

Міністерство освіти і науки України
ДВНЗ «Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника»

Кафедра біохімії та біотехнології

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ
ДО ЛАБОРАТОРНИХ ЗАНЯТЬ
ТА САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТІВ
З НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ
«ОСНОВИ БІОХІМІЇ»

Івано-Франківськ
2017

УДК 577.112+577.114

У посібнику детально описані методи якісного та кількісного визначення амінокислот, вуглеводів, ліпідів, вітамінів у біологічному матеріалі та різні підходи до визначення властивостей і активностей ферментів; подано інструкцію з охорони праці при роботі в навчальних лабораторіях кафедри біохімії та біотехнології; наведено основні типи розрахункових задач для самостійного опрацювання студентом.

Автори-укладачі: к.б.н., викл. Абрат О.Б., к.б.н. Мосійчук Н.М., к.б.н., доц. Байляк М.М., к.б.н., доц. Господарьов Д.В., д.б.н., доц. Семчишин Г.М.

Основні положення з техніки безпеки при виконанні лабораторних робіт

Вимоги безпеки перед початком та під час виконання роботи

1. Заходити до лабораторії і приступати до роботи можна тільки з дозволу викладача або завідувача лабораторіями і проходження вступного, первинного чи цільового інструктажу з охорони праці з відміткою у журналі.

2. Студент повинен знати про небезпечні фактори, які виникають при роботі в біохімічній лабораторії з агресивними, токсичними, пожежно-вибуховими речовинами під час їх нагрівання, змішування, переливання, розведення і т.п. Студент повинен отримати інструкцію до проведення лабораторної роботи чи експерименту, ознайомитися з їх змістом, одержати у завідувача чи викладача реактиви й устаткування. Студенти зобов'язані виконувати тільки ті дослідження, які вказані в інструкції до певної лабораторної роботи чи до певного експерименту. Не дозволяється самостійно включати електроприлади.

3. При виявленні несправності обладнання чи приладів необхідно повідомити викладача або завідувача лабораторіями. Перед початком роботи потрібно включити витяжну вентиляцію. Проводити роботи за відсутності примусової вентиляції категорично забороняється. Всі роботи, пов'язані з виділенням шкідливих речовин або газів повинні проводитися під витяжною шафою.

4. Перед початком робіт необхідно одягнути захисний одяг (халат), а при необхідності – додаткові захисні засоби (гумові рукавиці, респіратори, окуляри тощо).

5. По закінченню роботи необхідно прибрати своє робоче місце та здати його завідувачу лабораторіями або викладачу.

6. Після закінчення лабораторних робіт необхідно вимити руки з милом і зняти спецодяг і засоби індивідуального захисту.

Робота з реактивами

1. При роботі з реактивами треба виходити з того, що будь-які хімічні речовини, навіть „безпечні” більшою чи меншою мірою отруйні. Особливо небезпечне систематичне попадання в організм на протязі тривалого часу навіть дуже незначних кількостей речовин, які викликають хронічне отруєння. Важкі наслідки хронічних отруєнь викликані тим, що їх симптоми на перших порах бувають виражені не яскраво (загальна слабкість, сонливість, зниження працездатності), а наступне проникнення отруту в організм призводить до серйозних уражень, які важко піддаються лікуванню.

2. Для попередження попадання хімічних сполук на шкіру, у ротову порожнину та дихальні шляхи, необхідно дотримуватись наступних застережень:

- в лабораторних приміщеннях не слід робити запас реактивів, особливо летких – через нещільність тари вони можуть випаровуватись та забруднювати повітря в лабораторії. Необхідні для поточної роботи реактиви треба тримати щільно закритими, а найбільш леткі (наприклад, соляну кислоту, розчин аміаку) – під витяжною шафою;
- всі роботи з леткими реактивами необхідно проводити під витяжною шафою;
- при роботі з отруйними хімічними речовинами слід бути особливо акуратними. Розсипані або розлиті випадково реактиви треба негайно прибрати і ретельно помити стіл, витерти насухо;
- категорично заборонено викидати у раковини рідини і тверді речовини, що не розчиняються у воді, а також сильні отрути, кислоти та органічні розчинники. Такі відходи слід в кінці робочого дня виносити в спеціальні місця;
- категорично забороняється засмоктувати рідини в піпетки ротом, для цього необхідно використовувати гумові груші або піпетки-дозатори;
- забороняється зберігати разом реактиви, які здатні реагувати один з одним із виділенням тепла або газів. Не можна разом зберігати речовини, які у випадку виникнення пожежі необхідно гасити різними засобами гасіння, а також вибухонебезпечні;
- розлиті кислоти чи луги треба негайно засипати піском, зібрати совком і вимити поверхню.

3. Всі банки з хімічними реактивами, що зберігаються у лабораторії повинні бути підписані розбірливими етикетками і містити назву речовини, її формулу, концентрацію; дату приготування (якщо це розчин) та прізвище того, хто приготував. Забороняється виправляти написи на етикетках, наклеювати нові етикетки, наносити на ємкості з реактивами написи, які легко змиваються, забороняється використовувати реактиви без етикеток. Користуватися реактивами без етикеток або із сумнівними етикетками **КАТЕГОРИЧНО ЗАБОРОНЕНО**. У таких випадках реактиви негайно знищують.

4. Необхідно ретельно слідкувати за дотриманням чистоти реактивів. Не можна перемінювати корки від банок із реактивами, набирати чисту речовину з банки брудними шпателями або піпетками, збирати розсипані реактиви і засипати їх знову у банки з реактивом і т.п.

5. Зберігання реактивів допускається лише у спеціально обладнаних, добре провітрюваних приміщеннях. Необхідні для повсякденної роботи легкозаймисті й горючі рідини повинні зберігатися в спеціальних металевих ящиках, які захищені із середини азбестом і знаходяться в приміщенні

складу. Пляшки з мінеральними концентрованими кислотами потрібно тримати у витяжній шафі на керамічних або емальованих піддонах. Об'єм пляшок з кислотами не повинен перевищувати 1 л. Для приготування розчинів кислот їх треба вливати тонкою цівкою у воду, безперервно перемішуючи. Приливати воду в кислоту ЗАБОРОНЕНО.

6. Робота з вогненебезпечними речовинами

Легкозаймисті речовини (ЛЗР) і горючі речовини (ГР) займають серед вогненебезпечних речовин особливе місце: вони широко застосовуються в лабораторіях, їх випари навіть при кімнатній температурі легко утворюють з повітрям вогненебезпечні і вибухонебезпечні суміші. Максимальну обережність необхідно проявляти при роботі з діетиловим ефіром. Його випари важчі за повітря і мають властивість „розтікатися” по поверхні стола. Тому наявність вогню, електрообладнання що іскрить, розпечених предметів і т.п. навіть на відстані 3-5 м від місця роботи з ефіром може викликати його займання. Безпечна робота з ЛЗР може бути забезпечена лише при дотриманні наступних правил:

- Не можна допускати потрапляння горючих парів в атмосферу. Забороняється проводити будь-які роботи з ЛЗР поза витяжною шафою. Необхідно суворо слідкувати, щоб ємність з ЛЗР не виявилась поряд з нагрітими предметами, не освічувалась прямими променями сонця.
- Забороняється працювати з вогненебезпечними речовинами поблизу включених пальників або електричних приладів. Для займання повітряно-газової суміші досить іскри, що виникає при користуванні електричними вимикачами, штепселями і т.п. ЛЗР можна нагрівати з допомогою пари або гарячої води (воду для бані необхідно нагрівати далеко від ЛЗР). Щоб попередити випадкове застосування іншими особами полум'я або електрики в небезпечному сусідстві з ЛЗР, треба перед початком роботи з вогненебезпечними речовинами поставити до відома про це всіх працюючих в цій лабораторії.
- Дуже важливо попередньо прийняти всі можливі заходи, щоб у випадку аварії (якщо вона все-таки виникне) наслідки були мінімальними. Наявність на робочому місці ємностей з ЛЗР чи ГР в багато разів збільшує ймовірність виникнення великої пожежі в результаті навіть незначної іскри. Найбільш небезпечний диетиловий ефір чи ацетон, які заборонено зберігати в робочих приміщеннях лабораторій. Не дозволяється також використовувати для зберігання і перенесення ЛЗР тонкостінні скляні ємності.

Робота з електрообладнанням

1. Всі роботи в лабораторії повинні проводитися при справному електрообладнанні: приладах, установках, електропроводах і заземлених пристроях.

2. На електроприладах дозволяється працювати тільки під контролем викладача або іншої відповідальної особи

3. При роботі з електрообладнанням і електроприладами забороняється:

- працювати із зіпсованими електрообладнанням і при відсутності заземлення;
- працювати поблизу відкритих струмовідвідних частин обладнання;
- доторкатися руками або металевими предметами до оголених проводів;
- залишати без нагляду працюючі установки та включені електричні прилади;
- порушувати правила користування електроприладами, апаратами й установками.
- переносити включені електроприлади і ремонтувати обладнання, що знаходиться під струмом;
- нагрівати рідини у закритих колбах і безпосередньо на електроплитках;
- ставити електронагрівальні прилади на дерев'яну поверхню столу (необхідно на теплоізоляційну підставку (азбест, шамот та ін.));
- загроможувати доступ до електричних приладів, вішати на штепсельні розетки, вимикачі й шнури різні речі. У випадку припинення подачі струму всі електричні прилади повинні бути вимкнені;
- відкривати електрощитки, включати прилади або обладнання із зіпсутими штепсельними роз'ємами, пусковими пристроями.

3. При виявленні дефектів в ізоляції електричних дротів, зіпсутих пускатів, рубильників, штепселів та іншої апаратури, а також заземлення, потрібно негайно повідомити викладача або завідувача лабораторіями.

Робота зі скляним посудом

1. Причиною більшості травм в біохімічних лабораторіях є неправильне користування скляним посудом. Скло – дуже крихкий матеріал і витримує лише незначні механічні навантаження. Застосування фізичної сили при роботі із скляними приладами не допускається.

2. Внутрішній діаметр гумових шлангів, що використовуються для з'єднання окремих частин приладу, повинен бути лише ненабагато меншим діаметра скляних трубок. При одяганні шланга трубку тримають ближче до кінця. Треба змастити кінець трубки гліцерином або вазеліновим маслом.

3. Використовувати посуд з тріщинами категорично забороняється.

4. Уламки розбитого посуду прибирають тільки з допомогою щітки і совка, в жодному випадку – не руками. При розкритті ампули і розрізанні скляної трубки невеликого діаметру необхідно завернути їх рушником, злегка надпиляти напилем (без натиску). Розламувати трубки, не обернувши їх при цьому рушником, категорично заборонено. Краї розрізаної трубки треба зразу ж опалити, або обпиляти. Скляні прилади і посуд великих розмірів треба переносити двома руками. Піднімати бутлі за горло забороняється.

5. Скло не витримує різких перепадів температур. Якщо треба нагрівати вище 100°C, то використовують посуд з термостійкого скла (матова мітка на посуді). Особливо треба обережати від нерівномірного нагрівання – ексикатори, мірні циліндри і т.п. їх не можна мити дуже гарячою водою, ставити в розігріту сушильну шафу, наливати гарячі рідини. У приладах із термостійкого скла найбільш нестійкі до нагрівання місця сплавлення. При різкому перепаді температур вони можуть давати тріщину.

Миття та сушіння хімічного посуду

Працівникам хімічних (мікробіологічних, біохімічних) лабораторій категорично заборонено використовувати для роботи брудний посуд та обладнання, оскільки навіть незначне забруднення може суттєво вплинути на точність отриманих показників і, навіть, призвести до повної втрати результатів довготривалої роботи. Весь посуд, який використовується, повинен бути чистим. Скляний посуд вважається чистим, якщо при ретельному його огляді не помітно жодного забруднення і після обливання вода стікає із його стінок, не утворюючи окремих крапель.

Загальні правила при митті хімічного посуду:

1. Мити посуд необхідно зразу ж після його використання, в крайньому випадку – в кінці робочого дня. Не можна відкладати миття брудного посуду на наступний день.

2. При виборі способу миття необхідно враховувати вид забруднення – його розчинність у воді і органічних розчинниках, здатність до окислення. Неагресивні і нетоксичні забруднення легко відмиваються якимось одним способом.

3. Якщо наперед невідомо, який метод очистки необхідно вибрати, то слід починати з найбільш простого і доступного способу – миття гарячою чи мильною водою. Використовувати більш потужні миючі засоби – гарячі розчинники, концентровані кислоти і луги, хромову суміш – необхідно лише в тих випадках, коли забруднення не відмивається водою.

4. При митті посуду обов'язково необхідно одягати гумові рукавиці, а у випадку використання агресивних рідин, особливо хромової суміші, концентрованих лугів і т.д. – захисні окуляри.

5. Бажано, щоб миття посуду здійснювалося безпосередньо людиною, що з ним працює. Доручати цю операцію іншим особам допускається лише в тих випадках, коли в лабораторії працюють з однотипними речовинами. Якщо властивості забруднення особі, яка доручено мити посуд невідомі, то вона повинна перед миттям одержати інструктаж.

6. Посуд, який призначений для проведення особливо точних операцій і для аналітичних цілей після миття водопровідною водою треба декілька раз сполоснути дистильованою водою.

7. Сушіння посуду на повітрі проводиться в спеціальних сушках. Проте потрібно не допускати, щоби посуд, який вже висох, довго знаходився в сушці, тому що він знову забруднюється (припадає порошком).

8. Для прискорення сушіння використовують сушильні шафи. Температура сушильних шаф - 100-120°C. Для робіт, пов'язаних з застосуваннях абсолютно безводних сполук, посуд безпосередньо перед роботою треба обпалити в полум'ї горілки, або прогріти в сушильній шафі при температурі до 200°C не менше години.

9. Для зберігання чистого сухого посуду треба виключити можливість його забруднення. Для цього його ставлять у ящики лабораторного стола або у коробки. Великі посудини треба обов'язково закривати корками, ватними тампонами або фільтрувальним папером.

Вимоги безпеки в аварійних ситуаціях

1. Якщо випадково розлито значну кількість горючих рідин, необхідно негайно знеструмити кімнату загальним рубильником, загасити вогонь в усіх джерелах, а місця проливу засипати піском, який потім треба зібрати і винести на місце відходів ЛЗР.

2. На випадок пожежі необхідно:

- вимкнути рубильник електромережі;
- повідомити викладача або завідувача лабораторіями і викликати пожежну охорону за телефоном "01";
- вивести потерпілих, надати їм першу долікарську допомогу і приступити до гасіння пожежі.
- для успішної ліквідації місцевого загоряння велике значення має оперативність і правильне використання засобів вогнегасіння.

Пінним вогнегасником користуються для гасіння великих джерел полум'я. Водою не можна гасити рідини, які не розчиняються в ній, наприклад, бензин, петролейний ефір, бензол, толуол і інші вуглеводні, а також бурхливо реагуючі з нею речовини – лужні метали, карбід кальцію і т. п. Водою можна гасити розчинні у ній речовини, наприклад, спирт і т. п. Невеликі джерела полум'я легко ліквідувати, засипаючи їх піском, або накриваючи мокрою ганчіркою. При горінні одягу на людині незамінні азбестове або повстяне полотно.

3. При виникненні полум'я дуже важливо ліквідувати його на самому початку. Якщо цього не вдалося зробити в перші декілька секунд і горіння посилюється, треба негайно покликати на допомогу товаришів і викликати пожежну команду за тел. 101, продовжуючи боротись з вогнем. Від місця займання необхідно забрати всі горючі матеріали, виключити вентиляцію, нагрівальні прилади. При займанні електричних приладів або дротів треба зразу ж відключити електрику загальним рубильником, потім загасити вогонь

піском. Забороняється загороджувати підходи до засобів пожежогасіння, не ставити на ящики з піском жодних предметів.

Перша долікарська допомога

У кожному робочому приміщенні на видному місці повинна знаходитися укомплектована аптечка першої допомоги. При отруєнні шкідливими речовинами необхідно винести потерпілого із зони отруєння, незалежно від важкості отруєння і стану потерпілого необхідно викликати лікаря. При ураженні електричним струмом потрібно як можливо швидше вивільнити потерпілого від дії струму, покласти його на спину і забезпечити повний спокій. Не можна залишати потерпілого без нагляду, дозволяти йому рухатися або продовжувати роботу. При необхідності потрібно зробити штучне дихання й одночасно масаж серця, викликати лікаря.

1. Перша допомога при зупинці дихання. Штучне дихання проводиться „із рота в рот” або „із рота в ніс”. Для цього потерпілого треба покласти на спину, голову максимально закинути назад. Той, хто надає допомогу, робить глибокий вдих і міцно притиснувши свій рот до рота потерпілого (можна через марлю) проводить у нього видих. При цьому ніс потерпілого треба закрити пальцями. Вдувати повітря треба кожні 5-6 секунд. Штучне дихання проводять до відновлення самостійного і ритмічного дихання. *Непрямий масаж серця* здійснюють методом ритмічних стискань серця через передню стінку грудної клітки при натисканні на рухому нижню частину грудини 1 раз в секунду. При зупинці серця для забезпечення організму киснем одночасно з масажем серця проводять і штучне дихання: після двох глибоких вдувань у рот (чи ніс) потерпілого, 15 раз натискають на грудну клітку з інтервалом 1 сек, потім знову 2 глибоких вдування і 15 раз натискати на грудну клітку для масажу серця. Штучне дихання і масаж проводять до появи самостійного дихання і відновлення роботи серця або до передачі потерпілого медичному персоналу.

2. Перша допомога при пораненні. При пораненні скляним посудом і т.п. треба виконувати наступні правила:

- Не можна промивати рану водою або будь-якими ліками чи засипати порошком, змащувати мазями, бо через них заноситься бруд із поверхні шкіри і це може викликати загноєння.
- Не можна витирати з рани пісок, землю і т.ін., так як можна цим ще глибше втерти бруд. Очистити рану може тільки лікар.
- Не можна також видаляти згустки крові, оскільки це може викликати сильну кровотечу.

Для надання першої допомоги при пораненні треба накласти індивідуальний пакет або свіжо випрасовану носову хустинку. На те місце

тканини, яке наклали безпосередньо на рану, треба накапати йоду. Відправити потерпілого у медпункт.

3. Перша допомога при кровотечі. Зупинку капілярної чи венозної кровотечі проводять накладанням на рану тугої здавлюючої пов'язки. Зупинку артеріальної кровотечі, проводять шляхом накладання джгута. Для того, щоб зупинити кровотечу, треба підняти поранену кінцівку, закрити рану перев'язочним матеріалом, складеним у декілька разів, притиснути зверху, не доторкаючись до рани пальцями, потримати 4-5 хв. Якщо кровотеча не зупиниться, тоді поверх цього матеріалу накласти ще одну подушечку і забинтувати поранене місце досить щільно. Викликати лікаря.

При кровотечі із носа потерпілого треба посадити або положити, опустивши голову вниз, покласти на переносицю і ніс холодний компрес, стиснувши пальцями м'які частини носа. Ввести у ніс кусок стерильної вати чи марлі, змоченої перекисом водню. При кровотечі із рота потерпілого треба покласти на носилки і негайно відправити до лікаря.

4. Перша допомога при опіках. Опіки можуть бути викликані гарячими, розпеченими предметами; речовинами, що мають дуже низьку температуру (наприклад рідка вуглекислота), твердими і рідкими речовинами (кислотами і лугами). Опіки є трьох ступенів» починаючи від легкого почервоніння до тяжкого омертвіння великих ділянок шкіри, а деколи і більш глибоких тканин.

Термічні опіки. При важких опіках треба обережно зняти з потерпілого одяг і взуття - краще їх розрізати. Нічим не змащувати, не торкатися руками обпеченого місця, а перев'язати чистим рушником, зверху покласти вату і забинтувати. Потерпілого відправити до лікаря. Не можна відривати обгорілі шматки одягу, їх треба акуратно обрізати ножицями.

Опіки хімічними реагентами. При опіках концентрованими кислотами - негайно промити проточною водою (10-15 хв) уражене місце. Потім промити 10% розчином питної соди. Якщо попала кислота в очі - промити великою кількістю води, а потім 5% розчином питної соди.

При попаданні на тіло лугу треба зняти його сухою ганчіркою і промити 1% розчином оцтової кислоти. Якщо потратили краплі лугу в очі - промити водою, а потім 2% розчином борної або оцтової кислоти і звернутися в медпункт.

5. Перша допомога при втраті свідомості. При втраті свідомості (запаморочення, нудота, стиснення в грудях, нестача повітря, потемніння в очах) потерпілого потрібно покласти на спину, голову опустити, трохи підняти ноги, дати випити холодної води і понюхати нашатирний спирт. Не можна класти на голову компрес (холодний).

БІЛКИ

Лабораторна робота № 1 Якісні реакції на білки

Білки – це особливий клас речовин, які є невід’ємною складовою всіх живих організмів. За хімічною структурою білки або протеїни – це високомолекулярні азотовмісні органічні речовини, побудовані з амінокислот, що з’єднані між собою пептидними зв’язками. Іншими словами, білки – це високомолекулярні полімери, мономерами яких є амінокислоти. Спільною ознакою для всіх амінокислот є наявність амінної ($-\text{NH}_2$) та карбоксильної ($-\text{COOH}$) груп. До складу природних білків входять 20 α -амінокислот, які кодуються ДНК і називаються протеїногенними або стандартними амінокислотами.

Присутність білків у біологічних об’єктах можна виявити за допомогою кольорових реакцій, зумовлених наявністю в цих органічних біополімерах амінокислот, їх специфічних груп або пептидних зв’язків. Існують універсальні кольорові реакції, характерні для всіх білків незалежно від амінокислотного складу (біуретова, нінгідринова), а також специфічні реакції, у яких беруть участь тільки певні амінокислотні залишки молекули білка (ксантопротеїнова, Фоля та реакція Паулі).

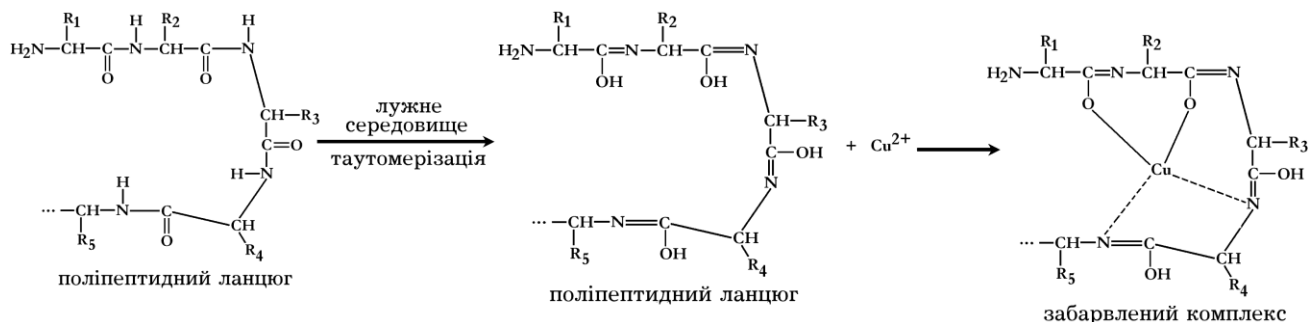
Реактиви

10% розчин яєчного білка	1% розчин желатину
10% розчин NaOH	5% розчин $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$
30% розчин NaOH	1 % розчин CuSO_4
0,5% розчин нінгідрину	1% розчин сульфанілової кислоти
HNO_3 (концентрована)	в 10% CH_3COOH
10% розчин Na_2CO_3	0,5% розчин NaNO_2

1) Біуретова реакція

Позитивну біуретову реакцію можуть давати білки та пептиди, які містять у молекулі не менше двох пептидних зв’язків. У лужному середовищі іони міді (II) утворюють комплекси з пептидними зв’язками, внаслідок чого розчини білків набувають фіолетового забарвлення з червоним або синім відтінком. Механізм реакції полягає в тому, що при надлишку лугу кетогрупа ($-\text{C}=\text{O}$) пептидного зв’язку відновлюється до ОН-групи, далі відбувається дисоціація ОН-групи, з’являється негативний заряд, за рахунок чого атом кисню взаємодіє з міддю, утворюючи солеподібні зв’язки. Мідь також утворює координаційні зв’язки з атомами азоту пептидного зв’язку. Утворений комплекс стабільний.

Інтенсивність забарвлення залежить від концентрації білка і йонів міді в розчині.

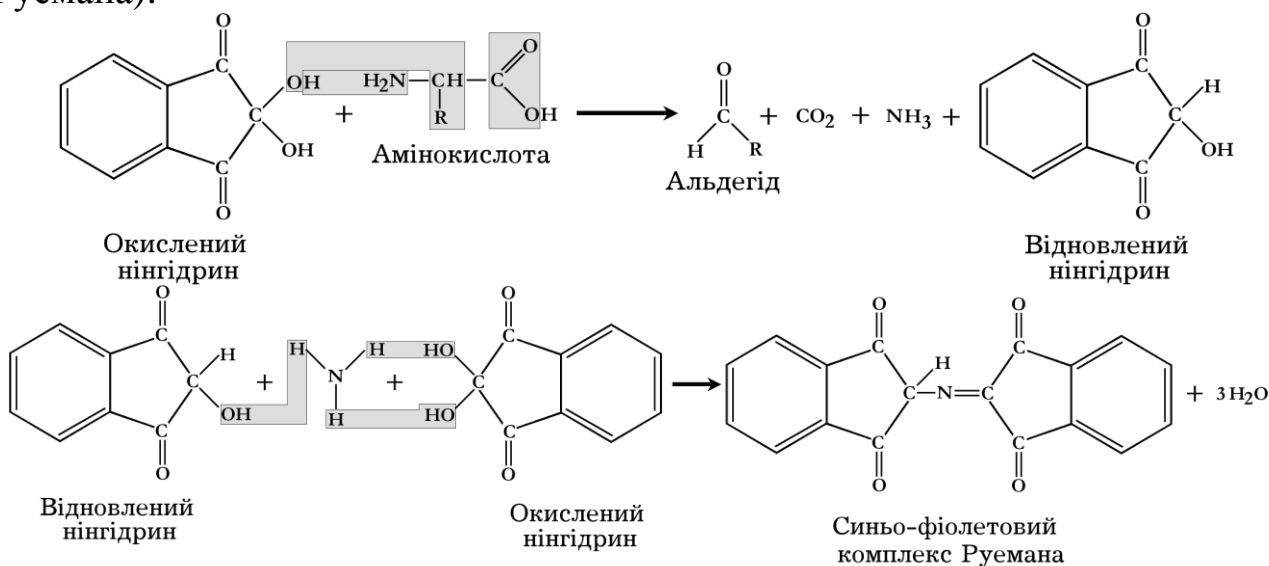


Хід роботи

1. У пробірку налити 1 мл 10% розчину яєчного білка.
2. Додати 2 мл 10% NaOH.
3. Додати 0,2 мл 1% розчину сульфату міді (II).
4. Результати спостережень занести до лабораторного зошита.

2) Нінгідринова реакція

Реакція властива як для вільних амінокислот, так і тих, які входять до складу білків та поліпептидів. При кип'ятінні білка з розчином нінгідрину (трикетогідринденгідрат), амінокислоти окислюються з утворенням вуглекислого газу, аміаку і альдегіду. Нінгідрин при цьому відновлюється. Відновлений нінгідрин конденсується з аміаком і молекулою окисленого нінгідрину, утворюючи сполуку синьо-фіолетового кольору (комплекс Руемана):



Хід роботи

1. У пробірку внести 1 мл 10% розчину білка.
2. Додати 1 мл 0,5% розчину нінгідрину.
3. Суміш кип'ятити 1-2 хвилини.
4. Результати спостережень занести до лабораторного зошита.

3) Ксантопротеїнова реакція

Ксантопротеїнова реакція застосовується для визначення наявності ароматичних амінокислот: триптофану, фенілаланіну, тирозину.

В цій реакції залишки амінокислоти тирозину, наявні в білку, взаємодіють з нітратною кислотою з утворенням динітротирозину. Динітротирозин має жовтий колір, який після додавання лугу переходить в оранжевий.



1. У пробірку внести 1 мл 10 %-го розчину яєчного білка.
2. Додати 0,5 мл концентрованої HNO_3 .
3. Обережно нагріти на водяній бані.
4. Охолодити та додати 2 мл 10 %-го розчину NaOH .
5. Результати спостережень занести до лабораторного зошита.

Реакція Фоля вказує на наявність у білках амінокислот цистину та цистеїну, які містять сірку. Цистеїн є замінною амінокислотою, яка може синтезуватися у нашому організмі з серину за участю вітаміну В₆. Цистин складається з двох молекул цистеїну, зв'язаних дисульфідним зв'язком. Цистеїн входить до складу білків кератинів, які є складовими нігтів, шкіри і волосся. Крім того, дана амінокислота бере участь у синтезі травних ферментів та важливого клітинного антиоксиданту глутатіону.

Принцип реакції полягає в тому, що сірковмісні амінокислоти (цистин і цистеїн) білків при нагріванні в присутності NaOH руйнуються з утворенням сульфідів натрію. Останній реагує з іонами свинцю з утворенням чорного осаду сульфідів свинцю:



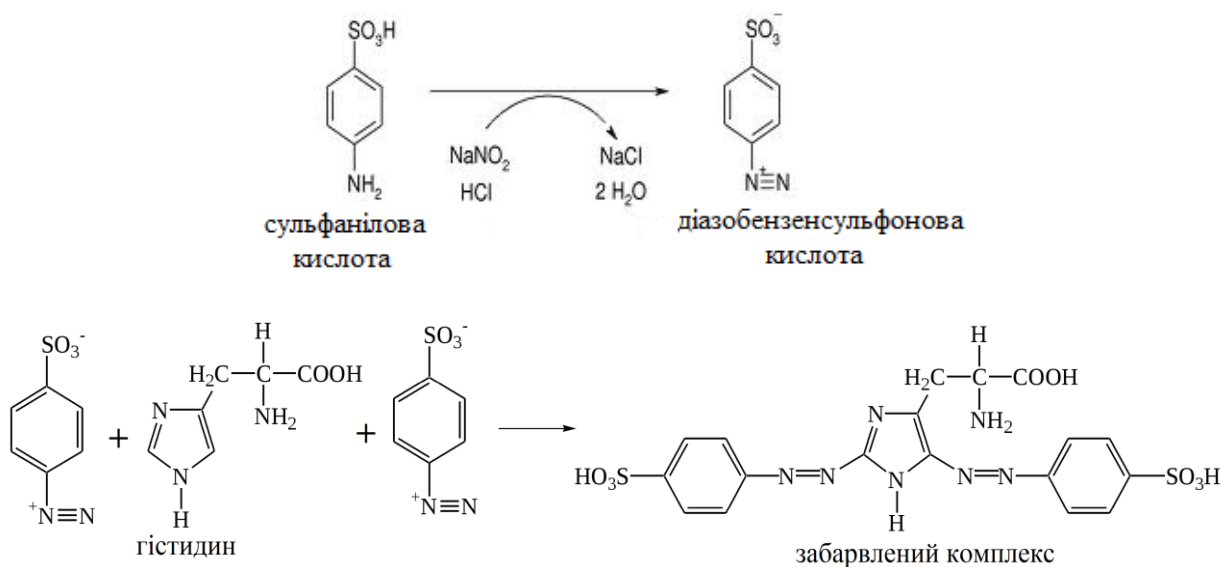


Хід роботи

1. У дві пробірки налити:
 - в першу – 1 мл 10 % розчину яєчного білка,
 - в другу – 1 мл 1% розчину желатину.
2. Додати по 1 мл 30% розчину NaOH.
3. Додати по одній краплі 5% розчину ацетату свинцю.
4. Нагрівати впродовж трьох хвилин на водяній бані.
5. Результати спостережень занести до лабораторного зошита.

5) Реакція Паулі (на виявлення амінокислот гістидину та тирозину)

Реакція Паулі дозволяє виявити в білках амінокислоти гістидин та тирозин. Гістидин є умовно незамінною кислотою (незамінна для дітей). Окрім будівельної функції у білках, гістидин використовується для синтезу гістаміну, важливого медіатора запалення та алергічних реакцій. Тирозин належить до замінних амінокислот в організмі людини і може синтезуватися з незамінної амінокислоти фенілаланіну. Принцип реакції Паулі полягає у тому, що гістидин і тирозин утворюють з діазобензолсульфоною кислотою комплексні сполуки жовто-червоного кольору. Діазобензолсульфонова кислота утворюється в реакції діазотування при взаємодії сульфанілової кислоти з нітритом натрію у кислому середовищі.



Хід роботи

1. У пробірку налити 0,25 мл 1% розчину сульфанілової кислоти.
2. Додати 0,5 мл 0,5% розчину NaNO_2 .

3. Вміст пробірки струсити і швидко додати 0,5 мл 10 % розчину яєчного білка.
4. Перемішати та додати 0,5 мл 10% розчину Na_2CO_3 .
5. Результати спостережень занести до лабораторного зошита.

Назва реакції	Спостереження	Чим зумовлена реакція
---------------	---------------	-----------------------

Лабораторна робота № 2

Фізико-хімічні властивості білків

Властивості білків визначаються хімічним складом, розмірами та формою молекули. Білки мають молекулярну масу від шести тисяч до мільйону і більше дальтонів (для білків-олігомерів). Фібрилярні білки не розчиняються у воді, оскільки містять переважно гідрофобні радикали, рівномірно розташовані вздовж витягнутої молекули. Глобулярні білки утворюють гідрофільні колоїди з розміром частинок 1-100 нм, в яких молекули води оточують глобули гідратними оболонками і взаємодіють з полярними групами на їх поверхні. Під дією зовнішніх факторів може відбуватися порушення структурної організації білкової молекули при збереженні первинної структури. При цьому білок втрачає свої нативні фізико-хімічні та біологічні властивості. Цей процес називається денатурацією. В основі денатурації лежить руйнування зв'язків, які стабілізують вищі структури білків (четвертинна, третинна, вторинна). Більшість білків денатують при нагріванні їх розчинів вище 50-60°C, хоч відомі термофільні бактерії, білки яких витримують температуру до 90°C. До хімічних чинників, що спричиняють денатурацію, належать кислоти, луги, органічні розчинники (спирт, ацетон), детергенти, алкалоїди, солі важких металів (олова, ртуті, міді, кадмію та ін.). Найкраще білки денатують в дуже кислих ($\text{pH} < 2$) або дуже лужних ($\text{pH} > 10$) середовищах.

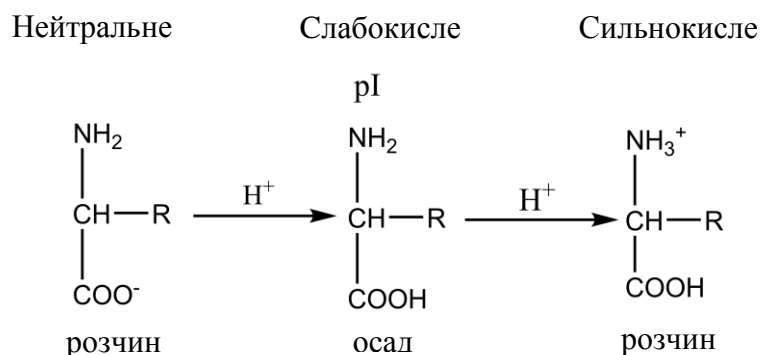
Реактиви

10% розчин яєчного білка
 1% розчини CH_3COOH
 10% розчини CH_3COOH
 10% розчин NaOH
 насичений розчин NaCl
 Етанол 96%
 Ацетон

HCl концентрована
 HNO_3 концентрована
 7 % розчин CuSO_4
 5% розчин AgNO_3
 10% сульфосаліцилова кислота
 10% трихлороцтова кислота

1) Осадження білків нагріванням

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



Хід роботи

1. У три пронумеровані пробірки налити по 2 мл 10% розчину яєчного білка (проявляє кислотні властивості, див. Рис).
2. Вміст пробірки №1 нагріти на відкритому полум'ї.
3. В пробірку №2 додати 0,2 мл 1% розчину CH_3COOH і нагріти. Випаде білий осад білка як результат втрати заряду і наближення до ізоелектричної точки.
4. В пробірку №3 додати 0,2 мл 10% розчину CH_3COOH і нагріти. Випадання білкового осаду не спостерігається навіть при кип'ятінні, оскільки в сильно кислому середовищі молекули білка мають позитивний заряд.
5. Результати спостережень занести до лабораторного зошита

№ проб.	рН середовища	Висновки
1	Нейтральне	
2	Слабокисле	
3	Кисле	

2) Осадження білків органічними розчинниками

Більшість білків нерозчинні в органічних розчинниках (спирт, ацетон). Органічні розчинники дегідратують білки, руйнуючи водну оболонку і тим самим знижуючи їхню стійкість у розчині.

Хід роботи

1. У дві пробірки налити по 0,5 мл 10% розчину яєчного білка.
2. У пробірку №1 додати 2 мл етилового спирту. Розчин стане каламутним.
3. У пробірку № 2 додати 2 мл ацетону.
4. В обидві пробірки додати по 0,5 мл насиченого розчину хлориду натрію.
5. Результати спостережень занести до лабораторного зошита.

3) Осадження білків концентрованими мінеральними кислотами

Концентровані мінеральні кислоти викликають денатурацію білка. При цьому утворюються комплексні солі білка з кислотами. Винятком є ортофосфорна кислота, при додаванні якої до розчину білка осаду не спостерігається. Осади білка розчиняються в надлишку всіх мінеральних кислот, крім азотної, можливо, за рахунок перезарядження білка і часткового гідролізу.

Хід роботи

1. У три пробірки налити по 1 мл концентрованих кислот: №1 – HCl, №2 – HNO₃.
2. У обидві пробірки обережно по стінці налити по 1 мл 10%-го розчину білка.

На межі між двома шарами рідин утворюється осад білка у вигляді тоненької білої плівочки. При струшуванні спостерігається розчинення білків у соляній кислоті, а в азотній осад не зникає.

Результати спостережень занести до лабораторного зошита.

4) Осадження білків органічними кислотами

Білки із розчинів можуть осаджуватись також і органічними кислотами. Трихлороцтова та сульфосаліцилова кислоти є дуже чутливими і специфічними реактивами на білки.

Хід роботи

1. У дві пробірки налити по 1 мл 10%-го розчину білка.
2. В пробірку №1 додати 0,4 мл 10%-го розчину сульфосаліцилової кислоти.
3. В пробірку №2 додати 1,5 мл 10% трихлороцтової кислоти.
4. В пробірках утворюються осади білків.
5. Результати спостережень занести до лабораторного зошита.

5) Осадження білків солями важких металів

Білки при взаємодії із солями Pb, Cu, Ag, Hg адсорбують їх, утворюючи солеподібні і комплексні сполуки, нерозчинні у воді, але розчинні у надлишку солі (крім AgNO_3 , HgCl_2).

Хід роботи

1. У дві пробірки внести по 1 мл 10% розчину яєчного білка.
2. У пробірку № 1 додати 0,2 мл 7% розчину CuSO_4 .
3. У пробірку № 2 додати 0,2 мл 5% розчину AgNO_3 .
4. До пробірки № 1 додати ще 1-2 мл 7% розчину CuSO_4 . При цьому відбувається розчинення осаду.
5. В пробірку № 2 додати 1-2 мл AgNO_3 – розчинення осаду не спостерігається.
6. Результати спостережень та висновки занести до лабораторного зошита у вигляді таблиці.

Осаджувач	Висновки
-----------	----------

Лабораторна робота № 3 Діаліз білків

Процес розділення високомолекулярних і низькомолекулярних частинок за допомогою напівпроникних мембран називається діалізом. Метод діалізу ґрунтується на нездатності колоїдних частинок проходити через напівпроникні бар'єри: штучні мембрани, колодій, целофан, пергамент та ін. Частинки білка мають великий діаметр і тому не проникають крізь такі мембрани. Діаліз широко використовують для очищення білків від низькомолекулярних домішок (органічних і неорганічних); останні легко проходять через пори напівпроникних мембран. Прилад, який використовується для діалізу, називається діалізатором. Найпростішим діалізатором може слугувати колодієвий або целофановий мішечок, занурений у склянку з водою. Розчин білка поміщають в целофановий мішечок; при цьому молекули низькомолекулярних речовин дифундують через мембрану, а колоїдний розчин білка залишається в мішечку.

Методом діалізу можна частково розділити глобуліни та альбуміни. По мірі переходу солей в навколишнє середовище глобуліни будуть випадати в осад, оскільки вони розчинні лише за наявності електролітів, альбуміни будуть залишатися в розчині.

Реактиви

5% розчин NaCl, 10% розчин HNO₃, 1% розчин AgNO₃, 10% розчин NaOH, 1% розчин CuSO₄, яєчний білок.

Хід роботи

1) Приготування сольового розчину білка

До 0,5 мл яєчного білка додати 5 мл 5% розчину хлориду натрію. Цей розчин налити в целофановий мішечок.

2) Діаліз

Верхній край мішечка щільно перев'язати ниткою і опустити мішечок у склянку з дистильованою водою на 1 годину. Через деякий час вміст мішечка помутніє, а потім випаде осад глобуліну. Після закінчення діалізу з невеликими порціями діалізату (зовнішня рідина) провести якісні реакції на наявність хлоридів і білка і переконатися в тому, що сіль дифундувала в посудину, а білок залишився в мішечку.

3) Проба на хлориди в діалізаті

До 2 мл діалізату додати 0,2 мл 10% розчину азотної кислоти і 0,2 мл 1% розчину нітрату срібла. Результати спостережень занести до лабораторного зошита.

4) Проба на білок (біуретова реакція) в діалізаті

До 2 мл діалізату додати 1 мл 10% розчину їдкого натру і 0,2 мл 1% розчину сульфату міді. Синє забарвлення свідчить про відсутність білка в діалізаті. Результати спостережень занести до лабораторного зошита.

5) Проба на білок в рідині, що піддавалась діалізу

З двома мілілітрами рідини з мішечку провести біуретову реакцію, як вказано вище. Червоно-фіолетове забарвлення свідчить про наявність білка в рідині, що піддавалась діалізу. Результати спостережень занести до лабораторного зошита.

ВУГЛЕВОДИ

Лабораторна робота № 4 Якісні реакції на вуглеводи

Вуглеводи – це переважно органічні сполуки з емпіричною формулою C_m(H₂O)_n, до складу яких входять Карбон, Оксиген та Гідроген. Вуглеводи входять до складу клітин всіх живих організмів. Розрізняють три головні класи вуглеводів: моносахариди, олігосахариди і полісахариди.

Моносахариди або прості вуглеводи – це похідні багатоатомних спиртів, які містять альдегідну або кетонну групу. Найпоширеніші в природі моносахариди – глюкоза та фруктоза. *Олігосахариди* – це коротколанцюгові молекули, що складаються з 2-10 моносахаридних одиниць (або моносахаридних залишків), з'єднаних глікозидними зв'язками. Найпоширенішими серед них є дисахариди, що містять дві моносахаридні одиниці. Типовими представниками дисахаридів є сахароза (тростинний чи буряковий цукор), мальтоза та лактоза. *Полісахариди* – високомолекулярні продукти конденсації моносахаридів, які зв'язуються один з одним глікозидними зв'язками та утворюють лінійні або розгалужені ланцюги. Полісахариди поділяються на гомополісахариди, які складаються тільки з моносахаридних одиниць одного типу, і гетерополісахариди, які містять два і більше типів моносахаридних одиниць. До гомополісахаридів належать целюлоза, крохмаль та глікоген.

Реактиви

1 % розчин глюкози

1 % розчин фруктози

1 % розчин мальтози

1 % розчин сахарози

1 % розчин крохмалю

Розчин Люголя

(0,1 % р-н I_2 в 1 % р-ні KI)

10 % розчин NaOH

2 % розчин $CuSO_4$

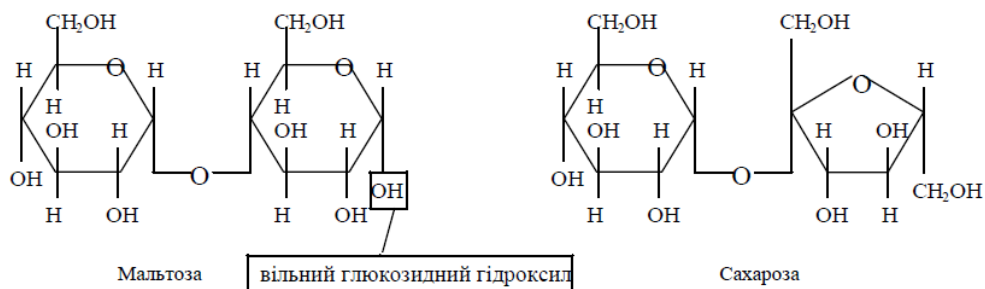
1% розчин лактози

Реактив Барфедда (6,6% розчин ацетату міді (II) в 0,8% оцтовій кислоті)

Реактив Фелінга (суміш сульфату міді і лужного розчину сегнетової солі)

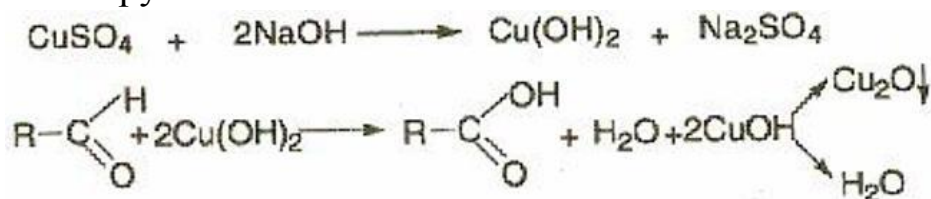
1) Реакція Тромера

Вуглеводи, які містять вільні альдегідні групи, можуть вступати в окисно-відновні реакції. У деяких моно- і дисахаридів у циклічній формі реакційноздатним є глюкозидний (напівацетальний) гідроксил біля першого атома Карбону.



Реакція Тромера полягає в окисненні альдегідної групи вуглеводу з утворенням альдонових кислот при взаємодії з гідроксидом Купруму (II). При цьому останній відновлюється до гідроксиду Купруму (I) зі зміною

забарвлення розчину із синього на жовтий. Гідроксид Купруму (I) жовтого кольору при подальшому нагріванні переходить у оксид Купруму (I) червоного кольору:



При надлишку CuSO_4 у середовищі під час нагрівання може утворюватися оксид Купруму (II) – осад чорного кольору, який заважає визначенню.

Хід роботи

1. У п'ять пронумерованих пробірок додати:
Пробірка №1 – 1 мл 1% розчин глюкози;
Пробірка №2 – 1 мл 1% розчин фруктози;
Пробірка №3 – 1 мл 1% розчин мальтози;
Пробірка №4 – 1 мл 1% розчин сахарози;
Пробірка №5 – 1 мл 1% розчин крохмалю.
2. У кожну пробірку додати по 1 мл 10% розчину NaOH ;
3. По краплях додати розчин сульфату міді до утворення осаду гідроксиду міді.
4. Поставити пробірки на водяну баню на 3-5 хв.
5. Результати спостережень занести до лабораторного зошита у вигляді таблиці.

№ проб	Вуглевод	Колір після нагрівання	Висновки
--------	----------	------------------------	----------

2) Реакція Фелінга

Принцип реакції такий самий, як і з реактивом Тромера. Під час нагрівання досліджуваного вуглеводу з реактивом Фелінга при наявності вільної альдегідної групи у вуглеводі утворюється червоний осад оксиду Купруму (I). Відмінність полягає в тому, що сегнетова сіль (Na, K -тартрат), яка входить до реактиву Фелінга, зв'язує надлишок йонів Купруму, запобігаючи утворенню чорного осаду оксиду Купруму (II).

Сахароза, на відміну від глюкози, мальтози та інших відновлюючих вуглеводів, дає негативну реакцію з реактивом Фелінга. Залишки глюкози і фруктози, які входять до складу сахарози, сполучені за рахунок своїх напівацетальних гідроксильних груп і не містять групи, яка б могла вступати в реакцію відновлення. При кип'ятінні з сірчаною кислотою відбувається гідролітичне розщеплення сахарози з утворенням глюкози і

фруктози. Перша має відновні властивості і дає позитивну реакцію з реактивом Фелінга.

Хід роботи

1. У чотири пробірки налити по 1 мл наступних розчинів:
Пробірка №1 – 1% розчин глюкози;
Пробірка №2 – 1% розчин фруктози;
Пробірка №3 – 1% розчин мальтози;
Пробірка №4 – 1% розчин сахарози.
2. У кожену пробірку додати по 1 мл реактиву Фелінга.
3. Поставити пробірки на киплячу водяну баню на 3-5 хвилин.
4. Результати спостережень занести в таблицю.

№ проб	Вуглевод	Колір після нагрівання	Висновки
--------	----------	------------------------	----------

3) Виявлення продуктів гідролітичного розщеплення крохмалю

Крохмаль – рослинний гомополісахарид, який складається з двох фракцій – амілози та амілопектину. Амілоза – лінійний полісахарид, молекули якого містять від 200 до 1000 мономерів (залишків глюкози), тоді як амілопектин – розгалужений полісахарид із залишків глюкози. При додаванні йоду амілоза зафарбовується в синій колір, а амілопектин – у червоно-фіолетовий. Поява синього забарвлення зумовлена утворенням комплексу (клатрату), в якому частинки йоду («молекули-гості») вбудовуються в кристалічну структуру амілози («молекул-господарів»).

При нагріванні крохмалю з мінеральними кислотами або при дії ферментів амілаз відбувається гідроліз з утворенням проміжних продуктів розпаду – декстринів та кінцевих – дисахариду мальтози і моносахариду глюкози. Продукти гідролізу не дають інтенсивного синього забарвлення при взаємодії з йодом.

Хід роботи

1. У п'ять пронумерованих пробірок налити по 3 мл дистильованої води.
2. У всі пробірки додати по 1 краплі розчину йоду.
3. У окрему пробірку (№6) додати 3 мл 1% розчину крохмалю та 1 мл 10% H_2SO_4 .
4. Вміст пробірки №6 перемішати та помістити її на киплячу водяну баню.
5. Через кожні 3 хв інкубації на водяній бані здійснювати відбір частини суміші і у кількості 2 краплі переносити у пронумеровані пробірки, які містять розчин йоду, за наступною схемою:
0 хв інкубації – внесення 2 крапель суміші у пробірку №1

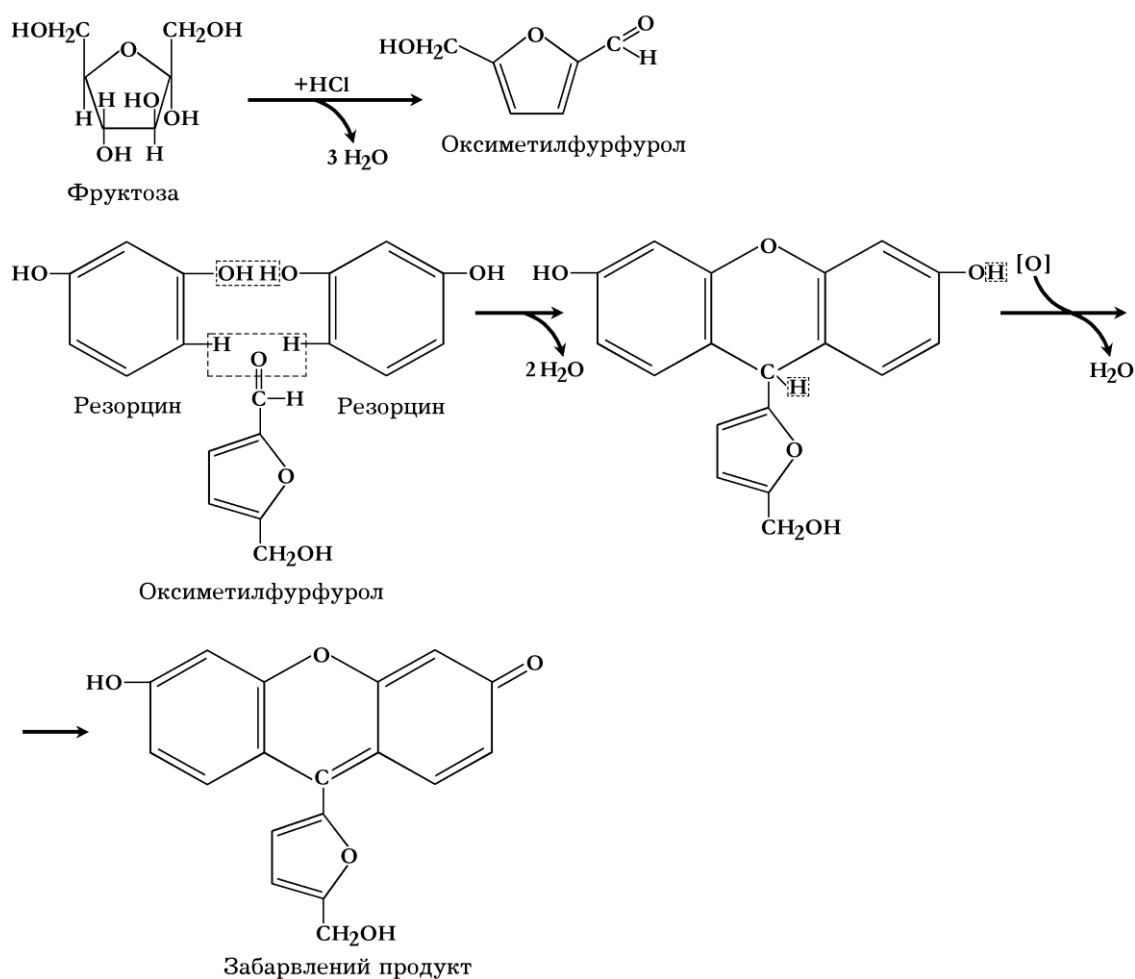
- 3 хв інкубації – внесення 2 крапель суміші у пробірку №2
 5 хв інкубації – внесення 2 крапель суміші у пробірку №3
 7 хв інкубації – внесення 2 крапель суміші у пробірку №4
 10 хв інкубації – внесення 2 крапель суміші у пробірку №5
 6. Результати спостережень занести в таблицю.

№ проб	Час кипіння	Колір з розчином I ₂	Продукт гідролізу
--------	-------------	---------------------------------	-------------------

Лабораторна робота № 5

Кількісне визначення фруктози на основі реакції Селіванова

Принцип реакції Селіванова на кетозу полягає у здатності кетоз як у вільному стані, так і при відщепленні від складних вуглеводів вступати в реакцію з соляною кислотою, внаслідок чого вони в присутності резорцину при нагріванні дають продукти конденсації, які мають червоне забарвлення. У випадку фруктози реакція проходить з утворенням оксиметилфурфуролу (див. рівняння).



Реактиви:

Реактив Селіванова: 0,05% розчин резорцину в 10 % хлоридній кислоті; стандартний розчин фруктози (0,5 мг/мл), досліджувані розчини фруктози.

Хід роботи

Для побудови калібрувального графіка в 6 пробірок налити необхідні реагенти згідно таблиці:

№	Кількість фруктози в пробі, мг	Об'єм стандартного розчину фруктози, мл	Об'єм води, мл	Об'єм реактиву Селіванова, мл
1	0	0	1	3
2	0,1	0,2	0,8	3
3	0,2	0,4	0,6	3
4	0,3	0,6	0,4	3
5	0,4	0,8	0,2	3
6	0,5	1,0	0	3

Досліджувані проби, які містять 0,1-0,5 мг фруктози, обробити так само, як і стандартні. Вміст пробірок перемішати і помістити у водяну баню з температурою 80° С. Через 8 хв проби охолодити і визначити інтенсивність червоного забарвлення на фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 490 нм. Дані подати графічно, відкладаючи по осі абсцис кількість фруктози в пробі, а на осі ординат – відповідну величину оптичної густини. За калібрувальним графіком розрахувати вміст фруктози у дослідних зразках.

ЛІПІДИ

Лабораторна робота № 6

Вивчення властивостей нейтральних жирів

Ліпіди – це жироподібні сполуки різноманітної структури, нерозчинні у воді, але розчинні у неполярних органічних розчинниках. Ліпіди поділяються на нейтральні жири або триацилгліцериди, воски, стероїди, фосфоліпіди та гліколіпіди. Нейтральні жири є однією з основних груп ліпідів і за структурою це складні ефіри жирних кислот та триатомного спирту гліцеролу. Вони містяться у цитоплазмі клітин або відкладаються у вигляді запасного жиру. При гідролізі жири розщеплюються на гліцерин і жирні кислоти. За певних умов жири гідрогенізуються (приєднують до себе Гідроген), омилуються, емульгуються, окислюються тощо.

Реактиви

96 % етанол

Ацетон

Хлороформ

Рослинна олія

Мильний розчин

Жовч

10 % розчин яєчного білка

20 % розчин Na_2CO_3

Концентрований жовток

Спиртовий розчин жовтка

H_2SO_4 концентрована

10 % NaOH

1) Розчинність жирів

Дана властивість зумовлена здатністю нейтральних жирів розчинятись у неполярних органічних розчинниках.

Хід роботи

1. У чотири пронумеровані пробірки додати по 0,2 мл рослинної олії.

2. У пробірки додати по 1 мл наступних розчинників:

Пробірка №1 – води;

Пробірка №2 – етанолу;

Пробірка №3 – ацетону;

Пробірка №4 – хлороформу.

3. Ретельно струсити вміст пробірок.

4. Записати в лабораторний зошит висновки (у вигляді таблиці) щодо розчинності жирів.

Вода	Спирт	Ацетон	Хлороформ
------	-------	--------	-----------

2) Утворення емульсії

Властивість зумовлена здатністю емульгаторів різко знижувати поверхневий натяг на межі фаз «вода/олія».

Хід роботи

1. У п'ять пронумерованих пробірок додати по 0,2 мл рослинної олії.

2. У пробірки додати по 1 мл наступних розчинників:

Пробірка № 1 – води;

Пробірка № 2 – мильного розчину;

Пробірка № 3 – розчину білка;

Пробірка № 4 – 20 % розчину Na_2CO_3 ;

Пробірка № 5 – 10 % розчину NaOH .

3. Ретельно перемішати вміст пробірок.

4. Записати в таблицю висновки щодо здатності досліджуваних рідин емульгувати жири.

Вода	Мило	Білок	Na_2CO_3	NaOH
------	------	-------	--------------------------	---------------

Лабораторна робота № 7

Дослідження складу ліпідів

1) Виявлення лецитину в жовтку курячого яйця

Лецитини (фосфатидилхоліни) – складні ефіри аміноспирту холіну і диацилгліцеридфосфорної кислоти – є одними з найбільш поширених представників фосфоліпідів. При розщепленні лецитинів утворюються вищі жирні кислоти (пальмітинова, стеаринова, олеїнова і арахідонова), гліцерофосфатидна кислота і холін. Лецитин бере участь в утворенні мембран клітин, і їх особливо багато в нервових волокнах та головному мозку. Значна кількість лецитину знайдена в мозку, нервах, яєчному жовтку, рибній ікрі. Лецитини не розчиняються у воді та ацетоні, але добре розчиняються в етиловому спирті, ефірі і хлороформі. Тому вони можуть бути виділені з розчину додаванням ацетону або води.

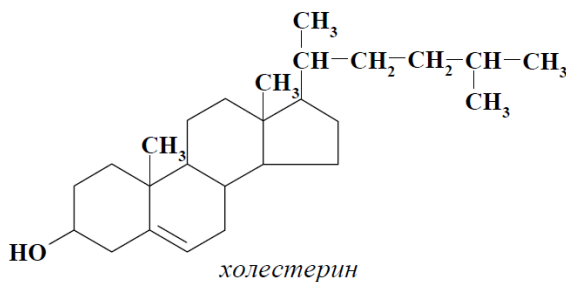
Хід роботи

1. У дві пробірки додати:
2. Пробірка № 1 – 10 крапель ацетону та 1-2 краплі концентрованого жовтка. Випадає білий осад.
3. Пробірка №2 – 20 крапель спиртового розчину жовтка та декілька крапель дистильованої води до утворення емульсії.
4. Результати спостережень та висновки занести в таблицю.

Ацетон	Вода
--------	------

2) Якісна реакція на холестерин (реакція Сальковського)

Холестерин належить до стероїдів та міститься в клітинних мембранах всіх тварин. Під дією концентрованої сірчаної кислоти відбувається перетворення холестерину з вторинного спирту в ненасичений вуглеводень, який дає специфічні кольорові реакції.



Хід роботи

1. В суху пробірку додати 1 мл спиртового розчину жовтка.

2. Обережно по стінках пробірки додати 0,5 мл концентрованої H_2SO_4 . На межі розподілу рідин з'являється червоне кільце. Результати спостережень занести до лабораторного зошита.

ВІТАМІНИ

Лабораторна робота №8 Якісні реакції на вітаміни

Вітаміни – низькомолекулярні органічні речовини, що мають різноманітну хімічну природу. Розрізняють водорозчинні (вітаміни С, Р, групи В, РР) та жиророзчинні вітаміни (А, Д, Е, К, F). Вітаміни відносяться до незамінних факторів харчування. Більшість вітамінів міститься в достатніх кількостях у звичайних продуктах харчування тваринного і рослинного походження – овочах, фруктах, соняшниковій олії, м'ясі, печінці, яйцях, різних крупах та ін. Для виявлення вітамінів у харчових продуктах і біологічних об'єктах використовуються якісні реакції.

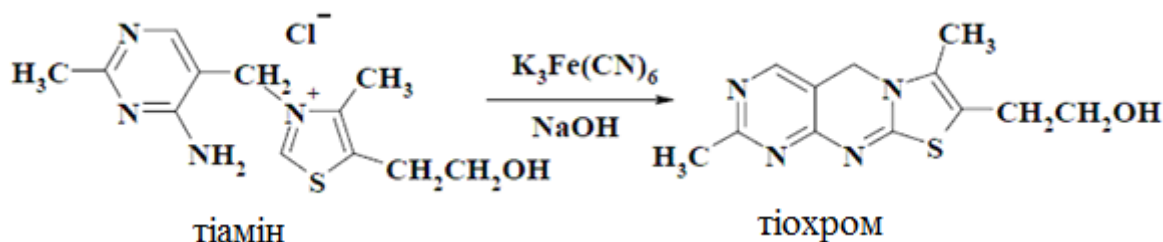
Реактиви

5 % розчин тіаміну
0,025% розчин рибофлавіну
5 % розчин піридоксину
10% розчину CH_3COOH
Спиртовий розчин вітаміну Е
5% розчин $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Cu}$
Концентрована HNO_3

5% розчин $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$
10 % розчин HCl
10% розчин NaOH
Zn металічний
5 % розчин FeCl_3
1 % розчин FeCl_3

1) Виявлення вітаміну B_1

Вітамін B_1 (тіамін) відіграє важливу роль в організмі, регулюючи обмін білків, жирів і вуглеводів. У природі він зустрічається у вільному та зв'язаному станах. Продукти рослинного походження (дріжджі, злаки) багатші на цей вітамін, ніж продукти тваринного походження. Принцип реакції, яка лежить в основі наведеного методу визначення, полягає у здатності тіаміну в лужному середовищі за наявності $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ перетворюватись у тіохром – пігмент жовтого кольору. Останній флуоресцює в ізобутиловому спирті.

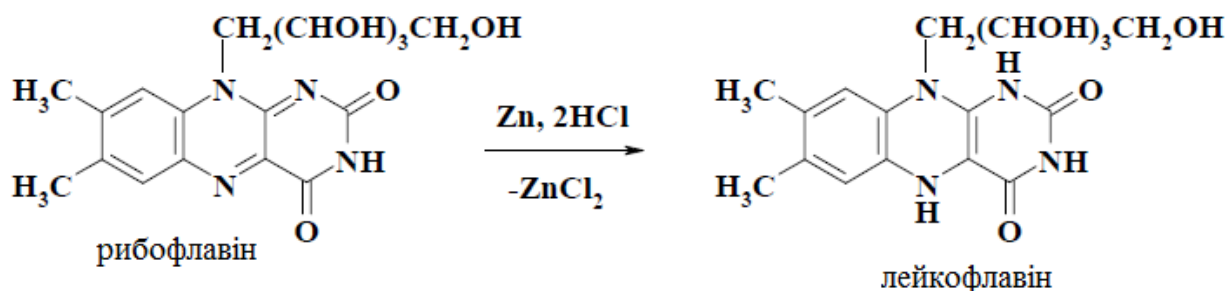


Хід роботи

1. У пробірку налити 0,2 мл 5%-го розчину тіаміну.
2. Додати 1 мл 10%-го розчину NaOH.
3. Додати 0,2 мл 5%-го розчину $K_3[Fe(CN)_6]$.
4. Пробірку нагріти. Спостерігається поява жовтого забарвлення.
5. Результати спостережень занести до таблиці.

2) Відновлення вітаміну B₂

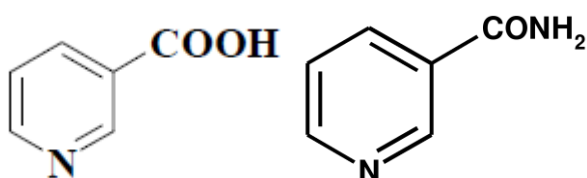
Рибофлавін, або вітамін B₂, міститься в дріжджах, пшениці, картоплі та інших рослинних продуктах. Нестача цього вітаміну в організмі людини і тварин призводить до зниження ваги, порушення апетиту, запалення слизової оболонки та інших патологічних змін. У чистому вигляді – це речовина жовтого кольору. При відновленні рибофлавіну змінюється забарвлення: від жовтого (рибофлавін) до червоного (родофлавін) і, зрештою, безбарвного (лейкофлавін). Якісне визначення рибофлавіну полягає в тому, що водень, який утворюється при додаванні металічного цинку до концентрованої соляної кислоти, відновлює рибофлавін до червоного родофлавіну, а потім у безбарвний лейкофлавін. При цьому жовтий колір розчину переходить в рожевий, а потім знебарвлюється.



Хід роботи

1. У пробірку додати 1 мл 0,025% розчину рибофлавіну.
2. Додати 0,5 мл 10% розчину HCl.
3. У пробірку додати 1 зернятко Zn.
4. Водень, який виділяється, реагує з рибофлавіном, і розчин змінює забарвлення з жовтого на червоний та рожевий.
5. Результати спостережень занести до таблиці.

3) Виявлення вітаміну PP



Вітамін PP (нікотинова кислота, нікотинамід, вітамін B₃) синтезується в організмі людини з амінокислоти триптофану. Нікотинамід необхідний для забезпечення окисно-відновних

процесів в організмі, синтезу стероїдів, жирних кислот та знешкодження ксенобіотиків. Нікотинова кислота активує синтез простагландинів, покращуючи мікроциркуляцію судин.

Нікотинова кислота при нагріванні з розчином ацетату міді (II) утворює синій осад нікотинату міді.

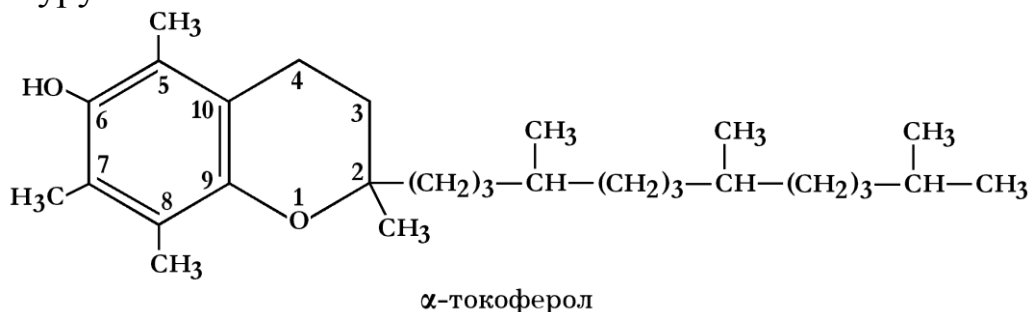
Хід роботи

1. У пробірку з 5 мг нікотинової кислоти додати 1 мл 10% розчину CH_3COOH .
2. Суміш перемішати та нагріти до кипіння на водяній бані.
3. Додати 1 мл 5% розчину $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Cu}$.
4. Результати спостережень занести до таблиці.

4) Виявлення вітаміну E

Вітамін E (токоферол) вважається одним з найбільш активних жирозчинних антиоксидантів. Найважливіші джерела вітаміну E – рослинні олії (соняшникова, бавовняна, соєва, кукурудзяна тощо), а також салат, капуста та насіння злаків. З продуктів тваринного походження вітамін E міститься в м'ясі, вершковому маслі, яєчному жовтку.

Взаємодія α -токоферолу з концентрованою азотною кислотою призводить до забарвлення реакційної суміші в червоний колір. Це зумовлене тим, що продукт окислення α -токоферолу має хіноїдну структуру.



Хід роботи

1. У пробірку додати 0,1 мл спиртового розчину вітаміну E.
2. Додати 1 мл концентрованої HNO_3 .
3. Пробірку інтенсивно струсити. Спостерігають появу червоного забарвлення.
4. Результати спостережень занести до таблиці.

Досліджуваний вітамін	Спостереження	Чим зумовлена реакція
-----------------------	---------------	-----------------------

ФЕРМЕНТИ

Лабораторна робота №9 Вплив різних чинників на активність α -амілази слини

На активність ферментів впливають концентрації субстратів, температура, рН середовища, низькомолекулярні сполуки тощо. Зростання швидкості ферментативної реакції зі збільшенням температури зумовлене підвищенням швидкості дифузії молекул. Таке збільшення відбувається до певної температури (“температурного оптимуму” ферменту), вище якого швидкість реакції знижується внаслідок термічної денатурації ферменту. Більшість ферментів проявляє максимальну активність при температурах 20-40°C.

Значення рН, при якому активність ферменту є максимальною, називають рН-оптимумом. Існування рН-оптимуму зумовлене тим, що в цьому діапазоні ступінь іонізації амінокислотних залишків активних центрів, які беруть участь у процесі каталізу, є найсприятливішою для каталізу.

Фермент α -амілаза слини каталізує гідроліз α -1-4-глікозидного зв'язку крохмалю і глікогену. Гідроліз крохмалю під впливом амілази проходить стадії утворення декстринів. Нерозщеплений крохмаль з йодом дає синє забарвлення. Декстрини в залежності від розміру дають з йодом різне забарвлення – фіолетове, червоно-буре, жовте. Жовтий колір свідчить про повний гідроліз крохмалю. На активність ферменту впливають концентрації субстратів, температура, рН середовища, низькомолекулярні сполуки тощо.

Реактиви

0,1% і 0,5% розчини крохмалю, 0,1% розчин йоду в 0,2% розчині йодиду калію, набір 50 мМ калій-фосфатних буферів з різним значенням рН (в діапазоні 6,0-8,0), слина (або кристалічний препарат амілази слини), дистильована вода.

Хід роботи

1) Вплив температури на активність амілази слини

Взяти 5 чистих пробірок. В першу додати 2 мл дистильованої води, в другу – 1,9 мл, третю, четверту і п'яту – по 1 мл. В окремій пробірці розвести слину дистильованою водою у співвідношенні 1:9 (наприклад, 1 мл слини в 9 мл дистильованої води). Для оцінки залежності активності від кількості ферменту у першу пробірку амілаза не додається, в другу пробірку додати 0,1 мл розведеної слини, а в третю – 1 мл. У третю і четверту пробірки внести також по 1 мл розведеної слини. Потім у всі п'ять пробірок додати по 2 мл 0,1% розчину крохмалю, добре збовтати та поставити

інкубувати при різній температурі на 30 хв: в термостат при 37°C (першу, другу і третю пробірки), при кімнатній температурі (четверту пробірку) і в холодильник при 4°C (п'яту пробірку). Після інкубації в пробірки додати по одній краплі 0,1% розчину йоду і перемішати. Швидкість реакції оцінити візуально за забарвленням рідини. На основі порівняння інтенсивності забарвлення у перших трьох пробірках, зробити висновок про залежність активності амілази від кількості препарату. Також зробити висновок про температурний оптимум амілази, порівнявши інтенсивність забарвлення у третій, четвертій та п'ятій пробірках.

2) Вплив рН на активність амілази слини

В 5 чистих пробірок налити по 2 мл калій-фосфатного буферу з різним значенням рН. Потім в кожену пробірку додати по 1 мл 0,5% розчину крохмалю та по 1 мл слини (попередньо розведеної в 10 раз). Вміст пробірок перемішати і помістити в термостат на 10 хв при 37°C. Після інкубації в усі пробірки додати по одній краплі 0,1% розчину йоду і 2 мл дистильованої води, перемішати. Спостерігати забарвлення і відмітити рН (оптимум рН), при якому амілаза діє найбільш активно. При оптимальному значенні рН розщеплення крохмалю відбувається повністю (забарвлення з йодом відсутнє). З віддаленням від оптимального значення рН в кислий або лужний бік розщеплення крохмалю відбудеться тільки частково до стадії декстринів (червоно-буре або фіолетове забарвлення) або крохмаль взагалі розщеплюватися не буде (синє забарвлення). Результати оформити у вигляді таблиці. Зробити висновок про рН оптимум амілази.

рН	Активність амілази	Забарвлення
6,0		
6,8		
7,2		
7,6		
8,0		

Лабораторна робота № 10

Визначення активності каталази титриметричним методом (метод А.Н.Баха та А.І.Опаріна)

Каталаза (H_2O_2 : H_2O_2 -оксидоредуктаза, КФ 1.11.1.6) – є тетрамерним гемвмісним ферментом, який дисмутує H_2O_2 до молекулярного кисню та води за наступною схемою:

При цьому одна молекула H_2O_2 виступає донором електронів і протонів, тоді як інша – акцептором.

Принцип методу.

Активність каталази титриметричним методом визначають за кількістю пероксиду водню, що розкладається під дією ферменту. В реакційну суміш вносять надлишок пероксиду водню. В контрольній пробі каталазу інактивують сірчаною кислотою, в дослідній пробі частина внесеного пероксиду водню розкладається під дією ферменту, а частину пероксиду водню, яка не розклалась визначають методом титрування перманганатом калію в кислому середовищі.

При цьому відбувається наступна реакція:



Кількість пероксиду водню, яка розклалась під дією ферменту, в відповідності до наведеної реакції, знаходять за різницею між дослідним і контрольним титруванням.

Реактиви

0,1н розчин KMnO_4 , 10% розчин H_2SO_4 , 0,1н розчин H_2O_2 , карбонат кальцію.

Хід роботи

2 г рослинного матеріалу розтирають з кварцовим піском. Якщо реакція рослинного матеріалу кисла, то в ступку додають невелику кількість карбонату кальцію. В процесі розтирання в ступку невеликими порціями додають 20 мл води. Утворену масу кількісно переносять в центрифужну пробірку і центрифугують 10-15 хв. при 3-5 тис. об/хв.

Для визначення активності ферменту з центрифужної пробірки беруть дві проби по 5 мл ферментної витяжки і переносять їх в конічні колби на 100 мл. В одну з колб, що є контролем, додають 1,25 мл 10% сірчаної кислоти для інактивації ферменту. Після цього в обидві колби додають по 5 мл 0,1н розчину пероксиду водню. Реакцію розкладу пероксиду водню проводять при 20°C на протязі 15 хв. Після додавання кожного реактиву вміст колб добре перемішують. Через 15 хв. фермент в дослідній колбі інактивують додаванням в колбу 1,25 мл 10% сірчаної кислоти.

Потім надлишок пероксиду водню в кожній колбі відтитровують 0.1н розчином перманганату калію до утворення стійкого рожевого забарвлення, яке не змінюється протягом 1 хв.

Розрахунки результатів. Активність каталази виражають в мікромолях пероксиду водню, який розклався під дією ферменту за 1хв. в перерахунку на 1г рослинного матеріалу. Розрахунки проводять за формулою:

$$x = \frac{(aT - bT) \cdot 50 \cdot 20}{n \cdot 5 \cdot 15}$$

де

x- активність каталази,

a – кількість 0.1н розчину перманганату калію, яка пішла на титрування контрольної проби, мл,

b - кількість 0.1н розчину перманганату калію, яка пішла на титрування дослідної проби, мл,

T – поправка до титру 0,1н KMnO_4 ,

50 – коефіцієнт перерахунку на мікромолі H_2O_2 ,

20 – загальний об'єм екстракту, мл,

5 – об'єм ферментного розчину, взятого для аналізу, мл,

15 – час ферментативної реакції, хв.,

n- наважка матеріалу, взятого для аналізу, г.

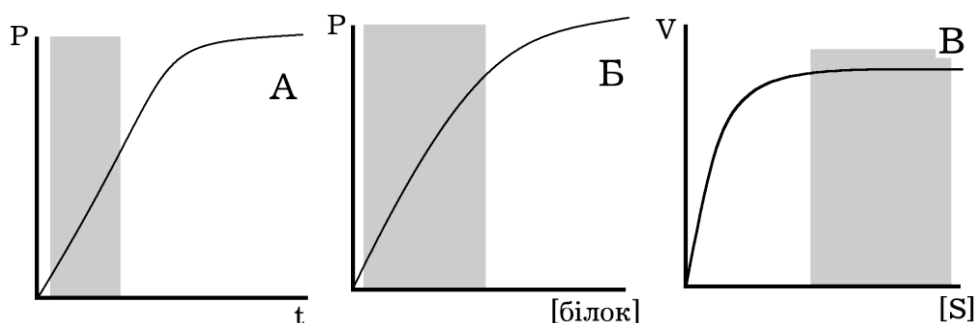
Лабораторна робота № 11

Визначення активності ферментів спектрофотометричним методом

I. Правила коректного визначення активності ферментів

1) Правило 1 (мал. А): Для розрахунків активності ферменту слід вибирати діапазон лінійної зміни концентрації субстрату – S (продукту – P) протягом часу.

Для цього треба на початку роботи реєструвати швидкість реакції протягом кількох хвилин, щоб вибрати лінійний діапазон зміни оптичного поглинання з часом. Зазвичай, швидкість реакції є максимальною на початку, а потім поступово знижується, чим порушується лінійність вказаної залежності. Проте є реакції (наприклад, каталізована глутатіонпероксидазою), в яких швидкість реакції зростає з часом. В цих випадках розрахунки ведуть в діапазоні найвищої швидкості реакції.



2) Правило 2 (мал. Б): Розрахунки активності ферменту слід проводити на основі визначень, для яких швидкість реакції (пронормована на використаний об'єм препарату) не залежить від кількості внесеного в суміш препарату.

Для цього необхідно визначити швидкість реакції для трьох-чотирьох об'ємів препарату і побудувати графік, на осі абсцис якого відкласти об'єми препарату (або вміст білка в ньому), а на осі ординат – зміну оптичного поглинання за хвилину. Для подальших визначень вибирається такий об'єм, який потрапляє в лінійний діапазон графіка.

3) Правило 3 (мал. В): Розрахунки активності ферменту слід проводити на основі визначень, в яких швидкість реакції мало залежить від концентрації субстратів. Як правило, використовують такі концентрації субстратів, які забезпечують 95% від максимальної активності, а концентрації субстратів в ході визначення знижуються не більше, ніж на 10%. Часто вибирають концентрації субстратів у 10 разів більші за константу Міхаеліса.

Малюнки, наведені вище, ілюструють три правила визначення активності ферментів. Сірим кольором позначені ділянки, які використовуються для коректного визначення активності.

II. Приготування супернатантів

1. Гомогенізація

А. Досліджуваний матеріал (мухи, тканини риб, мишей) гомогенізувати у співвідношенні 1:10 (мг мух або тканини : мкл середовища гомогенізації) у середовищі гомогенізації наступного складу (вказано кінцеві концентрації): 50 мМ КФБ (рН 7,0), 0,5 мМ ЕДТА та 1 мМ ФМСФ.

Б. 10 мл вирощеної культури дріжджів осадити центрифугуванням (3 тис. об./хв, 5 хв), промити 5 мл середовища гомогенізації (50 мМ КФБ (рН 7,0), 0,5 мМ ЕДТА та 1 мМ ФМСФ) та ресуспендувати в 0,8 мл цього ж середовища гомогенізації. Перенести отриману суспензію дріжджів із центрифужних пробірок в пластикові мікропробірки місткістю 2 мл, в які попередньо насипати по 0,4 мл скляних кульок діаметром 500-600 мкм виробництва «Sigma-Aldrich Co». Зруйнувати клітини дріжджів шляхом вібрації зі скляними кульками на вортекс-міксері протягом 15 хв у наступному режимі: 1 хв руйнування і 1 хв охолодження на льоду (всього 7 циклів руйнування).

2. Гомогенати відцентрифугувати, 13 000 об/хв, 15 хв, 4°C.

Відібрати супернатанти у чисті пластикові мікропробірки. Проби зберігати на холоді.

III. Визначення активності каталази

У плодової мушки диких типів виявлено два ізоферменти, каталази – одна з них кодується геном *Cat* (*CG6871*), а інша, яка синтезується в сім'яниках, кодується геном *CG9314*. Обидва ізоферменти локалізуються в пероксисомах.

У клітинах *S. cerevisiae* містяться дві форми каталази – каталаза Т, яка локалізована в цитозолі та кодується геном *CTT1* (*YGR088w*), і каталаза А, яка локалізується в пероксисомах і кодується геном *CTA1* (*YDR256c*). При вирощуванні *S. cerevisiae* на середовищі з глюкозою їхні клітини містять порівняно невелику кількість пероксисом. Число пероксисом у дріжджів зростає при утилізації незброджуваних джерел вуглецю – етанолу, гліцеролу, оцтової кислоти та, особливо, жирних кислот, таких, як олеїнова чи ліноленова.

У риб каталаза локалізована переважно у пероксисомах, проте невелика кількість її знайдена у мітохондріях.

Принцип методу

Метод ґрунтується на визначенні швидкості реакції диспропорціювання пероксиду водню під дією каталази. Зміну оптичного поглинання реєструють на спектрофотометрі при довжині хвилі 240 нм (УФ-область) у пробі об'ємом 2 мл, яка містить 50 мМ калій-фосфатний буфер (рН 7,0), 0,5 мМ ЕДТА, 10 мМ H_2O_2 та супернатант. Коефіцієнт молярного поглинання пероксиду водню при вказаній довжині хвилі становить $39,4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Реактиви:

- 400 мМ КФБ, рН 7,0;
- 50 мМ ЕДТА;
- 1М пероксид водню (концентрацію перевірити спектрофотометрично).

Хід роботи

1. Приготувати супернатанти як описано вище.
2. Приготувати суміш для визначення активності каталази:

Компонент	Вихідна концентрація	Кінцева концентрація	На 1 мл	На 16 мл (8 проб)
КФБ (рН 7,0)	400 мМ	50 мМ	125 мкл	2,00 мл
ЕДТА	50 мМ	0,5 мМ	10 мкл	0,16 мл
H_2O	-	-	865 мкл	13,84 мл

3. У кювету послідовно додати:

№	Об'єкт дослідження	Мухи	Дріжджі	Риби та миші
1	$V_{\text{суміші}}$ мкл	985×2	980×2	985×2

2	V _{супернатанту} , МКЛ	10	20	10
3	V _{H2O2} , МКЛ	20	20	20

Оптичне поглинання реєструвати протягом 70 с з інтервалом 5 с на спектрофотометрі при довжині хвилі 240 нм.

4. У супернатантах визначити концентрацію білка за методом Бредфорда

5. Розрахувати питому активність каталази за формулою:

$$A = \frac{\Delta OD_{\text{хв}} \times V_{\text{пр}}}{\epsilon_{240} \times V_{\text{суп}} \times [\text{білок}]} \times 1000,$$

де:

A – активність ферменту, Од/мг білка;

$\Delta OD_{\text{хв}}$ – зміна оптичного поглинання за 1 хв;

$V_{\text{пр}}$ – об'єм проби, мл;

ϵ_{240} – коефіцієнт молярної екстинції для H_2O_2 , $39,4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$;

$V_{\text{суп}}$ – об'єм супернатанту, мл;

[білок] – концентрація білка в супернатанті (мг/мл).

За одну одиницю активності каталази приймають таку кількість ферменту, яка перетворює 1 мкмоль перексиду водню за 1 хвилину в 1 мг білка.

IV. Визначення вмісту загального білка методом Бредфорда

Принцип методу

Метод ґрунтується на здатності білка зв'язуватись з барвником Кумасі яскраво-синім G-250 і утворювати забарвлені у синій колір сполуки ($\lambda_{\text{max}} = 595 \text{ нм}$). Концентрацію білка в досліджуваних пробах розраховують за допомогою калібрувального графіка, побудованого зі стандартним розчином білка.

Реактиви

-стандартний розчин білка 0,05 мг/мл;

-розчин Кумасі G-250 (0,005%, 0,05 мг/мл в 3% $HClO_4$).

Хід роботи

1. Підготувати штатив з пробірками для побудови калібрувального графіка (7 шт.) та проб (кожна у 2-ох повторях).
2. Для побудови калібрувального графіка у пробірки послідовно додати:

Об'єм води, мкл	1000	980	960	920	840	760	680
Об'єм розчину альбуміну (0,05 мг/мл), мкл	0	20	40	80	160	240	320
Маса альбуміну (мкг)	0	1	2	4	8	12	16

3. Одночасно готують досліджувані проби. Кожну досліджувану пробу готувати у двох повторах (дві пробірки).

	Дріжджі	Риби	Мухи
Об'єм води, мкл	980	980	970
Об'єм супернатанту, мкл	20	20	30

4. Додати до всіх пробірок по 1 мл (1000 мкл) розчину Кумасі G-250.
5. Інкубація проб з барвником впродовж 10 хв при кімнатній температурі. Час реєструвати з моменту додавання барвника в останню пробірку до проб для побудови калібрувального графіка.
6. Визначити оптичне поглинання проб при довжині хвилі 595 нм (OD₅₉₅), «обнуливши» прилад відносно першої проби калібрувального графіка, яка не містить білка.
7. Обчислити концентрацію загального білка у досліджуваних супернатантах за формулою:

$$C(\text{мг/мл}) = \frac{OD_{\text{проби}}}{K \cdot V_{\text{супернатанту}}}$$

де:

C – концентрація білка в досліджуваній пробі, мг/мл;

OD_{проби} – оптичне поглинання досліджуваної проби (середнє значення з двох повторів);

K – коефіцієнт перерахунку (з калібрувального графіка);

V_{супернатанту} – об'єм доданого супернатанту, мкл.

Задачі для самостійного розв'язування

1. Яка масова частка розчину натрій карбонату, добутого в результаті розчинення 5 г солі в 45 г води.
2. Скільки грамів купрум (II) сульфату міститься в 15 г 5%-вого його розчину.
3. Скільки грамів барій (II) хлориду і води необхідно взяти для приготування 200г 1%-вого розчину.
4. Яка масова частка розчину алюміній хлориду, якщо в 190 г води розчинили 10 г солі.
5. У 25 г води розчинили 15 г калій гідроксиду. Яка масова частка утвореного розчину.
6. Скільки грамів аргентум нітрату і води необхідно взяти, щоб приготувати 150 г 5%-вого розчину.
7. Обчислити масу барій хлориду, що міститься в 10 г розчину з масовою часткою солі 10 %.
8. Яка маса натрій гідроксиду перебуває в 300 г розчину, якщо масова частка лугу становить 2,5 %.
9. Скільки грамів ферум (III) хлориду міститься в 40 г 5%-вого розчину.
10. Скільки грамів калій йодиду і води необхідно взяти, щоб приготувати 50 г 0,1%-вого розчину.
11. В якому об'ємі 0,25 М розчину калій гідроксиду міститься 0,35 моль лугу.
12. Визначте молярну концентрацію солі в 250 мл розчину, одержаному при розчиненні 50 г калій сульфату у воді.
13. В якому об'ємі 0,25 М розчину калій гідроксиду міститься 16,8 г лугу.
14. В якому об'ємі 1,25 М розчину магній гідроксиду міститься 14,8 г лугу.
15. Скільки грамів KH_2PO_4 потрібно взяти для приготування 500 мл його 50 мМ розчину.
16. Скільки грамів KOH і води потрібно взяти для приготування 65 мл його 2М розчину.
17. В якому об'ємі 0,2 М розчину KCl міститься 15 г солі.
18. Розчин калій нітрату містить 192,6 г KNO_3 в одному літрі. Розрахувати молярну концентрацію розчину.
19. Визначте молярну концентрацію лугу в розчині, одержаному при розчиненні натрій гідроксиду масою 85 г у воді, якщо об'єм одержаного розчину становив 1650 мл.
20. Визначте молярну концентрацію ортофосфатної кислоти в розчині об'ємом 650 мл, в якому міститься 125 г кислоти.
21. У 200 мл розчину міститься 11,2 г гідроксиду калію. Визначте молярну концентрацію KOH в розчині.
22. У якому об'ємі води треба розчинити 30 г хлориду натрію, щоб отримати розчин концентрацією 15%?
23. Визначити молярну концентрацію розчину, який містить 5 г $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ в 600 мл розчину.
24. У 200 мл розчину міститься 11,2 г гідроксиду калію. Визначте молярну концентрацію KOH в розчині.
25. Обчисліть маси хлориду натрію і води, необхідні для приготування 0,5 літра розчину концентрацією 12%.
26. Обчисліть маси сульфату амонію і води, необхідні для приготування 200 мл розчину з масовою часткою $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20% (густина розчину 1,115 г / мл).
27. Скільки грамів солі потрібно взяти для приготування 45 мл 20 % розчину?

28. Скільки мл концентрованої H_2SO_4 ($\rho=1,96\text{г/мл}$) потрібно взяти, щоб приготувати 30 мл 4,5 н H_2SO_4 . У скільки разів потрібно розвести 4,5 н кислоту, щоб отримати 0,25 н.
29. Яка відсоткова концентрація 5 М розчину сульфатної кислоти ($\rho=1,36\text{г/мл}$).
30. Яка молярна концентрація 6,6% розчину сульфату міді ($\rho=1,06\text{ г/мл}$).
31. Скільки грамів води та солі потрібно взяти для приготування 200 мл 75 мМ калій-фосфатного буфера
32. Який об'єм 15 мМ розчину НАД треба взяти, щоб з нього приготувати 1000 мкл 150 мкМ розчину?
33. Який об'єм 20 мМ розчину цитрату треба взяти, щоб з нього приготувати 500 мкл 20 мкМ розчину?
34. Який об'єм 30 М розчину фумарату треба взяти, щоб з нього приготувати 500 мкл 300 мМ розчину?
35. Який об'єм 31 мМ розчину глюкози треба взяти, щоб з нього приготувати 10 мл 31 мкМ розчину?
36. Який об'єм 0,3 М розчину лактату треба взяти, щоб з нього приготувати 600 мкл 3 мМ розчину?
37. Який об'єм 0,2 М розчину фруктози треба взяти, щоб з нього приготувати 700 мкл 2 мМ розчину?
38. Який об'єм 0,15 М розчину глутамату треба взяти, щоб з нього приготувати 5000 мкл 3 мМ розчину?
39. Який об'єм 300 мМ розчину аспартату треба взяти, щоб з нього приготувати 200 мкл 1,5 мМ розчину?
40. Який об'єм 0,13 мМ розчину цитохрому *c* треба взяти, щоб з нього приготувати 600 мкл 13 мкМ розчину?
41. Який об'єм 0,02 мМ розчину НАДФ треба взяти, щоб з нього приготувати 400 мкл 1 мкМ розчину?
42. Який об'єм 0,15 М розчину пірувату треба взяти, щоб з нього приготувати 3000 мкл 5 мМ розчину?
43. Який об'єм 0,3 М розчину галактози треба взяти, щоб з нього приготувати 900 мкл 1 мМ розчину?
44. Який об'єм 0,01 М розчину гліцину треба взяти, щоб з нього приготувати 400 мкл 1 мкМ розчину?
45. Який об'єм 20 мМ розчину глюкозо-6-фосфату треба взяти, щоб з нього приготувати 8000 мкл 10 мкМ розчину?
46. Який об'єм 0,01 М розчину серину треба взяти, щоб з нього приготувати 5000 мкл 1 мкМ розчину?
47. Який об'єм 0,5 М розчину АТФ треба взяти, щоб з нього приготувати 8000 мкл 2,5 мМ розчину?
48. Який об'єм 0,1 М розчину гліцерину треба взяти, щоб з нього приготувати 5000 мкл 1 мМ розчину?
49. Який об'єм 3 мМ розчину діоксиацетонфосфату треба взяти, щоб з нього приготувати 0,5 мл 30 мкМ розчину?
50. Який об'єм 0,03 мМ розчину ГТФ треба взяти, щоб з нього приготувати 7000 мкл 1,5 мкМ розчину?
51. Який об'єм 0,3 мМ розчину аспарагіну треба взяти, щоб з нього приготувати 300 мкл 100 мкМ розчину?

52. Який об'єм 0,05 М розчину фосфатидилсерину треба взяти, щоб з нього приготувати 2500 мкл 10 мкМ розчину?
53. Який об'єм 0,2 М розчину фосфоенолпірувату треба взяти, щоб з нього приготувати 4 мл 100 мкМ розчину?
54. Який об'єм 0,3 мМ розчину глутаміну треба взяти, щоб з нього приготувати 600 мкл 1 мкМ розчину?
55. Який об'єм 0,035 мМ розчину гліцину треба взяти, щоб з нього приготувати 700 мкл 10 мкМ розчину?
56. Який об'єм 0,001 мМ розчину ацетилкоензиму А треба взяти, щоб з нього приготувати 500 мкл 2 мкМ розчину?
57. Який об'єм 0,2 мМ розчину фруктозо-6-фосфату треба взяти, щоб з нього приготувати 500 мкл 20 мкМ розчину?
58. Який об'єм 0,03 М розчину фруктозо-2,6-дифосфату треба взяти, щоб з нього приготувати 300 мкл 100 мкМ розчину?
59. Який об'єм 0,025 мМ розчину оротату треба взяти, щоб з нього приготувати 250 мкл 1 мкМ розчину?
60. Який об'єм 0,06 мМ розчину оксалоацетату треба взяти, щоб з нього приготувати 750 мкл 6 мкМ розчину?
61. Який об'єм 0,04 мМ розчину малату треба взяти, щоб з нього приготувати 550 мкл 4 мкМ розчину?
62. Заповнити табличку

Компоненти	Кінцева концентрація	Вихідна концентрація	На одну пробу (2 мл), мкл	На п'ять проб (10 мл), мкл
Розчин Na–ДНК	0,04 мг/мл	2 мг/мл		
Ацетатний буфер	0,05 М	0,1 М		
MgSO ₄	5 мМ	50 мМ		
Вода	—	—		
Препарат	—	—	100	

63. Заповнити табличку

Компоненти	Кінцева концентрація	Вихідна концентрація	На 1 пробу (2 мл), мкл	На 5 проб (10 мл), мл
КФБ	50 мМ	200 мМ		
ЕДТА	0,5 мМ	100 мМ		
H ₂ O ₂	10 мМ	1 М		
Препарат	-	-	2	
Вода	-	-		

64. Заповнити табличку

Компонент	Кінцева концентрація	Вихідна концентрація	На 1 пробу (2 мл)	На 10 проб (20 мл)
-----------	----------------------	----------------------	-------------------	--------------------

КФБ	50 мМ	200 мМ		
ЕДТА	1 мМ	100 мМ		
Піруват	1 мМ	100 мМ		
(НАДН + вода) за табл. 3	-	-	0,4 мл	
Вода	-	-		

65. Заповнити табличку

Компонент	Вихідна концентрація	Кінцева концентрація	На 10 проб	На 20 проб
КФБ	200 мМ	50 мМ		
ЕДТА	100 мМ	1 мМ		
НАДН	20 мкМ	0,15 мкМ		
Вода				
Препарат (5мкл на 1 пробу)				
Піруват (0,2 мл на 1 пробу)				

66. Заповнити табличку, коли загальний об'єм пірувату і води становить 200 мкл

Кінцева концентрація пірувату	1 мМ	2,5 мМ	5 мМ	10 мМ	20 мМ	30 мМ	35 мМ	40 мМ
Кількість 150 мМ пірувату, мкл								
Кількість води, мкл								

67. Заповнити табличку

Компоненти	Кінцева концентрація	Вихідна концентрація	На 1 пробу (2 мл), мкл
Імідазол, рН 7.0	200 мМ	50 мМ	
KCl	600 мМ	150 мМ	
АМФ	20 мМ	2 мМ	
Вода	-	-	
Препарат	-	-	5мкл

68. Заповнити табличку

Компоненти	Вихідна концентрація	Кінцева концентрація	Взяти на об'єм 100 мл
KCl	2 М	80 мМ	
NaF	400 мМ	100 мМ	
ЕДТА	50 мМ	2 мМ	
KH ₂ PO ₄	540 мМ	54 мМ	
K ₂ HPO ₄	350 мМ	35 мМ	
H ₂ O	-	-	

69. Заповнити таблицю

Компоненти	Кінцеві концентрації	Вихідні концентрації	На 100 мл	На 200 мл
КФБ	50 мМ	200 мМ		
ЕДТА	1 мМ	100 мМ		
H ₂ O				

70. Заповнити таблицю

Компоненти суміші	Кінцева концентрація	Вихідна концентрація	На 1 пробу (1 мл)	На 10 проб (10 мл)
КФБ	50 мМ	200 мМ		
ЕДТА	0,5 мМ	100 мМ		
GSSG	1 мМ	100 мМ		
НАДФН	0,25 мМ	25 мМ		
Вода	-	-	-	-
Препарат	-	-	10кл	

71. Заповнити таблицю

Компоненти суміші	Кінцева концентрація	Вихідна концентрація	На 1 пробу (1 мл)	На 10 проб (10 мл)
КФБ	50 мМ	200 мМ		
ЕДТА	0,5 мМ	100 мМ		
GSH	5 мМ	150 мМ		
ХДНБ	1 мМ	50 мМ		
Вода	-	-		
Препарат	-	-	10 мкл	

72. Заповнити таблицю

№	Компоненти суміші	Вихідна концентрація	Кінцева концентрація	На 1 пробу (1 мл)	На 20 проб (20 мл)
1.	КФБ	200 мМ	100 мМ		
2.	ЕДТА	100 мМ	1 мМ		
3.	НАДФН	10 мМ	0,25 мМ		
4.	ДТНБ	30 мМ	0,6 мМ		
5.	Вода	-			
6.	GSH, стандарт			5 мкл	