

Министерство образования и науки Российской Федерации
Государственное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
**«Владимирский государственный университет
имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых»**

Е. А. ЗАПРУДНОВА А. Г. ГЛАДИЛКИНА

ПРАКТИКУМ ПО БИОХИМИИ

Владимир 2011

УДК 577.1
ББК 28.072
З-30

Рецензенты:

Доктор медицинских наук, профессор
зав. кафедрой патофизиологии Московского государственного
медико-стоматологического университета (МГМСУ)

И. Ю. Малышев

Кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
отдела пищевой безопасности Федерального государственного
учреждения "Федеральный центр охраны здоровья
животных" (ФГУ "ВНИИЗЖ")

Н. Б. Шадрова

Печатается по решению редакционного совета
Владимирского государственного университета

Запруднова, Е.А. Практикум по биохимии / Е. А. Запруд-
З-30 нова, А. Г. Гладилкина ; Владим. гос. ун-т. – Владимир : Изд-во
Владим. гос. ун-та, 2011. – 56 с.
ISBN 978-5-9984-0123-7

Содержит теоретические сведения и практические указания к проведению лабораторного практикума по основным вопросам курса биохимии.

Предназначен для студентов третьего, четвертого курсов очной формы обучения направления 020200 – биология, изучающих дисциплину «Биохимия, в т.ч. большой практикум».

Рекомендован для формирования профессиональных компетенций в соответствии с ФГОС 3-го поколения.

УДК 577.1
ББК 28.072

ISBN 978-5-9984-0123-7

© Владимирский государственный
университет, 2011

ВВЕДЕНИЕ

Биологическая химия – это наука о качественном составе, количественном содержании и преобразованиях в жизненных процессах соединений, образующих живую материю.

Бурному развитию биохимии в последние десятилетия способствовало в первую очередь прогрессирующее применение в биохимических исследованиях новых физико-химических методов. Введение новых методических приемов каждый раз поднимает биохимическую науку на более высокую ступень познания закономерностей жизнедеятельности организмов, открывает новые уровни исследования живого. Последний период в развитии биохимии характеризуется широким применением скоростных методов анализа в сочетании с автоматическим контролем. Это в значительной мере облегчает и ускоряет выполнение научных программ. В практике биохимических работ применяется рентгеноструктурный анализ, электронная микроскопия, газовая, жидкостная, гелевая и капиллярная хроматография, метод меченых атомов, инфракрасная и ультрафиолетовая спектрофотометрия, флуоресцентный и полярографический анализ, электрофорез, метод молекулярных сит, масс-спектрометрия, ультрацентрифугирование, метод электронного парамагнитного резонанса, ядерного магнитного резонанса и др. Биохимия является фундаментом для решения многих вопросов в биологии, медицине, животноводстве, растениеводстве, промышленности микробиологического синтеза, пищевой промышленности и т.д.

Главная цель практикума – ознакомление с важнейшими принципами и методическими приемами экспериментальной биохимии. Особое внимание обращается на приобретение студентами навыков самостоятельной работы в биохимической лаборатории: умению рассчитать концентрации необходимых растворов, приготовить их и проверить правильность приготовления, а также освоению необходимых методов исследования. Постепенное, систематическое усвоение программы практикума, а также лекционных курсов обеспечивает фундаментальную теоретическую и практическую подготовку студентов, позволяющую им впоследствии самостоятельно работать в биохимических лабораториях самого различного профиля.

Следует отметить, что все биохимические процессы протекают в водной среде. Вещества, находящиеся в водном растворе, имеют водную оболочку, которая образуется в результате взаимодействия полярных молекул воды с заряженными группами макромолекул или ионов. Чем больше такая оболочка, тем лучше растворимо вещество. Человеческий организм в основном состоит из воды. Ее относительное содержание выше всего у новорожденных – 75 % общей массы тела. С возрастом оно постепенно уменьшается и составляет в период завершения роста 65 %, а у пожилых людей – всего лишь 55 %. Содержащаяся в организме вода распределена между несколькими жидкостными компартментами. В клетках находится 60 % ее общего количества, остальное – это внеклеточная вода в межклеточном пространстве и плазме крови, а также в составе трансцеллюлярной жидкости (в спинномозговом канале, камерах глаза, желудочно-кишечном тракте, экзокринных железах, почечных канальцах и молочных протоках). Необходимое содержание воды поддерживается за счет поступления ее извне с пищей (примерно 2 л в сутки); небольшое количество воды (0,3 л в сутки) образуется в процессе распада веществ. Нарушение водного баланса клеток организма приводит к тяжелым последствиям, вплоть до гибели клеток. Состав жидкости в компартментах организма регулируется за счет транспорта электролитов.

Таким образом, водный и электролитный балансы функционально неразделимы. Изучение молекул и процессов, влияющих на водный и электролитный балансы, изменений, возникающих в процессе метаболизма основных биоорганических веществ, – неотъемлемая часть биохимических исследований, способствующих выявлению наиболее благоприятных условий для выживаемости организмов. Следовательно, ознакомление с методами оценки функционального состояния организма способствует более широкому пониманию целей, задач и возможностей биохимии.

ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

Тема I. ИССЛЕДОВАНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

Белки относятся к высокомолекулярным соединениям; в их состав входит более 20 видов α -аминокислот, соединенных между собой пептидной связью (CO-NH). Плазма крови человека в норме содержит более 100 видов белков. Примерно 90 % общего белка составляют альбумин, иммуноглобулины, липопротеиды, фибриноген, трансферрин; другие белки присутствуют в плазме в небольших количествах.

Большинство специфических свойств белков зависит от химического строения и пространственной конфигурации макромолекул. Белки обладают гидрофильными свойствами, т.е. имеют большое сродство к воде, образуя с водой коллоидные растворы, отличающиеся неустойчивостью. Под влиянием разнообразных воздействий белки легко выпадают в осадок. На этом свойстве белковых растворов основаны различные осадочные пробы. Белки относятся к веществам, обладающим амфотерными свойствами, т.е. содержат кислые гидроксильные группы и основные аминогруппы, поэтому заряд их зависит от pH раствора, что важно учитывать при электрофоретическом разделении белков. В состав белков в среднем входит 16 % азота. В биологических жидкостях определяют общий белок, группы (фракции) белков, близкие по физическим и химическим свойствам, и индивидуальные белки.

Методы определения общего белка в биологических жидкостях основаны на различных принципах. *Азотометрические* – на определении содержащегося в нем азота; *весовые* (гравиметрические) – на высушивании белков до постоянной массы и последующем взвешивании на аналитических весах; *спектрофотометрические* – на определении поглощения при 280 нм; *фотометрические* – на измерении окрашенных продуктов реакции; *рефрактометрические* – на определении на рефрактометре коэффициента рефракции или преломления света. Наиболее распространены рефрактометрические и фотометрические методы.

Нами будут рассмотрены наиболее используемые в биохимии для

количественного определения белка 3 фотометрических метода: биуретовый, метод Лоури – Фолина и метод Брэдфорда, с помощью которых необходимо будет определить общую концентрацию белка в заранее приготовленном растворе.

Работа проводится с использованием спектрофотометра или фотоколориметра. В спектрофотометре видимый свет разлагается в спектр при помощи призмы или дифракционной решетки, а затем свет очень узкой области длин волн (монохроматический свет) проходит через исследуемый раствор. Поглощение света зависит от длины волны и от свойств раствора.

Коэффициент светопропускания (Т) согласно закону Ламберта – Бэра определяется соотношением

$$T = \frac{I}{I_0} \times 100 \%,$$

где I_0 – интенсивность падающего света;

I – интенсивность прошедшего через раствор света.

В качестве количественной характеристики поглощения света часто используют экстинкцию (Е) или оптическую плотность (А):

$$E = A = D = -\lg T = \lg \frac{I_0}{I}$$

Е прямо пропорциональна концентрации растворенного вещества (с):

$$E = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d,$$

где d – толщина слоя раствора, ε – коэффициент экстинкции (величина, постоянная для каждого вещества).

Линейная зависимость между экстинкцией, концентрацией и толщиной слоя раствора – закон Ламберта – Бэра.

Лабораторная работа № 1

Определение количественного содержания белка с помощью биуретового метода (Методика Горналла, Бардавилла и Дэвида)

Принцип метода. Белки в щелочной среде реагируют с сульфатом меди с образованием комплексных соединений, окрашенных в сине-фиолетовый или красно-фиолетовый цвет. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию белка в растворе.

Реактивы: биуретовый реагент готовят следующим образом: в 500 мл

воды растворяют 1,5 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 6 г смешанного тартрата натрия-калия (соль Роше $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). При интенсивном перемешивании добавляют 300 мл 10 % NaOH . Объем смеси доводят водой до 1 л.

Ход определения

Смешивают 4 мл биуретового реагента и 1 мл исследуемого раствора белка, выдерживают смесь при комнатной температуре в течение 30 мин. Определяют поглощение при длине волны между 540 и 560 нм. Концентрацию белка определяют с помощью градуировочного графика, построенного с использованием стандартного белка.

Построение градуировочного графика

1. Готовят основной раствор с концентрацией 10 мг/мл: 250 мг БСА (бычий сывороточный альбумин) растворить в 25 мл дистиллированной воды.

2. Готовят рабочий раствор с концентрацией белка 400 мкг/мл: к 1 мл основного раствора добавить 24 мл дистиллированной воды.

3. Готовят стандартные растворы для построения градуировочного графика согласно табл. 1.

Таблица 1

Рабочий раствор, мкл	Дистиллированная вода, мкл	Концентрация белка, мкг/мл
400	0	400
300	100	300
200	200	200
100	300	100
50	350	50

Лабораторная работа № 2

Определение количественного содержания белка с помощью метода Лоури – Фолина

Реактивы

Раствор А. 2 % раствор Na_2CO_3 в 0,1 М NaOH .

Раствор Б. 0,5 % раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1 % тартрате натрия (или калия).

Раствор В. Смешивают 50 мл раствора А с 1 мл раствора Б. Ежедневно готовят заново.

Раствор Г. Коммерческий реагент Фолина (хранить в холодильнике). Разбавить в 3 раза.

Ход определения

К 400 мкл раствора, содержащего белок, добавляют 2 мл раствора В, хорошо перемешивают и выдерживают в течение 10 мин или более при комнатной температуре. Быстро при постоянном перемешивании добавляют 200 мкл раствора Г. Выдерживают 30 мин, а затем определяют поглощение при 750 нм. Концентрацию белка определяют по градуировочному графику. Построение градуировочного графика описано в лаб. работе № 1.

Лабораторная работа № 3 **Определение количественного содержания белка с помощью метода Брэдфорда**

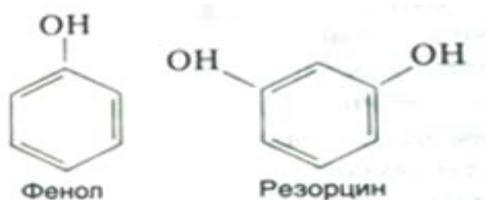
Реактивы: Кумасси бриллиантовый синий (100 мг) растворяют в 50 мл 95 % этанола. Добавляют 100 мл 85 % раствор фосфорной кислоты. Разбавляют водой до 1 л.

Ход определения

К 0,1 мл образца добавляют 1 мл раствора красителя, смешивают и определяют поглощение при 595 нм относительно чистого реагента. Концентрацию белка находят по градуировочному графику, построенному с помощью растворов белка. Построение градуировочного графика описано в лаб. работе № 1.

Контрольные вопросы и задачи

1. На чем основаны методы определения общего белка в биологических жидкостях?
2. Что позволяет определять спектрофотометр?
3. От чего зависит оптическая плотность раствора?
4. Что служит мономерами белков?
5. Белки клеток, находясь в водном растворе, приобретают конформацию, при которой большая часть гидрофобных радикалов ориентирована внутрь молекулы. Многие же антисептические средства содержат в своем составе гидрофобные группы:
 - а) объясните возможный механизм их бактерицидного действия;
 - б) сравните строение двух антисептических средств. Какой из препаратов лучше растворяется в воде?Какой из них должен оказывать более сильное бактерицидное действие?



6. Кератин, белок человеческого волоса, содержит около 12 % цистеина. Вычислите содержание серы в кератине.

Тема II. ВОДНЫЙ И ЭЛЕКТРОЛИТНЫЙ БАЛАНСЫ. ПАРАМЕТРЫ КИСЛОТНО-ОСНОВНОГО СОСТОЯНИЯ

В условиях равновесия осмотическое давление внутриклеточной и внеклеточной жидкостей одинаково. Однако концентрации в них отдельных электролитов заметно различаются (табл. 2 по П. Детьену).

Таблица 2

Электролиты	Плазма крови, моль/л	Внутриклеточная жидкость, ммоль/л
Na ⁺	142 (130 – 155)	10
K ⁺	4 (3,2 – 5,5)	155
Ca ²⁺	2,5 (2,1 – 2,9)	< 0,001 ¹⁾
Mg ²⁺	0,9 (0,7 – 1,5)	15
Cl ⁻	102 (96 – 110)	8
HCO ₃ ⁻	25 (23 – 28)	10
HPO ₄ ²⁻	1 (0,7 – 1,6)	65 ²⁾
SO ₄ ²⁻	0,5 (0,3 – 0,9)	10
Органические кислоты	4	2
Белки	2	6

¹⁾ Свободный Ca²⁺ в цитозоле.

²⁾ Включая органические фосфаты.

Благодаря непрерывной активности натриево-калиевой АТФазы в клеточной мембране ионы Na⁺, преобладающие во внеклеточной жидкости, внутри клетки присутствуют в низкой концентрации, а K⁺ – в высокой. Внутриклеточная концентрация магния, хотя и заметно ниже, чем K⁺, также значительна. Среди анионов Cl⁻ и HCO₃⁻ преобладают вне клетки, а ионы фосфата – внутри.

Как в плазме, так и в клетках, катионы и анионы находятся в равновесных концентрациях; соответственно положительные и отрицательные заряды взаимно компенсируются. Двухвалентные ионы и в еще большей степени поливалентные белки вносят значитель-

ный вклад в равновесие зарядов. При рН, характерном для жидкостей организма, белки находятся в форме полианионов в среднем с 10 отрицательными зарядами на молекулу. Различное распределение одно- и поливалентных электролитов приводит к тому, что плотность электрического заряда внутри клетки примерно на 20 % выше, чем во внеклеточной жидкости, хотя осмотические концентрации в обеих средах одинаковы.

Свободные ионы водорода связываются буферными системами: 40 % всех высвобождаемых протонов нейтрализует главная внеклеточная буферная система угольной кислоты и гидрокарбоната натрия, а 60 % – внутриклеточные буферные системы. Буферные системы – это первая защитная линия в противодействии тенденции роста концентрации протонов в клетках и во внутренней среде, который является фактором апоптоза и цитолиза. Для поддержания нормального кислотно-основного состояния необходимо выведение протонов из форм их временного связывания во внешнюю среду.

Кислотно-основное состояние характеризуют величины четырех его параметров:

- концентрация протонов во внеклеточной жидкости ($[H^+]$);
- содержание в ней бикарбонатного аниона ($[HCO_3^-]$);
- напряжение углекислого газа в артериальной крови (P_aCO_2);
- анионный пробел плазмы.

Число анионов всегда равно числу катионов как в клетках, так и во внеклеточной жидкости. Если из величины содержания во внеклеточной жидкости и жидкой части плазмы их главного одновалентного катиона ($[Na^+]$) вычесть общее содержание в них главных одновалентных анионов, хлоридного ($[Cl^-]$) и бикарбонатного ($[HCO_3^-]$), то мы получим значение анионного пробела плазмы (АПП).

Лабораторная работа № 4 **Исследование буферных систем**

Опыт 1. Приготовление буферных систем

Реактивы: 0,1 н. раствор CH_3COOH , 0,1 н. раствор CH_3COONa .

Ход работы

В 5 пробирок наливают различные объемы 0,1 н. раствора CH_3COOH и 0,1 н. раствора CH_3COONa согласно табл. 3:

Таблица 3

Номер пробирки	Количество, мл, 0,1 н. раствора		pH	
	CH ₃ COOH	CH ₃ COONa	практический	теоретический
1	0,5	9,5		
2	1,0	9,0		
3	5,0	5,0		
4	9,0	1,0		
5	9,5	0,5		

Измеряют pH приготовленных растворов и рассчитывают его теоретическое значение по формуле

$$pH = pK + \lg \frac{[\text{соль}]}{[\text{кислота}]}$$

где pK уксусной кислоты равно 4,7.

Опыт 2. Свойства буферных растворов

Реактивы: буферный раствор, 0,01 н. раствор HCl, 0,01 н. раствор NaOH, универсальный индикатор.

Ход работы

1. Влияние разбавления на pH буферных систем:

а) в 3 пробирки наливают по 1 мл буфера (pH одинаковый); во вторую пробирку добавляют 1 мл дистиллированной воды; в третью – 2 мл дистиллированной воды. Во все пробирки добавляют универсальный индикатор. Результаты заносят в табл. 4.

Таблица 4

Номер колбы	Количество, мл		Разбавление	Количество индикатора	Окраска
	буфера	воды			
1	1	–	–	1 капля	
2	1	1	в 2 раза	2 >>	
3	1	2	в 3 >>	3 >>	

Сделать вывод;

б) приготовить растворы согласно табл. 5 и измерить pH приготовленных растворов.

Таблица 5

Номер колбы	Количество, мл		Разбавление	pH
	буфера	воды		
1	10	10	в 2 раза	
2	2	18	в 10 >>	
3	1	99	в 100 >>	

Сделать вывод.

2. Действие небольших количеств сильных кислот и щелочей на рН буферных растворов

В 6 колб, содержащих буфер либо дистиллированную воду, добавить 0,01 н. раствора HCl или NaOH согласно табл. 6.

Таблица 6

Номер колбы	Количество, мл		0,01 н.		рН растворов
	буфера	воды	HCl	NaOH	
1	20	–	–	–	
2	20	–	1 мл	–	
3	20	–	–	1 мл	
4	–	20	–	–	
5	–	20	1 мл	–	
6	–	20	–	1 мл	

Определить рН приготовленных растворов и сделать вывод о влиянии кислот и щелочей на рН буферных систем.

Опыт 3. Определение буферной емкости сыворотки крови

Реактивы: буферный раствор (рН = 7,4), 0,1 н. раствор NaOH, фенолфталеин.

Ход работы

В первую пробирку налить 2 мл сыворотки крови, разведенной 1:10. Во вторую пробирку налить буферный раствор с рН = 7,4, разведенный 1:10. В обе пробирки добавить по 2 капли индикатора фенолфталеина. Содержимое пробирок 1 и 2 оттитровать 0,1 н. раствором NaOH до появления малиново-красного окрашивания.

Произвести расчет буферной емкости (В) сыворотки крови и буферного раствора согласно формуле

$$B = \frac{A \cdot 10 \cdot n}{(pH_1 - pH_0) \cdot 2}$$

где А – количество сильной щелочи, пошедшей на титрование (мл);

10 – разведение сыворотки (буфера);

рН₀ – водородный показатель содержимого пробирок до начала титрования (рН₀ = 7,4);

рН₁ – водородный показатель после окончания титрования (рН₁ = 9);

н – молярная масса эквивалента щелочи;

2 – объем взятой сыворотки (буфера).

Сравнить буферную емкость сыворотки крови и буферного раствора.

Лабораторная работа № 5

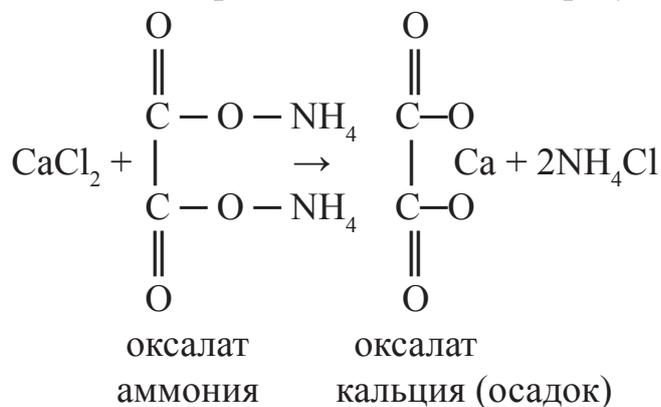
Количественное определение кальция в биологических жидкостях

Около 40% всего кальция плазмы крови связано с белком, еще примерно 5% образуют комплексы с лимонной, фосфорной или угольной кислотой, остальной кальций находится в физиологически активном, ионизированном состоянии. Как и калий, это внутриклеточный катион. Содержание его в плазме крови определяется балансом процессов всасывания, перераспределения между клеточным и неклеточным пространствами организма, выведения. Основным гормоном, регулирующим обмен кальция, считается гормон паращитовидных желез.

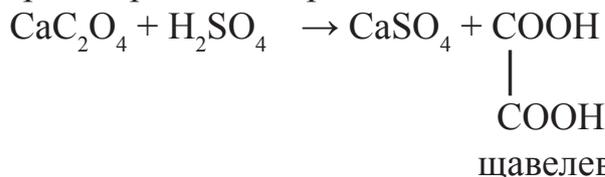
Опыт 1. Количественное определение кальция в сыворотке крови по методу Ваарда

Изменение содержания кальция в сыворотке крови служит диагностическим тестом при эндокринных и неврологических заболеваниях и болезнях, вызванных недостатком некоторых витаминов (например, витамина D). В норме содержание кальция в сыворотке крови человека составляет 9 – 11 мг %.

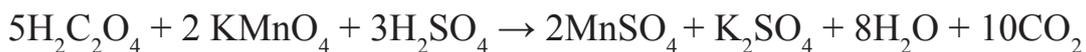
Принцип метода. Кальций, находящийся в сыворотке в виде водорастворимых солей, переводится в осадок в результате реакции:



Осадок растворяется в серной кислоте:



Освободившуюся щавелевую кислоту титруют раствором марганцевокислого калия:



Из приведенных уравнений следует, что по количеству марганцевокислого калия, пошедшего на окисление щавелевой кислоты, можно рассчитать исходное количество кальция.

Реактивы: 4 % раствор щавелевокислого аммония, 2 % раствор NH_4OH , 1 н. раствор H_2SO_4 , 0,01н. раствор KMnO_4 .

Ход работы

В одну центрифужную пробирку вносят 1 мл сыворотки крови (опытная проба), а в другую – 1 мл дистиллированной воды (контрольная проба). В обе пробирки добавляют по 1 мл 4 % раствора щавелевокислого аммония, пробы перемешивают, оставляют на 30 мин при комнатной температуре и центрифугируют со скоростью 3000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость сливают, в пробирки добавляют по 4 мл 2% раствора NH_4OH и содержимое перемешивают стеклянной палочкой. Пробы центрифугируют в течение 10 мин. Надосадочную жидкость сливают, в пробирки добавляют по 2 мл 1н. раствора H_2SO_4 и содержимое перемешивают стеклянной палочкой. Не вынимая палочки, пробирки погружают в кипящую водяную баню до растворения осадка. Раствор титруют, помешивая палочкой, 0,01н. раствором KMnO_4 до появления бледно-розового окрашивания, не исчезающего в течение 1 мин.

Содержимое кальция в сыворотке крови рассчитывают по уравнению

$$X = 0,2 (a - б) 100,$$

где X – содержимое кальция в сыворотке крови в мг%;

a – количество 0,01н. раствора KMnO_4 , пошедшее на титрование опытной пробы;

б – количество 0,01н. раствора KMnO_4 , пошедшее на титрование контрольной пробы;

0,2 – количество кальция (в мг), эквивалентное 1 мл 0,01н. раствора KMnO_4 , согласно уравнениям реакций.

Опыт 2. Определение концентрации кальция в биологических жидкостях колориметрическим методом (Арсеназо III)

Принцип метода. При взаимодействии ионов кальция в нейтральной среде с хромогеном Арсеназо III образуется окрашенный комплекс, имеющий максимумы поглощения при длинах волн 613 или 650 нм.

Исследуемый материал

Сыворотка или гепаринизированная плазма крови натошак. Не использовать в качестве антикоагулянтов оксалат, цитрат или ЭДТА!

Моча суточная. Собирать в емкость, содержащую 10 мл 6 моль/л HCl, или подкислить после сбора до pH 3 – 4 для растворения солей кальция. Образец перед анализом развести бидистиллированной водой в соотношении 1:1.

Реактивы

1. Монореагент, pH 6,0,
Натрий уксуснокислый – 100 ммоль/л;
Арсенazo III – 250 мкмоль/л.
2. Калибратор – 2,5 ммоль/л.

Ход работы

Компоненты реакционной смеси внести в пробирки в количествах, указанных в табл. 7.

Таблица 7

Компоненты, мкл	Проба		
	опытная	калибровочная	контрольная (холостая)
Монореагент	300	300	300
Исследуемый образец	3	–	–
Калибратор	–	3	–
Вода	–	–	3

Смешать и инкубировать 5 мин при температуре 18 – 25 °С. По окончании инкубации измерить оптическую плотность опытной и калибровочной проб против контрольной (холостой) пробы при длине волны 613 или 650 нм в кювете с толщиной поглощающего свет слоя 1 см. Окраска стабильна в течение 60 мин.

Расчет:

1. Сыворотка (плазма) крови:

$$C = 2,5 \frac{E_{\text{пробы}}}{E_{\text{калибратора}}} \text{ (ммоль/л)}.$$

2. Моча:

$$C = 5 \frac{E_{\text{пробы}}}{E_{\text{калибратора}}} \text{ (ммоль/л)}.$$

3. Суточная моча:

$$C = 5 \frac{E_{\text{пробы}}}{E_{\text{калибратора}}} \cdot V \text{ (ммоль/сутки)},$$

где V – объем суточной мочи, л.

Если концентрация кальция превышает 4,0 ммоль/л, развести образец в 2 раза бидистиллированной водой, повторить анализ и результат умножить на 2.

Референтные пределы

Сыворотка, плазма крови: 2,02 – 2,60 ммоль/л.

Суточная моча:

- отсутствие кальция в диете – 0,13 – 1,00 ммоль/сут;
- потребление кальция ниже среднего* уровня – 1,25 – 3,75 ммоль/сут;
- средний* уровень потребления кальция – 2,5 – 7,5 ммоль/сут.

Опыт 3. Определение кальция в биологических жидкостях с о-крезолфталейнкомплексом

Принцип метода: о-крезолфталейнкомплексон (КФК) образует с кальцием в щелочной среде комплекс красно-фиолетового цвета, интенсивность окраски которого при 575 нм пропорциональна концентрации кальция и измеряется фотометрически при длине волны 575 нм (560 – 580 нм). В реакционную смесь добавляют 8-оксихинолин, который связывает металлы, мешающие определению кальция (в частности, магний), и образует с кальцием менее прочный комплекс, чем КФК.

Реактивы

1. Буфер (аминометилпропанол 0,5 моль/л).
2. Хромоген (0,16 ммоль/л КФК, 6,9 ммоль ОХ).
3. Калибровочный раствор кальция (2,5 ммоль/л).
4. Раствор ЭДТА (150 ммоль/л).

Нормальные величины концентрации кальция составляют:

- для сыворотки крови и плазмы крови 2 – 2,6 ммоль/л;
- для мочи не более 2,5 – 6,2 ммоль/сут.

Исследуемый материал:

Сыворотка крови, плазма крови, отобранная на гепарине, моча.

Недопустимо использовать плазму крови, отобранной на цитрате, оксалате, ЭДТА.

Ход работы

Для единичных определений все растворы готовы к употреблению. Для большого количества определений первоначально готовят рабочий раствор.

Рабочий раствор. Смешивают по одному объему Буфера и Хромо-

* Средний уровень потребления кальция – 20 ммоль/сут

гена с двумя объемами дистиллированной воды из расчета, что на один анализ необходимо 4,0 мл рабочего раствора. Рабочий раствор можно хранить в плотно закупоренной пластиковой посуде в темном месте при температуре +2...+8 °С не более 7 сут или при температуре +15...+25 °С не более 2 сут.

1. Для единичных определений

Компоненты реакционной смеси внести в пробирки в количествах, указанных в табл 8.

Таблица 8

Компонент, мл	Проба		
	опытная	калибровочная	контрольная (холостая)
Сыворотка (плазма) крови, моча	0,02	–	–
Калибровочный раствор кальция	–	0,02	–
Буфер	0,50	0,50	0,50
Хромоген	0,50	0,50	0,50
Вода дистиллированная	1,00	1,00	1,02

Содержимое пробирок тщательно перемешать, инкубировать при комнатной температуре (+18...+25 °С) в течение 5 мин, после чего измерить величину оптической плотности калибровочной и опытной проб против контрольной (холостой) пробы при длине волны 575 (560 – 580) нм в кювете с толщиной поглощающего свет слоя 10 или 5 мм. Окраска устойчива в течение 1 ч. Концентрацию кальция рассчитать по формуле

$$C = \frac{E_o}{E_k} 2,5,$$

где С – концентрация кальция в опытной пробе, ммоль/л;

E_o – оптическая плотность опытной пробы, ед.опт.плотн.;

E_k – оптическая плотность калибровочной пробы, ед.опт.плотн.;

2,5 – концентрация кальция в калибровочном растворе, ммоль/л.

2. Для большого количества определений

Компоненты реакционной смеси внести в пробирки в количествах, указанных в табл. 9. Далее определение провести так, как это указано для единичных определений. Концентрацию кальция в пробе рассчитать по той же формуле.

Таблица 9

Компонент, мл	Проба		
	опытная	калибровочная	контрольная (холостая)
Сыворотка(плазма) крови, моча	0,02	–	–
Калибровочный раствор кальция	–	0,02	–
Рабочий раствор	2,00	2,00	2,00

При получении значений концентрации кальция выше 3,75 ммоль/л, анализируемый образец необходимо развести дистиллированной водой в соотношении 1:1, повторить анализ и полученный результат умножить на 2.

Опыт 4. Определение кальция в сыворотке крови титриметрическим методом с применением мурексида

Реактивы

1. Раствор комплексобразователя: 0,665 г ЭДТА (комплексона III) количественно полностью растворяют в 1 л дистиллированной воды.
2. 9 н. раствор гидроксида натрия: 36 г NaOH растворяют в 100 мл дистиллированной воды.
3. Мурексид, смешанный с NaCl в соотношении 1:50, истертый в тонкий порошок. Тереть в ступке 20 – 30 мин до пылеобразного состояния.

Ход работы

В коническую колбу вносят 50 мл дистиллированной воды, 0,4 мл 9 н. раствора NaOH и добавляют на кончике ножа несколько крупинок мурексида. Тотчас появляется бледно-сиреневая окраска, обусловленная цветом самого индикатора.

Объем пробы делят пополам. Одна часть раствора служит эталоном окраски мурексида, другая – для постановки опытной пробы. К ней добавляют 1 мл сыворотки крови, что приводит к появлению бледно-розового окрашивания, обусловленного образованием кальций-мурексидного комплекса. Раствор немедленно титруют ЭДТА до возвращения к прежней окраске индикатора. Установление конца титрования облегчается сопоставлением окраски контрольной и опытной пробы.

Расчет ведут по формуле

$$C, \text{ мг}\% = 7,2 \cdot V,$$

где V – количество мл, пошедшего на титрование комплексообразователя.

Для выражения результатов в мэкв/л найденную величину делят на 2.

Нормальные величины концентрации кальция в сыворотке крови составляют 9 – 12 мг% или 4,5 – 6 мэкв/л.

Лабораторная работа № 6

Количественное определение калия в биологических жидкостях

Калий – основной внутриклеточный катион. Во внеклеточной жидкости его содержание невелико. В плазме крови практически здоровых людей концентрация калия составляет 3,6 – 5,4 ммоль/л. Снижение ее до уровня менее 3,5 ммоль/л приводит к тяжелым нарушениям в организме человека: слабости мышц, появлению вялых параличей, прекращению сокращения (перистальтики) кишечника, вздутию живота. Увеличение уровня калия в плазме свыше 5,6 ммоль/л сопровождается ощущением «ползания мурашек», «одеревенения конечностей», нарушением ритма сердца. Может наступить остановка деятельности сердца, а также произойти паралич дыхательных мышц.

Опыт 1. Определение концентрации калия в сыворотке или плазме крови турбидиметрическим методом без депротеинизации

Принцип метода. При взаимодействии ионов калия с ионами тетрафенилбората в щелочной среде образуется стабильная суспензия. Оптическая плотность суспензии, измеренная при длине волны 578 нм, пропорциональна концентрации ионов калия в исследуемом образце.

Исследуемый материал

Сыворотка или гепаринизированная плазма крови. Гемолиз недопустим. Хранение – не более 8 ч при температуре 2 – 8 °С.

Реактивы

1. Монореагент:

тетрафенилборат натрия – 35 ммоль/л;

натрий едкий – 200 ммоль/л.

2. Калибратор – 5 ммоль/л.

Ход работы

Компоненты реакционной смеси внести в пробирки в количествах, указанных в табл 10.

Таблица 10

Компонент, мкл	Проба		
	опытная	калибровочная	контрольная (холостая)
Монореагент	400	400	400
Исследуемый образец	10	–	–
Калибратор	–	10	–
Вода	–	–	10

Смешать и инкубировать 10 мин при температуре 37 °С. По окончании инкубации измерить оптическую плотность опытной и калибровочной проб против контрольной (холостой) пробы при длине волны 578 нм в кювете с толщиной поглощающего свет слоя 1 см.

Расчет

$$C = 5 \frac{E_{\text{пробы}}}{E_{\text{калибратора}}} \text{ (ммоль/л)}.$$

Референтные пределы:

новорожденные – 3,7 – 5,9 ммоль/л;

дети – 3,4 – 4,7 ммоль/л;

взрослые – 3,5 – 5,1 ммоль/л.

Опыт 2. Определение калия в биологических жидкостях

Реактивы

1. 5% раствор ацетата натрия.
2. Смесь растворов ацетатов меди и свинца: отвешивают в колбу 7,5 г кристаллического ацетат меди и 2 г кристаллического ацетата свинца. Добавляют 150 мл дистиллированной воды, смесь нагревают до кипения и после охлаждения фильтруют.
3. Кристаллический нитрит натрия.
4. Нитрит натрия в растворе ацетатов свинца и меди: к 2 мл реактива 2 добавляют 250 мг нитрита натрия.
5. 5 % раствор риванола.
6. Ледяная уксусная кислота.

Ход работы

В центрифужную пробирку вносят 0,5 мл раствора ацетата натрия (реактив 1), 0,1 мл исследуемой биологической жидкости и 0,5 мл реактива 4. Содержимое пробирки хорошо перемешивают стеклянной палочкой, потирая ее о внутренние стенки пробирки в течение 5 мин, оставляют на 1 ч. После центрифугируют 10 мин при 1500 об/мин.

Совершенно прозрачную надосадочную жидкость сливают, а в пробирку добавляют 1 мл реактива 1. Перемешивают стеклянной палочкой, центрифугируют и тщательно сливают надосадочную жидкость.

Аналогичное промывание реактивом 1 повторяют еще несколько раз, пока он не станет совершенно белым, без голубизны. Затем к осадку добавляют 1 мл раствора риванола и 2 мл ледяной уксусной кислоты. Смесь перемешивают и, добавляя дистиллированную воду, переносят в мерную колбу на 25 мл, доводя до метки. Хорошо перемешивают и колориметрируют против воды при $\lambda = 540$ нм в кювете с толщиной поглощающего свет слоя 10 мм.

Расчет:

$$C \text{ (мг\%)} = E \cdot 36,$$

где E – показатель экстинкции;

36 – постоянный коэффициент;

C – концентрация калия в биологической жидкости.

Нормальные величины концентрации калия в сыворотке крови составляют 14 – 24 мг% или 3,8 – 6,2 мэкв/л

В моче концентрация может достигать 80 – 100 ммоль/л.

Лабораторная работа № 7

Количественное определение фосфора в биологических жидкостях

Содержание фосфора неорганического в циркулирующей плазме зависит от функции паращитовидных желез, потребления витамина D (оказывающих влияние на всасывание фосфора через слизистую оболочку кишечника), а также функции почек, процессов обмена веществ в костной ткани, характера питания. Неорганический фосфор биологических жидкостей входит в состав солей фосфорной кислоты. Основное назначение солей фосфорной кислоты в биологических жидкостях и, в первую очередь, в крови – создание в них буферной системы. Довольно часто в диагностических целях в клинических лабораториях определяют в крови пациентов содержание неорганического фосфора. В норме в крови содержание неорганического фосфора составляет 2,5 – 5 мг%.

Опыт 1. Определение неорганического фосфора в крови

Принцип метода. Неорганический фосфат взаимодействует с молибдатом аммония в присутствии восстановителей (например, гидрохинона и сернистокислового натрия) с образованием окрашенного комплексного соединения (молибденовой сини). Интенсивность окраски раствора пропорциональна концентрации неорганического фосфата.

Реактивы: 20 % раствор трихлоруксусной кислоты, молибденовый реактив (молибдат аммония), 1 % раствор гидрохинона, карбонатсульфитный раствор; стандартные растворы фосфора, содержащие соответственно 5, 10, 15, 20 и 25 мкг/мл.

Ход работы

1. Построение калибровочной кривой:

а) в пять пробирок вносят по 1 мл стандартного раствора фосфора, содержащего соответственно 5, 10, 15, 20 и 25 мкг/мл. В контрольную пробирку вносят по 1 мл дистиллированной воды;

б) во все пробы добавляют по 4 мл дистиллированной воды, 0,5 мл 20 % раствора трихлоруксусной кислоты, 0,5 мл молибденового реактива и 0,5 мл 1 % раствора гидрохинона. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и оставляют на 5 мин, после чего во все пробы добавляют по 2 мл карбонатсульфитного раствора и по 1,5 мл дистиллированной воды; перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 10 мин. Пробы колориметрируют с зеленым светофильтром в кюветах с толщиной слоя 10 мм против контрольной пробы.

2. Определение фосфора в крови

В центрифужную пробирку вносят 3 мл дистиллированной воды, 1 мл крови и 1 мл 20 % раствора трихлоруксусной кислоты, смесь перемешивают и оставляют на 10 мин (для осаждения белков). Затем пробы центрифугируют 5 мин при 1500 об/мин и 1 мл надосадочной жидкости отбирают в другую пробирку. Для приготовления контрольной пробы в другую пробирку вносят 1 мл дистиллированной воды. Далее в обе пробирки приливают реактивы в той же последовательности, как описано в пункте *б* при построении калибровочной кривой.

Расчет: концентрацию фосфора в пробе определяют по калибровочной кривой и рассчитывают его содержание в крови в мг% по формуле

$$X = (A \cdot 5 \cdot 100) / 1000 = A / 2 \text{ (мг\%)},$$

где *A* – количество фосфора в пробе, определенное по калибровочной кривой;

А 5 – количество фосфора в 1 мл крови;
100 – для пересчета количества фосфора в 100 мл крови;
1000 – для перевода мкг в мг.

Опыт 2. Определение концентрации неорганического фосфора в сыворотке крови UV- методом без депротеинизации

Принцип метода. При взаимодействии неорганического фосфора с молибдатом аммония в растворе серной кислоты образуется фосфомолибдатный комплекс, что приводит к увеличению абсорбции, измеряемой при длине волны 340 нм.

Исследуемый материал:

Сыворотка крови натошак. Использование гемолизированных и липемичных образцов недопустимо.

Реактивы

1. Молибденовый реагент (конечные концентрации в тесте):

Аммоний молибдат – 1,5 ммоль/л; H_2SO_4 – 340 ммоль/л.

2. Детергент (конечная концентрация в тесте):

Полисорбат 20 – 100 мг/л.

3. Калибратор – 1,615 ммоль/л.

Ход работы

Приготовление рабочего реагента

Смешать молибденовый реагент и детергент в соотношении 100 : 1. Рабочий реагент стабилен не менее 14 дней при температуре хранения 18 – 25 °С.

Компоненты реакционной смеси внести в пробирки в количествах, указанных в табл. 11.

Таблица 11

Компонент, мкл	Проба		
	опытная	калибровочная	контрольная (холостая)
Рабочий реагент	300	300	300
Сыворотка крови	3	–	–
Калибратор	–	3	–
Вода	–	–	3

Смешать и инкубировать 5 мин при температуре 18 – 25 °С. По окончании инкубации измерить оптическую плотность опытной и калибровочной проб против контрольной (холостой) пробы при $\lambda = 340$ нм и $d = 1$ см. Окраска стабильна в течение 60 мин.

Расчет:

$$C = 1,615 \frac{E_{\text{пробы}}}{E_{\text{калибратора}}} \text{ (ммоль/л)}.$$

Референтные пределы: 0,87 – 1,45 ммоль/л.

Опыт 3. Определение неорганического фосфора в биологических жидкостях по реакции с малахитовым зеленым

Принцип метода

Реактив для определения неорганического фосфора («Краситель») включает в себя молибдат аммония, краситель малахитовый зеленый и соляную кислоту. Неорганический фосфор образует с молибденовой кислотой фосфорно-молибденовую кислоту, которая реагирует с малахитовым зеленым с образованием комплекса зеленого цвета, стабилизированного в растворе наличием детергента. Оптическая плотность комплекса при 630 нм пропорциональна концентрации неорганического фосфора в образце.

Белки не мешают проведению реакции, поэтому депротеинизацию не проводят.

Реактивы

1. Детергент.

2. Краситель (молибдат аммония, малахитовый зеленый, соляная кислота): 1,5 г малахитового зеленого растворяют в 250 мл H_2O , одновременно растворяют 10,3 г молибденовокислого аммония в 250 мл 5 н. HCl . Оба раствора смешивают, дают отстояться и фильтруют, за это время цвет реактива меняется.

3. Калибровочный раствор фосфора (3 ммоль/л).

Нормальные величины концентрации неорганического фосфора:

– в сыворотке и плазме крови 0,8 – 1,6 ммоль/л;

– в моче 25 – 48 ммоль/сут.

Исследуемый материал

Негемолизированная сыворотка или плазма крови, моча.

Ход работы

К 20 мкл сыворотки приливают 2 мл раствора детергента, затем 2 мл красителя, тщательно перемешивают и через 10 мин определяют оптическую плотность при длине волны 630 нм (600 – 650 нм, красный светофильтр) против холостой пробы (без добавления сыворотки) в кювете

с толщиной слоя 1 или 0,5 см. Окраска устойчива в течение 2 ч. Расчет проводят по калибровочному графику.

Построение калибровочного графика

Для построения калибровочного графика из калибровочного раствора фосфора и дистиллированной воды готовят следующие разведения (табл. 12):

Таблица 12

Номер пробирки	Калибровочный раствор фосфора, мл	Дистиллированная вода, мл	Концентрация фосфора, ммоль/л
1	0,50	2,50	0,50
2	0,50	1,00	1,00
3	0,50	0,50	1,50
4	0,50	0	3,00

Полученные разведения обрабатывают так же, как и образец.

Примечание. При использовании кюветы меньшего объема расход реактивов может быть пропорционально уменьшен.

Во флаконе с красителем в процессе хранения допускается выпадение небольшого количества темного осадка, не влияющего на результаты анализа. Перед применением дать отстояться.

Образец мочи перед определением разводят в 10 – 20 раз дистиллированной водой, полученный результат умножают на разведение.

Лабораторная работа № 8 **Количественное определение хлоридов** **в биологических жидкостях**

Хлор, как и натрий, – внеклеточный элемент. На долю хлора приходится лишь 2/3 общего количества анионов внеклеточных жидкостей. Содержание ионов хлора в плазме крови здоровых людей колеблется в пределах 95 – 110 ммоль/л. Снижение их уровня наблюдается при образовании отеков, скоплении жидкости в полостях, избыточном потоотделении, поносе и др. Увеличение содержания ионов хлора в плазме происходит при обезвоживании, вызванном недостаточным поступлением в организм жидкости, глубоким расстройстве сердечной деятельности и некоторых других состояниях. В норме около 90 % потребляемых хлоридов выводится с мочой (в сутки 8 – 15 г).

Опыт 1. Определение концентрации хлоридов в биологических жидкостях колориметрическим методом без депротеинизации

Принцип метода. В присутствии ионов хлора в кислой среде меркуриотиоцианат образует тиоцианат-ионы, которые при взаимодействии с ионами трехвалентного железа и азотной кислотой формируют окрашенный комплекс, имеющий максимум поглощения при длине волны 540 нм.

Исследуемый материал

1. Сыворотка или гепаринизированная плазма крови. Гемолиз недопустим.

2. Моча суточная. Перед анализом развести дистиллированной водой в 2 раза.

Реактивы

1. Железо азотнокислое: $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ – 40 ммоль/л.

2. Меркуриотиоцианат: $\text{Hg}(\text{SCN})_2$ – 2 ммоль/л.

3. Калибратор – 100 ммоль/л.

Ход работы

Приготовление рабочего реагента

Смешать раствор железа азотнокислого и меркуриотиоцианата в соотношении 9:1. Рабочий реагент стабилен не менее двух лет при температуре хранения 18 – 25 °С в темноте. *Не допускать замораживания!*

Компоненты реакционной смеси внести в пробирки в количествах, указанных в табл 13.

Таблица 13

Компонент, мкл	Проба		
	опытная	калибровочная	контрольная (холостая)
Монореагент	350	350	350
Сыворотка крови	3	–	–
Калибратор	–	3	–
Вода	–	–	3

Смешать и инкубировать 5 мин при температуре 18 – 25 °С. По окончании инкубации измерить оптическую плотность опытной и калибровочной проб против контрольной (холостой) пробы при $\lambda = 540 \times (500 - 560)$ нм и $d = 1$ см. Окраска стабильна в течение 60 мин.

Расчет:

1. Сыворотка (плазма) крови:

$$C = 100 \frac{E_{\text{пробы}}}{E_{\text{калибратора}}} \text{ (ммоль/л).}$$

2. Моча суточная:

$$C = 200 \frac{E_{\text{пробы}}}{E_{\text{калибратора}}} V \text{ (ммоль/сутки)},$$

где V – объем суточной мочи, л.

Референтные пределы: сыворотка/плазма: 97 – 108 ммоль/л;
суточная моча: 110 – 250 ммоль/сутки.

Контрольные вопросы по теме

1. Каково соотношение катионов и анионов во внутриклеточной и внеклеточной жидкостях?

2. Перечислите основные параметры кислотно-основного состояния.

3. Какие системы органов участвуют в поддержании кислотно-основного состояния организма?

4. Перечислите основные буферные системы крови.

5*. Причины и патогенез гипонатриемии как патологического состояния, обусловленного сахарным диабетом, составляют:

- 1) выход воды во внеклеточный сектор из миоцитов скелетных мышц в сторону большей осмотической концентрации глюкозы;
- 2) снижение водного диуреза, связанное с диабетической нефропатией;
- 3) отек нейронов головного мозга;
- 4) рост осмоляльности внеклеточной жидкости из-за низкого вхождения в клетку и утилизации как субстратов анаболизма аминокислот (следствие инсулинопении);
- 5) осмотический диурез.

6*. Основные компенсаторные реакции в ответ на метаболический ацидоз:

- 1) увеличение экскреции углекислого газа через рост минутного объема дыхания;
- 2) рост экскреции протонов почками с мочой в виде аммониевого катиона для усиления образования бикарбонатного аниона почками;
- 3) рост секреции антидиуретического гормона для снижения водного диуреза и разведения протонов во внеклеточном секторе и клетках свободной водой.

* Выберите правильный ответ.

Тема III. ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ

Лабораторная работа № 9 **Исследование мочи**

Возможность уточнения клинического диагноза путем исследования мочи основывается на том, что с нею из организма выводятся многочисленные биологически важные соединения и продукты их превращения. Выявление и количественное определение в моче отдельных ее компонентов способствуют распознаванию многих заболеваний. Анализ мочи необходим, прежде всего, для того, чтобы установить характерные для болезни отклонения в процессах обмена веществ и на основании этого облегчить постановку правильного клинического диагноза.

Практически здоровые взрослые люди в течение суток выделяют с мочой от 0,6 до 2,0 л жидкости.

Опыт 1. Цвет

Нормальная моча окрашена в более или менее насыщенный желтый цвет (от соломенного до янтарно-желтого). Окраска мочи может меняться при приеме лекарственных препаратов (ревеня, амидопиринна, салицилатов и др.) или употреблении некоторых пищевых продуктов (свеклы, черники). Патологически измененная окраска мочи бывает при гематурии (вид мясных помоев), билирубинурии (оранжево-красный цвет).

Опыт 2. Прозрачность

В нормальной моче все составные части находятся в растворе, поэтому свежесобранная моча совершенно прозрачна. Если моча оказывается мутной в момент выделения, то это обусловлено наличием в ней большого количества клеточных образований, солей, бактерий, жира. Ориентировочно установить причину помутнения можно следующим образом: если при нагревании 4 – 5 мл мочи в пробирке она становится прозрачной, то помутнение было вызвано мочеислыми солями (уратами); если степень помутнения после нагревания не изменяется, то к моче прибавляют 10 – 15 капель уксусной кислоты, полное или даже частичное исчезновение мути после этого говорит о том, что она была вызвана фосфатами. Полная прозрачность мочи может не достигаться потому, что в таких случаях обычно имеется щелочная моча, находящаяся в процессе

разложения, которая содержит микробы и клеточные элементы. Помутнение, исчезающее при добавлении HCl , вызвано оксалатом кальция. Муть, обусловленная присутствием жира, исчезает при взбалтывании мочи со смесью эфира и спирта. Если моча остается мутной, несмотря на все эти процедуры, то муть, по всей вероятности, вызвана микробами, что распознается при микроскопическом исследовании.

Опыт 3. Реакция мочи

Определение рН при помощи лакмусовой бумаги следует проводить одновременно двумя ее видами: синей и красной.

Результаты:

1) синяя лакмусовая бумага краснеет, красная не изменяет своего цвета – кислая реакция; 2) красная лакмусовая бумага синееет, синяя не изменяет своего цвета – щелочная реакция; 3) оба вида бумаги не меняют своего цвета – нейтральная реакция.

Выпускаемая в нашей стране универсальная индикаторная бумага дает возможность определить рН (значения даны с интервалом 1,0 в широком диапазоне – от 1,0 до 10,0). Кроме того, некоторыми фирмами выпускаются специальные виды индикаторной бумаги, предназначенные для определения рН мочи (диапазон значений рН 5,0 – 8,0), или комбинированные экспресс-тесты, которые включают, кроме определения величины рН, несколько других показателей.

Нормальные величины. Моча здоровых взрослых людей при обычном питании имеет средние значения рН $6,25 \pm 0,36$ (от 5,0 до 7,0). Колебания рН мочи обусловлены составом питания; мясная диета обуславливает кислую реакцию мочи, растительная диета – щелочную.

Клиническое значение. В норме при смешанной пище в организме образуются главным образом кислые продукты обмена. Основания попадают в организм при приеме щелочных лекарств и с пищей, богатой основаниями (овощи, фрукты, молочные продукты). Излишнее количество бикарбонатов выводится почками, при этом моча становится щелочной.

Органические кислоты и кислые соли неорганических кислот, содержащиеся в моче, диссоциируют в водной среде, выделяя известное количество свободных H^+ . Концентрация (активность) свободных H^+ -ионов представляет истинную реакцию мочи – активную кислотность (рН).

Щелочность мочи увеличивается при рвоте, особенно при высокой кислотности желудочного сока, ощелачивающей терапии, хронической

инфекции мочевыводящих путей. Кислотность увеличивается при сахарном диабете, туберкулезе почек, почечной недостаточности. Изменение рН мочи соответствует изменениям рН крови; при ацидозах моча имеет кислую реакцию, при алкалозах – щелочную. Однако иногда наблюдается расхождение этих показателей. При хронических поражениях канальцевого аппарата почек (туберкулопатиях) в крови отмечается картина гиперхлоремического ацидоза, а реакция мочи щелочная, что связано с нарушением синтеза кислоты и аммиака в связи с поражением канальцев.

При гипокалиемическом алкалозе наблюдается ацидурия. Недостаток калия увеличивает секрецию H^+ -ионов канальцами. В данной ситуации – это физиологический ответ почечных канальцев, направленный на поддержание ионного равновесия между клетками и межтканевой жидкостью. Таким образом, определение рН мочи может иметь значение при дифференциальной диагностике алкалоза и ацидоза разной этиологии.

Опыт 4. Определение белка

Унифицированная проба с сульфосалициловой кислотой

Реактив: 20 % раствор сульфосалициловой кислоты.

Ход определения

В 2 пробирки наливают по 3 мл профильтрованной мочи. В опытную пробирку прибавляют 6 – 8 капель реактива. На темном фоне сравнивают контрольную пробирку с опытной. Помутнение в опытной пробирке указывает на наличие белка, пробу считают положительной.

Примечание. Если реакция мочи щелочная, то перед исследованием ее подкисляют 2 – 3 каплями 10 % раствора уксусной кислоты.

Унифицированный метод Брандберга – Робертса – Стольниковой

Принцип метода. В основу положена кольцевая проба Геллера, заключающаяся в том, что на границе азотной кислоты и мочи при наличии белка происходит его коагуляция и появляется белое кольцо.

Реактивы: 30 % раствор азотной кислоты (относительная плотность 1,2) или реактив Ларионовой. Приготовление реактива Ларионовой: 20 – 30 г хлорида натрия растворяют при нагревании в 100 мл дистиллированной воды, дают остыть, фильтруют. К 99 мл фильтрата приливают 1 мл концентрированной азотной кислоты.

Ход определения

В пробирку наливают 1 – 2 мл азотной кислоты (или реактива Ларионовой) и осторожно, по стенке пробирки, наслаивают такое же количе-

ство профильтрованной мочи. Появление тонкого белого кольца на границе двух жидкостей между 2-й и 3-й мин указывает на наличие белка в концентрации примерно 0,033 г/л. Если кольцо появляется раньше 2 мин после наслаивания, мочу следует развести водой и провести повторное наслаивание уже разведенной мочи. Степень разведения мочи подбирают в зависимости от вида кольца, т. е. его ширины, компактности и времени появления. При нитевидном кольце, появившемся ранее 2 мин, мочу разводят в 2 раза, при широком – в 4 раза, при компактном – в 8 раз и т. д. Концентрацию белка при этом вычисляют путем умножения 0,033 на степень разведения и выражают в граммах на 1 л (г/л).

Примечание. Иногда белое кольцо получается при наличии больших количеств уратов. В отличие от белкового кольца уратное появляется немного выше границы между двумя жидкостями и растворяется при легком нагревании.

Биуретовый метод

Принцип метода. Пептидные связи белка с солями меди в щелочной среде образуют комплекс фиолетового цвета. Белки предварительно осаждают трихлоруксусной кислотой.

Реактивы: 10 % раствор трихлоруксусной кислоты, 20 % раствор меди ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 3 % раствор NaOH.

Ход определения

К 5 мл мочи прибавляют 3 мл раствора трихлоруксусной кислоты, центрифугируют до постоянного объема осадка. Надосадочную жидкость отсасывают пипеткой, осадок затем растворяют в 5 мл раствора NaOH. К раствору добавляют 0,25 мл CuSO_4 , смесь перемешивают и центрифугируют. Надосадочную жидкость фотометрируют при длине волны 540 нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм против дистиллированной воды. Концентрацию белка рассчитывают по калибровочной кривой.

Нормальное значение. Небольшое количество белка в суточной моче обнаруживается и у вполне здоровых лиц, однако такие небольшие концентрации не выявляют в разовых порциях используемыми в настоящее время методами.

Опыт 5. Определение глюкозы

Проба Гайнеса

Принцип метода основан на способности глюкозы восстанавливать в щелочной среде при нагревании гидрат окиси меди (синего цвета) в

гидрат закиси меди (желтого цвета) и закись меди (красного цвета). Для того чтобы из гидрата окиси меди при нагревании не образовался чёрный осадок окиси меди, к реактиву добавляют глицерин, гидроксильные группы которого связывают гидрат окиси меди.

Реактивы. Реактив Гайнеса: 1) 13,3 г кристаллического сульфата меди ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) растворяют в 400 мл дистиллированной воды; 2) 50 г едкого натра растворяют в 400 мл дистиллированной воды; 3) 15 г глицерина растворяют в 200 мл дистиллированной воды. Смешивают растворы 1 и 2 и тотчас же приливают раствор 3. Реактив стоек.

Ход исследования

К 6 – 8 мл мочи прибавляют 20 капель реактива до появления голубоватой окраски, смешивают и нагревают верхнюю часть пробирки до начала кипения. Нижняя часть пробирки – контроль. При наличии глюкозы в моче появляется желтая окраска в верхней части пробирки.

Опыт 6. Определение кетоновых тел

Унифицированная проба Ланге

Принцип метода. Нитропруссид натрия в щелочной среде реагирует с кетоновыми телами (ацетоуксусной кислотой, β -гидроксимасляной кислотой и ацетоном) с образованием комплекса красно-фиолетового цвета.

Реактивы: натрия нитропруссид, раствор 50 г/л, готовят перед употреблением; уксусная кислота концентрированная; аммиак водный (NH_4OH) – 25 % раствор.

Ход определения

В пробирку к 3 – 5 мл мочи приливают 5 – 10 капель раствора натрия нитропрussa и 0,5 мл уксусной кислоты, смешивают, а затем осторожно по стенке пробирки пипеткой наслаивают 2 – 3 мл водного раствора аммиака. Пробу считают положительной, если в течение 3 мин на границе сред образуется красно-фиолетовое кольцо.

Модифицированная проба Ротеры

Принцип метода тот же, что и в пробе Ланге.

Реактивы: натрия нитропруссид, раствор 50 г/л, готовят перед употреблением; сульфат аммония; аммиак водный (NH_4OH) – 25 % раствор.

Ход определения

Приблизительно 200 мг сухого сульфата аммония, 5 капель мочи и 2 капли раствора натрия нитропрussa тщательно смешивают в пробирке, а затем на эту смесь осторожно наслаивают 10 – 15 капель рас-

творя водного аммиака. При наличии кетоновых тел на границе раздела в течение 3 – 5 мин образуется красно-фиолетовое кольцо, интенсивность окраски которого позволяет ориентировочно судить о концентрации кетоновых тел в моче (табл. 14).

Таблица 14

Интенсивность окраски	Обнаруживаемые вещества, г/л	
	ацетоуксусная кислота	ацетон
Следы	0,05	0,2
Умеренная	0,3	2,5
Интенсивная	0,8	8

При незначительной концентрации кетоновых тел слабое кольцо может появиться на 8 – 10 мин.

Опыт 7. Определение билирубина

Унифицированная проба Розина

Реактив: 1% спиртовой раствор йода.

Ход определения

В пробирку наливают 4 – 5 мл мочи и осторожно по стенкам пробирки наслаивают раствор йода. Появление на границе между жидкостями зеленого кольца говорит о наличии билирубина.

Нормальные значения. Моча здоровых людей содержит минимальные количества билирубина, которые не могут быть обнаружены качественными пробами, применяемыми в практической медицине. С мочой выделяется только билирубина глюкуронид (прямой билирубин), концентрация которого в норме в крови незначительна.

Клиническое значение. Билирубинурию наблюдают главным образом при поражениях паренхимы печени (паренхиматозные желтухи) и нарушении оттока желчи (обтурационные желтухи). Для гемолитической желтухи билирубинурия нехарактерна, так как гемобилирубин (непрямой билирубин) не проходит через почечный фильтр.

Опыт 8. Определение уробилиноидов

Унифицированная проба Флоранса

Принцип метода. С соляной кислотой уробилин образует соединение, окрашенное в красный цвет.

Реактивы: концентрированная серная кислота, диэтиловый эфир, концентрированная соляная кислота.

Ход исследования

Мочу в количестве 10 мл подкисляют в пробирке 8 – 10 каплями

концентрированной серной кислоты, перемешивают, затем приливают 2 – 3 мл эфира и, закрыв пробирку пробкой, несколько раз осторожно пропускают эфир через слой мочи для экстрагирования уробилина. Затем эфирную вытяжку мочи наслаивают на 2 – 3 мл концентрированной HCl, налитой в другую пробирку. При наличии уробилина на границе жидкостей образуется розовое кольцо. Интенсивность окраски пропорциональна количеству уробилина.

Оценка результата. Проба настолько чувствительна, что даже в норме на границе между двумя жидкостями видно легкое розовое окрашивание. Этой пробой можно установить полное отсутствие уробилиноидов в моче.

Унифицированная проба Богомолова

Принцип метода. Уробилин с сульфатом меди образует соединение красно-розового цвета.

Реактивы: насыщенный раствор сульфата меди: 23 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 100 мл дистиллированной воды; хлороформ.

Ход исследования

К 10 – 15 мл мочи приливают 2 – 3 мл насыщенного раствора сульфата меди. Если образуется помутнение, то прибавляют несколько капель концентрированной соляной кислоты до прояснения раствора. Через 5 мин приливают 2 – 3 мл хлороформа и, закрыв пробирку пробкой, несколько раз встряхивают.

Оценка результатов. Если хлороформ окрашивается в розовый цвет, то концентрация уробилина в моче выше нормальной.

Нормальные величины. В моче здорового человека содержатся следы уробилиногена, а за сутки выделяется не больше 6 мг, у детей не более 2 мг.

Клиническое значение. В свежей моче содержится уробилиноген, который при стоянии мочи окисляется в уробилины. Все эти вещества являются производными билирубина и называются уробилиноидами. Уробилиноиды образуются под действием ферментов бактерий и клеток слизистой оболочки кишечника из билирубина, выделившегося с желчью. Уробилиноидурия является одним из характерных симптомов поражения паренхимы печени, гемолитических состояний и заболеваний кишечника. Полное отсутствие уробилиноидов говорит о полном нарушении поступления желчи в кишечник.

Опыт 9. Обнаружение других сахаров

Обнаружение фруктозы (проба Селиванова)

Принцип метода. При нагревании фруктозы с резорцином в кислой среде образуются соединения, окрашенные в красный цвет.

Реактивы: HCl, 1 моль/л; резорцин: 5 г в 1 л 1 моль/л раствора HCl.

Ход обнаружения

К 2 мл мочи приливают 1 мл раствора резорцина и нагревают до закипания.

Оценка результата. При положительной пробе развивается интенсивное красное окрашивание. В норме окраска не появляется.

Примечание. Иногда пищевая нагрузка медом и фруктами может дать положительную пробу.

Обнаружение лактозы и мальтозы (проба Велька)

Принцип метода. Лактоза и мальтоза в щелочной среде при нагревании с аммиаком образуют окрашенные соединения.

Реактивы: аммиак водный концентрированный; KOH, раствор 200 г/л.

Ход обнаружения

К 5 мл мочи приливают 2,5 мл аммиака и 0,2 мл раствора KOH. Нагревают на водяной бане 30 мин при 60 °С.

Оценка результатов. При положительной реакции на лактозу появляется коричневая окраска, а при наличии мальтозы – красная окраска. В норме окраска не развивается.

Лабораторная работа № 10

Химия молока

Молоко представляет собой эмульсию жира в молочной плазме. В состав молока входят: 1) вода; 2) липиды – триглицериды, содержащие главным образом олеиновую и пальмитиновую кислоты, фосфолипиды – фосфатидилхолины и фосфатидилэтаноламины, а также холестерин; 3) белки – казеиноген, молочный альбумин и молочный глобулин; 4) углеводы – лактоза (молочный сахар) и в небольшом количестве глюкоза; 5) ферменты – амилаза, липаза, каталаза, дегидрогеназа и др.; 6) витамины – А, С, D, группы В и др.; 7) минеральные вещества: калий, натрий, кальций, магний, фосфор, хлор, железо (следы).

Таким образом, молоко является ценнейшим пищевым продуктом, так как в его состав входят важнейшие питательные вещества.

Большое практическое значение имеет вопрос о сравнительной ценности женского и коровьего молока. Сравнивая их состав (табл. 15), можно видеть, что в отношении белков, углеводов и солей имеется резкая разница.

Таблица 15

Ингредиент	Женское молоко, %	Коровье молоко, %
Общий белок	1,2 – 1,5	3,3
Казеиноген	0,8 – 1,0	2,7
Альбумины и глобулины	0,4 – 0,6	0,6
Лактоза	6,0 – 7,0	4,8
Липиды	3,5	3,7
Соли	0,3	0,7

Из приведенной таблицы видно, что при замене женского молока коровьим необходимо разбавить коровье молоко в 2 – 3 раза водой и одновременно добавить некоторое количество сахара.

Опыт 1. Определение реакции среды молока по лакмусу и фенолфталеину

Реакция среды молока обусловлена одновременным присутствием кислореагирующих однозамещенных и щелочнореагирующих двухзамещенных фосфорнокислых солей щелочных металлов.

Молоко травоядных и всеядных животных имеет обычно нейтральную реакцию по лакмусу. рН молока равен 6,5 – 7,0.

Ход работы

В пробирку наливают 1 мл молока и смачивают им лакмусовую бумажку, после чего в пробирку прибавляют 1 – 2 капли фенолфталеина. Отмечают реакцию среды молока по лакмусу и фенолфталеину.

Опыт 2. Выделение казеина из молока

На долю специфического фосфопротеида казеина приходится 80 % белков молока. Этот белок обладает кислыми свойствами и находится в молоке в виде растворимой кальциевой соли. При подкислении казеин выпадает в осадок в виде белых рыхлых хлопьев, которые легко отделяются фильтрованием.

Реактивы: 1 % раствор соляной кислоты, 10 % раствора гидроксида натрия концентрированная азотная кислота, 1 % раствор сульфата меди, молибденовый реактив.

Ход работы

1. В химический стакан емкостью 50 мл отмеряют мерной пробиркой 3 мл молока и 7 мл дистиллированной воды. К смеси постепенно, слегка перемешивая, добавляют 10 – 15 капель 1 % раствора соляной кислоты до начала образования рыхлого осадка. (Кислоту добавлять аккуратно по каплям, так как в избытке ее осадок казеина растворяется!)

2. Для удаления кислоты в стакан наливают 10 мл дистиллированной воды, перемешивают и через 5 мин жидкость осторожно сливают с осадка. К осадку еще раз приливают 10 мл дистиллированной воды, содержимое стакана осторожно перемешивают и через 5 мин фильтруют через бумажный фильтр.

3. Осадок с фильтра переносят стеклянной палочкой в колбочку (небольшую часть осадка оставляют на фильтре и проверяют на биуретовую реакцию). В колбочку приливают 6 мл 10 % раствора гидроксида натрия, присоединяют обратный холодильник и нагревают на песочной бане в течение 1 ч.

4. К охлажденному гидролизату добавляют 20 – 30 капель концентрированной азотной кислоты слабокислой реакции на лакмус. При нейтрализации выпадает осадок высокомолекулярных продуктов неполного гидролиза казеина. После отстаивания жидкость фильтруют.

5. Проводят с фильтратом биуретовую реакцию и молибденовую пробу на фосфорную кислоту:

а) к 0,5 мл фильтрата добавляют 1 мл 10 % щелочи и 1 каплю 1 % раствора сульфата меди;

б) к 0,5 мл фильтрата добавляют 1 мл молибденового реактива (смесь молибдата аммония и концентрированной азотной кислоты), доводят до кипения и кипятят несколько минут. В присутствии фосфорной кислоты жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет. При охлаждении выпадает желтый кристаллический осадок $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{MoO}_3$.

Опыт 3. Качественные реакции на составные части молока

Осаждение казеиногена

Белок молока – казеиноген – относится к сложным белкам – фосфопротеидам, его простетическая группа содержит большое количество ортофосфорной кислоты, соединенной с аминокислотами серином и треонином. Казеиноген не свертывается при нагревании, растворим в растворах слабых щелочей. В молоке казеиноген находится в виде растворимой

в воде кальциевой соли. В изоэлектрической точке (при рН = 4,7) казеиноген переходит в изоэлектрическое состояние, теряет свою устойчивость и выпадает в осадок.

Реактивы: 3 % раствор уксусной кислоты, 1 % раствор гидроксида натрия, 10 % раствор гидроксида, 2 % раствор сульфата меди.

Ход работы

В колбочку наливают 2,5 мл молока и 5 мл дистиллированной воды. Содержимое колбочки хорошо перемешивают и добавляют по каплям 0,5 мл 3 % раствора уксусной кислоты. Затем снова хорошо перемешивают и оставляют стоять на 5 – 10 мин. Осадок белка отфильтровывают, фильтрат разливают в четыре пробирки и используют в качественных реакциях.

Осадок белка после промывания водой растворяют на фильтре 1 мл 1% раствора гидроксида натрия. С полученной жидкостью проделывают биуретовую реакцию: прибавляют равный объем 10 % раствора гидроксида натрия и 1 – 2 капли 2 % раствора сульфата меди, перемешивают. Жидкость окрашивается в фиолетовый цвет.

Осаждение молочного альбумина и глобулина

Молочный альбумин и глобулин обладают всеми свойствами белков соответствующих групп (альбуминов и глобулинов): они свертываются при кипячении и высаливаются в насыщенном (альбумины) и полунасыщенном (глобулины) растворе сульфата аммония.

Реактивы: сульфат аммония – насыщенный раствор, порошок.

Ход работы

В первую пробирку с фильтратом добавляют равный объем насыщенного раствора сульфата аммония, выпадает осадок. Раствор фильтруют и фильтрат насыщают порошком сульфата аммония. Вторично выпадает осадок.

Открытие молочного сахара

Молочный сахар – лактоза, состоит из остатков β-галактозы и α-глюкозы, соединенных между собой 1,4-гликозидной связью, вследствие чего обладает восстановительной способностью.

Реактивы: 10 % раствор гидроксида натрия, 2 % раствор сульфата меди.

Ход работы

С фильтратом во второй пробирке проделывают реакцию Троммера: в пробирку наливают 0,5 мл исследуемой жидкости, добавляют 5 – 6 капель 10 % раствора гидроксида натрия и по каплям 2 % раствор

сульфата меди до образования легкой не исчезающей мути. Пробирку осторожно нагревают, сначала появляется желтое окрашивание, а затем образуется желтый или красно-коричневый осадок.

Открытие солей фосфорной кислоты

Реактивы: 3,75 % раствор молибденовокислого аммония в азотной кислоте.

Ход работы

К фильтрату в третьей пробирке прибавляют 5 – 6 капель 3,75 % раствора молибденовокислого аммония в азотной кислоте и нагревают до кипения. Медленно образуется желтый кристаллический осадок фосфорно-молибденовокислого аммония.

Открытие солей кальция

Реактивы: 0,2 % раствор щавелевокислого аммония.

Ход работы К фильтрату в четвертой пробирке прибавляют 2 – 4 капли 0,2 % раствора щавелевокислого аммония. Выпадает осадок нерастворимого в воде щавелевокислого кальция.

Опыт 4. Створаживание молока

Под влиянием фермента пепсина происходит створаживание молока, так как пепсин обладает способностью превращать казеиноген в казеин, кальциевые соли которого нерастворимы в воде.

Реактивы: 0,2 % раствор щавелевокислого аммония, раствор пепсина, 10 % раствор хлорида кальция.

Ход работы

В четыре пробирки отмеривают по 3 мл предварительно разведенного в 20 раз молока. В первую пробирку добавляют 5 – 6 капель раствора пепсина. Во вторую добавляют 5 – 6 капель прокипяченного раствора пепсина. В третью и четвертую пробирки после добавления 5 – 6 капель 0,2 % раствора щавелевокислого аммония и встряхивания – по 5 – 6 капель раствора пепсина.

Все пробирки помещают на 10 – 15 мин в термостат при температуре 37 – 42 °С. По истечении указанного времени отмечают, в каких пробирках произошло створаживание молока и почему.

Затем в четвертую пробирку добавляют 5 – 6 капель 10 % раствора хлорида кальция и объясняют причину выпадения в этой пробирке казеина.

Опыт 5. Осаждение белков молока солями тяжёлых металлов

Реактивы: 5 % раствор сульфата меди, 5 % раствор ацетата свинца.

Ход работы

В три пробирки наливают по 1 мл молока и прибавляют в первую – 2 – 3 капли 5 % раствора сульфата меди, во вторую – 2 – 3 капли 5 % раствора ацетата свинца.

Наблюдают осаждение белков молока.

Контрольные вопросы и задачи

1. Сравните состав женского и коровьего молока. В чем преимущество женского молока для грудного вскармливания детей?
2. Что такое уробилины, где они образуются?
3. С чем может быть связано помутнение мочи? Как можно выявить причину помутнения мочи?
4. Что такое казеиноген и на чем основан способ его осаждения?
5. В молоке содержится растворимый белок лактоальбумин с молекулярной массой 16300. При гидролизе 10 г такого белка получили 11,75 г различных аминокислот. Сколько аминокислотных остатков входит в состав молекулы такого белка?
- 6*. Уменьшение реабсорбции натрия сопровождается:
 - 1) торможением секреции протонов в почках и гипокалиемией;
 - 2) гипокалиемией и избыточной секрецией протонов;
 - 3) гипокалиемией и задержкой протонов.

Тема IV. ФЕРМЕНТЫ

Ферментами (или энзимами) называют биологические катализаторы белковой природы, входящие в состав всех клеток и тканей живых организмов и ускоряющие течение отдельных химических реакций.

Источник выделения ферментов – различные животные и растительные ткани, а также микроорганизмы. Из одних только плесневых грибов выделено около 80 различных ферментных препаратов. Ввиду того, что ферменты являются белками и легко подвергаются денатурации, все операции при их выделении и очистке следует вести в мягких условиях при температуре не выше +4 °С, лучше в холодной комнате. Так как ферменты легко инактивируются при значениях рН ниже 5 и выше 9, в процессе

* Выберите правильный ответ

их выделения и особенно очистки необходимо тщательно контролировать величину водородного показателя. В связи с тем, что процедура выделения индивидуальных ферментов чрезвычайно сложна, часто работу ведут с так называемыми ферментными препаратами, представляющими собой лишь частично очищенные ферменты.

Лабораторная работа № 11 **Получение препарата сахаразы**

Материалы и реактивы: пекарские дрожжи, кварцевый песок, ацетон, тимол, 10 % раствор гидроксида натрия, 1 % раствор сульфата меди.

Ход работы

1. 100 г пекарских дрожжей тщательно растирают в ступке с кварцевым песком. Растертую массу наносят тонким слоем на стекло и высушивают в токе сухого воздуха.

2. Высушенные дрожжи растирают в порошок. Для извлечения сахаразы к полученному порошку приливают небольшими порциями 200 мл воды при постоянном перемешивании. Затем массу вновь растирают в фарфоровой ступке и центрифугируют в течение 10 мин при 3000 об/мин или фильтруют через складчатый фильтр.

3. Прозрачный фильтрат упаривают в вакууме при 35 °С до небольшого объема и выливают в пятикратный объем охлажденного до –20 °С ацетона, перемешивают и через несколько минут центрифугируют при 3000 об/мин. Образовавшийся осадок высушивают при температуре 38 °С и растирают в ступке в порошок.

4. Полученный препарат сахаразы длительно сохраняется. В качестве антисептика к порошку добавляют кристаллик тимола, завернутый в фильтровальную бумагу.

5. Для проверки активности сахаразы в 2 пробирки наливают по 0,5 мл 0,01 % водного раствора препарата. Содержимое одной из них кипятят в течение 3 мин для разрушения фермента, после чего пробирку охлаждают. Затем в обе пробирки добавляют по 3 мл 5 % раствора сахаразы и ставят в термостат при 40 °С на 15 мин. По истечении времени в обеих пробах проводят реакцию Троммера. В контрольной пробирке осадка оксида меди (I) не появляется. В пробирке с активным ферментом образуется красный осадок оксида меди (I), что указывает на присутствие восстанавливающих ионы меди глюкозы и фруктозы, образующихся при гидролизе невосстанавливающего ее дисахарида – сахарозы.

Лабораторная работа № 12

Получение препарата уреазы из соевой муки

Материалы и реактивы: бобы сои; петролейный эфир; 1 % раствор мочевины; 1 % раствор фенолфталеина; 10 % раствор гидроксид натрия; реактив Несслера.

Ход работы.

1. Сто граммов сухих бобов сои размалывают на кофейной мельнице и тщательно растирают в ступке. Муку высыпают в коническую колбу и встряхивают в течение 10 – 15 мин с 200 мл петролейного эфира для обезжиривания (колбу беречь от огня). Осадок отделяют на воронке Бюхнера. Экстракцию эфира повторяют 5 – 6 раз.

2. Обезжиренную муку высушивают, распределяя ее тонким слоем на стекле или фильтровальной бумаге. Высушенную обезжиренную муку хранят в банке с притертой пробкой, предпочтительно в сухом месте. Она может долго служить для получения активных вытяжек уреазы.

3. 20 – 30 г обезжиренной соевой муки настаивают с пятикратным количеством дистиллированной воды в течение 15 – 20 ч при температуре не выше 5 °С. Осадок отделяют центрифугированием при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость упаривают в вакууме до суха при температуре 35 – 40 °С. Полученный порошок хорошо растворим в воде.

4. Для проверки активности уреазы готовят 0,01 % раствор препарата. В пробирку наливают 5 мл 1 % раствора мочевины, 2 – 3 капли спиртового раствора фенолфталеина и 1 – 2 мл 0,01 % раствора уреазы. Пробирку помещают в термостат при 38 °С на 30 мин. Параллельно ставят такой же опыт с прокипяченным раствором уреазы. Содержимое первой пробирки становится малиново-красным вследствие смещения реакции среды в щелочную область в результате образования аммиака. Образование аммиака можно обнаружить и иным путем. С этой целью повторяют опыт и после инкубации при 38 °С в реакционную смесь осторожно добавляют равный объем 10 % раствора гидроксида натрия. Выделение аммиака обнаруживают по запаху, по посинению влажной лакмусовой бумажки у отверстия пробирки, а также по образованию красно-бурого осадка при добавлении 2 – 3 капель реактива Несслера.

Гидролиз мочевины, катализируемый уреазой, приводит к образованию оксида углерода и аммиака.

Лабораторная работа № 13

Получение препарата амилазы из плесневых грибов

Материалы и реактивы: плесневый порошок; 1 % раствор крахмала, свежеприготовленный; раствор йода в йодистом калии.

Ход работы

1. Культивирование плесневых грибов

Плесневые грибы развиваются на синтетических питательных средах с небольшим числом компонентов, например среде Чапека.

Для получения грибной массы вносят кусочек плесени непосредственно с заплесневевшего предмета (или пользуются чистой культурой гриба *Aspergillus niger*) в питательную среду Чапека. Колбу помещают в термостат при температуре при 25 – 28 °С. Через 5 – 6 дней на поверхности жидкости вырастает мощная пленка гриба, пригодная для выделения амилазы.

2. Получение препарата грибных амилаз

Грибную массу отделяют от среды фильтрованием, распределяют ее небольшими кусочками на поверхности стекла и высушивают при температуре 37 °С. Воздушно-сухую массу затем тщательно растирают в фарфоровой ступке с трехкратным количеством кварцевого песка. Полученный тонкий однородный порошок используют для проведения опытов с амилазой.

3. Обнаружение действия грибных амилаз

2 г полученного препарата плесневелых грибов смешивают с 50 мл воды, нагретой до 37 °С, энергично встряхивают в течение 5 мин, а затем настаивают 2 ч при той же температуре. После повторного встряхивания твердый остаток отфильтровывают. В пробирку наливают 5 мл полученного фильтрата, прибавляют 10 мл 1 % раствора крахмала, быстро перемешивают и тотчас же одну каплю содержимого пробирки, извлеченную стеклянной палочкой, смешивают на предметном стекле с 1 – 2 каплями раствора йода в йодистом калии. Проба окрашивается интенсивно с синий цвет. Пробирку помещают в водяную баню, нагретую до 40 °С. Через каждые 2 мин повторяют взятие проб. По мере расщепления крахмала пробы с йодом будут окрашиваться в разные цвета.

Лабораторная работа № 14

Качественные пробы на присутствие ферментов

Опыт 1. Открытие липазы в семенах клещевины

Материалы и реактивы: семена клещевины; масло вазелиновое; фосфатный буфер (0,2 М; рН = 4,8); 96 % этиловый спирт; диэтиловый эфир; 1 % спиртовой раствор фенолфталеина; 0,1 н. гидроксид калия.

Ход работы

0,2 г очищенных семян клещевины тщательно растирают в фарфоровой ступке, после чего к растертой массе примешивают 3 мл вазелинового масла и 2 мл 0,2 М фосфатного буфера (рН = 4,8).

Смесь инкубируют 30 мин, добавляют 30 мл 96 % спирта и 15 мл эфира. Тщательно перемешивают.

Смесь сливают в колбу на 100 мл, добавляют 2 – 3 капли раствора фенолфталеина и отщепившиеся жирные кислоты оттитровывают 0,1 н раствором гидроксида калия (все горелки в лаборатории должны быть выключены!). В качестве контроля используют смесь без инкубации. Разница в количестве пошедшей на титрование 0,1 н. щелочи в опытной и контрольной пробах является показателем активности липазы.

Опыт 2. Открытие уреазы в соевой муке

Материалы и реактивы: соевая мука; 1 % раствор мочевины; 1 % спиртовой раствор фенолфталеина.

Ход работы

К 2 мл 1 % раствора мочевины добавляют 2 капли фенолфталеина и 2 мл раствора уреазы (1:10). Смесь хорошо перемешивают и ставят в термостат при 38 °С на 30 мин. Параллельно ставят такой же опыт с прокипяченным раствором уреазы. Содержимое первой пробирки становится малиново-красным вследствие смещения рН раствора в щелочную зону за счет образовавшегося аммиака.

Опыт 3. Открытие альдегидоксидазы в сыром молоке

Материалы и реактивы: свежее коровье молоко; масло вазелиновое; 0,4 % раствор формальдегида; 0,01 % раствор метиленового синего.

Ход работы

1. В три пробирки наливают по 5 мл свежего коровьего молока. Одну пробу кипятят в течение 2 – 3 мин и остужают. В прокипяченную

пробу и в одну из некипяченых проб добавляют по 1 мл 0,4 % раствора формальдегида, а в другую некипяченую – 1 мл воды.

2. Затем во все три пробирки приливают по 1 мл 0,01 % раствора метиленового синего. Содержимое пробирок хорошо перемешивают и заливают в каждую по 3 – 4 капли вазелинового масла для предохранения жидкости от соприкосновения с кислородом воздуха.

3. Все пробы помещают в водяную баню, нагретую до 40 °С. Через некоторое время жидкость в некипяченой пробе, содержащей субстрат, обесцвечивается за счет образования восстановленной формы метиленового синего.

Опыт 4. Открытие действия пепсина

Материалы и реактивы: профильтрованный желудочный сок; смесь молочноацетатная, состоящая из равных объемов свежего молока и 0,1 М раствора ацетатного буфера; 0,1 М раствор ацетатного буфера (рН = 5).

Ход работы

В пробирку наливают 5 мл молочноацетатной смеси и помещают ее в термостат при температуре 25 °С. После того как пробирка прогреется до указанной температуры, в нее добавляют 0,1 мл профильтрованного желудочного сока. Перемешивают содержимое пробирки и одновременно включают секундомер, следя за моментом появления на стенке пробирки первых сгустков казеина. Этот момент, свидетельствующий о завершении реакции перехода растворимого казеиногена в нерастворимый казеин под действием протеолитического фермента – пепсина, отмечают по секундомеру.

Лабораторная работа № 15

Определение каталазы (по А.Н. Баху и А.И. Опарину)

Материалы и реактивы: свежий растительный материал (морковь или картофель); 0,1 н. раствор перманганата калия; 10 % раствор серной кислоты; карбонат кальция; 0,1 н. раствор перекиси водорода.

Ход работы

1. 2 г сырого картофеля (или моркови) растирают с кварцевым песком в ступке, постепенно добавляя 2 – 3 мл воды. Для уменьшения кислой реакции добавляют на кончике шпателя карбонат кальция до прекращения выделения пузырьков углекислого газа.

2. Растертую массу количественно переносят в мерную колбу и доводят водой до 100 мл. Смесь оставляют стоять в течение 30 – 60 мин, после чего ее фильтруют.

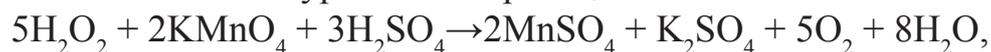
3. В коническую колбу на 200 мл берут пипеткой 25 мл 0,1 н. раствора перекиси водорода и добавляют туда же пипеткой 20 мл вытяжки фермента.

4. Через 30 мин действие фермента прекращают прибавлением 5 мл 10% раствора серной кислоты и титруют смесь 0,1 н. раствором перманганата калия (до образования устойчивого в течение примерно 1 мин розового окрашивания). Отмечают количество миллилитров раствора перманганата калия, пошедшего на титрование оставшейся перекиси водорода.

5. Одновременно ставят контроль с инактивированным нагреванием в кипящей водяной бане в течение 5 мин ферментным раствором (20 мл). К этому раствору после охлаждения добавляют 25 мл 0,1 н. раствора перекиси водорода. Смесь оставляют стоять на 30 мин, после чего добавляют 5 мл 10 % раствора серной кислоты и титруют 0,1 н. раствором перманганата калия. Отмечают количество миллилитров перманганата калия, пошедшего на титрование всего количества перекиси водорода.

6. По разности между опытным и контрольным титрованием находят количество перманганата, эквивалентное количеству разложенного ферментом перекиси водорода.

Расчет количества перекиси водорода, разложенного ферментом, ведут в соответствии с уравнением реакции



согласно которому 1 мл 0,1 н. раствора перманганата калия соответствует 1,7 мг перекиси водорода.

Пример расчета: из 1,25 г моркови приготовлена вытяжка каталазы объемом 100 мл: на титрование опытной пробы затрачено 15,5 мл, контрольной – 30,2 мл 0,1 н. раствора перманганата калия. Количество разложенной перекиси водорода в пробе эквивалентно $(30,2 - 15,5) 14,7$ мл 0,1 н. раствора перманганата калия и, следовательно, равно $(14,7 \cdot 1,7) 24,99$ мг. В 1 г сырой моркови содержится количество каталазы, способное за 30 мин разложить $(24,99 \cdot 100/20 \cdot 1,25) 99,96$ мг перекиси водорода, а за 1 мин – $(99,96/30) 3,33$ мг. Так как 1 мкмоль перекиси водорода составляет 0,034 мг, то в 1 г моркови присутствует $(3,33/0,034) 100$ Е каталазы.

Контрольные вопросы

1. В чем заключаются сходства и различия ферментов и неорганических катализаторов?
2. К каким классам ферментов относятся: сахараза, липаза, уреазы, альдегидоксидаза, пепсин, каталаза?
3. В чем выражают активность ферментов?
4. Для какого класса ферментов коферментом является КоА?
5. Какой фермент обладает абсолютной субстратной специфичностью:
 - 1) пепсин,
 - 2) лизоцим,
 - 3) карбоксипептидаза,
 - 4) уреазы,
 - 5) аргиназа?

Тема V. ВИТАМИНЫ

Витамины – разнообразные по химическому строению органические вещества, которые принимают участие в регуляции обмена веществ в организме. Они не выполняют структурную функцию и не используются в качестве источника энергии. Витамины требуются в минимальных количествах, выражающихся в миллиграммах и микрограммах, но большинство из них не синтезируется в организме человека или животных и, таким образом, они являются незаменимыми составными частями пищи.

По физико-химическим свойствам витамины делятся на 2 группы:

- 1) водорастворимые: В₁, В₂, В₃, В₅, В₆, В₁₂, В_С, Н, С, Р;
- 2) жирорастворимые: А, D, Е, К.

Лабораторная работа № 16 **Водорастворимые витамины**

Опыт 1. Качественная реакция на витамин В₁ (тиамин)

Принцип метода. Эта реакция основана на способности витамина В₁ в щелочной среде с диазореактивом образовывать сложное комплексное соединение красного или оранжевого цвета.

Реактивы: тиамин в порошке или 5 % раствор тиамин, 1 % рас-

твор сульфаниловой кислоты, 5 % раствор нитрита натрия, 10 % раствор гидрокарбоната натрия.

Ход работы

В пробирку наливают 1 мл 1 % раствора сульфаниловой кислоты и 1 мл 5 % раствора нитрита натрия. Сюда же вносят небольшое количество (на кончике шпателя) порошка или 0,5 мл тиамин и по стенке добавляют 1 мл 10 % гидрокарбоната натрия. На границе двух жидкостей появляется кольцо оранжевого или красного цвета.

Опыт 2. Качественная реакция на витамин В₂ (рибофлавин)

Принцип метода. Реакция основана на способности рибофлавина легко восстанавливаться. Водород, образующийся при добавлении металлического цинка к концентрированной соляной кислоте, восстанавливает желтый рибофлавин сначала в родофлавин (промежуточное соединение) красного (или розового) цвета, а затем в бесцветный лейкофлавин.

Реактивы: 0,025 % раствор рибофлавина, металлический цинк, концентрированная соляная кислота.

Ход работы

В пробирку приливают 1 мл раствора витамина В₂, 0,5 мл концентрированной соляной кислоты и опускают кусочек металлического цинка. Выделяющийся водород реагирует с рибофлавином, восстанавливая его, и жидкость постепенно окрашивается в розовый цвет, а затем обесцвечивается. При взбалтывании обесцвеченного раствора лейкофлавин вновь окисляется кислородом воздуха в рибофлавин.

Опыт 3. Качественная реакция на витамин РР

Принцип метода. При нагревании витамина РР с раствором ацетата меди образуется плохо растворимый синий осадок медной соли никотиновой кислоты.

Реактивы: никотиновая кислота в порошке, 10 % раствор уксусной кислоты, 5 % раствор ацетата меди.

Ход работы

В пробирку помещают 5 – 10 мг витамина РР и растворяют при нагревании в 1 – 2 мл 10 % раствора уксусной кислоты. К нагретому до кипения раствору прибавляют такой же объем 5 % раствора ацетата меди. Жидкость становится мутной, окрашивается в голубой цвет, а при стоянии выпадает синий осадок медной соли никотиновой кислоты.

Опыт 4. Качественная реакция на витамин В₆

Принцип метода. При взаимодействии витамина В₆ с раствором хлорида железа образуется комплексная соль типа фенолята железа красного цвета.

Реактивы: 5 % раствор витамина В₆, 5 % раствор хлорида железа (III).

Ход работы

В пробирке смешивают 1 мл водного раствора пиридоксина и несколько капель раствора 5 % хлорида железа (III). Смесь встряхивают. Наблюдают окрашивание жидкости в красный цвет.

Опыт 5. Качественные реакции на витамин Р (рутин)

Реакция рутина с хлоридом железа (III)

Принцип метода. Хлорид железа (III) образует с рутином комплексные соединения, окрашенные в изумрудно-зеленый цвет.

Реактивы: насыщенный водный раствор рутина, 5 % раствор хлорида железа (III).

Ход работы

К 2 мл насыщенного водного раствора рутина прибавляют несколько капель 5 % раствора хлорида железа (III). Наблюдают появление зеленого окрашивания.

Реакция рутина с концентрированной серной кислотой

Принцип метода. Концентрированная серная кислота образует с флавонами и флавонолами флавилиевые соли, растворы которых имеют ярко-желтую окраску.

Реактивы: насыщенный водный раствор рутина, концентрированная серная кислота.

Ход работы

К 2 мл насыщенного водного раствора рутина осторожно по стенке пробирки доливают 1 мл концентрированной серной кислоты. На границе двух жидкостей возникает окрашенное в желтый цвет кольцо.

Реакция рутина с реактивом Фелинга

Принцип метода. При кислотном гидролизе рутина отщепляется молекула рутинозы, которая далее распадается на глюкозу и рамнозу, обладающие восстанавливающими свойствами.

Реактивы: рутин в порошке, 20 % соляная кислота, 20 % раствор гидроксида натрия, реактив Фелинга.

Ход работы

К 0,5 г рутина добавляют 5 мл 20 % раствора соляной кислоты.

Смесь кипятят в течение 1 мин, затем фильтруют. К фильтрату доливают 3 мл 20 % раствора гидроксида натрия и 3 мл свежеприготовленного реактива Фелинга. Снова нагревают до кипения. Наблюдают образование красного осадка закиси меди.

Опыт 6. Количественное определение витамина С методом йодиметрического титрования

Принцип метода. Аскорбиновая кислота – сильный восстановитель и может быть определена йодиметрически при определенном значении рН раствора (например рН = 7). При титровании йодом аскорбиновая кислота окисляется, образуя дегидроаскорбиновую кислоту.

Реактивы: 2 % раствор соляной кислоты, 0,5 % раствор крахмала, 0,003 н. раствор I₂.

Ход работы

2 г капусты или картофеля натереть на терке в чашке Петри или мелко порезать и растереть в ступке с небольшим количеством толченого стекла или песка. Затем, если измельчали на терке, собрать массу из чашки Петри в стаканчик, если в ступке – прямо в ступку добавить 10 мл 2 % раствора HCl. Хорошо перемешанную массу отфильтровать через стеклянную воронку с ватой в коническую колбу на 50 – 100 мл. Массу на фильтре промыть несколькими каплями воды. В фильтрат прилить 1 мл 0,5 % раствора крахмала и титровать рабочим раствором 0,003 н. I₂ до появления синего окрашивания.

При расчете содержания витамина С в продукте использовать формулу определения массы при помощи титра по определяемому веществу:

$$M = (n \cdot \text{Э} \cdot V) / 1000 \text{ (г)},$$

где n – молярная концентрация эквивалента йода;

Э – молярная концентрация эквивалента аскорбиновой кислоты в граммах, равная в данном случае 88 г;

V – объем пошедшего на титрование йода, мл.

Для пересчета на содержание витамина С в 100 г продукта использовать формулу

$$X = (M \cdot 1000) / 2 \text{ (г)}.$$

Полученный результат сравнить с нормой: содержание витамина С в капусте – 25 – 60 мг/100 г, в картофеле – 25 мг/100 г.

Лабораторная работа № 17 **Жирорастворимые витамины**

Опыт 1. Качественные реакции на витамин А

Реактивы: рыбий жир или раствор витамина А, ледяная уксусная кислота, насыщенная сульфатом железа (II), и концентрированная серная кислота.

Ход работы

Реакция витамина А с сульфатом железа (II)

В пробирку опускают 3 – 4 капли раствора витамина А или рыбьего жира. Добавляют 5 – 10 капель ледяной уксусной кислоты, насыщенной сульфатом железа (II), и 1 – 2 капли концентрированной серной кислоты. Появляется голубое окрашивание, постепенно переходящее в красно-розовое.

Реакция витамина А с концентрированной серной кислотой

В пробирку по стенке опускают 3 – 4 капли раствора витамина А или рыбьего жира. Добавляют 1 – 2 капли концентрированной серной кислоты. Появляется голубое или фиолетовое окрашивание, переходящее в буро-красное.

Опыт 2. Качественная реакция на витамин D

Реактивы: раствор витамина D, насыщенный раствор сурьмы (V).

Ход работы

В пробирку к 2 мл витамина D добавляют 0,2 мл насыщенного раствора сурьмы (V). Наблюдают появление желтого окрашивания.

Опыт 3. Качественные реакции на витамин Е

Реактивы: спиртовой раствор α -токоферола, концентрированная азотная кислота, 1 % раствор хлорида железа (III).

Реакция α -токоферола с концентрированной азотной кислотой

Принцип метода. При окислении токоферолов под влиянием концентрированной азотной кислоты образуются соединения хиноидной структуры, окрашенные в красный цвет.

Ход работы.

В пробирку вносят 5 капель спиртового раствора витамина Е и добавляют 1 мл концентрированной азотной кислоты. Пробирку интенсивно перемешивают и наблюдают постепенное появление красного окрашивания.

Реакция α -токоферола с хлоридом железа

Принцип метода. При взаимодействии с хлоридом железа α -токоферол окисляется до α -токоферилхинона, окрашенного в красный цвет.

Ход работы

К 0,5 мл спиртового раствора α -токоферола добавляют 0,5 мл 1 % раствора хлорида железа (III) и тщательно перемешивают содержимое пробирки. Наблюдают появление красного окрашивания.

Контрольные вопросы

1. Какова химическая природа аскорбиновой кислоты?
2. Какова химическая природа витаминов группы E?
3. Какой витамин является производным стерина:
1) A₁; 2) D₂; 3) B₆; 4) D₃; 5) PP?
4. Антигеморройным действием обладает витамин:
1) H; 2) B₁; 3) D; 4) B₁₂; 5) C.
5. Укажите, какой витамин:
 - 1) принимает участие в свертывании крови;
 - 2) участвует в реакциях декарбоксилирования аминокислот;
 - 3) входит в состав α -кетоглутаратного комплекса;
 - 4) входит в состав карбоксилаз.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Березов, Т. Т.* Биологическая химия : учебник / Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. – М. : Медицина, 1998. – 704 с. – ISBN 5-225-02709-1.
2. Биохимия. Краткий курс с упражнениями и задачами: учеб. пособие / под ред. проф. Е. С. Северина, проф. А. Я. Николаева. – М. : Гэотар – Мед, 2001. – 448 с. – ISBN 5-9231-0053-3.
3. *Досон, Р.* Справочник биохимика / Р. Досон [и др.]. – М. : Мир, 1991. – 544 с.
4. Лабораторные методы исследования в клинике / под ред. проф. В. В. Меньшикова. – М. : Медицина, 1987. – 368 с.
5. *Марри, Р.* Биохимия человека : учебник : в 2 т. / Р. Марри [и др.]. – М. : Мир, 1993. – Т.1 – 381 с. – ISBN 5-03-001-774-7; Т.2 – 414 с. – ISBN 5-03-001-775-5.
6. *Мецлер, Д.* Биохимия : в 3 т. / Д. Мецлер. – М.: Мир, 1980. Т.1. – 408 с.; Т.2 – 606 с.; Т.3 – 488 с.
7. *Пустовалова, Л. М.* Практикум по биохимии / Л.М. Пустовалова. – Ростов н/Д.: Феникс, 1999. – 541 с. – ISBN 5-222-00829-0.
8. *Робинсон, Д. Р.* Основы регуляции кислотно-щелочного равновесия / Д.Р. Робинсон. – М., 1969. – 185 с.
9. Руководство к лабораторным занятиям по биологической химии / под ред. Т. Т. Березова. – М. : Медицина, 1976. – 294 с.
10. *Страйер, Л.* Биохимия: в 3 т. / Л. Страйер. – М. : Мир, 1985. – Т.1 – 168 с.; Т.2 – 218 с.; Т.3 – 396 с.
11. Физиология человека: учебник: в 3 т. / под ред. Р. Шмидта и Г. Тевса. – М. : Мир, 2007. – Т.1. – 323 с. – ISBN 5-03-003575; Т.2 – 314 с. – ISBN 5-03-003576-1; Т.3 – 228 с. – ISBN 5-03-003577-Х.
12. *Филлипович, Ю. Б.* Практикум по общей биохимии / Ю.Б. Филлипович [и др.]. – М. : Высш.шк., 1982. – 311 с.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ.....	5
Тема I. ИССЛЕДОВАНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ.....	5
<i>Лабораторная работа № 1.</i> Определение количественного содержания белка с помощью биуретового метода. (Методика Горналла, Бардавилла и Дэвида).....	6
<i>Лабораторная работа № 2.</i> Определение количественного содержания белка с помощью метода Лоури – Фолина	7
<i>Лабораторная работа № 3.</i> Определение количественного содержания белка с помощью метода Брэдфорда.....	8
Тема II. ВОДНЫЙ И ЭЛЕКТРОЛИТНЫЙ БАЛАНСЫ. ПАРАМЕТРЫ КИСЛОТНО-ОСНОВНОГО СОСТОЯНИЯ.....	9
<i>Лабораторная работа № 4.</i> Исследование буферных систем.....	10
<i>Лабораторная работа № 5.</i> Количественное определение кальция в биологических жидкостях	13
<i>Лабораторная работа № 6.</i> Количественное определение калия в биологических жидкостях	19
<i>Лабораторная работа № 7.</i> Количественное определение фосфора в биологических жидкостях	21
<i>Лабораторная работа № 8.</i> Количественное определение хлоридов в биологических жидкостях	25
Тема III. ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ.....	28
<i>Лабораторная работа № 9.</i> Исследование мочи.....	28
<i>Лабораторная работа № 10.</i> Химия молока.....	35
Тема IV. ФЕРМЕНТЫ.....	40
<i>Лабораторная работа № 11.</i> Получение препарата сахаразы.....	41
<i>Лабораторная работа № 12.</i> Получение препарата уреазы из соевой муки.....	42
<i>Лабораторная работа № 13.</i> Получение препарата амилазы из плесневых грибов.....	43

<i>Лабораторная работа № 14. Качественные пробы на присутствие ферментов</i>	44
<i>Лабораторная работа № 15. Определение каталазы (по А.Н. Баху и А.И. Опарину)</i>	45
Тема V. ВИТАМИНЫ	47
<i>Лабораторная работа № 16. Водорастворимые витамины</i>	47
<i>Лабораторная работа № 17. Жирорастворимые витамины</i>	51
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	53

Учебное издание

ЗАПРУДНОВА Елена Александровна
ГЛАДИЛКИНА Анна Геннадьевна

ПРАКТИКУМ ПО БИОХИМИИ

Подписано в печать 24.03.11.
Формат 60x84/16. Усл. печ. л. 3,25. Тираж 90 экз.

Заказ

Издательство

Владимирского государственного университета
600000, Владимир, ул. Горького, 87.