінімум іонізації, максимально нестійкий і дуже легко може бути осаджений.

Ізоелектричні точки для окремих білків такі: фібриноген – 8,0; гемоглобін – 6,7; міоглобін – 5,2; желатин – 4,9; альбумін – 4,9; казеїн – 4,7; муцин – 2,7; пепсин – 1,1.

Хід роботи. У 6 пробірок наливають розчини у кількостях, зазначених у табл. 16.

Таблиця 16

Розчини, мл	№ пробірок					
	1	2	3	4	5	6
CH ₃ COONa	2	2	2	2	2	2
CH ₃ COOH, 0,1 н	0,25	0,5	1,0	2	4	–
CH ₃ COOH, 1н	–	–	–	–	–	0,8
Вода дистильована	3,75	3,5	3,0	2	–	3,2
рН розчину	5,6	5,3	5,0	4,7	4,4	4,1
Помутніння						

Вміст кожної із пробірок ділять навпіл. У перші 6 пробірок вносять по 1 мл 1 % розчину желатину, а у інші 6 пробірок – по 1 мл 1 % розчину казеїну. У третю пробірку першого ряду і четверту пробірку другого ряду обережно піпеткою нашаровують етанол до появи ледве помітної каламуті. Частіше всього для цієї реакції

необхідно 3,5 мл етанолу. Встановивши таку кількість, додають спирт в інші пробірки. Через 30 хв спостерігають помутніння в усіх інших пробірках, оцінюють його інтенсивність.

Примітка. Знаком + позначається ступінь помутніння у кожній пробірці.

Робота 7. Визначення вмісту нітрогену амінних груп білка методом формольного титрування

Визначення амінних груп дає уяву про наявність у молекулі білків вільних аміногруп, які належать залишкам діаміномонокарбонових (аргініну, орнітину, лізину, оксизину) і діамінодикарбонових (цистину) амінокислот. Під час гідролізу білків концентрація амінних груп у розчині збільшується, оскільки проходить гідролітичне розщеплення поліпептидних ланцюгів і зростає кількість проміжних (альбумоз, пептонів, поліпептидів і дипептидів) і кінцевих (амінокислот) продуктів гідролізу білкових молекул. Концентрація амінних груп гідролізату тісно пов'язана з концентрацією карбоксильних груп. Під час гідролізу білків настає момент, коли гідроліз завершився і концентрації амінних і карбоксильних груп більше не змінюються, що свідчить про закінчення гідролізу.

Метод ґрунтується на взаємодії амінокислот із формальдегідом аміногруп з утворенням метиленамінокислот, які титруються лугом. Індикатором для проведення цієї роботи найчастіше слугує тимолфталейн, зона віражу якого знаходиться за рН 9,0–9,5. Формольне титрування краще всього проводиться під час визначення амінних груп у розчинах найпростішої амінокислоти – гліцину.

Амінокислоти у водних розчинах утворюють внутрішньомолекулярні солі, тому без попереднього блокування аміногруп формальдегідом титрувати карбоксильні групи лугом неможливо. Утворена метиленова похідна амінокислоти легко взаємодіє з лугом.

Хід роботи. У колбу наливають 1 мл 5 % розчину казеїну, додають 0,5 мл 20 % розчину формаліну та 2–3 краплі фенолфталейну. Титрують 0,01 н розчином NaOH із мікробюретки до стійкого рожевого забарвлення. Таким чином визначають кількість вільних карбоксильних груп у молекулі білка.

Паралельно з цим проводять титрування карбоксильних груп амінокислот у розчині білка після гідролізу, який проводився впродовж 45 хв. Гідролізат охолоджують, виливають у циліндр і дово-

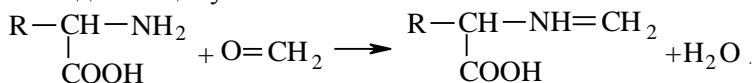
дять об'єм дистильованою водою до 25 мл. Для титрування відбирають 1,25 мл гідролізату, що відповідає 1 мл розчину білка (20 мл білка відповідає 25 мл гідролізату). У цю ж пробірку додають декілька крапель фенолфталеїну і нейтралізують вміст 5 % розчином NaOH до слаборожевого забарвлення (луг нейтралізує хлоридну кислоту, яка використовувалася для гідролізу, тому ця кількість лугу не враховується). Потім додають формалін. Формалін блокує аміногрупи, при цьому звільняються карбоксильні групи і розчин стає кислим, а фенолфталеїн знебарвлюється. Визначають кількість лугу, яку витратили на титрування.

Вміст амінного нітрогену в гідролізаті визначають за формулою:

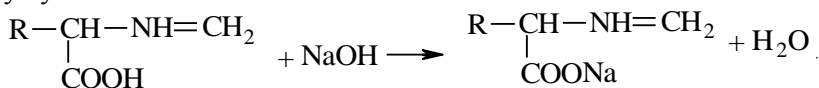
$$X = \frac{a \times 0,14 \times 100 \times 100}{n},$$

де X – вміст амінного нітрогену у розчині білка, %; a – кількість 0,01 н розчину NaOH, що витратили на титрування, мл; 0,14 – коефіцієнт переведення кількості витраченого лугу на аміний нітроген (1 мл 0,01 н розчину NaOH відповідає 0,14 мл нітрогену); n – концентрація розчину білка, %; 100 – коефіцієнт переведення у відсотки; 100 – коефіцієнт переведення у г.

Робота проходить у два етапи. Перш за все, за взаємодії аміної кислоти з формальдегідом зв'язується амінна група і виникає метиленове похідне гліцину:



Надалі відбувається титрування метиленового похідного гліцину лугом:



Робота 8. Визначення амінокислот методом розподільної хроматографії на папері

У ході вивчення білків кормів виникає необхідність визначення їх амінокислотного складу. Білки кормів ділять на повноцінні та неповноцінні. Повноцінні білки мають корми, до складу яких у вигляді амінокислотних залишків входять незамінні амінокислоти, що не можуть синтезуватися організмом тварин: валін, ізолейцин, лейцин, лізин, метіонін, треонін, триптофан і фенілаланін. До умовно незамінних амінокислот відносять гістидин. Інші амінокис-

лоти, що входять у склад білків, вважають замінними, вони можуть синтезуватися в організмі тварин: аланін, аспарагінова і глутамінова кислоти, серин. П'ять амінокислот вважають частково замінними: аргінін, гліцин, тирозин, цистеїн і цистин. Імінокислоти пролін і оксипролін можуть синтезуватися у тваринному організмі. Амінокислотний склад білкового гідролізату можна визначити за допомогою хроматографічного методу на папері, який є однією з модифікацій хроматографічного аналізу, розробленого М.С. Цветом (1903).

Для визначення амінокислотного складу білкового гідролізату на смужку фільтрованого паперу на деякій відстані від нижнього краю наносять краплю розчину, що містить суміш амінокислот. Після висихання нижній край смужки поміщають у розчинник (розчин фенолу у воді, водний розчин бутилового або амілового спирту тощо) спеціальної камери і щільно її закривають. Розчинник рухається по капілярах фільтрувального паперу знизу вгору, захоплює із собою амінокислоти, які за рахунок різних властивостей (заряд, молекулярна маса) рухаються з різними швидкостями і по-різному утримуються папером. Чим краще амінокислота розчиняється у розчиннику, тим більшою є швидкість її просування по фільтрувальному паперу та вище розміщення на смужці відносно рівня розчинника. Якщо смужку паперу з амінокислотами висушити і зволожити розчином нінгідрину, то місце розміщення амінокислот виявиться на папері у вигляді синіх і фіолетових плям. Для кожної амінокислоти на такому папері за даних умов властиве певне розташування плям. Воно визначається коефіцієнтом R_f , який визначає відношення шляху, пройденого відповідною амінокислотою від місця нанесення краплі розчину до середини плями амінокислоти (а), до шляху, який пройшов розчинник від місця нанесення проби до фронту розчинника (б): $R_f = a/b$.

Для ідентифікації амінокислот розчину необхідно паралельно з досліджуванням розчину визначити коефіцієнт R_f окремих хімічно чистих амінокислот у тих же самих умовах. Якщо такий коефіцієнт в обох випадках ідентичний, то ми маємо справу з одними і тими ж амінокислотами. Метод розподільної хроматографії на папері простий і доступний для вивчення малої кількості амінокислоти у розчинах і біологічних речовинах. Його використовують для встановлення в субстратах різних речовин – вітамінів, гормонів, пігментів і інших біологічноактивних речовин.

Хід роботи. На верхньому кінці 4-х смужок фільтрувального паперу роблять прокол голкою. На нижньому кінці паперу на відстані 3 см від краю простим олівцем відмічають крапку для нанесення проби. Смужки нумерують. Номери ставлять олівцем поблизу верхнього кінця. На першу смужку мікропіпеткою наносять краплю розчину суміші амінокислот у кількості 0,01 мл, на другу – 0,01 мл розчину аланіну, на третю – 0,01 мл розчину глутамінової кислоти, на четверту – 0,01 мл розчину лейцину. Місце нанесення досліджуваного і контрольних розчинів амінокислот підсушують на повітрі. На дно скляного циліндра наливають 50–60 мл насиченого водного розчину фенолу, на гачки корку підвішують паперові смужки і опускають їх із корком у циліндр з розрахунком, щоб смужки занурились у водний розчин фенолу на 1–1,5 см, висіли вертикально і не торкались стінок циліндра. Циліндр ставлять у термостат з температурою 40–45 °С на 2–3 години. Фронт розчинника разом з амінокислотами підніметься на 14–15 см. Смужки виймають і підвішують у сушильній шафі на 10–15 хв за температури 100 °С. Після випаровування розчинника і фенолу смужки виймають і підвішують на штатив. Обприскують скляним пульверизатором 0,1 % розчином нінгідрину і знову вміщують у сушильну шафу за тієї ж температури на 5–6 хв. Проявлені нінгідрином хроматограми поміщають на папір і лінійкою вимірюють відстані від місця нанесення проби до середини плями (а) і розташування фронту розчинника (б).

Обчислюють коефіцієнт R_f . Хроматограму суміші амінокислот порівнюють з еталонами – хроматограмами окремих амінокислот. Замалювати прилад і хроматограми.

Робота 9. Перетравлювання білків пепсином

Обмін білків – центральна ланка всіх біологічних процесів, які складають основу існування організму. Як і обмін інших речовин, він складається з 4-х етапів: *перетравлювання, всмоктування, проміжного і кінцевого* обмінів. Перетравлювання білків починається у шлунку (у жуйних у сичузі), де білки зазнають дії шлункового соку. Шлунковий сік – безбарвна і дещо опалесціююча рідина з густиною 1,002–1,010. У людини за добу утворюється до 2 л соку, у свині – 4, у собаки – 2–3, у великої рогатої худоби – 30, у коня – 20, у вівці та кози – 4 л. Головним ферментом шлункового соку є

пепсин, який активізується хлоридною кислотою. рН шлункового соку людини дорівнює 1,5–2,0, великої рогатої худоби – 2,17–3,14, свині – 1,1–2,0, коня – 1,2–3,8, вівці та кози – 1,9–5,6, птиці – 3,8. Хлоридна кислота створює умови для перетворення пепсиногену у пепсин, прискорює розщеплення білків до складових частин, спричинює їх денатурацію, набрякання і розпушення. Перетравлювання білків краще всього можна прослідкувати на розщепленні фібрину, який під впливом пепсину і хлоридної кислоти стає розчинним і перетворюються у проміжні та навіть частково кінцеві продукти гідролізу.

Хід роботи. Беруть 4 пробірки. У першу наливають 3–4 мл 0,2 % розчину хлоридної кислоти, у другу – 3–4 мл розчину пепсину у хлоридній кислоті, або шлункового соку, у третю – 3–4 мл розчину пепсину або шлункового соку, нейтралізованих карбонатом натрію під контролем лакмусового папірця, у четверту – 3–4 мл прокип'яченого і охолодженого розчину пепсину у хлоридній кислоті або шлункового соку. У кожну пробірку вносять по однаковому невеличкому шматочку фібрину. Всі пробірки ставлять у водяну баню на 30–60 хв за температури 37–40 °С. Пробірки охолоджують та вивчають перетравлення. Вміст пробірок фільтрують. Проводять біуретову реакцію. У першій пробірці відбувається лише набрякання фібрину під дією хлоридної кислоти, у другій – розщеплення до проміжних і кінцевих продуктів гідролізу, у третій – фібрин залишається без змін (у нейтральному середовищі пепсин неактивний), у четвертій – відбулось набрякання фібрину під впливом хлоридної кислоти, розщеплення білка не відбулось внаслідок інактивації ферменту кип'ятінням.

Робота 10. Перетравлювання білків ферментами підшлункової залози

Заключні процеси перетравлювання білків відбуваються у тонкому відділі кишечника, де нерозщеплені білки або продукти їх гідролізу піддаються дії соку підшлункової залози і кишечника. Сік підшлункової залози – прозора рідина, без запаху, зі слаболужною реакцією, має близько 10 % сухого залишку. У людини за добу виділяється близько 1,5–2 л, у корови – 3–4, у свині – 8, у собаки – 0,2 л соку. Сік містить комплекс ферментів білкового, нуклеїнового, ліпідного і вуглеводного обмінів. Близько 30 % пептидних зв'язків

білків і проміжних продуктів їх гідролізу розщеплюються панкреатичним ферментом трипсином, 50 % – хімотрипсином, частина – амінополіпептидазою, карбоксиполіпептидазою, трипептидазами і дипептидазами. Пепсин, ферменти-протеази соку підшлункової залози і кишкового соку розщеплюють білки до амінокислот і простетичних груп, які засвоюються стінкою тонкого кишківника, після чого надходять у печінку та велике коло кровообігу.

Хід роботи. У колбу вносять 3–5 г казеїну, 25–30 мл витяжки або 2 % розчину панкреатину і 5 мл хлороформу (щоб попередити гниття). Колбу закривають ватою і поміщають у термостат за температури 35–40 °С на 4–5 діб. Колбу виймають з термостату і кип'яють. Краплями додають ацетатну кислоту до слабокислої реакції (за лакмусовим папірцем). Після охолодження суміш фільтрують, звільняють від неперетравлених білків. Беруть 3–4 мл фільтрату і додають декілька крапель бромної води – виникає рожево-фіолетове забарвлення, що свідчить про наявність у фільтраті амінокислоти триптофану. (Не допускати надлишку бромної води! Зникає забарвлення.) У другу пробірку наливають 2–3 мл фільтру і додають 5–10 крапель концентрованої сульфатної кислоти та 5–6 мл 15 % розчину сульфату ртуті у 6 н сульфатній кислоті. Перемішують. Утворений жовтий осад ртутної сполуки триптофану фільтрують. З осадом і фільтром, розділеними на три частини, проводять кольорові реакції Адамкевича, Мілона і ксантопротеїнову.

Позитивна реакція Адамкевича і ксантопротеїнова та негативна реакції Мілона свідчать про наявність в осаді триптофану і відсутність тирозину. Позитивна ксантопротеїнова реакція і реакція Мілона та негативна реакція Адамкевича із фільтром свідчать про наявність тирозину і відсутність триптофану. Виникнення жовтого забарвлення під час проведення ксантопротеїнової реакції, особливо з осадом, проходить дуже повільно, частіше всього через 15–20 хв.

Робота 11. Визначення кількості білка за нітрогеном мікрометодом Кьельдаля

Метод визначення вмісту білків за нітрогеном – класичний, зроблений датським хіміком Й. Кьельдалем (1849–1900), є одним із найточніших методів.

Метод полягає у визначенні вмісту нітрогену білків. Кількість білкового нітрогену знаходять за різницею між загальним та залиш-

ковим нітрогеном. *Загальний нітроген* – це нітроген, що міститься у сироватці крові у різних сполуках, як білкових, так і небілкових. *Залишковий нітроген* характеризує кількість нітрогену в низькомолекулярних небілкових сполуках, таких як сечовина, сечова кислота, креатин, креатинін, гідроксид амонію тощо. Різниця між загальним і залишковим нітрогенами характеризує вміст нітрогену в білкових молекулах. Виходячи із того, що білок містить в середньому 16 % нітрогену, отриману величину білкового нітрогену необхідно помножити на коефіцієнт 6,25, що дозволить одержати кількість білка у сироватці крові.

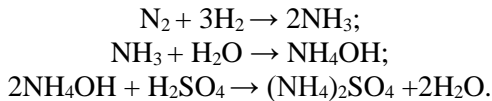
Робота складається із таких етапів: визначення вмісту загального нітрогену; визначення вмісту залишкового нітрогену; визначення вмісту білкового нітрогену і білка у сироватці крові.

Визначення вмісту загального нітрогену у сироватці крові

Цей етап, у свою чергу, поділяють на три стадії: мінералізація, відгонка аміаку, титрування і розрахунки вмісту загального нітрогену.

Мінералізація. Всі органічні сполуки сироватки крові мінералізують, при цьому карбон окиснюється до вуглекислого газу, Гідроген – до води, а нітроген переходить у аміак.

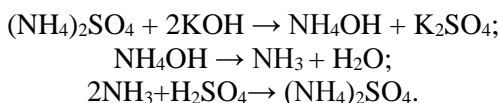
Хід роботи. У колбу Кьельдаля мікропіпеткою вносять 2 мл сироватки крові, 0,2 мл концентрованої сульфатної кислоти, 3 краплі 10 % розчину сульфату купруму і 2 краплі пероксиду гідрогену (як каталізатор). Колбу Кьельдаля нагрівають у піщаній бані впродовж декількох годин (роботу проводять у витяжній шафі). Кінцем мінералізації вважається утворення прозорої рідини та світло-жовтого осаду на дні колби Кьельдаля. Нітроген у процесі мінералізації переходить в аміак, який зв'язується сульфатною кислотою в сульфат амонію:



Відгонка аміаку. Після мінералізації сироватки крові колбу Кьельдаля з'єднують зі спеціальним відгонним апаратом і проводять руйнування сульфату амонію і переведення аміаку в приймальну колбу з 0,01 н титрованим розчином сульфатної кислоти.

Відгонка і зв'язування відбуваються у відгонному апараті після повного і герметичного з'єднання пароутворювача, колби Кьельдаля, холодильника і приймальної колби. Кінець холодильника зану-

рюють у приймальну колбу, куди попередньо вносять 20 мл 0,01 н розчину сульфатної кислоти і 3 краплі індикатора метилового червоного. Вмикають електроплитку під пароутворювачем і кип'ятять дистильовану воду. Після цього дуже обережно через лійку у колбу Кьельдаля вносять 8–10 мл 33 % розчину гідроксиду калію. При цьому відбувається руйнування сульфату амонію і відгонка аміаку у приймальну колбу. Закінчення відгонки аміаку визначають за реакцією на лакмус, який не повинен синіти від пари, що відходить із відгінного апарату.



Вміст приймальної колби титрують із бюретки 0,01 н розчином гідроксиду натрію до появи жовтого кольору.

Розрахунки загального нітрогену проводять за формулою:

$$N = \frac{(20 - A) \times 0,00014 \times 1000}{B},$$

де N – загальний нітроген, г/л; 20 – кількість мл 0,01 н розчину сульфатної кислоти; A – кількість мл 0,01 н розчину гідроксиду натрію, що витратили на титрування; 0,00014 – кількість нітрогену, що еквівалентна 1 мл 0,01 н розчину сульфатної кислоти, г; 1000 – перерахунок нітрогену, що міститься в 1 л сироватки крові, г; B – кількість сироватки, що брали для дослідження.

У нормі кількість залишкового нітрогену в сироватці крові становить: корови – 16–32 ммоль/л; телята – 9–17; свиноматки – 13–17; поросята – 11–20; кури – 21–34 ммоль/л. Кількість залишкового нітрогену знижується за гострої дистрофії печінки, цирозу, вагітності і підвищується у разі інфекційних захворювань із прогресуючим розпадом тканин.

Визначення вмісту залишкового нітрогену

Цей етап складається із чотирьох стадій: осадження білків сироватки крові, мінералізації, відгонки аміаку і титрування.

У пробірку наливають 3 мл сироватки крові та додають 3 мл 8 % розчину трихлорацетатної кислоти. При цьому білок осаджується. Фільтрують. Мінералізацію проводять аналогічно визначенню загального нітрогену. Для цього у колбу Кьельдаля вносять 0,4 мл безбілкового фільтрату сироватки крові, 0,2 мл концентрованої сульфатної кислоти, 3 краплі 10 % розчину сульфату купруму, 2 краплі пероксиду гідрогену.

Визначення білкового нітрогену і білка

Білковий нітроген визначають як різницю між загальним і залишковим нітрогеном. Для визначення вмісту білка одержану кількість білкового нітрогену необхідно помножити на коефіцієнт 6,25.

Вміст білка = білковий нітроген × 6,25 г/л.

Робота 12. Кількісне визначення загального білка сироватки крові рефрактометричним методом

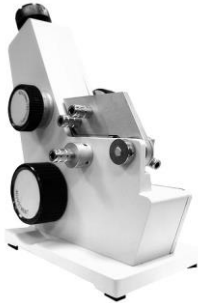


Рис. 12. Рефрактометр.

Коефіцієнт рефракції розчину обумовлений кількістю і розмірами розчинених частинок. Для визначення показника заломлення використовують рефрактометр (рис. 12).

Спочатку визначають показник заломлення світла для дистильованої води з метою перевірки роботи рефрактометра. Дистильована вода має показник заломлення 1,333. Після цього визначають показник заломлення світла для сироватки. За табл. 17 знаходять вміст білка у сироватці крові.

Таблиця 17 – Вміст білка за показником коефіцієнта заломлення світла

Показник заломлення (рефракції)	Білок у сироватці крові, %	Показник заломлення (рефракції)	Білок у сироватці крові, %	Показник заломлення (рефракції)	Білок у сироватці крові, %
1,33705	0,63	1,34275	3,94	1,34836	7,20
1,33743	0,86	1,34313	4,16	1,34873	7,42
1,33781	1,08	1,34350	4,38	1,34910	7,63
1,33820	1,30	1,34388	4,60	1,34947	7,85
1,33858	1,52	1,34424	4,81	1,34984	8,06
1,33896	1,74	1,34463	5,03	1,35021	8,28
1,33934	1,96	1,34500	5,25	1,35050	8,49
1,33972	2,18	1,34537	5,47	1,35095	8,71
1,34000	2,40	1,34575	5,68	1,35123	8,92
1,34048	2,62	1,34612	5,90	1,35169	9,14
1,34086	2,84	1,34650	6,12	1,35205	9,35
1,34124	3,06	1,34687	6,34	1,35242	9,57
1,34162	3,28	1,34724	6,55	1,35279	9,78
1,34193	3,50	1,34761	6,77	1,35316	9,99
1,34237	3,72	1,34798	6,98	1,35352	10,20

Контрольні питання

1. Що таке білки? 2. Назвати і коротко охарактеризувати функції білків у живому організмі. 3. Назвати величини молекулярної маси білків (нижній і верхній порого). 4. Що таке денатурація білків? 5. Які зміни відбуваються з білковою молекулою під час денатурації? 6. Дати визначення термінів “ізоелектричний стан” (ІЕС) і “ізоелектрична точка” (ІЕТ) білків. 7. Вказати ізоелектричну точку желатину, казеїну та інших білків. 8. Коротко охарактеризувати структурну організацію молекули білка (первинну, вторинну, третинну і четвертинну). 9. Класифікація білків. 10. Яка різниця між простими і складними білками? 11. Основні групи простих і складних білків. 12. Як визначається біологічна цінність білків? 13. Назвіть замінні та незамінні амінокислоти. 14. Назвіть ферменти, які беруть участь у перетравленні білків. 15. Назвіть кінцеві продукти перетравлення білків і напишіть їх формули. 16. Покажіть головні етапи всмоктування білків. 17. Дайте характеристику головним етапам біосинтезу білка. 18. Дайте визначення термінам “трансамінування”, “декарбоксилування”, “дезамінування” амінокислот. Наведіть приклади цих хімічних перетворень. 19. Назвати шляхи знешкодження аміаку в організмі. 20. У чому суть орнітинового циклу? 21. Кінцевий обмін білків. 22. Патологія білкового обміну. 23. Регуляція білкового обміну.

4. ХІМІЯ І ОБМІН НУКЛЕЙНОВИХ КИСЛОТ

Нуклеїнові кислоти (лат. *nucleus* – ядро) – найважливіші органічні речовини, з якими пов’язані всі основні процеси існування живої матерії, вони беруть участь у збереженні та передачі спадкової інформації. Нуклеїнові кислоти – простетичні групи нуклеопротеїдів. Є два види нуклеїнових кислот: дезоксирибонуклеїнова і рибонуклеїнова. Дезоксирибонуклеїнова кислота (ДНК) міститься у хромосомах ядер клітин, рибонуклеїнова кислота (РНК) знаходиться як у ядрі, так і цитоплазмі, існує у вигляді трьох типів: інформаційна (іРНК), рибосомальна (рРНК), транспортна (тРНК).

Нуклеїнові кислоти побудовані з нуклеотидів. Кожний нуклеотид складається із трьох компонентів: азотистої основи (аденін, гуанін, цитозин, тимін і урацил), вуглеводу (дезоксирибози або рибози) та залишку фосфатної кислоти. У складі ДНК відсутній залишок урацилу, в молекулі ДНК – тиміну. Молекула ДНК представляє собою двонитчасту спіраль, РНК – одонитчасту.

Багато вільних нуклеотидів входять до складу ферментів (НАД, ФАД тощо), є макроергічними сполуками (АТФ, УТФ, ГТФ), виконують функцію медіатора для гормонів (цАМФ).

Нуклеїнові кислоти характеризуються високим ступенем метаболізму, з їх діяльністю пов’язаний біосинтез білків.

Робота 1. Гідроліз нуклеопротейідів

Дріжджі мають у своєму складі велику кількість нуклеопротейідів. У ході гідролізу нуклеопротейіди розпадаються до кінцевих продуктів – поліпептидів, амінокислот, азотистих основ, пентоз і фосфатну кислоту.

Хід роботи. 1–2 г дріжджів поміщають у конічну колбу і додають 15–20 мл 5 % розчину сульфатної кислоти. Колбу закривають корком зі зворотним холодильником і кип'ячать протягом години. Одержаний гідролізат фільтрують. Фільтрат використовують для якісних реакцій на складові компоненти нуклеопротейідів.

Робота 2. Якісна реакція на пептидний зв'язок

Біуретова реакція

Хід роботи. У пробірку наливають 1–2 мл гідролізату і додають 1–2 мл 10 % розчину гідроксиду натрію і 1–2 краплі 1 % розчину сульфату купруму. Виникає фіолетове забарвлення, що свідчить про наявність сполук із пептидними зв'язками.

Робота 3. Якісні реакції на пентози

Реакція Троммера

Хід роботи. У пробірку наливають 1–2 мл фільтрату і додають 10 % розчин гідроксиду натрію до лужної реакції (на лакмус). До розчину додають краплями 5 % розчин сульфату купруму до появи незникаючої каламуті гідроксиду купруму світло-синього кольору. Нагрівають верхній шар вмісту пробірки і слідкують за тим, як спочатку виникає жовте забарвлення, яке поступово переходить у червоне, що характерно для оксиду купруму (I).

Реакція з реактивом Фелінга

Хід роботи. У пробірку наливають 1 мл фільтрату і додають 1 мл реактиву Фелінга. Вміст пробірки поміщають у киплячу водяну баню на 20 хвилин. Виникає осад червоно-цегляного кольору.

Реакція з орциновим реактивом

Після кип'ятіння із сульфатною кислотою пентози втрачають воду і перетворюються у фурфурол.

Хід роботи. У пробірку наливають 1–2 мл орцинового реактиву і нагрівають до кипіння. Швидко додають 5–6 крапель фільтрату.

Після 2–3-х хвилин виникає зелене забарвлення, яке утворюють сполуки пентоз і орцину.

Реакція на фурфурол із флороглюцином

Під час дегідратації пентоз утворюється фурфурол, який взаємодіє із флороглюцином і утворює червоне забарвлення.

Хід роботи. У пробірку наливають 1–2 мл розчину флороглюцину і нагрівають до кипіння. Швидко додають 1–2 мл фільтрату. Виникає рожеве забарвлення, яке поступово переходить у червоне.

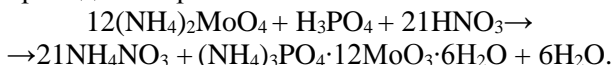
Робота 4. Відкриття у гідролізіті пуринових основ

Хід роботи. У пробірку наливають 1–2 мл фільтрату і додають 5–6 крапель розчину аміаку до лужної реакції (за лакмусом). Додають 0,5 мл 1 % розчину нітрату аргентуму. Через декілька хвилин утворюється осад срібних солей пуринових основ.

Робота 5. Відкриття у гідролізіті залишків фосфатної кислоти

Хід роботи. У пробірку наливають 1 мл фільтрату і нейтралізують його концентрованим розчином аміаку (за лакмусом). Додають 1 мл молібденового реактиву (3,8 % розчин молібдату амонію у 16 % нітратній кислоті). Розчин під час нагрівання набуває лимонно-жовтого забарвлення, а за охолодження випадає кристалічний осад фосфорномолібденовокислого амонію жовтого кольору.

Реакція проходить за рівнянням:



Контрольні питання

1. Визначення і класифікація нуклеїнових кислот. 2. Дайте характеристику будови молекули ДНК (первинна, вторинна, третинна структура). 3. Дайте класифікацію і характеристику різних видів РНК. 4. Дайте коротку характеристику кожного з етапів обміну нуклеїнових кислот в організмі тварин (перетравлювання, всмоктування, проміжний і кінцевий обмін). 5. Як регулюється нуклеїновий обмін? 6. Напишіть схематично хімізм реакцій утворення гіпоксантину, ксантину і сечової кислоти. 7. Що вам відомо про патологію нуклеїнового обміну?

5. ВОДНИЙ І МІНЕРАЛЬНИЙ ОБМІНИ

У складі клітин і тканин тваринного організму виявлено понад 70 хімічних елементів, з яких 47 постійно присутні. Ці елементи прийнято вважати *біогенними* хімічними елементами.

Біогенні хімічні елементи утворюють неорганічні та органічні сполуки. Неорганічні сполуки у середньому складають 71,5 % загальної маси тваринного організму, органічні – 28,5 %. Основою неорганічних речовин тваринного організму є вода – 65,9 % загальної маси тіла. Мінеральні сполуки становлять у середньому 5,6 % загальної маси тіла.

Усі біогенні хімічні елементи ділять на три групи: макроелементи (їх кількість в організмі перевершує 0,001 % – O, C, H, Ca, K, N, P, S, Mg, Na, Cl і Fe), мікроелементи (їх кількість в організмі коливається від 0,001 до 0,000001 % – Cu, Zn, Co, Mn, I, F, Br, Be, Mo, Se, Cr, As, Sr, Cd, U, Ba, Pb, Ti, To тощо) та ультрамікроелементи (їх кількість в організмі менше 0,000001 % – U, Ag, Au, Ra, He).

Найбільша кількість мінеральних речовин сконцентрована в кістковій (48–74 % загальної маси) та хрящовій (2–10 %) тканинах. Мінеральні речовини у клітинах і тканинах знаходяться у вільному і зв'язаному стані. Зокрема, у кістках, хрящах і дентині вони знаходяться у вигляді солей карбонатної, фосфатної та інших кислот. У біологічних рідинах (кров, лімфа, ліквор, молоко, травні соки) більшість мінеральних речовин знаходяться у вільному стані або у вигляді іонів.

Мінеральні речовини виконують ряд життєво важливих функцій. Перш за все, опорну і пластичну (наприклад, у кістковій тканині). Вони беруть участь у підтримці осмотичного тиску. Мінеральні елементи (зокрема, Натрій, Калій, Фосфор) – необхідна складова частина буферних систем організму, що забезпечують стабільність у клітинах і тканинах рН. Іони Натрію, Калію, Кальцію та Магнію беруть участь у передачі нервових імпульсів, у збудливості та подразненні живих клітин. З наявністю таких іонів пов'язані фізико-хімічні властивості колоїдів організму – гідратація, в'язкість, розчинність, здатність до набрякання. Окремі катіони (наприклад, Ca, Mn, Zn, Mg) є активаторами і інгібіторами ферментів. Йод – складовий компонент гормонів щитоподібної залози, Кольбат – вітаміну B₁₂. Сульфатна кислота бере участь у нейтралізації шкідливих продуктів проміжного обміну (наприклад, скатолу, індолу, фенолів) методом утворення парних сполук. Хлорид натрію сприяє секретії ряду залоз харчового тракту. Залишки фосфатної кислоти – необхідні складові частини макроергічних сполук (АТФ, АДФ, кретинфосфату тощо).

Організм тварин і людини дуже чутливий до нестачі у раціонах мінеральних речовин (у ряді випадків і до їх надлишку). При цьому в організмі розвивається ряд аліментарних захворювань, зокрема у разі нестачі Йоду – ендемічний зоб, Натрію і Калію – м'язова адинамія, Кальцію і Фосфору – аліментарний рахіт, надмірна кількість у раціоні кислот сприяє виникненню ацидозу тощо.

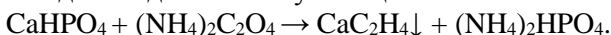
У ветеринарній клінічній практиці та у тваринництві виникає необхідність у ряді випадків вивчити і контролювати в кормах і біологічних рідинах кількісний вміст ряду мінеральних елементів – Кальцію, Фосфору, Магнію, Калію, Натрію, Йоду та інших.

Робота 1. Якісне визначення Кальцію

Третину всіх мінеральних речовин тваринного організму, тобто 1,9 % загальної маси тіла становить Кальцій. 97 % Кальцію зосереджено у скелеті у вигляді солей фосфатної і карбонатної кислот, а 1 % елементу знаходиться у біологічних рідинах в іонізованому стані. У кістковій тканині 85 % Кальцію знаходиться у вигляді фосфатів, близько 10 % – карбонатів і лише 0,3 % – фторидів.

Хід роботи. У колбу вносять 5–10 г кісткової тканини, додають 25 мл 0,5 % розчину сульфатної кислоти і залишають на добу. Фільтрують. В одну пробірку вносять 1–2 мл екстракту кісткової тканини, у другу – 0,5–1 мл сироватки крові та додають в обидві пробірки по 3–4 краплі насиченого розчину оксалату амонію. Через деякий час в обох пробірках випадає білий осад оксалату амонію.

У разі додавання у пробірку насиченого розчину оксалату амонію на дно випадає осадок оксалату кальцію:

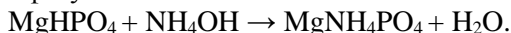


Робота 2. Якісне визначення Магнію

Магній складає близько 0,05 % загальної маси тварин. Він зосереджений більше всього в кістках, менше – у м'яких тканинах. Виконує опорні й пластичні функції, бере участь у біосинтезі білків, у реакціях імунітету, окисному фосфорилуванні, діяльності мітохондрій, терморегуляції тощо.

Хід роботи. Оксалат кальцію, одержаний у попередній роботі, відділяють фільтрацією вмісту пробірки.

До фільтрату додають 3–5 крапель насиченого розчину аміаку – випадає осад фосфату магній-амонію:



Робота 3. Якісне визначення Фосфору

Фосфор в організмі тварин становить близько 1 % загальної маси тіла. Він є головною складовою частиною кісткової тканини, необхідним компонентом нуклеїнових кислот, фосфопротеїдів (зокрема, білка молока казеїну), хімічної основи клітинних мембран, фосфоліпідів, складовою частиною буферних систем, макроергічних сполук (АТФ та її структурних аналогів).

Хід роботи. У одну пробірку вносять 1–2 мл екстракту кісткової тканини, у другу – 0,5–1 мл сироватки крові та додають в обидві пробірки по 4–6 крапель молібденового реактиву – випадає жовтий кристалічний осад фосфоромолібдату амонію. За додавання 2–6 крапель 10 % розчину вітаміну С розчин забарвлюється у синій колір із жовтим відтінком.

Робота 4. Кількісне визначення Хлору

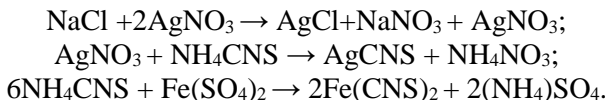
Хлор складає близько 0,08 % загальної маси тварин. Хлор бере участь у регуляції осмотичного тиску, є компонентом для синтезу в залозах дна шлунка хлоридної кислоти, активатором ферменту амілази і поліпептидази.

Хід роботи. У колбу наливають 2–3 мл води і вносять точно 0,1 мл сироватки або плазми крові. Піпетку обполіскують двічі водою. У суміш додають 4–5 крапель 30 % розчину залізоаміачних галунів (як індикатора) і титрують 0,01 н розчином тіоціанату амонію до появи рожевого забарвлення. Паралельно проводиться контрольна проба, де замість сироватки чи плазми крові вносять воду.

Якщо для досліджень використовують кров або якусь іншу тканину, то взята проба попередньо омилується. Для цього пробу (0,2 мл крові або 0,1 г тканини) поміщають у колбу із тугоплавкого скла зі зворотним холодильником, додають 2 мл 1 н розчину гідроксиду калію і омилують у киплячій водянній бані протягом 1,5 год. Після охолодження в колбу додають 0,5 мл концентрованої нітратної кислоти, 12 мл 0,01 н розчину нітрату аргентуму. Ємність переносять у піщану баню (або плитку з азбестовою сіткою) і доводять до кипіння. У киплячу суміш краплями додають розчин перманганату калію до тих пір, поки не зникне рожеве забарвлення. Кип'ятять 5 хв, додають пучку цукру для віддалення забарвлення. Суміш поступово стає безбарвною. Її охолоджують, додають 4–5

крапель 30 % розчину залізоаміачних галунів і титрують до появи рожевого забарвлення.

У безбілковому фільтраті іони хлору взаємодіють з нітратом аргентуму. Надлишок останнього відтитровують розчином тіоціанату амонію:



Кількість Хлору (X) крові визначають за формулою:

$$X = \frac{(A - B) \times 0,355 \times 1000}{35,5 \times 100},$$

де X – вміст Хлору, мекв/л; A – кількість розчину нітрату аргентуму, взятого для проведення досліду (2 мл); B – кількість розчину тіоціанату амонію, що витратили на титрування, мл; 0,355 – кількість Хлору, яка відповідає 1 мл 0,01 н розчину нітрату аргентуму, г; 35,5 – атомна маса Хлору.

Контрольні питання

1. Як умовно поділяється вода, що міститься в організмі? 2. Дати визначення термінів “вільна вода”, “імобілізована вода”, “ендогенна вода”, “екзогенна вода”.
3. Пояснити біологічне значення води шляхом обґрунтування основних життєво важливих функцій.
4. Яке значення мінеральних речовин для життєдіяльності тварин?
5. Вказати вміст мінеральних речовин (макро-, мікро- і ультрамікроелементів) в організмі, органах і тканинах сільськогосподарських тварин.
6. Перерахувати і коротко охарактеризувати біологічну дію основних мікроелементів для живих організмів.
7. Як відбувається всмоктування, проміжний і кінцевий обміни мінеральних речовин?
8. Що таке тріада В.І. Вернадського і яке вона має значення для виникнення мінеральної патології?
9. Чим характеризуються порушення мінерального обміну за рахітів, ендемічного зобу, бронзової хвороби, тетанії, анемії?
10. Дайте характеристику біогеохімічних зон і провінцій України.

6. ВІТАМІНИ

Вітаміни (лат. *vita* – життя і *amin* – амін) – група низькомолекулярних органічних речовин різноманітної хімічної природи, необхідних для існування організмів тварин і людини в мізерних кількостях, порівняно з головними продуктами харчування (білками, ліпідами, вуглеводами, мінеральними речовинами).

Відсутність вітамінів у кормах або порушення процесів їх засвоєння призводить до комплексу тяжких порушень обміну речовин, які нерідко закінчуються смертю, – *авітамінозів*, недостатнє надходження в організм – *гіповітамінозів*, надлишок у кормах (що буває дуже рідко) – до *гіпервітамінозів*. Усе це негативно впливає на реакції обміну речовин, спричинює сповільнення процесів росту

і розвитку тварин, зменшення рівня продуктивності і зниження резистентності організму.

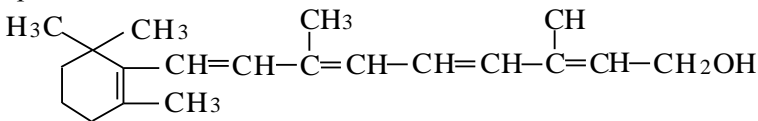
Зараз відомо близько 40 вітамінів і вітаміноподібних речовин. Їх класифікують на жиророзчинні і водорозчинні вітаміни, а також вітаміноподібні речовини. До жиророзчинних вітамінів належать вітаміни А, D, Е, К, F, Q. Вони розчинні в органічних розчинниках і жирах, можуть депонуватися в тканинах і клітинах організму, виконують пластичні функції – беруть участь у функціонуванні клітинних мембран, у формуванні, рості та розвитку ембріонів (вітаміни А і Е), утворенні та регенерації кісткової (вітамін D) та епітеліальної (вітамін А) тканин, у процесах згортання крові (вітамін К). Жиророзчинні вітаміни зазвичай не можуть синтезуватися тваринним організмом.

Водорозчинні вітаміни не розчиняються в жирах і багатьох органічних розчинниках, розчинні у воді, термолабільні (на відмінну від термостабільних жиророзчинних вітамінів), нестійкі до зміни рН, не можуть депонуватися у тканинах. Багато з них є складовими частинами ферментів і безпосередніми учасниками більшості реакцій обміну в усіх тваринних організмах. До них належать вітаміни В₁, В₂, В₃, В₅, В₆, В_с, В₁₂, Н, С, Р.

Вітаміноподібні речовини не мають чітких вітамінних функцій. При цьому вони можуть виконувати структурні функції. Наприклад, інозит і холін є складовими частинами молекул фосфоліпідів. До них належать інозит, вітамін В₁₃ (оротова кислота), В₁₅ (пангамова кислота), холін, В_r (карнозин), U, п-амінобензойна кислота (ПАБК).

Робота 1. Якісна реакція на ретинол

Вітамін А (*вітамін росту, антиксерофтальмічний*) – група жиророзчинних вітамінів, що містять β-іононове кільце. У природі найбільш поширені вітамін А₁ (ретинол, аксерофтол) і вітамін А₂ (дегідроретинол). Різні форми одного й того вітаміну називаються *вітамерами*.



Вітамін А₁

Особливо багато вітаміну є в тканинах печінки риб (морського окуня – до 37 %, палтуса – 2,5–5 % загальної маси). Траводні тварини одержують вітамін із рослинними кормами у вигляді провітаміну каротину: α -, β - і γ -каротинів. Найбільшу цінність має β -каротин, який у харчовому каналі розщеплюється на дві молекули вітаміну А. За нестачі вітаміну А в раціоні уповільнюється ріст і розвиток організму (вітамін А часто називають вітаміном росту). При цьому порушується діяльність слізних залоз, виникає сухість (*ксерофтальмія*), розм'якшення і дегенерація (*кератомалачія*) рогівки ока, слабне, особливо в сутінках зір, виникає сліпота (*гемералопія*). У разі нестачі вітаміну А змінюється будова покривних тканин, відбувається ороговіння епітеліального покриву, порушується регенерація і відбувається розпад епітелію шкіри (*дерматити*), харчового каналу (виникають *коліти*), дихальних шляхів (з'являються *бронхіти*). У самок спостерігається ороговіння епітелію піхви (*кератити*) і запалення слизової оболонки сечовивідних шляхів (*нієліти*), виникають вторинні ниркові камені. Відбувається зниження резистентності організму, підвищується стомлюваність. До нестачі в раціонах вітаміну А особливо чутливі телята, поросята і курчата.

Реакція із хлоридом стибію (метод Карра Прайса)

Хід роботи. У суху пробірку наливають 1–3 краплі хлороформного розчину свіжого риб'ячого жиру, або 0,05 % розчину вітаміну А, додають 0,1–0,2 мл насиченого розчину хлориду стибію (III) у хлороформі. Суміш забарвлюється в інтенсивно-синій колір, який поступово переходить у рожево-фіолетовий.

Хімізм кольорової реакції вивчений недостатньо.

Примітка. Реакція відбувається лише тоді, коли реактиви і посуд не містять навіть слідів води. Якщо є вода, то із хлоридом стибію (III) утворюється сполука, яка не реагує з вітаміном А. Для усунення слідів води необхідно додати 1–2 краплі ацетангідриду.

Реакція з концентрованою сульфатною кислотою

Хід роботи. У пробірку вносять 3–5 крапель хлороформного розчину вітаміну А (або свіжого риб'ячого жиру) і додають 0,5–1 мл концентрованої сульфатної кислоти. За наявності вітаміну А і каротиноїдів спостерігається послідовна зміна забарвлення від синього до фіолетового і червоно-бурого. В основі проведеної реакції

лежить здатність сульфатної кислоти віднімати від вітаміну А воду з утворенням кольорових продуктів реакції.

Бромхлороформова проба на вітамін А

Хід роботи. До 2–3 мл риб'ячого жиру або розчину вітаміну А додають декілька крапель розчину бром у хлороформі (1:60). За наявності в досліджуваних розчинах вітаміну А виникає зеленувато-блакитне забарвлення.

У молекулі вітаміну А є п'ять подвійних зв'язків, які здатні розриватися і приєднувати Бром. Виникають бромпохідні вітаміну А, які мають зеленувато-блакитне забарвлення. Інтенсивність забарвлення залежить від вмісту в розчині вітаміну А.

Робота 2. Кількісне визначення вмісту каротину

Каротини – оранжево-жовті пігменти, що належать до групи каротиноїдів. За хімічною будовою належать до терпенів (тетра-терпенів), які містять у молекулі 40 атомів карбону. Основна структура молекули симетрична і складається із двох C_{20} -половинок. Синтезуються рослинами. Ними багате зелені листя (особливо шпинату), морква, плоди шипшини, смородини тощо. Багато каротину містить стручковий перець (до 853 мг/кг). Деякі ссавці здатні в окремих тканинах накопичувати β -каротин, особливо в жировій клітковині, молоці, жовтому тілі яєчника. β -каротин у травному тракті під впливом ферменту каротинази розщеплюється на дві молекули вітаміну А.

Хід роботи. Досліджуваний корм (моркву, люцерну, зелену траву, зелену цибулю, перець тощо) подрібнюють і розтирають у ступці зі скляним піском (5–8 г) із пучкою (на кінчику ножа) питної соди. Якщо досліджується вологий корм, у ступку додають 5 г безводного сульфату натрію і старанно розтирають. До суміші додають 4–5 г сухого оксиду алюмінію (III) і знову розтирають протягом 2–3 хв. Оксид алюмінію є адсорбентом, який поглинає непотрібні супутні домішки. Одержаний порошок переносять у суху пробірку і додають 15 мл петролейного етеру або авіаційного бензину. Пробірку закривають корком, багаторазово струшують і залишають стояти до повного осідання частинок. Відстояний жовтий шар (верхній) каротину відбирають піпеткою (10 мл) і переносять у колориметр Дюбеска, де попередньо для порівняння забарвлення налитий стандартний 0,036 % розчин біхромату калію. Стандарт за

забарвленням відповідає 0,00208 мг каротину в 1 мл досліджуваного розчину.

Вміст каротину вираховується за формулою:

$$X = \frac{0,00208 \times h_{cm} \times V \times 100 \times 0,05551}{h_x \times a},$$

де X – кількість каротину, ммоль/л; 0,00208 – кількість каротину, яка відповідає за забарвленням 1 мл стандартного розчину біхромату, мг; h_{cm} – показник шкали стандартного розчину біхромату; h_x – показник шкали дослідного розчину (допущені коливання ± 2 мм за висоти стандарту в 10 мм); V – загальний об'єм досліджуваного розчину, мл; a – наважка, г; 0,05551 – коефіцієнт переводу у ммоль/л.

Робота 3. Кількісне визначення вітаміну А

Уміст вітаміну А виражається в інтернаціональних одиницях (ІО). Одна ІО відповідає 0,68 мкг β -каротину, або 0,33 мкг вітаміну А. Добова потреба тварин у вітаміні А у перерахунку на 100 кг живої маси така: сухостійні корови – 15–20 тис. ІО, лактуючі корови – 10–15 + 5 на 1 кг молока, телята – 10–15, свиноматки – 12–15, поросята – 12–15 тис. ІО.

Хід роботи. У колбу вносять 0,5–1,0 г риб'ячого жиру і додають 10 мл 0,5 н спиртового розчину гідроксиду калію. Закривають корком, в який вмонтований холодильник. Проводять омилення жиру за температури 80–85 °С протягом 1 години. Вміст колби охолоджують за кімнатної температури і додають 20 мл дистильованої води. Розчин переносять у ділильну лійку і двічі екстрагують діетиловим етером – перший раз 50 мл, другий – 25 мл. Ефірні витяжки зливають і відмивають від луку в ділильній лійці дистильованою водою 3–4 рази (по 20 мл) до нейтральної реакції промивних вод. Промиту етерну витяжку висушують над зневодненим сульфатом натрію (7–8 г) і залишають на 30 хв, періодично збовтуючи. Витяжку фільтрують і відганяють етер у потоці вуглекислоти (можна відігнати етер на теплій водяній бані). Сухий залишок розчиняють у хлороформі (1–5 г) і переносять у мірну колбу на 10–25 мл. У суху пробірку переносять 0,3 мл екстракту, додають 3 мл розчину хлориду стибію (III). У випадку, коли виникає каламуть, додають 1–2 краплі ацетатного альдегіду і колориметрують, порівнюючи утворене синє забарвленням із кольором стандартної шкали ФЕКу.

Приготування розчинів еталонів. Готують основний розчин: у 75 мл дистильованої води вносять 75 г сульфату купруму і 3,5 г

нітрату кобальту. Основний розчин розводять і готують пробіркі-еталони згідно зі схемою (табл. 18):

Таблиця 18

	№ пробірки								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Основний розчин, мл	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Вода, мл	0,2	1,5	3,25	5,8	9,5	10,8	27,7	52,1	120
Число синіх одиниць	9	8	7	6	5	4	3	2	1

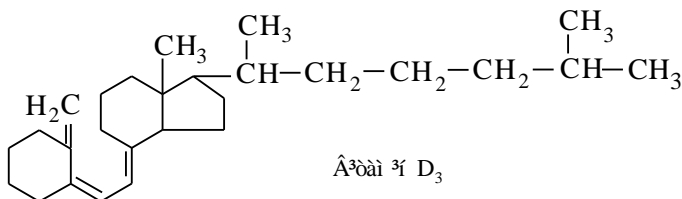
Для визначення кількості вітаміну А користуються формулою:

$$X = \frac{C \times B}{a \times 4},$$

де X – кількість вітаміну А, мг/100 г; С – число синіх одиниць; В – об'єм хлороформного розчину, мг; а – наважка речовини, г; 4 – коефіцієнт переводу синіх одиниць у мг.

Робота 4. Якісні реакції на вітамін D

Вітамін D (*кальциферолі*) – група сполук, що проявляють антирахітичні властивості. Найбільше значення мають вітамін D₂ (*ергокальциферол*) і вітамін D₃ (*холекальциферол*):



У разі відсутності або нестачі вітаміну D у ростучих тварин розвивається рахіт, у дорослих – *остеомаліяція*, у старих – *остеопороз*. Провітаміном вітаміну D₂ є ергостерол, а вітаміну D₃ – 7-дегідрохолестерол. Більше всього ергостеролу міститься у пекарських дріжджах (до 2 % сухої маси). 7-дегідростерол утворюється із холестерину у шкірі під впливом ультрафіолетового опромінювання організму. Вітамін є у багатьох продуктах тваринного походження. Зокрема, жир печінки риб містить у 1 кг до 40000000 ІО, молоко корів – 250. Багаті на вітамін D сіно лугове (до 620 ІО/кг) та сіно люцерни (300–570 ІО/кг).

Якісні реакції на виявлення у кормах вітаміну D базуються на утворенні кольорових продуктів реакцій за дії певних реагентів.

Реакція з аніліном

Хід роботи. У суху пробірку вносять 1–2 краплі риб'ячого жиру, 4–5 крапель хлороформу і перемішують. Додають 1 краплю анілінового реактиву (15 частин аніліну і одна частина хлоридної кислоти). Суміш обережно нагрівають і кип'ятьяють 0,5 хв. За наявності вітаміну D жовта емульсія стає спочатку зеленою, потім червоною. Через деякий час вміст пробірки розділяється на два шари: верхній (світлий) і нижній (червоний).

Забарвлення виникає у результаті конденсації аніліну з вітаміном D, в ациклічній частині молекули якого є ненасичені (подвійні) зв'язки. Виникає забарвлений продукт реакції, що має складну будову молекул.

Бромхлороформна проба

Хід роботи. У пробірку наливають 1 мл риб'ячого жиру і 1 мл бромхлороформового реактиву (розчин броду в хлороформі – 1:60). Пробірку нагрівають на водяній бані протягом 1–2 хв. Виникає зеленувато-блакитне забарвлення. Забарвлення виникає в результаті приєднання броду до ненасичених зв'язків вітаміну D – з утвореним бромпохідних вітаміну D.

Робота 5. Кількісне визначення вітаміну D

Хід роботи. У конічну колбу з повітряним зворотним холодильником вносять 10 г молочного жиру, 40 мл 96° етанолу і 8 мл 50 % розчину гідроксиду калію. Колбу поміщають у водяну баню, нагріту до 85–90 °С на 40–50 хв. Відбувається омилення. Після цього вміст колби переносять у ділильну лійку і тричі екстрагують діетиловим етером (порціями по 50, 25 і 25 мл). Етерний екстракт зливають у другу ділильну лійку і багаторазово промивають водою до вимивання лугу (контролюють фенолфталеїном). До очищеного екстракту додають 7 г безводного сульфату натрію, висушують до повної прозорості (15–20 хв) і фільтрують через паперовий фільтр. Етер відганяють на попередньо нагрітій водяній бані до одержання сухого осаду, який розчиняють у 5 мл хлороформу. До 1 мл розчину додають 3 краплі ацетилхлориду і 6 мл розчину 20 % розчину хлориду стибію (III). Через 4 хв вимірюють інтенсивність забарвлення у фотоелектроколориметрі за довжини хвилі 500 нм. Контролем слугує суміш, яка складається з 1 мл хлороформу, 5 мл 20 % розчину хлориду стибію (III) і 3-х крапель ацетилхлориду. Кіль-

кість вітаміну D розраховують за калібрувальним графіком. Для одержання такого графіку готують серію розчинів кальциферолу в хлороформі, що містять від 200 до 1000 ІО у 1 мл вітаміну D, використовуючи для цього основний розчин кальциферолу (у 100 мл 96° етанолу розчинити 10 мг кальциферолу, що відповідає 400000 ІО вітаміну D) і проводячи кольорову реакцію, як було згадано вище.

У ході роботи проходить ряд хімічних реакцій. Спочатку відбувається гідроліз естерів вітаміну D і ВЖК. Хід хімічної реакції аналогічний гідролізу стеринів. Виникають забарвлені солі стибію та вітаміну D.

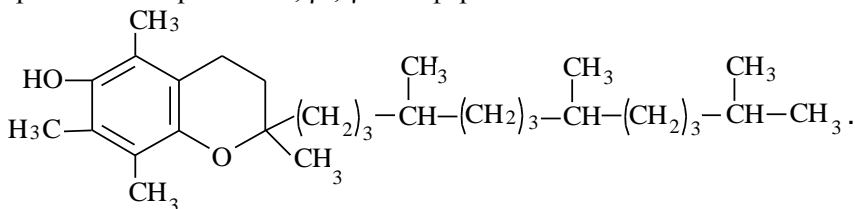
Кількість вітаміну D визначають за формулою:

$$C = \frac{b \times V \times \rho}{a},$$

де C – кількість вітаміну D, од. у 1 г жиру; b – знайдена за калібрувальною кривою (графіком) кількість вітаміну D, од. у 1 мл розчину; V – розведення, мл; a – маса жиру, г; ρ – густина жиру, г/см³.

Робота 6. Якісна реакція на вітамін Е

Вітамін Е (*антистерильний, вітамін розмноження, токоферол*). За нестачі або відсутності вітаміну Е в організмі, перш за все, порушуються функції розмноження. У тварин розвивається безплідність, м'язова дистрофія, некроз печінки тощо. У самців дегенерує епітелій сім'яних каналців, гальмується сперматогенез, згасають статеві рефлекси. У самок яєчник зберігає нормальну будову, але порушується розвиток плоду, що призводить до абортів і безпліддя. Вітамін гальмує вільнорадикальне окиснення ненасичених ліпідів клітинних і інтрацелюлярних мембран. Вітамін представлений трьома вітамерами – α -, β -, γ -токоферолами:



Вітамін Е

У молекулі β -токоферолу в положенні 7 відсутня метильна група, в γ -токоферолу – у положенні 5. *Токофероли* – маслянисті рідини, добре розчинні у жирах і органічних розчинниках, стійкі до нагрі-

вання, оптично активні. Багато вітаміну Е міститься у зародках зерна пшениці (150–300 ІО/кг), у кукурудзі (до 150), сінному борошні (до 200), дріжджах (до 500 ІО) тощо. Авітамінози часто зустрічаються у свиней, курей, качок, індиків. Добова потреба у вітаміні для корів на 100 кг живої маси становить 300–500 ІО, для телят – 20–40 ІО.

Реакція з концентрованою нітратною кислотою

Хід роботи. У суху пробірку вносять 4–5 крапель 0,1 % розчину α -токоферолу у 96 % етанолі, додають 10 крапель концентрованої нітратної кислоти і струшують. Пробірку поміщають у водяну баню, нагріту до 70 °С. Виникає емульсія, яка поступово розділяється на два шари: верхній (червоний) і нижній шари. Забарвлення обумовлено окисненням α -токоферолу до α -токоферолхінону, що має червоний або жовто-червоний колір. Реакція використовується для колориметричного визначення токоферолу.

Реакція з хлоридом феруму (III)

Хід роботи. У суху пробірку вносять 4–5 крапель 0,1 % спиртового розчину α -токоферолу і додають 0,5 мл 1 % розчину хлориду феруму (III). Уміст пробірки струшують і нагрівають – виникає червоне забарвлення. У разі нагрівання α -токоферол перетворюється в α -токоферолхінон.

Робота 7. Кількісне визначення вітаміну Е

Хід роботи. У колбу зі зворотним холодильником вносять 100 мл молока, 25 мл 60 % розчину гідроксиду калію і 20 мл 96° етанолу. Вміст колби протягом 2 год нагрівають на киплячій водяній бані. Колбу охолоджують, додають 20 мл дистильованої води і виливають у ділильну лійку. Проводиться екстракція вітаміну Е трьома порціями. Вміст лійки спочатку промивають 50 мл діетилового етеру, потім двічі по 25 мл етеру. Витяжки об'єднують у чисту ділильну лійку і 3–4 рази промивають дистильованою водою до повного вимивання луку (контролюють фенолфталеїном). Потім висушують прожареним сульфатом натрію (5–7 г) до прозорого стану рідини. Екстракт фільтрують у колбу на 100 мл, а осад на фільтрі промивають невеликою кількістю етеру, що у загальній сумі приєднується до головного екстракту. Колбу поміщають у водяну баню і випаровують етер. Одержаний сухий залишок розчиняють у

5 мл абсолютного етанолу і додають 1 мл концентрованої нітратної кислоти. До колби приєднують зворотний холодильник і нагрівають до окиснення α -токоферолу протягом 3 хв. Паралельно проводять контроль – у такій же колбі поміщають 5 мл абсолютного етанолу і додають 1 мл концентрованої нітратної кислоти, нагрівають протягом 3 хв. Обидві колби охолоджують і залишають у темному місці для розвитку забарвлення. Вміст обох колб кількісно переносять у мірні колби на 25 мл і доливають до мітки етанол.

Реакція відбувається під впливом концентрованої нітратної кислоти, яка перетворює α -токоферол у продукт червоного або жовто-червоного кольору – токоферилхінон.

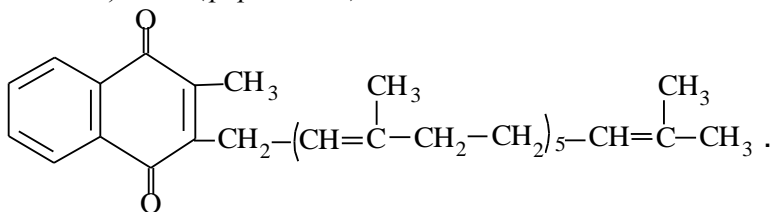
Визначають оптичну густину забарвленого дослідного розчину на ФЕК із синім світлофільтром (470 нм) проти контролю і за її величиною визначають кількість вітаміну Е у досліджуваному розчині за калібрувальною кривою.

Серія стандартних спиртових розчинів α -токоферолу зі зростаючою концентрацією від 100 до 400 ммг у 1 мл.

Для побудови калібрувальної кривої 5 мл кожного із серії стандартних розчинів α -токоферолу з певною концентрацією вітаміну окиснюють концентрованою нітратною кислотою на водяній бані протягом 3 хв (див. вище). Подальші операції тотожні з такими, які описані для дослідної і контрольної проб. Одержані величини екстинцій забарвлених стандартних розчинів відкладають на осі ординат, а відповідні їм кількості α -токоферолу – на осі абсцис.

Робота 8. Якісні реакції на вітамін К

Вітамін К складається із двох природних форм – вітаміну K_1 (філохінон) та K_2 (фарнохінон).



Вітамін K_2

У разі гіпо- та авітамінозів у тварин спостерігаються геморогічні діатези, крововиливи, знижується процес згортання крові та зменшення кількості протромбіну. Найбільш чутливою до нестачі

вітаміну К є птиця. Джерелом вітаміну К слугують зелені корми (люцерна, лугове різнотрав'я, капуста), картопля, печінка, рибне борошно. У корми необхідно додавати 1–5 мг/кг корму. Високою вітамінною активністю характеризуються синтетичні аналоги вітаміну К, зокрема вікасол, який має кращу розчинність у воді і широко використовується у клінічній практиці у разі кровотеч.

Реакція з лужним розчином цистеїну

Хід роботи. У пробірку наливають 1 мл 0,1 % спиртового розчину вікасолу (синтетичного аналогу вітаміну К), додають 2 краплі 0,025 % розчину цистеїну і 2 краплі 10 % розчину гідроксиду натрію. Виникає жовте забарвлення.

Реакція з етилмалоновим естером

Хід роботи. До 2 мл 0,1 % спиртового розчину вікасолу додають 0,5 мл 1 % розчину етилмалонового естеру і 0,1 мл 1 % розчину гідроксиду калію. Виникає фіолетово-червоне забарвлення.

Реакція з аніліном

Хід роботи. До 2 мл 0,1 % спиртового розчину вікасолу додають 0,5 мл аніліну. Суміш струшують. Виникає червоне забарвлення.

Реакція з діетилтіокарбоматом

Хід роботи. До 2 мл 0,1 % спиртового розчину вікасолу додають 0,5 мл 5 % розчину діетилтіокарбомату. Суміш струшують. Виникає блакитне забарвлення.

Робота 9. Кількісне визначення вітаміну К

Хід роботи. Столову моркву подрібнюють на тертушці. У ступку переносять 10–15 г подрібненої моркви, додають пучку кварцового піску і безводного карбонату натрію. Суміш подрібнюють у ступці товкачиком, розтирають в однорідну масу. У ступку додають 10 мл діетилового етеру і знову розтирають. Гомогенат переносять на лійку Бюхзера, двічі промивають ступку невеликими порціями діетилового етеру і зливають у ту ж лійку. Суміш фільтрують і тричі промивають фільтр невеликими порціями етеру. Фільтрати з'єднують у загальну масу і сушать безводним сульфатом натрію. Етер випаровують на теплій водяній бані, а залишок розчиняють у 5 мл хлороформу. До одержаного розчину додають 1 мл 1 % спиртового розчину діетилмалонового естеру і 0,2 мл 1 %

розчину гідроксиду калію. Загальний об'єм доводять водою у мірній колбі до 10 мл. Одночасно готується контроль зі стандартним розчином вітаміну К. Забарвлені розчини колориметрують.

Метод оснований на здатності вітаміну К у лужному середовищі утворювати з діетилмалоновим естером забарвлену сполуку (див. попередню роботу).

Кількість вітаміну К вираховують за формулою:

$$C = \frac{C_0 \times E_d \times V}{E_{ст} \times a},$$

де С – вміст вітаміну К, мкг/г; C_0 – масова концентрація стандартного розчину вітаміну К, мкг/мл; V – об'єм екстракту, мл; E_d – екстинція досліджуваного розчину; $E_{ст}$ – екстинція стандартного розчину; а – маса речовини, що взята для досліджень, г.

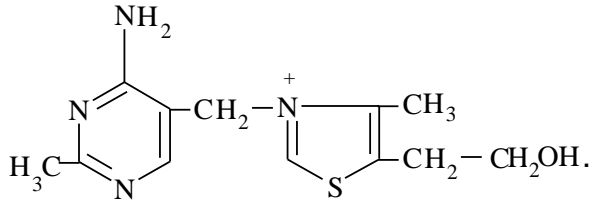
Морква містить 0,08 мг вітаміну К на 100 г сухої маси.

Робота 10. Якісні реакції на вітамін В₁

Вітамін В₁ (*антиневричний, тіамін*). За нестачі або відсутності вітаміну В₁ у тварин (найчастіше у птиці, телят, ягнят, коней, свиней, собак і хутрових звірів) порушується діяльність нервової системи (*парези і паралічі*), серцево-судинної системи (*стенокардія*), харчового каналу (зменшується секреція травних залоз), різко падає рівень продуктивності. На ранніх стадіях авітамінозу у тварин (зокрема, у птиці) виникають судоми м'язів шиї, у свиней – підвищується рівень цукру в крові (*гіперглікемія*), виникає ацидоз, у підшлунковій залозі дегенерують острівці Лангерганса, у крові і лімфі накопичується піровиноградна кислота, дегенерує хромофінна тканина наднирників, нейронів, виявляються крововиливи, наступають парези і паралічі, у багатьох випадках і смерть. Вітамін В₁ є коферментом понад 30 ферментів.

На вітамін В₁ найбільше багаті пивні дріжджі (68,6 мг/кг), люцерна (10 мг/кг). Він міститься у дріжджах, у висівках багатьох злаків (зокрема, рису, звідки вперше був виділений), моркві, шпинаті, яблуках, капусті, буряках, апельсинах. Добова потреба у вітаміні для свиней складає 1,0–1,3 мг/кг сухої речовини корму, для телят – 3–15 мг.

Вітамін В₁ – похідний двох сполук – тiazолу і піримідину:



Реакція з діазореактивом

Хід роботи. У пробірку наливають 1 мл лужного розчину. Для цього окремо готують 5,76 % розчин карбонату натрію і 4 % розчин гідроксиду натрію, перед постановкою досліду змішати рівні об'єми обох розчинів. У пробірку додають 0,5 мл діазореактиву (0,9 г сульфанілової кислоти розчинити в 9 мл концентрованої хлоридної кислоти і довести водою до 100 мл) і 0,5 мл розчину тіаміну (або харчових продуктів, багатих на вітамін). Виникає жовте забарвлення, яке поступово переходить у рожеве.

У лужному середовищі тіамін із діазореактивом (з діазофенілсульфоною кислотою) утворює сполуку складної будови, забарвлену в жовтий і рожевий кольори.

Реакція з гексаціанофератом (III) калію

Хід роботи. У пробірку наливають 0,5 мл розчину тіаміну, 1 мл 1 % розчину гексаціаноферату (III) калію і 1 мл 30 % розчину їдкого натрію. Перемішують. Через декілька хвилин додають 3–5 мл ізобутилового спирту і знову перемішують. Через 5–10 хв верхній ізобутановий шар зливають у пробірку з ультрафіолетового скла, і у променях ртутно-кварцової лампи спостерігають синю флуоресценцію. Гексаціаноферат (III) калію окиснює тіамін у пігмент тіохром.

Робота 11. Кількісне визначення вітаміну В₁ флуорометричним методом

Хід роботи. У ділільну лійку наливають 5–6 мл сечі (з сечею виділяється надлишок вітаміну В₁ з організму, частково з калом), додають рівний об'єм ізобутанолу і струшують протягом 2 хв. Нижній шар (промита сеча) зливають у дві сухі ділільні лійки по 2 мл у кожную. Після цього додають по 1 мл 20 % розчину гідроксиду натрію. У 1-шу лійку (дослідну) краплями додають свіжий 10 % розчин гексаціаноферату (III) калію, поки забарвлення не зникає протягом 30 с. У другу лійку такий розчин не вносять. В обидві

ділильні лійки наливають по 5 мл дистильованої води, по 10 мл ізобутанолу, інтенсивно струшують. Після цього нижній шар сечі зливають, а верхній із вітаміном В₁, розчиненим в ізобутанолі, розділяють на дві сухі пронумеровані пробірки. У 3-тю ділильну лійку наливають 1 мл робочого стандартного розчину тіаміну (10 мкг/мл) і 1 мл води, у 4-ту (контрольну) – 2 мл дистильованої води. В останні дві лійки додають по 1 мл 20 % розчину гідроксиду натрію і по 10 крапель розчину гексаціаноферату (III) калію. Суміші струшують. Потім у кожну лійку додають по 5 мл води і по 10 мл ізобутанолу, знову струшують протягом 2 хв. Нижній шар зливають, а верхній переливають у сухі пробірки відповідно – 3-тю і 4-ту. В усі чотири пробірки додають по 2 мл етанолу (для просвітлення вмісту). Проводять порівняння інтенсивності люмінесценції досліджуваної сечі і контролю. Для кількісного визначення порівнюють люмінесценцію окиснених стандартних розчинів тіамінхлориду і досліджуваних розчинів на флуорометрі (рис. 13).

Для визначення кількості тіаміну використовують формулу:



Рис. 13. Флуорометр.

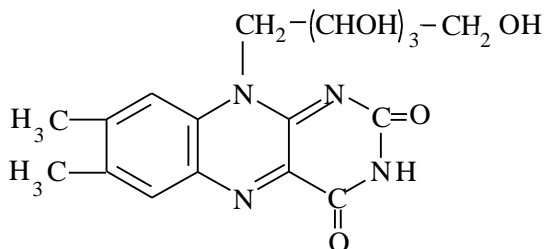
$$X = \frac{10 \times (a - b) \times V}{c \times 2},$$

де X – вміст вітаміну В₁ у добовій кількості сечі, мкг; 10 – концентрація тіаміну в 1 мл робочого стандартного розчину, мкг; 2 – об'єм сечі, взятий для аналізу, мл; V – об'єм сечі, зібраної за добу, мл; a – інтенсивність люмінесценції дослідної проби; b – інтенсивність люмінесценції контрольної проби; c – інтенсивність стандартної проби.

Робота 12. Якісна реакція на вітамін В₂

Вітамін В₂ (*рибофлавін*). У разі нестачі в раціонах вітаміну В₂ молодняку тварин затримується ріст, зменшується приріст маси, збільшуються витрати корму, настає висока смертність. Авітаміноз частіше всього спостерігається у поросят, телят, ягнят, птиці. У ссавців на спині випадає шерсть, виникають себорейні дерматити (особливо біля очей, вух і на грудях) з'являються виразки слизових оболонок харчового каналу, васкуляризується рогівка, виникають кон'юнктивіти, кератити, анемія, знижується температура тіла, падає пульс. На вітамін багаті молоко (до 30 мг/кг), кормові дріжджі, люцернове і рибне борошно. Добова потреба у вітаміні для телят складає 4–8 мг, свиней – 2–4, курчат – 2,5–3 мг/кг корму.

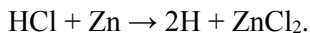
Вітамін В₂ – похідний гетероциклу ізоалоксазину і спирту рибітолу:



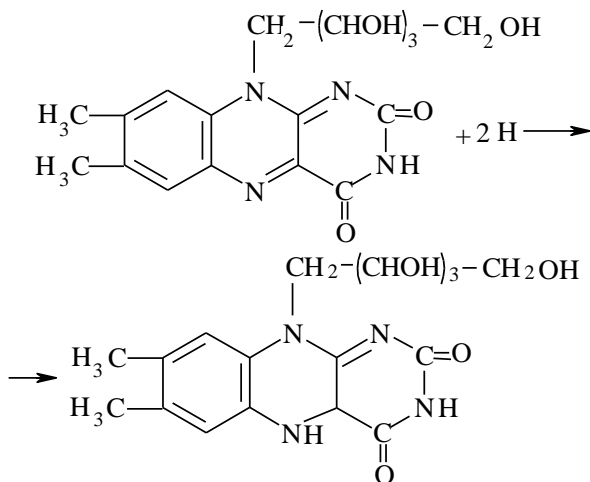
Рибофлавін – складова частина понад 60 ферментів, що беруть участь у клітинному диханні та інших реакціях обміну речовин.

Хід роботи. У пробірку вносять 8–12 крапель 0,025 % розчину вітаміну В₂ жовтого кольору, додають 5 крапель концентрованої хлоридної кислоти і шматочок металічного Цинку. Виділяються бульбашками водню. Суміш поступово забарвлюється в рожевий колір, потім знебарвлюється.

Під дією Цинку розкладається хлоридна кислота і виділяється Гідроген:



Гідроген взаємодіє з рибофлавіном, який спочатку відновлюється в червоний родофлавін (проміжну сполуку) і у безкольоровий лейкофлавін:



Робота 13. Флуорометричне визначення вітаміну В₂

Хід роботи. В одну калібровану пробірку наливають 8 мл профільтрованої витяжки з рослинного матеріалу після інкубації із препаратом фосфатази. Для цього 5–10 г сухих дріжджів розтерти в фарфоровій ступці з 10–15 мл 0,1 н розчину сульфатної кислоти, перенести в колбу на 100 мл і довести об'єм до 75 мл розчином сульфатної кислоти; суміш нагріти на водяній бані за інтенсивного змішування. Охолодити, додати декілька крапель толуолу і 5 мл 2,5 М розчину ацетату натрію, що містить ферментний препарат фосфатази (рН 4–4,5), під впливом якого за температури 40–45 °С звільнюється рибофлавін (інкубувати протягом 2 г). Суміш фільтрується після інкубації. У другу пробірку налити 7 мл води і 1 мл стандартного розчину рибофлавіну (10 мг рибофлавіну розчинити в 250 мл води. Одержаний розчин розводять у 100 разів. 1 мл такого розчину містить 0,4 мкг рибофлавіну). Краплями в обидві пробірки додають рівні об'єми 4 % розчину перманганату калію до виникнення слаборожевого забарвлення, яке тримається не більше 1 хв. Через 10 хв в обидві пробірки додають краплями 3 % розчин пероксиду гідрогену до нейтралізації надлишку перманганату (в середньому 2–5 краплі). Об'єми одержаних сумішей в обох пробірках доводять дистильованою водою до 10 мл і вимірюють інтенсивність люмінесценції. По закінченні визначення люмінесценції в обидві пробірки додають по 0,2 мл робочого розчину Na₂S₂O₇ для тушіння люмінесценції вітаміну В₂. Вимірюють люмінесценцію домішок до вітаміну В₂ на флуорометрі.

Визначення вітаміну В₂ і люмінесціюючих домішок базується на тих же принципах, що і якісне визначення вітаміну В₂ (див. попередню роботу).

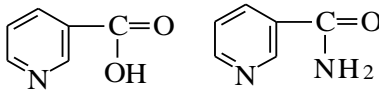
Визначення вмісту вітаміну В₂ проводиться за формулою:

$$C = \frac{10 \times (A - B) \times 0,4 \times V \times V_1}{(A_1 - B_1) \times V_2 \times a},$$

де С – вміст рибофлавіну в досліджуваному матеріалі, мкг/г; А – показник флуорометра для дослідного розчину; В – показник флуорометра для дослідного розчину після тушіння люмінесценції рибофлавіну; А₁ – показник флуорометра для стандартного розчину рибофлавіну; В₁ – показник флуорометра для стандартного розчину рибофлавіну після тушіння люмінесценції; 0,4 – вміст вітаміну В₁ у стандартному розчині, мкг; V – об'єм екстракту перед вимірюванням флуорометром (10 мл); V₁ – об'єм всієї витяжки (100 мл); V₂ – об'єм витяжки, взятої для аналізу (8 мл); а – маса взятого рослинного матеріалу для приготування витяжки, г.

Робота 14. Якісні реакції на вітамін В₅.

Вітамін В₅, або РР (*протипелагрничний, нікотинамід*). За відсутності або нестачі вітаміну в кормах у тварин (частіше у поросят, курчат, індичат, каченят, цуценят) порушується структура і функції шкіри (виникають зморшки і струпи), розвиваються пронос і судоми, зникає апетит, затримується і припиняється ріст, знижується продуктивність. Виникають атрофічні явища у тканинах шкіри, м'язів, кістках, печінці, залозах внутрішньої секреції, розвивається анемія. Типовими ознаками є дерматити на відкритих ділянках шкіри, у свиней – на вухах, у птиці випадає пір'я, зменшується нечучість, настає масова загибель, особливо молодняку. Вітаміном багаті дріжджі (200–475 мг/кг сухого корму), пшеничні висівки, зерно вівса і гороху, сіно конюшини і люцерни. Вітамін має дуже просту будову – представлений нікотиновою кислотою та її амідом:

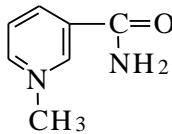


Нікотинова кислота Амід нікотинової кислоти

Вітамін є складовою частиною близько 100 оксидоредуктаз, здійснюючих біологічне окиснення. Він є коферментом багатьох ферментів, входить до складу НАД і НАДФ. Потреба у вітаміні для коней – 0,1 мг/кг сухого корму, телятам – 0,3–0,5, ягнятам – 0,1–0,6, птиці – 8 мг/кг.

Виявлення *N*-метилнікотинамід у сечі

Реакція дозволяє відкрити у складі сечі продукт обміну вітаміну В₅ – *N*-метилнікотинамід:



Хід роботи. У пробірку наливають 5 мл сечі, додають пучку деревного вугілля і збовтують 3–5 хв. Сеча знебарвлюється внаслідок адсорбції пігментів сечі (урохрому, білірубину тощо). Знебарвлена сеча фільтрується у фарфорову чашку. У фільтраті є нікотинова кислота, її амід та їх похідні. Вміст чашки випаровують досуха на водяній бані, далі проводять дослідження так, як для визначення

нікотинової кислоти (див. вище). Відсутність рожевого забарвлення фільтрату свідчить про авітаміноз або гіповітаміноз.

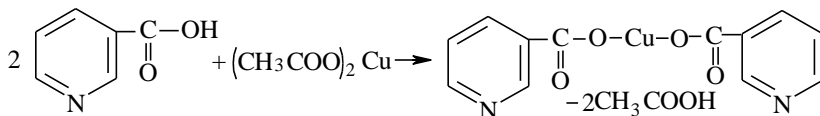
Реакція з 2,4-динітрохлорбенzenом

Хід роботи. У фарфорову чашку наливають 1 мл 0,1 % розчину нікотинової кислоти і випарюють на водяній бані. Після цього за допомогою піпетки з грушею або маленького циліндра вносять 1 мл 1 % спиртового розчину 2,4-динітрохлорбензену (обережно – отрута!) і перемішують скляною паличкою. Випарюють на водяній бані і сухий залишок знову нагрівають протягом 10–15 хв. Чашку охолоджують за кімнатної температури і додають 2 мл 0,1 % спиртового розчину гідроксиду натрію. Виникає рожево-фіолетове забарвлення.

Проба з ацетатом купруму на вітамін B₅

Хід роботи. 5–10 мг нікотинової кислоти розчиняють за нагрівання в 1–2 мл 10 % розчину ацетатної кислоти. До нагрітого до кипіння розчину додають рівний об'єм 5 % розчину ацетату купруму. Суміш стає каламутною, потім забарвлюється у блакитний колір і з часом випадає синій осад мідної солі нікотинової кислоти.

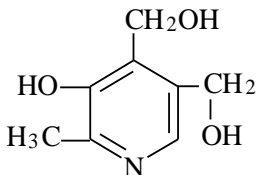
Нікотинова кислота взаємодіє з ацетатом купруму, що призводить до утворення солі:



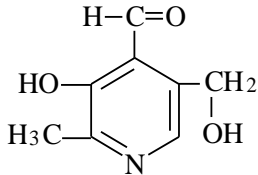
Робота 15. Якісні реакції на вітамін B₆

Вітамін B₆ (*піридоксин*). Гіпо- і авітамінози зустрічаються у свиней, собак, курей, голубів і лабораторних тварин. При цьому виникають дерматити, з'являються епілептичні судоми, пригнічується діяльність червоного кісткового мозку, затримується і зупиняється ріст і розвиток організму. У свиней і собак переважає ураження нервової системи. У свиней вміст гемоглобіну в крові зменшується до 30 %, кількість Феруму збільшується в 6 разів. У шурів виникає симетричний дерматит з ураженням кінцівок, кінчиків вух і носу. Курчата стають збудженими, поїдають власне пір'я, у дорослої птиці виникають пухлини шлунка, судоми. Вітаміном багаті соняшникова макуха (до 11,2 мг/кг), пшеничні висівки. Свиням

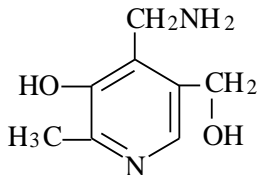
рекомендують додавати 1 мг вітаміну на 1 кг корму. Вітамін В₆ об'єднує три сполуки:



І 3дї аї єнї є



І 3дї аї єнїє



І 3дї аї єнї 3

Вітамін у вигляді коферментів (фосфатів) входить до складу багатьох ферментів, які беруть участь в обміні амінокислот, зокрема у дезамінуванні, переамінуванні, декарбоксилуванні.

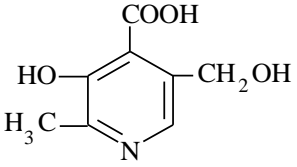
Хід роботи. У пробірку наливають 1 мл водного розчину вітаміну В₆ і додають 3 краплі 5 % розчину хлориду феруму (III). Струшують. Через декілька хвилин виникає червоне забарвлення.

Вітамін В₆ за взаємодії із розчином хлориду феруму (III) утворює комплексну сіль феноляту феруму (III).

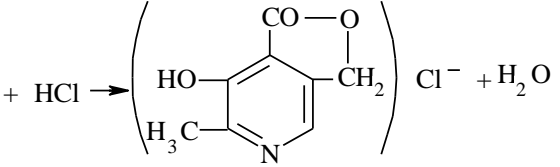
Робота 16. Виявлення піридоксислової кислоти

Із тваринного організму вітамін В₆ виводиться в основному з сечею. З метаболітів піридоксину, що виділяються із сечею, піридоксилова кислота складає 20–40 %. За її кількістю визначають стан обміну вітаміну в організмі.

Хід роботи. У мікрохімічну пробірку вносять 1 мл сечі і 1 мл 10 % розчину хлоридної кислоти. Пробірку поміщають у киплячу водяну баню на 20 хв, охолоджують за кімнатної температури, додають 1 мл 10 % розчину гідроксиду натрію (рН 9,0) і 1 мл 1 % розчину тетраборату натрію. За УФ-опромінення розчину виникає синя люмінесценція. В основі виникнення люмінесценції лежить утворення з піридоксислової кислоти штучного люмінофора – лактону:



4-ї 3дї аї єнї єї аа
єєнїї да



Єаєїї і 4-ї 3дї аї єнї єї аї і
єєнїї дє

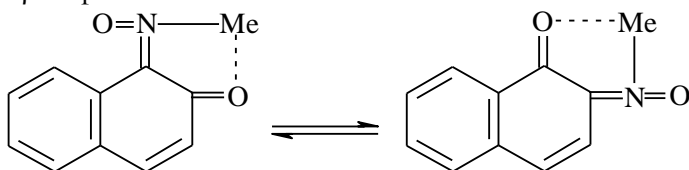
Робота 17. Відкриття Кобальту у вітаміні В₁₂

Вітамін В₁₂ (ціанокобаламін, антианемічний). Гіпо- і авітамінози частіше всього зустрічаються у свиней, собак і птиці. У тварин затримується ріст, продуктивність, виникають проноси, блювання, зменшується резистентність до різних хвороб, збільшується ембріональна смертність, виникають парези, паралічі, анемія (у кров'язному руслі з'являються незрілі і великі еритроцити).

Вітамін В₁₂ за наявності в раціонах кобальту у травному тракті синтезується мікроорганізмами (особливо пропіоновокислими бактеріями). Для поросят добова потреба у вітаміні складає 20 мкг/кг сухого корму, телят – до 40, місячних курчат – 20, дорослих курчат – 2 мкг/кг. Вітамін – кофермент багатьох ферментів, які беруть участь у біосинтезі та обміні нуклеїнових кислот, білків, вуглеводів, ліпідів та інших життєво важливих речовин. Молекула вітаміну складається з двох частин – нуклеотидної і хромофornoї.

Відкриття Кобальту з нафтоловим реактивом

Хід роботи. У фарфоровий тигель наливають 1 мл 0,1 % водно-розчину вітаміну В₁₂ і випарюють досуха на водяній бані. Потім додають 0,5 г бісульфату калію і ставлять на вогонь або на азбестову сітку. Сплав охолоджують, додають 3 мл дистильованої води під час нагрівання. Розчин нейтралізують 10 % розчином гідроксиду натрію (контролюють фенолфталеїном), додають у суміші 0,5 г ацетату натрію, 0,5 мл 15 % розчину α-нітросо-β-нафтолу, або α-нітросо-дисульфо-β-нафтолу. Суміш забарвлюється в червоний колір. Це обумовлено утворенням комплексної сполуки Кобальту з α-нітросо-β-нафтолом.



Комплексна сіль α-нітросо-β-нафтолу

Одержаний червоний продукт хімічної реакції стійкий, що встановлюється дослідом. У суміш додають 0,5 мл 10 % розчину хлоридної кислоти, кип'ятять протягом 1 хв, при цьому забарвлення не змінюється.

Відкриття Кобальту з нафтоловим реактивом та кислотами

Хід роботи. У тигель або пробірку наливають 1 мл 0,1 % розчину ціанкобаламіну, додають 1 мл концентрованої нітратної кислоти і 3 мл концентрованої хлоридної кислоти. Суміш кип'ячать під тягою до повного випаровування рідини. Після охолодження додають 1–2 краплі 0,1 % розчину α -нітросо- β -нафтолу в ацетоні і краплями додають 10 % розчину гідрофосфату натрію. У присутності іонів кобальту (Co^{2+}) виникає буре забарвлення, коли їх немає – жовто-зелене.

Відкриття Кобальту з тіосечовиною

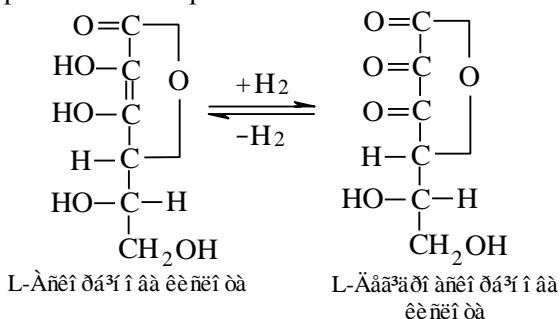
Хід роботи. У пробірку вносять розчин вітаміну B_{12} і додають 3–5 крапель концентрованої сульфатної кислоти. Пробірку переносять у штатив і ставлять у нахиленому вигляді. Її вміст спалюють у витяжній шафі до зникнення забарвлення. Після завершення мінералізації пробірку охолоджують і додають 1 мл дистильованої води, обережно перемішують. На фільтр наносять 2–3 краплі 10 % розчину тіосечовини і висушують над сіткою газового запальника. Після висихання на фільтр наносять 1–2 краплі одержаного мінералізату і знову нагрівають фільтр над сіткою. На фільтрі (частіше у вигляді плями) виникає зелене забарвлення, яке має комплексна сполука складу $[\text{Co}_2(\text{CSN}_2\text{H}_4)_3](\text{SO}_4)_2$, що свідчить про наявність вітаміну, а в ньому Кобальту.

Робота 18. Якісні реакції на вітамін С

Вітамін С (*аскорбінова кислота, антицинговий вітамін*). У разі гіповітамінозу з'являється швидка стомлюваність, великі крововиливи, сонливість, знижена опірність до різних захворювань. У телят за авітамінозів спостерігаються явища некрозу, анемія, прискорення пульсу і дихання, затримується ріст, падають прирости. У поросят виникає анемія, затримується ріст, виникають крововиливи у шкірі і слизових оболонках, гіперкератоз, кон'юнктивіти, іноді некроз хвоста, випадає щетина. У дорослих свиней виникають геморагії і червоноплямистість на слизових оболонках рота, особливо ясен, некротичний стоматит, пухнуть суглоби, настає різке виснаження і смерть. У хутрових звірів спостерігаються підшкірні крововиливи, стоматити, анемія, набряки лап і хвоста (кінчик хвоста іноді відпадає), парези і паралічі, смерть. У лисенят хутро стає ватним, сірувато-білим і м'яким.

Вітамін С широко поширений у продуктах рослинного походження – свіжих овочах і фруктах. У плодах шипшини міститься 2–4,5 г вітаміну на 100 г, у хвої ялинки і сосни (взимку) – 220–275 мг на 100 г, у капусті – 30–70 мг на 100 г. Добова потреба у вітаміні С для телят у перші дні життя становить 250 мг, у разі раннього відлучення поросят – 100–200 мг/кг корму, взимку – 100, півням і індикам – 100–200 мг/кг корму. Серед продуктів тваринного походження більше всього вітаміну С міститься у молоці (1,5 мг/100 г). За термічної обробки кормів вітамін руйнується.

Вітамін бере участь у багатьох реакціях обміну. Він є донором і акцептором протонів і електронів:

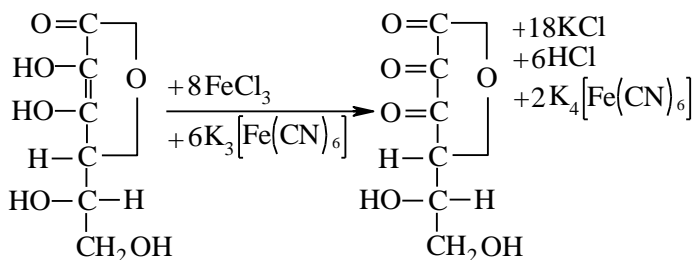


Якісні реакції на вітамін С ґрунтуються на його здатності легко вступати в окисно-відновні реакції та відновлювати різні хімічні реактиви: метиленову синьку, 2,6-дихлофеноліндофенол, гексаціаноферат (III) калію, нітрат аргентуму тощо.

Реакція з гексаціанофератом (III) калію

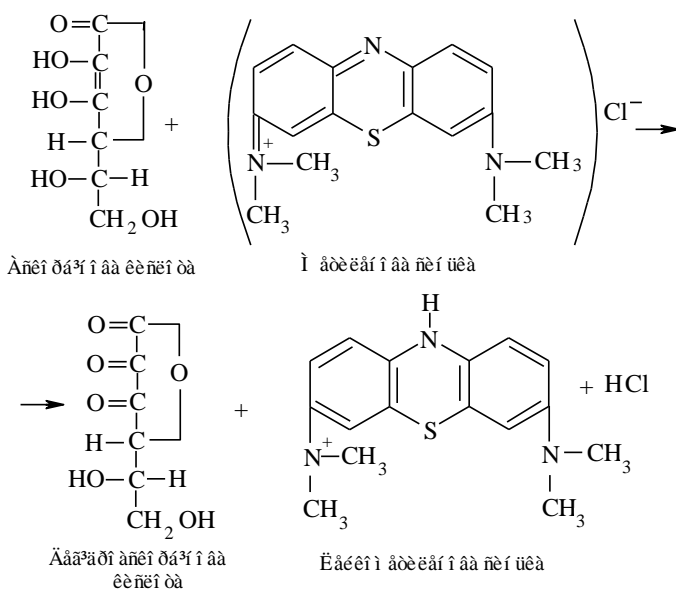
Хід роботи. У дві пробірки вносять по 2–3 краплі 5 % розчину гексаціаноферату (III) калію і 1 краплю 1 % розчину хлориду феруму (III). Рідини забарвлюються в бурий колір. У першу пробірку додають 5–10 крапель витяжки з капусти або шипшини, у другу – стільки ж дистильованої води. У першій пробірці рідина забарвлюється у зеленувато-синій колір, а потім випадає темно-синій осад берлінської блакиті, вміст другої пробірки не змінює свого забарвлення.

Спочатку аскорбінова кислота окиснюється в дегідроаскорбінову кислоту, гексаціано-(III)ферат калію перетворюється в гексаціаноферат (II) калію, що і є основою для утворення берлінської блакиті:



Реакція з метиленою синькою

Хід роботи. У дві пробірки вносять по 1 краплі 0,01 % розчину метиленового синього і 10 % розчину бікарбонату натрію. У першу пробірку додають 5 крапель витяжки шипшини або капусти (1 % розчину), у другу – стільки ж дистильованої води. Обидві пробірки нагрівають над полум'ям запальника. У першій пробірці (дослідній) відбувається знебарвлення, вміст другої пробірки (контрольної) залишається без змін. Метиленова синька – тіазиновий барвник, зовнішній і внутрішній антисептик, антидот за отруєння ціанідами, CO і H₂S. Використовується як барвник у поліграфії, як реактив (у лабораторній практиці). Легко взаємодіє з вітаміном С, перетворюючись у лейкосполуку:



Йодна проба на вітамін С

Хід роботи. Беруть дві пробірки. У першу пробірку наливають 2 мл витяжки з капусти або шипшини, у другу – стільки ж дистильованої води. В обидві пробірки вносять по 1–2 краплі розчину Йоду в йодиді калію. У першій пробірці розчин Йоду знебарвлюється за рахунок відновлення аскорбінової кислоти молекулярного Йоду і утворення йодистоводневої кислоти.

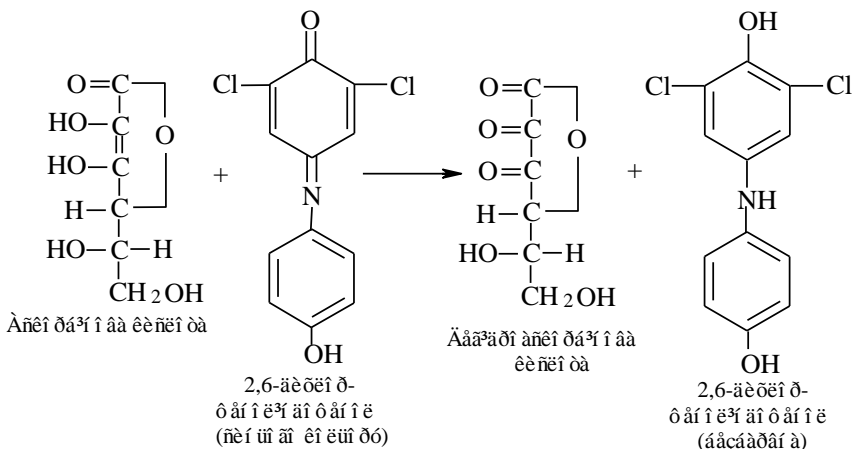
Робота 19. Кількісне визначення вітаміну С

У практичній роботі лікаря ветеринарної медицини і технолога з виробництва та переробки продукції тваринництва нерідко виникає необхідність визначити кількість вітаміну С. Перш за все, це необхідно для профілактики гіпо- та авітамінозів. Добова потреба у вітаміні С для телят у перші два тижні життя складає до 250 мг, дорослі кури повинні одержувати у складі раціону влітку 40–60 мг/кг корму, взимку – 100 мг/кг корму.

У молоці корови в середньому міститься до 1,5 мг/кг вітаміну С. Внесення в молоко деяких штамів молочнокислих бактерій дозволяє підвищити у простокваші і кефірі вміст вітаміну С у 2–4 рази. Добова потреба у вітаміні С у дорослої клінічно здорової людини складає 50–100 мг, у дітей – 5–8 мг. Потреба зростає за багатьох фізіологічних і патологічних станів – важкої фізичної роботи, вагітності, інфекційних захворювань, токсикозів, перегріву, переохолоджень тощо.

Хід роботи. У ступку поміщають 2–3 г наважки капусти, картоплі, хвої, шипшини. Додають невелику кількість битого скла і розтирають, поступово додаючи 9 мл 2 % розчину хлоридної кислоти, або 5 % розчину ацетатної кислоти. Одержану витяжку виливають у колбу через вату або марлю. В окрему колбу відміряють 3 мл фільтрату, додають для розведення 2–5 мл води і титрують із мікробюретки 0,001 н розчином 2,6-дихлорфеноліндофенолом до слаборожевого забарвлення, яке не зникає протягом 30 с.

Індикатор 2,6-дихлорфеноліндофенол у нейтральному і лужному середовищах має синій колір, у кислому – слаборожевий (колір недисоційованих молекул). Відновлена форма індикатора, незалежно від реакції середовища, є безбарвною.



При розрахунках вважають, що 1 мл 0,001 н розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу відповідає 0,088 мг аскорбінової кислоти:

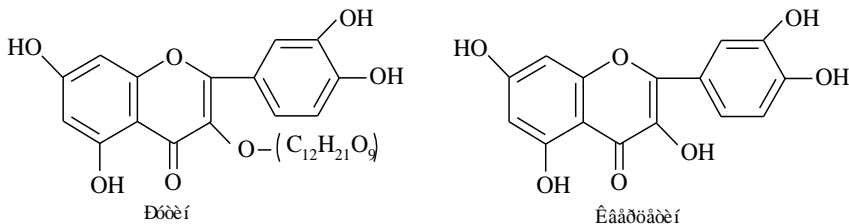
$$X = \frac{0,088 \times a \times V \times 100}{b \times c},$$

де X – вміст вітаміну С, мг%; а – кількість 0,001 н розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу, що витрачено на титрування, мл; V – загальний об'єм фільтрату, мл; b – кількість фільтрату, взятого на титрування, мл; c – наважка дослідного матеріалу, г.

Для визначення вмісту вітаміну С у рідинах (наприклад у молоці) для переведення концентрації у моль/л, одержану величину необхідно помножити на коефіцієнт 0,05551.

Робота 20. Якісні реакції на рутин і кверцетин

Вітамін Р (біофлавоноїди, вітамін проникності). Вітамін об'єднує групу речовин – еридиктіол, гесперидин, рутин і кверцетин:



У разі нестачі або відсутності вітаміну в кормах у тварин проявляються кровививи в шкірі, м'язах, суглобах і внутрішніх органах у вигляді точок і петехій. Багато вітаміну міститься в листях

гречки, шкірці шипшини, смородини, цедрі цитрусових тощо. Вітамін бере участь в окисно-відновних процесах, діє на судинну систему через залози внутрішньої секреції, а також через ферментні системи і клітинне дихання.

Реакція рутину із хлоридом феруму (III)

Хід роботи. У пробірку наливають 1–2 мл насиченого водного розчину рутину і додають декілька крапель 1 % розчину хлориду феруму (III). Виникає зелене забарвлення.

Реакція рутину із концентрованою сульфатною кислотою

Хід роботи. У пробірку наливають 1–2 мл насиченого водного розчину рутину. По стінці пробірки обережно додають 1 мл концентрованої сульфатної кислоти. На межі двох рідин виникає жовте кільце. Концентрована сульфатна кислота з флавонами і флавонолами утворює оксонієві (флавилієві) солі, для яких характерне яскраво-жовте забарвлення.

Реакція рутину з реактивом Фелінга

Хід роботи. У пробірку вносять 0,5 г рутину, додають 5 мл 0,5 % розчину хлоридної кислоти. Суміш кип'ячать протягом 1 хв і фільтрують. До фільтрату додають 3 мл 10 % розчину гідроксиду натрію і 3 мл реактиву Фелінга. Виникає червоний осад оксиду купруму (II).

Реакція відбувається в дві стадії – спочатку під впливом хлоридної кислоти і нагрівання відбувається гідроліз молекули рутину до кверцетину і дисахариду рутинози. Надалі рутиноза гідролізується до глюкози і рамнози. Потім глюкоза і рамноза реагують з реактивом Фелінга, що призводить до утворення червоного осаду оксиду купруму.

Реакція кверцетину з Магнієм

Хід роботи. У пробірку наливають 1 мл насиченого спиртового розчину кверцетину. Вносять шматочок магнієвої стрічки або (на кінчику скальпеля) порошку металічного Магнію та 3–4 краплі концентрованої хлоридної кислоти. Суміш спочатку забарвлюється в рожевий колір, потім поступово стає малиною або фіолетово-червою. Кверцетин вступає в реакцію відновлення, що призводить до утворення нової сполуки – ціанідину, який має червоно-рожевий або фіолетово-червоний колір.

Робота 21. Кількісне визначення вітаміну Р у препаратах чайного листа

Хід роботи. У колбу зі зворотним холодильником поміщають 0,25 г чаю, заливають 100 мл гарячої дистильованої вод і кип'ять 5 хвилин. Беруть 2 мл охолодженого екстракту і переносять у другу колбу, куди наливають 50 мл дистильованої води і 5 мл розчину індигокарміну. Виникає інтенсивно синє забарвлення. Паралельно готують контрольну пробу. Для цього у колбу вносять 52 мл води і 5 мл розчину індигокарміну. Вміст колб перемішують і титрують 0,1 н розчином перманганату калію до появи жовтого забарвлення через перехідні тони (від синього до зеленого і зеленувато-жовтого). Вираховують кількість розчину перманганату калію, що витратили на титрування обох колб, тобто на окиснення катехінонів.

Результати титрування порівнюють зі стандартним перерахунковим коефіцієнтом титрування: 1 мл 0,1 н розчину перманганату калію окиснює 6,4 мкг рутину. Для визначення вмісту вітаміну Р використовують формулу:

$$X = \frac{(a - b) \times 6,4 \times V_1 \times 100}{P \times V_2 \times 100},$$

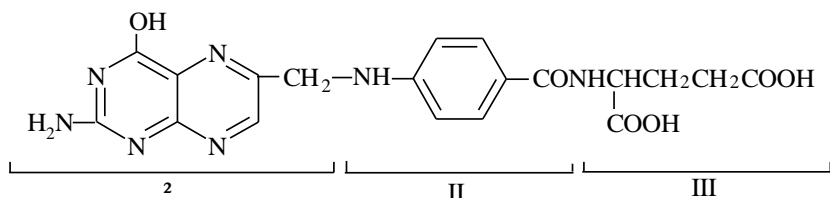
де X – вміст вітаміну Р у наважці, %; a – кількість 0,1 н розчину перманганату калію, що витратили на титрування дослідної проби, мл; b – кількість 0,1 н розчину перманганату калію, що витратили на титрування контрольної проби, мл; 6,4 – стандартний перерахунковий коефіцієнт титрування; V₁ – об'єм, в якому проводилася екстракція наважки, мл; V₂ – об'єм розчину, взятого для титрування, мл; P – наважка, мг.

Робота 22. Кількісне визначення вмісту фолієвої кислоти

Вітамін В_с (*фолієва кислота*). За нестачі в кормах фолієвої кислоти у молодняку птиці розвиваються лейкопенія, гіпохромна анемія, порушується ріст пір'я, настає параліч ніг і шиї. В інших видів тварин припиняється ріст, розвиток і знижується рівень продуктивності.

На вітамін багаті дріжджі (11,35 мг/г), люцернове і соєве борошно, макуха, картопля. Молоко містить у середньому 0,005 мг% фолієвої кислоти. Поросятам необхідно давати 0,5–1 мг/кг, свиноматкам – 2,1, курям-несучкам – 0,5, курчатам – 0,5–0,8, індикам – до 1,3 мг/кг.

Молекула вітаміну складається із залишків похідного птеридину (I), п-амінобензойної кислоти (II) і глютамінової кислоти (III):



Хід роботи. У колбу наливають 35 мл молока, 45 мл дистильованої води і додають декілька крапель 15 % розчину сульфатної кислоти (до рН 3,5–4,0). Вміст колби перемішують, встановлюють зворотний холодильник і нагрівають на киплячій бані протягом 45 хв. Суміш охолоджують і доводять рН до 4,5–5,0 15 % розчином гідроксиду натрію. У колбу вносять 200 мг пеніцилінової плівки, розчиненої в 10 мл води, 3 краплі толуолу, перемішують і ферментують 16–18 год у термостаті за температури 38–40°C. Потім суміш фільтрують через складчастий фільтр. Одержаний осад двічі промивають невеликими порціями дистильованої води, доводячи об'єм фільтрату до 100 мл. У іншу конічну колбу відбирають 50 мл фільтрату, підкислюють 15 % розчином сульфатної кислоти (до рН 3) і додають 100 мг активованого вугілля. Суміш кип'ятять 5 хв, під тягою, перемішуючи і фільтрують через пористий скляний фільтр (колба Бунзена) під вакуумом.

Колбу Бунзена замінюють іншою колбою і через той же фільтр 5 разів пропускають нагрітий до кипіння 3 % розчин аміаку в 70° етанолі для елюції фолієвої кислоти (перший раз беруть 20 мл, другий і третій – по 15, четвертий і п'ятий – по 10 мл). Об'єднані елюати переносять у колбу Вюрца і переганяють до об'єму 10–15 мл. Залишок переносять у мірну колбу на 25 мл і підкислюють 2 % розчином сульфатної кислоти (до рН 3), потім краплями додають із бюретки 4 % розчин KMnO_4 до появи рожевого забарвлення, що не зникає протягом 10 хв. Для видалення надлишку перманганату калію додають краплями 3 % розчин пероксиду гідрогену і доводять рН до 4,0–4,5 15 % розчином гідроксиду натрію. Загальний об'єм доводять водою до 25 мл.

Суміш фільтрують і вимірюють інтенсивність люмінесценції за 470 нм на флуорометрі. Паралельно вимірюють інтенсивність люмінесценції стандартного розчину фолієвої кислоти, який обробляють як і дослідний розчин (контроль), і стандартного розчину без

обробки. Для приготування стандартного розчину 20 мг перекристалізованої фолієвої кислоти розчинити в 100 мл дистильованої води, в яку внесено 3 краплі 10 % розчину гідроксиду натрію. Цей розчин розводять у 100 разів водою.

Спочатку фолієва кислота адсорбується активованим вугіллям, потім окиснюється перманганатом калію і гідролізується до птеридину, *p*-амінобензойної та глютамінової кислот. Птеридин окиснюється у птеридин-6-карбонову кислоту (або в альдегід), наявність яких обумовлює інтенсивну блакитну люмінесценцію за 470 нм.

Уміст вітаміну V_c вираховують за формулою:

$$X = \frac{(A - A_1) \times b \times V \times V_1}{A_2 \times a \times V_0},$$

де X – вміст фолієвої кислоти, мг/мл; A – показник флуорометра для дослідного розчину; A_1 – показник флуорометра для контрольного розчину; A_2 – показник флуорометра для стандартного розчину фолієвої кислоти; b – вміст фолієвої кислоти в 1 мл стандартного розчину; a – маса молока, г; V – кількість фільтрату, взятого для адсорбції, мл; V_0 – об'єм гідролізату після розбавлення водою, мл.

Контрольні питання

1. Дати визначення і провести класифікацію вітамінів. 2. Що означають терміни: провітаміни, вітамери, авітаміноз, гіпо- і гіпервітамінози? 3. Який існує зв'язок в організмі тварин між вітамінами і ферментами? Написати структурні формули основних коферментів, до складу яких входять вітаміни. 4. Які Вам відомі жиророзчинні вітаміни? 5. Які Вам відомі водорозчинні вітаміни? Які загальні властивості для кожної з груп вітамінів? 6. Охарактеризуйте значення вітамінів для обміну речовин. 7. Які заходи слід провести у тваринництві, щоб уникнути авітамінозів і гіповітамінозів?

7. ФЕРМЕНТИ

Ферменти (ензими) – біологічні каталізатори білкової природи, які синтезуються в живих клітинах і здатні прискорювати хімічні реакції, що відбуваються в організмі.

Біосинтез ферментів відбувається безперервно в кожній клітині, тканині, органі і складається з тих же етапів, що і біосинтез звичайного білка. Окремі органи синтезують великі кількості ферментів, необхідних для повноцінної життєдіяльності тваринного організму. До таких органів, перш за все, слід віднести травні залози, що беруть участь у гідролітичному розщепленні продуктів харчування тварин.

Ферменти широко використовуються в побуті (приготування продуктів харчування для людини), харчовій та легкій промислово-

сті, в тваринництві (для поліпшення перетравлення кормів), у ветеринарній практиці (для діагностики і лікування багатьох хвороб).

Матеріалом для одержання різних ферментів можуть бути органи і тканини тварин і рослин, травні соки, клітинні маси мікроорганізмів. В останні роки велику кількість ферментів одержують біотехнологічними методами із різних мікроорганізмів. Наприклад, під час індукованого синтезу з маси кишкової палички можна одержати в середньому 6 % кислій фосфатази від загальної маси речовин.

За хімічною природою ферменти є простими або складними білками. Перші з цих білків є однокомпонентними, їх молекули побудовані лише з білка. Складні ферменти є двокомпонентними, їх молекула складається з білкової частини (апофермент) і небілкової (кофактор). Кофактор ферментних молекул може бути простетичною групою (вона є невід'ємною складовою частиною такої молекули) або коферментом, небілковою речовиною, що з'єднується з білковою частиною під час каталітичної дії. Простетичні групи і коферменти найчастіше представлені ефірами ортофосфорної кислоти з водорозчинними вітамінами, нуклеотидами.

Ферменти взаємодіють із субстратами не всією своєю молекулою, а певною ділянкою – активним центром. Є ферменти, що містять у складі своїх молекул декілька, а іноді і більше десятка (холінереза має 20–100) активних центрів. За допомогою активного центра ферментативна молекула з'єднується із субстратом і здійснює його перетворення. У складі активного центра є функціональні групи, що здійснюють зв'язок молекули ферменту і субстрату. До них належать гідроксильна група (–OH) серину, сульфгідрильна група (–SH) цистеїну, імідазольне кільце гістидину, карбоксильна група (–COOH) аспарагінової і глутамінової кислот, кофактори, метали.

Багато ферментів, крім активних центрів, у складі молекул мають алостеричні, або регуляторні центри. Речовини, які з'єднуються з алостеричним центром ферменту, називаються *алостеричними ефекторами*, які за своїми функціями можуть бути активаторами та інгібіторами. Під впливом алостеричних ефекторів відбувається зміна конфігурації активного центру і його здатності взаємодіяти з субстратом. Алостеричні ефектори беруть участь у регуляції ферментативної активності взагалі і обміну речовин.

Залежно від ферментативної дії ферменти ділять на шість класів, які об'єднують більше 2000 представників. Кожний фермент має свій шифр в класифікації ферментів. Перед шифром ставлять дві літери – КФ (класифікація ферментів), потім чотири групи цифр, розділених крапками: перша цифра означає клас ферменту, друга – підклас, третя – підпідклас, четверта – порядковий номер ферменту.

Ряд ферментів може існувати в декількох молекулярних формах, або видах, їх прийнято називати *ізоферментами*. Ізоферменти мають однакову субстратну специфічність, але відрізняються фізико-хімічними та імунологічними властивостями, які обумовлені незначною різницею в амінокислотному складі молекул і стереохімічною будовою окремих її ділянок. Відомі ізоферментні форми ЛДГ, МДГ, креатинінкінази та ще понад 100 ферментів. Кількісне співвідношення ізоферментних форм між собою залежить від багатьох факторів: віку тварин, фізіологічного стану, хвороби тощо.

Більшість тканин і органів тваринного організму містять мізерну кількість ферментів, яку неможливо виділити, тому для виявлення ферментів часто використовують непрямі методи. Суть цих методів у тому, що про наявність ферменту в тканинах або біологічних рідинах судять за дією ферменту на субстрат і його перетворення в певні продукти. Наприклад, про наявність ліпази в соці підшлункової залози судять за розщепленням жиру на гліцерин і жирні кислоти тощо.

Для ферментів, як біологічних каталізаторів, характерний ряд хімічних властивостей. До таких особливостей відносять: термолабільність та температурний оптимум, оптимум дії рН, специфічність дії, вплив активаторів та інгібіторів, зворотність дії.

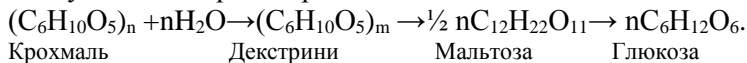
Робота 1. Виявлення амілази у слині

Амілаза – фермент, який здійснює в присутності іонів Ca^{2+} гідролітичне розщеплення α -1,4-глюкозидних зв'язків у молекулах полісахаридів. Амілаза міститься у слині та соці підшлункової залози.

Хід роботи. У пробірку наливають 1–2 мл слини, додають 2–3 мл розчину крохмалю, перемішують і поміщають на 15 хв у водяну баню за температури 37 °С. Вміст пробірки розділяють навпіл. У першу пробірку додають декілька крапель розчину Йоду в йодиді калію, у другу 2–3 мл реактиву Фелінга. Розчин Йоду в йодиді ка-

лію дозволяє виявити крохмаль і продукти його гідролізу, реактив Фелінга – мальтозу і глюкозу. Другу пробірку кип'ятять – випадає червоний осад оксиду купруму (I).

Слина містить два ферменти – амілазу і мальтазу, під впливом яких відбувається гідроліз крохмалю:



Декстрини – проміжні продукти розщеплення крохмалю. Залежно від розміру молекули їх ділять на амілодекстрини (з розчином Йоду в йодиді калію вони дають фіолетове забарвлення), ерітродекстрини (червоне), ахродекстрини (жовте) і мальтозодекстрини (світло-жовте). Забарвлення крохмалю (синє) і продуктів його розщеплення декстринів зв'язано з явищем адсорбції їх молекулами молекул Йоду.

Під впливом реактиву Фелінга під час нагрівання в другій пробірці забарвлення із синього стає жовтим або червоним – утворюється оксид купруму (I).

Робота 2. Виявлення сахарози у дріжджах

Сахараза – фермент із класу гідролаз, який здатний розщеплювати молекулу сахарози до глюкози і фруктози.

Хід роботи. 1–2 г дріжджів старанно розтирають зі скляним піском у ступці, поступово додають 10 мл дистильованої води. Одержану масу фільтрують через вату в чисту пробірку. У пробірку вносять 1–2 мл фільтрату, додають 2–3 мл розчину сахарози, розмішують і поміщають у водяну баню на 15 хв (38 °С). Вміст пробірки ділять навпіл. У першу пробірку додають 1 мл розчину Фелінга для відкриття глюкози. Нагрівають. Випадає осад оксиду купруму (I). У другу пробірку додають декілька 1 мл реактиву Селіванова для відкриття фруктози. При цьому утворюється фіолетове забарвлення.

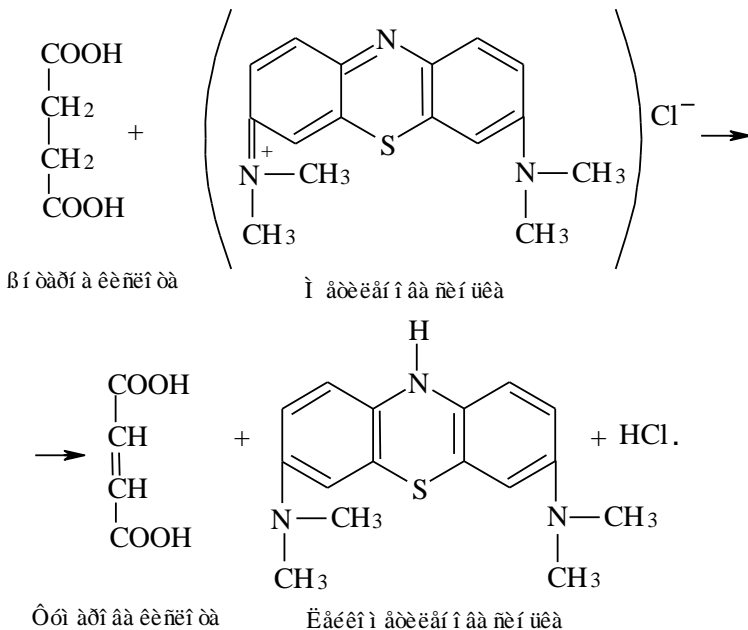
Робота 3. Виявлення сукцинатдегідрогенази у м'язовій тканині

Сукцинатдегідрогеназа (СДГ), або дегідрогеназа янтарної кислоти – фермент, що окиснює янтарну кислоту у fumarову, є одним із центральних ферментів циклу трикарбонових кислот Кребса.

Хід роботи. У пробірку поміщають 0,5–0,6 мл свіжої м'язової кашки, 3–4 мл 1 % розчину янтарної кислоти і 2–3 краплі 0,1 % розчину метиленової синьки. Вміст пробірки добре перемішують і

ставлять у водяну баню за температури 37–40 °С. Слідкують за знебарвленням нижньої частини вмісту пробірки. Метиленова синь відновлюється.

Сукцинатдегідрогеназа (СДГ) окиснює янтарну кислоту, перетворюючи її у fumarову. Водень відновлює метиленову синьку, яка переходить у лейкоформу (безбарвну):



Робота 4. Виявлення пепсину в шлунковому соці

Пепсин – протеолітичний фермент шлункового соку хребетних. Пепсин виділяється у вигляді пепсиногену, який у присутності хлоридної кислоти відщеплює пептид із 42 амінокислотних залишків і перетворюється на пепсин. Фермент гідролізує внутрішні пептидні зв'язки у білковій молекулі з утворенням більш простих пептидів і амінокислот. Пепсин активний у кислому середовищі (оптимум дії за рН 2,0). Вживається як лікарський засіб, використовується у сироварінні, а також для дослідження первинної структури молекул білка.

Хід роботи. У пробірку вносять 0,5–1,0 г вареного яєчного білка і додають 5–6 мл шлункового соку. Суспензію перемішують і

поміщують на 30 хв у водяну баню або термостат за температури 38 °С. Білок гідролізується і вміст пробірки стає прозорим.

Під впливом пепсину відбувається поступове розщеплення білка до проміжних і кінцевих продуктів за схемою:

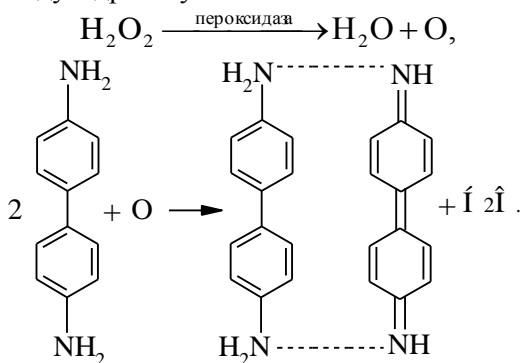
Білок → Альбумози → Пептони → Поліпептиди → Амінокислоти.

Робота 5. Виявлення пероксидази у крові

Пероксидази – ферменти класу оксидоредуктаз, які каталізують окиснення різних речовин за рахунок кисню пероксиду гідрогену або інших пероксидів. Такими речовинами в організмі тварин є феноли, аміни, жирні кислоти, цитохроми та інші сполуки. Пероксидази виконують важливі функції в диханні рослин (разом із поліфенолоксидазою каталізують окиснення хромогенів у дихальні пігменти). У тваринному організмі фермент виявлений в еритроцитах і молоці. Для виявлення пероксидаз застосовують реактиви, які після окиснення змінюють своє забарвлення (гваякова смола, бензидин, пірогалол тощо).

Хід роботи. У дві пробірки наливають по 0,5–1 мл 2 % розчину пероксиду гідрогену і 0,5 мл 5 % розчину бензидину. У першу пробірку додають 1–2 мл розведеної крові (1:1000), у другу (контрольну) – 1–2 мл води. Спостерігають за появою забарвлення.

Пероксидаза каталізує окиснення субстрату (бензидину) за допомогою пероксиду гідрогену:



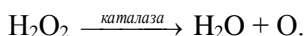
Робота 6. Виявлення каталази в крові

Каталаза – фермент класу оксидоредуктаз, каталізує розщеплення пероксиду гідрогену з утворенням молекулярного кисню. Каталаза, як і пероксидаза, належить до гемінових ферментів. Мо-

лекула гемінового ферменту в своєму складі має білкову частину (ферон) і кофактор (агон), представлений простетичною групою гемом. Широко поширений у природі. Міститься у спеціалізованих органоїдах клітин – мікротільцях (пероксисомах). Багато ферменту є в еритроцитах і гепатоцитах.

Хід роботи. У пробірку наливають 1,0–1,5 мл крові, розбавленої водою (1:1000) і додають 5–6 крапель 2 % розчину пероксиду гідрогену. Спостерігають за бурхливим виділенням бульбашок кисню.

Під впливом каталази відбувається розщеплення пероксиду гідрогену до води і молекулярного кисню:



Робота 7. Одержання ферментних препаратів

Матеріалом для одержання ферментів є органи і тканини тварин, рослин, травні соки, клітинна маса мікроорганізмів. Лише із плісневих грибків виділено понад 100 різних ферментів: протеолітичних, гліколітичних, пектолітичних. Близько 500 ферментів одержано у кристалічному вигляді.

Ферменти – це білки, які легко під впливом різних умов середовища денатурують. Враховуючи це, їх слід виділяти за м'яких умов та температури не вище +4 °С, за рН 5–9, реактиви повинні бути хімічно чистими. Ферменти найчастіше одержують із домішками у вигляді ферментних препаратів. Для одержання ферментних препаратів наважка повинна бути добре гомогенізована і обезводнена. Головними домішками до ферментних препаратів, як правило, є ліпіди. Часто для усунення домішок і обезводнення ферментних препаратів їх обробляють охолодженим (до –20 °С) ацетоном, взятим у надлишку. Ацетоновий порошок ферментного препарату зберігають в ексікаторі за температури 0 °С без втрати активності. В останні роки для обезводнення ферментних препаратів використовують ліофілізацію і сефадекси. Для виділення індивідуальних ферментів у чистому вигляді використовують методи електрофорезу, гель-фільтрацію через сефадекси, іонообмінну хроматографію тощо. Для максимального збереження активності ферментів протягом довгого часу рекомендують одержувати їх у іммобілізованому стані.

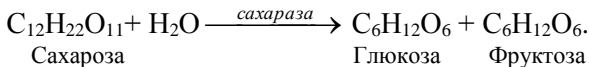
Одержання препарату сахарози

Фермент входить до складу соку підшлункової залози і здійснює розщеплення сахарози в тонкій кишці до глюкози і фруктози, які після цього засвоюються слизовою оболонкою. Значний вміст ферменту у дріжджах.

Хід роботи. 100 г пекарських дріжджів старанно розтирають у ступці, додаючи кварцовий пісок. Розтерту масу тонким шаромносять на скло і висушують у потоці сухого повітря. Висушені дріжджі розтирають у порошок. Для екстракції сахарози із дріжджів до порошку додають порціями 200 мл дистильованої води, постійно перемішуючи. Одержану масу знову розтирають у ступці і центрифугують протягом 10 хв за 3000 об/хв, або фільтрують через складчастий фільтр. Прозорий фільтрат упарюють у вакуумі за температури 35 °С до невеликого об'єму і виливають у п'ятикратний об'єм ацетону, перемішують і через декілька хвилин центрифугують. Осад висушують за температури 38 °С і розтирають у ступці. Для стійкості порошку додають кристалик тимолу, загорнутий у фільтрувальний папір. Готують 0,01 % розчин препарату.

Беруть дві пробірки. У кожну пробірку наливають по 0,5 мл препарату сахарози. Вміст другої пробірки (контрольної) кип'ятять. В обидві пробірки додають по 3 мл 5 % розчину сахарози і поміщають на водяну баню за температури 40 °С на 10–15 хв. В обидві пробірки додають по 2 мл реактиву Фелінга, перемішують і доводять до кипіння. У дослідній пробірці випадає червоний осад оксиду купруму (I).

Під впливом ферменту сахарози в дослідній пробірці відбувається гідроліз сахарози:



Після додавання реактиву Фелінга глюкоза окиснюється, а реактив Фелінга відновлюється.

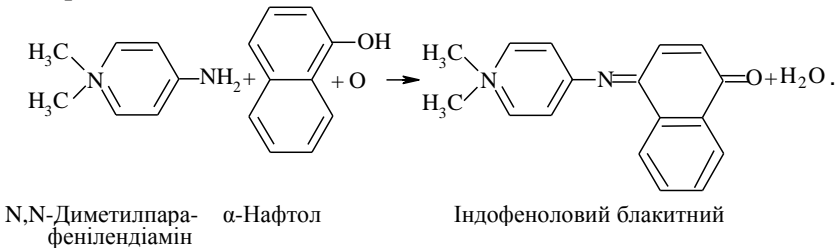
Одержання препарату цитохромоксидази

Цитохромоксидаза (КФ 1.9.3.1) – фермент класу оксидоредуктаз, що каталізує кінцевий етап переносу електронів на кисень у дихальному ланцюзі у процесі біологічного окиснення, міститься на внутрішній мембрані мітохондрій клітин. Простетична група ферменту містить дві групи гематину і два атоми Купруму. Вміст

ферменту в препараті свідчить про стан біологічного окиснення в тканинах або органах, з яких одержаний препарат.

Хід роботи. М'язи тільки-що забитої тварини очищують від жиру і сполучної тканини. Відважують 50–80 г, подрібнюють ножицями, заливають чотирма об'ємами дистильованої води і гомогенізують протягом 10 хв. Гомогенат фільтрують через подвійний шар марлі, після чого багаторазово промивають осад дистильованою водою до тих пір, поки промивні води не стануть прозорими. Одержана кашка стала майже безбарвною. З неї беруть 2–3 г і поміщають на фільтрувальний папір, після чого додають 0,1–0,2 мл реактиву, який складається з однакових об'ємів 1 % спиртового розчину α -нафтолу, 1 % розчину N,N-диметилпарафенілєндіаміну і 1,5 % розчину карбонату натрію. Через декілька хвилин виникає яскраво-синє забарвлення. Одночасно проводять і контрольне дослідження, для якого кашку нагрівають протягом 5 хв за температури 60–70 °С.

Цитохромоксидаза сприяє окисненню α -нафтолу і N,N-диметилпарафенілєндіаміну та утворенню в присутності кисню індофенолового блакитного:



Робота 8. Вплив температури на активність амілази слини

Ферменти – термолабільні сполуки. За дії високих температур вони, як білки, денатурують. Температурний оптимум більшості ферментів знаходиться в межах температури, близької до температури тіла тварини (37–40 °С). Ферменти в розчиненому стані більш чутливі до нагрівання, ніж у сухому. Зі зниженням температури швидкість ферментативних реакцій поступово зменшується і досягає мінімуму за температури 0 °С.

Хід роботи. У дві пробірки вносять по 2 мл розчину розбавленої слини. Одну пробірку кип'ятять і охолоджують до кімнатної температури. В обидві пробірки вносять по 3 мл 1 % розчину крохмалю.

лю. Вміст пробірок перемішують і ставлять у водяну баню на 10 хв за температури 37 °С. Вміст кожної пробірки розділяють навпіл. З однією половиною двох пробірок проводять якісну реакцію на крохмаль, додаючи кілька крапель розчину Йоду. З другою половиною вмісту обох пробірок проводять якісну реакцію на мальтозу (глюкозу) з реактивом Фелінга.

Робота 9. Специфічність дії амілази слини

Специфічність дії – одна із важливих властивостей ферментів. Кожний фермент діє на певний субстрат або групу речовин, подібних за структурою. Основою специфічності взаємодії ферментів і субстратів є компліментарність структури активного центру (активних центрів) ферменту і субстрату (субстратів). Це сприяє утворенню фермент-субстратного комплексу і здійсненню каталітичного процесу.

Розрізняють групову (абсолютну і відносну) та індивідуальну (абсолютну і стереохімічну) специфічність ферментів. Прикладом абсолютної групової специфічності може бути дія пепсину на розщеплення білків різного походження і будови молекул. Відносною груповою специфічністю характеризуються лужна і кисла фосфатази, які каталізують розщеплення моноестерів ортофосфорної кислоти за різних реакцій середовища (лужних і кислих). Прикладом абсолютної специфічності може бути дія уреази, яка здатна гідролітично розщеплювати лише сечовину. Прикладом стереохімічної специфічності є дія фумаратгідратази, що здатна здійснювати каталіз приєднання води до молекул фумарової кислоти і не може цього робити для її стереоізомеру – малеїнової кислоти.

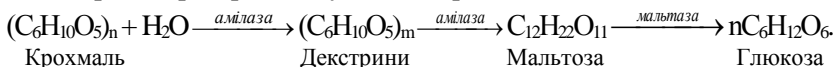
Специфічність каталітичної дії амілази проявляється на основі здатності каталізувати гідролітичне розщеплення крохмалю і не впливати на гідроліз інших вуглеводів, зокрема сахарози.

Хід роботи. В одну пробірку вносять 1 мл розчину крохмалю, у другу – 1 мл розчину сахарози. В обидві пробірки додають по 1 мл розчину розбавленої слини. Вміст пробірок перемішують і ставлять у водяну баню за температури 37 °С на 10 хв. Після цього у пробірки додають по 1 мл реактиву Фелінга і нагрівають.

У першій пробірці під впливом амілази слини відбувається розщеплення крохмалю до декстринів і мальтози (частково і глюкози), у другій таке розщеплення не проходить, оскільки в слині нема

сахарази, ферменту, який здатний гідролітично розщеплювати сахарозу, тому після додавання реактиву Фелінга в першу пробірку і нагрівання суміші випадає цегляно-червоний або коричневий осад оксиду купруму (I), у другій пробірці реактив Фелінга залишається без змін (синього кольору).

У першій пробірці відбуваються реакції:



Робота 10. Вплив реакції середовища на активність ферментів

Кожний фермент проявляє максимальну для нього каталітичну дію за певного значення рН, що називається рН-оптимумом. Так, для пепсину рН – оптимум становить 1,5–2,5; катепсину – 4,5–5,0; карбоксилази – 4,8; трипсину – 7,8–9,5. Білки – амфотерні електроліти, рН впливає на ступінь іонізації функціональних груп молекули ферменту, що безпосередньо діє на зв'язок апоферменту (білкової частини) з кофактором (коферментом, простетичною групою, активатором).

У багатьох випадках оптимум рН для дії ферменту відповідає ізоелектричній точці даного ферментативного білка.

Хід роботи. У три пробірки наливають по 1–1,5 мл буферних розчинів з рН 2; 6,8 і 9. Потім у кожну пробірку вносять по 1–1,5 мл 1 % розчину пепсину у 0,2 % розчині хлоридної кислоти та по невеличкому шматочку фібрину. Пробірки ставлять у водяну баню за температури 38 °С на 30 хв. Спостерігають за розчиненням фібрину в різних пробірках.

Фібрин під впливом пепсину гідролізується до проміжних і кінцевих продуктів гідролізу:

Фібрин → Альбумози → Пептози → Поліпептиди → Дипептиди → Амінокислоти.

Ступінь розчинності одержаних продуктів збільшується із поглибленням гідролітичного розщеплення.

Робота 11. Вплив активаторів та інгібіторів на активність ферментів

На активність ферментів впливають різні речовини: одні з них підвищують її, інші – понижують і навіть припиняють. Перші речовини називають *активаторами*, другі – *інгібіторами*, або паралізаторами.

Розрізняють специфічні і неспецифічні активатори та інгібітори. Прикладом специфічного активатора для пепсину може бути хлоридна кислота, для трипсину – ентерокиназа. Під їх впливом від молекули попередника (пепсиногену і трипсиногену) відщеплюється пептид, відкривається активний центр і формується молекула ферменту. Відщеплені пептиди слід розглядати як специфічні інгібітори. Типовим специфічним активатором для підшлункової ліпази є жовчні кислоти. Інгібітором для пепсину є антипепсин. До неспецифічних активаторів належать різноманітні неорганічні катіони (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}), рідше – аніони (Cl^-). До неспецифічних інгібіторів належать отрути, іони важких металів, алкалоїдні реактиви тощо. Інгібітори взаємодіють з активними центрами молекул ферментів, інактивуюють їх, при цьому фермент не може взаємодіяти з субстратом.

Розрізняють *зворотні* і *незворотні* інгібітори. Зворотні інгібітори можуть бути конкурентними і неконкурентними. Конкурентне інгібування – взаємодія ферментів зі сполуками, будова яких має споріднену будову з молекулою субстрату. В цьому випадку конкурентний інгібітор зв'язується з активним центром ферменту і не дозволяє йому взаємодіяти із субстратом. Цей процес лежить в основі дії антивітамінів, сульфамідних препаратів, антибіотиків, що взаємодіють з мікроорганізмами. Прикладом незворотнього інгібування є дія фосфорорганічних інгібіторів на активність холінестерази, трипсину, хімотрипсину. Під впливом таких реагентів утворюються стійкі сполуки ферментів та інгібіторів, обумовлені виникненням ковалентних зв'язків із функціональними групами активних центрів ферменту.

Хід роботи. У три пробірки вносять по 2 мл розчину розбавленої в 10 разів слини. У першу пробірку додають 1 краплю 1 % розчину хлориду натрію, у другу – 1 краплю 1 % розчину сульфату купруму, у третю – 1 краплю води. У три пробірки вносять по 1 мл розчину слини. Вміст пробірок перемішують і ставлять у водяну баню за температури 37 °С на 5 хв. Після водяної бані проводять реакцію на крохмаль (додають у кожен пробірку по 3 краплі розчину Йоду в йодиді калію).

Робота 12. Визначення активності амілази за методом Каравея

За одиницю активності будь-якого ферменту прийнята така його кількість, яка каталізує перетворення одного мікромоля субстрату за хвилину за оптимальних умов (температур, рН, концентрації субстрату). Її краще всього визначати за вимірюванням початкової швидкості ферментативної реакції (досягають такої концентрації субстрату, яка буде достатня для насичення ферменту). Концентрація ферменту виражається в одиницях активності на 1 мл. *Молекулярна* активність ферменту визначає кількість молекул субстрату, що перетворюються за 1 хв однією молекулою ферменту за оптимальної концентрації субстрату. *Питома* активність ферменту в розчинах виражається в одиницях активності ферменту на 1 мг білка.

У клінічних дослідженнях біологічних рідин (крові, сироватки, лімфи, ліквору, травних соків, сечі тощо) активність ферментів виражається у мкмольх зруйнованого субстрату в перерахунку на 1 мл за час інкубації протягом 1 г за температури +37 °С.

Амілаза – фермент, що гідролізує полісахариди (крохмаль, глікоген та інші продукти, що містять три і більше залишків глюкози) до декстринів та мальтози.

Активність ферменту зростає у разі захворювань підшлункової залози та стресів різного походження.

Хід роботи. У пробірку вносять 1 мл 0,04 % розчину крохмалю у фосфатному буферному розчині (рН 7,2–7,4) і прогрівають 5 хв у водяній бані (+37 °С). Після цього додають 0,2 мл негомолізованої сироватки (сечі або дуоденального вмісту) і знову поміщають у водяну баню рівно на 5 хв. Контрольну пробу проводять так само, як і досліду, тільки замість сироватки вносять 0,2 мл фізіологічного розчину. Потім у всі пробірки доливають по 1 мл 0,01 н розчину Йоду та по 5 мл дистильованої води, перемішують і колориметрують у кюветі із шаром 1 см проти дистильованої води за довжини хвилі 630–690 нм (червоний світлофільтр).

Активність амілази визначають за формулою:

$$X = \frac{E_{\text{контр}} - E_{\text{досл}}}{E_{\text{контр}}} \times 0,4 \times 50 \times 12,$$

де X – активність амілази, г крохмалю/л × год; $E_{\text{контр}}$ – екстинція контрольної проби; $E_{\text{досл}}$ – екстинція дослідної проби; 0,4 – кількість крохмалю, внесеного у проби; 50 – коефіцієнт перерахунку на кількість крохмалю, гідролізованого 1 л біологічної рідини, г; 12 – коефіцієнт перерахунку з 5 хв на 60 хв.

Контрольні питання

1. Дати визначення терміну "ферменти" або "ензими". 2. Яка біологічна роль ферментів? 3. Перерахуйте загальні властивості ферментів. 4. Коротко охарактеризуйте будову молекул ферментів. 5. На чому базується класифікація і номенклатура ферментів? 6. Назвіть шість класів ферментів і поясніть, які типи реакцій каталізують представники кожного класу. 7. Взаємозв'язок між ферментами і вітамінами. 8. Як використовуються препарати ферментів у ветеринарній медицині, зоотехнії, промисловості?

8. ГОРМОНИ

Гормони (грец. *hormao* – приводити в рух, збуджувати) – біологічноактивні речовини, які мають регуляторну дію на обмін речовин. Гормони виробляються у залозах внутрішньої секреції і виділяються безпосередньо у кров, лімфу або ліквор. Вплив гормонів на обмін речовин проявляється різними шляхами. Вони можуть змінювати швидкість ферментативних реакцій, впливати на біосинтез білків-ферментів, регулювати проникність клітинних структур тощо.

Час життя гормонів невеликий: від декількох хвилин до декількох днів (тиреодні гормони). Час, за який гормони викликають певну біологічну чи фізіологічну відповідь, також різний. Дія гормонів проявляється за дуже незначних концентрацій (10^{-6} – 10^{-12} моль/л). Гормони здебільшого не мають видової специфічності. До гормонів місцевої дії належать гормони шлунково-кишкового тракту, простагландини, лейкотрієни і тромбосани, серотонін та гістамін. Діяльність залоз внутрішньої секреції контролюється центральною нервовою системою.

За хімічною природою гормони поділяють на такі групи: білково-пептидні (прості білки, складні білки, пептиди), стероїди та похідні амінокислот. *Гормоноїди* (простагландини, лейкотрієни і тромбосани) – речовини, які є похідними ненасичених кислот, що мають скелет із 20 атомів Карбону. За характером дії гормони поділяють на *пускові* (гормони гіпоталамуса) і *гормони-виконавці*. За морфологічною класифікацією гормони поділяють залежно від місця їх синтезу, наприклад, гормони гіпофіза, підшлункової залози, наднирників, статевих залоз тощо. За біологічними функціями гормони поділяють на такі групи: гормони, що регулюють обмін вуглеводів, жирів, білків (інсулін, глюкагон, глюкокортикоїди, адреналін); гормони, що регулюють водно-сольовий обмін (альдостерон, вазопресин); гормони, що регулюють обмін кальцію і фосфатів (паратгормон, кальцитонін); гормони, що відповідають за ре-

продуктивну функцію (андрогени, естрогени, прогестерон, гонадотропні гормони, пролактин); гормони, що регулюють функції периферичних ендокринних залоз (гормони гіпоталамуса, тропні гормони гіпофіза).

У клініці часто трапляються гормональні порушення – *gino-* і *гіперфункції* залоз внутрішньої секреції.

Робота 1. Осадження інсуліну сульфосаліциловою кислотою

Інсулін – гормон підшлункової залози, який, в основному, регулює обмін вуглеводів. За хімічною будовою – це білок, до складу якого входять залишки 51 амінокислоти. У разі нестачі або відсутності в організмі інсуліну виникає цукровий діабет. Причиною можуть бути токсикози, інфекції, панкреатити, пухлини гіпофіза тощо. При цьому настає загальна слабкість, схуднення, гіперглікемія, глюкозурія, поліурія (добова кількість сечі зростає у декілька раз), кома і загибель організму.

Хід роботи. У пробірку наливають 1 мл розчину інсуліну і додають 3–5 крапель 20 % розчину сульфосаліцилової кислоти. За наявності в розчині білків випадає осад.

Робота 2. Біуретова реакція з гормонами білкової і поліпептидної природи

Усі гормони білкової природи здатні давати якісні реакції на білки (див. роботу 3 «Білки»).

Хід роботи. У пробірку вносять 5 крапель розчину відповідного гормону (АКТГ, пролактину, інсуліну, вазопресину і т.д.), додають 5 крапель 5 % розчину гідроксиду натрію та 1 краплю 1 % розчину сульфату купруму. Виникає фіолетове забарвлення, що свідчить про наявність білка.

Робота 3. Виявлення 17-кетостероїдів

17-кетостероїди належать до метаболітів гормонів кори наднирників і статевих залоз (глюкокортикоїдів, мінералкортикоїдів, андрогенів та естрогенів). Виділення 17-кетостероїдів із сечею значно збільшується у разі пухлин (аденома, рак наднирників). Рівень екскреції гормону знижується у разі захворювань щитоподібної залози, нирок, печінки (цироз), а також виснаження організму.

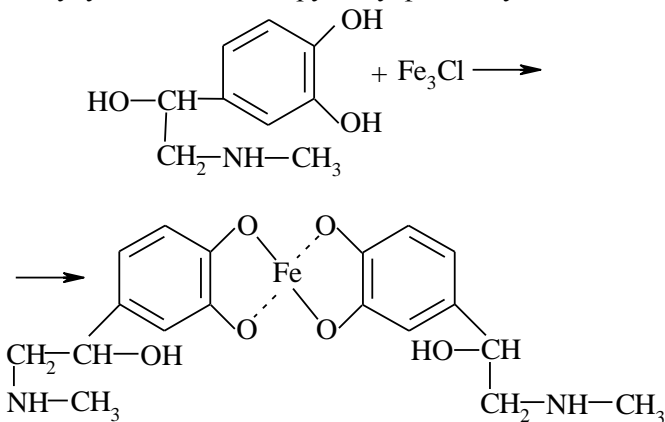
17-кетостероїди, які утворилися у тканинах печінки і нирок із кортикостероїдів, виявляються за допомогою *m*-динітробензену.

Хід роботи. У пробірку наливають 0,5–1,0 мл сечі, додають 5–10 крапель 20 % розчину гідроксиду натрію та 5 крапель 2 % розчину *m*-динітробензену. Перемішують. Через декілька хвилин за наявності 17-кетостероїдів з'являється вишнево-червоне забарвлення.

Робота 4. Якісна реакція на адреналін

Адреналін – гормон, що синтезується у мозковій речовині наднирників. За хімічною природою – похідний діоксибензену. Разом із норадреналіном та простагландинами впливає на обмін вуглеводів, ліпідів, білків та інших сполук. За гіперфункції виникає надлишок гормонів та їх попередників, посилюються реакції обміну, які ними регулюються. Виникає гіпертонія, гіперглікемія, глюкозурія, нефрити, пригнічується мозковий кровообіг, може настати смерть.

Хід роботи. У пробірку вносять 1 мл 0,1 % розчину адреналіну і додають 1 краплю 1 % розчину FeCl₃. З'являється зелене забарвлення. Якщо до одержаного розчину додати краплю лугу, виникає вишнево-червоне забарвлення. Адреналін з іонами феруму (III) утворює сполуку зеленого кольору типу феноляту:



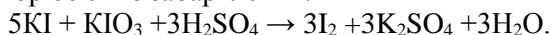
Робота 5. Виявлення Йоду у гідролізаті щитоподібної залози

У щитоподібній залозі синтезуються йодовмісні гормони (тироксин, трийодтиронін, тиреокальцитонін). За *гіпофункції* щитоподібної залози у молодих тварин виникає кретинізм, що зумовлює порушення пропорцій тіла, у дорослих – мікседему. За нестачі Йоду в кормах та воді розвивається ендемічний зоб. *Гіперфункція* виявляється у вигляді базедової хвороби. При цьому у тварин настає швид-

ка втомлюваність, погіршується апетит, знижується продуктивність, пронос. Порушуються всі види обміну, розвивається токсикоз.

Хід роботи. У ступку поміщають декілька грамів тканини щитоподібної залози щойно забитої тварини і добре розтирають. Розтерту масу переносять у колбу для гідролізу, додають 5 мл 10 % розчину сульфатної кислоти та 5 мл дистильованої води. Колбу кип'ятять протягом 10–15 хв. До 1 мл гідролізату (охолодженого) додають 10 % розчин сульфатної кислоти (до кислої реакції середовища на лакмус). Після цього у суміш додають 3 краплі 1 % розчину крохмалю та 5–10 крапель 2 % розчину йодиду калію. Виникає синє забарвлення.

За лужного гідролізу препарату тиреоїдину або тканин щитоподібної залози утворюється йодид калію. Під час дії у кислому середовищі на йодид калію KIO_3 утворюється вільний Йод, який із крохмалем утворює синє забарвлення:



Робота 6. Якісна реакція на фолікулін

У статевих залозах (сім'яниках та яєчниках) синтезуються стероїдні гормони, які відіграють значну роль в обміні речовин, розмноженні та розвитку вторинних статевих ознак. Жіночі статеві гормони синтезуються в яєчниках, плаценті і частково в наднирниках. Чоловічі статеві гормони (*андрогени*) утворюються переважно в сім'яниках, деяка частина – в яєчниках і корі надниркових залоз. Найбільша кількість гормонів міститься у спермі. Ці гормони є похідними циклічного спирту циклопентанпергідрофенантрону.

Статеві гормони добре розчиняються в органічних розчинниках: етері, хлороформі, спирті, олії, погано – у воді.

Реакція на фолікулін проводиться із концентрованою сульфатною кислотою, що зумовлює утворення сполуки солон'яно-жовтого кольору із зеленою флуоресценцією.

Хід роботи. У ділильну лійку наливають 20 мл етанолу і вносять 3 мл масляного розчину фолікуліну. Суміш перемішують, фолікулін екстрагується спиртом. Верхній (спиртовий) шар використовують для досліджень.

У одну пробірку вносять 2 мл спиртового розчину фолікуліну, у другу – 2 мл спирту. Обидві пробірки поміщають у киплячу водяну баню на 5–10 хв для видалення спирту. В обидві пробірки вносять

по 3 мл концентрованої сульфатної кислоти і знову нагрівають у бані. При цьому у пробірці із фолікуліном виникає солом'яно-жовте забарвлення, яке у разі подальшого нагрівання переходить в оранжеве із зеленою флуоресценцією.

Контрольні питання

1. Що таке гормони і гормоніди? Наведіть приклади. 2. Принципи класифікації гормонів. 3. Який механізм дії гормонів? 4. Наведіть приклади використання гормонів із лікувальною метою. 5. Заповніть таблицю, вказавши назву гормону, місце його синтезу та клінічні синдроми порушення діяльності ендокринних залоз.

9. БІОХІМІЯ КРОВІ

Кров – біологічна рідина, яка забезпечує органи і тканини організму поживними речовинами і киснем. Кров в організмі виконує ряд життєво важливих функцій: живильну, дихальну, видільну, захисну, регуляторну, підтримку водної рівноваги, механічну тощо. Кількість крові становить 8–15 % маси тіла.

Кров складається з рідкої частини (плазми) і формених елементів (еритроцитів, лейкоцитів і тромбоцитів). Плазма крові, позбавлена білка фібриногену, називається *сироваткою*.

Кров має слаболужну реакцію середовища (рН 7,2–7,9 залежно від виду тварин). рН крові змінюється у дуже вузьких межах. В ембріональний період реакція середовища крові слабокисла, у перші дні постнатального життя – нейтральна. Сталість рН крові регулюється буферними системами крові, основними з яких є гемоглобінова і оксигемоглобінова (81 % загальної маси), білкова (10 %), гідрокарбонатна (7 %), фосфатна (1 %) та кислотна (близько 1 %). Густина крові – 1,05–1,06, осмотичний тиск – 0,68–0,74 кПа. Поверхневий натяг сироватки крові – в межах 65 мН/м. Він збільшується у разі отруєнь, а за захворювань печінки, нирок та інших органів – зменшується.

Кров характеризується сталістю хімічного складу. Плазма крові, яка становить 55–60 % загального об'єму крові, на 90 % складається із води. Сухий залишок складають органічні (9 %) та мінеральні (1 %) речовини. Основою органічних речовин є білки (6–8 %), які поділяють на три групи: альбуміни, глобуліни і фібриноген. Безазотисті речовини плазми і сироватки крові представлені вуглеводами (в основному глюкоза), ліпідами, ацетоновими тілами, безазотистими вітамінами та мінеральними речовинами.

Згортання крові – захисна реакція організму, що запобігає крововтратам за пошкоджень кровоносних судин. У процесі згортання крові беруть участь плазмові (I–XIII) і тромбоцитарні фактори (1–4).

Робота 1. Визначення каталазної активності крові за методом Баха і Зубкової

Каталаза бере участь у розкладі пероксиду гідрогену, що утворюється у процесі біологічного окиснення у тканинах і потребує знешкодження.

Активність каталази позначають через каталазне число. *Каталазним числом* називається кількість пероксиду гідрогену (мг), що руйнується одним мікролітром (0,001 мл) крові. У нормі воно складає від 12 до 20. Принцип методу визначення каталазного числа полягає у визначенні кількості пероксиду гідрогену, що може бути розщепленим ферментом за 30 хв. Цю кількість визначають за різницею між вмістом його у контрольній і дослідній пробах.

Хід роботи. У мірну колбу на 50 мл вносять приблизно 20 мл дистильованої води і 0,1 мл крові мікропіпеткою, яку промивають від залишків крові декілька разів водою в колбі. Потім доливають у мірну колбу до мітки дистильованої води і залишають на 30 хв. У дві пронумеровані конічні колби наливають по 10 мл дистильованої води і вносять по 1 мл розчину крові, перемішують. Одну колбу (контрольну) кип'ятять протягом 3 хв для зруйнування ферменту каталази. Вміст колби охолоджують. В обидві колби вносять точно по 2 мл 1 % розчину пероксиду кисню і залишають за кімнатної температури на 30 хв. Після охолодження у кожну колбу додають по 5 мл 10 % розчину сульфатної кислоти і відтитровують вміст кожної колби 0,1 н розчином перманганату калію до стійкої появи рожевого забарвлення, що не зникає впродовж 30 с.

Записують результати титрування і проводять розрахунки згідно з формулою:

$$X = 17 \times 0,1 \times (A_k - A_d),$$

де X – каталазне число, мг H_2O_2 на 1 мл крові; 17 – грам-еквівалент пероксиду гідрогену; 0,1 – нормальність розчину пероксиду гідрогену; A_k – кількість 0,1 н розчину перманганату калію, що витратили на титрування контрольної проби, мл; A_d – кількість 0,1 н розчину перманганату калію, що витратили на титрування дослідної проби, мл.

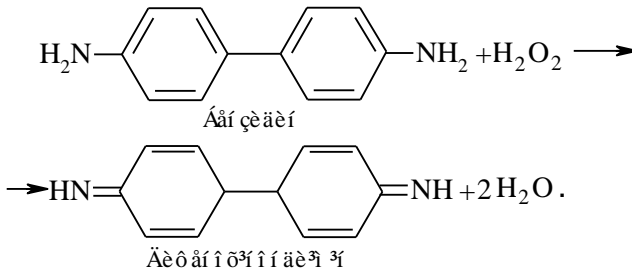
Робота 2. Якісні реакції на кров

У лабораторній практиці виникає необхідність встановити наявність крові у деяких біологічних рідинах. Для цього використовуються гваякова і бензидинова проби. Гемоглобін, який міститься у крові, має здатність прискорювати розклад пероксиду гідрогену. Атомарний кисень, утворений при цьому, здатний окиснювати гваякову смолу чи бензидин, змінюючи забарвлення. Чутливість гваякової проби дозволяє відкрити наявність крові під час розбавлення її у співвідношенні 1:10000, а бензидинової – до 1:200000. Гваякову пробу проводять не тільки зі свіжою кров'ю, але із прокип'яченим розчином крові, із сухими кров'яними плямами.

Бензидинова проба

Хід роботи. У пробірку вміщують 1 мл сильнорозведеної крові. Додають 1 мл 5 % розчину бензидину у льодяній ацетатній кислоті та 2 мл 3 % розчину пероксиду гідрогену. Спостерігають появу синього або зеленого забарвлення.

Під впливом гемоглобіну, що проявляє пероксидазні властивості, бензидин окиснюється пероксидом гідрогену в дифенохінондимін:



Дифенохінондимін вступає в реакцію конденсації з молекулою неокисненого бензидину, утворює бензидинову синьку.

Гваякова проба

Хід роботи. У пробірку вносять 1 краплю дефібрированої крові, додають 5 мл дистильованої води і збовтують. Приливають 1 мл 1 % спиртового розчину гваякової смоли і потім краплю 3 % розчину пероксиду гідрогену. Спостерігають появу синього забарвлення, що утворюється від окиснення гваякової смоли.

Робота 3. Визначення вмісту Кальцію у сироватці крові за де Ваардом

Гіперкальціємія (збільшення вмісту кальцію у сироватці крові) виявляється за гіперфункції прищитоподібної залози. При цьому відбувається надлишкове виведення фосфатів із сечею, що спричинює їх надходження із тканин, головним чином кісткової, у кров. У кров надходять, в основному, вторинні фосфати, зв'язані з Кальцієм та Манганом, а із сечею виводяться первинні, внаслідок чого у крові збільшується кількість Кальцію та Мангану. *Гіпокальціємія* – явище, за якого відбувається відкладання солей цих елементів у кістковій тканині, а також воно спостерігається за захворювань нирок та рахіту.

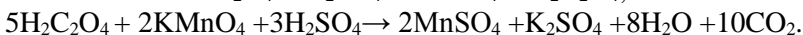
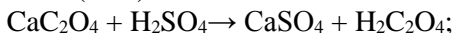
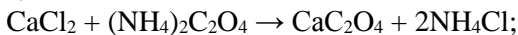
Вміст Кальцію у сироватці крові залежить від виду, віку та статі тварин. Так, у ссавців вміст Кальцію становить 2,50–3,24 мкмоль/л (10–13 мг%), у птиці – 3,24–4,99 мкмоль/л (13–20 мг%).

Принцип методу визначення Кальцію полягає у тому, що цей елемент у вигляді солі щавлевої кислоти (оксалату кальцію) переводиться в осад. Осад оксалату кальцію легко розчиняється у мінеральних кислотах, але практично не розчинний у слаболужному середовищі, тому отриманий раніше осад оксалату кальцію відмивають від надлишку оксалату амонію розведеним розчином аміаку. Відмитий осад солі розчиняють у сульфатній кислоті. Щавлеву кислоту відтитровують 0,01 н розчином перманганату калію у присутності надлишку сульфатної кислоти.

Хід роботи. В одну центрифужну пробірку наливають 2 мл дистильованої води і 2 мл сироватки, у другу – 4 мл дистильованої води. В обидві пробірки приливають по 1 мл 4 % розчину оксалату амонію, злегка струшують і залишають стояти протягом 10 хв. Обидві пробірки (дослідну і контрольну) центрифугують впродовж 8-ми хв. Обережно зливають рідину із пробірок (щоб не порушити осад). Краї пробірок протирають фільтрувальним папером до повного видалення рідини. У дослідній пробірці на дні залишається білий осад. Наливають в обидві пробірки по 4 мл 2 % розчину аміаку, злегка струшують і знову центрифугують (8 хв). Зливають рідину з обох пробірок і ще раз додають по 4 мл 2 % розчину аміаку для повторного промивання осаду від залишків вільної щавлевої кислоти та інших домішок. Пробірки центрифугують, а центрифугат зливають. В обидві пробірки вносять по 2 мл 1 н розчину суль-

фатної кислоти. Осад розмішують скляними паличками, які не виймаються із пробірок до закінчення роботи. Пробірки ставлять у гарячу водяну баню (70–90 °C) на 3 хв. Уміст пробірок титрують 0,01 н розчином перманганату калію до появи рожевого забарвлення, що не зникає протягом хвилини.

Хімізм реакцій такий:



Розрахунки проводять згідно з формулою:

$$X = 0,2 \times (A - B) \times 50,$$

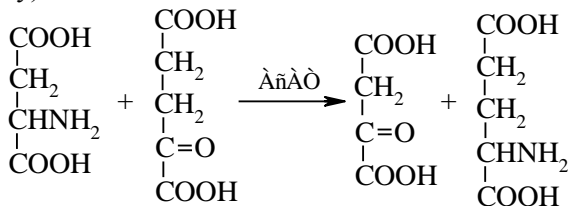
де X – вміст кальцію у сироватці крові, мг%; 0,2 – кількість кальцію, що відповідає 1 мл 0,01 н розчину KMnO_4 , мг; A – кількість 0,01 н розчину KMnO_4 , що витратили на титрування дослідної проби, мл; B – кількість 0,01 н розчину KMnO_4 , що пішла на титрування контрольної проби, мл; 50 – перерахунок вмісту кальцію на 100 мл сироватки крові.

Для переведення вмісту кальцію із мг% у ммоль/л одержаний результат необхідно помножити на коефіцієнт 0,2495.

Робота 4. Визначення активності амінотрансфераз у сироватці крові за Ратман і Френкель

Найбільше активність амінотрансфераз використовують з метою діагностики печінки та міокарда. Виражене підвищення активності цих ферментів виявлено за гангрени м'язів, прогресуючого міозиту, некрозу та травм скелетних м'язів. Максимальне підвищення активності аспартатамінотрансферази (АсАТ) та аланінамінотрансферази (АлАТ) проходить за гострого вірусного гепатиту.

Під час переамінування амінокислот, що проходить під впливом АсАТ та АлАТ, утворюються щавлевооцетатна і піровиноградна кислоти (перша у реакційній суміші перетворюється у піровиноградну кислоту):



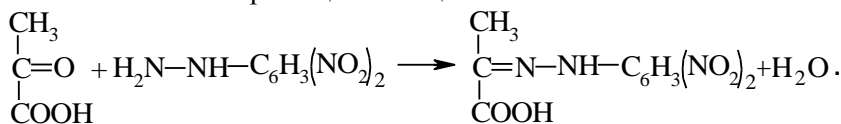
Аспарагінова
кислота

α -Кетоглутарова
кислота

Щавлевооцетатна
кислота

Глутамінова
кислота

У разі додавання розчину 2,4-динітрофенілгідразину ферментативний процес зупиняється і виникають гідрозони піровиноградної кислоти і певною мірою щавлеоцетатної:



Аєї эоді ө аї эеэадагї і

У лужному середовищі вони утворюють забарвлення, інтенсивність якого пропорційна кількості утвореної піровиноградної кислоти.

Хід роботи. У дві пробірки (контрольна та дослідна) вносять реактиви за схемою, наведеною у табл. 19.

Таблиця 19

Біологічний матеріал, реактиви, мл	Контрольна проба, мл	Дослідна проба, мл
1. Сироватка	–	0,1
2. Субстратно-буферна суміш для АлАТ (аланінкетоглутарова) чи АсАТ (аспартаткетоглутарова)	0,5	0,5
Перемішати, поставити у термостат за температури 37 °С на 30 хв		
3. Розчин 2,4-динітрофенілгідразину	0,5	0,5
4. Сироватка	0,1	–
Перемішати, залишити на 20 хв		
5. 0,5 н розчин NaOH	5,0	5,0

Перемішати, через 5 хв фотоколометрувати на ФЕК у кюветі із товщиною шару 1 см за довжини хвилі 500–560 нм (зелений світлофільтр) проти контрольної проби.

Розрахунок активності ферменту у сироватці крові проводять за калібрувальним графіком. Для цього готують калібрувальний розчин натрію піровинограднокислого із концентрацією 110 мкг/мл, що еквівалентно 88 мкг/мл піровиноградної кислоти. Із калібрувального розчину піровинограднокислого натрію готують ряд розведень, як вказано у табл. 20.

Таблиця 20

№ пробірки	1	2	3	4	5
1. Дист. вода, мл	4,4	4,0	3,6	3,2	2,8
2. Калібрувальний розчин піурату натрію, мл	0,4	0,8	1,2	1,6	2,0
3. Вміст піровиноградної кислоти, мкмоль	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25
4. Активність ферменту, мкмоль піровиноградної кислоти на 1 мл сироватки за 1 год	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5

Як розчин для порівняння використовують пробу, яку обробляють як калібрувальну, але замість розчину натрію піровинограднокислого використовують воду. Для побудови калібрувального графіку на осі абсцис відкладають активність ферменту (АсАТ чи АлАТ), на осі ординат – показник екстинції ФЕК.

Робота 5. Титрометричний метод визначення резервної лужності

Лужні резерви крові (*резервна лужність*) – це складові частини буферних систем, що зберігають постійне значення рН. Величину лужних резервів крові виражають кількістю мг на 100 мл крові, що за силою дорівнює дії солей буферних систем крові.

Хід роботи. У конічну колбу об'ємом 100 мл із бюретки вносять 10 мл 0,01 н розчину НСІ і мікропіпеткою вводять 0,2 мл крові. Розмішують. Вміст колби титрують із мікробюретки 0,1 н розчином NaOH до появи помутніння і випадання осаду у вигляді пластівців.

Розрахунки проводять згідно з формулою:

$$X = \frac{(1-A) \times 4 \times 100}{0,2},$$

де X – резервна лужність крові, мг на 100 мл крові; A – кількість 0,1 н розчину NaOH, що витратили на титрування, мл; 0,2 – кількість крові, що взята для дослідження, мл; 4 – кількість NaOH в 1 мл розчину NaOH, мг; 100 – коефіцієнт перерахунку на 100 мл крові.

Робота 6. Визначення вмісту сечової кислоти у сироватці крові

Сечова кислота є одним із кінцевих продуктів обміну окремих гетероциклічних амінокислот (триптофану) та пуринових основ (аденіну та гуаніну), що входять до складу нуклеїнових кислот. У птахів – це основний кінцевий продукт азотистого обміну. Порушення обміну сечової кислоти є наслідком або супроводжує такі захворювання як подагра, артрити, нефропатії, сечокам'яну хворобу, ожиріння, цукровий діабет тощо. Значні кількості солей сечової кислоти (*уратів*) виділяються у разі захворювань, пов'язаних із підвищеним розпадом клітин і тканин, наприклад лейкозів. Накопичення уратів у тканинах може спричинити у них місцеві запалення та дистрофічні зміни.

Хід роботи. У три пробірки (контрольна, калібрувальна та дослідна) вносять реактиви за схемою (табл. 21).

Таблиця 21

Біологічний матеріал, реактиви, мл	Калібрувальна проба, мл	Контрольна проба, мл	Дослідна проба, мл
Розчин 0,05 н H ₂ SO ₄	6,0	6,0	6,0
Сироватка	–	–	0,3
Дистильована вода	–	0,3	–
Калібрувальний розчин сечової кислоти, 0,3 ммоль/л (50,4 мг/л)	0,3	–	–
10 % розчин вольфрамату натрію	0,3	0,3	0,3
Перемішати, через 10–20 хв центрифугують			
Центрифугат	3,0	3,0	3,0
10 % розчин карбонату натрію	1,5	1,5	1,5
Реактив Фоліна	1,0	1,0	1,0

Перемішати, через 30 хв фотоколориметрувати на ФЕК у кюветі із товщиною шару 1 см за довжини хвилі 500–700 нм проти контрольної проби.

Концентрацію сечової кислоти у сироватці крові розраховують за формулою:

$$X = \frac{E_{\text{досл}}}{E_{\text{калібр}}} \times C,$$

де X – концентрація сечової кислоти у сироватці крові, ммоль/л; E_{досл} – екстинція дослідної проби; E_{калібр} – екстинція калібрувальної проби; C – концентрація сечової кислоти у калібрувальній пробі, 0,3 ммоль/л.

Контрольні питання

1. Охарактеризуйте фізико-хімічні властивості крові сільськогосподарських тварин.
2. Наведіть хімічний склад крові, плазми та сироватки крові корови, свині, курки.
3. Напишіть назви і склад буферних систем крові. Ілюструйте механізм їх дії.
4. Дайте характеристику основних функцій крові.
5. Згорання крові, його компоненти і стадії.
6. Які лікарські препарати готують із крові? Як вони застосовуються у ветеринарній практиці?

10. БЮХІМІЯ СЕЧІ

Сеча – водяниста рідина, у коней, мулів та ослів дещо тягуча внаслідок наявності муцину, утворюється в нирках за рахунок фільтрації крові. Із сечею виділяють кінцеві продукти обміну речовин. Під час виділення сечі регулюється сталість внутрішнього середовища організму. Колір сечі – від світло-жовтого до темно-коричневого. Густина – 1,01–1,07 (залежно від виду тварин). Осмотичний тиск становить 0,6–11,3 кПа і може змінюватися за багатьох захворювань, особливо нефритів та циститів. Сеча травоядних тва-

рин має слаболужну реакцію, всеїдних – близьку до нейтральної, м'ясоїдних – слабокислу. Зсув рН у кислу сторону відбувається у разі нефритів, гепатитів, у лужну – циститів. Реакція сечі у молодих тварин є кислішою, ніж у дорослих. Свіжа сеча має специфічний запах: у коня – аміаку, у собак – часнику. Гнильний запах з'являється внаслідок запальних процесів у сечостатевої системі. За пологового парезу й ацетонемії сеча набуває запаху ацетону.

Поліурія (зростання кількості сечі) характерна для багатьох захворювань, зокрема, діабету, гнійних запальних процесів. Зниження добової кількості сечі (*олігурія*) спостерігається за лихоманки, проносів, гострих нефритів, серцевої недостатності тощо. Повна зупинка виділення сечі (*анурія*) буває у разі отруєння важкими металами, сильних стресів, сечокам'яної хвороби.

До складу сечі входить понад 200 речовин. Іноді у ній з'являються нетипові речовини, що обумовлено складом корму та води, вживанням твариною ліків. Сеча складається з води (96 %) та сухого залишку (4 %). До складу сухого залишку входять органічні (2,5 %) та неорганічні (1,5 %) речовини. Неорганічні компоненти сечі представлені солями Натрію, Калію, Кальцію, Магнію, амонію та інших катіонів із хлоридною, фосфатною, сульфатною та іншими мінеральними кислотами. Мінеральний склад сечі змінюється у разі патології. Так, вміст Кальцію в сечі збільшується за остеомалією та аденоми прищитоподібної залози, Феруму – фасціольозу, амонійних солей – за діабету. Органічні складові компоненти сечі представлені нітрогенумісними та безазотистими сполуками. Нітрогенумісні речовини – продукти кінцевого обміну білків та нуклеїнових кислот. Основою їх у багатьох тварин є сечовина (савці) та сечова кислота (птахи та рептилії). До цих сполук відносять алантоїн, гіпурову та фенацетурову кислоти, індикан, пігменти (урохром, урохромоген, уроеритрин, уробіліноген), а також нітрогенумісні вітаміни, гормони, ферменти тощо.

Безазотисті речовини сечі – щавлева, глюкуронова, янтарна кислоти та їх похідні, феноли та естери, ароматичні гідроксикислоти, безазотисті вітаміни та ін. Їх вміст не перевищує часток відсотка. До складу сечі входить знешкоджений фенол у вигляді фенолсульфатної та крезолсульфатної кислот.

У разі патологічних змін в організмі у сечі з'являються сполуки, яких зазвичай немає у здорових тварин. Для діагностики

винятково важливе значення становить виявлення у сечі білків, вуглеводів, ацетонових тіл, пігментів. Поява у сечі білка називається *протеїнурією*, поява гемоглобіну – *гемоглобінурією*. *Кетонурія* (*ацетонурія*) виникає за підвищеного вмісту в сечі кетонових тіл (ацетону, ацетоацетатної та β -оксимаєляної кислоти). *Білірубінурія* – підвищення виділення білірубину з сечею. До патологічних складових сечі належать сечові камені й пісок, які складаються з оксалатів, фосфатів та карбонатів кальцію та магнію, а також уратів.

Фізико-хімічні дослідження сечі дають інформацію про загальний стан організму, роботу його окремих систем та органів.

Робота 1. Фізична характеристика сечі

Визначення густини сечі

Густина сечі залежить від концентрації розчинених речовин і пов'язана із кількістю утвореної сечі. Невідповідність між густиною та кількістю сечі встановлена у разі цукрового діабету, що є наслідком порушення зворотної реабсорбції води в ниркових каналах через нестачу антидіуретичного гормону. Олігонурія, що супроводжує гострий нефрит, проявляється високою густиною сечі.

Для визначення питомої густини сечі користуються спеціальними ареометрами, які називаються *урометрами* (рис. 14). Питома вага у нормі складає: у людей – 1,015–1,025; у коней – 1,025–1,055; у ВРХ – 1,025–1,050; у овець – 1,015–1,070; у свиней – 1,018–1,022.

Хід роботи. У циліндр наливають сечу і поміщають у нього урометр (рис. 14). Проводять підрахунок, беручи ту лінію на шкалі урометра, яка відповідає нижньому меніску.

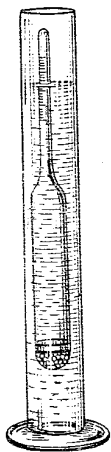


Рис. 14. Урометр.

Дослідження прозорості сечі

Нормальна сеча являє собою прозору рідину. Проте за недовгочасного стояння (через 10–15 хв) у ній часто з'являється ледве помітна каламуть у вигляді хмарки, що складається, в основному, з муцину, слизу, епітеліальних клітин, інколи з домішками кристалів, які не мають ніякого діагностичного значення. Помутніння сечі зумовлюється також кристаликами щавелевої кислоти (оксалатів) та сечової (уратів). У сечі з лужною реакцією випадають

в осад фосфати кальцію і магнію. Лужний характер сечі, що відстоюється, спричиняється розкладом сечовини до аміаку ферментами мікрофлори. Сеча стає каламутною у разі запальних процесів сечовивідних протоків, коли в сечу потрапляють гній, білок, клітини крові тощо.

Для діагностики деяких захворювань сечу підкислюють і нагрівають. Якщо після цього муть зникає, це означає, що в ній містилися фосфати кальцію та магнію й урати. Якщо муть залишається, це вірогідно спричинено наявністю гною, епітелію та інших домішок.

Характеристику прозорості сечі дають у висловах: прозора, каламутнувата, каламутна, молочно-каламутна.

Дослідження кольору сечі

Колір сечі зумовлений наявністю в ній пігментів урохрому, уробіліну, уроеритрину тощо і змінюється від блідо-жовтого до насичено червоно-жовтого кольору. Інтенсивність забарвлення відповідає густині сечі. Сеча з високою густиною темніша, з низькою – світліша. Винятком є діабет, за якого сеча, незважаючи на дуже високу густину, є блідою. Різні речовини ендо- або екзогенного походження можуть надавати сечі найрізноманітнішого забарвлення. Так, червоного або рожево-червоного кольору сеча набуває за *гематурії*, *гемоглобінурії*. Висока концентрація уробіліну і білірубіну може надавати сечі бурого або червоно-бурого відтінку. Зелений або синій колір сечі спостерігається за умов гниття білків у кишечнику, яке зумовлює утворення індоксилірчаних кислот, що розкладаються до індиго.

Колір сечі визначають у циліндрі з безбарвного прозорого скла у відбитому світлі на білому фоні.

Дослідження запаху сечі

Свіжовипущена сеча має специфічний запах, обумовлений, головним чином, наявністю в ній летких кислот. Для кожного виду тварин характерний свій специфічний запах: у коней – запах аміаку, у великої рогатої худоби – затхлий, у свиней – гострий неприємний. Сеча, що зберігається за відсутності консервантів, зазнає впливу мікроорганізмів, проходить розклад сечовини з утворенням аміаку. За наявності великої кількості ацетонових тіл сеча набуває "плодового" запаху. Сеча має неприємний запах аміаку, коли загниває.

Визначення реакції сечі

Активна реакція сечі в нормі залежить від типу годівлі тварин. За посиленого живлення білковою їжею (м'ясом) сеча набуває більш кислої реакції, за вживання переважно рослинної їжі – більш лужної. Кисла реакція сечі зумовлюється, головним чином, однозаміщеними фосфатами, переважно NaH_2PO_4 і KH_2PO_4 . У лужній сечі переважають двозаміщені фосфати або бікарбонати калію чи натрію. Реакція сечі може змінюватись і за деяких патологічних станів. Різнокисла реакція сечі спостерігається у разі діабету та голодування (внаслідок накопичення у сечі ацетонових тіл), а також за ниркової недостатності внаслідок порушення утворення в нирках аміаку, який нейтралізує кислі складові компоненти сечі.

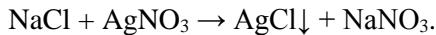
Хід роботи. Реакцію сечі визначають якісно за допомогою синього і червоного лакмусового папірця. З цією метою краплю дослідної сечі наносять на лакмусовий папірець. Для визначення рН сечі у клініці користуються колориметричним і електрометричним методами визначення; рН сечі клінічно здорових людей становить 5,2–6,8; великої рогатої худоби – 7,7–8,7; коней – 7,2–8,8; свиней – 6,5–7,8.

Робота 2. Якісне визначення хлоридів у сечі

Серед неорганічних речовин у сечі найбільше хлориду натрію. У разі вживання кормів, які містять мало кухонної солі, концентрація NaCl у сечі значно зменшується. Виявлення хлоридів у сечі ґрунтується на одержанні осаду хлориду аргентуму за дії нітрату аргентуму.

Хід роботи. У пробірку вносять 2 мл дослідної сечі, додають 2–5 крапель 1 % розчину нітрату аргентуму і дві краплі нітратної кислоти. Випадає білий осад хлориду аргентуму.

Реакція проходить за схемою:

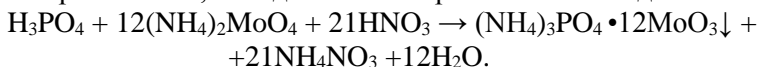


Робота 3. Якісне визначення фосфатів у сечі

Фосфор виділяється із сечею переважно у вигляді однозаміщених фосфатів калію чи натрію (KH_2PO_4 , NaH_2PO_4). На кількість виділених фосфатів впливає рН крові. За *ацидозу* (підвищення кислотності) двозаміщені фосфати, наприклад Na_2HPO_4 , реагують із кислотами і перетворюються в однозаміщені (NaH_2PO_4). За *алкалозу* (підвищення лужності) однозаміщені фосфати реагують з основами

і перетворюються у двозаміщені, які також виділяються із сечею. Таким чином, в обох випадках вміст фосфатів у сечі збільшується.

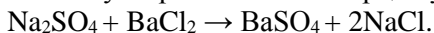
Хід роботи. У пробірку наливають 20–30 крапель молібденово-кислого реактиву і нагрівають майже до кипіння. Потім додають декілька крапель сечі, випадає жовтий кристалічний осад солі:



Робота 4. Якісне визначення сульфатів у сечі

Нейтральний Сульфур знаходиться в сечі у вигляді цистину, таурину та інших сполук. Сульфур виділяється із сечею у вигляді сульфатів і парних сполук. Концентрація індоксилсірчаної і ска-токсилсірчаної кислот у сечі незначна. Вона зростає у разі закрєпів, атоній передшлунків, гнильних процесів у травному каналі.

Хід роботи. До 20 крапель сечі додають 5 крапель 10 % розчину хлоридної кислоти і краплями 5 % розчин хлориду барію до повного осадження. Білий осад сульфату барію фільтрують. У фільтраті залишаються розчинні у воді барієві солі етеросульфатних кислот – сполуки сульфатної кислоти із фенолом ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OSO}_3\text{H}$), індексиллом та ін. Для їх виявлення фільтрат поміщають у киплячу водяну баню і нагрівають протягом 50 хв. Знову з'являється каламуть, що обумовлено звільненням сульфатної кислоти у результаті гідролізу етеросульфатних кислот з утворенням нової порції сульфату барію:



Робота 5. Відкриття цукру у сечі

У сечі в нормі глюкоза практично відсутня. *Глюкозурія* (з'явлення цукру в сечі) обумовлена гіперглікемією, або порушенням фільтруючої діяльності нирок. Стійка гіперглікемія спостерігається у разі порушень гормональної функції підшлункової залози (панкреатичний діабет).

Проба Троммера

Під час нагрівання дослідної рідини з лужним розчином сульфату купруму за наявності глюкози утворюється червоний осад купруму. Реакція обумовлена окисненням глюкози за альдегідною групою і відновленням купруму.

Хід роботи. У пробірку наливають 8–10 мл сечі, 2–3 мл гідроксиду натрію і розчин сульфату купруму до появи блакитного осаду гідроксиду купруму. Нагрівають до кипіння. За наявності глюкози

випадає жовтий осад гідроксиду купруму або червоний осад оксиду купруму.

Проба Фелінга

Хід роботи. До 2 мл 7 % розчину сульфату купруму додають 2 мл лужного розчину сегнетової солі. До одержаного реактиву Фелінга додають 3–4 мл дослідної сечі, рідину перемішують і нагрівають до кипіння. За наявності глюкози випадає жовтий осад гідроксиду купруму (I) або червоний осад оксиду купруму.

Робота 6. Якісне визначення білка у сечі сульфосаліциловою кислотою

Білок з'являється в сечі переважно за рахунок білків плазми крові або клітин сечовивідних шляхів. Запальні процеси нирок (нефрити), деякі форми гіпертонії супроводжуються підвищенням проникності базальних мембран клубочків нефрону, що призводить до посилення фільтрації білків і появи їх у сечі. При цьому сеча стає каламутною. Поява білка в сечі (*протеїнурія*) за походженням може бути нирковою і позанирковою. Ниркові протеїнурії зумовлені органічними пошкодженнями нефронів, внаслідок чого білки плазми крові (альбуміни і глобуліни) потрапляють у сечу. Позаниркові протеїнурії пов'язані з ураженням сечових шляхів або передміхурової залози. За патологічних станів у сечу потрапляє ряд ферментів, які за хімічною природою є білками. Для якісного визначення білка в сечі використовують реакції осадження.

Хід роботи. У пробірку наливають 1–2 мл сечі, додають 3–5 крапель 20 % розчину сульфосаліцилової кислоти. За наявності білка у сечі з'являється осад або помутніння.

Робота 7. Реакції на уробілін і уробіліноген

Уробілін завжди знаходиться у незначній кількості у сечі. У разі гемолітичної та печінкової жовтяниці вміст його значно зростає, що пов'язано із пригніченням функції печінки розкладати уробіліноген, який потрапляє із кишечника. Призупинення надходження жовчі в кишечник внаслідок закупорки їх жовчовидільних шляхів спричинює зникнення із сечі уробіліногену та появу в ній жовчного пігменту – *білірубіну*.

Хід роботи. У пробірку наливають 8–10 мл дослідної сечі та додають декілька крапель гідроксиду амонію до появи запаху аміаку. Уробілін при цьому утворює амонійну сіль, яка розчиняється у воді.

Робота 8. Реакція на жовчні кислоти у сечі

Жовчні кислоти – кінцеві продукти обміну холестерину, який виводиться з організму в основному у вигляді жовчних кислот. За хімічною природою вони є похідними холанової кислоти ($C_{23}H_{39}COOH$), до циклічної структури якої приєднані одна, дві або три гідроксильних групи. У нормі у сечі жовчні кислоти практично відсутні, проте певна кількість їх з'являється у разі жовтяниці та гострих панкреатитів. Жовчні кислоти можуть бути виявлені якісно, а також кількісно за допомогою проб на зниження поверхневого натягу.

Хід роботи. У чашку Петрі наливають 50 мл сечі та додають 1–2 краплі фенолфталеїну. Нейтралізують сечу розчином гідролізу натрію до появи рожевого забарвлення. Насипають на поверхню сечі невелику кількість сірки і стежать за її опусканням на дно чашки.

За наявності жовчних кислот у сечі сірка осідає на дно – жовчні кислоти знижують поверхневий натяг. Чим швидше осідає сірка, тим більше міститься жовчних кислот. У разі відсутності жовчних кислот остання лишається на поверхні сечі. Напишіть формули відомих вам жовчних кислот.

Робота 9. Відкриття ацетонових тіл у сечі

Наявність кетонових тіл у сечі (*кетонурія*) чи ацетонових (*ацетонурія*) спостерігається у разі порушення вуглеводного та жирового обміну, цукрового діабету, голодання, зменшення кількості вуглеводів у раціоні. До цих речовин відносять недоокиснені продукти обміну жирів; β -оксимаєляна, ацетоацетатна кислоти та ацетон.

Хід роботи. У пробірку наливають 2 мл сечі, 0,5 мл 10 % розчину нітропрусиду натрію та 0,5 мл 10 % розчину гідроксиду натрію. За наявності ацетонових тіл виникає стійке червоне забарвлення, що переходить у вишневе під час додавання 0,5 мл концентрованої ацетатної кислоти.

Робота 10. Визначення вмісту сечовини

Сечовина – основний кінцевий продукт азотистого обміну у ссавців. Вона складає до 90 % усіх азотовмісних речовин сечі. Утворення сечовини відбувається в орнітиновому циклі Кребса.

Збільшення кількості сечовини у сечі спостерігається у разі надмірного надходження білків з кормом, а також всіх станів, пов'язаних із підвищеним розпадом власних білків, зменшення – за

низького надходження білків з кормом, захворювань нирок (погіршене виведення) та печінки (порушення синтезу), ацидозів (недостатній синтез внаслідок утворення значних кількостей амонійних солей).

Хід роботи. У три пробірки вносять по 3 мл 2 % розчину діацетилмонооксиму. У першу пробірку (дослідну) додають 0,03 мл розведеної у 10 разів сечі, у другу (контрольну) – 0,03 мл фізіологічного розчину, у третю (калібрувальну) – 0,03 мл калібрувального розчину сечовини із концентрацією 8,32 ммоль/л (0,5 мг/мл). У всі пробірки додають по 3 мл 2 % розчину тіосемікарбазиду у 16 % розчині сульфатної кислоти. Пробірки закривають фольгою, вміст перемішують і одночасно поміщають у киплячу баню точно на 10 хв. Пробірки швидко охолоджують і колориметрують на ФЕК у кюветі із товщиною шару 1 см за довжини хвилі 470 нм проти контрольної проби.

Концентрацію сечовини розраховують за формулою:

$$X = \frac{E_{\text{досл}}}{E_{\text{калібр}}} \times C \times 10,$$

де X – концентрація сечовини у сечі, ммоль/л; $E_{\text{досл}}$ – екстинція дослідної проби; $E_{\text{калібр}}$ – екстинція калібрувальної проби; C – концентрація сечовини у калібрувальній пробі, 8,32 ммоль/л; 10 – коефіцієнт розведення сечі.

Робота 11. Визначення вмісту креатиніну у сечі

Креатин та *креатинін* є азотистими екстрактивними речовинами. Вміст креатиніну становить 0,003–0,01 % загальної кількості сечі. Збільшення вмісту креатиніну у сечі за надмірного надходження білків із кормом (розпад останніх спричинює виведення креатиніну), голодання (розпад власних білків), судомів (розпад білків м'язів), зменшення – у разі захворювань нирок.

Хід роботи. У пробірку вносять 1 мл розведеної у 50 разів сечі, додають 3,0 мл насиченого розчину пікринової кислоти. Через 5 хв пробірку поміщають у водяну баню (100 °С) на 1 хв, а потім центрифугують. В іншу пробірку відмірюють 2 мл центрифугату, додають 3 мл 0,3 % розчину гідроксиду натрію, перемішують. Витримують 10 хв і колориметрують у кюветі із товщиною шару 1 см за довжини хвилі 500–560 нм проти контрольної проби. Контрольну пробу готують аналогічно, але замість розведеної сечі додають 1 мл дистильованої води. В калібрувальну пробу вносять 1 мл розчину креатиніну з концентрацією 88,4 мкмоль/л (10 мг/мл).

Концентрацію креатиніну розраховують за формулою:

$$X = \frac{E_{\text{досл}}}{E_{\text{калібр}}} \times C \times 50,$$

де X – концентрація креатиніну у сечі, мкмоль/л; $E_{\text{досл}}$ – екстинція дослідної проби; $E_{\text{калібр}}$ – екстинція калібрувальної проби; C – концентрація сечовини у калібрувальної проби, 88,4 мкмоль/л; 50 – коефіцієнт розведення сечі.

Контрольні питання

1. Фізико-хімічні властивості сечі. 2. Хімічний склад сечі. 3. Органічні складові компоненти сечі. 4. Неорганічні складові компоненти сечі. 5. Патологічні складові компоненти сечі. 6. Хімізм утворення сечі. 7. Особливості, властивості та хімічний склад сечі птахів.

11. БІОХІМІЯ МОЛОКА

Молоко – полідисперсна система, що складається з істинних і колоїдних розчинів, суспензій та емульсій. Молоко утворюється в молочних залозах ссавців, є надзвичайно цінним продуктом харчування людини і тварин. Для харчування людей зазвичай використовується молоко корів, менше – кіз, овець, кобил, верблюдиць, ослиць, буйволиць, самок оленя, зебу, яка.

Молоко корів – рідина білого кольору з жовтуватим відтінком, солодкувата на смак, зі своєрідним запахом. Густина молока – 1,027–1,033, температура замерзання – 0,54–0,57 °С, температура кипіння – 100,2 °С, осмотичний тиск – 6,66–6,76 кПа. Реакція середовища – слабокисла або близька до нейтральної (рН 6,6–7,0). Титрована кислотність – 12–20 °Т, буферна ємність за кислотою – 2,5, за лугом – 1,4.

У молоці міститься 200 індивідуальних речовин. Хімічний склад молока одного й того ж виду тварин залежить від породи і віку самки, періоду лактації, умов утримання та годівлі тощо. Основою молока є вода (70–90 % залежно від виду тварин), яка знаходиться у вільному і зв'язаному станах. Уміст білків у коров'ячому молоці становить 2,9–4,0 %. У знежиреному молоці до 55 % білків становить α -казеїн. Вуглеводи перебувають у вільній і зв'язаній з білками формах. Вільні вуглеводи представлені лактозою (в середньому 4,7 %), галактозою, глюкозою, аміносахарами. Ліпіди молока представлені сумішшю нейтральних жирів, стеринів, стеридів, фосфатидів, гліколіпідів та їх похідних. Уміст ліпідів в молоці становить від 1 (як) до 17 % (олень). Коров'яче молоко в середньому містить 3,5–4,2 % жиру. Холестерину у молоці невели-

ка кількість – 0,012 %. Фосфатидів і гліколіпідів у молоці – 0,032–0,050 %. Оболонки жирових кульок на 60 % складаються із фосфатидів. Уміст мінеральних речовин у молоці становить 0,7–1 %. Вони перебувають у вигляді солей, кислот, іонів, біокомплексів, входять до складу металоензимів тощо. Молоко містить практично всі жиро- та водорозчинні вітаміни. До складу молока входять пігменти, зокрема каротин, лактофлавін, незначна кількість хлорофілів, які обумовлюють його забарвлення.

Робота 1. Визначення загальної кислотності молока за Тернером

Кислотність молока обумовлюється наявністю в ньому речовин, що мають кислі властивості. До них, перш за все, належать вуглекислота, кислі білки, лимонна кислота, кислі солі лимонної, вугільної і ортофосфорної кислот та інші речовини. Під час зберігання молока в його складі з'являється молочна кислота як результат молочнокислого бродіння. З часом її кількість зростає. Розрізняють загальну (титровану) і активну кислотність. Загальна кислотність молока обумовлена кількістю молочної кислоти, що утворилась під дією молочнокислих бактерій, визначається у градусах Тернера (°Т). Свіжовидоєне молоко має кислотність 15–18 °Т, молоко, що реалізується у продаж – 20–24 °Т, молоко, яке скипається під час кип'ятіння – 24–27 °Т. Жіноче молоко має кислотність 1–9 °Т, кобиляче молоко та молоко ослиці – у межах 6 °Т.

Кислотність молока може залежати і від хімічного складу кормів. Вона має більш високі величини у разі згодовування коровам кислого жому, силосів тощо. Збільшення кислотності молока можуть зумовлювати й інші причини – згодовування корів великою кількістю концентратів, сіном, зібраним з низинних і заболочених луків, тощо. Підвищена кислотність свіжого молока (23–26 °Т) часто обумовлена порушеннями мінерального обміну в організмі корів і нестачею у раціоні солей кальцію. Іноді причиною підвищеної кислотності молока є згодовування коровам великої кількості кислих кормів (зеленої маси).

Хід роботи. У конічну колбу відмірюють 10 мл дослідного молока, додають 20 мл води і 2–3 краплі розчину фенолфталеїну. Вміст пробірки збовтують і титрують 0,1 н розчином NaOH до появи стійкого слаборожевого забарвлення, не зникаючого протягом 2 хв.

Кислотність визначають за формулою:

$$X = A \times 10,$$

де X – кислотність молока; A – кількість лугу, що витратили на титрування, мл.

Робота 2. Визначення густини молока

Густина молока – відношення маси молока за температури 20 °С до маси води того ж об'єму за температури 4 °С. Вона знаходиться у межах 1,027–1,033 г/см³. Густина молозива, багатого білками і мінеральними речовинами, досягає 1,040 г/см³. Густина молока залежить від кількісного вмісту в ньому певних хімічних речовин, їх хімічної природи і відносин між собою. Особливий вплив на густину молока має вміст молочного жиру. Так, густина жиру менше води (у середньому дорівнює 0,920 г/см³), і тому у разі збільшення відсотка жиру густина молока зменшується. Наприклад, густина вершків у середньому дорівнює 1,015 г/см³.

Густину молока вимірюють за допомогою спеціальних ареометрів – *лактоденсиметрів*, або лактометрів і виражають у градусах за температури 20 °С. Градуси лактоденсиметра відповідають тисячним часткам числа, що характеризує дійсну густину молока.

Густину молока рекомендують визначати не раніше 2-х годин після доїння.

Хід роботи. У циліндр обережно (щоб не утворилася піна) наливають попередньо добре перемішане молоко. Після чого у молоко занурюють сухий лактоденсиметр. Через деякий час (3–5 хв) проводять відлік за шкалою від місця зіткнення поверхні молока з діленням лактоденсиметру (по верхньому меніску), а також визначають температуру молока (за шкалою термометра). До значень показника лактоденсиметра додають або віднімають 0,2 у разі відхилення температури молока на ±1° від 20 °С.

Робота 3. Визначення в'язкості молока віскозиметричним методом

В'язкість молока здебільшого визначають у відносних (щодо води) величинах. Якщо в'язкість води прийняти за 1, то в'язкість молока коливається в межах 1,3–2,2. В'язкість молока зумовлена вмістом молочних білків, жиру, цукру і солей. За вмісту молочного цукру більше 5 %, жиру – більше 4 % в'язкість молока збільшується. Особливого значення набуває в'язкість молока у процесі сепарування, тому що підвищення температури молока зменшує в'язкість і полегшує відокремлення жирових кульок у вигляді вершків.

Метод визначення в'язкості базується на швидкості витікання молока крізь капілярний отвір віскозиметра за температури 20 °С.

Хід роботи. Згідно з інструкцією секундоміром роблять відлік часу в секундах, за які вода збіжить в капілярі віскозиметра від верхньої до нижньої риски. Відлік повторюють тричі і виводять середню швидкість проходження води. Аналогічно роблять відлік і з молоком.

Показник в'язкості молока розраховують за формулою:

$$B = \frac{\rho \times t}{t_1},$$

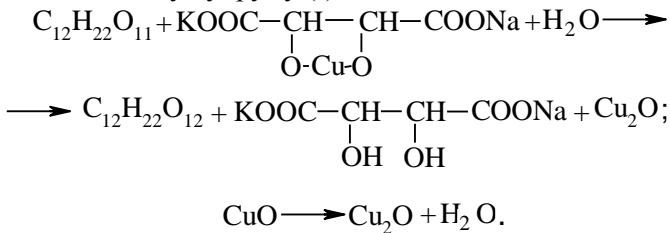
де B – питома в'язкість молока за температури 20 °С; ρ – густина молока, г/мл; t – час витікання молока, с; t₁ – час витікання води, с.

Робота 4. Якісне визначення лактози у молоці

У складі молока ссавців міститься від 1,4 до 36 % вуглеводів. Найбільше вуглеводів містить молоко носорога – 36 %. У коров'ячому молоці вуглеводів 4,5–5,2 %, у середньому – 4,9 %. Вони, в основному, представлені лактозою, або молочним цукром, частково галактозою і глюкозою, фосфорними ефірами різних моносахаридів, їх похідними – глюкозаміном, галактозаміном, сіаловими кислотами та деякими іншими вуглеводними сполуками. Вуглеводи у молоці знаходяться у вільному і зв'язаному з білками станах. Зв'язані вуглеводи складають близько 0,3 % молока.

Лактоза – головний вуглевод молока. Коров'яче молоко у середньому містить 4,7 % лактози. Лактоза є дисахаридом, молекула якого побудована із залишків молекул D-галактози і D-глюкози, сполучених між собою зв'язком 1,4. Лактоза існує в ациклічній і циклічній формах.

Хід роботи. У пробірку наливають 3–5 мл молока і додають 2–3 мл реактиву Фелінга. Нагрівають у водяній бані. Випадає червоний осад оксиду купруму (I):



Робота 5. Кількісне визначення лактози методом рефрактометрії

Хід роботи. У пробірку наливають 5 мл молока і додають 5–6 крапель 4 % розчину хлориду кальцію. Пробірку закривають і добре перемішують. Далі пробірку поміщають у киплячу водяну баню на 10 хв. Після водяної бані пробірку охолоджують до 15 °С. Із охолодженої пробірки скляною трубкою з ватним тампоном беруть пробу для досліду і переносять на призму рефрактометра.

Кількість лактози визначається згідно з коефіцієнтом заломлення, користуючись даними табл. 22.

Таблиця 22 – Вміст лактози відповідно до коефіцієнта заломлення світла, %

Коефіцієнт заломлення	Лактоза, %	Коефіцієнт заломлення	Лактоза, %	Коефіцієнт заломлення	Лактоза, %
1,3390	3,01	1,3404	3,70	1,3418	4,38
1,3391	3,06	1,3405	3,72	1,3419	4,44
1,3382	3,11	1,3406	3,77	1,3420	4,49
1,3398	3,16	1,3407	3,82	1,3421	4,54
1,3394	3,21	1,3408	3,87	1,3422	4,59
1,3395	3,26	1,3409	3,93	1,3423	4,64
1,3396	3, 31	1,3410	3, 98	1,3424	4, 69
1,3397	3,36	1,3411	4,03	1,3425	4,74
1,3398	3,42	1,3412	4,08	1,3426	4,79
1,3399	3,47	1,3413	4,13	1,3427	4,84
1,3400	3,52	1,3414	4,18	1,3428	4,89
1,3401	3,57	1,3415	4,23	1,3429	4,95
1,3402	3,62	1,3416	4,28	1,3430	5,00
1,3403	3,67	1,3417	4,33	1,3431	5,05

Робота 6. Визначення вмісту Хлору в молоці

Уміст Хлору в молоці здорових корів не перебільшує 0,15 %. Кількість його в молоці підвищується внаслідок захворювання тварин, особливо маститами. Визначення Хлору в молоці базується на титруванні фільтрату після видалення білків розчином азотнокислого срібла, 1 мл якого відповідає 1 мг хлору.

Хід роботи. У колбу внести 2 мл молока, 16 мл води, 1 мл 20 % розчину сульфату міді, 0,8 мл 2 н розчину гідроксиду натрію і 0,2 мл 10 % розчину хромовокислого калію. Розчин повинен мати нейтральну реакцію на лакмус. У разі необхідності нейтралізувати його розчином гідроксиду натрію. Вміст перемішати і профільтрувати.

10 мл фільтрату перенести в іншу колбу і титрувати 0,02817 н розчином AgNO_3 до кольору червоної цегли.

Уміст хлору визначають за формулою:

$$X = \frac{A \times 20 \times 0,02821}{2 \times \rho},$$

де X – вміст Хлору, ммоль/л; A – кількість розчину AgNO_3 , яку витратили на титрування, мл; 2 – кількість молока, взятого для дослідження, мл; 20 – сумарне розведення проби; ρ – густина молока, г/см³; 0,02821 – коефіцієнт переведення вмісту Хлору у ммоль/л.

Контрольні питання

1. Біохімічні особливості молочної залози та її функції. 2. Охарактеризуйте фізико-хімічні властивості та хімічний склад коров'ячого молока. 3. Утворення складових частин молока. 4. Що таке молозиво? 5. Яка різниця між хімічним складом молока і молозивом? 6. Значення молозива у годуванні ссавців.

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия: Учебник. – М.: Медицина, 1988. – 704 с.
2. Галяс В.Л., Колотницький А.Г. Фізична і колоїдна хімія. – Львів: Стрийська міська друкарня, 2004. – 272 с.
3. Кононський О.І. Біохімія тварин: Підручник. – 2-ге вид., переробл. і доп. – К.: Вища шк., 2006. – 454 с.
4. Кононський О.І. Фізична і колоїдна хімія: Підручник. – 2-ге вид., доп. і випр. – К.: Центр учбової літератури, 2009. – 312 с.
5. Кучеренко М.Є., Бабенюк Ю.Д., Васильєв О.М. Біохімія. – К.: Либідь, 1995. – 432 с.
6. Кучеренко Н.Е., Бабенюк Ю.Д., Васильєв А.Н. Биохимия: Практикум. – К.: Вища шк. Вид-во при Київ. ун-ті, 1988. – 128 с.
7. Ленинджер А. Основы биохимии: В 3 т. Пер. с англ. – М.: Мир, 1985. – 1024 с.
8. Маршалл В.Дж. Клиническая биохимия. – М.: БИНОМ, Невский диалект, 1999. – 368 с.
9. Чечеткін О.В., Воронянський В.І., Карташов М.І. Біохімія сільськогосподарських тварин. – Х.: Харк. зооветеринар. ін-т, 2000. – 465 с.
10. Явоненко О.Ф., Яковенко Б.В. Біохімія. – Суми: Унів. кн., 2002. – 379 с.

ЗМІСТ

ПЕРЕДМОВА	3
I. ФІЗИЧНА ХІМІЯ	4
1. ПОВЕРХНЕВИЙ НАТЯГ І МЕТОДИ ЙОГО ВИЗНАЧЕННЯ.	4
1. Спостереження за кулеподібною формою крапель аніліну у воді (4);	
2. Якісна проба на поверхнево-активні та поверхнево-неактивні речовини (5);	
3. Визначення величини поверхневого натягу етанолу сталагмометричним методом (6);	
4. Визначення поверхневого натягу розчинів різних спиртів (7);	
5. Визначення присутності солей жовчних кислот у сечі за поверхневим натягом (7).	
2. АДСОРБЦІЯ	8
1. Залежність величини адсорбції від природи адсорбтиву (10);	
2. Залежність величини адсорбції від природи розчинника (10);	
3. Адсорбція активованого вугілля на межі розділу двох фаз (10);	
4. Елюція метиленового синього (10);	
5. Фарбування вовни (11);	
6. Хроматографічне розділення барвників на папері (11).	
3. ХІМІЧНА КІНЕТИКА І КАТАЛІЗ	12
1. Залежність швидкості хімічної реакції від концентрації реагуючих речовин і температури (14);	
2. Гетерогенний каталіз (14);	
3. Гомогенний каталіз (15).	
4. ОСМОС І МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ ОСМОТИЧНОГО ТИСКУ	15
1. Ендо- та екзоосмос (18);	
2. “Штучна клітина” Траубе (ендоосмос) (18);	
3. Осмометричний метод визначення осмотичного тиску (18);	
4. Визначення осмотичного тиску плазмолітичним методом (19);	
5. Визначення осмотичного тиску розчину кріоскопічним методом (20).	
5. РЕАКЦІЯ СЕРЕДОВИЩА І МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ВОДНЕВИХ ІОНІВ	22
1. Визначення загальної, активної і потенційної кислотності (25);	
2. Колориметричний метод визначення рН (25);	
3. Електрометричний метод визначення рН (28).	
6. БУФЕРНІ РОЗЧИНИ	29
1. Приготування ацетатних буферних розчинів із заданим значенням рН (30);	
2. Буферний метод визначення концентрації водневих іонів (30);	
3. Вплив розведення на рН буферного розчину (31);	
4. Вплив кислот і лугів на рН буферних розчинів (31);	
5. Визначення	

ня буферної ємності розчинів (32); 6. Визначення буферної ємності сироватки крові (33).

II. КОЛОЇДНА ХІМІЯ 34

1. ОДЕРЖАННЯ КОЛОЇДНИХ РОЗЧИНІВ 34

1. Одержання гідрозолей Сульфуру та каніфолію методом пониження розчинності (36); 2. Одержання золю парафіну (37); 3. Одержання гідрозолі Сульфуру методом окиснення (37); 4. Одержання золю гідроксиду феруму методом гідролізу (37); 5. Утворення гідрозолі Аргентуму методом відновлення (38); 6. Одержання золей йодиду аргентуму реакцією подвійного обміну (39); 7. Одержання золю гідроксиду алюмінію методом пептизації (39).

2. МЕТОДИ ОЧИСТКИ КОЛОЇДНИХ РОЗЧИНІВ 40

1. Виготовлення напівпроникної мембрани (41); 2. Діаліз золю гідроксиду феруму (42); 3. Діаліз розчину білка, забрудненого хлоридом натрію (42); 4. Відмінність колоїдних розчинів від істинних (43).

3. ВЛАСТИВОСТІ КОЛОЇДНИХ РОЗЧИНІВ 44

1. Осмос і осмотичний тиск золей (44); 2. Явище Фарадея-Тиндаля (45); 3. Явище електрофорезу (45); 4. Визначення заряду колоїдної частинки методом капілярного аналізу (46); 5. Коагуляція золю гідроксиду феруму (47); 6. Захист міцел гідрофобних колоїдних розчинів (47).

4. В'ЯЗКІСТЬ 48

1. Визначення в'язкості за допомогою капілярного віскозиметра (49); 2. Вплив температури на в'язкість рідини (50); 3. Вплив концентрації розчиненої речовини на в'язкість розчину (50); 4. Вплив концентрації водневих іонів (сН); на в'язкість (51); 5. Зміни в'язкості зі старінням розчину (51).

5. СПОСОБИ ОДЕРЖАННЯ І ВЛАСТИВОСТІ РОЗЧИНІВ ВИСОКОМОЛЕКУЛЯРНИХ СПОЛУК (ВМС); 52

1. Одержання розчину крохмалю (53); 2. Одержання розчину казеїну (54); 3. Відношення ліофобного золю і розчину желатину до коагуляції (55); 4. Захисна дія желатину для ліофобних колоїдів (55); 5. Визначення ізоелектричної точки желатину (56); 6. Коацервація у розчинах ВМС (56).

6. ЕМУЛЬСІЇ 57

1. Одержання емульсії олії (58); 2. Одержання стійкої емульсії без участі стабілізаторів (58); 3. Обернення фаз емульсії (59).

7. ГЕЛІ	60
1. Одержання гелю желатину методом драглювання (60);	
2. Залежність часу драглювання від температури та концентрації розчину (61);	
3. Набухання зерна (61);	
4. Одержання кілець Лізеганга (62);	
5. Синерезис гелю (згустку) крові (62).	
ІІІ. ЗАГАЛЬНА БІОХІМІЯ	63
1. ХІМІЯ ТА ОБМІН ВУГЛЕВОДІВ	63
1. Загальна реакція на вуглеводи з α -нафтолом (66);	
2. Якісні реакції на моносахариди (67);	
3. Якісні реакції дисахаридів (69);	
4. Кольорова реакція виявлення глікогену і крохмалю (70);	
5. Гідроліз клітковини (71);	
6. Перетравлювання вуглеводів (72);	
7. Визначення вмісту цукру в крові за методом Хагедорн-Ієнсена (73);	
8. Кількісне визначення цукру в крові за Покровським та Крайко (75);	
9. Кількісне визначення піровиноградної кислоти в біологічних рідинах (76);	
10. Відкриття молочної кислоти в м'язовому екстракті (77);	
11. Використання неорганічного фосфору у реакціях гліколізу і глікогенолізу (77);	
12. Анаеробний гліколіз у м'язовій тканині (79);	
13. Визначення кількості цукру у сечі методом Фелінга (81);	
14. Кількісне визначення глюкози антроновим методом Моріса (82);	
15. Визначення кількості цукру у сечі поляриметричним методом (83);	
16. Визначення кількості глюкози у сечі методом бродіння (84).	
2. ХІМІЯ І ОБМІН ЛІПІДІВ	86
1. Виявлення жирів (87);	
2. Емульгування жиру (88);	
3. Виділення холестерину із тканин мозку (89);	
4. Якісні реакції на холестерин (90);	
5. Виявлення лецитину та відкриття продуктів його гідролізу (91);	
6. Визначення хімічних констант жирів (94);	
7. Визначення дії ліпази і впливу жовчі на перетравлення жиру молока (98);	
8. Відкриття кетонівих тіл у сечі (99);	
9. Якісне визначення жовчних кислот (101);	
10. Кількісне визначення жиру у тканинах за Сокслетом (102);	
11. Визначення загальних ліпідів у сироватці крові (102);	
12. Визначення загального холестерину у сироватці крові за методом Ілька (104).	
3. ХІМІЯ І ОБМІН БІЛКІВ	105
1. Екстракція білків із м'язової тканини (107);	
2. Виділення казеїну з коров'ячого молока (107);	
3. Кольорові реакції на білки (109);	
4. Реакції осадження білків (117);	
5. Очищення білків методом діалізу (125);	
6. Визначення ізоелектричної точки білка (126);	
7. Визначення вмісту нітрогену аміних груп білка методом формольного	

титрування (128); 8. Визначення амінокислот методом розподільної хроматографії на папері (129); 9. Перетравлювання білків пепсином (131); 10. Перетравлювання білків ферментами підшлункової залози (132); 11. Визначення кількості білка за нітрогеном мікрометодом Кьельдаля (133); 12. Кількісне визначення загального білка сироватки крові рефрактометричним методом (136).

4. ХІМІЯ І ОБМІН НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ 137

1. Гідроліз нуклеопротейдів (138); 2. Якісна реакція на пептидний зв'язок (138); 3. Якісні реакції на пентози (138); 4. Відкриття у гідролізаті пуринових основ (139); 5. Відкриття у гідролізаті залишків фосфатної кислоти (139).

5. ВОДНИЙ І МІНЕРАЛЬНИЙ ОБМІНИ 139

1. Якісне визначення Кальцію в біологічному матеріалі (141); 2. Якісне визначення Магнію в біологічному матеріалі (141); 3. Якісне визначення Фосфору в біологічному матеріалі (142); 4. Кількісне визначення Хлору в біологічному матеріалі (142).

6. ВІТАМІНИ 143

1. Якісна реакція на ретинол (144); 2. Кількісне визначення вмісту каротину (146); 3. Кількісне визначення вітаміну А (147); 4. Якісні реакції на вітамін D (148); 5. Кількісне визначення вітаміну D (149); 6. Якісна реакція на вітамін E (150); 7. Кількісне визначення вітаміну E (151); 8. Якісні реакції на вітамін K (152); 9. Кількісне визначення вітаміну K (153); 10. Якісні реакції на вітамін B₁ (154); 11. Кількісне визначення вітаміну B₁ флуорометричним методом (155); 12. Якісна реакція на вітамін B₂ (156); 13. Флуорометричне визначення вітаміну B₂ (158); 14. Якісні реакції на вітамін B₅ (159); 15. Якісні реакції на вітамін B₆ (160); 16. Виявлення піридоксилової кислоти (161); 17. Відкриття Кобальту у вітаміні B₁₂ (162); 18. Якісні реакції на вітамін C (163); 19. Кількісне визначення вітаміну C (166); 20. Якісні реакції на рутин і кверцетин (167); 21. Кількісне визначення вітаміну P у препаратах чайного листа (169); 22. Кількісне визначення вмісту фолієвої кислоти (169).

7. ФЕРМЕНТИ 171

1. Виявлення амілази у слині (173); 2. Виявлення сахарози у дріжджах (174); 3. Виявлення сукцинатдегідрогенази у м'язовій тканині (174); 4. Виявлення пепсину в шлунковому соці (175); 5. Виявлення пероксидази у крові (176); 6. Виявлення каталази в крові (176); 7. Одержання ферментних препаратів (177); 8. Вплив температури на

активність амілази слини (179); 9. Специфічність дії амілази слини (180); 10. Вплив реакції середовища на активність ферментів (181); 11. Вплив активаторів та інгібіторів на активність ферментів (181); 12. Визначення активності амілази за методом Каравея (183).

8. ГОРМОНИ 184

1. Осадження інсуліну сульфосаліциловою кислотою (185); 2. Біуретова реакція з гормонами білкової і поліпептидної природи (185); 3. Виявлення 17-кетостероїдів (185); 4. Якісна реакція на адреналін (186); 5. Виявлення Йоду у гідролізаті щитоподібної залози (186); 6. Якісна реакція на фолікулін (187).

9. БІОХІМІЯ КРОВІ 188

1. Визначення каталазної активності крові за методом Баха і Зубкової (189); 2. Якісні реакції на кров (190); 3. Визначення вмісту Кальцію у сироватці крові за де Ваардом (191); 4. Визначення активності амінотрансфераз у сироватці крові за Ратман і Френкель (192); 5. Титриметричний метод визначення резервної лужності (194); 6. Визначення вмісту сечової кислоти у сироватці крові (194).

10. БІОХІМІЯ СЕЧІ 195

1. Фізична характеристика сечі (197); 2. Якісне визначення хлоридів у сечі (199); 3. Якісне визначення фосфатів у сечі (199); 4. Якісне визначення сульфатів у сечі (200); 5. Відкриття цукру у сечі (200); 6. Якісне визначення білка у сечі сульфосаліциловою кислотою (201); 7. Реакції на уробілін і уробіліноген (201); 8. Реакція на жовчні кислоти у сечі (202); 9. Відкриття ацетонових тіл у сечі (202); 10. Визначення вмісту сечовини (202); 11. Визначення вмісту креатиніну у сечі (203).

11. БІОХІМІЯ МОЛОКА 204

1. Визначення загальної кислотності молока за Тернером (206); 2. Визначення густини молока (206); 3. Визначення в'язкості молока віскозиметричним методом (206); 4. Якісне визначення лактози у молоці (207); 5. Кількісне визначення лактози методом рефрактометрії (208); 6. Визначення вмісту хлору в молоці (208).

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ 210

НАВЧАЛЬНЕ ВИДАННЯ

Цехмістренко Світлана Іванівна
Кононський Олексій Іванович
Цехмістренко Оксана Сергіївна

БІОХІМІЯ ТВАРИН З ОСНОВАМИ
ФІЗИЧНОЇ І КОЛОЇДНОЇ ХІМІЇ
ПРАКТИКУМ

Редактор О.М. Т р е г у б о в а

Комп'ютерний набір і верстка С.І. Ц е х м і с т р е н к о

Здано до складання 12.10.2009. Підписано до друку Формат
Ум. друк. арк. Зам. Ціна . Тираж

РВІКВ, Сектор оперативної поліграфії БНАУ
09117, Біла Церква, Соборна пл., 8; тел. 33–11–01

