

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. І. МЕЧНИКОВА
Біологічний факультет
Кафедра біохімії



**МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ ДО ВИКОНАННЯ
ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ
З ХІМІЇ БІООРГАНІЧНОЇ**

**ЧАСТИНА І. ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ АМІНОКИСЛОТ,
БІЛКІВ, НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ**

для студентів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти
зі спеціальності 091 «Біологія», 014.05 «Середня освіта (Біологія та здоров'я
людини)»

ОДЕСА
2022

УДК 577.11

M545

Федорко Н. Л., Чернадчук С. С., Будняк О. К., Запорожченко О. В., Петров С. А., Сорокін А. В.

Рецензенти:

Задерей Н. С., кандидат біологічних наук, доцент кафедри генетики та молекулярної біології Одеського національного університету імені І. І. Мечникова;

Рижко І. Л., кандидат біологічних наук, доцент кафедри гідробіології та загальної екології Одеського національного університету імені І. І. Мечникова

Рекомендовано до друку Вченою Радою
біологічного факультету ОНУ імені І. І. Мечникова
Протокол № 6 від 15.02.2022 р

M545 Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з дисципліни «Хімія біоорганічна» (для студентів біологічного факультету денної та заочної форм навчання) [електронний ресурс] / Н. Л. Федорко, С. С. Чернадчук, О. К. Будняк та ін. – Одеса, 2022. – 82 с.

Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт розроблені відповідно до вимог навчальної програми з дисципліни «Хімія біоорганічна» для здобувачів першого рівня вищої освіти спеціальностей 091 Біологія, 014.05 «Середня освіта (Біологія та здоров'я людини).

Мета методичних вказівок до виконання лабораторних робіт – допомогти студентам засвоїти теоретичні розділи курсу та опанувати загальними методами визначення основних органічних сполук щодо розуміння їх функціонування в організмі.

Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з дисципліни «Хімія біоорганічна» містять опис проведення 26 лабораторних занять, для кожного з них наведено тему, мету, перелік матеріалів, реактивів та обладнання, необхідних для проведення заняття, перелік запитань до перевірки засвоєння знань та перелік літератури. Кожна тема супроводжується певною теорією. Невід'ємною частиною Методичних вказівок є коротка інструкція з техніки безпеки та охорони праці в біохімічній лабораторії.

УДК 577.11

© Федорко Н. Л., Чернадчук С. С., Будняк О. К., Запорожченко О. В.,
Петров С. А., Сорокін А. В., 2022

ЗМІСТ

Загальні відомості	5
Розділ І. Фізико-хімічні властивості амінокислот	10
Тема 1. Загальні властивості амінокислот	10
<i>Лабораторна робота №1</i>	12
Виявлення оптичної активності амінокислот	
<i>Лабораторна робота №2</i>	15
Реакція амінокислот з азотистою кислотою	
<i>Лабораторна робота №3</i>	16
Реакція амінокислот з нінгідрином	
<i>Лабораторна робота №4</i>	18
Дослідження рН водних розчинів амінокислот	
<i>Лабораторна робота №5</i>	20
Амфотерність розчинів амінокислот	
<i>Лабораторна робота №6</i>	22
Реакція амінокислот із формальдегідом	
<i>Лабораторна робота №7</i>	23
Утворення хелатів амінокислот	
<i>Лабораторна робота №8</i>	25
Флюоресценція амінокислот	
Тема 2. Властивості окремих амінокислот	26
<i>Лабораторна робота №9</i>	26
Ксантопротеїнова реакція	
<i>Лабораторна робота №10</i>	28
Реакція Міллона	
<i>Лабораторна робота №11</i>	30
Реакція Фоліна на тирозин та цистеїн	
<i>Лабораторна робота №12</i>	31
Діазореакція (реакція Паулі)	
<i>Лабораторна робота №13</i>	33
Реакція Шульця-Распайля	
<i>Лабораторна робота № 14</i>	34
Реакція Адамкевіча	
<i>Лабораторна робота № 15</i>	35
Реакція на аргінін (Сакагучі)	
<i>Лабораторна робота № 16</i>	36
Реакції на сірковмістні амінокислоти	

Тема 3. Розподільна хроматографія на папері	
<i>Лабораторна робота № 17</i>	38
Розділення суміші амінокислот методом розподільчої хроматографії на папері	
Розділ II. Фізико-хімічні властивості білків	51
<i>Лабораторна робота № 18</i>	52
Виявлення пептидних зв'язків (біуретова реакція)	
<i>Лабораторна робота № 19</i>	53
Нінгідринова реакція	
<i>Лабораторна робота № 20</i>	53
Розчинність білків	
<i>Лабораторна робота № 21</i>	54
Осадження білків	
<i>Лабораторна робота № 22</i>	60
Визначення ізоелектричної точки білків	
<i>Лабораторна робота № 23</i>	61
Діаліз білків	
Розділ III. Фізико-хімічні властивості нуклеїнових кислот	65
Тема 1. Будова нуклеїнових кислот	65
<i>Лабораторна робота № 24</i>	
Визначення компонентів нуклеїнових кислот шляхом гідролізу нуклеопротейдів	68
Тема 2. Оптичні властивості нуклеїнових кислот	72
<i>Лабораторна робота № 25</i>	
Визначення вмісту нуклеотидів за методом Василенко, Камзоловим та Кноре	74
<i>Лабораторна робота № 26</i>	
Кількісне визначення нуклеїнових кислот за вуглеводним компонентом	75
Список літератури	80

ЗАГАЛЬНІ ВІДОМОСТІ

Хімія біоорганічна вивчає будову та біологічні функції найважливіших компонентів живої матерії, насамперед біополімерів та низькомолекулярних біологічних регуляторів, приділяючи головну увагу з'ясуванню закономірностей взаємозв'язку між структурою та біологічною дією.

Хімія біоорганічна — це фундаментальна наука на стику хімії та біології, вона сприяє розкриттю принципів функціонування живих систем. Але вона має і виражену практичну спрямованість, будучи теоретичною основою отримання нових цінних сполук для медицини, сільського господарства, низки галузей промисловості.

«Хімія біоорганічна» є нормативною дисципліною для студентів біологічного факультету Одеського національного університету імені І. І. Мечникова, які навчаються за спеціальностями 091 «Біологія» та 014.05 «Середня освіта. Біологія та здоров'я людини».

Дисципліна «Хімія біоорганічна» викладається студентам другого курсу денної форми навчання першого рівня освіти (бакалаврського) в четвертому семестрі та студентам третього курсу заочної форми в шостому семестрі і студентам четвертого курсу у сьомому семестрі. Загальний обсяг лабораторних занять складає 60 академічних годин на денному відділенні та 24 академічних години на заочному відділенні.

Лабораторні роботи з курсу Хімія біоорганічна сприяють оволодінню наступних *методів дослідження*: основний арсенал складають методи органічної хімії, проте для вирішення структурно-функціональних завдань залучаються різноманітні фізичні, фізико-хімічні, математичні та біологічні методи.

Об'єкти вивчення: амінокислоти, білки, пептиди, нуклеїнові кислоти, вуглеводи, ліпіди, біополімери змішаного типу — глікопротеїни, ліпопротеїни, гліколіпіди, вітаміни тощо.

Основні завдання: виділення в індивідуальному стані сполук, що досліджуються, встановлення їх структури, зрозуміння зв'язку структури сполук та їх біологічних функцій, тестування отриманих сполук *in vitro* та *in vivo*.

Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з хімії біоорганічної включають класичні біохімічні методи та нові методики. У процесі проведення лабораторних робіт студенти повинні засвоїти великий обсяг фактичного матеріалу та виконати практичні частини лабораторних робіт із основних розділів курсу хімії біоорганічної.

Мета методичних вказівок до виконання лабораторних робіт – надати студентам можливість при вивченні курсу «Хімія біоорганічна» *отримати:*

- ✓ *знання* про будову та властивості найважливіших компонентів живої матерії, про їх біологічні функції;
- ✓ *вміння* працювати з хімічним посудом, реактивами, ваговою технікою, готувати розчини, працювати з приладами, вести протоколи експерименту;
- ✓ *навички* самостійно працювати з біологічним матеріалом, планувати та проводити експеримент, аналізувати отримані дані, робити логічні висновки.

Кожне завдання, формули, розрахунки та висновки щодо виконаних робіт оформляються протоколом у спеціальному зошиті.

Завдання вважається виконаним лише після перевірки та підпису викладача.

КОРОТКА ІНСТРУКЦІЯ **з техніки безпеки та охорони праці в біохімічній лабораторії**

Перед початком виконання практичних робіт необхідно перевірити справність обладнання, вентиляції, газової мережі, водопроводу, системи електроживлення. У разі виявлення несправностей, що створюють підвищену небезпеку, роботу в лабораторії забороняється проводити до їх усунення.

Хімічні речовини при невмілому і неправильному використанні можуть стати причиною отруєння осіб, які працюють, викликати пожежу, вибух чи хімічний опік.

З метою виключення випадків травматизму при роботах у хімічних лабораторіях необхідно виконувати наступні вимоги:

1. Кожен студент до початку досліду повинен добре ознайомитися з властивостями речовин, з якими прийдеться стикатися і необхідними умовами безпечного проведення роботи з урахуванням можливих побічних реакцій.

2. При використанні витяжної шафи, з метою більш ефективної дії вентиляції, слід підняти дверцята витяжної шафи на 1/3 – 1/4 її підйому. Після закінчення роботи необхідно щільно прикрити дверцята шафи.

3. У випадку перерви дії вентиляції всі роботи у витяжних шафах, які пов'язані з виділенням шкідливих газів, парів, треба негайно припинити.

4. Не залишати ніяких речовин у посуді без етикеток. Не проводити ніяких дослідів у нечистому посуді. Посуд мити одразу ж після досліду, використовуючи мийні засоби.

5. Не залишати включених нагрівальних приладів, пальників, що горять, відкритих газових і водопровідних кранів.

6. Перелік реактивів-прекурсорів:

Прекуртори (лат. *prae* — попереду, перед + *cursus* — напрямок) — речовини та їх солі, класифіковані в міжнародних конвенціях як хімічні матеріали, що використовуються для приготування наркотичних і психотропних речовин, а також

хімічні речовини та їх солі, що використовуються з аналогічною метою і віднесені Комітетом з контролю за наркотиками при МОЗ України до зазначеної категорії. КМУ затверджено перелік прекурсорів у вигляді таблиці (списку № 1 та списку № 2).

Список № 1. Прекурсори, обіг яких обмежено і стосовно яких вжито певні заходи контролю

Міжнародна непатентована назва	Хімічна назва
N-Ацетил-антранілова кислота	2-Ацетиамінобензойна кислота
Ергометрин	Бета-пропаноламід лізергінової кислоти малеат, 9,10-дидегідро-N-[(S)-2-гідрокси-1-метилетил]-6-метилерголін-8β карбоксіамід малеат
Ерготамін	Ерготаман 3', 6', 18-тріон, 12'-гідрокси-2'метил-5'-(фенілметил)-(5'α),[R-R*,R*])-2,3-дигідроксибутандіоат
Ефедрин	[R-(R*,S)]-α-[1-(метиламіно)етил]-фенілметанол, 1-феніл-2-(метиламіно)-пропанол
Ізосафрол	3,4-метилендіокси-(1-пропеніл)бензол
Лізергінова кислота	9,10-Дидегідро-6-метилерголін-8β-карбонова кислота
3,4-Метиленді-оксифеніл-2-пропанон (3,4-МДФ-2П)	3,4-Метилендіокси-(пропіл-2-он)бензол
Піперональ	3,4-(Метилендіокси)бензальдегід, геліотропін
Псевдоефедрин	[S-(R*,R*)]-α-[1-(метиламіно)етил]-феніл-метанол, 1-феніл-2-(метиламіно)-пропанол
Сафрол	3,4-Метилендіоксіалілбензол
Фенілацетон	1-Феніл-2-пропанон; метилбензилкетон
Фенілпропаноламін (ФПА, норефедрин)	(±)-2-Аміно-1-фенілпропанол-1

Список № 2. Прекурсори, стосовно яких вживаються певні заходи контролю

Міжнародна непатентована назва	Хімічна назва
Ангідрид оцтової кислоти	Оцтовий ангідрид
Антранілова кислота	2-Амінобензойна кислота
Ацетон	2-Пропанон
Етиловий ефір	Діетиловий ефір
Калію перманганат	Калій марганцевокислий

Міжнародна непатентована назва	Хімічна назва
Метилетилкетон	2-Бутанон
Піпередин	Гексагідропіридин, пентаметиленімін
Сірчана кислота	Сульфатна кислота
Соляна кислота	Хлористоводнева кислота
Толуол	Метилбензол
Фенілоцтова кислота	Альфа-толуїлова кислота

Примітка. До цих списків також включають солі перелічених речовин у разі, коли утворення таких солей можливе, за винятком солей сірчаної та соляної кислот. Матеріали, що містять не менше ніж 10 % таких прекурсорів, як ацетон, етиловий ефір, метилетилкетон та толуол, підлягають тим же заходам контролю, що й прекурсори.

ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ ПРИ РОБОТІ З ЇДКИМИ РЕЧОВИНАМИ ТА РЕАКТИВАМИ-ПРЕКУРСОРАМИ

1. При змішуванні концентрованих сірчаної й азотної кислот користуватися тільки товстостінним хімічним чи порцеляновим посудом.
2. Щоб уникнути розбризкування при розведенні концентрованої сірчаної кислоти – слід приливати кислоту у воду, а не навпаки.
3. При попаданні кислот чи лугів на поверхню шкіри їх необхідно негайно змити сильним струменем води.
4. Їдкі луги дають опіки всіх ступенів. Тому при роботі з зазначеними розчинами необхідно застосовувати міри проти розбризкування і використовувати захисний спецодяг захисні і запобіжні окуляри.
5. Наповнення піпеток концентрованими кислотами, лугами та іншими рідинами шляхом всмоктування ротом категорично забороняється, для цього потрібно користатися сифонами, спеціальними піпетками з гумовою грушею або автоматичними піпетками.

ЗАХОДИ БЕЗПЕКИ ПРИ РОБОТІ З ГОРЮЧИМИ І ЛЕГКОЗАЙМИСТИМИ РЕЧОВИНАМИ

1. При роботі з горючими і легкозаймистими рідинами (сірковуглець, ефір, бензол і т. д.) необхідно виконувати такі правила:
 - а) не користуватися відкритим полум'ям для нагрівання;
 - б) не тримати ці сполуки на столах у великих кількостях;
 - в) переливати у даліні від вогню, а при переливанні великих кількостей усі нагрівачі (газові й інші пальники) у приміщенні згасити;
 - г) не виливати ці речовини в раковину;
 - д) не гріти на відкритому вогні, а тільки на водяній бані.
2. При роботі з масляними банями користатися термометром і не перевищувати температуру займання горючих сполук.

3. Не нахилятися над судиною, у якій що-небудь кипить чи у яку наливається яка-небудь рідина (особливо їдка), тому що бризки можуть потрапити в очі.

4. Пробірку, у якій нагрівається рідина, тримати отвором у бік, а не до себе чи до поруч працюючого, тому що рідина внаслідок нагрівання нерідко викидається з пробірки.

5. У випадку займання горючих рідин:

а) негайно погасити всі пальники, виключити електронагрівальні прилади;

б) відставити судини з вогнебезпечними речовинами;

в) прикрити полум'я мокрою ковдрою, а при потребі засипати піском;

г) вимикати вентиляційні прилади;

д) при необхідності використовувати вуглекислотний вогнегасник;

е) терміново повідомити пожежну охорону (тел.101) і керівництво факультету.

ПРАВИЛА РОБОТИ З ЕЛЕКТРИЧНИМИ ПРИЛАДАМИ

1. Перед початком роботи слід перевірити справність електроприладу.

2. Перед включенням прилади повинні бути заземлені, якщо цього вимагають їхні інструкції користування.

3. Працювати з електронагрівальними приладами, що мають відкриту спіраль, у хімічній лабораторії категорично заборонено.

4. Перед включенням приладу необхідно перевірити справність розетки і цілісність шнурів, особливо від електроплиток.

5. При роботі з приладами, що генерують високу напругу, необхідно ретельно перевірити їх заземлення, а також не торкатися електронесучих вузлів.

6. При роботі з центрифугами центрифужні пробірки попарно врівноважувати на центрифужних вагах і поміщати в гнізда ротора одна напроти другої. У разі забруднення гнізда ротора слід його ретельно очистити і висушити.

7. Після закінчення роботи необхідно виключити всі використані в роботі електроприлади.

Після вивчення і зрозуміння правил техніки безпеки та охорони праці при роботі в біохімічній лабораторії робиться відповідна відмітка у спеціальному журналі, де кожен студент ставить свій підпис і після чого допускається до виконання лабораторних робіт з біохімії.

РОЗДІЛ І. ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ АМІНОКИСЛОТ

ТЕМА 1. ЗАГАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ АМІНОКИСЛОТ

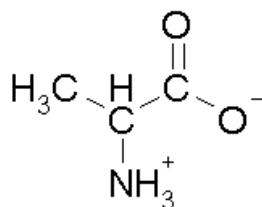
Мета: вивчити будову і властивості амінокислот.

Питання для підготовки та обговорення:

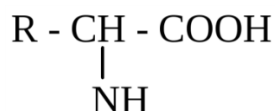
1. Будова амінокислот. Принципи класифікації амінокислот.
2. Фізико - хімічні властивості амінокислот.
3. Які види ізомерії характерні для амінокислот?
4. Основні реакції амінокислот.
5. Визначення амінокислотного складу білків, кількісний та якісний аналіз амінокислотного складу.

Амінокислота - органічна кислота, що містить одночасно дві функціональні групи: кислу карбоксильну ($-\text{COOH}$) та основну аміногрупу ($-\text{NH}_2$). Тому і така назва – «амінокислота».

У межах рН розчинів від 4,0 до 9,0 усі амінокислоти існують у формі цвітеріонів (zwitter-ion= дипольярний іон) – з протонованою аміногрупою (NH_3^+) та дисоційованою карбоксильною групою - ($-\text{COO}^-$). Така собі двобічна (кисло-основна) молекула або амфоліт - молекула, що має властивість «двобічності» - амфотерності (грец. amphoteros- двобічний).



Амінокислоти відрізняються одна від одної хімічною природою радикалу R, що представляє групу атомів у молекулі амінокислоти, пов'язану з α -вуглецевим атомом і не бере участь в утворенні пептидного зв'язку при синтезі білка.



Амінокислоти класифікуються залежно від природи радикалів, хоча було запропоновано інші основи. Зокрема, розрізняють ароматичні та аліфатичні амінокислоти, а також амінокислоти, що містять сірку або гідроксильні групи. Часто класифікація полягає в природі заряду амінокислоти.

Раціональна класифікація, заснована на полярності радикалів, виділяє 4 класи амінокислот:

1. Неполлярні, або гідрофобні (аланін, валін, лейцин, ізолейцин, триптофан, пролін, фенілаланін, метіонін);
2. Полярні (гідрофільні незаряджені) (гліцин, серин, треонін, цистеїн, тирозин, аспарагін, глутамін);
3. Негативно заряджені (аспарагінова кислота, глутамінова кислота);
4. Позитивно заряджені при фізіологічних значеннях рН (при рН 6,0 - 7,0) (лізин, аргінін, гістидин).

Існує багато методів дослідження фізико-хімічних властивостей амінокислот. Це, методи визначення рН та амфотерних характеристик, кольорові реакції на амінокислоти (загальні, групові, окремі), використання флуоресценції тощо. Усі природні амінокислоти, крім глікоколу, оптично активні. У водних розчинах (або у HCl) вони здатні обертати площину поляризованого пучка (виняток становить гліцин). Ця властивість обумовлена наявністю в молекулі всіх природних амінокислот (крім гліцину) в α -положенні асиметричного атома вуглецю (тобто атому вуглецю, у якого всі чотири валентні зв'язки займають різні замісники).

Для позначення напрямку оптичного обертання площини використовуються знаки (+) - правообертальні і (–) – лівообертальні. Ряд амінокислот (гістидин, лейцин, метіонін, цистеїн, треонін, фенілаланін, тирозин, пролін, триптофан, оксипролін, серин) в нейтральних водних розчинах є лівообертальними. При цьому серед α -амінокислот є правообертальні (аланін, валін, ізолейцин, аспарагінова кислота, глутамінова кислота, аргінін, лізин).

Значення питомого обертання праворуч або ліворуч - кількісна характеристика оптичної активності, і для більшості амінокислот становить від 10 до 30°. Величина і знак оптичного обертання залежать від характеру радикалів амінокислот і значення рН розчину, в якому вимірюється оптичне обертання.

Всі амінокислоти, що утворюються при гідролізі природних білків в умовах, що виключають расемізацію, відносяться до L-ряду, тобто мають просторове розташування, схоже на конфігурацію L-гліцеринового альдегіду. Символи L і D вказують на те, що амінокислота належить до L- або D-ряду в своїй стереохімічній конфігурації, в той час як знак «+» або «–» вказує на напрямок зміни площини поляризації світлового променя.

Серед білкових амінокислот є дві амінокислоти (треонін і ізолейцин), які містять по два асиметричних атома вуглецю.

Вивчення оптичних властивостей амінокислот можливе за допомогою поляриметра або поляризаційного мікроскопа.

Лабораторна робота №1 **ВИЯВЛЕННЯ ОПТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ АМІНОКИСЛОТ**

Мета заняття: ознайомитись із будовою та правилами користування портативним поляриметром. Засвоїти загальні відомості про оптичні властивості амінокислот.

Матеріал досліду: розчини амінокислот.

Реактиви: дистильована вода, амінокислоти.

Обладнання: поляриметр.

Завдання роботи:

- засвоїти правила роботи з ноніусом поляриметра,
- дослідити явище мутаротації амінокислот.

Принцип методу: Поляризований промінь світла пропускається крізь кювету із дослідною речовиною. Якщо речовина оптично активна, відбувається зміна обертання площини поляризації світлового потоку, що є пропорційно концентрації поляризуючої речовини. Це явище визначається реєстрацією зміни кута обертання світла, за яким легко обчислити вміст оптично активної речовини. Можна, також, вирішити обернене завдання - знайти питоме обертання речовини, знаючи його концентрацію в розчині, наприклад, для порівняння якості дослідного розчину з еталонним.

Хід роботи: Будова кишенькового поляриметра наведена на рис. 1. Промінь світла, відбившись від дзеркала 1, потрапляє на призму 2, що поляризує, яка пропускає тільки поляризовані в одній площині промені світла. Пучок поляризованого світла потім проходить через поміщену в гніздо 8 кювету (трубку) 3, куди наливають досліджуваний розчин.

Якщо цей розчин оптично активний, то площина поляризації світла при проходженні його через кювету зміниться. Для того щоб визначити кут обертання світла, що пройшло через кювету, на його шляху поставлена поляризаційна призма, що обертається (аналізатор) 4, кут повороту якої відраховується за шкалою через окуляр 5. Аналізуюча призма влаштована так, що в окулярі 6 видно поле, розділене на три частини (рис. 1 в). Залежно від кута повороту в аналізуючій призмі яскравість полів змінюється: яскравішим стає то центральне поле, то бічні поля.

Обертаючи призму за кільце 7, досягають однакової освітленості всіх трьох полів зору і після цього роблять відлік за шкалою через окуляр 5. Шкала приладу (Рис. 1 г) розділена на градуси (від -20° до $+20^{\circ}$. Від'ємними

вважаються значення, що ліворуч від нуля. Відлік виконується за допомогою ноніуса. Окуляри поляриметра забезпечені лінзами, що обертаються в оправках, це дозволяє досягти чіткого зображення полів і шкали.

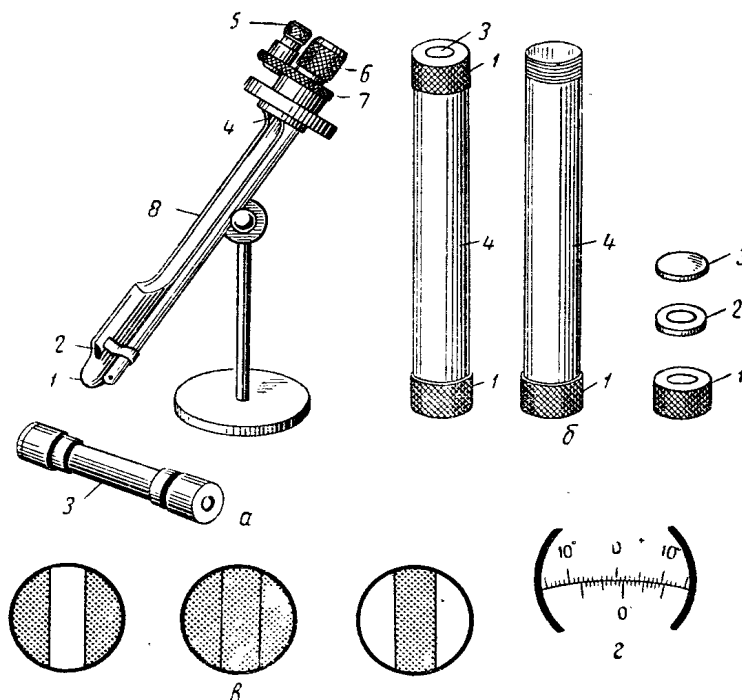


Рис.1. Кишеньковий поляриметр (Шарпенак и др., 1969).

Примітки. а) загальний вигляд:

1 – дзеркало, 2 – призма, що викликає поляризацію, 3 – кювета, 4 – поляризаційна призма - аналізатор, 5 – окуляр для шкали призми - аналізатора, 6 – окуляр, 7 – кільце, що обертає призму – аналізатор, 8 – гніздо для кювети.

б) кювета:

1 - кришка, 2 - ущільнююче кільце, 3 – скло, 4 - корпус кювети.

в) зображення в окулярі поляриметра.

г) шкала поляриметра.

Робота з ноніусом. Кількість градусів відраховується за шкалою (рис. 1 г). Якщо нуль ноніуса розташований між двома поділами верхньої шкали, наприклад 1 і 2, записують те з цих значень, яке ближче до нуля, в даному випадку 1. Кількість десятих часток градуса визначають, пам'ятаючи, що їх вказує той поділ ноніуса, який збігається з поділом основної шкали. Так, якщо з розподілом основної шкали співпав сьомий поділ ноніуса, записують сім десятих часток градуса. У прикладі відлік становив $1,7^\circ$. Працюючи з поляриметром, слід пам'ятати, що права половина ноніуса використовується тільки при кутах обертання більше 0° , тобто коли нуль ноніуса стоїть правіше

за нуль верхньої шкали, потрібно користуватися лівою половиною шкали ноніуса.

При відстеженнях, близьких до 20° , шкала ноніуса виходить за межі верхньої шкали. У цьому випадку відстеження роблять по іншій половині ноніуса і знайдену кількість десятих віднімають із 1° . Отримана при цьому різниця є кількістю десятих часток. Наприклад, нуль ноніуса зупинився між $+19$ і $+20$. Відлік по правій половині ноніуса зробити неможливо, оскільки вона вийшла за межі верхньої шкали. Роблять відлік по лівій половині шкали ноніуса. Нехай, наприклад, з поділками верхньої шкали збігається друга поділка (рахуючи від нуля) лівої половини ноніуса (тобто $0,2^\circ$). Кількість десятих становить $1^\circ - 0,2^\circ = 0,8^\circ$. Відповідь $19,8^\circ$.

Підготовка поляриметра до роботи. Для цього направляють дзеркало 1 (див. рис. 1 а) на джерело світла (вікно або освітлювач), і, змінюючи його нахил, домагаються найкращого освітлення полів зору, що спостерігаються через окуляр 6. На цьому етапі роботи слід звернути увагу, щоб кювета 3 була суха, тому що залишки розчину в ній заважають регулюванню освітлення. Регулювання освітлення можна провести також при вийнятій кюветі. Досягши оптимального освітлення, переходять до фокусування окулярів 5 і 6. Для цього обертають рухливі оправы цих окулярів до отримання чіткого зображення. При роботі з поляриметром не слід забувати, що найкращі умови видимості створюються, коли око розташоване до окуляра 6. При спробі дивитися в цей окуляр здалеку поле зору в ньому здається не освітленим.

Після того, як поляриметр підготовлений до роботи, необхідно визначити нульову точку, тобто той відлік, який виходить при заповненні кювети чистим розчинником (у цій роботі водою). Для цього одну з кришок кювети (рис. 4 б) відгвинчують, виймають із неї скло і заповнюють кювету водою так, щоб надлишок води стояв над краями у вигляді меніска. Меніск накривають склом, вийнятим із кришки, і переконуються в тому, що у кювету не потрапили бульбашки повітря. Якщо в кювету потрапило повітря, скло знімають, додають воду і знову накривають меніск склом. Закручують кювету кришкою та поміщають її у поляриметр. Обертаючи призму-аналізатор за кільце 7 (див. рис. 1 а) ліворуч і праворуч, досягають однакової освітленості всіх трьох частин поля зору. Роблять відлік за шкалою в окулярі 5. Повертають кільце 7 і знову досягають однакового освітлення всіх трьох полів. Знову роблять відлік. Аналогічним чином повторюють відлік ще раз і беруть середню величину з трьох відліків. Виймають кювету, відгвинчують кришку та виливають воду.

Отримані дані занести до таблиці:

№	Назва амінокислот	Кут обертання світла			
		Показники			Середнє значення
1					
2					
3					

Зробити висновок:

Лабораторна робота №2

РЕАКЦІЯ АМІНОКИСЛОТ З АЗОТИСТОЮ КИСЛОТОЮ

Мета заняття: ознайомитись з хімічними властивостями α -аміногруп в амінокислотах.

Матеріал дослідів: розчин глікоколу.

Реактиви:

глікокол, 5 %-вий розчин,

нітрит натрію, 5 %-вий розчин,

нітратна (або оцтова) кислота концентрована.

Обладнання: мікрохімічні пробірки, мікропіпетки.

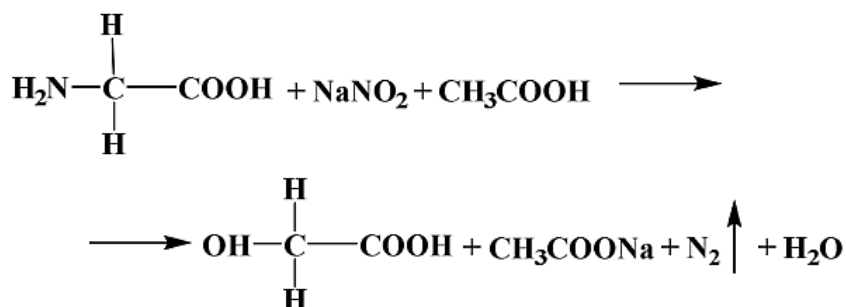
Завдання роботи:

- провести дослідження взаємодії α -аміногрупи глікоколу із азотистою кислотою,
- зробити відповідний висновок.

Принцип методу:

α -аміногрупи в амінокислотах реагують із азотистою кислотою з виділенням азоту.

Хімізм реакції: Так як азотна кислота у вільному стані не стійка, то замість неї беруть суміш нітриту натрію і будь-якої сильної кислоти. Азотиста кислота витісняється із солі цією кислотою та реагує з амінокислотою (на прикладі глікоколу).



Хід роботи: беруть 2 мікрохімічні пробірки. У першу з них вносять 6 крапель 5 %-вого розчину глікоколу та 1 краплю нітратної (або оцтової) кислоти. Друга пробірка є контрольною – до неї вносять 6 крапель води та 1 краплю азотної кислоти. У кожену пробірку додають по 3 краплі розчину нітриту натрію і струшують. У першій пробірці, де була амінокислота, відзначається інтенсивне виділення бульбашок газоподібного азоту. В контрольній пробірці утворення азоту немає, там з'являються лише поодинокі бульбашки оксидів азоту, що виникають при руйнуванні азотистої кислоти.

Отримані дані занести до таблиці:

№ пробірки	Кількість доданої речовини у краплях				Виділення $\text{N}_2 \uparrow$
	Глікокол	H_2O	HNO_3 (або CH_3COOH)	NaNO_2	
1	6	-	1	3	
2	-	6	1	3	

Зробити висновок:

Лабораторна робота №3 РЕАКЦІЯ АМІНОКИСЛОТ З НІНГІДРИНОМ

Мета заняття: провести реакцію вільних α -аміногруп в амінокислотах і білках з нінгідрином.

Матеріал досліду: розчин глікоколу, білок яєчний

Реактиви:

нінгідрин, 0,2 %-вий спиртовий розчин,

глікокол, 0,1 %-вий розчин,

білок яєчний, 10 %-вий розчин.

Обладнання: мікрохімічні пробірки, мікропіпетки.

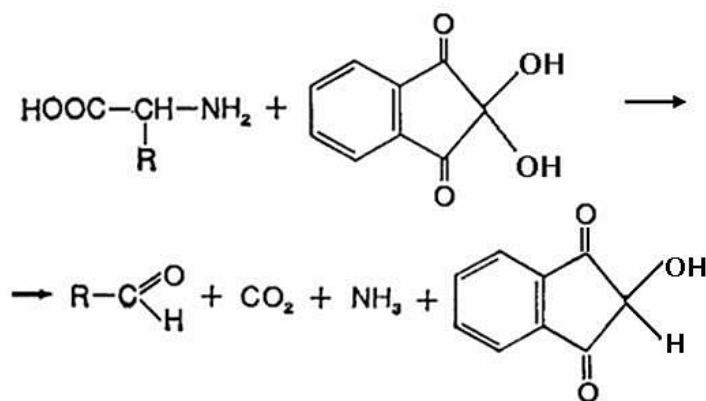
Завдання роботи:

- провести дослідження взаємодії α -аміногрупи глікоколу із нінгідрином
- пояснити різні за інтенсивністю забарвлення в реакціях нінгідрину з глікоколом і білком

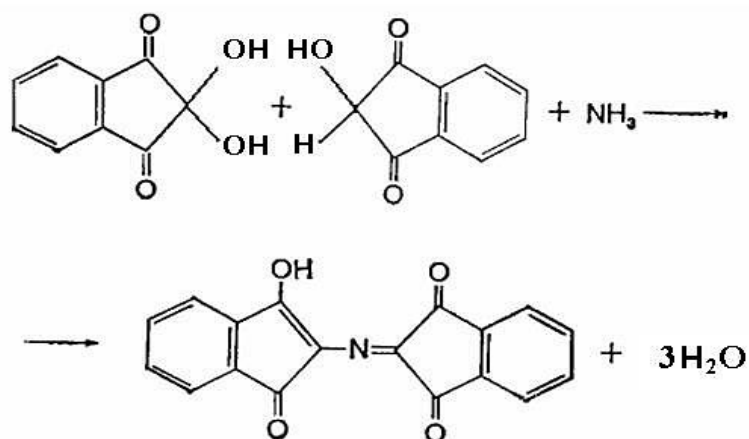
Принцип методу: Всі α -амінокислоти, взаємодіючи з нінгідрином утворюють продукти, які забарвлені в синій або фіолетовий колір. Цю реакцію дають і білки. Взаємодія амінокислот з нінгідрином може бути розглянута на прикладі глікокола.

Хімізм реакції:

1. Під час нагрівання α -амінокислоти окислюються нінгідрином та піддаються окисному дезамінуванню з утворенням аміаку та декарбоксилюванню з утворенням альдегіду і CO_2 , а нінгідрин відновлюється:



2. Відновлений нінгідрин, що конденсується з аміаком і окисленим нінгідрином, утворює сполуку синьо-фіолетового кольору:



Як видно з рівняння реакції, в утворенні кольорового продукту бере участь нітроген аміаку, що утворюється з аміногрупи. Таким чином, нінгідринова реакція виявляє вільні α -аміногрупи. Чим більше вільних α -

аміногруп містить білок, тим інтенсивніше забарвлення, що утворюється при взаємодії його з нінгідрином.

Хід роботи: змішують у мікрохімічній пробірці по 2 краплі розчинів нінгідрину та глікоколу. Нагрівають пробірку та відзначають появу синього фарбування.

Повторюють дослід, взявши замість глікоколу розчин білка. У цьому досліді забарвлення з'являється повільно, воно менш інтенсивне, тому що білок має менше вільних аміногруп на одиницю ваги, ніж амінокислоти.

Забарвлення, що виникає при взаємодії амінокислот з нінгідрином, варіює в залежності від будови взятої в дослід амінокислоти, від рН розчину та інших умов дослід.

Отримані дані занести до таблиці:

№ пробірки	Кількість доданої речовини у краплях				Фарбування
	Глікокол	Білок	H ₂ O	Нінгідрин	
1	2	-	-	2	
2	-	2	-	2	
3	-	-	2	2	

Зробити висновок:

Лабораторна робота №4 ДОСЛІДЖЕННЯ рН ВОДНИХ РОЗЧИНІВ АМІНОКИСЛОТ

Мета заняття: дослідити реакцію водних розчинів амінокислот з різним вмістом вільних аміно- та карбоксильних груп.

Матеріал досліду: розчини: глікоколу, аспарагінової кислоти, лізину.

Реактиви:

глікокол, 0,1 %-вий розчин,

аспарагінова кислота, 0,1 % розчин,

лізин, 0,1 %-вий розчин.

Обладнання: мікрохімічні пробірки, мікропіпетки, універсальний індикатор та шкала для визначення рН.

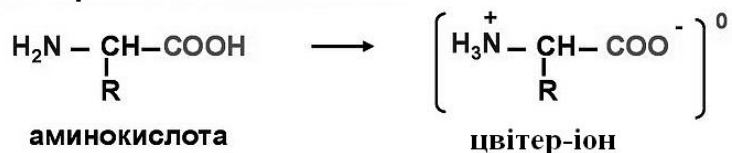
Завдання роботи:

- ознайомитись з реакцією на рН розчинів амінокислот в залежності від кількості в них вільних аміно- та карбоксильних груп.

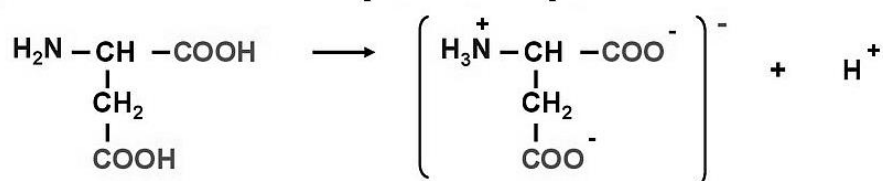
Принцип методу. Реакція водних розчинів амінокислот залежить від кількості вільних аміно- та карбоксильних груп, що містяться в їх молекулах.

У водних розчинах моноаміномонокарбонових амінокислот карбоксильна та аміногрупа взаємно нейтралізуються, утворюючи внутрішню сіль – цвітеріон. Водні розчини таких амінокислот виявляють реакцію, близьку до нейтральної (рис. 2 а).

а) нейтральні амінокислоти



б) кислі амінокислоти на прикладі аспарагінової кислоти



в) основні амінокислоти на прикладі лізину

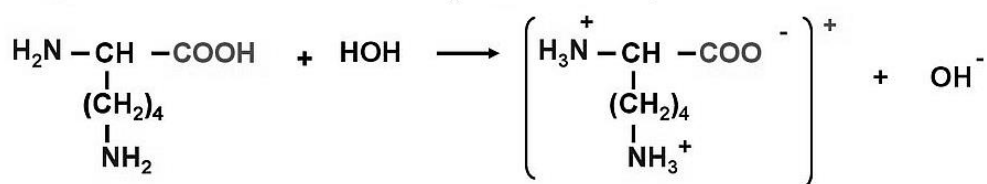


Рис. 2. Утворення біполярного іону (цвітер-іону) або внутрішньої солі амінокислотами.

Моноамінодикарбонові амінокислоти утворюють кислі розчини, тому що на утворення внутрішніх солей витрачається лише одна з двох карбоксильних груп, а інша дисоціює з утворенням H^+ іонів (рис. 2 б).

Діаміномонокарбонові амінокислоти у водних розчинах дають лужну реакцію, тому що в їхній молекулі при утворенні внутрішньої солі одна аміногрупа залишається вільною (рис. 2 в).

pH водних розчинів амінокислот можна визначити колориметричним методом.

Хід роботи: у 3 мікрохімічні пробірки вносять по 3 краплі розчинів амінокислот: у першу пробірку – глікоколу, у другу – лізину, у третю – аспарагінову кислоту. Додають у кожен пробірку по 5 крапель універсального індикатора. Після змішування зіставляють фарбування у кожній пробірці зі шкалою.

Знайдені за шкалою значення рН занести до таблиці:

Групи амінокислот	Представники	Фарбування	рН
Моноаміномонокарбонові Моноамінодикарбонові Діаміномонокарбонові	Глікокол Аспарагінова кислота Лізін		

Зробити висновок:

Лабораторна робота №5 АМФОТЕРНІСТЬ РОЗЧИНІВ АМІНОКИСЛОТ

Мета заняття: прояв амфотерності амінокислот залежно від реакції середовища.

Матеріал дослідів: розчини: глікоколу, аспарагінової кислоти, лізину.

Реактиви:

глікокол, 5 % розчин,

їдкий натр, 0,4 %-вий розчин,

соляна кислота, 0,4 %-вий розчин,

фенолфталеїн, 0,5 %-вий спиртовий розчин,

метилоранж, 0,1 %-вий розчин.

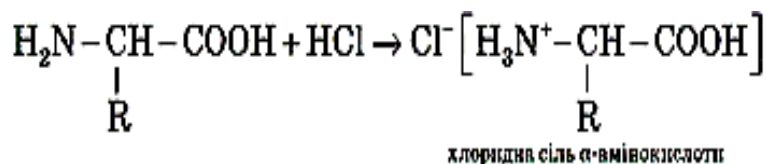
Обладнання: мікрохімічні пробірки, шкала для визначення рН, універсальний індикатор, мікропіпетки.

Завдання роботи:

- засвоїти метод титрування
- побудувати калібрувальну криву
- засвоїти прояв амфотерності амінокислот

Принцип методу: Амінокислоти є амфотерними сполуками. Залежно від реакції середовища вони ведуть себе як кислоти, або як основи. У присутності кислоти амінокислота утворює із нею сіль за рахунок аміногрупи.

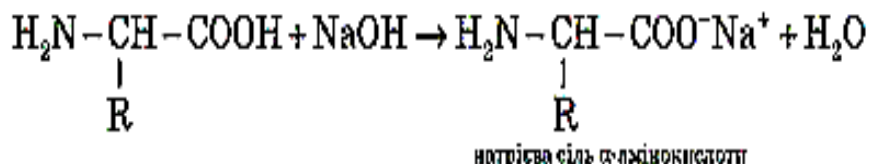
Хімізм реакції:



Дисоціація карбоксильних груп амінокислоти у присутності сильних кислот пригнічена.

При додаванні лугу до розчину амінокислоти утворюється сіль за рахунок карбоксильних груп амінокислоти.

Хімізм реакції:



Ці реакції пояснюють значну буферну ємність розчинів амінокислот. При титруванні розчину амінокислоти лугом або кислотою рН зсувається значно менше, ніж при додаванні лугу або кислоти до води. Переконатись у цьому можна, виконавши наступний дослід.

Хід роботи: для проведення досліду беруть 4 мікрохімічні пробірки. У пробірку 1 вносять 5 крапель 5 %-вого розчину глікоколу, у пробірку 2 – 5 крапель води. Додають в обидві пробірки краплі розчину фенолфталеїну. У пробірку 2 додають 1 краплю розчину їдкого натру: з'являється фіолетове фарбування. Додають по краплях 0,4 % розчин їдкого натру в пробірку 1, домагаючись збігу забарвлення в обох пробірках. Кількість доданих крапель підраховують. Щоб обсяг рідини в обох пробірках весь час був однаковий, у процесі титрування лугом вмісту першої пробірки в другу додають по краплях воду - стільки ж скільки лугу в пробірку 1. Кількість крапель розчину їдкого натру, що пішло на титрування глікоколу, записують у таблицю 2.

У пробірку 3 вносять 5 крапель розчину глікоколу, пробірку 4 — стільки ж води. У кожную пробірку додають по краплині метилоранжу. У пробірку 4 вносять 1 краплю соляної кислоти — вміст пробірки фарбується в рожевий колір. Глікокол, що знаходиться в пробірці 3, відтитровують 0,4 % кислотою, рахуючи краплі, до такого ж забарвлення. Щоб обсяг рідини в обох пробірках був однаковий, у процесі титрування додають у пробірку 4 воду по краплях — стільки ж, скільки кислоти в пробірку 3.

Результат дослідів занести до таблиці:

Варіанти дослідів	Застосовані реактиви (краплі)						Загальний обсяг проби	Забарвлення розчину
	Амінокислота	H ₂ O	Фенолфталеїн	NaOH	Метилоранж	HCl		
1	5	-	1	x	-	-		фіолетова
2	-	5	1	1	-	-		
3	5	-	-	-	1	x		рожева
4	-	5	-	-	1	1		

Зробити висновок:

Лабораторна робота №6 РЕАКЦІЯ АМІНОКИСЛОТ З ФОРМАЛЬДЕГІДОМ

Мета заняття: засвоїти метод визначення кількості аміногруп за Сьоренсеном.

Матеріал дослідів: розчини амінокислот з різними властивостями

Реактиви:

глікокол, фенілаланін, цистеїн, 5% розчини,
фенолфталеїн, 0,5 %-вий спиртовий розчин,
їдкий натр. 0,4 %-вий розчин,
формолова суміш.

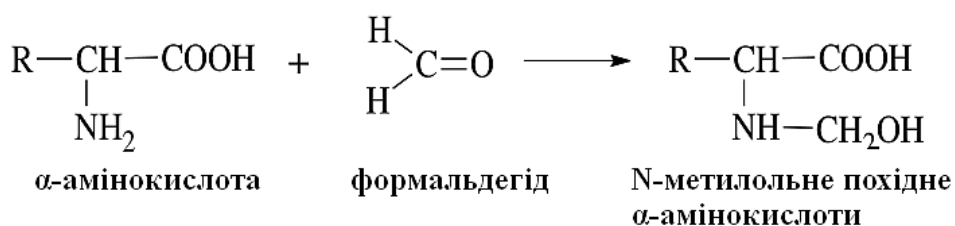
Обладнання: мікрохімічні пробірки, мікропіпетки.

Завдання роботи:

- засвоїти метод титрування,
- пояснити причини появи кислого середовища у досліді за дією формальдегіду.

Принцип методу. За взаємодії α-амінокислот з формальдегідом, утворюються відносно стабільні карбіноламіни - похідні N-метилолу, вільну карбоксильну групу яких можна відтитрувати лугом.

Хімізм реакції:



Внаслідок цієї реакції аміногрупа виявляється пов'язаною і втрачає свої основні властивості. Карбоксильна група залишається вільною, тому

метиленові похідні амінокислот мають кислий характер. Карбоксильні групи, що звільнилися в результаті реакції, можна відтитрувати лугом. Кількість лугу, що пішла на титрування, еквівалентна кількості аміногруп, пов'язаних формальдегідом. Описаний спосіб визначення кількості аміногруп був розроблений Зеренсеном і отримав назву методу формолового титрування.

Хід роботи: у мікрохімічні пробірки вносять по 5 крапель розчину досліджуваних амінокислот, додають 1 краплю розчину фенолфталеїну і по краплях їдкий натр до рожевого забарвлення (зазвичай достатньо однієї краплі). Додають 5 крапель формолової суміші і струшують. Формальдегід зв'язує аміногрупи і реакція розчину зсувається в кислий бік – фенолфталеїн знебарвлюється. Додають у пробірку по краплях розчин їдкого натру до появи рожевого забарвлення. Зазначають, скільки крапель 0,4 %-ного їдкого натру потрібно для зв'язування карбоксильних груп у 5 краплях розчину амінокислот.

Результат досліду занести до таблиці:

Варіанти досліду	Реактиви (краплі), що використовуються						Забарвлення розчину
	Аміно-кислота	Фенол-фталеїн	NaOH	Забарвлення розчину	Формолова суміш	NaOH	
1	5	1	х	Слабо-рожева	5	х	Рожеве
2	5	1	х		5	х	
3	5	1	х		5	х	
4	5	1	х		5	х	

Зробити висновок:

Лабораторна робота №7 УТВОРЕННЯ ХЕЛАТІВ АМІНОКИСЛОТ

Мета заняття: дослідити процес утворення хелатних комплексів амінокислот та зміну їх властивостей.

Матеріал досліду: розчин глікоколу різної концентрації

Реактиви:

глікокол, 1 %-вий розчин,
глікокол, 5 %-вий розчин,
мідь сірчанокисла, 5 %-вий розчин,
нінгідрин, 0,2 %-вий розчин у спирті.

Обладнання: мікрохімічні пробірки, мікропіпетки.

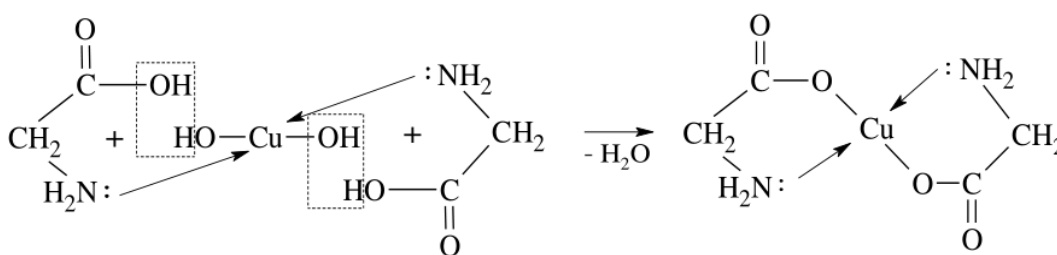
Завдання роботи:

- провести реакції хелатоутворення амінокислот
- пояснити причини зникнення реакції амінокислот з нінгідрином після утворення ними хелатних сполук.

Принцип методу. При взаємодії з іонами міді, кобальту та інших металів амінокислоти утворюють особливі комплексні сполуки, так звані хелати, або або внутрішньокмплесні сполуки.

Термін «хелати» - походить від грецького слова $\chi\eta\lambda\acute{\eta}$, *chelè* — «клішня». Від цього ж слова зроблено англійський термін «хелатор». Хелаторами називають такі органічні сполуки, які здатні вступати у взаємодію з іонами деяких металів і одночасно (за допомогою двох різних хімічних функціональних груп) захоплювати метал з двох сторін як би в клішні. При цьому між хелатором і металом виникають два зв'язки (ковалентний і координаційний) і через це утворюється гетероциклічне кільце.

Описаний вище процес називають хелатоутворенням, а утворений в результаті продукт - хелатом. Прикладом може бути мідний хелат глікоколу:



Реакція уворення хелатної солі глікоколу з міддю (II)

Наведена формула цієї сполуки показує, що іон металу дійсно захоплений в клішні молекулами амінокислоти.

Відповідно до прийнятої класифікації хелати відносять до внутрішньокмплесних сполук. Амінокислоти, що увійшли до складу хелатних комплексів, різко змінюють свої властивості, зокрема не дають реакцію з нінгідрином.

Хелати, до складу яких входять мідь, кобальт та інші кольорові метали, є пофарбованими сполуками.

Хід роботи. 1. До 3 крапель розчину сірчанокислої міді додають у пробірку стільки ж крапель 5 %-вого розчину глікоколу. З'являється синє забарвлення, викликане утворенням хелату. Порівнюють її із забарвленням сірчанокислої

міді, для чого вносять в іншу пробірку 3 краплі розчину сірчаноокислої міді та стільки ж крапель води.

2. У пробірку наливають 2 краплі 1 %-вого розчину глікоколу і додають 2 краплі розчину сірчаноокислої міді. Струшують і, додавши 2 краплі розчину нінгідрину, нагрівають. Темно-синє фарбування, що утворювалося раніше глікоколом з нінгідрином, не з'являється. Роблять контрольний дослід - до 2 крапель 1%-вого розчину глікоколу додають 2 краплі розчину нінгідрину і нагрівають. Виникає інтенсивне синє забарвлення.

Результат дослідів занести до таблиці:

Варіанти дослідів	Застосовані реактиви (краплі)						Забарвлення розчину
	Амінокислота		H ₂ O	CuSO ₄	Нінгідрин	t°C	
	1 %	5 %					
1	-	3	-	3	-	-	
2	-	-	3	3	-	-	
3	2	-	-	2	2	+	
4	2	-	-	-	2	+	

Зробити висновок:

Лабораторна робота №8 ФЛЮОРЕСЦЕНЦІЯ АМІНОКИСЛОТ

Мета заняття: дослідити та зрозуміти процес флюоресценції амінокислот.

Матеріал дослідів: розчин глікоколу різної концентрації.

Реактиви:

глікокол, 1 %-вий розчин,

глікокол, 5 %-вий розчин.

Обладнання: флюоресцентний освітлювач, папір фільтрувальний.

Завдання роботи:

- зробити зразки амінокислоти глікоколу різної концентрації до флуоресцентного аналізу,
- дослідити інтенсивність флюоресценції .

Принцип методу. Амінокислоти, нанесені на поверхню фільтрувального паперу, флюоресціюють при освітленні ультрафіолетовим світлом. Це використовується під час аналізу біологічного матеріалу.

Хід роботи: на аркуш паперу наносять 1 краплю розчину амінокислоти. Після висушування розглядають папір, помістивши його перед освітлювачем

у затемненому приміщенні. У місці нанесення розчину амінокислоти видно коричневу флюоресценцію.

Зробити висновок:

Питання для контролю:

1. Опишіть явище оптичної активності амінокислот.
2. Охарактеризуйте реакцію амінокислот з азотистою кислотою.
3. Опишіть реакцію амінокислот з нінгідрином.
4. Як визначають рН водних розчинів амінокислот.
5. Охарактеризуйте амфотерність розчинів амінокислот.
6. Опишіть реакцію амінокислот з формальдегідом.
7. Охарактеризуйте утворення хелатів амінокислот.
8. Охарактеризуйте флюоресценцію амінокислот.

ТЕМА 2. ВЛАСТИВОСТІ ОКРЕМИХ АМІНОКИСЛОТ

Мета: вивчити фізико-хімічні властивості окремих амінокислот.

Питання для підготовки та обговорення:

1. Хімічні реакції на циклічні амінокислоти.
2. Хімічні реакції на сірковмісні амінокислоти.
3. Хімічні реакції на карбоксильні та аміногрупи.

Багато амінокислот як вільних, так і тих, що входять до складу білків, дають специфічні кольорові реакції, за допомогою яких їх можна виявити. Деякі з цих реакцій використовуються для кількісного визначення окремих амінокислот та білка.

Лабораторна робота №9 КСАНТОПРОТЕЇНОВА РЕАКЦІЯ

Мета заняття: зрозуміти доцільність проведення ксантопротеїнової реакції з амінокислотами.

Матеріал досліду: фенол, тирозин або триптофан, білок.

Реактиви:

нітратна кислота концентрована,
аміак концентрований,
фенол, 2 %-вий розчин,
тирозин, 0,5 %-вий розчин,
білок яєчний, 10 %-вий розчин,
аланін, 1 % розчин.

Обладнання: мікрохімічні пробірки, мікропіпетки.

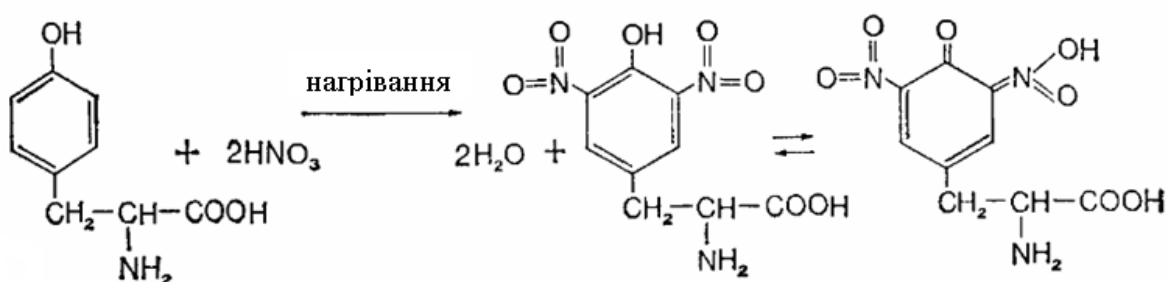
Завдання роботи:

- проаналізувати особливості ксантопротеїнової реакції з ароматичними амінокислотами,
- заповнити таблицю і зробити відповідний висновок.

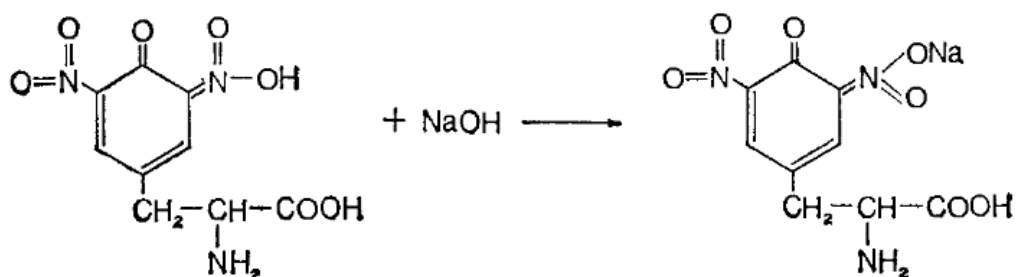
Принцип методу. Ксантопротеїнова реакція заснована на здатності ароматичних сполук легко нітруватися, з утворенням пофарбованих нітропохідних. У цю реакцію вступають амінокислоти, що мають у своїй молекулі ароматичне кільце. Тирозин та триптофан при нагріванні з концентрованою нітратною кислотою утворюють нітропохідні, які забарвлені у жовтий колір. Ця реакція характерна також і для білків, що містять тирозин та триптофан. Амінокислота фенілаланін погано нітрується, на цій підставі її участь у ксантопротеїновій реакції піддається сумніву.

Ксантопротеїнова реакція не є строго специфічною. Оскільки вона обумовлена нітруванням ароматичного кільця, її дає багато циклічних сполук, які ні є амінокислотами, наприклад фенол.

Хімізм реакції: Тирозин реагує з нітратною кислотою, утворюється хіноїдна сіль динітротирозину жовтого кольору:



Додання до динітротирозину гідроксиду натрію викликає утворення натрієвої солі динітротирозину, яка має оранжеве забарвлення:



Хід роботи: беруть 4 мікрохімічні пробірки. У першу вносять 2 краплі розчину фенолу, у другу - 2 краплі розчину тирозину або триптофану, в третю - стільки ж крапель розчину білка, в четверту – 2 краплі розчину

аланіну. У кожену пробірку додають по 1 краплі нітратної кислоти. Нагрівають пробірки та відзначають появу жовтого фарбування. Після охолодження додають по 2-3 краплі їдкого натру або аміаку в кожену пробірку, при цьому жовте забарвлення змінюється на помаранчеве.

Результати досліду занести до таблиці:

№ пробірки	Варіант досліду	Застосовані реактиви				Забарвлення
		HNO ₃	t °C	Забарвлення	NaOH або (NH ₄ OH)	
1	Фенол					
2	Тирозин (триптофан)					
3	Білок					
4	Аланін					

Зробити висновок:

Лабораторна робота №10 РЕАКЦІЯ МІЛЛОНА

Мета заняття: зрозуміти механізм дії реактиву Міллона на вільний гідроксил фенольного кільця.

Матеріал досліду: фенол, тирозин, білок.

Реактиви:

реактив Міллона,
тирозин, 0,5 %-вий,
білок яєчний, 10 %-вий,
фенол, 2 %-вий,

Обладнання: мікрохімічні пробірки, мікропіпетки.

Завдання роботи:

- проаналізувати виразність реакції Міллона з ароматичними амінокислотами і білком,
- заповнити таблицю і зробити відповідний висновок

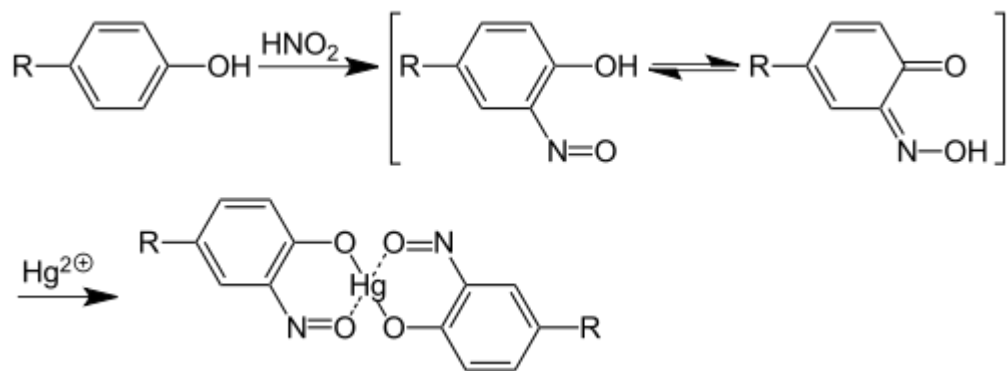
Принцип методу. Реакція обумовлена наявністю у тирозині вільного фенольного гідроксилу. При додаванні до розчину тирозину реактиву Міллона (що містить суміш азотнокислих солей окису та закису ртуті) розчин забарвлюється у червоний колір.

Реакцію дають і білки, що містять тирозин. Реакція не є строго специфічною, оскільки її дають деякі інші феноли. Однак в умовах вивчення

амінокислотного складу гідролізатів білків реакція Міллона може розглядатися як специфічна для тирозину, бо білки не містять інших речовин, які містили б фенольний гідроксил. До розчину білка не потрібно додавати надлишок реактиву Міллона, тому що він містить нітратну кислоту, яка при взаємодії з білком може дати жовте забарвлення розчину і цим викликати маскування реакції Міллона.

Хімізм реакції:

Визначення проводиться шляхом додавання реактиву Міллона — розчину $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ і HgNO_3 у нітратній кислоті, що містить сліди нітритної кислоти. В ході взаємодії іони Hg^{2+} утворюють фенолят і координують довкола себе нітрозогрупи, котрі приєдналися внаслідок нітрозилування бензенового кільця у тирозині:



Кінцева сполука утворюється у вигляді червоно-коричневого осаду.

Хід роботи: беруть 3 мікрохімічні пробірки. У першу вносять 2-3 краплі розчину тирозину, в другу - стільки ж білка, в третю - фенолу. Додають у кожену пробірку краплі розчину Міллона і нагрівають. У пробірках з тирозином і фенолом виникає червоно-коричнєве фарбування, у пробірці з білком - білий осад, що утворився після додавання реактиву і червоніє при нагріванні.

Результати досліду занести до таблиці:

№ пробірки	Варіант досліду	Застосовані реактиви		Забарвлення
		Реактив Міллона	t °C	
1	Тирозин			
2	Білок			
3	Фенол			

Зробити висновок:

Лабораторна робота №11

РЕАКЦІЯ ФОЛІНА НА ТИРОЗИН ТА ЦИСТЕЇН

Мета заняття: зрозуміти характер прояву реакції Фоліна.

Матеріал досліду: фенол, тирозин, білок.

Реактиви:

реактив Фоліна,
їдкий натр, 10 %-вий,
фенол, 2 %-вий,
тирозин 0,5 %-вий,
сульфіт натрію або
ульфїт калію, 2 %-вий.

Обладнання: мікрохімічні пробірки, мікропіпетки.

Завдання роботи:

- проаналізувати виразність реакції Фоліна з тирозином і білком,
- пояснити, чому реакція Фоліна з цистеїном здійснюється тільки після його відновлення,
- заповнити таблицю і зробити відповідний висновок.

Принцип методу. Реактив Фоліна легко відновлюється у лужному середовищі фенолами з утворенням синього забарвлення.

Це обумовлено особливістю його складу. Реактив Фоліна містить солі фосфорновольфрамової і фосформолібденової кислот. Реакцію дає не тільки сам фенол, а й інші сполуки, що містять фенольний гідроксил, зокрема тирозин, фолікулін.

Реактив Фоліна дає синє забарвлення також і з цистеїном, проте лише після того, як цистеїн буде відновлено за допомогою сульфїту натрію та калію.

Хід роботи: підготовляють 3 мікрохімічні пробірки. У першу вносять 2 краплі розчину фенолу, в другу - стільки ж тирозину, в третю - білка. Додають у кожен пробірку по 2 -3 краплі розчину їдкого натру і по 1 краплі реактиву Фоліна. Відзначають появу синього забарвлення.

Здатністю відновлювати реактив Фоліна в синю сполуку має не тільки вільний тирозин, а й білок. Можна було б очікувати, що інтенсивність забарвлення, що виникає при взаємодії реактиву Фоліна з білком, пропорційна вмісту тирозину і цистеїну. Насправді, виявилось, що якщо білок обробити попередньо солями міді, то інтенсивність забарвлення реакційного середовища з реактивом Фоліна набагато перевищує ту, яку могли б дати тільки названі амінокислоти. Вважають, що у складі білкової молекули, що утворює мідний комплекс, з реактивом Фоліна взаємодіють

також і інші амінокислоти, а тому інтенсивність забарвлення, певною мірою, пропорційна вмісту білка. Лоурі та співробітники використали цей принцип для кількісного визначення білка.

Результати дослідів занести до таблиці:

№ пробірки	Варіант дослідів	Застосовані реактиви		Забарвлення
		NaOH	Реактив Фоліна	
1	Фенол			
2	Тирозин			
3	Білок			

Зробити висновок:

Лабораторна робота №12 ДІАЗОРЕАКЦІЯ (РЕАКЦІЯ ПАУЛІ)

Мета заняття: зрозуміти специфічність прояву діазореакції з тирозином, гістидином і білком.

Матеріал дослідів: тирозин, білок, гістидин.

Реактиви:

натрій вуглекислий, 10 %-вий розчин,
гістидин, 0,5 %-вий розчин,
тирозин, 0,5 %-вий розчин,
білок яєчний, 10 %-вий розчин,
діазореактив.

Обладнання: мікрохімічні пробірки, мікропіпетки.

Завдання роботи:

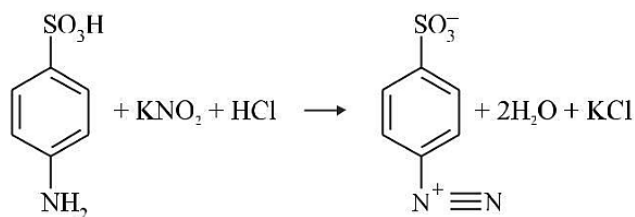
- проаналізувати виразність діазореакції з тирозином, білком і гістидином,
- пояснити, чому діазореакція не є специфічною до гістидину,
- як можна застосувати діазореакцію для кількісного визначення гістидину,
- заповнити таблицю і зробити відповідний висновок.

Принци методу. Реакція Паулі відкриває амінокислоти гістидин та тирозин у білкових розчинах і гідролізатах. При взаємодії кислотного розчину сульфанілової кислоти з нітритом калію відбувається реакція діазотування і утворюється діазобензенсульфонова кислота (діазореактив) (1), яка з

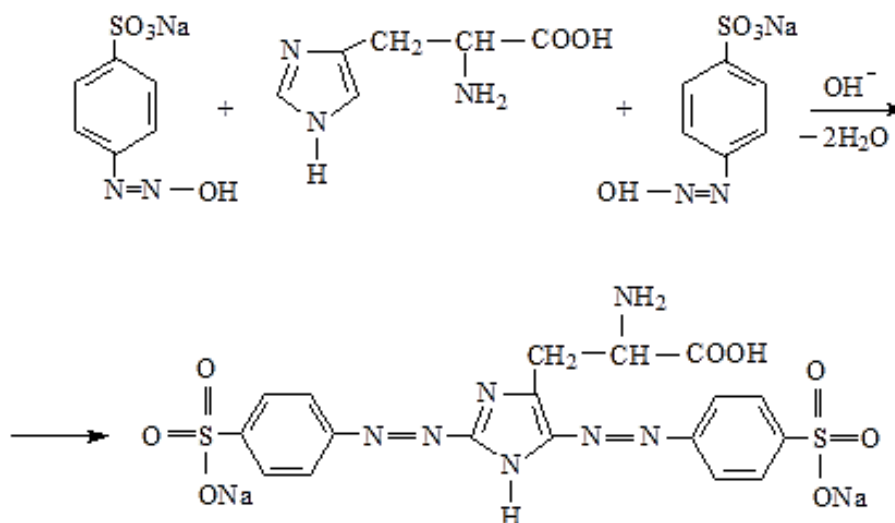
гістидином, або з тирозином у присутності вуглекислого натрію утворює комплексну сполуку жовтого або помаранчевого кольору (2):

Хімізм реакції:

1.



2.



Хід роботи: в одну мікрохімічну пробірку вносять 2 краплі розчину гістидину, в іншу – стільки ж тирозину та третю – білка. У кожену пробірку додають по 1 краплі розчину натрію вуглекислого і по 5 -10 крапель діазореактиву. Відзначають появу жовтого або помаранчевого фарбування.

У звичайних умовах ця реакція не є специфічною для гістидину, тому що в таку реакцію вступає тирозин, а також деякі феноли.

Результати досліду занести до таблиці:

№ пробірки	Варіант досліду	Застосовані реактиви		Забарвлення
		NaCO ₃	Діазореактив	
1	Гістидин			
2	Тирозин			
3	Білок			

Зробити висновок:

Лабораторна робота №13

РЕАКЦІЯ ШУЛЬЦЯ-РАСПАЙЛЯ

Мета заняття: дослідити характер прояву реакції Шульца-Распайля на тирозин і білок.

Матеріал досліду: тирозин, білок.

Реактиви:

сахароза, 0,01 %-вий,

сірчана кислота, концентрована,

білок яєчний, 10 %-вий розчин,

Обладнання: мікрохімічні пробірки, мікропіпетки.

Завдання роботи:

- проаналізувати виразність і механізм реакції Шульца-Распайля з тирозином і білком,
- заповнити таблицю і зробити відповідний висновок.

Принцип методу. Реакція обумовлена взаємодією триптофану з оксиметилфурфуролом, що утворюється при дії концентрованої сірчаної кислоти на сахарозу, що додається до розчину білка і триптофану.

Хід роботи: в одну мікрохімічну пробірку вносять 4 краплі розчину триптофану, в іншу – 3 краплі розчину білка. У кожену пробірку по краплі додають розчин сахарози і струшують. Обережно вводять у пробірку по стінці 10 крапель концентрованої сірчаної кислоти. Верхній шар у пробірці з триптофаном забарвлюється в жовтий колір продуктами окиснення сахарози, а на кордоні з сірчаною кислотою, що опустилася на дно, виникає вишнево-червоне кільце. У пробірці з білком на межі розчину білка та сірчаної кислоти утворюється також червоне кільце.

Проробляючи реакцію Шульца-Распайля, слід уникати введення надлишку сахарози, оскільки у разі виникає коричневе забарвлення, що маскує реакцію на триптофан.

Результати досліду занести до таблиці:

№ пробірки	Варіант досліду	Застосовані реактиви		Забарвлення
		Сахароза	H ₂ SO ₄ , концентрована	
1	Триптофан			
2	Білок			

Зробити висновок:

Лабораторна робота №14 РЕАКЦІЯ АДАМКЕВИЧА

Мета заняття: дослідити особливості проведення реакції Адамкевича на триптофан.

Матеріал досліду: триптофан, білок.

Реактиви:

льодяна оцтова кислота,
сірчана кислота концентрована,
білок яєчний, 10 %-вий розчин,
триптофан, 0,3 %-вий розчин.

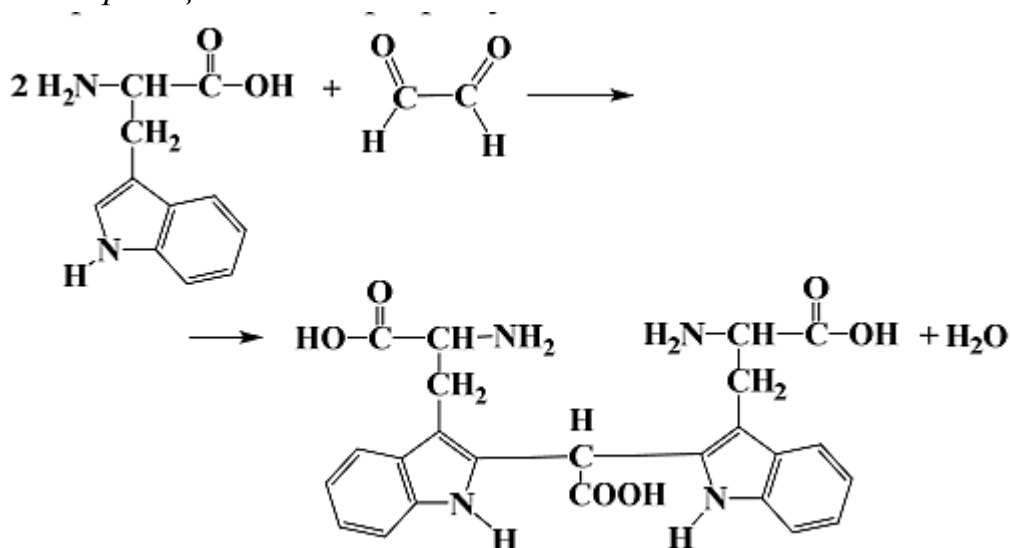
Обладнання: електрична плита, мікрохімічні пробірки, мікропіпетки.

Завдання роботи:

- відмітити виразність реакції Адамкевича на триптофан та особливості її проведення,
- заповнити таблицю і зробити відповідний висновок.

Принцип методу. При взаємодії триптофану з гліоксиловою кислотою утворюється сполука фіолетового кольору:

Хімізм реакції:



Джерелом гліоксилової кислоти є льодяна оцтова кислота, яка завжди містить її як домішок.

Хід роботи: беруть 2 мікрохімічні пробірки. В одну з них додають 3 краплі розчину триптофану, в іншу – 3 краплі розчину білка. У кожну пробірку наливають по 3 краплі оцтової кислоти та нагрівають, не доводячи до кипіння. Пробірки охолоджують і обережно приливають по стінці по 10 крапель концентрованої сірчаної кислоти. У шарі із досліджуваною рідиною, або на кордоні між шарами з'являється фіолетове кільце.

Результати досліду занести до таблиці:

№ пробірки	Варіант досліду	Застосовані реактиви			Забарвлення
		CH ₃ COOH	t °C	H ₂ SO ₄ , концентрована	
1	Триптофан				
2	Білок				

Зробити висновок:

Лабораторна робота №15 РЕАКЦІЯ НА АРГІНІН (САКАГУЧІ)

Мета заняття: зрозуміти специфічність проведення реакції Сакагучі.

Матеріал досліду: аргінін, білок.

Реактиви:

нафтол, 0,1 %-вий розчин,

лужний розчин 0,1 % -вого гіпоброміту натрію,

аргінін, 0,1 %-вий розчин,

білок яєчний, 10 %-вий розчин.

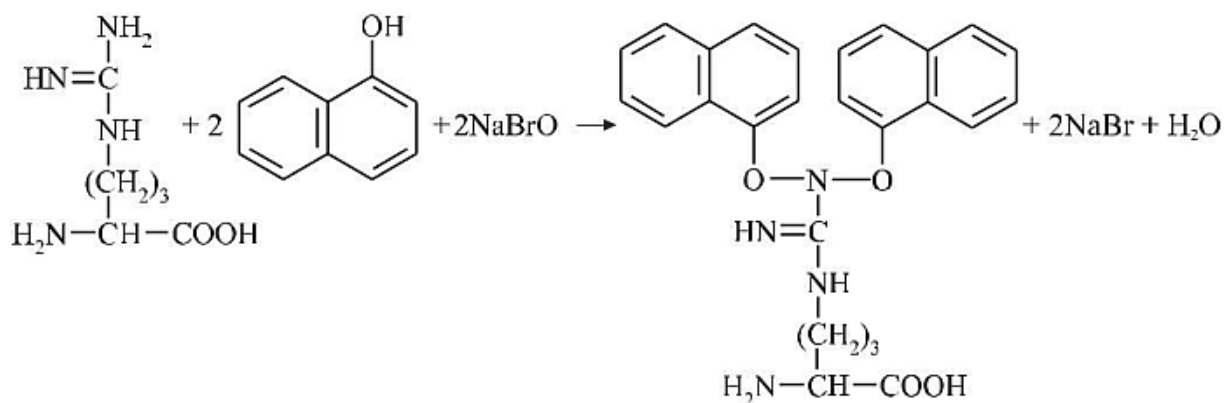
Обладнання: мікрохімічні пробірки, мікропіпетки.

Завдання роботи:

- відмітити виразність реакції Сакагучі на вільний аргінін та у складі білку,
- заповнити таблицю і зробити відповідний висновок.

Принцип методу. Аргінін, який має гуанідинову групування, в присутності α -нафтолу окислюється гіпобромітом в лужному середовищі з утворенням продукту конденсації рожево-червоного кольору:

Хімізм реакції:



Хід роботи: в одну мікрохімічну пробірку додають по 1 краплі 0,1 %-вого розчину аргініну, в іншу – 1 краплю 10 %-вого білка. Додають у кожену

пробірку по 1 краплі розчинів α -нафтолу і гіпоброміту. Аргінін у лужному середовищі взаємодіє з гіпобромітом натрію та α -нафтолом, та утворює продукт цегляно-червоного або малиново-червоного кольору.

Результати досліду занести до таблиці:

№ пробірки	Варіант досліду	Застосовані реактиви		Забарвлення
		α – Нафтол	Гіпоброміт натрію	
1	Аргінін			
2	Білок			

Зробити висновок:

Лабораторна робота №16 РЕАКЦІЇ НА СІРКОВМІСТНІ АМІНОКИСЛОТИ

Мета заняття: дослідити та аналізувати реакції із сульфідними групами сірковміщуючих амінокислот.

Матеріал досліду: цистеїн, білок.

Реактиви:

їдкий натр, 30 %-вий розчин,
оцтовокислий свинець, 5 %-вий розчин,
нітропрусид натрію, 10 %-вий розчин,
цистеїн, 0,1 %-вий розчин,
білок яєчний, 10 %-вий розчин.

Обладнання: електрична плита, мікрохімічні пробірки, мікропіпетки.

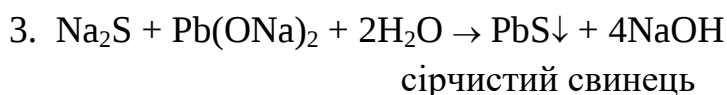
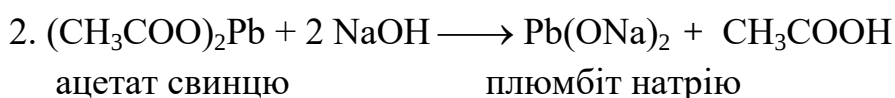
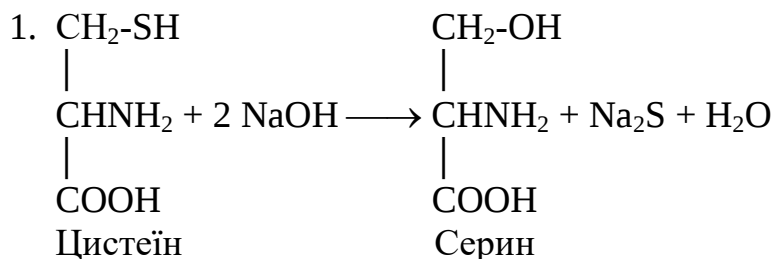
Завдання роботи:

- провести реакцію цистину і білку в лужному середовищі з ацетатом свинцю і нітропрусидом,
- відзначити та пояснити особливості забарвлення в обох варіантах досліду.

Принципи методів. Амінокислоти, що містять сірку, особливо цистин і цистеїн, при тривалому кип'ятінні з лугом втрачають сірку у вигляді сірководню. Сірководень взаємодіє з лугом, утворює сульфід, які можна виявити за допомогою наступних реакцій: при додаванні ацетату сульфід утворюють коричневий або навіть чорний осад сульфиду свинцю; при додаванні розчину нітропрусиду натрію сульфід дає червоно-коричнє забарвлення.

1. Реакція з оцтовокислим свинцем.

Хід роботи: в одну мікрохімічну пробірку вносять 3 краплі 0,4 % цистеїну, в іншу - стільки ж білка. Додають у кожну пробірку по 3 краплі 30 % їдкого натру і обережно нагрівають протягом 2 хв. Після охолодження додають краплю ацетату свинцю. Рідина забарвлюється темно-коричневий колір.



Результати досліду занести до таблиці:

№ пробірки	Варіант досліду	Застосовані реактиви			Забарвлення
		NaOH	t °C	(CH ₃ COO) ₂ Pb	
1	Цистеїн				
2	Білок				

Зробити висновок:

2. Реакція із нітропрусидом натрію.

Хід роботи: беруть 2 мікрохімічні пробірки. В одну з них вносять 3 краплі розчину білка, в іншу 3 краплі 0,1 % розчину цистеїну. В обидві пробірки додають по 3 краплі 30% розчину їдкого натру і обережно нагрівають протягом 2 хв. Після охолодження додають у кожну з пробірок по 1 краплі 10 %-вого розчину нітропрусиду натрію. У пробірках з'являється червоно-коричнєве фарбування.

Результати досліду занести до таблиці:

№ пробірки	Варіант досліду	Застосовані реактиви			Забарвлення
		NaOH	t °C	Нітропрусид-Na	
1	Цистеїн				
2	Білок				

Зробити висновок:

Питання для контролю:

1. Опишіть ксантопротеїнову реакцію.
2. Охарактеризуйте реакцію Мілона.
3. Опишіть реакцію Фоліна на тирозин та цистеїн.
4. Охарактеризуйте діазореакцію (реакцію Паулі).
5. Опишіть реакцію Шульца-Распайля.
6. Охарактеризуйте реакцію Адамкевича.
7. Опишіть реакцію на аргінін (Сакагучі).
8. Опишіть реакції на сірковмісні амінокислоти.

ТЕМА 3. РОЗПОДІЛЬНА ХРОМАТОГРАФІЯ НА ПАПЕРІ

Мета: засвоїти хроматографічні методи дослідження амінокислот.

Питання для підготовки та обговорення:

1. Які властивості амінокислот є основою хроматографічного методу?
2. Перелічіть основні види хроматографії.
3. Надайте визначення принципу адсорбційної хроматографії.
4. Які властивості амінокислот є основою розподільної хроматографії?
5. Які властивості амінокислот є основою іонообмінної хроматографії?
6. Які властивості амінокислот є основою дифузної хроматографії?
7. Які властивості амінокислот лежать в основі хроматографії за спорідненістю?

Лабораторна робота №17**РОЗДІЛЕННЯ СУМІШІ АМІНОКИСЛОТ МЕТОДОМ РОЗПОДІЛЬЧОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ НА ПАПЕРІ**

В даний час для поділу та кількісного визначення амінокислот широко використовується метод хроматографії – динамічного поділу суміші речовин. Зазвичай хроматографія заснована на розподілі досліджуваної речовини між двома фазами - нерухомою та рухливою (елюент). Нерухома фаза головним чином є сорбент з розвиненою поверхнею, а рухлива - потік газу (пара, флюїда - речовина в надкритичному стані) або рідини. Потік рухомої фази фільтрується через шар сорбенту або переміщається вздовж шару сорбенту.

Залежно від агрегатного стану рухомої фази розрізняють газову, флюїдну (або надкритичну хроматографію з флюїдом як елюент) і рідинну хроматографію. Як нерухому фазу використовують тверді (або твердоподібні) тіла і рідини. Відповідно до агрегатного стану рухомої та нерухомої фаз розрізняють такі види хроматографії: 1) газо-твердофазну хроматографію, або газоадсорбційну хроматографію; 2) газо-рідинну

хроматографію (газо-рідко-твердофазну); 3) рідко-твердофазну хроматографію; 4) рідко-рідкофазну хроматографію; 5) флюїдно-твердофазну хроматографію; 6) флюїдно-рідко-твердофазну хроматографію.

По геометрії сорбційного шару нерухомої фази розрізняють колонкову та плоскошарову хроматографію. До плоскошарової відносяться тонкошарова хроматографія та паперова хроматографія. У колонковій хроматографії зазвичай виділяють капілярну хроматографію, в якій сорбент розташований на внутрішніх стінках колонки, а центральна частина колонки залишається незаповненою сорбентом, тобто відкритої для потоку елюентів (хроматографія на відкритих капілярних колонках).

Залежно від способу введення проби та способу переміщення хроматографічних зон по шару сорбенту розрізняють такі варіанти хроматографії: проявний (або елюентний), фронтальний та витісняльний.

У найбільш часто використовуваному проявному варіанті аналізовану суміш періодично вводять імпульсно в потік рухомої фази. У колонці аналізована суміш поділяється на окремі компоненти, між якими знаходяться зони рухомої фази.

У фронтальному варіанті хроматографії, дослідну пробу із речовинами, які необхідно розділити, безперервно подають в колонку. Можна також подавати в колонку одночасно пробу та рухому фазу. У фронтальній хроматографії тільки перший, найменш сорбуємий, компонент можна отримати в чистому вигляді на виході з колонки, інші зони будуть містити по два і більше компонентів.

У витісняльному варіанті хроматографії в колонку після подачі суміші, що розділяється, вводять спеціальну речовину (витісник), яка сорбується краще будь-якого з її компонентів. У витісняльній хроматографії утворюється щільна послідовність зон речовин, що розділяються.

Існує кілька різновидів хроматографічного методу аналізу, що розрізняються за механізмом поділу речовин. Найважливішими є такі:

- адсорбційна хроматографія - заснована на різній здатності окремих сполук адсорбуватися на тих чи інших сорбентах;
- іонообмінна хроматографія - заснована на різній здатності речовин, що розділяються, до іонного обміну з тим чи іншим іонітом;
- розподільна хроматографія - заснована на різній розчинності речовин, яких потрібно розділити, у двох частково змішуються рідинах;
- дифузійна хроматографія - заснована на розподілі речовин за швидкістю дифузії всередину сорбенту; до цього типу хроматографії відноситься гель-фільтраційна хроматографія;

- хроматографія за спорідненістю - метод заснований на застосуванні нерозчинних форм біологічно активних речовин, що мають спорідненість до речовин, яких потрібно розділити.

Одним із методів, що дозволяють визначати амінокислотний склад білків, є розподільна хроматографія на папері, основні **принципи** якої зводяться до наступного.

Якщо ми візьмемо смужку хроматографічного паперу, нанесемо на один з її кінців 1 краплю розчину, що містить суміш амінокислот, а потім завантажимо кінець паперу у суміш деяких органічних розчинників, то поступово, просочуючи папір, розчинник почне просуватися вгору по смужці.

Залежно від хімічної будови різних амінокислот швидкість їхнього переміщення виявиться неоднаковою, нанесена на початку досліду в одному місці суміш амінокислот розділиться на свої компоненти, які розповсюджуються в різних місцях хроматографічного паперу. Виявити це можна, розглядаючи лист (хроматограму) в ультрафіолетовому світлі або обробивши хроматограму розчином нінгідрину. В обох випадках ми виявимо ряд плям, які відповідають окремим амінокислотам, що входили до складу суміші.

1. Висхідна хроматографія

Мета заняття: засвоїти метод проведення висхідної хроматографії.

Матеріал досліду: суміш амінокислот, стандарти амінокислот.

Реактиви:

н-Бутанол,

оцтова кислота льодяна,

нінгідрин, 0,5 %-вий розчин в ацетоні.

Обладнання: сушильна шафа, циліндр ємністю на 50 мл з добре пригнаною пробкою, циліндр на 25 мл, піпетка на 5 мл, мікропіпетки, олівець простий, лінійка з поділками, хроматографічний папір.

Завдання роботи:

- засвоїти методіку підготовки приладу та реакційної суміші до висхідної хроматографії,
- Засвоїти техніку нанесення амінокислот на хроматографічний папір.

Хід роботи:

Приготування суміші для хроматографії

Перед початком досліду готують у циліндрі на 25 мл бутаноловий розчинник. Для цього до 4 мл бутанолу додають 1 мл оцтової кислоти та 5 мл

дистильованої води. Змішують рідини обережним струшуванням і дають відстоятися емульсії, що утворилася. При відстоюванні емульсія ділиться на два шари. Верхній шар, який використовується в подальшій роботі, поступово стає абсолютно прозорим.

У якості камери для хроматографії використовують циліндр ємністю на 50 мл (рис. 2 б, або в). У цей циліндр переносять піпеткою верхній шар бутанолового розчинника першого циліндра. Достатньо перенести стільки розчинника, щоб на дні циліндра, що служить хроматографічною камерою, утворився шар висотою 7-10 мм.

Слід звернути особливу увагу, щоб при заповненні циліндра розчинником не намочити його стінки.

Нанесення суміші амінокислот на папір

На смужці хроматографічного паперу, необхідного розміру, на відстані 2 см від нижнього краю простим олівцем проводять стартову лінію, на якій наносять амінокислоти. Потім на цю хроматограму мікропіпеткою наносять стандартні розчини амінокислот (див. крапки 1,2,3 та ін., рис. 2 а). Відстань між варіантами повинний бути не менш, ніж 2 см. Діаметр плям, що утворилися на папері, не повинен перевищувати 5 мм.

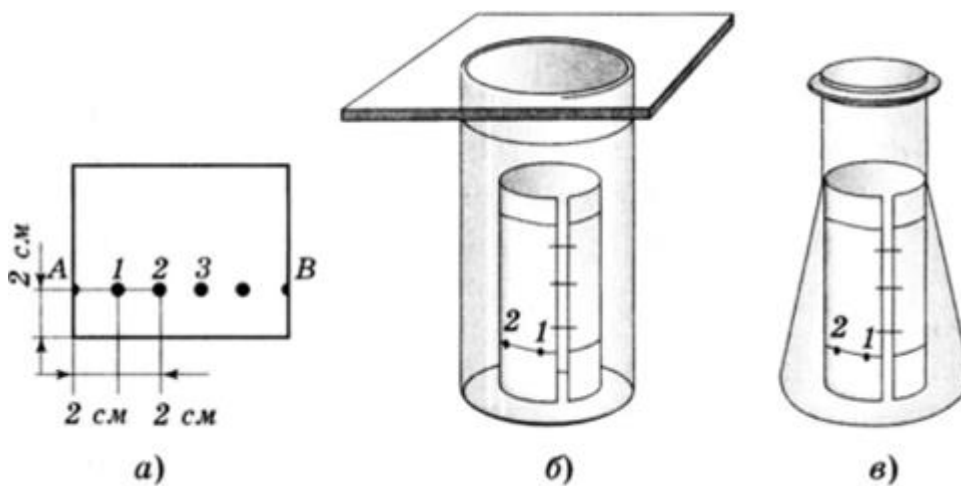


Рис. 2. Нанесення зразків на хроматографічний носій (папер) (Грандберг и др., 2019).

Необхідно пам'ятати, що за всіх маніпуляціях хроматографічну смужку можна тримати лише за кінець, протилежний плямам. Смужку після нанесення розчину сушать на повітрі або в сушильній шафі (при 70-90 С).

Хроматографія

Ретельно розглядають хроматографічний папір на просвіт і, переконавшись, що пляма висохла, опускають його у камеру для хроматографії. Місце, де була нанесена суміш, повинно бути в нижньому кінці паперової смужки, воно в жодному разі не повинно поміщатися в розчинник, налитий на дно камери.

Слід обережно опускати смужку на дно камери (без поштовхів та бризок). Циліндр закривають пробкою. Бутаноловий розчинник усмоктується в паперову смужку та піднімається по ній вгору. Якщо описані вище етапи роботи виконані правильно, розчинник йде рівним горизонтальним фронтом. Після того, як він піднімається на 13-15 см, рахуючи від нижнього кінця смужки, розподіл амінокислот закінчують. Для цього смужку виймають за верхній кінець, відзначають олівцем межу розчинника і сушать смужку на повітрі (краще під тягою) або в сушильній шафі.

Прояв плям амінокислот

Для виявлення плям амінокислот висохлу хроматографічну смужку рівномірно обприскують з пульверизатора розчином нінгідрину і, висушують на повітрі, під тягою, або прогрівають 2-3 хв. у сушильній шафі при 70-90 °С і стежать за тим, щоб смужка не торкалася стінок.

У процесі прогрівання на хроматограмі виступають плями, що відповідають місцям локалізації амінокислот (рис. 3).

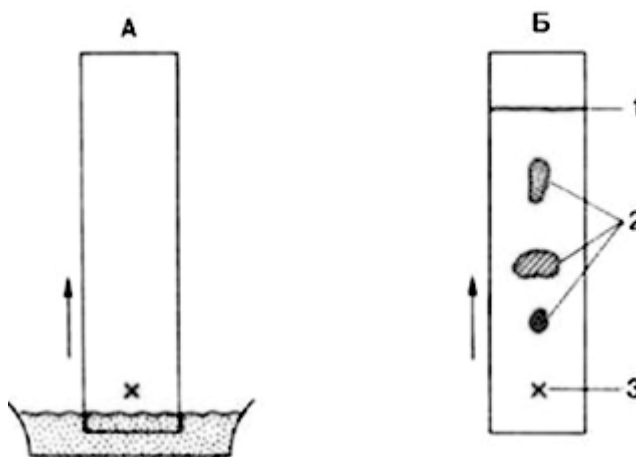


Рис. 3. Початок і результат хроматографування (Березов и др., 1998).

А – початок хроматографування, позначено місце нанесення суміші (3),
Б – результат розділення суміші на три плями – три сполуки (2), позначено фронт розчинника (1). Стрілкою відображено напрямок руху розчинника, який викликав розділення суміші на її компоненти.

Далі обчислюють коефіцієнти рухливості амінокислот (R_f).

Обчислення коефіцієнтів рухливості амінокислот.

По-перше, вимірюють відстань від місця нанесення відповідної амінокислоти до центра її плями (a); по-друге, вимірюють відстань від місця нанесення амінокислоти до зазначеної олівцем межі, до якої піднявся з паперу розчинник (b) (рис. 4).

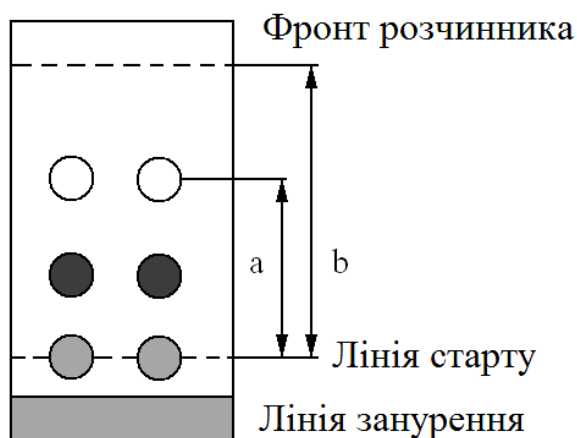


Рис. 4. Вимірювання даних для визначення R_f , де a – шлях зразка, b – шлях розчинника (Бубель та ін., 2010).

Для обчислення R_f шлях, який пройшла амінокислота від місця нанесення, ділять на шлях, який пройшов розчинник (також враховуючи від місця нанесення):

$$R_f = \frac{a}{b}$$

Приклад. Фронт розчинника пройшов 107 мм. Пляма глікоколу відійшла від місця нанесення на 12 мм, а пляма лейцину – на 53 мм. Коефіцієнти рухливостей розраховується наступним чином:

$$R_{f_{\text{глікоколу}}} = \frac{12}{107} = 0,12$$

$$R_{f_{\text{лейцину}}} = \frac{53}{107} = 0,50$$

Описана модель хроматографічної камери дозволяє ознайомитись із хроматографією на папері. Зрозуміло, для аналізу амінокислот така камера виявилася надто примітивною. Камери, що використовуються за цим

принципом, мають значно більший розмір і дозволяють хроматографувати на великих аркушах паперу одночасно кілька досліджуваних препаратів, складні суміші сполук і на цьому ж аркуші проводити хроматографію чистих амінокислот – свідків. Знання R_f сполук – свідків допомагає визначити місця знаходження на хроматографічному носії відповідних сполук після їх розділення із дослідної суміші для подальшого елюювання і визначення концентрації (рис. 5).

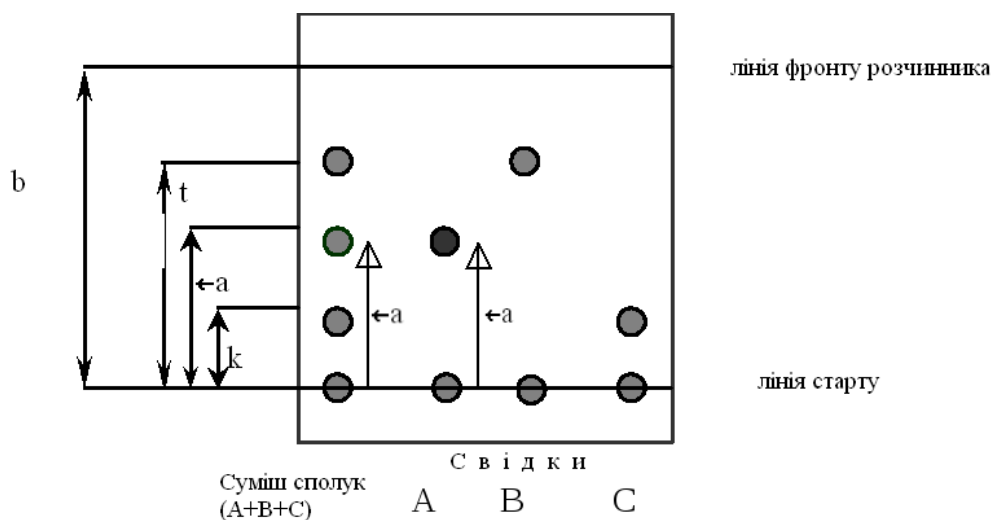


Рис. 5. Визначення місця розташування необхідної сполуки за допомогою свідків (Гиндуллина и др., 2010).

Примітки: 1. А, В, С – свідки, суміш сполук під час хроматографії розподіляється;

2. k , a , t – значення шляхів для розрахування R_f , відповідно, для сполук А, В, С; b – шлях розчинника. За відомим R_f , (наприклад, для сполуки А – використовують значення a), знаходять її місце серед плям, які утворилися із суміші.

2. Низхідна хроматографія

Результати хроматографії покращуються, якщо розчинник просувається листом паперу зверху вниз. Для цього його наливають у довгу кювету, закріплену у верхній частині камери, і закріплюють аркуші паперу так, щоб верхні краї були занурені в кювету (рис.6). Нижній край листа звисає вільно, не торкаючись дна камери. Розчинник, налитий на дно камери, служить лише для насичення його парами всього обсягу камери. Цей метод хроматографії називається низхідною хроматографією.

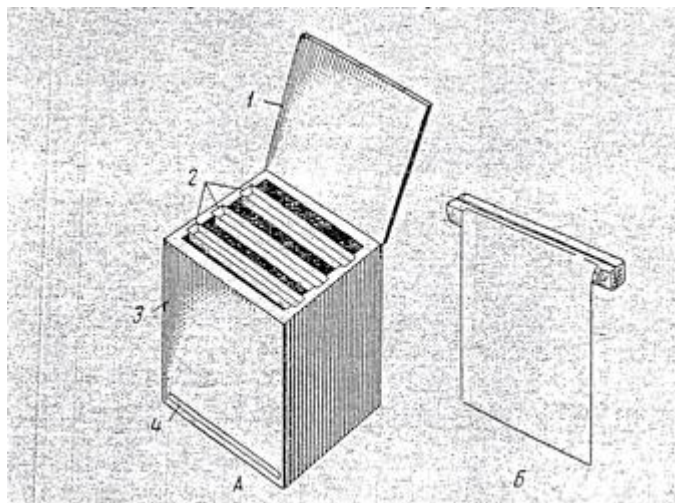


Рис. 6. А – камера для низхідної хроматографії (Грандберг и др., 2019).

1 – кришка;
2 – кювети з розчинником, у яких закріплюють звисаючі листи паперу;

3 – корпус камери;
4 – піддон з розчинником.

Б – окрема камера із листом хроматографічного паперу.

У якості хроматографічної камери використовують високі скляні банки з виступом у верхній частині. На виступ у строго горизонтальному положенні ставлять човник - спеціальну скляну посудину для розчинника.

Хід роботи:

1. З хроматографічного паперу вирізають смужку шириною 5 см і довжиною приблизно відповідної висоті камери. На відстані 1,0 см від кінця смужки проводять простим олівцем стартову лінію, у середині якої відзначають точку старту. На стартову точку мікропіпеткою наносять 0,005-0,01мл суміші амінокислот (у кілька прийомів, діаметр мокрої плями не більше 5 мм), періодично просушуючи папір над електричною плиткою (або над настільною лампою).

2. На дно хроматографічної камери наливають невелику кількість нижнього шару розчинника, а у встановлений човен - верхній шар розчинника. Хроматограму з нанесеною сумішшю амінокислот поміщають у камеру так, щоб ближній до старту кінець був опущений у човник і зафіксований у ньому предметним склом, а інший висів вертикально, не торкаючись стінок камери. Камеру закривають кришкою та залишають при кімнатній температурі на 18-20 годин.

3. Розчинник просувається по хроматограмі зверху вниз, і коли фронт наблизиться до нижнього краю паперу, хроматограму виймають з камери і висушують під тягою. Потім її обробляють 0,5% розчином нінгідрину і поміщають у сушильну шафу при 60-70°C на 10-15 хвилин для розвитку фарбування, після чого на ній з'являються плями синьо-фіолетового або лілового кольору, що відповідають амінокислотам. Обчислюють коефіцієнти рухливості амінокислот (R_f).

3. Радіальна (кругова) хроматографія

Хроматографічною камерою є ексікатор (рис. 7).

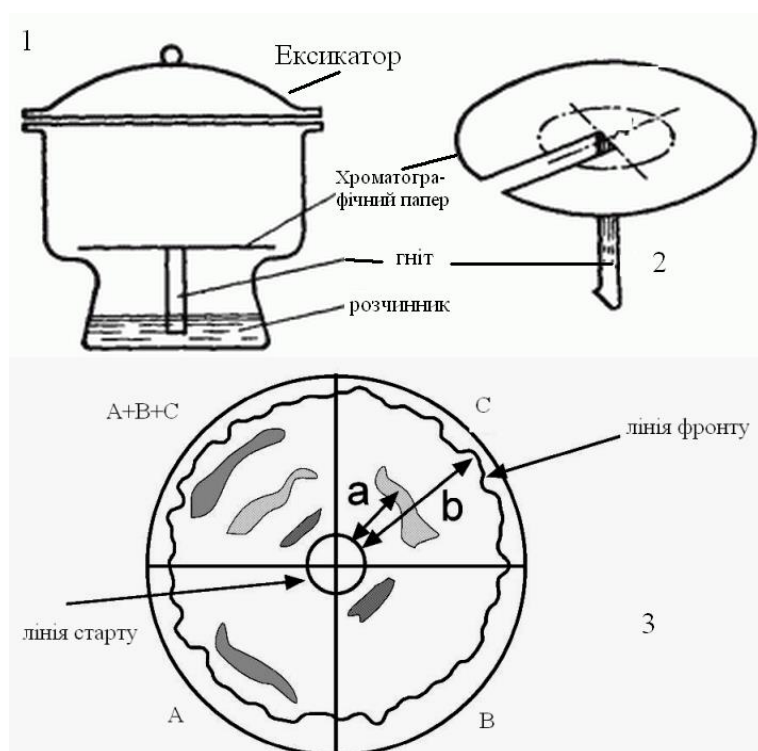


Рис. 7. Радіальна хроматографія (Тимин и др., 2012).

Примітки. 1- Ексікатор із хроматограммою та розчинником. 2 – вигляд хроматографи, 3 – результат радіальної хроматографії. Позначки такі ж, як на рисунку 5.

Хід роботи:

1. Хроматографічний папір вирізають у формі диска, діаметр якого відповідає внутрішнім розмірам діаметра ексікатора. У центр диска (на точку старту) наносять мікропіпеткою у кілька прийомів 0,005-0,01 мл досліджуваної суміші амінокислот. Нанесення суміші слід проводити дуже акуратно, злегка торкаючись мікропіпетки стартової точки, щоб діаметр

мокрої плями був не більше 5 мм. Після кожного нанесення пляму підсушують над електроплиткою або термостатом.

2. У центрі хроматограм роблять голкою отвір, в який пропускають гніт зі складеної вчетверо нитки. Хроматограму поміщають ексікатор, на дно якого попередньо наливають верхній шар розчинника. Перевіряють положення гніта і хроматограми: кінець гніта повинен бути занурений у розчинник, а краї хроматограми повинен знаходитися на виступах ексікатора. Закривають ексікатор кришкою.

3. Розчинник піднімається вгору по гніту, а потім радіально поширюється по паперу від центру. Коли розчинник досягне краю паперу, його виймають з ексікатора, висушують під тягою, обробляють 0,5% розчином нінгідрину і поміщають у сушильну шафу при 60-70°C на 10-15 хвилин. На хроматограмі з'являються синьо-фіолетові плями, кожна з яких відповідає окремій амінокислоті. Обчислюють коефіцієнти рухливості амінокислот (R_f).

4. Тонкошарова хроматографія на пластинах «Силуфол»

Це метод, подібний до висхідної хроматографії, проте він характеризується вищою чутливістю у порівнянні із використанням паперу.

Хід роботи

1. На пластинку «Силуфол» на відстані 2,5 см від нижнього краю проводять стартову лінію, на якій наносять досліджувану суміш з амінокислот. Потім на цю пластинку мікропіпеткою наносять стандартні розчини амінокислот. Діаметр плям, що утворилися на пластинці, не повинен перевищувати 5 мм.

2. Проводять висхідну хроматографію.

3. Прояв. Для виявлення плям амінокислот висохлу хроматографічну смужку рівномірно обприскують з пульверизатора розчином нінгідрину і, висушивши на повітрі (під тягою), прогрівають 2-3 хв у сушильній шафі при 70-90° С, стежачи за тим, щоб смужка не торкалася стін шафи. У процесі прогрівання на смужці виступають плями, що відповідають місцям локалізації амінокислот. Вимірюють відстань від місця нанесення амінокислот до зазначеної олівцем межі, до якої піднявся з паперу розчинник. Обчислюють коефіцієнти рухливості амінокислот (R_f).

5. Кількісне визначення амінокислот у плямах хроматограм

Амінокислоти на хроматографі можливо визначати не тільки якісно, а і кількісно. Для цього пляму з відповідною амінокислотою, «проявленою» розчином нінгідрину, обводять простим олівцем, вирізають (з

хроматографічного паперу) або зіскоблюють (у разі тонкошарової хроматографії) в індивідуальну пробірку, екстрагують розчином ацетону (3,0 мл) протягом 30 хв. за 37 °С.

Вміст амінокислоти у елюаті визначають колориметрично на спектрофотометрі або фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 540 нм (проти контролю, що містить 3,0 мл розчину ацетону).

Питання для контролю:

1. Перерахуйте види розподільної хроматографії.
2. Які розчинники застосовують для приготування суміші для розділення амінокислот?
3. Які носії використовуються у розподільчій хроматографії?
4. Що є рухомою фазою у розподільчій хроматографії?
5. Що є нерухомою фазою у розподільчій хроматографії?
6. Яка якісна реакція використовується для виявлення амінокислот на хроматограмі?
7. Що являє собою коефіцієнт розподілу?
8. Як визначити коефіцієнт розподілу?
9. Які фактори визначають константність величини R_f кожної амінокислоти?
10. Поясніть, чому різні амінокислоти мають різні R_f ?
11. Надайте опис кількісного визначення амінокислот при розподільчій хроматографії.

КОНТРОЛЬ ЗНАНЬ ДО РОЗДІЛУ «ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ АМІНОКИСЛОТ»:

1. Назвіть α -амінокислоти, що входять до складу природних білків.
2. Які характеристики амінокислот можна використовувати за їх класифікації?
3. Які альфа-амінокислоти відносяться до аліфатичних?
4. Які амінокислоти відносяться до гетероциклічних?
5. Що являють собою моноамінодикарбонові амінокислоти та діаміномоноткарбовані амінокислоти?
6. Перерахуйте амінокислоти, які містять $-SH$ та $-OH$ – групи.
7. На які класи ділять амінокислоти залежно від полярності радикалу?
8. До якого класу відносяться амінокислоти з:
 - а. позитивно зарядженими радикалами,
 - б. негативно зарядженими радикалами. Перерахуйте.
9. Які амінокислоти мають незаряджений R? (перерахуйте).
10. Зазначте специфічну реакцію на циклічні амінокислоти.
11. Для фенілаланіну ксантопротеїнова реакція є специфічною?
12. За допомогою оцтовокислого свинцю в лужному середовищі, які амінокислоти можна виявити?
13. Які якісні реакції існують на виявлення триптофану?
14. Яка амінокислота дає червоне фарбування у кислому середовищі з альдегідом?
15. З якою амінокислотою оксиметилфурфурол дає червоне-вишневе фарбування?
16. Які амінокислоти відносяться до незамінних?
17. Які амінокислоти відносяться до:
 - правообертальних,
 - лівообертальних?
18. Які амінокислоти мають:
 - 1 хіральный атом,
 - 2 хіральні атоми C
 - не мають хіральных атомів?
19. Як називаються сполуки амінокислот з іонами металів?
20. Які α -амінокислоти відносяться до:
 - неполярних,
 - полярних незаряджених,
 - полярних негативно заряджених,
 - полярних позитивно заряджених?

21. Які α -амінокислоти відносяться до модифікованих?
22. Які амінокислоти дозволяє виявити нінгідрінова реакція?
23. Яку амінокислоту можна виявити за допомогою реакції з нітропрусидом натрію?
24. Вкажіть специфічну реакцію на тирозин.
25. Що таке хелати? Наведіть приклад реакції з участю амінокислот.

ЗАВДАННЯ ДО КОНТРОЛЬНОЇ ПЕРЕВІРКИ ЗНАНЬ:

Визначити амінокислотний склад двох сумішей за допомогою якісних реакцій на окремі амінокислоти

Амінокислоти, що треба визначити		Назва якісних реакцій			
Тирозин	суміш I				
	суміш II				
Триптофан	суміш I				
	суміш II				
Фенілаланін	суміш I				
	суміш II				
Цистеїн	суміш I				
	суміш II				
Висновок					

Рекомендована література:

1. Біологічна хімія: Лабораторний практикум / За заг. ред. проф. Я.І. Гонського. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2001. – 288 с.
2. Карнаухов О.І., Мельничук Д.О., Чеботько К.О. Загальна та біоорганічна хімія. – Вінниця: Нова книга, 2003. – 544 с.
3. Біологічна і біоорганічна хімія : у 2 кн. : підручник. Кн. 2. Біологічна хімія / Ю.І. Губський, І.В. Ніженковська, М.М. Корда та ін. ; за ред. Ю.І. Губського, І.В. Ніженковської. – К. : ВСВ "Медицина", 2016. – 544 с.
4. Пустовалова Л.М. Практикум по биохимии. – Ростов-на-Дону: Феникс, 1999. – 544 с.
5. Зіменковський Б.С., Музиченко В.П. Біоорганічна хімія. – Львів: Кварт, 2009. – 402 с.
6. Овчинников Ю.А. Биорганическая химия. – Москва: Просвещение, 1987.

– 815с.

7. Методические указания к лабораторным работам по биоорганической химии (Физико-химические свойства аминокислот, белков, нуклеиновых кислот) (Для студентов биологического факультета) / Авторы: А.В. Запорожченко, С.А. Петров, С.С. Чернадчук, З.Е. Захариева, Н.Л. Федорко, И.Л. Вовчук, А.В. Сорокин, А.К. Будняк. – Одесса: Принт-мастер, 2008. – 62 с.

8. Методические указания к лабораторным работам по биоорганической химии (Физико-химические свойства углеводов и липидов) (Для студентов биологического факультета) / Авторы: А.В. Запорожченко, С.А. Петров, С.С. Чернадчук, З.Е. Захариева, Н.Л. Федорко, И.Л. Вовчук, А.В. Сорокин, А.К. Будняк. – Одесса: Принт-мастер, 2008. – 64 с.

РОЗДІЛ II. ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ БІЛКІВ

Мета: вивчити будову і властивості білків.

Питання для підготовки та обговорення:

1. Фізико-хімічні властивості білків.
2. Особливості пептидного зв'язку.
3. Функції білків.
4. Структурна організація білків.
5. Якісні реакції для визначення білків.

Білки – високомолекулярні азотовмісні органічні речовини, молекули яких побудовані із залишків амінокислот. Амінокислотні залишки в поліпептидному ланцюзі розташовані у певному генетично запрограмованому порядку та з'єднані пептидним зв'язком, що визначає первинну структуру білка.

Первинна структура білка містить інформацію про власну просторову організацію та має кілька рівнів.

Спіральна конфігурація поліпептидних ланцюгів має назву вторинної структури білка. У цих спіралях водень NH-групи пептидного зв'язку вступає у взаємодію з киснем C=O групи пептидного зв'язку сусіднього витку. Новий утворений зв'язок носить назву водневого зв'язку. Водневі зв'язки зміцнюють вторинну структуру білка. Однак поліпептидні ланцюги не можуть утворити спіралі на всьому їхньому протязі – цьому заважає дисульфідні зв'язки між молекулами цистеїну, розташованими в різних частинах поліпептидного ланцюжка, а також молекули проліну та оксипроліну, які не укладаються в спіралі. В результаті виникає специфічне для даного білка розташування

поліпептидних ланцюгів у просторі або упакування спіралей, так звана третинна структура білка. Білкові молекули можуть поєднуватися між собою, утворюючи більш важкі полімери. У цьому випадку йдеться про четвертинну структуру білка.

Існування первинної структури білка легко можна виявити, користуючись хімічними реакціями, у той час як для дослідження вторинної структури білка та наступних рівнів його організації велике значення набуває фізико-хімічні методи аналізу.

Лабораторна робота №18 **ВИЯВЛЕННЯ ПЕПТИДНИХ ЗВ'ЯЗКІВ (БІУРЕТОВА РЕАКЦІЯ)**

Мета заняття: зрозуміти умови проведення реакції на виявлення пептидних зв'язків.

Матеріал досліду: білок.

Реактиви:

сірчаноокисла мідь, 1 %-ва,

їдкий натр, 10 %-вий,

яєчний білок, 10 %-вий, 50 %-вий розчини.

Обладнання: пробірки, піпетки.

Завдання роботи:

- опанувати проведенням біуретової реакції,
- пояснити характер забарвлення в ході біуретової реакції при використанні різних концентрацій білка.

Принцип методу. Білки (пептиди) у лужному розчині у присутності солей міді (II) утворюють комплексні її сполуки синьо-фіолетового або червоно-фіолетового кольору, залежно від концентрації білка.

Хід роботи: до 3 крапель розчину білка різної концентрації додають 1 краплю розчину сульфату міді та 3 краплі їдкого натру: проба 1 і 2. З'являється фіолетове забарвлення різної інтенсивності.

Отримані результати внести у таблицю:

Варіанти досліду	CuSO ₄	NaOH	Забарвлення
Білок, 10%-вий			
Білок, 50%-вий			

Зробити висновки:

Лабораторна робота №19 НІНГІДРИНОВА РЕАКЦІЯ

Мета заняття: зрозуміти особливості прояву нінгідринової реакції.

Матеріал досліду: білок, гліцин.

Реактиви:

яєчний білок, 1 % розчин,

нінгідрин, 0,5 % розчин,

гліцин, 1 % розчин.

Обладнання: електрична плита, пробірки, піпетки.

Завдання роботи:

- опанувати проведенням нінгідринової реакції,
- пояснити різне забарвлення в ході біуретової реакції білку та гліцину.

Принцип методу. Білки, поліпептиди та вільні α -амінокислоти при нагріванні реагують з нінгідрином (трикетогідринденгідратом) з утворенням продукту конденсації, забарвленого у фіолетовий колір.

Хід роботи: до 1 мл 1 % розчину білка додають 0,5 мл 0,5 % розчину нінгідрину та нагрівають до кипіння. З'являється фіолетово-синє забарвлення. Виконують цю ж реакцію з розчином амінокислоти, взявши замість розчину білка 1 % розчин гліцину.

Отримані результати занести до таблиці:

№ пробірки	Застосовані реагенти (мл)			
	Білок	Гліцин	Нінгідрин	Забарвлення
1	1	-	0,5	
2	-	1	0,5	

Зробити висновки:

Лабораторна робота №20 РОЗЧІННІСТЬ БІЛКІВ

Мета заняття: зрозуміти причини розчинності білків в різних розчинах.

Матеріал досліду: яєчний білок, кератин.

Реактиви:

яєчний білок (не розведений),

кератин,

KCl, 5 % розчин.

Обладнання: пробірки, піпетки.

Завдання роботи:

- дати пояснення розчинності білків у воді та слабкому сольовому розчині.

Принцип методу. Розчинність білків у воді обумовлена наявністю на поверхні білкової молекули вільних гідрофільних груп і залежить від структури білка, реакції середовища, присутності електролітів. У кислому середовищі краще розчиняються білки, які мають кислі властивості, а в лужному - білки, що володіють основними властивостями. Альбуміни добре розчиняються у дистильованій воді, а глобуліни розчиняються у воді тільки у присутності електролітів. Не розчиняються у воді білки опорних тканин (колаген, кератин, еластин та ін.)

Хід роботи:

1. До 2 крапель нерозведеного яєчного білка додають 1 мл дистильованої води та перемішують. При цьому яєчний альбумін розчиняється, а яєчний глобулін випадає у вигляді невеликого осаду.
2. До 2 крапель яєчного білка додають 1 мл 5 % розчину калію хлориду. У слабкому сольовому розчині розчиняються як альбуміни, так і глобуліни.
3. Перевіряють розчинність у воді та у 5 % розчині хлористого калію білка кератину, що міститься в шерсті та волоссі.

Результати роботи оформити у вигляді таблиці:

Назва білка	Розчинність	
	в H ₂ O	в 5 % KCl
яєчний білок		
кератин		

Зробити висновки:

Лабораторна робота №21 ОСАДЖЕННЯ БІЛКІВ

Реакції осадження білків залежно від застосовуваного осадника бувають необоротними та оборотними.

Необоротне осадження білків (денатурація)

Принцип методів. Необоротні реакції осадження призводять до денатурації білків, при цьому руйнується просторова структура молекули і білки втрачають свої природні біологічні та фізико-хімічні властивості. Денатурацію білків можна викликати фізичними впливами (кип'ятіння,

заморожування, високий тиск, вібрація, радіоактивне випромінювання та ін.) та хімічними осадниками.

1. Осадження білків неорганічними осадниками

а) Осадження білків мінеральними кислотами.

Мета заняття: зрозуміти причини осадження білків в різних умовах.

Матеріал досліджу: яєчний білок.

Реактиви:

яєчний білок 1 % розчин,
нітратна кислота, концентрована,
сірчана кислота, концентрована,
соляна кислота, концентрована.

Обладнання: пробірки, піпетки.

Завдання роботи:

- дати пояснення появи осаду в різних варіантах досліджу.

Хід роботи: у пробірку обережно наливають близько 1 мл концентрованої нітратної кислоти. Потім, нахиливши пробірку, повільно додають по стінці 1 мл 1 %-ного розчину білка. На межі двох рідин утворюється осад у вигляді білого кільця.

Таку ж реакцію роблять з концентрованою соляною та сірчаною кислотами.

б) Осадження білків солями важких металів

Мета заняття: провести реакцію з осадженням білків різними осадниками.

Матеріал досліджу: яєчний білок.

Реактиви:

яєчний білок, 1 % розчин,
сульфат міді, 7 % розчин,
ацетат свинцю, 5 % розчин.

Обладнання: пробірки, піпетки.

Завдання роботи:

- дати пояснення появи осаду в різних варіантах досліджу.

Хід роботи: у дві пробірки наливають по 1 мл 1 % розчину білка та додають по 3-4 краплі: у першу пробірку – 7 %-ного розчину сульфату міді, у другу – 5 %-ного розчину ацетату свинцю. У всіх пробірках утворюється осад.

2. Осадження білків органічними осадниками

а) осадження білків органічними кислотами

Мета заняття: зрозуміти причину осадження білків різними органічними осадниками.

Матеріал досліджу: яєчний білок.

Реактиви:

яєчний білок, 1 % розчин,
 сульфосаліцилова кислота, 10 %-ний розчин,
 трихлороцтова кислота, 10 %-ний розчин.

Обладнання: пробірки, піпетки.

Завдання роботи:

- дати пояснення появи осаду в різних варіантах досліду.

Хід роботи: у 2 пробірки наливають по 2 мл 1 % розчину білка і додають в одну пробірку 4-5 крапель 10 %-ного розчину сульфосаліцилової кислоти, в іншу - 5-10 крапель 10 %-ної трихлороцтової кислоти. Випадає осад білка

б) Осадження білків органічними розчинниками

Мета заняття: зрозуміти причину осадження білків різними органічними розчинниками.

Матеріал досліду: яєчний білок.

Реактиви:

яєчний білок, 1 %-вий розчин,
 етанол, 96 %-вий,
 хлороформ,
 ацетон або ефір,
 хлористий натрій (насичений розчин).

Обладнання: пробірки, піпетки.

Завдання роботи:

- дати пояснення появи осаду в різних варіантах досліду.

Хід роботи: до 1 мл 1 % розчину білка додають 2 мл органічного розчинника (96 %-вого етанолу, хлороформу, ацетону або ефіру) та перемішують. Утворення осаду можна посилити додаванням кількох крапель насиченого розчину натрію хлориду.

в) Осадження білків алкалоїдними реактивами

Мета заняття: зрозуміти причину осадження білків алкалоїдами.

Матеріал досліду: яєчний білок.

Реактиви:

яєчний білок, 1 %-вий розчин,
 оцтова кислота, 1 %-вий розчин,
 пікринова кислота, 1 %-вий розчин,
 танін (насичений розчин),

залізо-синеродистий калій, 5 %-вий розчин.

Обладнання: пробірки, піпетки.

Завдання роботи:

- дати пояснення появи осаду в різних варіантах досліду.

Хід роботи: у три пробірки наливають по 1 мл 1 %-вого розчину білка, по 4-5 крапель 1 %-вого розчину оцтової кислоти та по 2-3 краплі: у першу пробірку – 10 %-вого розчину пікринової кислоти, у другу - насиченого розчину таніну, у третю – 5 %-вого розчину залізо-синьородистого калію. Спостерігають випадіння осаду.

3. Осадження білків при нагріванні

Мета заняття: зрозуміти причину осадження білків при нагріванні.

Матеріал досліду: яєчний білок.

Реактиви:

яєчний білок, 1 % розчин,

оцтова кислота, 1 %-вний, 10 %-вий розчини,

хлорид натрію (насичений розчин),

гідроксид натрію, 10 %-вий розчин.

Обладнання: електрична плита, пробірки, піпетки.

Завдання роботи:

- дати пояснення появи осаду в різних варіантах досліду.

Хід роботи: у п'ять пробірок наливають по 0,5 мл 1 %-вого розчину яєчного білка.

Вміст першої пробірки нагрівають до появи опалесценції (помутніння розчину).

До розчину білка у другій пробірці обережно додають 1 краплю 1 %-вого розчину оцтової кислоти, нагрівають і спостерігають спочатку появу опалесценції, а потім випадання білого пластівцевого осаду білка. Осад утворюється завдяки тому, що білок втрачає заряд і знаходиться у ізоелектричному стані.

До розчину білка у третій пробірці додають 1-2 краплі 10 %-вого розчину оцтової кислоти та нагрівають. Осад не утворюється, тому що в кислому середовищі (надлишок кислоти) частинки білка перезаряджаються і набувають позитивного заряду.

До розчину білка в четвертій пробірці додають 1-2 краплі 10 %-вого розчину оцтової кислоти, 1 краплю насиченого розчину натрію хлориду і нагрівають. Випадає осад внаслідок адсорбції іонів електроліту (утворення подвійного електричного шару) та нейтралізації заряду на частинках білка.

До розчину білка в п'ятій пробірці додають 1 краплю 10 % розчину натрію гідроксиду і нагрівають. Осад не утворюється, оскільки у лужному середовищі негативний заряд частинках білка посилюється.

4. Оборотно осадження білків методом висолювання

Фракційне осадження білків плазми сульфатом амонію

Мета заняття: зрозуміти причину і характер осадження білків методом висолювання.

Матеріал дослід: плазма крові.

Реактиви:

яєчний білок, 1 %-вий розчин,
сульфат амонію (насичений розчин),
гідроксид натрію, 10 %- вий розчин,
сульфат міді, 1 %- вий розчин.

Обладнання: електрична плита, пробірки, піпетки.

Завдання роботи:

- дати пояснення появи осаду в різних варіантах дослід.

Принцип методу. При додаванні до водних розчинів білків сульфатів або хлоридів лужних та лужноземельних металів (Na_2SO_4 , NaCl , MgSO_4 та інші) відбувається дегідратація та нейтралізація білкових частинок, при цьому білки випадають в осад без зміни нативної структури. Такий тип осадження білків називається висоленням. Висолення - оборотний процес і після видалення солі (розведенням водою, діалізом) білок знову набуває природних властивостей. Оскільки різні білки висолюються при різних концентраціях солей, цей метод використовується для фракціонування білків. Для поділу білків методом висолення широко застосовується сульфат амонію.

Фібриноген випадає в осад при 33 %-ому насиченні плазми сірчаноокислим амонієм, глобуліни – при напівнасиченні, а альбуміни – при повному насиченні плазми крові.

Хід роботи:

1. До 2 мл плазми додають 5 мл дистильованої води, 3,5 мл насиченого розчину сульфату амонію і перемішують. В осад випадає фібриноген (можна спостерігати лише незначне помутніння), який відокремлюють фільтруванням. Наявність білка на фільтрі перевіряють біуретовою реакцією: для цього воронку з фільтром переносять у чисту пробірку і на фільтр наливають 1 мл 10 %-вого розчину гідроксиду натрію і 1 краплю 1 %-го

розчину сульфату міді. Фільтрат (№1) використовують для подальшої роботи.

2. До 4 мл фільтрату №1 додають 4 мл насиченого розчину сульфату амонію та перемішують. В осад випадають глобуліни, які відокремлюють фільтруванням. Отримують осад, з яким роблять біуретову реакцію, і фільтрат №2.

3. До фільтрату №2 додають при постійному перемішуванні скляною паличкою кристалічний сульфат амонію до насичення (поки сіль не перестане розчинятися). Випадають в осад альбуміни, наявність яких перевіряють біуретовою реакцією: 1 мл суміші переносять у чисту пробірку, додають 1 мл 10 %-вого розчину гідроксиду натрію та 1 краплю 1 %-вого розчину сульфату міді.

Всі отримані результати оформити у вигляді таблиць з висновками та пояснюваннями.

1. Записати результати реакцій необоротного осадження білка при дії неорганічних та органічних осаджувачів у вигляді таблиці:

Назва груп осадників	Застосовані реактиви	Характер і забарвлення осаду	Чим обумовлена реакція

2. Результати дослідів щодо осадження білків при нагріванні оформити у вигляді таблиці:

Номер пробірки	Середовище	Зміни, що спостерігаються	Висновки
1	Нейтральне		
2	Слабокисле (1 % CH_3COOH)		
3	Кисле (10 % CH_3COOH)		
4	Кисле (10 % CH_3COOH + електроліт NaCl)		
5	Лужне (10 % NaOH)		

3. Виписати результати фракційного поділу білків плазми до таблиці:

Назва білка	Ступінь насичення $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Характер осаду	Результати біуретової реакції

Лабораторна робота №22 ВИЗНАЧЕННЯ ІЗОЕЛЕКТРИЧНОЇ ТОЧКИ БІЛКІВ

Мета заняття: зрозуміти зв'язок заряду білка з його осадженням.

Матеріал дослідів: казеїн, желатин.

Реактиви:

оцтова кислота 0,1 М, 0,2 М, 1 М,

оцтовокислий натрій 0,1 М, 0,2 М,

казеїн 0,4 % розчин,

желатин 1 % розчин.

Обладнання: пробірки, піпетки.

Завдання роботи:

- дати пояснення появи осаду в різних варіантах дослідів.

Принцип методу. Ізoeлектричною точкою білка називається величина рН середовища, коли сумарний електричний заряд білка дорівнює нулю. Розчини білків в ізoeлектричній точці найменш стійкі, нейтральні молекули білка легко випадають в осад. Внаслідок цього, визначення ізoeлектричної точки може бути зведено до визначення рН розчину, при якому спостерігається найбільш повне та швидке випадання білка в осад. Для отримання розчинів із різною величиною водневого показника користуються буферними розчинами.

Хід роботи:

1. Для визначення ізoeлектричної точки казеїну в 7 сухих пробірок послідовно наливають реактиви в кількостях (в мл), зазначених у таблиці:

№ пробірки	CH ₃ COOH 0,2 М	H ₂ O	0,4 % р-н казеїну в 0,2М CH ₃ COONa	pH суміші
1	1,6	0,4	0,2	3,8
2	0,8	1,2	0,2	4,1
3	0,4	1,6	0,2	4,4
4	0,2	1,8	0,2	4,7
5	0,1	1,9	0,2	5,0
6	0,06	1,94	0,2	5,3
7	0,03	1,97	0,2	5,6

Розчини ретельно перемішують. Через 5-10 хвилин спостерігають помутніння розчинів. Найбільша кількість осаду спостерігається у тій пробірці, де рН відповідає ізоелектричній точці казеїну.

Для визначення ізоелектричної точки желатину в 6 сухих пробірок послідовно наливають реактиви в кількостях (мл), зазначених у таблиці:

№ Про- бірки	H ₂ O	0,1 М розчин CH ₃ COH	1М розчин CH ₃ COOH	0,1М розчин CH ₃ COONa	1% розчин желатини	pH
1	3,8	0,8	-	2,0	2,0	5,6
2	3,5	0,5	-	2,0	2,0	5,3
3	3,0	1,0	-	2,0	2,0	5,0
4	2,0	2,0	-	2,0	2,0	4,7
5	-	4,0	-	2,0	2,0	4,4
6	3,2	-	0,8	2,0	2,0	4,1

Вміст кожної пробірки перемішують, і потім у всі пробірки повільно по стінці додають 2 мл 96%-ного етанолу (або ацетону). Через 30 хвилин визначають ізоелектричну точку желатину. Вона відповідатиме рН пробірки з максимальним ступенем помутніння.

Відзначити ступінь помутніння у пробірках та записати ізоелектричні точки казеїну та желатину.

Лабораторна робота №23

ДІАЛІЗ БІЛКІВ

Мета заняття: зрозуміти причини і характер діалізу білка.

Матеріал досліджу: казеїн, желатин.

Реактиви:

яєчний білок 3 %-вий розчин,

сульфат амонію (насичений розчин),

хлорид барію 5 %-вий розчин,
сірчаноокисла мідь, 1 %-вий розчин,
гідроксид натрію, 10 %-вий розчин.

Обладнання: пробірки, піпетки.

Завдання роботи:

- дати пояснення появи осаду в різних варіантах досліду.

Принцип методу. Діалізом називається процес поділу високо- та низькомолекулярних речовин за допомогою напівпроникних мембран (целофан, колодій, пергамент та ін.). Молекули білка, що мають великі розміри і молекулярну масу, не здатні проникати через такі мембрани, у той час як низькомолекулярні речовини легко проходять через них. Діаліз є дуже зручним методом очищення білкових розчинів від низькомолекулярних домішок, наприклад, надлишку солей. Найпростішим діалізатором може бути целофановий або колоїдний мішечок, опущений у стакан із водою.

Хід роботи:

1. У пробірку наливають 2 мл 3 % розчину яєчного альбуміну та додають 1 краплю насиченого розчину сульфату амонію. З листа целофану, попередньо намоченого дистильованою водою, роблять мішечок і виливають у нього вміст пробірки. Краї мішечка прикріплюють до середини скляної палички (або затискають між двома скляними паличками, з'єднаними одна з одною гумовими кільцями). Мішечок поміщають у склянку з дистильованою водою так, щоб скляна паличка лягла на краї склянки. Рівень рідини в мішечку повинен бути нижчим від рівня рідини в склянці.

2. Через 1 годину після початку діалізу рідину, що знаходиться в склянці, перевіряють на присутність білка та сульфат-аніонів:

а) Проба на білок.

З 1 мл рідини зі склянки роблять біуретову реакцію.

б) Проба на сульфат-аніони.

До 1 мл рідини зі склянки додають 3-4 краплі 5 % розчину хлориду барію та спостерігають утворення осаду сульфату барію у вигляді білої каламуті.

3. Целофановий мішечок виймають із склянки. Рідину з мішечка переливають у пробірку і роблять біуретову реакцію.

Питання для контролю:

1. Опишіть біуретову реакцію на виявлення пептидних зв'язків.
2. Опишіть нінгідринову реакцію.
3. Охарактеризуйте явище розчинності білків.

4. Опишіть явище осадження білків.
5. Опишіть визначення ізоелектричної точки білків.
6. Охарактеризуйте діаліз білків.

КОНТРОЛЬ ЗНАНЬ ДО РОЗДІЛУ «ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ БІЛКІВ»:

1. Що таке білки? Перерахуйте функції білків.
2. Назвіть типи зв'язків амінокислот у молекулі білка.
3. Що розуміють під первинною, вторинною, третинною, четвертинною структурами білка? Які зв'язки їх утворюють?
4. Види спіралей у молекулі білка.
5. Дисульфідний, водневий, іонний зв'язок, їх участь в утворенні структур білка.
6. Гідрофобні зв'язки у молекулі білка.
7. Як встановити N-кінцеву та C-кінцеву амінокислоти в поліпептидному ланцюжку?
8. Наведіть докази наявності пептидного зв'язку у молекулі білка.
9. Наведіть характеристику глобулярних та фібрилярних білків.
10. Охарактеризуйте методи виділення та очищення білків.
11. Охарактеризуйте амфотерні властивості білків.
12. Від чого залежить розчинність білків?
13. Які чинники стійкості білкової молекули у розчині вам відомі?
14. Який механізм виникнення заряду білкової молекули?
15. Що таке ізоелектрична точка та ізоелектрична зона білків?
16. Що таке гідратна оболонка та який механізм її виникнення?
17. Надайте поняття про денатурацію та висолювання білків.
18. Охарактеризуйте оборотне та необоротне осадження білків.
19. Що таке молекулярна маса білків? Які методи її визначення вам відомі?
20. Наведіть класифікацію білків.
21. Чим відрізняються складні білки від найпростіших?
22. Які методи використовують для вивчення амінокислотного складу гідролізатів білків?
23. Білки здатні випадати в осад під впливом високих концентрацій солей (NaCl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ та інших), тобто висолюватися. Чим зумовлений цей ефект?
24. Які хімічні елементи належать до складу протеїнів?
25. Скільки поліпептидних ланцюгів може міститися у молекулі протеїнів?
26. Що дозволяють встановити якісні реакції на білки?
27. Які органічні сполуки реагують із нінгідрином?

28. На яких фізико-хімічних властивостях білків ґрунтується метод діалізу?
29. Якими методами можна фракціонувати білки, ґрунтуючись на молекулярній масі?
30. Якими процесами супроводжується денатурація протеїнів?
31. Які реакції осадження білка належать до необоротних?
32. Які групи беруть участь в утворенні пептидного зв'язку між амінокислотами у білку?
33. Які реагенти використовують для оборотного осадження білка?

ЗАВДАННЯ ДО КОНТРОЛЬНОЇ ПЕРЕВІРКИ ЗНАНЬ:

Проведіть порівняльну характеристику фізико-хімічних властивостей двох розчинів білків

I. Реакції висолювання	Розчин №1	Розчин №2
	Результат дослідження	Результат дослідження
1) напівнасичений розчин $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		
2) насичений розчин $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		
3) якісна реакція на білок		
Висновок:		

Визначте ізоелектричну точку (ІЕТ) досліджуваних розчинів

II. Реакції визначення ІЕТ	Розчин №3	Розчин №4
	Результат дослідження	Результат дослідження
pH		
4,0-5,0		
9,0-11,0		
Висновок		

Рекомендована література:

1. Біологічна хімія: Лабораторний практикум / За заг. ред. проф. Я.І. Гонського. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2001. – 288 с.
2. Пустовалова Л.М. Практикум по биохимии. – Ростов-на-Дону: Феникс, 1999. – 544 с.
3. Біологічна і біоорганічна хімія : у 2 кн. : підручник. Кн. 2. Біологічна хімія / Ю.І. Губський, І.В. Ніженковська, М.М. Корда та ін. ; за ред. Ю.І. Губського, І.В. Ніженковської. – К. : ВСВ “Медицина”, 2016. – 544 с.
4. Карнаухов О.І., Мельничук Д.О., Чеботько К.О. Загальна та біоорганічна хімія. – Вінниця: Нова книга, 2003. – 544 с.
5. Зіменковський Б.С., Музиченко В.П. Біоорганічна хімія. – Львів: Кварт, 2009. – 402 с.
6. Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия. – Москва: Просвещение, 1987. – 815с.
7. Методические указания к лабораторным работам по биоорганической химии (Физико-химические свойства аминокислот, белков, нуклеиновых кислот) (Для студентов биологического факультета) / Авторы: А.В. Запорожченко, С.А. Петров, С.С. Чернадчук, З.Е. Захариева, Н.Л. Федорко, И.Л. Вовчук, А.В. Сорокин, А.К. Будняк. – Одесса: Принт-мастер, 2008. – 62 с.
8. Методические указания к лабораторным работам по биоорганической химии (Физико-химические свойства углеводов и липидов) (Для студентов биологического факультета) / Авторы: А.В. Запорожченко, С.А. Петров, С.С. Чернадчук, З.Е. Захариева, Н.Л. Федорко, И.Л. Вовчук, А.В. Сорокин, А.К. Будняк. – Одесса: Принт-мастер, 2008. – 64 с.

РОЗДІЛ III. ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ ТЕМА 1. БУДОВА НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ

Мета: вивчити будову і властивості нуклеїнових кислот.

Питання для підготовки та обговорення:

1. Фізико-хімічні властивості нуклеїнових кислот.
2. Гідроліз нуклеопротеїдів.
3. Якісні реакції на компоненти нуклеїнових кислот.

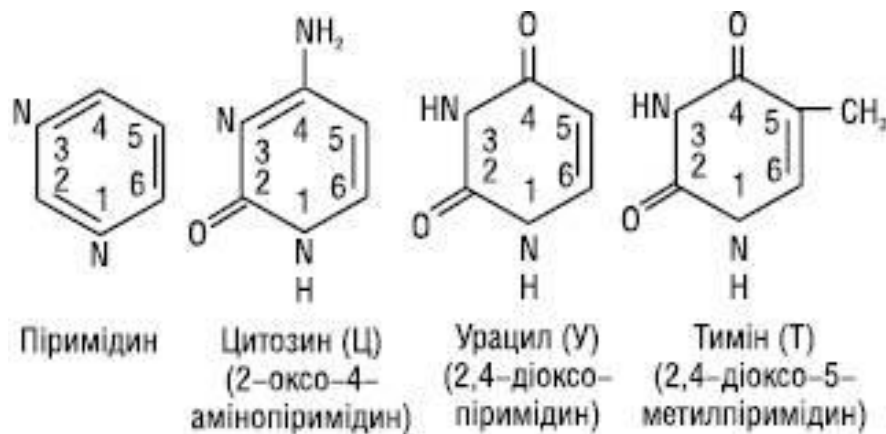
Нуклеїнові кислоти є високомолекулярними полімерними сполуками, які складаються з мононуклеотидів (нуклеозидмонофосфатів). Вони мають

першорядне значення у збереженні, поширенні та передачі генетичної інформації, що реалізується шляхом синтезу специфічних білків. У свою чергу, моновуклеотиди складаються з пуринової або піримідинової основи, вуглеводного компонента (рибози та дезоксирибози) та фосфорної кислоти.

Пуринові основи можна розглядати як похідні пурину. До складу нуклеїнових кислот входять дві пуринові основи - аденін і гуанін:

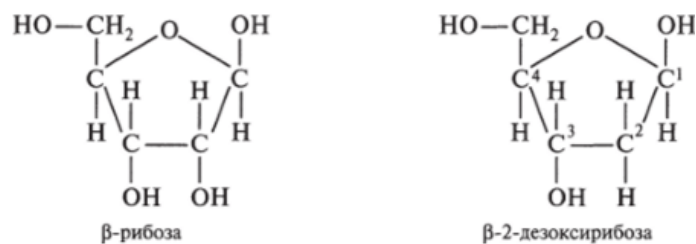


Піримидинові основи - цитозин, урацил, тимін - можна розглядати як похідні піримідину:



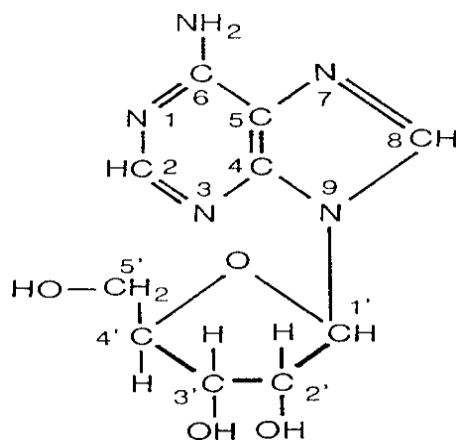
Крім того, відкрито ще ряд мінорних основ: 5-метилцитозин, 5-гідроксиметилцитозин у складі ДНК; диметилгуанін, метиладенін у складі РНК та ін.

Як вуглеводний компонент в склад нуклеїнових кислот входять рибоза і дезоксирибоза:

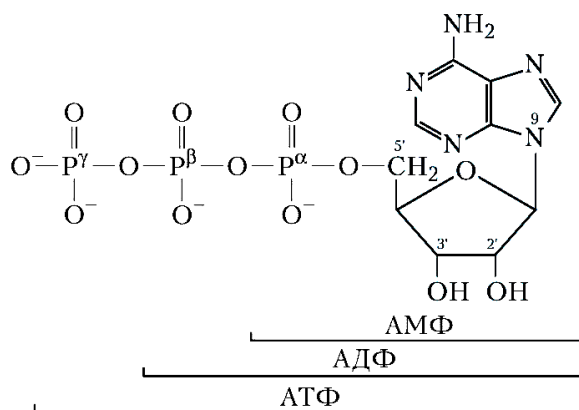


Дезоксирибоза у C_2 не містить кисень.

Прикладом нуклеозиду є аденозин:



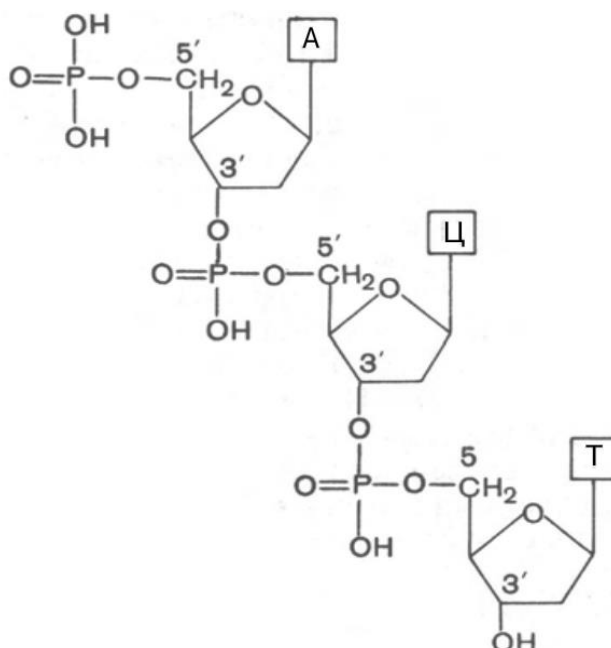
Нуклеозид із фосфорною кислотою, яких може бути один залишок (або два, чи три залишки), утворює нуклеотиди: нуклеозидмоно(або -ди-, або -три-)фосфати:



У складі нуклеїнових кислот містяться нуклеозидмонфосфати.

Мононуклеотиди носять різні назви в залежності від пуринової або піримідинової основи, що входить до їх складу, наприклад, аденілова кислота (містить аденін), гуанілова кислота (гуанін), цитидилова кислота (цитозин) та ін.

Окремі мононуклеотиди в молекулі нуклеїнової кислоти з'єднуються за допомогою кисневих містків, що утворюються за рахунок гідроксильної групи третього вуглецевого атома пентози одного мононуклеотиду та гідроксилу фосфорної кислоти сусіднього нуклеотиду:



У живих організмах виявлено два типи нуклеїнових кислот: дезоксирибонуклеїнові кислоти (ДНК) та рибонуклеїнові кислоти (РНК). Різниця в хімічному складі між ДНК і РНК полягає в тому, що вуглеводним компонентом ДНК є дезоксирибоза, а в РНК - рибоза; крім того, в склад ДНК поряд з іншими азотистими основами входить тимін, а в РНК замість тиміну - урацил.

Лабораторна робота №24

ВИЗНАЧЕННЯ КОМПОНЕНТІВ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ ШЛЯХОМ ГІДРОЛІЗУ НУКЛЕОПРОТЕЇДІВ

Мета заняття: визначити молекулярний склад нуклеопротеїдів.

Матеріал досліду: гідролізат з дріжджів, який є джерелом компонентів нуклеїнових кислот.

Реактиви:

Дріжджі пекарські,

Ефір,

Гідроксид натрію, 0,4 %-вий, 10 %-вий, 30 %-вий розчини,

Оцтова кислота, 5 %-вий розчин,

Сірчана кислота, 5 %-вий розчин,

Сульфат міді, 1 %-вий, 7 %-вий розчини,

Аміак, концентрований,

Аміачний розчин 1 %-вого нітрату срібла,

Реактив Фелінга,

Молібденовий реактив (молібдат амонію в нітратній кислоті).

Обладнання: пробірки, піпетки.

Принцип методу. Нуклеопротейди добре розчиняються в розведених лугах і легко осідають при підкисленні. Для виділення нуклеопротейдів з дріжджів їх екстрагують слабким розчином гідроксиду натрію, а потім осаджують при підкисленні розведеним розчином оцтової кислоти.

Для вивчення складу нуклеопротейдів проводять кислотний гідроліз цих білків та у гідролізаті виявляють їх компоненти. При неповному гідролізі нуклеопротейди розпадаються на білки та нуклеїнові кислоти. Білок виявляють біуретової реакції. При повному гідролізі нуклеопротейдів утворюються α -амінокислоти, пуринові та піримідинові основи, фосфорна кислота та пентози (рибоза та дезоксирибоза).

Амінокислоти виявляють нінгідриновою реакцією, фосфорну кислоту – реакцією з молібдатом амонію, пентози – реакцією Фелінга, азотисті основи – за допомогою нітрату срібла, з яким вони утворюють важкорозчинні сполуки.

1. Проведення гідролізу.

Хід роботи: ретельно розтирають у фарфоровій ступці 5-10 г дріжджів, змочених 10-15 краплями ефіру і такою ж кількістю води, з 2-3 г піску. Поступово додають у ступку 30-40 мл 0,4 % розчину гідроксиду натрію і продовжують розтирати протягом 10-15 хв. Вміст ступки переносять у центрифужні пробірки, врівноважують їх і центрифугують. До центрифугату при перемішуванні додають краплями 1% розчин оцтової кислоти до припинення виділення осаду нуклеопротейдів.

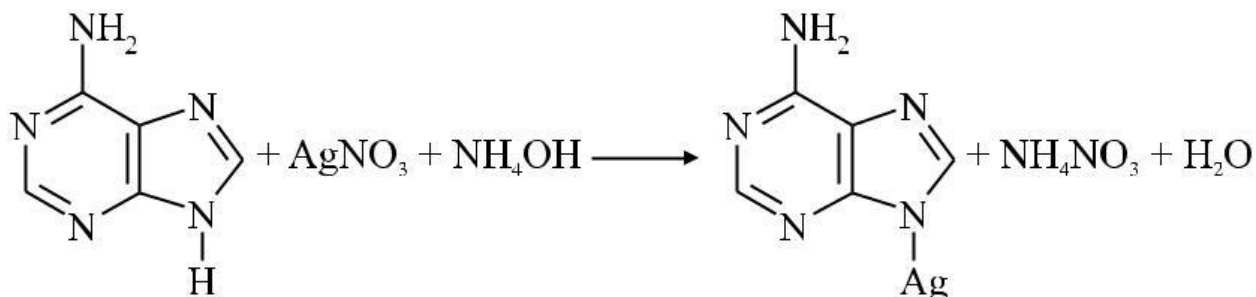
Отриманий осад фільтрують і використовують для гідролізу. 0,5 г нуклеопротейдів вносять у пробірку, додають 5 мл 5 %-ого розчину сірчаної кислоти, закривають пробірку пробкою, в яку вставлена скляна трубка довжиною 25-30 см (зворотний холодильник), і ставлять на киплячу водяну баню. Через 1-2 години після початку гідролізу розчин охолоджують, фільтрують і досліджують.

2. Якісна реакція на білок

Хід роботи: для проведення біуретової реакції до 5 крапель гідролізату додають 10 крапель 10% розчину гідроксиду натрію, одну краплю 1% розчину сульфату міді і спостерігають за зміною забарвлення.

3. Проба на пуринові основи.

Хід роботи: до 10 крапель гідролізату додають 1 краплю концентрованого розчину аміаку для нейтралізації та 5 крапель 1 % розчину AgNO_3 . При постійній випадає пухкий осад бурого кольору, зумовлений утворенням срібних сполук пуринових основ:



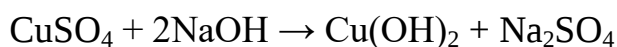
4. Якісні реакції на вуглевод (рибозу і дезоксирибозу).

Принцип методу. Ці реакції засновані на здатності рибози та дезоксирибози, що мають вільний глікозидний гідроксил, відновлювати метали (мідь, вісмут, залізо) у лужному середовищі. При цьому метали відновлюються з окисної форми в закисну або у разі закису до вільного стану; цукру ж дають різні продукти окиснення.

а) Проба Троммера полягає у відновленні окисної міді в закисну під впливом рибози та дезоксирибози, присутніх у гідролізаті дріжджів; реакція протікає у лужному середовищі.

Хімізм реакції:

З початку:

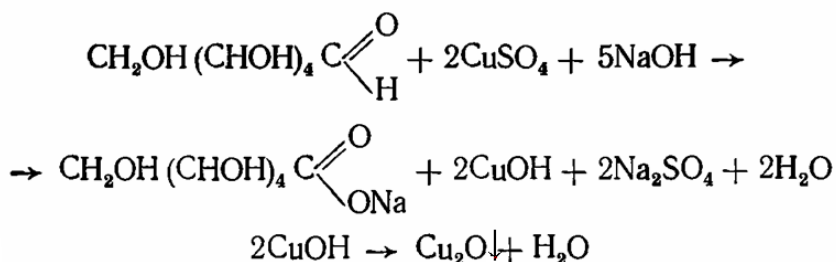


Сульфат міді

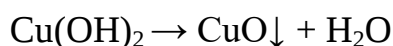
Гідрат окису міді

(блакитний осад)

Гідрат окису міді реагує, наприклад, з рибозою, утворюється Na-сіль рибонової кислоти та гідрат закису міді – жовтий Cu(OH) , який може перетворюватися на цегляно-червоний закис міді Cu_2O . У загальній формі реакції мають наступний вигляд:



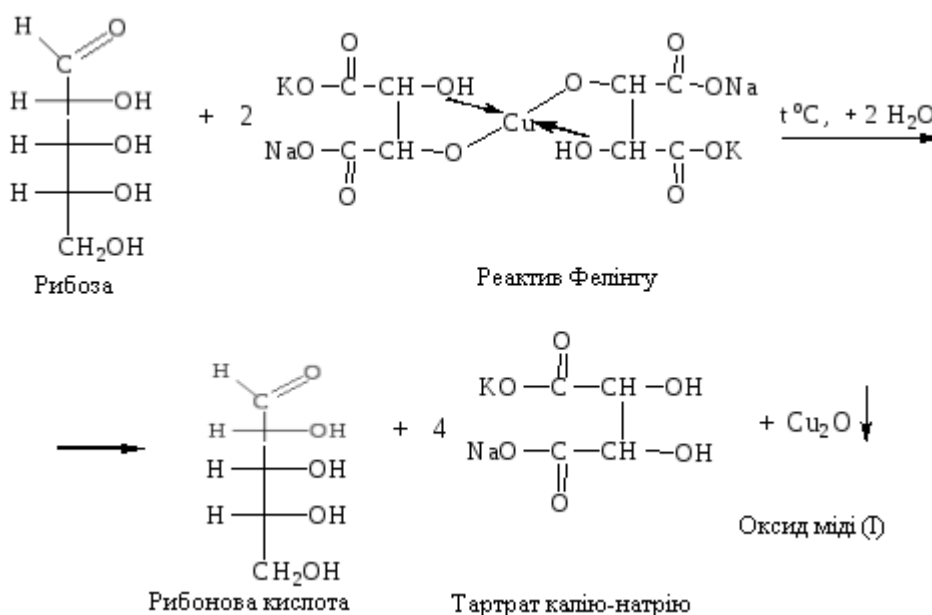
Надлишок CuSO_4 заважає реакції, тому що це призводить до утворення великої кількості проміжного $\text{Cu}(\text{OH})_2$, який при нагріванні розпадається з утворенням чорного осаду окису міді CuO :



Хід роботи: до 5 крапель гідролізату додають 5 крапель 30 % розчину їдкого натру і кілька крапель 7 % розчину сульфату міді до появи каламуті гідроксиду міді $\text{Cu}(\text{OH})_2$. При нагріванні до кипіння випадає жовтий осад гідрату закису міді CuOH або червоний осад закису міді Cu_2O .

б) Реакція Фелінга.

Хімізм реакції:



Хід роботи: до 1 мл гідролізату додають розчин гідроксиду натрію до лужної реакції на лакмус, потім 5-10 крапель реактиву Фелінгу, нагрівають і спостерігають за зміною забарвлення.

5. Реакція для виявлення фосфорної кислоти

Молібденова проба на фосфорну кислоту

Хімізм реакції:



Фосфорномолібденовокислий
амоній (лимонно - жовтого
кольору)

Хід роботи: до 5 крапель гідролізату додають 10 крапель молібденового реактиву, що є розчином молібденовокислого амонію в нітратній кислоті, і кип'ятять. При охолодженні пробірки під струменем холодної водопровідної води випадає кристалічний осад лимонно-жовтого кольору, зумовлений утворенням фосфорномолібденовокислого амонію.

Результати занести до таблиці:

Дослідний об'єкт	Результати реакцій				
	Біуретової	Фелінгу	Тромера	AgNO ₃	Із молібден- новим реактивом

Зробити висновки:

Питання для контролю:

1. Опишіть первинну будову нуклеїнових кислот.
2. Охарактеризуйте вторинну структуру нуклеїнових кислот.
3. Охарактеризуйте метод кислотного гідролізу нуклеопротейдів.
4. Опишіть біуретову пробу на поліпептиди.
5. Опишіть срібну пробу на пуринові основи.
6. Опишіть молібденову пробу на фосфорну кислоту.

ТЕМА 2. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ НУКЛЕОТИДІВ ТА НУКЛЕІНОВИХ КИСЛОТ

Мета: засвоїти методи кількісного визначення нуклеотидів та нуклеїнових кислот.

Питання для підготовки та обговорення:

1. Чим обумовлені оптичні властивості нуклеїнових кислот.
2. Охарактеризуйте закон Ламберта-Бера.

У сучасній біології широке вживання знаходять спектральні методи дослідження біологічних об'єктів. Важливу інформацію про структурні особливості біополімерів отримують при використанні флуоресценції, ультрафіолетової (УФ) та інфрачервоної (ІФ) спектрофотометрії, дисперсії оптичного обертання, електронного парамагнітного резонансу (ЕПР) та ядерного магнітного резонансу (ЯМР).

Основним законом абсорбційної спектрофотометрії є закон Ламберта – Бера. Якщо на шар речовини товщиною L падає монохроматичний пучок світла інтенсивністю I_0 , то завдяки процесам поглинання світла в речовині, світло, яке вийшло, матиме інтенсивність

$$I = I_0 e^{-ECL}$$

де C – концентрація речовини; E – молярний коефіцієнт екстинкції ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$).

Логарифм співвідношення I_0/I називається оптичною щільністю речовини:

$$D = \ln I_0/I = ECL$$

Пропускання світла розчином (T) виражається співвідношенням:

$$T = I_0/I \cdot 100\%$$

Світло різних довжин хвиль λ поглинається речовиною по-різному. Залежність оптичної щільності D або молярного коефіцієнта екстинкції E від λ називається спектром поглинання речовини: $D = f(\lambda)$ або $E = f(\lambda)$. Спектр поглинання визначається властивостями речовини та є постійною характеристикою речовини. Прилади, на яких вимірюються D або T та визначаються спектри поглинання, називаються спектрофотометрами. D змінюється від 0 до ∞ , а T – від 1 до 100 %.

Речовини можуть поглинати світло у різних ділянках спектра. Умовно весь спектральний діапазон поділяють на ультрафіолетову, видиму та інфрачервону області. УФ-спектр лежить в інтервалі від 100 до 400 нм і поділяється на вакуумну (100-200 нм), середню (200-300 нм) та близьку (300-400 нм) УФ-області ($1 \text{ нм} = 10^{-9} \text{ м}$). Видима частина спектра займає від 400 до 750 нм. УФ-спектр ділиться на близьку (0,75-2,5 мкм), середню (2,5-15 мкм) та далеку (15-300 мкм) УФ-області.

Спектри поглинання білків та нуклеїнових кислот розташовані в середній частині УФ-спектру. Чисто емпірично знайдено кореляції між хімічною структурою молекул та їх спектрами. Наявність циклічних структур із делокалізованими π - електронами зумовлює поглинання УФ-світла. Для

білків і нуклеїнових кислот характерні два максимуми поглинання: один - на межі вакуумної УФ-області (200-210 нм) та другий - у середній УФ-області (довгохвильовий максимум поглинання). Довгохвильовий максимум білків визначається поглинанням трьох ароматичних амінокислот – триптофану, тирозину та фенілаланіну. Поглинання обумовлено π - π електронними переходами у площині ароматичного кільця. Для нуклеїнових кислот максимум 260 нм пов'язаний із поглинанням пуринових та піримідинових основ. Основна частка поглинання пов'язана з π – π^* переходами, але невелике поглинання визначається і гетероатомами, що дають n – π^* переходи.

У лабораторній практиці на спектрофотометрі визначають відношення D_{280}/D_{260} . З цього відношення оцінюють чистоту білкових препаратів та відсутність нуклеїнових кислот. Якщо $D_{280}/D_{260} > 1,6-1,7$ – це свідчить про високу чистоту білкових препаратів.

УФ - поглинання нуклеїнових кислот. Поглинання нуклеїнових кислот обумовлені пуриновими та піримідиновими основами. Значення $E_{\max}$ при 260 нм для аденіну, урацилу, тиміну, гуаніну та цитозину дорівнює відповідно $13,4 \cdot 10^3$; $8,2 \cdot 10^3$; $7,4 \cdot 10^3$; $7,2 \cdot 10^3$ та $5,55 \cdot 10^3$ г⁻¹ см⁻¹.

Лабораторна робота №25 ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ НУКЛЕОТИДІВ ЗА МЕТОДОМ ВАСИЛЕНКА, КАМЗОЛОВОЇ ТА КНОРРЕ

Мета заняття: визначити вміст нуклеопротейдів спектрофотометричним методом за допомогою спеціальних коефіцієнтів.

Матеріал досліду: чистий препарат РНК.

Реактиви:

РНК,

Гідроксид калію, 0,5 н,

Соляна кислота, 0,1 н.

Обладнання: пробірки, піпетки.

Принцип методу. Метод визначення ґрунтується на прямому спектрофотометричному визначенні нуклеотидів у розчині при дев'яти різних довжинах хвиль з наступним розрахунком окремих нуклеотидів за спеціальними коефіцієнтами (див. таблицю). Метод застосовують для порівняно чистих препаратів РНК.

Хід роботи: наважку РНК гідролізують у 0,5 н розчині КОН при 37°C протягом 18 год, підкислюють 0,1 н розчином НСІ, та отриманий гідролізат використовують для спектрофотометричного аналізу.

Хоча для цього методу характерна швидкість виконання і невелика кількість стадій визначення нуклеїнових кислот, проте його використання обмежується у зв'язку з тим, що він потребує чистих препаратів нуклеїнових кислот і в певних концентраціях. Значні коливання концентрацій призводять до втрати відтворення результатів. Для роботи використовують коефіцієнти перерахунку концентрацій нуклеотидів:

Коефіцієнти перерахунку концентрацій нуклеотидів

Довжина хвилі, нм	Нуклеотиди			
	А	Т	Г	Ц
255,0	-0,102722	+0,137335	-0,076828	+0,064128
257,5	+0,086134	+0,024500	-0,011923	-0,117505
260,0	-0,388802	+0,190198	-0,121019	+0,437638
265,0	+0,648962	-0,355113	+0,204348	-0,629913
270,0	+0,413094	-0,285994	+0,163068	-0,356251
275,0	-0,899523	+0,311530	-0,198800	+0,341192
280,0	-0,374961	+0,177533	-0,081681	+0,380892
285,0	+0,521705	-0,156474	+0,138982	+0,659304
290,0	+0,234601	-0,026770	+0,054940	-0,345770

Приклад розрахунків. Для аденілової кислоти знайдено такі значення оптичних густин при зазначених довжинах хвиль: 0,740; 0,780; 0,799; 0,798; 0,756; 0,691; 0,600; 0,486; 0,360. Отже, концентрація аденілової кислоти в розчині дорівнюватиме:— $(0,102722 \cdot 0,740) + (0,086134 \cdot 0,780) - 0,388802 \cdot 0,799 + (0,648962 \cdot 0,798) + (0,413094 \cdot 0,756) - (0,899523 \cdot 0,691) - (0,374961 \cdot 0,600) + (0,521705 \cdot 0,486) + (0,234601 \cdot 0,360) = 2,14 \cdot 10^3$ мкмоль/мл.

Лабораторна робота № 26

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ ЗА ВУГЛЕВОДНИМ КОМПОНЕНТОМ

Методи кількісного визначення нуклеїнових кислот ґрунтуються на визначенні їх структурних компонентів: азотистих основ (за поглинанням в

ультрафіолетовій зоні спектру), вуглеводів (за допомогою характерних кольорових реакцій) і фосфорної кислоти.

Мета заняття: визначити вміст нуклеїнових кислот за допомогою різних спектрофотометричних методів, які базуються на властивостях їх вуглеводних компонентів.

Матеріал досліді: розчини ДНК та РНК.

1. Визначення вмісту ДНК з дифеніламіном за Діше

Принцип методу. Метод базується на реакції між дифеніламіном і дезоксирибозою, що відщеплюється від пуринових нуклеотидів у результаті кислотного гідролізу. N-глікозидний зв'язок у піримідинових нуклеотидах при цьому не руйнується, внаслідок чого можна визначити лише біля половини вуглеводу, що входить до складу ДНК; тому рекомендується як стандарт використовувати гідролізат ДНК, концентрацію якого попередньо визначають спектрофотометричним методом.

Реактиви:

розчин ДНК (50–500 мкг/мл),

стандартний розчин ДНК (0,5 мг/мл), що містить від 50 до 500 мкг ДНК у пробі (для його отримання наважку комерційного препарату ДНК розчиняють в 0,5 н. HClO_4 і нагрівають 15 хв. при 70°C ; для визначення точної концентрації гідролізат розводять у 50 разів 0,5 н. розчином HClO_4 і вимірюють поглинання на спектрофотометрі),

реактив Діше (1 г дифеніламіну, перекристалізованого із 70 %-го етилового спирту, розчиняють в 100 мл льодяної оцтової кислоти і додають 2,75 мл концентрованої H_2SO_4).

Обладнання: ваги, колба, пробірки, водяна баня, годинник, піпетки, мірний циліндр, фотоелектроколориметр або спектрофотометр (довжина хвилі 590 нм), кювети завтовшки 5 або 10 мм.

Хід роботи:

1. До розчину ДНК (50–500 мкг/мл) додають подвійний об'єм реактиву Діше. Суміш нагрівають протягом 10 хв на водяній бані при 90°C й охолоджують.

2. Одночасно проводять реакцію зі стандартним розчином ДНК (0,5 мг/мл), що містить від 50 до 500 мкг ДНК у пробі. Під час проведення досліді при нагріванні розвивається стійке синє забарвлення. Вимірюють поглинання розчинів на фотоелектроколориметрі при 590 нм.

Вміст ДНК у тканині розраховують за графіком, побудованим за стандартним розчином ДНК, з урахуванням всіх розведень. Виходячи із

вмісту фосфату при спектрофотометричному визначенні перерахунковий коефіцієнт для ДНК становить 10,1, для РНК – 10,5.

Розрахунки кількісного визначення ДНК за вуглеводним компонентом та отримані результати записують у зошит.

2. Визначення ДНК за методом Броді

Принцип методу. Цей метод дозволяє спектрофотометрично визначити кількість ДНК, оскільки інтенсивність забарвлення дезоксирибози ДНК із солянокислим цистеїном залежить від кількості ДНК у розчині. Цим методом можна визначити ДНК у розчинах, які містять від 1 до 10 мкг ДНК.

Реактиви:

розчин ДНК (1–10 мкг речовини),

1 %-й розчин солянокислого цистеїну, концентрована H_2SO_4 .

Обладнання: пробірки, піпетки, водяна баня, спектрофотометр.

Хід роботи: до 0,5 мл розчину ДНК, що містить 1–10 мкг нуклеїнової кислоти, додають 0,05 мл 1 %-го розчину солянокислого цистеїну, суміш охолоджують протягом 10 хв у холодній воді. Потім додають 5 мл охолодженої концентрованої сірчаної кислоти, перемішують і ставлять на водяну баню за температури 25 °С на 20 хв.

Вимірюють оптичну густину розчину за довжини хвилі 474 нм.

Вміст ДНК розраховують за графіком, побудованим за стандартним розчином ДНК.

Розрахунок вмісту ДНК і отриманий результат записують у зошит.

3. Визначення вмісту РНК за Мейбаум

Принцип методу. Метод базується на реакції рибози, що входить до складу РНК, з орцином. При гідролізі РНК у присутності соляної кислоти формується похідне фурфуролу, яке утворює при нагріванні з орцином продукт зеленого кольору. Реакція не є високоспецифічною, оскільки забарвлені продукти утворюють не тільки рибоза, а й дезоксирибоза, гексози, полісахариди, а також деякі інші сполуки, однак чутливість реакції рибози з орцином з є набагато вищою.

Реактиви:

розчин РНК (0,1 мг/мл; для його отримання розчиняють наважку комерційного препарату в 0,5 н. HClO_4 з наступним кип'ятінням протягом 15 хв і вимірюванням поглинання на спектрофотометрі),

0,5 %-й розчин орцину (виготовлений на 0,1 %-му розчині FeCl_3 у концентрованій HCl перед роботою).

Обладнання: ваги, колба, пробірки, піпетки, водяна баня, годинник, фотоелектроколориметр або спектрофотометр (довжина хвилі 670 нм), кювети завтовшки 5 або 10 мм.

Хід роботи: у досліді використовують розчин РНК (0,1 мг/мл), який отримують, розчиняючи наважку комерційного препарату в 0,5 н. HClO_4 з наступним кип'ятінням протягом 15 хв і вимірюванням поглинання на спектрофотометрі. До 2 мл досліджуваного розчину, що містить від 10 до 80 мкг РНК, додають 2 мл 0,5%-го розчину орцину, перемішують і нагрівають 20 хв на киплячій водяній бані. Проби охолоджують і вимірюють екстинкцію при 670 нм.

Вміст РНК розраховують за графіком, побудованим за стандартним розчином РНК.

Розрахунок вмісту РНК і отриманий результат записують у зошит.

Питання для контролю:

1. Розкажіть про локалізацію нуклеїнових кислот у клітині.
2. Яка структура пуринових основ? Наведіть приклади представників.
3. Яка структура піримідинових основ? Наведіть приклади представників.
4. Перерахуйте мінорні основи пуринового ряду.
5. Перерахуйте мінорні основи піримідинового ряду.
6. Які таутомерні форми ОН-вмісних азотистих основ ви знаєте?
7. Назвіть якісну реакцію на азотисті основи.
8. Охарактеризуйте вуглеводний компонент нуклеїнових кислот. Які якісні реакції на цей компонент вам відомі?
9. Охарактеризуйте N, β -глікозидний зв'язок нуклеозидів. Наведіть приклади.
10. Охарактеризуйте моонуклеотиди. Поясніть утворення фосфодієфірного зв'язку. Яка якісна реакція на фосфатний компонент вам відома?
11. Яка будова циклічні нуклеотидів? Наведіть приклади.
12. Охарактеризуйте первинну структуру нуклеїнових кислот.
13. Охарактеризуйте вторинну структуру нуклеїнових кислот.
14. Наведіть правила Чаргафа.
15. Охарактеризуйте третинну структуру нуклеїнових кислот.

КОНТРОЛЬ ЗНАНЬ ДО РОЗДІЛУ «ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ»:

1. Охарактеризуйте функції нуклеїнових кислот.

2. Охарактеризуйте особливості первинної структури ДНК та РНК.
6. Опишіть особливості структури та функції тРНК.
7. Охарактеризуйте таутомерію азотистих основ.
8. Як визначити нуклеотидну послідовність ДНК?
9. Опишіть вторинну структуру ДНК та РНК.
10. Охарактеризуйте фізико-хімічні властивості нуклеїнових кислот.
11. Опишіть азотисті основи пуринового ряду: структуру та властивості.
12. Опишіть азотисті основи піримідинового ряду: структуру та властивості.
13. Охарактеризуйте вторинну структуру ДНК та РНК.
14. Що таке процес денатурації ДНК?
15. Опишіть мінорні основи нуклеїнових кислот.
16. Які якісні реакції на компоненти нуклеїнових кислот ви знаєте?
17. Опишіть види нуклеїнових кислот та їх локалізацію у клітині.
18. Охарактеризуйте третинну структуру ДНК та РНК.
19. Що таке макромолекулярна структура нуклеїнових кислот?
20. Охарактеризуйте структуру та біологічні функції циклічних нуклеотидів.

ЗАВДАННЯ ДО КОНТРОЛЬНОЇ ПЕРЕВІРКИ ЗНАНЬ :

Визначте компоненти запропонованих розчинів

Компоненти нуклеїнових кислот	Реакції	Розчин №1	Розчин №2
		Результат дослідження	Результат дослідження
Вуглеводний компонент			
Азотиста основа			
Неорганічний фосфор			
Висновок			

Рекомендована література

1. Пустовалова Л.М. Практикум по биохимии. – Ростов-на-Дону: Феникс, 1999. – 544 с.
2. Зіменковський Б.С., Музиченко В.П. Біоорганічна хімія. – Львів: Кварт, 2009. – 402 с.
3. Біологічна хімія: Лабораторний практикум / За заг. ред. проф. Я.І. Гонського. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2001. – 288 с.

4. Біологічна і біоорганічна хімія : у 2 кн. : підручник. Кн. 2. Біологічна хімія / Ю.І. Губський, І.В Ніженковська, М.М. Корда та ін. ; за ред. Ю.І. Губського, І.В. Ніженковської. – К. : ВСВ “Медицина”, 2016. – 544 с.
5. Карнаухов О.І., Мельничук Д.О., Чеботько К.О. Загальна та біоорганічна хімія. – Вінниця: Нова книга, 2003. – 544 с.
6. Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия. – Москва: Просвещение, 1987. – 815с.
7. Методические указания к лабораторным работам по биоорганической химии (Физико-химические свойства аминокислот, белков, нуклеиновых кислот) (Для студентов биологического факультета) / Авторы: А.В. Запорожченко, С.А. Петров, С.С. Чернадчук, З.Е. Захариева, Н.Л. Федорко, И.Л. Вовчук, А.В. Сорокин, А.К. Будняк. – Одесса: Принт-мастер, 2008. – 62 с.
8. Методические указания к лабораторным работам по биоорганической химии (Физико-химические свойства углеводов и липидов) (Для студентов биологического факультета) / Авторы: А.В. Запорожченко, С.А. Петров, С.С. Чернадчук, З.Е. Захариева, Н.Л. Федорко, И.Л. Вовчук, А.В. Сорокин, А.К. Будняк. – Одесса: Принт-мастер, 2008. – 64 с.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Біоорганічна хімія. Практикум : навч. посіб. / Л. І. Остапченко, І. В. Компанець, О. В. Скопенко та ін. – К. : ВПЦ "Київський університет", 2019. – 400 с.
2. Лабораторний практикум з курсу «Біоорганічна хімія» для студентів заочного відділення. Гребіник Д.М., Моргаєнко О.О., Скопенко О.В. - Київ, 2009 - 43 с.
3. Введение в биохимию. Аминокислоты. Белки: учебно-методическое пособие/ М.Г. Литвинова, К.И. Мелконян, под ред. И.М. Быкова. – Краснодар, ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, 2019. – 110 с.
4. Биохимия. Практикум : Учебное пособие по курсу «Медицинская биохимия» /Л. А. Ганеева, Л. И. Зайнуллин, З.И. Абрамова, Н. Х. Тенишева. — Казань : ИСБ, 2015. — 176 с.
5. Биологическая химия: Практикум / Под общ. Ред. Ю.В. Хмелевского. – К.:Вища школа., Головное изд-во, 1985. – 208 с.
6. Біологічна хімія: Лабораторний практикум / За заг. ред. проф. Я.І. Гонського. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2001. – 288 с.
7. Біохімія: Підручник / М.Є. Кучеренко та ін.. – К.: Либідь, 1995. – 464 с.

8. Горячковский А.И. Справочное пособие по клинической биохимии. - Одесса: ОКФА, 2005.- 616 с.
9. Пустовалова Л.М. Практикум по биохимии. – Ростов – на – Дону: Феникс, 1999. – 544 с.
10. Кучеренко Н. Е., Бабенюк Ю. Д., Васильев А. Н. Биохимия (практикум). - Киев.: Вища школа, 1988. - 128 с.
11. Шарпенак А. Э., Коньшев В. А. Практикум по биологической химии. Учебное пособие для медицинских институтов / -М. Высшая школа — 1969. – 304 с.
12. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. Учебник. – М.: Медицина, 1998. – 704 с.
13. Методичні вказівки до лабораторних робіт з курсу “Аналітична хімія та інструментальні методи аналізу” для студентів III курсу спеціальності «Хімічна технологія фармацевтичних препаратів» / Укл.: Т.О. Бубель, А.О. Гиренко, І.Д. Головка. – Дніпропетровськ: ДВНЗ УДХТУ, 2010. – 69 с.
14. Гиндуллина Т.М. Хроматографические методы анализа: учебно-методическое пособие /Т.М. Гиндуллина, Н.М. Дубова – Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2010. – 80 с.
15. Лабораторный практикум по биологической химии для студентов лечебного и педиатрического факультетов: Учебное пособие / О.А.Тимин, Е.А.Степовая, Т.С.Федорова, О.Л.Носарева, В.Ю.Серебров – Томск: Сибирский государственный медицинский университет, 2012 – 258 с.

Навчальне видання

Федорко Наталія Леонідівна, **Чернадчук** Сніжана Сергіївна, **Будняк**
Олександр Костянтинович, **Запорожченко** Олександр Вікторович,
Петров Сергій Анаталійович, **Сорокін** Андрій Вікторович

**МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ ДО ВИКОНАННЯ
ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ
З ХІМІЇ БІООРГАНІЧНОЇ**

**ЧАСТИНА І. ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ АМІНОКИСЛОТ,
БІЛКІВ, НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ**

для студентів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти
зі спеціальності 091 «Біологія», 014.05 «Середня освіта (Біологія та здоров'я
людини)

Оригінал-макет розроблено в авторській редакції

**Кафедра біохімії
Біологічний факультет
Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
Шампанський провулок 2, м. Одеса, 65058**