

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені І. І. МЕЧНИКОВА
ФАКУЛЬТЕТ ХІМІЇ ТА ФАРМАЦІЇ
КАФЕДРА ЗАГАЛЬНОЇ ТА КЛІНІЧНОЇ ФАРМАЦІЇ

СУЧАСНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ СИСТЕМ

ЕЛЕКТРОННІ МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти
факультету хімії та фармації
спеціальності Фармація, Хімія

Одеса
ОНУ імені І. І. Мечникова
2026

УДК 57.08:615.1:577.2(076.5)
C916

Укладачі:

А. О. Цісак, кандидат біологічних наук, доцент, доцент кафедри загальної та клінічної фармації національного університету імені І. І. Мечникова;

О. В. Устянська, кандидат біологічних наук, доцент, доцент кафедри загальної та клінічної фармації національного університету імені І. І. Мечникова.

Рецензенти:

О. І. Грицук, доктор медичних наук, професор кафедри загальної та клінічної фармації Одеського національного університету імені І. І. Мечникова;

Т. О. Кіосе, доктор хімічних наук, професор, професор кафедри неорганічної хімії та хімічної освіти Одеського національного університету імені І. І. Мечникова.

Рекомендовано вченою радою факультету хімії та фармації

ОНУ імені І. І. Мечникова.

Протокол № 8 від 21 травня 2026 р.

C916 **Сучасні** методи дослідження біологічних систем [Електронний ресурс] : електрон. метод. рек. для здобувачів першого (бакалавр.) рівня вищ. освіти ф-ту хімії та фармації спец. Фармація, Хімія / уклад.: А. О. Цісак, О. В. Устянська. Одеса : ОНУ імені І. І. Мечникова, 2026. 58 с. 0,9 МБ.

Вивчення дисципліни надає здобувачу освіти базову фундаментальну підготовку для оволодіння фаховими знаннями і практичними навичками у майбутній професійній діяльності. Робочий зошит містить завдання для закріплення знань здобувачів освіти під час проведення лабораторних занять. У методичних рекомендаціях представлені розрахункові та ситуаційні завдання у послідовності викладеного матеріалу з дисципліни.

УДК 57.08:615.1:577.2(076.5)

ЗМІСТ

ВСТУП	4
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 1	
Тема: Клініко-аналітичні аспекти дослідження біологічних систем	5
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 2	
Тема: Спектроскопічні методи в дослідженні біологічних систем (УФ-Vis та флуоресцентна спектроскопія)	18
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 3	
Тема: Кількісний аналіз біологічних об'єктів методом HPLC	32
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 4	
Тема: Електрофоретичний аналіз білків та нуклеїнових кислот	43
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 5	
Тема: Кількісний та якісний аналіз біомолекул методом мас-спектрометрії	51
РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА	57

ВСТУП

Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з дисципліни «Сучасні методи дослідження біологічних систем» призначені для здобувачів освіти спеціальності І8 «Фармація» та ЕЗ «Хімія» (фармацевтична хімія) та мають на меті сформувати у них практичні навички роботи з сучасними аналітичними методами дослідження біологічних об'єктів.

У сучасній науковій та фармацевтичній практиці точне визначення складу біологічних систем, виявлення біомолекул та оцінка їх кількісних характеристик є невід'ємною частиною розробки та контролю якості лікарських засобів. Використання методів спектроскопії, електрофорезу, мас-спектрометрії та імуноаналізів дозволяє отримувати високочутливі та специфічні дані, необхідні для прийняття обґрунтованих рішень у дослідженні та аналізі біологічних систем.

Метою лабораторних робіт є:

1. Ознайомлення студентів із фізико-хімічними принципами сучасних аналітичних методів.
2. Формування практичних навичок роботи з обладнанням та програмним забезпеченням для аналізу біомолекул.
3. Розвиток умінь проводити кількісний та якісний аналіз біологічних зразків, інтерпретувати експериментальні дані та робити висновки.
4. Застосування отриманих знань для розв'язання розрахункових та ситуаційних завдань, що імітують реальні науково-дослідні та фармацевтичні ситуації.

Лабораторні роботи структуровані таким чином, щоб студенти могли поступово опановувати методи від базових (спектроскопія, електрофорез) до складних аналітичних технологій (мас-спектрометрія, імуноаналізи), а також навчитися інтегрувати отримані результати для комплексного оцінювання біологічних систем.

У методичних вказівках надано:

- покрокові інструкції виконання експериментів;
- розрахункові та ситуаційні завдання;
- бланки для фіксації результатів та їх інтерпретації;
- приклади рішень для викладача, що дозволяють оцінювати якість виконання.

Дотримання цих вказівок сприятиме розвитку компетенцій, необхідних для сучасного фахівця у галузі фармацевтичної хімії та біоаналітичних досліджень.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 1

Тема: Клініко-аналітичні аспекти дослідження біологічних систем

1. Актуальність теми

Біологічні зразки (кров, плазма, сироватка, сеча, тканини) є складними багатокомпонентними системами, в яких лікарські речовини присутні у низьких концентраціях та можуть перебувати у зв'язаному або вільному стані. Помилки на етапі пробопідготовки або вибору аналітичного методу можуть призвести до хибної клінічної інтерпретації результатів.

2. Мета заняття

Навчальна:

- навчити студентів аналізувати клінічну ситуацію;
- обґрунтовувати вибір методу дослідження;
- оцінювати матричні ефекти;
- розраховувати термодинамічні та кінетичні параметри.

Розвивальна:

- формування аналітичного мислення;
- інтеграція хімічних і біомедичних знань.

ТЕОРЕТИЧНИЙ БЛОК

1. Визначення лікарського препарату у плазмі крові

Біологічна матриця

Плазма крові – складна багатокомпонентна система, що містить:

- білки (альбумін, глобуліни)
- ліпіди
- електроліти
- ендогенні метаболіти
- ферменти

Наявність великої кількості компонентів зумовлює необхідність:

- пробопідготовки
- очищення екстракту
- застосування високоселективних методів

Найчастіше використовують:

- ВЕРХ (HPLC)
- LC-MS/MS
- флуориметрію
- імуноаналіз

Основні фармакокінетичні параметри

- C_{max} – максимальна концентрація
- T_{max} – час досягнення C_{max}
- AUC – площа під кривою «концентрація-час»
- $t_{1/2}$ – період напіввиведення

Розрахунок концентрації за калібрувальною залежністю:

$$C = S_{\text{аналіт}}/k$$

де

S – площа піка,

k – коефіцієнт калібрувальної прямої.

Визначення концентрації з внутрішнім стандартом

$$C_X = C_{IS} \cdot S_X / S_{IS}$$

де

IS – внутрішній стандарт.

2. Термодинаміка зв'язування: розрахунок ΔG

Взаємодія лікарського препарату з білком (наприклад, альбуміном) описується константою зв'язування:

$$K_a = [PL] / [P][L]$$

Зміна вільної енергії Гіббса:

$$\Delta G = -RT \ln K_a$$

де

$$R = 8.314 \text{ Дж} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$$

T – температура (K)

Інтерпретація:

- $\Delta G < 0$ – процес самодовільний
- Чим більш негативне ΔG – тим сильніше зв'язування

3. Ферментативна кінетика

Рівняння Міхаеліса-Ментен

$$v = V_{max} [S] / (K_m + [S])$$

де:

v – швидкість реакції

K_m – константа Міхаеліса

V_{max} – максимальна швидкість

Лінійна форма (Лайнуївера-Берка)

$$1/v = K_m/V_{max} \cdot 1/[S] + 1/V_{max}$$

Клінічне значення:

- визначення інгібіторної активності препарату

- оцінка метаболічного кліренсу
- аналіз конкурентного / неконкурентного інгібування

4. Матричний ефект при LC-MS

Матричний ефект – зміна іонізаційної ефективності аналіту під впливом компонентів біоматриці.

Проявляється як:

- пригнічення іонізації (ion suppression)
- підсилення сигналу (ion enhancement)

Розрахунок:

$$ME(\%) = S_{\text{matrix}} / S_{\text{standard}} \times 100$$

Інтерпретація:

- 100 % – відсутність матричного ефекту
- <100 % – пригнічення
- 100% – підсилення

Методи мінімізації:

- твердофазна екстракція (SPE)
- використання ізотопно-маркованого внутрішнього стандарту
- оптимізація мобільної фази

5. Нестабільність зразка

Причини:

- окиснення
- гідроліз
- фотодеградація
- ферментативний розпад

Період напіврозпаду:

$$t_{1/2} = \ln 2 / k$$

де k – константа швидкості деградації.

У клінічній аналітиці обов'язково перевіряють:

- стабільність при кімнатній температурі
- стабільність після заморожування
- стабільність після трьох циклів заморожування-розморожування

6. Валідація аналітичного методу: LOD та LOQ

Межа виявлення (LOD)

$$LOD = 3.3\sigma / S$$

Межа кількісного визначення (LOQ)

$$LOQ = 10\sigma / S$$

де

σ – стандартне відхилення сигналу

S – нахил калібрувальної прямої

Критерії прийнятності:

- точність (accuracy)
- правильність (trueness)
- відтворюваність (precision)
- селективність
- лінійність

7. Визначення вільної фракції препарату

У плазмі препарат перебуває:

- у зв'язаній формі (з білками)
- у вільній (фармакологічно активній)

Фракція вільної речовини:

$$f_u = C_{\text{free}} / C_{\text{total}}$$

Часто визначають методом:

- ультрафільтрації
- рівноважного діалізу
- LC-MS аналізу після розділення фракцій

Клінічне значення:

- корекція дозування
- оцінка ризику токсичності
- взаємодії лікарських засобів

КЛІНІКО-АНАЛІТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ РОЗГЛЯНУТИХ ПАРАМЕТРІВ

Параметр	Клінічне значення
Концентрація в плазмі	Контроль терапевтичного рівня
ΔG	Оцінка сили зв'язування з білком
K _m	Афінність ферменту
Матричний ефект	Достовірність LC-MS аналізу
LOD/LOQ	Чутливість методу
Вільна фракція	Фармакологічна активність

ВИСНОВОК

Комплексний клініко-аналітичний підхід включає:

- точне кількісне визначення препарату

- оцінку його зв'язування з білками
- аналіз ферментативного метаболізму
- контроль стабільності зразка
- перевірку валідності методу

Саме поєднання фізико-хімічних, термодинамічних та кінетичних розрахунків дозволяє інтерпретувати аналітичні дані з клінічної точки зору.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

ЗАДАЧА 1. Визначення препарату у плазмі крові

Клінічна ситуація

Пацієнт отримує новий протизапальний препарат. Очікувана терапевтична концентрація у плазмі – 50–200 нг/мл. Препарат на 95 % зв'язується з білками плазми.

Завдання:

1. Запропонуйте алгоритм пробопідготовки.
2. Який метод аналізу є доцільним?
3. Чи потрібно визначати вільну фракцію препарату?
4. Які можливі матричні ефекти?

Вхідні дані:

- Очікувана концентрація: 50–200 нг/мл
- Ступінь зв'язування з білками: 95 %

Бланк відповіді

1. Обраний метод аналізу: _____
2. Схема пробопідготовки: _____

Етап	Опис
1	
2	
3	
4	

3. Чи потрібно визначати вільну фракцію?

☐ Так

☐ Ні

Обґрунтування: _____

4. Потенційні матричні ефекти:

ЗАДАЧА 2. Розрахунок термодинаміки зв'язування ΔG

У ході доклінічних досліджень нової лікарської молекули вивчається її афінність до специфічного мембранного рецептора. За результатами біофізичних досліджень (методом рівноважного зв'язування) визначено константу асоціації комплексу «препарат-рецептор».

Сила зв'язування характеризується стандартною зміною вільної енергії Гіббса (ΔG), яка дозволяє оцінити термодинамічну вигідність та спонтанність процесу утворення комплексу.

Відомо, що:

- процес є рівноважним
- стандартні умови (1 атм, 298 К)
- розчин – водний, ідеалізований

Вхідні дані

- Константа асоціації препарату з рецептором: $K_a = 5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$
- $T = 298 \text{ K}$
- $R = 8,314 \text{ Дж/моль} \cdot \text{K}$

Завдання

1. Розрахуйте значення ΔG (у кДж/моль) для препарату з $K_a = 5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.
2. Визначте знак ΔG та зробіть висновок щодо спонтанності процесу зв'язування.
3. Аналогічно розрахуйте ΔG для препарату з $K_a = 1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$.
4. Порівняйте отримані значення ΔG для двох препаратів та зробіть клініко-фармакологічний висновок щодо:
 - сили зв'язування;
 - афінності до рецептора;
 - потенційної тривалості фармакологічного ефекту.

Розрахункова таблиця

Показник	Значення
K_a	
$\ln(K_a)$	
RT	
ΔG	

Бланк розв'язання

1. Обчислення $\ln(K_a)$: _____
2. Обчислення RT : _____
3. $\Delta G =$ _____
4. Висновок щодо спонтанності:

ЗАДАЧА 3. Ферментативна кінетика

У ході доклінічних досліджень нового лікарського засобу оцінюється його вплив на активність ферменту, який бере участь у метаболізмі ксенобіотиків. Препарат передбачається як можливий інгібітор ферменту.

Для визначення кінетичних параметрів було проведено експеримент із вимірювання швидкості ферментативної реакції при різних концентраціях субстрату в присутності досліджуваної сполуки.

Передбачається, що реакція підпорядковується рівнянню Міхаеліса-Ментен

Вхідні дані:

Під час дослідження інгібітора отримані дані:

[S], мМ	V	V/V _{max} (приблизно)
1	2,5	
5	6,0	
10	8,0	
50	9,5	

[S] – концентрація субстрату (мМ);

V – початкова швидкість реакції (умовні одиниці).

Завдання:

1. На основі наведених даних визначте приблизне значення V_{max} .
(Орієнтуйтеся на насичення швидкості при високих концентраціях субстрату.)
2. Графічно оцініть значення K_m :
 - побудуйте графік залежності V від [S];
або

- використайте лінійне перетворення (графік Лайнуівера-Берка: $1/V$ від $1/[S]$).

Поясніть, як ви визначили K_m .

3. Теоретичне питання:

Який тип інгібування є найбільш імовірним, якщо експериментально встановлено, що:

- V_{max} не змінюється,
- K_m зростає?

4. Зробіть короткий фармакологічний висновок щодо механізму взаємодії препарату з ферментом.

Бланк відповіді

1. Орієнтовне V_{max} : _____
2. Орієнтовне K_m : _____
3. Тип інгібування: _____

ЗАДАЧА 4. Матричний ефект при LC-MS аналізі біологічних зразків
Клініко-аналітична ситуація

Під час валідації методики кількісного визначення лікарського препарату у плазмі крові методом рідинної хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням (LC–MS) проводиться оцінка матричного ефекту.

Матричний ефект – це зміна інтенсивності іонізації аналіту під впливом компонентів біологічної матриці (білків, фосфоліпідів, солей, ендогенних метаболітів), що може призводити до заниження або завищення результатів кількісного аналізу.

Для оцінки впливу матриці було проведено порівняльний аналіз:

- стандартного розчину препарату (у чистому розчиннику);
- екстракту плазми крові, до якого внесено ту саму концентрацію препарату (пост-екстракційне додавання).

Дані:

- При аналізі стандарту сигнал становив 100 одиниць.
- У плазмі – 65 одиниць при тій самій концентрації.

Завдання:

1. Поясніть причину зниження інтенсивності сигналу у плазмі порівняно зі стандартним розчином. Вкажіть фізико-хімічні процеси, що відбуваються у джерелі іонізації.
2. Визначте, який тип матричного ефекту має місце в даному випадку. За потреби розрахуйте відсоткове значення матричного ефекту.
3. Запропонуйте щонайменше три способи мінімізації матричного ефекту при LC–MS аналізі біологічних зразків.
4. Зробіть короткий висновок щодо впливу матричного ефекту на точність і правильність кількісного визначення препарату.

Таблиця

Показник	Значення
Сигнал стандарту	
Сигнал у матриці	
% пригнічення	

ЗАДАЧА 5. Нестабільність зразка при зберіганні:**клініко-аналітичний аналіз****Клініко-аналітична ситуація**

Під час проведення фармакокінетичного дослідження нового лікарського засобу здійснюється серійний відбір зразків плазми крові пацієнтів. Частина зразків була проаналізована одразу після відбору, а частина – після зберігання при кімнатній температурі протягом 6 годин.

За результатами повторного аналізу встановлено, що концентрація препарату у зразках після 6 годин зберігання зменшилась на 30 % порівняно з початковим значенням.

Відомо, що препарат є органічною сполукою середньої полярності та частково зв'язується з білками плазми.

У клінічній аналітиці стабільність зразків є критичним параметром валідації методу та необхідною умовою достовірної оцінки фармакокінетичних показників (C_{max} , AUC, $t_{1/2}$).

Завдання:

1. Проаналізуйте можливі механізми деградації препарату в біологічному зразку при кімнатній температурі.
Вкажіть як хімічні, так і біохімічні процеси.
2. Запропонуйте заходи, які дозволять запобігти зниженню концентрації препарату під час зберігання та транспортування зразків.
3. Поясніть, чому нестабільність зразка є критичною для інтерпретації фармакокінетичних параметрів і клінічних висновків.
4. Зробіть короткий висновок щодо можливих наслідків отримання занижених концентрацій у фармакокінетичному дослідженні.

Методичні орієнтири

При аналізі ситуації врахуйте можливі процеси:

- гідроліз
- окиснення
- фотодеградація
- ферментативний метаболізм у плазмі
- адсорбція на стінках пробірки
- деградація під впливом рН

Також згадайте вимоги до стабільності під час валідації біоаналітичного методу:

- короткочасна стабільність (bench-top stability)
- довготривала стабільність
- стабільність після циклів заморожування-розморожування
- стабільність у автосемплері

Бланк відповіді

1. Можливі механізми деградації:

2. Запобіжні заходи:

3. Клініко-фармакокінетичне значення нестабільності:

ЗАДАЧА 6. Валідація біоаналітичного методу: визначення LOD та LOQ

Клініко-аналітична ситуація

Під час валідації методу кількісного визначення лікарського препарату у плазмі крові методом LC–MS було отримано калібрувальну залежність між концентрацією аналіту та аналітичним сигналом.

Метод планується використовувати для фармакокінетичних досліджень, у яких очікувані концентрації препарату знаходяться в діапазоні 5-50 нг/мл.

Для оцінки чутливості методу необхідно визначити:

- межу виявлення (LOD – limit of detection)
- межу кількісного визначення (LOQ – limit of quantification)

Вхідні дані:

- Калібрувальна залежність:
 $y = 1250x + 300$

де:

y – аналітичний сигнал (площа піка),

x – концентрація препарату (нг/мл),

1250 – нахил калібрувальної прямої (S),

300 – інтерсепт (фоновий сигнал).

- Стандартне відхилення сигналу:

$$\sigma = 150$$

Завдання:

1. Розрахуйте межу виявлення (LOD) у нг/мл.
2. Розрахуйте межу кількісного визначення (LOQ) у нг/мл.
3. Проаналізуйте отримані значення та зробіть висновок:
Чи є метод придатним для кількісного визначення концентрації препарату на рівні 10 нг/мл?
4. Обґрунтуйте відповідь з позиції аналітичної хімії та вимог до біоаналітичної валідації.

Таблиця для розрахунку

Показник	Значення
S (нахил)	
σ	
LOD	
LOQ	

[illegible]

ЗАДАЧА 7. Визначення вільної фракції лікарського препарату в плазмі крові

Клініко-аналітична ситуація

Під час проведення терапевтичного лікарського моніторингу визначено загальну концентрацію препарату в плазмі крові пацієнта. Відомо, що досліджуваний лікарський засіб значною мірою зв'язується з білками плазми, переважно з альбуміном.

Згідно з літературними даними, ступінь зв'язування препарату з білками плазми становить 90 %.

У клінічній фармакології важливо розрізняти:

- **загальну концентрацію (C_{total})** – суму зв’язаної та вільної фракцій;
- **вільну концентрацію (C_{free})** – частину препарату, не зв’язану з білками;
- **фракцію вільного препарату (f_u)** — частку активної форми в загальній концентрації.

Саме вільна форма препарату здатна:

- проникати через біологічні мембрани;
- взаємодіяти з рецепторами;
- піддаватися метаболізму та елімінації.

Вхідні дані:

- Загальна концентрація препарату в плазмі 100 нг/мл.
- Ступінь зв'язування з білками – 90 %.

Завдання:

1. Розрахуйте вільну концентрацію препарату в плазмі (нг/мл).
2. Визначте частку вільної фракції (у відсотках).
3. Поясніть, чому саме вільна концентрація, а не загальна, визначає фармакологічний ефект препарату.
4. Зробіть короткий клінічний висновок:
Як може змінитися фармакологічний ефект при зниженні рівня альбуміну в плазмі (наприклад, при гіпоальбумінемії)?

Бланк розрахунку

Показник	Значення
Загальна концентрація	
% зв'язування	
Вільна фракція (%)	
Вільна концентрація	

Питання для підсумкової дискусії

1. Який етап біоаналітичного дослідження є найбільш критичним?
2. Чому афінність не дорівнює ефективності?
3. Чи можлива повна відсутність матричних ефектів?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 2

Тема: Спектроскопічні методи в дослідженні біологічних систем (УФ-Vis та флуоресцентна спектроскопія)

Актуальність теми

Спектроскопія є фундаментальним інструментом сучасної фармацевтичної хімії. Методи УФ-Vis та флуоресцентної спектроскопії дозволяють:

- визначати концентрацію біомолекул;
- досліджувати структуру білків;
- аналізувати білок-лігандні взаємодії;
- визначати константи зв'язування;
- досліджувати стабільність лікарських речовин;
- вивчати процеси денатурації та агрегації.

У фармацевтичній аналітиці ці методи широко застосовуються при контролі якості, біофармацевтичних дослідженнях та розробці лікарських засобів.

Мета заняття

Навчальна:

- навчити студентів застосовувати закон Бугера-Ламберта-Бера;
- проводити кількісний аналіз білків та лікарських речовин;
- розраховувати квантовий вихід флуоресценції;
- визначати константи зв'язування;
- аналізувати тушіння флуоресценції.

Практична:

- інтерпретувати спектри УФ та флуоресценції;
- виконувати розрахунки концентрацій;
- працювати з калібрувальними графіками;
- оцінювати похибки.

ТЕОРЕТИЧНИЙ БЛОК

Загальні положення

Спектроскопічні методи займають провідне місце серед сучасних фізико-хімічних методів аналізу біологічних систем. Найбільш широко у фармацевтичній хімії застосовуються:

- **УФ-Vis спектрофотометрія**
- **Флуоресцентна спектроскопія**

Ці методи базуються на взаємодії електромагнітного випромінювання з речовиною та дозволяють проводити як якісний, так і кількісний аналіз біомолекул (білків, нуклеїнових кислот, лікарських речовин).

Основи методу УФ-Vis СПЕКТРОФОТОМЕТРІЇ

УФ-Vis спектрофотометрія ґрунтується на поглинанні молекулами світла в ультрафіолетовій (190-400 нм) та видимій (400-800 нм) ділянках спектра.

Основний закон кількісного аналізу – **закон Бугера-Ламберта-Бера:**

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C$$

де:

A – оптична густина (абсорбція);

ε – молярний коефіцієнт екстинкції ($\text{л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$);

l – довжина кювети (см);

C – концентрація (моль/л).

Визначення концентрації білка методом УФ-спектрофотометрії

Білки поглинають світло при:

- **280 нм** – за рахунок ароматичних амінокислот (триптофан, тирозин, фенілаланін);
- **205-220 нм** – за рахунок пептидних зв'язків.

Формула розрахунку:

$$C = A \varepsilon \cdot l$$

Якщо ε невідомий, використовують стандартні коефіцієнти або визначають експериментально.

Визначення концентрації ДНК методом спектрофотометрії

Нуклеїнові кислоти мають максимум поглинання при **260 нм**.

Для дволанцюгової ДНК:

- $A_{260} = 1$ відповідає ≈ 50 мкг/мл

Розрахунок:

$$C_{\text{ДНК}} = A_{260} \times 50 \times DF$$

де DF – коефіцієнт розведення.

Оцінка чистоти:

$$A_{260} / A_{280} \approx 1,8$$

Менші значення свідчать про білкові домішки.

Побудова калібрувального графіка

Для визначення концентрації невідомого зразка:

1. Готують серію стандартних розчинів.
2. Вимірюють їх абсорбцію.
3. Будують графік $A = f(C)$.
4. Рівняння прямої: $A = kC + b$
5. Для невідомого зразка: $C = (A - b) / k$

Визначення молярного коефіцієнта екстинкції (ϵ)

Якщо концентрація відома:

$$\epsilon = A / (l \cdot C)$$

ϵ є характеристикою речовини і залежить від довжини хвилі.

Розрахунок розведення розчину

При приготуванні розчинів використовується формула:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

де:

C_1 – початкова концентрація;

V_1 – об'єм вихідного розчину;

C_2 – необхідна концентрація;

V_2 – кінцевий об'єм.

Основи флуоресценції

Флуоресценція – це випромінювання світла молекулою після поглинання фотона.

Основні параметри:

- λ_{ex} – довжина хвилі збудження
- λ_{em} – довжина хвилі емісії
- I – інтенсивність флуоресценції

Інтенсивність пропорційна концентрації при малих концентраціях:

$$I = kC$$

Визначення квантового виходу

Квантовий вихід (Φ) – відношення кількості випромінених фотонів до поглинутих:

$\Phi = \text{кількість випромінених фотонів} / \text{кількість поглинутих фотонів}$

Визначається порівняльним методом відносно стандарту:

$$\Phi_x = \Phi_{st} \cdot I_x / I_{st} \cdot A_{st} / A_x$$

де:

- Φ_{st} – квантовий вихід стандарту;
- I_{st} – інтегральна інтенсивність флуоресценції стандарту;
- I_x – інтегральна інтенсивність флуоресценції зразка;
- A_{st} – оптична густина стандартного розчину при довжині хвилі збудження;
- A_x – оптична густина зразка при тій самій довжині хвилі.

Передбачається, що вимірювання проводяться за однакових умов (однаковий розчинник, температура, довжина оптичного шляху, кювета та налаштування спектрофлуориметра).

Тушіння флуоресценції. Рівняння Штерна-Фольмера

Тушіння – зменшення інтенсивності флуоресценції під дією тушника (Q).

Рівняння:

$$I_0/I = 1 + K_{SV}[Q]$$

де:

I_0 – інтенсивність без тушника;

I – інтенсивність при наявності тушника;

K_{SV} – константа Штерна-Фольмера;

$[Q]$ – концентрація тушника.

Графік I_0 / I від $[Q]$ дозволяє визначити K_{SV} .

Константа K_{SV} характеризує ефективність взаємодії флуорофору з тушником:

- велике K_{SV} – сильне тушіння, висока афінність;
- мале K_{SV} – слабе тушіння, низька афінність.

Визначення константи зв'язування лікарського ліганду з білком

Взаємодію лікарського препарату з білком плазми можна досліджувати методом флуоресцентного тушіння.

Використовують рівняння:

$$\log (I_0 - I)/I = \log K_a + n \log [L]$$

де:

K_a – константа зв'язування;

n – число центрів зв'язування;

$[L]$ – концентрація ліганду.

З графіка визначають K_a та n .

Практичне значення методів

Методи УФ-Vis та флуоресценції широко застосовуються для:

- контролю якості фармацевтичних субстанцій;
- визначення білків у біологічних рідинах;
- аналізу ДНК та РНК;
- дослідження взаємодії «лікарський засіб-білок»;
- визначення стабільності препаратів.

Висновки

Спектроскопічні методи є високочутливими, доступними та універсальними інструментами дослідження біологічних систем.

УФ-Vis спектрофотометрія дозволяє визначати концентрацію білків та нуклеїнових кислот, молярний коефіцієнт екстинкції та проводити кількісний аналіз через калібрувальні криві.

Флуоресцентна спектроскопія забезпечує високу чутливість, можливість визначення квантового виходу, констант тушіння та констант зв'язування лігандів з білками, що є особливо важливим у фармацевтичній хімії.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

БЛОК I. УФ-СПЕКТРОСКОПІЯ

ЗАДАЧА 1. Визначення концентрації білка методом УФ-спектрофотометрії

Лабораторно-аналітична ситуація

У ході біохімічного дослідження необхідно визначити концентрацію білка в розчині методом УФ-спектрофотометрії при довжині хвилі 280 нм.

Відомо, що білки поглинають ультрафіолетове випромінювання в області 280 нм завдяки наявності ароматичних амінокислот (переважно триптофану та тирозину).

Для аналізу використано стандартний зразок **бичачого сироваткового альбуміну (БСА)**, який широко застосовується як модельний білок у біоаналітичних дослідженнях.

Визначення концентрації здійснюється на основі закону Бугера-Ламберта-Бера.

Вхідні дані:

Оптична густина розчину БСА при 280 нм:

$$A=0,745$$

Молярний коефіцієнт екстинкції:

$$\epsilon=43800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

Довжина оптичного шляху кювети:

$$l=1 \text{ cm}$$

Молярна маса БСА (для розрахунку масової концентрації):

$$M=66\,000 \text{ г/моль}$$

Завдання:

1. Використовуючи закон Бугера-Ламберта-Бера, визначте молярну концентрацію білка (у моль/л).
2. Переведіть отримане значення у масову концентрацію (г/л та мг/мл).
3. Поясніть, чому метод визначення білка при 280 нм може давати похибки при аналізі складних біологічних зразків.
4. Зробіть короткий висновок щодо придатності цього методу для кількісного визначення білка у фармацевтичному аналізі.

Бланк відповіді

$c =$ _____

$C_{\text{мас}} =$ _____

ЗАДАЧА 2. Побудова калібрувального графіка та визначення концентрації невідомого зразка

Лабораторно-аналітична ситуація

У ході кількісного визначення білка методом УФ-спектрофотометрії при довжині хвилі 280 нм проведено калібрування приладу з використанням стандартних розчинів відомої концентрації.

Для кожного стандарту було виміряно оптичну густину (A_{280}). Передбачається, що залежність між концентрацією білка та оптичною густиною є лінійною та підпорядковується закону Бугера-Ламберта-Бера.

Вхідні дані:

Калібрувальні розчини:

Концентрація (мкг/мл)	A_{280}
10	0,115
20	0,231
40	0,462
60	0,691

Знайти концентрацію зразка з $A = 0,350$.

Завдання:

1. Побудуйте калібрувальний графік залежності A_{280} від концентрації.
2. Визначте рівняння калібрувальної прямої (знайдіть k та b).
3. Розрахуйте концентрацію невідомого зразка з $A = 0,350$.
4. Оцініть, чи знаходиться отримане значення в межах калібрувального діапазону.
5. Зробіть короткий висновок щодо лінійності методу та його придатності для кількісного аналізу.

Методичні рекомендації

- Для розрахунку можна використати:
 - графічний метод (інтерполяція);
 - аналітичний метод (рівняння прямої);

- [illegible]

Лабораторно-аналітична ситуація

Квантовий вихід визначається порівнянням інтенсивності флуоресценції невідомого зразка з інтенсивністю флуоресцентного стандарту відомого квантового виходу.

Вхідні дані:

Параметр	Значення
Квантовий вихід стандарту, Фст	0,54
Інтенсивність флуоресценції стандарту, Іст	1200
Інтенсивність флуоресценції зразка, Ізр	800
Оптична густина стандарту, Аст	0,10
Оптична густина зразка, Азр	0,08

Завдання:

- 24

- Які фактори можуть впливати на точність визначення квантового виходу?
3. Зробіть короткий аналітичний висновок щодо придатності методу для порівняльного дослідження флуоресцентних властивостей біологічних молекул.

Методичні рекомендації

- Перевірте правильність одиниць та співвідношення інтенсивностей та оптичних густин.
- Поясніть, чому враховується відношення оптичних густин (A_{st} / A_{sr}).
- Пам'ятайте, що квантовий вихід не може перевищувати 1.

ЗАДАЧА 4. Тушіння флуоресценції (рівняння Штерна-Фольмера)

У ході досліджень взаємодії лікарських молекул із біологічними макромолекулами проводять аналіз **тушіння флуоресценції**.

Тушіння флуоресценції – це процес зменшення інтенсивності флуоресценції (F) флуорофору під впливом **тушника** (quencher, Q).

Для кількісного опису процесу використовується **рівняння Штерна-Фольмера**.

Вхідні дані:

$$F_0 = 1000$$

$$F = 625$$

$$[Q] = 0,02 \text{ M}$$

$$F_0/F = 1 + K_{SV}[Q]$$

Завдання:

1. Використовуючи наведені дані та рівняння Штерна-Фольмера, **розрахуйте константу тушіння K_{SV} (M^{-1})**.
2. Проаналізуйте отримане значення K_{SV} :
 - Чи ефективне тушіння?
 - Що це свідчить про взаємодію флуорофору та тушника?

Побудова графіка $\log((I_0 - I)/I)$ від $\log[Q]$ дозволяє визначити K та n з

Завдання:

1. Використовуючи наведені дані, обчисліть значення $(I_0 - I)/I$ для кожної концентрації ліганду.
2. Побудуйте графік:
 $\log(F_0 - F/F)$ від $\log[Q]$
Знайдіть **нахил прямої (n)** та **інтерсепт (logK)**.
3. Визначте **константу зв'язування K (M^{-1})** та **стехіометрію комплексу n**.
4. Дайте короткий клініко-аналітичний висновок щодо сили взаємодії ліганду з білком.

- Для розрахунку $\log$ використовуйте логарифм за основою 10.
- Нахил прямої графіка дорівнює n , а інтерсепт на осі Y – $\log K$.
- Перевірте, чи не виходять значення $(I_0 - I)/I$ за межі допустимого (позитивні числа).
- Обговоріть можливі джерела похибки: точність вимірювання I , деградація ліганду, концентраційні похибки.

This image shows a blank sheet of white paper with horizontal ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There are no margins, text, or other markings on the paper.

This image shows a full page of white paper with horizontal blue ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page, providing a template for handwriting practice or general writing. There are no margins, text, or other markings on the page.

Задача 6. Визначення молярного коефіцієнта екстинкції (ϵ)

Лабораторно-аналітична ситуація

У ході біоаналітичного дослідження необхідно визначити **молярний коефіцієнт екстинкції (ϵ)** лікарського препарату або білка у розчині методом **УФ-спектрофотометрії**.

Молярний коефіцієнт екстинкції характеризує здатність молекули поглинати світло на певній довжині хвилі та використовується для кількісного визначення концентрації розчинів за законом Бугера-Ламберта-Бера.

Вхідні дані:

$$A = 0,525$$

$$c = 2 \times 10^{-5} \text{ M}$$

$$1 = 1 \text{ cm}$$

Завдання:

-
- This image shows a blank sheet of white paper with horizontal ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There are no margins, text, or other markings on the paper.

Лабораторно-аналітична ситуація

Лабораторно-аналітична ситуація

У ході підготовки розчинів для біоаналітичного або фармацевтичного дослідження часто необхідно **отримати розчин заданої концентрації з більш концентрованого стандартного розчину.**

Вхідні дані:

Початкова концентрація 2 мг/мл.

Необхідно отримати 0,2 мг/мл у 10 мл.

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

Завдання:

1. Використовуючи формулу розведення, **розрахуйте об'єм початкового розчину V_1** , необхідний для приготування нового розчину.
2. Обчисліть, скільки розчинника (води або буферного розчину) потрібно додати, щоб довести розчин до об'єму 10 мл.
3. Поясніть, чому точне дозування об'ємів критично для точності кінцевої концентрації.

4. Зробіть короткий висновок про важливість правильного розведення в лабораторних і фармацевтичних дослідженнях.

ЗАДАЧА 8. Визначення концентрації ДНК методом спектрофотометрії

Лабораторно-аналітична ситуація

У ході молекулярно-біологічних або фармакологічних досліджень важливо визначити **концентрацію ДНК у розчині**.

Для цього використовується **ультрафіолетова спектрофотометрія при 260 нм**, де ДНК має характерний піковий максимум поглинання завдяки азотистим основам.

Відомо, що для подвійної спіральної ДНК справедлива наступна залежність:

1 OD (оптична густина)=50 μ г/мл ДНК

де OD вимірюється при 260 нм, а довжина кювети $l = 1$ см.

Вхідні дані:

Оптична густина зразка при 260 нм: $A_{260} = 0,85$

Для ДНК Конверсія: 1 OD = 50 мкг/мл

Завдання:

1. Використовуючи наведену конверсію, **розрахуйте концентрацію ДНК у розчині (мкг/мл)**.
2. Поясніть, чому визначення концентрації ДНК при 260 нм є стандартним методом кількісного аналізу нуклеїнових кислот.
3. Обговоріть можливі джерела похибки при визначенні концентрації ДНК методом УФ-спектрофотометрії (наприклад, наявність білків, фенолу, хімічних домішок).
4. Зробіть короткий аналітичний висновок про точність і практичну придатність методу для лабораторного аналізу.

[illegible]

7. ПІДСУМКОВІ ПИТАННЯ

1. В яких межах справедливий закон Бера?
2. Чому при високих концентраціях спостерігається відхилення?
3. Яка різниця між статичним і динамічним тушінням?
4. Від чого залежить квантовий вихід?
5. Як визначити кількість сайтів зв'язування?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 3

Тема: Кількісний аналіз біологічних об'єктів методом HPLC

Мета

- розрахувати параметри хроматографічної системи
- визначити концентрацію лікарської речовини
- оцінити ефективність та селективність

ТЕОРЕТИЧНИЙ БЛОК

Загальні положення

Високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ, HPLC — High Performance Liquid Chromatography) є одним із найбільш інформативних і точних методів кількісного аналізу біологічних об'єктів (плазма крові, сироватка, тканинні екстракти, лікарські препарати).

Метод ґрунтується на різній швидкості переміщення компонентів суміші між:

- рухомою фазою (елюентом);
- нерухомою фазою (сорбент у колонці).

Кількісне визначення здійснюється за площею хроматографічного піка, яка прямо пропорційна концентрації аналіту.

Хроматографічні параметри ефективності розділення

Ефективність хроматографічної системи оцінюється рядом параметрів:

- фактор утримування (k);
- селективність (α);
- роздільна здатність (R_s).

Фактор утримування (коефіцієнт ємності, k)

Фактор утримування характеризує ступінь взаємодії речовини з нерухомою фазою.

$$k = (t_R - t_0) / t_0$$

де:

t_R — час утримування аналізованої речовини;

t_0 — час мертвого об'єму (час проходження незатримуваної речовини).

Інтерпретація:

- $k < 1$ — слабе утримування;
- $k = 1-10$ — оптимальний діапазон;
- $k > 10$ — надмірне утримування.

Селективність (фактор розділення, α)

Селективність характеризує здатність системи розрізняти два компоненти:

$$\alpha = k_2/k_1, \quad (k_2 > k_1)$$

$\alpha > 1$ завжди; чим більше α , тим краще розділення.

Роздільна здатність (R_s)

Роздільна здатність показує ступінь розділення двох піків:

$$R_s = 2(t_{R2} - t_{R1}) / (W_1 + W_2)$$

де W_1 і W_2 – ширини піків на рівні основи.

Критерії оцінки:

- $R_s \geq 1,5$ – повне базове розділення;
- $R_s \approx 1,0$ – часткове перекриття;
- $R_s < 1,0$ – незадовільне розділення.

Визначення ефективності хроматографічної колонки

Ефективність колонки характеризується числом теоретичних тарілок (N).

Розрахунок числа теоретичних тарілок

$$N = 16(t_R/W)^2$$

де:

t_R – час утримування;

W – ширина піка на рівні основи.

Альтернативна формула (за шириною на половині висоти):

$$N = 5,54(t_R/W_{1/2})^2$$

Інтерпретація:

- $N > 5000$ – висока ефективність;
- $2000-5000$ – задовільна;
- < 2000 – низька ефективність.

Чим більше N , тим вужчі піки і краща роздільна здатність.

Побудова калібрувального графіка та визначення концентрації невідомого зразка

У кількісній ВЕРХ використовується лінійна залежність:

$$S = kC + b$$

де:

S – площа піка;

C – концентрація;

k – чутливість методу (нахил);

b – вільний член.

Етапи побудови калібрувальної залежності

1. Підготовка серії стандартних розчинів.
2. Інжекція кожного стандарту.

3. Вимірювання площ піків.
4. Побудова графіка $S = f(C)$.
5. Обчислення рівняння методом найменших квадратів.
6. Визначення коефіцієнта кореляції ($r \geq 0,99$).

Визначення концентрації невідомого зразка

$$C = (S - b) / k$$

Результат повинен знаходитись у межах калібрувального інтервалу.

Визначення межі виявлення (LOD)

Межа виявлення – найменша концентрація речовини, яку можна достовірно відрізнити від фону.

Розрахунок LOD

$$LOD = 3\sigma / k$$

де:

σ – стандартне відхилення сигналу холостої проби;

k – нахил калібрувальної прямої.

Іноді застосовується коефіцієнт 3,3:

$$LOD = 3,3\sigma / k$$

Практичне значення:

Чим менший LOD, тим вища чутливість методу.

Розрахунок основних хроматографічних параметрів колонки

Для комплексної оцінки роботи системи визначають:

1. Фактор утримування (k);
2. Селективність (α);
3. Роздільну здатність (R_s);
4. Число теоретичних тарілок (N).

Комплексний аналіз дозволяє:

- оцінити стан колонки;
- оптимізувати склад рухомої фази;
- підібрати швидкість потоку;
- перевірити придатність системи до аналізу (system suitability test).

Практичне значення методу HPLC у фармацевтичній хімії

Метод використовується для:

- визначення лікарських речовин у біологічних рідинах;
- фармакокінетичних досліджень;
- контролю домішок;
- аналізу стабільності препаратів;
- біоеквівалентних досліджень.

HPLC поєднує високу чутливість, селективність та відтворюваність, що робить його ключовим методом сучасної біоаналітики.

Висновок

Кількісний аналіз біологічних об'єктів методом ВЕРХ базується на математичному описі процесів утримування, розділення та детектування.

Оцінка параметрів k , α , R_s та N дозволяє охарактеризувати ефективність колонки, а використання калібрувальної залежності та розрахунок LOD — забезпечити достовірність і чутливість кількісного визначення.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

ЗАДАЧІ

ЗАДАЧА 1. Хроматографічні параметри ефективності розділення

Розрахунок k , α , R_s

Під час аналізу суміші двох фармацевтичних субстанцій методом ВЕРХ отримано такі експериментальні дані:

- Час утримування першого компонента:
 $t_{R_1} = 4,2$ хв
- Час утримування другого компонента:
 $t_{R_2} = 6,0$ хв
- Час мертвого об'єму (незатримуваної сполуки):
 $t_0 = 1,5$ хв
- Ширина піка першого компонента на рівні основи:
 $W_1 = 0,4$ хв
- Ширина піка другого компонента на рівні основи:
 $W_2 = 0,5$ хв

Завдання:

1. Розрахувати коефіцієнти утримування (ємності) для кожного компонента
2. Визначити селективність (фактор розділення)
3. Розрахувати роздільну здатність (R_s) між піками
4. Оцінити якість розділення згідно з критеріями
 - $R_s \geq 1,5$ – повне розділення;
 - $R_s \approx 1,0$ – часткове перекриття;
 - $R_s < 1,0$ – незадовільне розділення.
5. Зробити висновок щодо ефективності розділення компонентів.

Розрахунок числа теоретичних тарілок

За результатами обробки хроматограми встановлено:

- $$tR = 5,5 \times B$$

- $$W = 0,35 \text{ XB}$$

1. Розрахувати **число теоретичних тарілок (N)** для даної колонки
2. Проаналізувати отримане значення N та зробити висновок щодо ефективності хроматографічної системи (висока, середня або низька ефективність розділення).
3. У відповіді необхідно вказати:
 - Підставлені значення у формулу;
 - Розраховане число теоретичних тарілок (N);
 - Короткий висновок щодо ефективності колонки.

ЗАДАЧА 3. Побудова калібрувального графіка та визначення концентрації невідомого зразка методом ВЕРХ

Під час кількісного визначення лікарської речовини методом вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) було отримано дані для серії стандартних розчинів різної концентрації.

Результати вимірювання площі хроматографічних піків наведені в таблиці:

Концентрація, С (мкг/мл)	Площа піка, (S)
10	125
20	250
40	505
60	750

коефіцієнт пропорційності (нахил калібрувальної прямої)

$k \approx 12,5$.

Під час аналізу невідомого зразка площа піка становила:

$S = 420$.

Завдання:

1. Побудувати калібрувальний графік залежності площі піка (S) від концентрації (C).
2. Визначити рівняння калібрувальної прямої.
3. Розрахувати концентрацію невідомого зразка, використовуючи отримане рівняння.
4. Зробити висновок щодо відповідності концентрації робочому діапазону методу.
5. У відповіді необхідно подати:
 - рівняння калібрувальної прямої;
 - підстановку числових значень у формулу;
 - розраховану концентрацію невідомого зразка (мкг/мл);
 - короткий висновок.

This image shows a single sheet of white paper with horizontal ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There are no margins, text, or other markings on the paper.

ЗАДАЧА 4. Визначення межі виявлення (LOD) методом калібрувальної залежності

Під час кількісного визначення лікарської речовини методом ВЕРХ (або УФ-спектрофотометрії) була побудована калібрувальна залежність сигналу детектора (S) від концентрації (C).

За результатами статистичної обробки даних встановлено:

- Нахил калібрувальної прямої:
 $k = 12,5$ (од. сигналу · мл/мкг)
- Стандартне відхилення сигналу холостої проби (або стандартне відхилення відгуку):
 $\sigma = 4,0$ од. сигналу

Завдання:

1. Розрахувати **межу виявлення (LOD)**
2. Подати результат у тих самих одиницях концентрації (мкг/мл).
3. Зробити висновок щодо чутливості методу та можливості визначення низьких концентрацій речовини.
4. У відповіді необхідно вказати:
 - Формулу розрахунку;
 - Підстановку числових значень;
 - Розраховане значення LOD;
 - Короткий аналітичний висновок.

k1 = _____

$$k_2 =$$
 $\alpha =$ _____

Rs = _____

N = _____

C =

LOD = _____

[illegible]

Додаткові завдання:

ЗАВДАННЯ 1. Розрахунок основних хроматографічних параметрів колонки

Під час аналізу суміші двох фармацевтичних сполук методом вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) отримано такі експериментальні дані:

- Отримані дані характеризують ефективність та селективність

Завдання:

1. **Обчислити фактор утримування (k)** для кожного піка.
2. **Обчислити селективність (фактор розділення) α .**
3. **Обчислити роздільну здатність (R_s)** між двома піками.
4. Оцінити якість розділення відповідно до критеріїв:
 - $R_s \geq 1,5$ – повне базове розділення;
 - $1,0 < R_s < 1,5$ – часткове перекриття піків;
 - $R_s \leq 1,0$ – незадовільне розділення.
5. У відповіді необхідно подати:
 - Розрахунок k_1 та k_2 ;
 - Значення селективності α ;
 - Розраховане значення R_s ;
 - Короткий висновок щодо ефективності роботи колонки.

This image shows a blank sheet of white paper with horizontal ruling lines. The lines are evenly spaced and extend across the width of the page. There are no margins, text, or other markings on the paper.

ЗАВДАННЯ 2. Визначення концентрації лікарської речовини за калібрувальною кривою

Під час кількісного визначення лікарської речовини методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) було підготовлено серію стандартних розчинів із відомими концентраціями. Для кожного стандарту виміряно площу хроматографічного піка.

Отримані експериментальні дані наведено в таблиці:

С (мкг/мл)	Площа піка
10	120
20	240
40	480
60	720

Під час аналізу досліджуваного зразка площа піка становила:

$S_{\text{зразка}} = 330$

Завдання:

1. Побудувати калібрувальний графік залежності площі піка (S) від концентрації (C).
 2. Визначити рівняння калібрувальної прямої ($S = kC + b$).
 3. Розрахувати концентрацію лікарської речовини в досліджуваному зразку.
 4. Зробити висновок щодо відповідності отриманого значення лінійному діапазону методу.
 5. У відповіді необхідно подати:
 - Рівняння калібрувальної залежності;
 - Підстановку числових значень у формулу;
 - Розраховану концентрацію зразка (мкг/мл);
 - Короткий аналітичний висновок.
-
-
-
-
-
-
-

ЗАВДАННЯ 3. Теоретичне

Питання: Опишіть переваги і недоліки GC та HPLC при аналізі біологічних молекул.

ЗАВДАННЯ 4. Розрахунок числа теоретичних тарілок

Дані: $t_R = 6,2$ хв, $W = 0,45$ хв

ЗАВДАННЯ 5. Ситуаційна задача

Ситуація: При аналізі зразка лікарського препарату методом RP-HPLC піки двох компонентів збігаються. Як можна покращити розділення?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 4

Тема: Електрофоретичний аналіз білків та нуклеїнових кислот

Мета

- Оволодіти технікою SDS-PAGE, Native PAGE та agarose gel
- Визначати молекулярну масу білків
- Оцінювати чистоту препаратів
- Вчитися робити розрахунки електрофоретичної рухливості

ТЕОРЕТИЧНИЙ БЛОК

Електрофорез є одним із найбільш поширених методів аналізу біомолекул у сучасній біології. Він широко застосовується в дослідженнях у галузі Біохімія, Молекулярна біологія та Генетика для розділення білків, нуклеїнових кислот та інших заряджених частинок.

Метод ґрунтується на переміщенні заряджених молекул у рідкому середовищі або гелі під дією електричного поля. Швидкість руху молекул залежить від їх заряду, розміру, форми, а також властивостей середовища, у якому відбувається електрофорез. Найчастіше як матрицю використовують **поліакриламідні або агарозні гелі**, що виконують роль молекулярного сита.

У біологічних дослідженнях електрофорез застосовується для:

- визначення молекулярної маси білків;
- аналізу складу білкових сумішей;
- дослідження білкових комплексів;
- аналізу довжини фрагментів ДНК і РНК;
- контролю результатів ПЛР, рестрикції та інших молекулярно-біологічних процедур.

Визначення молекулярної маси білка методом SDS-PAGE

Метод **SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)** є різновидом поліакриламідного гель-електрофорезу, який використовується для розділення білків за їх молекулярною масою.

У цьому методі застосовується аніонний детергент **SDS (додецилсульфат натрію)**, який:

- денатурує білки;
- руйнує вторинну, третинну та четвертинну структури;
- надає білковим молекулам однаковий негативний заряд.

У результаті всі білки мають приблизно однакове **співвідношення заряд/маса**, тому під час електрофорезу їх розділення відбувається **переважно за розміром (молекулярною масою)**.

Білки рухаються через поліакриламідний гель, який виконує роль молекулярного фільтра:

- **менші білки** мігрують швидше;
- **більші білки** рухаються повільніше.

Для визначення молекулярної маси досліджуваного білка використовують **стандартні білкові маркери** (protein ladder) з відомими молекулярними масами. Порівнюючи відстань міграції досліджуваного білка зі стандартами, можна побудувати **калібрувальну залежність між логарифмом молекулярної маси та відносною електрофоретичною рухливістю (Rf)** і визначити молекулярну масу невідомого білка.

Дослідження білкових комплексів методом Native PAGE

Метод **Native PAGE** (нативний поліакриламідний електрофорез) застосовується для дослідження білків у їх природному, нативному стані.

На відміну від SDS-PAGE:

- детергенти не використовуються;
- структура білка не руйнується;
- зберігаються білок-білкові взаємодії.

У цьому методі міграція молекул залежить одночасно від:

- молекулярної маси;
- електричного заряду;
- просторової структури білка.

Native PAGE широко застосовується для:

- аналізу **білкових комплексів**;
- дослідження **олігомерного стану білків**;
- виявлення взаємодії між білками;
- вивчення ферментативної активності після електрофорезу.

Якщо два білки утворюють комплекс, під час Native PAGE може спостерігатися **додаткова смуга**, що відповідає комплексу з більшою молекулярною масою. Для підтвердження взаємодії порівнюють електрофоретичні профілі:

- окремих білків;
- їх суміші.

Поява нової смуги з іншою рухливістю свідчить про **утворення білкового комплексу**.

Електрофоретична рухливість частинок

Однією з основних характеристик процесу електрофорезу є **електрофоретична рухливість**.

Електрофоретична рухливість (μ) визначає швидкість переміщення зарядженої частинки в електричному полі при одиничній напруженості поля.

Вона визначається за формулою:

$$\mu = vE$$

де:

- μ — електрофоретична рухливість;
- v — швидкість переміщення частинки;
- E — напруженість електричного поля.

Електрофоретична рухливість залежить від таких факторів:

- величини заряду молекули;
- розміру та форми частинки;
- в'язкості середовища;
- температури;
- складу та рН буферного розчину;
- пористості гелю.

Цей параметр є важливим для кількісного опису процесів міграції біомолекул під час електрофоретичного аналізу.

Електрофорез ДНК у агарозному гелі

Електрофорез у **агарозному гелі** є стандартним методом розділення фрагментів ДНК за їх довжиною.

Агароза – це полісахарид, отриманий із морських водоростей. Після застигання вона утворює пористу гелеву матрицю, яка функціонує як **молекулярне сито**.

Молекули ДНК мають негативний заряд через фосфатні групи у складі нуклеотидів, тому під дією електричного поля вони рухаються до **позитивного електрода (анода)**.

Оскільки співвідношення заряд/маса у фрагментів ДНК приблизно однакове, їх розділення у гелі залежить головним чином від **довжини молекули**:

- **менші фрагменти ДНК** рухаються швидше;
- **більші фрагменти ДНК** рухаються повільніше.

Концентрація агарози визначає розмір пор гелю:

- **0,5–1% агарози** – для великих фрагментів ДНК;
- **1–2% агарози** – для середніх і малих фрагментів.

Для визначення довжини фрагментів ДНК використовують **маркер молекулярної маси (DNA ladder)**, який містить фрагменти відомої довжини. Після електрофорезу ДНК візуалізують за допомогою флуоресцентних барвників під ультрафіолетовим освітленням.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

ЗАДАЧА 1. Визначення молекулярної маси білка методом SDS-PAGE

У лабораторії проведено електрофоретичне розділення білків методом SDS-PAGE в поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах.

Для побудови калібрувальної залежності використано стандартний набір білків із відомими молекулярними масами. Після завершення електрофорезу виміряно відносну рухливість (R_f) стандартних білків та досліджуваного зразка.

Відомо, що у методі SDS-PAGE існує лінійна залежність між логарифмом молекулярної маси білка ($\log MW$) та його відносною рухливості (R_f).

Дані:

MW кДa	Rf	log10(MW)
25	0,80	
50	0,65	
75	0,50	
100	0,35	

Для досліджуваного білка виміряно:

$$R_f = 0,45$$

Завдання:

1. Побудувати калібрувальний графік залежності **log(MW)** від **Rf**.
2. За отриманою залежністю визначити молекулярну масу досліджуваного білка.
3. Записати відповідь у кДа з точністю до 1 кДа.
4. Коротко пояснити принцип визначення молекулярної маси білка методом SDS-PAGE.

[illegible]

This image shows a single sheet of white paper with horizontal blue or grey ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There are approximately 20 lines visible. The paper has a slight shadow on the right side, suggesting it's resting on a surface. There is no handwriting or other markings on the paper.

ЗАДАЧА 2. Ситуаційна задача з теми: Дослідження білкових комплексів методом Native PAGE

У біохімічній лабораторії вивчають взаємодію двох очищених білків – білка А та білка В. За попередніми даними існує припущення, що ці білки можуть утворювати стабільний білковий комплекс у розчині.

Для перевірки цієї гіпотези дослідники вирішили використати електрофоретичний метод, який дозволяє аналізувати білки без їх денатурації та без руйнування можливих міжмолекулярних взаємодій.

Було проведено електрофоретичне розділення білків у поліакриламідному гелі за нативних умов. У гель були нанесені такі зразки:

1. Білок А
2. Білок В
3. Суміш білка А та білка В (інкубовані разом перед електрофорезом)

Після завершення електрофорезу гель пофарбували для візуалізації білкових смуг.

Завдання:

- [illegible]

ЗАДАЧА 3. Визначення електрофоретичної рухливості частинок

Під час електрофоретичного експерименту було отримано такі значення:

- швидкість переміщення білкової молекули $v=0,25$ см/хв
- напруженість електричного поля $E=10$ В/см

Завдання:

1. Обчисліть електрофоретичну рухливість частинки (μ).
2. Запишіть результат із правильними одиницями вимірювання.
3. Поясніть, які фізико-хімічні фактори можуть впливати на величину електрофоретичної рухливості молекул під час електрофорезу.

This image shows a blank sheet of white paper with horizontal ruling lines. The lines are evenly spaced and extend across the width of the page. There are no margins, text, or other markings on the paper.

ЗАДАЧА 4. Електрофорез ДНК у агарозному гелі

Дослідник підготував два зразки ДНК:

- фрагмент довжиною **500 пар основ (бр)**
- фрагмент довжиною **1000 пар основ (бр)**

Обидва зразки були нанесені в лунки 1 % агарозного гелю та піддані електрофорезу за однакових умов (однакова напруга, буфер та час проведення експерименту).

Завдання:

1. Який із фрагментів ДНК переміститься на **більшу відстань** у гелі?
2. Поясніть причину різниці у міграції фрагментів ДНК.
3. Як зміниться роздільна здатність для цих фрагментів, якщо збільшити концентрацію агарози до 2 %?

This image shows a single sheet of white paper with horizontal blue or grey ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There are approximately 20 lines visible. The paper has a slight shadow on the right side, suggesting it's resting on a surface.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 5

Тема: Кількісний та якісний аналіз біомолекул методом мас-спектрометрії

Мета

- навчитися інтерпретувати мас-спектри
- визначати молекулярну масу білків, пептидів та лікарських речовин
- проводити кількісний аналіз з використанням внутрішніх стандартів

ТЕОРЕТИЧНИЙ БЛОК

Мас-спектрометрія (MS) є високочутливим і точним методом аналізу біомолекул, що дозволяє визначати молекулярну масу, кількість і склад білків, пептидів, нуклеїнових кислот та інших біомолекул. MS часто поєднується з **високоєфективною рідинною хроматографією (HPLC-MS)** для підвищення селективності та роздільної здатності.

Основні принципи методу:

1. Молекули іонізуються та перетворюються на заряджені частинки.
2. Іони розділяються у полі залежно від **співвідношення маси до заряду (m/z)**.
3. Інтенсивність піків у спектрі дозволяє визначити кількісний вміст аналіту.
4. Використання внутрішніх стандартів і мультизаряджених іонів забезпечує точність і розширює межі аналізу.

Визначення молекулярної маси молекули за даними мас-спектрометрії

Метод мас-спектрометрії широко застосовується для аналізу біомолекул, визначення їх молекулярної маси, складу та структури. Він є важливим інструментом у дослідженнях у галузі дисциплін Біоаналітична хімія, Біохімія та Протеоміка.

У мас-спектрометрії молекули іонізуються та перетворюються на заряджені частинки (іони), які потім розділяються залежно від **відношення маси до заряду (m/z)**. Значення m/z визначається як відношення молекулярної маси іона до його заряду.

Молекулярна маса молекули (M) визначається на основі піку в спектрі за формулою:

$$M = (m/z \times z) - z \times m_H$$

де:

- **M** – молекулярна маса молекули;

- m/z – експериментально виміряне значення маси до заряду;
- z – заряд іона;
- m_H – маса протона (приблизно 1 Да).

Для білків і пептидів, що утворюють мультизаряджені іони, важливо враховувати **кількість протонів**, що додаються під час іонізації.

Пояснення: Однозаряджені іони дають пряме значення молекулярної маси, тоді як мультизаряджені іони потребують додаткового розрахунку, але дозволяють аналізувати великі молекули.

Кількісний аналіз методом внутрішнього стандарту

Метод **внутрішнього стандарту** широко використовується в аналітичній хімії та біоаналітиці для визначення концентрацій аналітів у складних зразках. Він дозволяє зменшити вплив факторів, що змінюють сигнал під час вимірювань (наприклад, коливання чутливості при детекції або втрати під час підготовки зразка).

Принцип методу:

1. До зразка додають **відому кількість внутрішнього стандарту (IS)**, що подібний до аналіту, але легко відрізняється при детекції.
2. Вимірюють **інтенсивність сигналу (I)** для аналіту та внутрішнього стандарту.
3. За відомою концентрацією внутрішнього стандарту та співвідношенням сигналів визначають концентрацію аналіту.

Визначення концентрації аналіту C_A проводять за методом внутрішнього стандарту, використовуючи просту пропорцію:

$$C_A/C_{IS}=I_A/I_{IS}$$

де:

- C_A – концентрація аналіту (мкг/мл);
- C_{IS} – концентрація внутрішнього стандарту (мкг/мл);
- I_A – інтенсивність сигналу аналіту;
- I_{IS} – інтенсивність сигналу внутрішнього стандарту.

Пояснення: Якщо сигнал аналіту вдвічі більший за сигнал стандарту, а концентрація стандарту відома, можна визначити концентрацію аналіту пропорційно.

Розрахунок значень m/z для мультизаряджених іонів у мас-спектрометрії

Метод **мас-спектрометрії (MS)** дозволяє визначати молекулярну масу молекул на основі відношення **масса/заряд (m/z)**. Для іонів із множинним зарядом $z > 1$ у спектрі з'являються пік(и) з меншими значеннями m/z порівняно з іонами одиничного заряду. Це дозволяє аналізувати великі молекули (пептиди, білки), що інакше були б важко детектовані.

Формула для розрахунку:

$$m/z = (M + z \cdot m_H) / z$$

де:

- M — молекулярна маса молекули (Da);
- z — заряд іона;
- m_H — маса протона, приблизно 1 Da.

Інтерпретація мас-спектрометричних даних після HPLC-MS

Основний пік відповідає **повністю протонованому або молекулярному іону білка**.

Під час HPLC-MS аналізу часто спостерігаються:

- Основний пік білка/пептиду, що відповідає цільовій молекулі.
- Додаткові піки з меншим m/z , які можуть виникати через:
 - **деградацію білка** (протеолітичне розщеплення, часткове розривання пептидних зв'язків);
 - **дегідратацію або втрату модифікованих груп** (наприклад, втрати води, фосфорильованих або глікозильованих залишків);
 - **аддукси** з меншими зарядами (якщо основний пік відповідає іону з вищим зарядом, менші заряди призводять до менших m/z);
 - **ізотопні піки** та різні ізотопні склади (наприклад, C^{13}/C^{12}).
- Додаткові піки не завжди свідчать про забруднення, але можуть вказувати на **гетерогенність зразка або побічні реакції**.

Підхід до інтерпретації:

- Порівняння спектрів сумішей і окремих компонентів.
- MS/MS для підтвердження структури піків.
- Повторний HPLC-MS для перевірки стабільності молекул.

Вибір методу мас-спектрометрії для аналізу великих білків.

□ **MALDI-MS** – метод, при якому молекула змішується з кристалічною матрицею та іонізується під дією лазерного випромінювання. Основні характеристики:

- генерує переважно **однозаряджені іони**, що спрощує інтерпретацію спектрів;
- мінімальна фрагментація молекули;
- добре підходить для великих молекул (>50–100 кДа), включаючи білки та поліпептиди.

□ **ESI-MS** – метод, що утворює **мультизаряджені іони** шляхом розпилення розчину аналіту у електричному полі. Основні характеристики:

- утворює **множинні заряди**, що зменшує m/z , але ускладнює спектр;
- підходить для менш полярних та середніх молекул;

- для дуже великих білків складніше отримати чіткі піки через **широкий розподіл зарядів**.
 - Порівняльні переваги MALDI-MS для великих білків:
 1. Простота спектру (однозаряджені піки).
 2. Мала фрагментація великих молекул.
 3. Можливість аналізувати білки високої молекулярної маси (>100 кДа).
 - Недоліки ESI-MS для великих білків:
 - складність інтерпретації спектрів через мультизаряджені іони;
 - можливі розподіли та перекриття піків, що ускладнює визначення точної маси.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

ЗАДАЧА 1. Визначення молекулярної маси молекули за даними мас-спектрометрії

Під час аналізу зразка методом мас-спектрометрії було отримано пік із такими параметрами:

Пік в MS = 657,3 (m/z), заряд іона $z = 2$

Завдання:

1. Визначте молекулярну масу досліджуваної молекули.
2. Виконайте розрахунок, використовуючи масу протона $m_H \approx 1$ Да.
3. Запишіть отриманий результат у дальтонах (Да).

ЗАДАЧА 2. Кількісний аналіз методом внутрішнього стандарту

Дані:

- Внутрішній стандарт: $C_{IS} = 5$ мкг/мл, $I_{IS} = 200$
- Аналіт: $I_A = 450$

Завдання:

Визначити концентрацію аналіту C_A за методом внутрішнього стандарту.

ЗАДАЧА 3. Розрахунок відношення m/z у мультизаряджених іонів у мас-спектрометрії

Дані: Іон з $MW = 1200$ Da, заряди +2, +3

Завдання:

1. Розрахувати значення m/z для іона з зарядом +2.
2. Розрахувати значення m/z для іона з зарядом +3.
3. Вказати, які піки будуть спостерігатися у мас-спектрі.

ЗАДАЧА 4. Інтерпретація мас-спектрометричних даних після HPLC-MS

Ситуація: У лабораторії проведено HPLC-MS аналіз білка для визначення його молекулярної маси та чистоти зразка. Під час аналізу в спектрі спостерігаються додаткові піки з m/z нижче основного піка білка.

Завдання:

1. Проаналізувати можливі причини появи цих додаткових піків.
2. Вказати фізико-хімічні та аналітичні фактори, що можуть призвести до зменшення m/z .
3. Запропонувати методи перевірки та підтвердження природи додаткових піків.

ЗАДАЧА 5. Вибір методу мас-спектрометрії для аналізу великих білків

У сучасних біохімічних лабораторіях широко застосовуються різні методи мас-спектрометрії для визначення молекулярної маси та структури

білків. Найпоширеніші методи іонізації – **MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)** та **ESI (Electrospray Ionization)**.

Під час підготовки до експерименту виникає питання:

Завдання:

1. Поясніть, чому метод **MALDI-MS** більш підходить для аналізу великих білків у порівнянні з **ESI-MS**.
2. Вкажіть фізико-хімічні принципи іонізації, які визначають переваги та обмеження кожного методу.
3. Наведіть приклади випадків, коли вибір методу може вплинути на точність визначення молекулярної маси великого білка.

This image shows a single sheet of white paper with horizontal blue or grey ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There are no margins, text, or other markings on the paper.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Скоог Д. А., Голлер Ф. Дж., Крауч С. Р. Основы аналитической химии. – Київ : ВСВ «Медицина», 2019. – 1056 с.
2. Lakowicz J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. – 3rd ed. – New York : Springer, 2006. – 954 p.
3. Pavia D. L., Lampman G. M., Kriz G. S. Introduction to Spectroscopy. – 5th ed. – Boston : Cengage Learning, 2015. – 784 p.
4. Christian G. D. Analytical Chemistry. – 6th ed. – New York : Wiley, 2004. – 828 p.
5. Valeur B., Berberan-Santos M. N. Molecular Fluorescence. – 2nd ed. – Wiley-VCH, 2012. – 592 p.
6. Боровський, О. М., & Козак, М. В. Біоаналітична хімія: сучасні методи досліджень. – К.: Вища школа, 2020. – 456 с.
7. Соколова, Т. В. Методи спектроскопії в біохімії та фармацевтичній хімії. – Львів: Світ науки, 2019. – 312 с.
8. Хмельницький, В. П. Електрофорез і хроматографія біомолекул. – Харків: Фоліант, 2018. – 298 с.
9. Gross, J. H. Mass Spectrometry: A Textbook. – 3rd ed. – Berlin: Springer, 2017. – 672 p.
10. Nelson, D. L., Cox, M. M. Lehninger Principles of Biochemistry. – 7th ed. – New York: W. H. Freeman, 2017. – 1232 p.
11. Hermanson, G. T. Bioconjugate Techniques. – 3rd ed. – London: Academic Press, 2013. – 1128 p.
12. Ekins, R. P. Immunoassay: A Practical Guide. – London: Taylor & Francis, 2010. – 288 p.
13. Шелест, І. В., & Петренко, О. В. Флуоресцентні методи аналізу в біохімії. – Київ: Академвидав, 2021. – 184 с.
14. Skoog, D. A., Holler, F. J., Crouch, S. R. Principles of Instrumental Analysis. – 7th ed. – Belmont: Cengage Learning, 2017. – 1120 p.
15. Практичні методики роботи в біохімічній лабораторії: підручник / за ред. І. С. Кузнєцової. – Київ: Либідь, 2016. – 384 с.

Навчальне видання

СУЧАСНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ СИСТЕМ

ЕЛЕКТРОННІ МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти
факультету хімії та фармації
спеціальності Фармація, Хімія

Електронне практичне видання

Укладачі:

**Цісак Альона Олександрівна
Устянська Ольга Володимирівна**

В авторській редакції

Затв. авт. 07.08.2026. Шрифт Times New Roman.
Системні вимоги: операційна система сумісна з програмним забезпеченням
для читання файлів формату PDF.
Обсяг 0,9 МБ. Зам. № 3213.

Видавець:

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
вул. Змієнка Всеволода, буд. 2, м. Одеса, 65001, Україна
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 8592 від 23.03.2026 р.
Тел.: (048) 723 28 39, e-mail: druk@onu.edu.ua