Міністерство освіти і науки України
Вінницький національний технічний університет

Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з дисципліни «Біохімія» для здобувачів вищої освіти за спеціальністю 163 – Біомедична інженерія

Co-funded by the Erasmus+ Programme of the European Union

Розроблено в рамках проекту “Erasmus+ (CBHE) BioArt “Інноваційна мультидисциплінарна освітня програма зі штучних імплантів для біоінженерії для бакалаврів та магістрів”

Developed in the frame of project “Erasmus+ (CBHE) BioArt“Innovative Multidisciplinary Curriculum in Artificial Implants for Bio-Engineering BSc / MSc Degrees” (586114-EPP- 1-2017-1-ES- EPPKA2-CBHE- JP).

Вінниця
ВНТУ
2020

Рекомендовано - кафедрою біомедичної інженерії Вінницького національного технічного університету Міністерства освіти і науки України (протокол засідання кафедри БМІ № 2 від 10.09.2019 р., оновлено, розглянуто зі змінами на засіданні кафедри БМІ № 2 від 09.09.2020 р)

Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з дисципліни «Біохімія» для студентів спеціальності спеціальності 163 - Біомедична інженерія освітня програма Біомедична інженерія / Уклад. Д. Х. Штофель. – Вінниця : ВНТУ, 2020.

Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт призначений для студентів, які навчаються за рівнем бакалавра зі спеціальності 163 - Біомедична інженерія, освітня програма - Біомедична інженерія.

Лабораторна робота № 1

Дослідження властивостей вуглеводів та ліпідів

Мета роботи – дослідити основні хімічні властивості вуглеводів та ліпідів, ознайомитись з якісними реакціями на ці класи сполук.

Задачі роботи:

1) опрацювати теоретичні відомості за темою роботи;

2) провести відповідні біохімічні реакції;

3) зробити висновки за підсумками роботи.

Теоретичні відомості і методичні вказівки

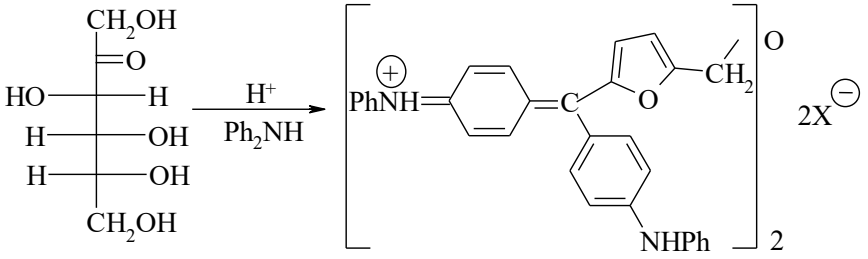
1. ВУГЛЕВОДИ

Вуглеводи є поліфункціональними сполуками. Для визначення вуглеводів використовують різноманітні реакції по функціональним групам.

Наявність в молекулі *–ОН* та *–СНО* груп обумовлює *здатність* цих речовин *до окиснення*. На цій властивості вуглеводів засновано їх визначення за допомогою реактиву Фелінга або нітрату срібла. В цих реакціях відбувається окиснення цукру та відновлення катіону металу. Вуглеводи особливо чутливі до окиснення в лужному середовищі, в якому можуть відбуватися наступні перетворення молекули: енолізація, окисно-відновне диспропорціонування, ізомеризація вуглецевого скелету або його розпад. *Монози*, *альдонові кислоти*, *поліоли* дають реакції, які є загальними для всього класу вуглеводів.

Інший тип аналітичних реакції на цукри базується на здатності вуглеводів конденсуватись з ароматичними системами з утворенням забарвлених сполук. Конденсація може відбуватись за рахунок карбонільної групи монози. Наприклад, при проведенні *нафторезорцинової проби Толленса* (загальна реакція на вуглеводи) глюкуронова кислота конденсується з нафторезорцином з утворенням похідних динафтилметану **I** або ксантену **II**.

Проте продукти конденсації можуть утворюватись також в результаті більш кардинального перетворення молекули вуглеводу (особливо в кислому середовищі) з утворенням різноманітних похідних фурфуролу, які вступають в реакції конденсації з ароматичними сполуками. Наприклад, при конденсації фруктози з дифеніламіном утворюється забарвлена похідна фуранового ряду:



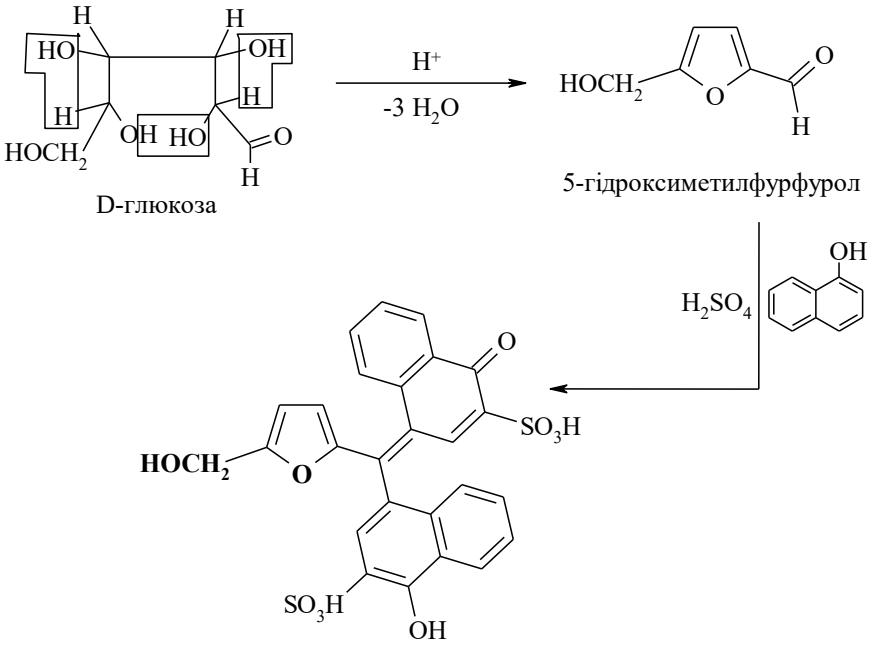
1.1. Загальні реакції на вуглеводи.

1.1.1. Реакція Моліша.

До *1 мл* водного розчину або суспензії досліджуваної сполуки (беруть кілька кристалів вуглеводу) додають *1 – 2* краплини 10%-ного спиртового розчину α-нафтолу.

Пробірку струшують, далі нахиляють і по стінці пробірки до суміші обережно приливають *1 мл* концентрованої сірчаної кислоти таким чином, щоб кислота не змішувалась з водним шаром (важкий шар кислоти має опуститися на дно пробірки). Виникнення ***темно-фіолетового*** кільця на межі двох шарів вказує на наявність вуглеводу або сполуки, яка містить вуглевод.

Поява забарвлення обумовлена утворенням продукту конденсації 5-гідроксиметилфурфуролу з α-нафтолом:



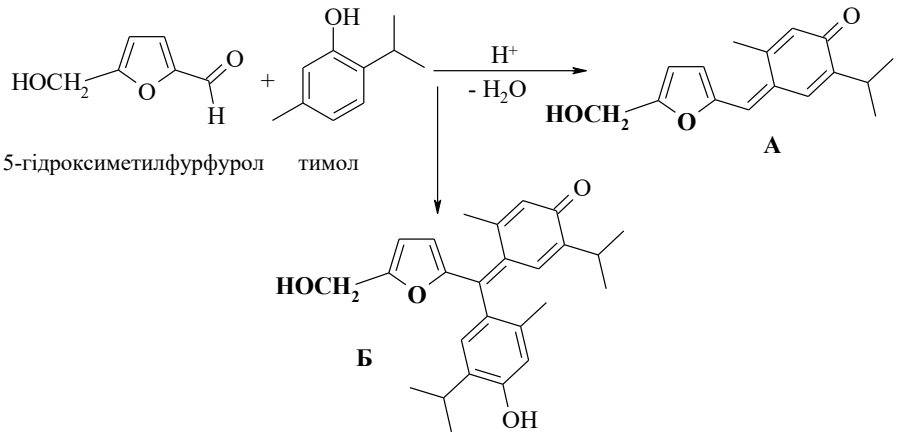
Реакції *перешкоджає азотиста кислота*, *нітрат* – та *нітрит*-іони.

Цю реакцію дають *всі вуглеводи* та *вуглеводвмісні сполуки,* особливо *чутливі – кетози*. Вона спостерігається при концентрації альдоз ≥0.01%.

1.1.2. Реакція з тимолом

Декілька кристаликів цукру нагрівають з *10 мл* концентрованої соляної кислоти та додають 5%-ий спиртовий розчин тимолу. З'являється ***червоне*** забарвлення.

В результаті взаємодії гексоз з хлороводневою кислотою утворюється 5-гідроксиметилфурфурол, який конденсуючись з тимолом дає забарвлені продукти (**А** або **Б**, в залежності від співвідношення реагентів та умов реакції):



1.1.3. Нафторезорцинова проба Толленса (*загальна реакція на вуглеводи*).

У пробірку вміщують кілька кристалів глюкози, 5 мл води, 1 мл 1%-ого спиртового розчину нафторезорцину (1,3-дигідроксинафталену) і 1 мл концентрованої хлороводневої кислоти.

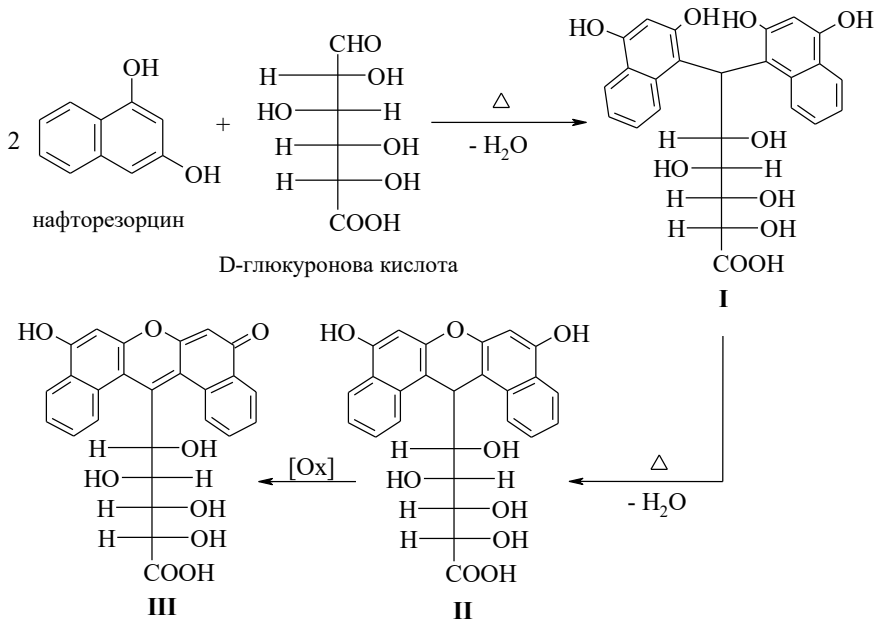
Суміш обережно кип'ятять впродовж 1 хв, потім охолоджують і збовтують з 5 мл етеру або бензену.

Етеровий (бензеновий) шар забарвлюється в різні кольори:

Вуглевод	Забарвлення
Глюкоза, маноза, галактоза	синьо-зелене
Рамноза	фіолетове
Арабіноза, ксилоза	темно-синє
Уронові кислоти	фіолетове

Поява забарвлення зумовлена утворенням продуктів конденсації глюкуронової кислоти з нафторезорцином – динафтилметану **I** або ксантену **II**. Поглибленню забарвлення сприяє подальше окиснення ксантену **II** у сполуку **III** з довшим ланцюгом спряження.

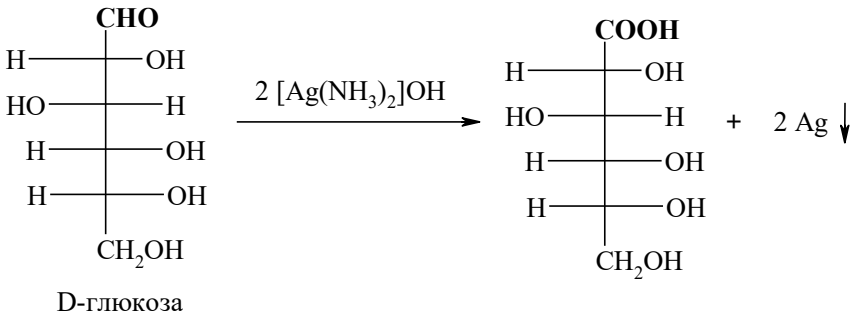
Реакцію часто використовують для виявлення *уронових кислот*.



1.2. **Специфічні реакції окремих класів вуглеводів**.

1.2.1. Реакція срібного дзеркала.

В пробірку з *5 мл* аміачного розчину оксиду срібла додають декілька кристаликів досліджуваної сполуки, суміш обережно нагрівають на водяній бані при 60–70 °С впродовж 2-3 хв. **Вуглеводи-відновники** виявляють за утворенням ***срібного дзеркала*** на стінках пробірки. Окисненню піддається лише ланцюгова форма вуглеводу:



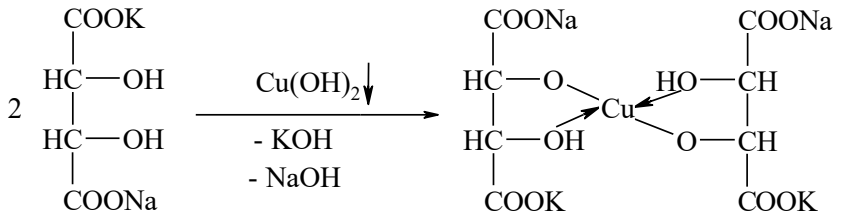
Цю реакцію дають *всі альдегіди* та деякі інші споріднені сполуки (наприклад, похідні альдегідів – альдіміни).

1.2.2. Реакція Фелінга.

Для цієї реакції готують реактив Фелінга, який складається з двох розчинів, які зберігаються окремо.

Перший розчин містить *34 г* $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ в *500 мл* води, другий розчин – *173 г* сегнетової солі та *75 мл* гідроксиду натрію в *500 мл* води.

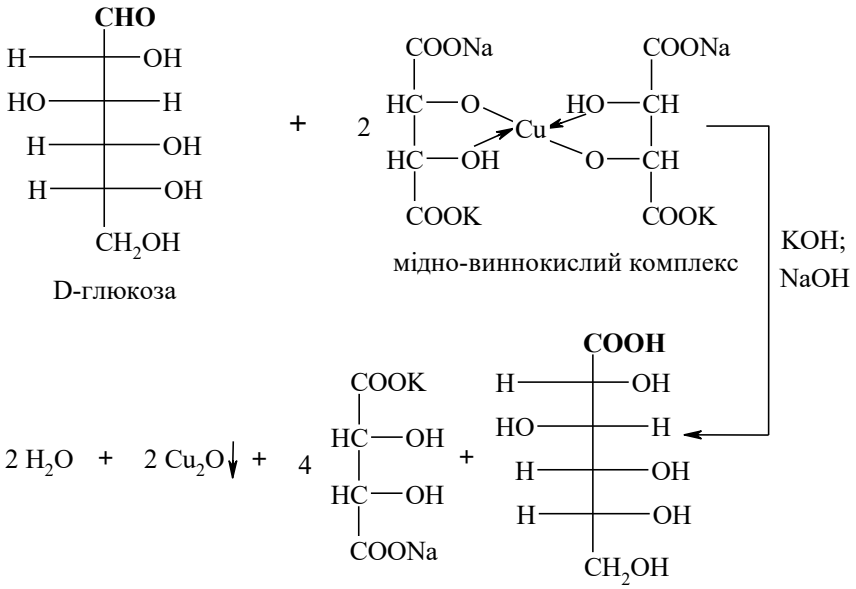
При змішуванні обох розчинів спостерігається виділення *блакитного осаду* гідроксиду купруму (II), який із сегнетовою сіллю утворює *водорозчинний комплекс синього* кольору:



сегнетова сіль мідно-виннокислий комплекс

Для аналізу декілька міліграмів досліджуваної сполуки (наприклад, ≈ 3 краплини 5%-ого розчину глюкози) розчиняють в суміші рівних об'ємів обох розчинів (при нагріванні реакція відбувається швидше).

Якщо сполука є **відновником-вуглеводом**, розчин швидко бліднішає і утворюється ***червоний*** (червоно-коричневий) ***осад*** оксиду купруму (I).



Для багатьох вуглеводів (дисахариди, полісахариди) необхідно прокип'ятити суміш на водяній бані.

Слід пам'ятати, що реакцію Фелінга можуть давати *не лише вуглеводи*, а й інші сполуки, наприклад, аліфатичні альдегіди.

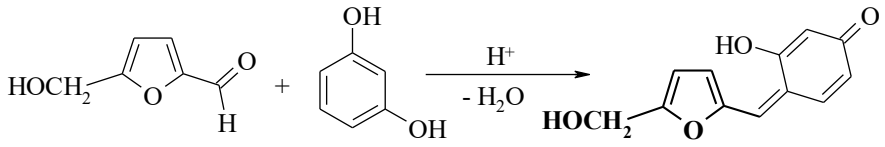
1.2.3. Реакція Селіванова на кетози.

До водного розчину досліджуваного вуглеводу додають рівний об'єм концентрованої соляної кислоти, декілька краплин 1%-ого розчину резорцину в 20%-ій соляній кислоті, суміш нагрівають до кипіння. Після витримування впродовж *15–30 хв* при 80 – 90 °С **кетози** дають ***червоне*** забарвлення, а потім ***темний осад*** (при подальшому

кип’ятінні розчину). Відфільтрований осад розчиняють в спирті з утворенням червоного розчину.

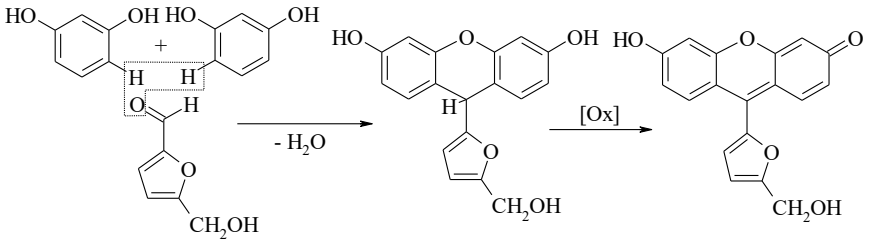
При тривалому кип’ятінні **альдози** також дають ***червоне*** (блідо-рожеве) забарвлення, але менш інтенсивне, ніж кетози. ***Осад*** при цьому ***не утворюється***.

У процесі реакції при нагріванні гексоз з хлороводневою кислотою утворюється 5-гідроксиметилфурфурол, який конденсується з резорцином утворюючи забарвлений продукт (склад $C_{12}H_{10}O_4$):



5-гідроксиметилфурфурол резорцин

Деякі літературні джерела вказують на те, що при використанні двократного надлишку резорцину та в жорсткіших умовах може утворитись циклічна похідна *вишнево-червоного* кольору:



Кетози в умовах досліду перетворюються у 5-гідроксиметилфурфурол в *15-20 разів швидше*, ніж *альдози*.

Реакція Селіванова дозволяє виявити в суміші цукрів *кетогексози* як у *вільному*, так і в *зв’язаному* стані (дисахариди).

1.2.4. Виявлення пентоз. Реакція Біаля

У пробірку вміщують 1 мл 0.1%-ого розчину пентози і 2 мл розчину, заздалегідь приготованого змішуванням 0.05 г орцину (5-метилрезорцину), 25 мл 25%-ого розчину хлороводневої кислоти та 1 краплі 3%-ого розчину хлориду феруму (III).

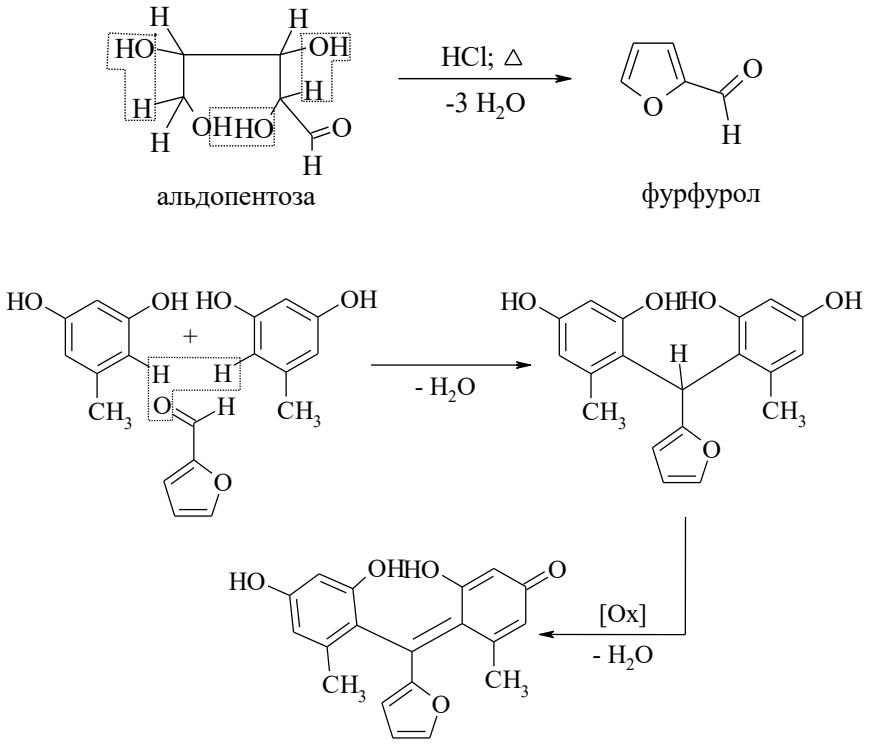
Вміст пробірки кип’ятять у полум’ї пальника впродовж 1-2 хв.

Для видалення з водного розчину продуктів реакції в пробірку додають 2 мл амілового спирту.

Органічний шар забарвлюється в *зелений* (*синьо-зелений*) колір.

Глюкоза, *галактоза* і *фруктоза* в цих умовах реакції забарвлюють органічний шар у *коричневий* колір.

Припускають, що реакція перебігає за такою схемою:



1.2.5. Реакція Келлера-Кілліані (виявлення дезоксицукрів).

В пробірці змішують 0.5 мл 5%-ого розчину сульфату заліза (II), 0.5 мл льодяної оцтової кислоти та декілька кристалів дезоксуцукру. До гомогенного розчину обережно по стінці пробірки приливають 1 мл розчину, який одержують при змішуванні 0.5 мл 5%-ого розчину сульфату заліза (II) та 0.5 мл концентрованої сірчаної кислоти.

Спостерігається забарвлення верхнього шару рідини у *волошково-синій* колір.

Ця реакція є *специфічною* на *вільні дезоксицукри* або *дезоксицукри*, що займають крайнє (термінальне) положення у молекулі *глікозиду*.

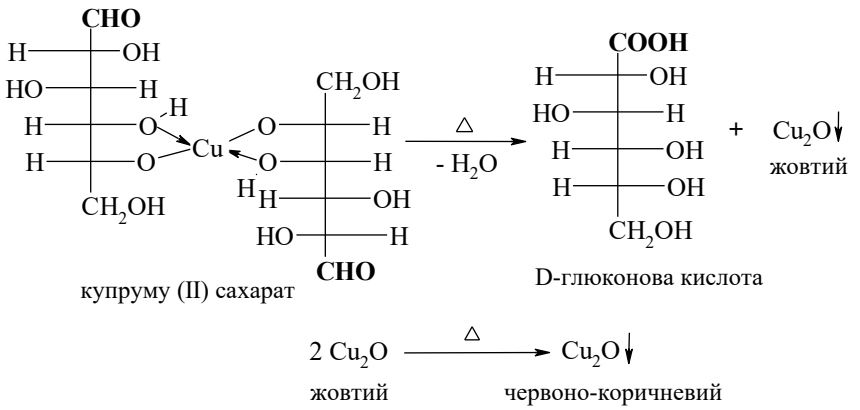
1.2.6. Проба Троммера (виявлення відновлюючих цукрів).

*Відновлення гідроксиду купруму (II) глюкозою в лужному розчині***.**

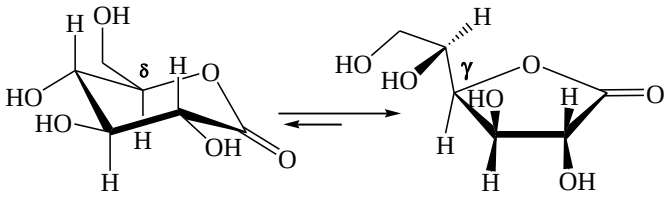
До отриманого в попередньому досліді прозорого розчину купрум (II) сахарату *синього* кольору додають кілька крапель води так, щоб висота рідини в пробірці була ~ 20 мм.

Пробірку тримають похило і обережно нагрівають у полум'ї пальника верхню частину розчину. Спостерігається перехід *синього* забарвлення розчину в *зелене*, а потім його *знебарвлення*.

Одночасно з'являється *жовтий осад* оксиду купруму (I) (у розчині може існувати гідратована форма $Cu_2O \cdot xH_2O$), що агрегуючись перетворюється в *червоно-коричневий осад* оксиду купруму (I):



Альдонові кислоти у розчинах існують переважно в циклічній формі γ-лактону:



1.3. Якісна реакція на полісахариди

Крохмаль – типовий полісахарид. Найбільш специфічна реакція на крохмаль – поява синього фарбування з йодом. Фарбування обумовлене амілозою. Фарбування зникає при нагріванні і відновлюється при охолоджені крохмального клейстеру.

Для проведення досліду до декількох крапель крохмального клейстеру додають 1-2 краплі реактиву Люголя (розчин йоду з йодистим калієм).

2. ЛІПІДИ

Під терміном ліпіди (від грец. — жир) об’єднують жири й жироподібні речовини. Головним критерієм, за яким ці речовини об’єднали в одну групу, є те, що вони не розчиняються у воді, але добре розчиняються в неполярних органічних розчинних факторах: ефірі, бензині, хлороформі тощо. Ця властивість споріднює всі ліпіди. А за своєю структурою вони доволі істотно відрізняються одне від одного. Отже, ліпіди — це органічні сполуки з різною структурою, але спільними властивостями.

У живих організмах зустрічаються різні ліпіди, зокрема фосфоліпіди, жири та стероїди. Усі вони виконують важливі функції.

Серед ліпідів найпоширеніші й найбільш відомі — жири. Уміст жиру в клітинах зазвичай невеликий — 5-10 % (сухої речовини). Однак існують клітини, у яких міститься близько 90 % жиру. У тварин такі клітини перебувають під шкірою, у грудних залозах, чіпці (сальнику). Жир міститься в молоці всіх ссавців. У деяких рослин велика кількість жиру зосереджена в насінні та плодах, наприклад у соняшника, конопель, волоського горіха.

За хімічною структурою жири являють собою складні сполуки трьохатомного

спирту гліцеролу та високомолекулярних жирних кислот.

Жирні кислоти — це органічні сполуки, до складу яких входить карбоксильна група та довгий вуглеводневий хвіст.

Часто зустрічаються пальмітинова, стеаринова, олеїнова жирні кислоти.

Усі жирні кислоти поділяють на дві групи: насичені, тобто ті, які не містять подвійних зв'язків, і ненасичені, або негранічні, тобто ті, які містять подвійні зв'язки. До насичених кислот належать пальмітинова й стеаринова, а до ненасичених — олеїнова.

Взаємодія гліцеролу й жирних кислот призводить до утворення справжніх, або істинних, жирів — триацилгліцеролів.

Властивості жирів визначаються якісним складом жирних кислот та їхнім кількісним співвідношенням. Так, рослинні жири, або олії, багаті на негранічні жирні кислоти, тому в переважній більшості випадків вони є легкоплавкими — рідкими при кімнатній температурі. А тваринні жири при кімнатній температурі залишаються твердими, оскільки містять переважно насичені жирні кислоти.

Жири, або триацилгліцероли,— це природні органічні сполуки, які є естерами (складними ефірами) гліцеролу та жирних кислот. Триацилгліцероли являють собою форму накопичення жирів в організмі та є одним з основних джерел енергії, це найпоширеніші серед природних ліпідів. їх поділяють на жири, що залишаються твердими при температурі 20 °С, та олії, що перебувають при цій температурі в рідкій фазі.

Калорійність жирів вища, ніж калорійність вуглеводів, тому вони відкладаються в організмі тварин як запасна поживна речовина. Жир також служить для теплоізоляції й забезпечує плавучість. Одним із продуктів окиснення жирів є вода — деякі пустельні тварини запасають жир в організмі саме задля цієї мети. Олії найчастіше накопичуються рослинами (насіння соняшника, кокосової пальми тощо).

Особливо важливими жироподібними речовинами є фосфоліпіди. Це теж складні сполуки гліцеролу й жирних кислот, але від справжніх жирів вони відрізняються тим, що містять залишок ортофосфатної кислоти. Фосфоліпіди, завдяки своїй будові, мають здатність утворювати біліпідний шар, що є основою біологічних мембран.

Молекулярна маса фосфоліпідів становить усього кілька сотень дальто – нів. У молекулі розрізняють «голівку» й два «хвости». «Голівка» й «хвости» мають різні властивості. «Голівка» гідрофільна, тому що до її складу входить кисень і зв'язки поляризовані. Вода охоче взаємодіє з «голівками» фосфоліпідів. «Хвости» являють собою залишки жирних кислот, що містять багато CH_2-груп. «Хвости» гідрофобні, вони «намагаються» уникнути взаємодії з водою. Інакше кажучи, фосфоліпіди є амфіфільними речовинами.

Якщо молекули фосфоліпідів перебувають на поверхні води, то їхні «голівки» обернені до води, а «хвости» — виштовхуються з води назовні. При цьому молекули фосфоліпіду утворюють моношар — поверхневу плівку завтовшки в одну молекулу.

А якщо молекули фосфоліпідів перебувають повністю у воді, тоді «голівки» будуть обернені до води (назовні), а «хвости» — від води (усередину). Такі дрібні скупчення молекул — міцели — дійсно утворюються, але буває й по-іншому, коли сильно витягнута міцела може замкнутися. Тоді утворюється пухирець, усередині й зовні якого перебуває вода. Молекули фосфоліпідів у стінці такого пухирця утворюють бішар, тобто розташовуються у два ряди голівками до води, а хвости обернені один до одного.

«Жирні» неполярні частини молекул при цьому взаємодіють одна з одною, а полярні частини — з водою. Ліпідний бішар становить основу всіх клітинних мембран, однак, крім ліпідів, ці мембрани містять ще й білки.

2.1. Різноманітність ліпідів.

Окрім триацилгліцеролів і фосфоліпідів, існує багато інших ліпідів.

Важливу біологічну роль відіграють такі складні сполуки, як гліколі – піди, що утворені з вуглеводів та ліпідів. їх особливо багато в складі тканини мозку та нервових волокон.

До ліпідів належать деякі вітаміни (А, Б) і гормони (наприклад, статеві), а також такі сполуки, як лецитин і холестерин.

Стероїди й терпени побудовані з п’ятиатомних вуглеводневих будівельних блоків C_5H_8. З усіх стероїдів в організмі людини в найбільшій кількості наявний холестерол. Стероїдами також є статеві гормони (естроген, прогестерон, тестостерон), вітамін Б. До терпенів належать ароматичні речовини (ментол, камфора), натуральний каучук.

Воски — це естери жирних кислот і довголанцюгових спиртів. Тварини й рослини використовують їх як водовідштовхувальне покриття (бджолині стільники, покриття пір’я птахів, епідерміс деяких плодів і насіння).

2.2. Біологічні функції ліпідів.

Ліпіди дуже широко представлені в живій природі й відіграють надзвичайно важливу роль у клітині та організмі.

Структурна функція. Ліпіди беруть участь у побудові мембран клітин усіх органів і тканин. Вони беруть участь в утворенні багатьох біологічно важливих сполук.

Енергетична функція. Жири часто служать запасними поживними речовинами, виконуючи енергетичну функцію. Ліпіди забезпечують 25-30 % усієї енергії, необхідної

організму. При повному розпаді 1 г жиру виділяється 38,9 кДж енергії.

Функція запасання поживних речовин. Жири є свого роду «енергетичними консервами». Жировими депо можуть бути і крапля жиру всередині клітини, і «жирове тіло» у комах, і підшкірна клітковина, у якій накопичується жир у людини.

Терморегуляторна функція. Жири погано проводять тепло. Вони відкладаються під шкірою, утворюючи у деяких тварин величезні скупчення. Наприклад, у кита шар підшкірного жиру досягає 1 м. Це дозволяє теплокровній тварині жити у холодній воді полярного океану.

У багатьох ссавців є спеціальна жирова тканина, що відіграє роль терморегулятора, своєрідного біологічного «обігрівача». Цю тканину називають «бурим жиром». У ній виробляється енергія, що має для ссавців важливе значення в умовах життя при низьких температурах.

Жир може бути постачальником так званої ендогенної води. Із 1 кг жиру при його окисненні утворюється майже 1,1кг води. Завдяки цій воді існує багато пустельних тварин, наприклад піщанки, тушканчики. Жир, що накопичується в горбах у верблюда, теж є джерелом води.

Захисна функція. Шар жиру захищає ніжні органи від ударів і струсів (наприклад, навколониркова капсула, жирова подушка біля ока). Жироподібні сполуки покривають тонким шаром листя рослин, не даючи їм намокати під час рясних дощів.

Гормональна функція. Багато ліпідів є попередниками в біосинтезі гормонів. Наприклад, до ліпідів належать статеві гормони людини й тварин: естрадіол (жіночий гормон) і тестостерон (чоловічий гормон).

Із ненасичених жирних кислот у клітинах людини й тварин синтезуються такі регуляторні речовини, як простагландини. Вони мають широкий спектр біологічної активності: регулюють скорочення мускулатури внутрішніх органів, підтримують тонус судин, регулюють функції різних відділів мозку, наприклад центру теплорегуляції. Підвищення температури тіла під час деяких захворювань пов’язане з посиленням синтезу простагландинів і збудженням центру терморегуляції. Широко застосовуваний у медицині аспірин гальмує синтез простагландинів і в такий спосіб знижує температуру тіла.

Радикали ненасичених жирних кислот є хімічно активними. За місцем кратних зв’язків вони вступають в реакції приєднання, окиснення, полімеризації. Тому їх можна якісно виявити за допомогою бромної води (реакція приєднання), знебарвлення розчину перманганату калію (реакція окиснення).

2.3. Реакції ліпідів.

2.3.1. Розчинність жирів

У 5 сухій пробірок поміщають 3-4 краплі рослинного жиру. В першу пробірку додають 2-3 мл води; у другу – 2-3 мл бензину; у третю – 2-3 мл. хлороформу; в четверту – 2-3 мл ефіру, в п'яту – 2-3 мл ацетону. Струшують. Порівнюють розчинність жиру в органічних розчинниках і у воді.

Жири добре розчиняються в органічних розчинниках, але нерозчинні у воді. Пояснити, що відбувається з ліпідами у воді.

2.3.2. Емульгування жирів.

У 6 пробірок поміщають по 3-4 краплі рослинного жиру і по 3 мл води. Потім у другу пробірку додають декілька крапель 1% розчину їдкого калію, у третю – 1% розчину соди, в четверту – 1% розчину мила, у п'яту – розчину білка, у шосту – стільки ж жовчі. Перша пробірка, у яку нічого не додають, служить контролем.

Вміст усіх пробірок старанно перемішують струшуванням, ставлять за порядком у штатив і через 5 хв. спостерігають стійкість емульсії. Жири не розчиняються у воді, а дають нестійкі емульсії. При додаванні емульгаторів утворюється стійка емульсія.

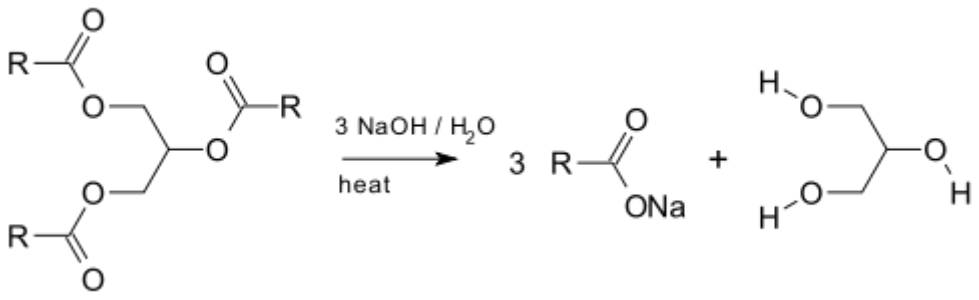
Встановлюють, який емульгатор найсильніший.

2.3.3. Гідроліз .(омилення, жиру)

1 мл рослинного жиру змішують у широкій пробірці з 20 мл спиртового розчину їдкого калію. Пробірку нагрівають на киплячій водяній бані, закривши корком з довгою скляною трубкою (зворотнім холодильником) до повного омилення. Показником цього може служити відсутність утворення жирних плям на поверхні води, в яку додана крапля гідролізату.

При лужному гідролізі жирів утворюються продукти їх нейтралізації лугом – солі жирних кислот, які називають милами, наприклад, $C_{17}H_{35}COOK$ – стеариновокислий калій (рідке мило).

Узагальнена реакція омилення жиру розчином гідроксиду натрію з утворенням милоподібних речовин та гліцерину:



2.3.4. Одержання вільних жирних кислот.

При додаванні до мила концентрованої хлоридної кислоти утворюються вільні жирні кислоти. Мила – солі вищих насичених та ненасичених органічних кислот. Тверде мило – суміш натрієвих солей пальмітинової, стеаринової та олеїнової кислот.

Після омилення розчин з досліду 2.3.3 розводять до об'єму 20 мл дистильованою водою, і таким чином одержують розчин калієвого мила, з яким виконують наступні досліди для визначення наявності в ньому гліцеролу, жирних кислот і одержання нерозчинних мил.

У пробірку з 2 мл розчину калієвого мила додають 0,5 мл концентрованої хлоридної кислоти (HCl). Жирні кислоти, що утворюються, нерозчинні у воді тому будуть збиратися на її поверхні.

$$C_{17}H_{35} - COOK + HCl \rightarrow C_{17}H_{35} - COOH + KCl$$

калієве мило стеаринова кислота

2.3.5. Якісна реакція на гліцерол (акролеїнова реакція)

При нагріванні гліцеролу з гідросульфатом калію відбувається дегідратація, у результаті якої гліцерин перетворюється в акролеїн – ненасичений альдегід етилового ряду зі специфічним запахом.

На дно двох пробірок кладуть декілька кристаликів $KHSO_4$, потім в одну пробірку вносять 5 крапель розчину калієвого мила, отриманого в досліді 7, в другу – 5 крапель гліцеролу, нагрівають у полум'ї пальника. Утворення акролеїну визначають за характерним запахом альдегіду – запах горілого сала.

2.3.6. Одержання нерозчинних мил.

При додаванні до розчину калієвого мила розчину барію хлориду ($BaC1_2$) і плюмбуму ацетату $(CH_3COO)_2Pb$ утворюються **нерозчинні солі жирних кислот**.

У 2 пробірки з 2 мл розчину калієвого мила вносять відповідно по 1 мл розчину $BaC1_2$ і $(CH_3COO)_2Pb$. Спостерігають утворення нерозчинних мил.

$$2\ KOOC - (CH_2)_{16} - CH_3 + BaCl_2 \rightarrow KCl + Ba\ [OOC - (CH_2)_{16} - CH_3]_2$$

барієва сіль жирної кислоти (нерозчине барієве мило)

Порядок виконання і звітування

Почергово провести всі реакції, описані в методичних вказівках.

Відобразити у звіті:

1) основні теоретичні відомості;
2) проведені біохімічні реакції та їх значення;
3) висновки, які повинні містити основні результати виконання роботи.

Підсумок

Після виконання лабораторної роботи студенти повинні знати принципи будови, функції та властивості вуглеводів і ліпідів, знати, у які взаємодії вступають ці речовини; уміти проводити відповідні біохімічні реакції.

Контрольні питання

1. Будова вуглеводів.
2. Чим зумовлені хімічні властивості вуглеводів?
3. Опишіть загальні реакції на вуглеводи.
4. Що показують реакції Фелінга та срібного дзеркала?
5. Яким чином можна виявити дезоксирибозу?
6. Будова ліпідів.
7. Чим зумовлені фізико-хімічні властивості ліпідів?
8. Які функції ліпідів у живих організмах?
9. Опишіть загальні реакції на ліпіди.
10. Як можна одержати вільні жирні кислоти?

Лабораторна робота № 2
Дослідження якісних реакцій на білки

Мета роботи – дослідити основні хімічні властивості білків та ознайомитись з якісними реакціями для їх визначення.

Задачі роботи:

1) опрацювати теоретичні відомості за темою роботи;

2) провести відповідні біохімічні реакції;

3) зробити висновки за підсумками роботи.

Теоретичні відомості і методичні вказівки

1. Хімічна природа білків

Білки – високомлекулярні органічні сполуки, що розщеплюються при гідролізі з утворенням амінокислот. До складу всіх білків входить 20 головних амінокислот. У білковій молекулі амінокислоти з'єднані пептидними зв'язками. При утворенні пептиднго зв'язку карбоксильна група однієї амінокислоти взаємодіє з амінною групою іншої, при цьому виділяється молекула води.

Розмаїтість, специфічність існуючих у природі білків залежать від особливостей амінокислотного складу і порядку розташування амінокислот у поліпептидному ланцюзі. Амінокислотний склад і порядок чергування амінокислот визначають структуру білка.

У структурі білка велике значення має також просторова конфігурація поліпептидного ланцюга, що має назву вторинної (наприклад, визначена спіралізованність поліпептидного ланцюга), третинної (визначене укладання спіралізованного поліпептиду у просторі) і четвертинної (асоціація декількох поліпептидних ланцюгів-субодиниць) структури.

Складна структурна організація пояснює високу специфічність білків.

У просторовій конфігурації білкової молекули мають значення різні типи зв'язків: водневі, гідрофобні, іонні, дисульфидні, афінні та ін.

Білки відрізняються за розчинністю. Розчини білків мають амфотерні властивості, оскільки містять одночасно карбоксильні й амінні групи. При дисоціації карбоксильних і амінних груп вони здобувають заряди. Значення pH, при якому сума негативних та позитивних зарядів білкової частки дорівнює нулю, називається ізоелектричною характеристикою.

Структура білків дуже лабильна і легко руйнується під впливом різних хімічних і фізичних впливів; при цьому змінюються біологічні і фізико-хімічні властивості білків.

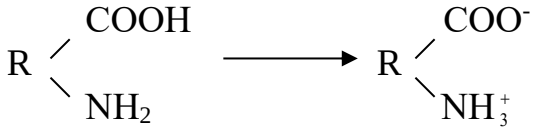
2. Фізико-хімічні властивості білків.

Білки – високомолекулярні сполуки (їхня молекулярна вага коливається від декількох тисяч до десятків мільйонів), більшість їх має гідрофільні властивості, тобто вони мають велику спорідненість до води.

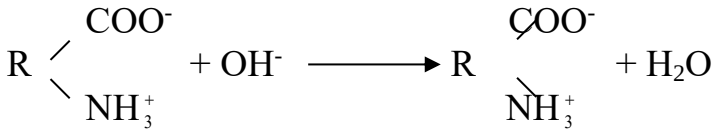
За сучасними уявленнями розчини молекул білків відповідають розмірам колоїдних часток (0,1- 0,001 мкм), т. ч. розчини білка мають властивості колоїдних розчинів. У відбитому світлі вони здатні до опалесценції, дають ефект Тиндаля (при бічному висвітленні видний світний конус), частки білка здебільшого не здатні проникати через напівпроникні мембрани.

Колоїдні розчини білка досить стійкі. Така стабільність білкових розчинів обумовлена двома основними факторами: по-перше, білкова частка несе електричний заряд, і, по-друге навколо білкової молекули утворюється щільна водяна оболонка, що складається з декількох шарів, які перешкоджають коагуляції (об'єднанню) білкових молекул і випаданню їх в осад. Присутність водяної оболонки обумовлена наявністю на поверхні білкової молекули великої кількості гідрофільних полярних груп, що зв'язують частки води.

Наявність електричного заряду обумовлена здатністю білкової молекули дисоціювати у водяних розчинах і давати іони. Білки, як і їхні структурні елементи – амінокислоти, завдяки одночасній присутності COOH-груп (кислотних) і NH_2-груп (основних) є амфолітами (амфотерними електролітами):



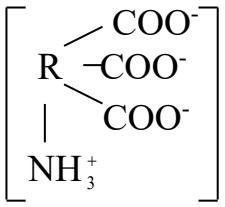
У кислотному середовищі вони виявляють основні властивості і несуть позитивний заряд (катіони):



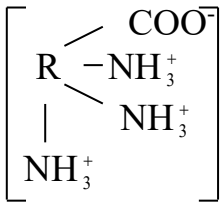
Оскільки білки мають різний амінокислотний склад, то в залежності від переваги в молекулі білка дикарбонових амінокислот (глутамінової, аспарагінової) або диамінокарбонових амінокислот (лізина, аргініна) білки у водяних розчинах мають, відповідно, властивості слабких кислот або слабких лугів. Більшість природних білків

мають кислий характер (альбуміни, глобуліни) і у водяному розчині несуть негативний заряд; основні білки (протаміни, гістони) у водяному розчині несуть позитивний заряд.

Схематично це можна представити в такий спосіб:



Кислий білок



Основний білок

При додаванні кислоти до водяного розчину білка його кислотна дисоціація знижується, відповідно до закону діючих мас, основна ж дисоціація відповідно підвищується, настає момент, коли кислотна дисоціація стає рівною лужній; загальний заряд білкової молекули при цьому стає найменшим, тому що в цьому випадку білкова частка несе на собі рівну кількість позитивних і негативних зарядів, що врівноважують один одне. При подальшому додаванні кислоти кислотна дисоціація білка ще більше придушується, і білок здобуває позитивний заряд (катіон); таким чином, відбувається перезарядження колоїдних часток. Навпаки, при дії лугів знижується лужна і підсилюється кислотна дисоціація, і білок заряджається негативно. Таке значення pH, при якому частки білка несуть рівну кількість позитивних і негативних зарядів (білок знаходиться в ізоелектричному стані), називається *ізоелектричною характеристикою*. У ізоелектричній характеристиці білок легко випадає в осад. Це можна пояснити тим, що в ізоелектричному стані білок позбавляється одного із стабілізуючих факторів і внаслідок зняття заряду припиняється взаємовідштовкування часток; під впливом міжмолекулярних сил притягання такі частки утворюють більш великі агрегати і випадають в осад.

Осадження білка з розчину може бути досягнуто багатьма прийомами. Реакціями осадження користаються для виявлення білка в розчині, для поділу білкових фракцій, а також для одержання безбілкових фільтрів.

3. Виконання лабораторної роботи

3.1. Якісні реакції на білки й амінокислоти.

Біуретова реакція (Піотровського). При додаванні до лужного розчину білка розчину сірчанокислої міді рідина здобуває червоно-фіолетове або синьо-фіолетове забарвлення. Реакція обумовлена присутністю в білку пептидних зв'язків, що з іонами міді утворюють забарвлені комплексні сполуки.

Забарвлення біуретового комплексу залежить від кількості мідної солі в розчині і від структури речовини, з яким зв'язується координаційно іон міді.

Біуретову реакцію дають білки, продукти розпаду білка – пептони і поліпептиди, які мають не менше двох пептидних зв'язків.

Хід роботи: у дві пробірки наливають: у першу – 5 крапель розчину 1% яєчного білка, у другу – 5 капель 1% розчину желатини. У пробірки додають по 5 крапель 10% NaOH і 1 краплю 1% розчину $CuSO_4$. З'являються стійке червоно-фіолетове (або синьо-фіолетове) забарвлення.

Нінгідринова реакція. Розчин білка при нагріванні з розведеним розчином нінгідрина забарвлюється в синій колір. Реакція обумовлена наявністю в білку залишків α-амінокислот. При взаємодії з нінгідрином α-амінокислоти окислюються і розпадаються з утворенням аміаку, альдегіду і вугільної кислоти. Нінгідрин відновлюється і конденсується з іншою часткою нінгидрина й аміаком. У результаті утворюється складна сполука мурексидного типу, забарвлена в синій колір.

Хід роботи: у дві пробірки наливають: у першу – 5 капель розчину 1% яєчного білка, у другу – 5 капель 1% розчину желатини. У кожну пробірку наливають 2-3 краплі 0,1 % розчину нінгідрина і кип'ятять. З'являється рожеве, червоне, а потім синє забарвлення.

Ксантопротеїнова реакція. При нагріванні розчину більшості білків з концентрованою азотною кислотою рідина забарвлюється в лимонно-жовтий колір, який переходить у лужному середовищи в оранжевий.

Реакція обумовлена присутністю в білку циклічних амінокислот- фенілаланіна, тирозина і триптофана, які при взаємодії з концентрованою азотною кислотою утворюють нітропохідні жовтого кольору (реакція нітрування). Останні при додаванні лугу перетворюються в солі хіноїдної структури, забарвлені в оранжевий колір. Білки, у яких циклічні амінокислоти відсутні, не дають ксантопротеїнової реакції. До таких білків відносяться: желатина, клупеїн, сальмин і ін.

Хід роботи: у дві пробірки наливають: у першу – 5 капель розчину 1% яєчного білка, у другу – 5 капель 1% розчину желатини. В усі пробірки додають по 2-3 краплі концентрованої азотної кислоти і обережно нагрівають. У першій пробірці – лимонно-жовте забарвлення. Потім до охолоджених пробірок додають по 10 крапель концентрованого NH_3, або 30% NaOH. В пробірці з яєчним білком лимонно-жовте забарвлення змінюється на оранжеве.

Реакція на тирозин (Міллона). При нагріванні розчинів більшості білків з реактивом Міллона, що складається із суміші азотнокислої ртуті з азотистою кислотою, утворюється осад білка, забарвлений у червоний колір. Реакція обумовлена присутністю в

білку циклічної амінокислоти тирозину, яка при взаємодії з реактивом Міллона дає ртутну сіль свого нітропохідного, пофарбовану в червоний колір. Білки, що не містять тирозину (желатина, клупеїн, сальмин і ін.) не дають реакцію Міллона. Якщо реакцію Міллона роблять з розчином тирозину, то осад не утворюється, але рідина рівномірно забарвлюється в червоний колір. Цю реакцію широко використовують для кількісного визначення тирозину в гідролізатах білка і для визначення деяких похідних тирозину, що дають цю реакцію.

Реакція Міллона не є строго специфічною для тирозину. Її дають феноли, поліфеноли, а також алкалоїди, що мають фенольне угруповання. Однак усі ці речовини відсутні у молекулі білка.

Хід роботи: у 2 пробірки наливають: у першу – 5 капель 1% розчину яєчного білка, у другу – 5 капель 1% розчину желатини. У пробірки додають 1-2 краплі реактиву Міллона та обережно нагрівають до червоного забарвлення.

Реакція Фоля. При нагріванні розчинів білка з лугом і плюмбітом рідина забарвлюється в бурий або чорний колір. Реакція обумовлена присутністю в білку сірчастих амінокислот: цистина, цистеїна та метіоніна, які під впливом лугу руйнуються з утворенням сірчистого натрію; останній із плюмбитом утворює чорний осад сірчистого свинцю. Інтенсивність забарвлення залежить від кількості сірчистих амінокислот у білку і від концентрації білка в розчині.

Хід роботи: у 2 пробірки наливають: у першу – 5 капель 1% розчину яєчного білка, у другу – 5 капель 1% розчину желатини. У пробірки додають по 5 капель 30% їдкого натру і по 1 краплі 5% розчину оцтовокислого свинцю. При тривалому нагріванні випадає бурий або чорний осад сірчистого свинцю.

3.2. Реакції осадження білків.

Для осадження білка потрібно позбавити його факторів, що утримують його в розчині, використовуючи різні агенти, що знижують заряд, або руйнують гідратну оболонку білкової частки.

При вивченні реакцій осадження білка варто познайомитися з поняттям денатурації. З білками під впливом зміни pH, підвищення температури, випромінювання різних довжин хвиль, радіоактивного випромінювання, а також ряду хімічних речовин (органічні розчинники, важкі метали й ін.) відбуваються глибокі зміни в просторовій нативній структурі молекули, у результаті яких різко зменшується здатність білка розчинятися в звичайних для них розчинниках (вода, сольові розчини й ін.). Білки при цьому втрачають

свої гідрофільні властивості і здобувають гідрофобні. Пептидні зв'язки в білках при денатурації не гідролізуються.

Фактично процес денатурації білка зводиться до руйнування нативної вторинної і третинної структури білка, при цьому білкова молекула, як правило, утрачає свої біологічні властивості.

Реакції осадження білків дуже різноманітні, однак їх можна розділити на дві групи:

1) практично незворотні реакції осадження, при яких в білках відбуваються глибокі зміни, внаслідок чого вони не можуть бути знову розчинені в первісному розчиннику. У цьому випадку має місце денатурація білка. До незворотних реакцій відносяться осадження білка солями важких металів, алкалоїдними реактивами, мінеральними та органічними кислотами й осадження при нагріванні.

2) зворотні реакції осадження, при яких білки, що осаджуються, не піддаються глибоким змінам і тому одержані осади білків можуть бути розчинені в первісному розчиннику. Молекула білка при цьому зберігає свої первісні нативні, включаючи біологічні, властивості і не піддається помітній денатурації.

До зворотних реакцій осадження слід віднести осадження білків органічними розчинниками (спиртом, ацетоном) і висалювання білків (осадження під впливом концентрованих розчинів нейтральних солей: NH_4Cl, NaCl, $(NH_4Cl)_2SO_4$ і ін.).

Осадження білка при нагріванні. Майже усі білки денатурують при нагріванні (50 – 55 °С и вище). Механізм теплової денатурації зв'язаний з перебудовою структури білкової молекули, у результаті якої білок утрачає свої нативні властивості, зменшується його розчинність (зменшення гідрофільних властивостей веде до порушення гідратної оболонки). Присутність солей і концентрація водневих іонів відіграють важливу роль у випаданні в осад денатурованого при нагріванні білка. Найбільш повне і швидке осадження відбувається в ізоелектричній характеристиці білка, тобто при такій величині pH, коли колоїдні частки білка є найменш стійкими. Тому для повного осадження білка при нагріванні слід створювати реакцію середовища, що відповідає його ізоелектричній характеристиці.

Білки, що мають кислі властивості, осаджують у слабокислому середовищі, білки, які мають лужні властивості, – у слаболужному середовищі.

У сильно кислих (за винятком азотної, трихлороцтової і сульфосаліцилової кислот) і сильно лужних розчинах денатурований при нагріванні білок не випадає в осад, тому що частки білка перезаряджуються (або відбувається посилення наявного заряду) і несуть у першому випадку негативний заряд, що підвищує їхню стійкість у розчині в результаті

електричних сил відштовхування. Тому в сильно кислих і в сильно лужних розчинах білки звичайно не випадають в осад при нагріванні. Однак у сильно кислих розчинах білки при нагріванні можуть коагулювати при додаванні достатньої кількості якої-небудь нейтральної солі. Ступінь впливу іонів нейтральних солей на білок, що осаджується, залежить від їхньої здатності адсорбуватися на частках білка. Адсорбовані іони солі (якщо вони протилежні за знаком заряду колоїдної частки) нейтралізують заряд частки; настає момент, коли сили притяжіння між молекулами перевищують сили відштовхування, і білок випадає в осад.

Хід роботи.

У 5 пронумерованих пробірок наливають по 10 капель 1% розчину яєчного білка.

Вміст першої пробірки нагрівають на газовому пальнику. Рідина каламутніє, але завдяки тому, що частки денатурованого білка несуть заряд, вони утримуються в зваженому стані (яєчний альбумін є кислим білком і в нейтральному середовищі заряджається негативно).

У пробірку 2 додають 1 краплю 1 % розчину оцтової кислоти і нагрівають. Випадає осад білка внаслідок того, що білок втрачає заряд і наближається до ізоелектричного стану.

У пробірку 3 додають 1 краплю 10 % розчину оцтової кислоти і вміст пробірки нагрівають. Осад білка не утвориться навіть при кип'ятінні, тому що в сильно кислому середовищі частки білка перезаряджаються, здобуваючи позитивний заряд.

У пробірку 4 додають 1 краплю 10 % розчину оцтової кислоти і 1 краплю насиченого розчину хлориду натрію. Утвориться осад білка завдяки адсорбції іонів хлориду натрію (утворення подвійного електричного шару) і нейтралізації позитивного заряду на частках білка.

У пробірку 5 додають 1 краплю 10 % розчину їдкого натру і нагрівають. Осаду білка не утвориться навіть при кип'ятінні, тому що в лужному середовищі негативний заряд на частці білка підсилюється.

Результати роботи вносять у таблицю 1.

Таблиця 1

Нейтральне середовище	Слабокисле середовище (1 % CH_3COOH)	***Кисле середовище*** (10 % CH_3COOH)	Кисле середовище + електроліт (10 % CH_3COOH + NaCl)	Лужне середовище (10 % NaOH)

Осадження білка органічними розчинниками. Білки нерозчинні в багатьох органічних розчинниках (спирт, ацетон, ефір і ін.). Однак їхнє осадження відбувається тільки з нейтральних і слабокислих розчинів і особливо повно в присутності електролітів (іони солі зв'язуються колоїдними частками білка і знімають заряд). Органічні розчинники дегідратують частки білка (руйнують водяну оболонку) і тим самим знижують їхню стійкість у розчині.

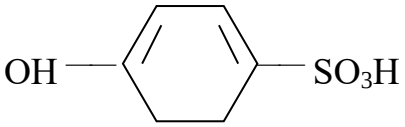
Короткочасний вплив органічних розчинників зберігає білок у природному стані; при тривалій дії спирта білок піддається денатурації.

Хід роботи. У пробірку наливають 5 крапель 1 % розчину яєчного білка і 20 крапель спирту або ацетону; розчин каламутніє. При додаванні декількох крапель насиченого розчину хлориду натрію випадає осад білка.

Осадження білка концентрованими мінеральними кислотами. Осадження білка концентрованими мінеральними кислотами (крім H_3PO_4) обумовлене як явищами дегідратації білкових часток, так і деякими іншими чинниками (наприклад, денатурацією, утворенням солей і ін.). У надлишку сірчаної або соляної кислот, а також при їхньому тривалому впливі, осад денатурованого білка, що випав, розчиняється за рахунок перезарядження білка і часткового гідролізу. У надлишку азотної кислоти цього розчинення не відбувається (точний механізм цього явища не встановлений; можливо, іон NO_3^- заважає перезарядженню білкової млекули). Реакція осадження білка азотною кислотою використовується при клінічних дослідженнях сечі на присутність і кількісний вміст у ній білка.

Хід роботи. У три пробірки наливають по 15-20 крапель концентрованої соляної, сірчаної й азотної кислоти. Потім, нахиливши пробірку під кутом 45°, обережно по стінці пробірки (щоб рідини не змішувалися) наливають рівний об’єм розчину білка. На межі двох шарів рідини з'являється осад білка у вигляді тонкої плівки. Обережно струшуючи пробірки, виявляють розчинення осаду у випадку осадження соляною і сірчаною кислотами, у пробірці з азотною кислотою білок не розчиняється.

Осадження білка органічними кислотами. Білки з розчинів можуть осаджуватися органічними кислотами, однак різні органічні кислоти неоднаково діють на білок. Трихлороцтова (CCl_3COOH) і сульфосаліцилова кислоти є дуже чуттєвими і специфічними реактивами на білок і тому широко використовуються в клінічній практиці для доказу наявності білка в біологічних рідинах (сеча, ексудати, трансудати й ін.), тобто застосовуються в діагностичних і прогностичних цілях.





сульфосаліцилова кислота

Органічні кислоти використовуються, крім того, при визначенні залишкового азоту в сироватці крові, що є важливим показником інтенсивності обмінних процесів, які протікають в організмі людини. При ряді захворювань (інфекційні, гіперфункція щитовидної залози, рак і ін.) має місце різке посилення процесів розпаду білків, наслідком чого є збільшення кількості залишкового азоту в крові, для визначення якого використовується трихлороцтова кислота. Сульфосаліцилова кислота осаджує не тільки білки, але і високомолекулярні поліпептиди. Механізм осадження білків органічними кислотами обумовлений дегідратацією білкової молекули і зняттям заряду.

Хід роботи. У дві пробірки наливають по 5 крапель 1 % розчину білка, в одну пробірку додають 1-2 краплі 10 % розчину сульфосаліцилової, в іншу 1-2 краплі 10 % розчину трихлороцтової кислоти. У пробірках утвориться осад білка.

Осадження білка алкалоїдними реактивами. Осадження білка «алкалоїдними» реактивами обумовлено наявністю в білку азотистих гетероциклічних угруповань, аналогічних тим, що знаходяться в молекулі алкалоїдів (пірольних, індольных, імідазольних і ін.). Більш повне осадження спостерігається при перезарядженні білкової молекули на позитивний заряд (підкислення), що полегшує взаємодію білка з негативно зарядженими іонами осаджувача. Алкалоїди знайшли застосування при лікуванні опіків. Обробка алкалоїдами ураженої поверхні призводить до денатурації білків і утворенню захисного шару, що перешкоджає зневоднюванню тканин і проникненню інфекції.

Хід роботи. У три пробірки наливають по 5 крапель 1 % розчину яєчного білка, по 1 краплі 1 % розчину оцтової кислоти і по 2-3 краплі в першу пробірку 10 % розчину пікринової кислоти, у другу – насиченого розчину таніна, у третю – 5 % розчину железістосинеродістого калію. В усіх пробірках білок випадає в осад.

Осадження білка солями важких металів. При дії солей важких металів на розчини білка відбувається денатурація білкової молекули. Осадження денатурованого білка обумовлено адсорбцією важкого металу на поверхні білкової молекули й утворенням нерозчинних комплексів.

Властивості білків зв'язувати важкі метали використовуються в медичній практиці; білки застосовують як протиотруту при отруєнні солями ртуті, свинцю, міді й інших металів. Білок обмежує всмоктування важкого металу, утворюючи з ним нерозчинні комплекси.

Слід зазначити, що за осадження білків деякими солями важких металів, наприклад, оцетокислим свинцем і сульфатом міді, надлишок цих солей веде до розчинення (пептизації) спочатку утвореного осаду, що зв'язано з адсорбцією важкого металу на поверхні колоїдних часток і появою позитивного заряду на молекулі білка. При надлишку солей срібла і ртуті пептизація не спостерігається.

Хід роботи. У три пробірки вносять по 5 крапель 1 % розчину яєчного білка і по одній краплі в першу пробірку 7 % розчину сульфату міді, у другу – 5 % розчину оцетокислого свинцю, у третю – 5 % нітрату срібла. В усіх пробірках утворюється осад.

У першу пробірку додають ще 5-10 крапель 7 % розчину сульфату міді, при цьому спостерігається розчинення осаду. У третю пробірку вносять 5-10 крапель 5 % розчину нітрату срібла. Розчинення осаду не відбувається. Результати роботи вносять у табл. 2.

Таблиця 2

Назва груп осаджувачів	Реагенти	Характер і колір осаду	Чим обумовлена реакція
Органічні розчинники Концентровані мінеральні кислоти Алкалоїдні реактиви Органічні реактиви Солі важких металів			

Порядок виконання і звітування

Почергово провести всі реакції, описані в методичних вказівках.

Відобразити у звіті:

4) основні теоретичні відомості;
5) проведені біохімічні реакції та їх значення;
6) висновки, які повинні містити основні результати виконання роботи.

Підсумок

Після виконання лабораторної роботи студенти повинні знати будову і склад білків, їх фізико-хімічні властивості; уміти проводити якісні реакції на білки та робити висновки на їх підставі.

Контрольні питання

1. Будова білків.
2. Функції білків.
3. Фізичні властивості білків.

4. Хімічні властивості білків.
5. Чим зумовлені хімічні властивості білків?
6. Які реакції з білками є якісними?
7. Опишіть реакцію Фоля.
8. Які реакції викликають осадження білків?

Лабораторна робота № 3
Дослідження буферних систем

Мета і задачі:

Мета роботи – дослідити основні хімічні властивості буферних розчинів на основі органічних речовин.

Задачі роботи:

1) опрацювати теоретичні відомості за темою роботи;

2) провести дослідження буферних систем;

3) зробити висновки за підсумками роботи.

Теоретичні відомості і методичні вказівки

Буферні розчини – це розчини, які здатні досить стійко зберігати сталість концентрації іонів гідрогену при додаванні до них деякої кількості сильної кислоти або лугу, при розведенні або концентруванні. Здатність стійко зберігати сталість *pH* називається буферною дією.

Буферні системи бувають кислотні, основні та амфолітні. Кислотні складаються зі слабкої кислоти і її солі із сильною основою. Основні – зі слабкої основи і її солі із сильною кислотою. Наприклад, ацетатний буферний розчин містить слабку оцтову кислоту й ацетат натрію; аміачний буферний розчин – слабку основу гідроксид амонію й хлорид амонію. Амфолітні – розчини амінокислот або білків.

Найчастіше буферні системи – це суміш розчинів:

а) слабкої кислоти (наприклад, CH_3COOH, H_2CO_3) і добре дисоційованої солі цієї кислоти, утвореної при взаємодії із сильною основою (CH_3COONa і $NaHCO_3$, відповідно**);**

б) слабкої основи (наприклад NH_4OH) і добре дисоційованої солі цієї основи, утвореної при взаємодії із сильною кислотою (NH_4Cl);

в) солей багатоосновних кислот утвореними при взаємодії із сильною основою, але із різним ступенем заміщення атомів водню (наприклад, Na_2HPO_4 і NaH_2PO_4).

Буферну дію проявляють також розчини амфолітів – речовин, які мають у своїй структурі одночасно як кислотні, так і основні функціональні групи. Звичайно це речовини високомолекулярних органічних полімерів, зокрема білків, які мають групи -COOH і $-NH_2$.

Механізм буферної дії.

Розглянемо ацетатний буфер, що складається із суміші розчинів CH_3COOH і CH_3COONa. У розчині проходить дисоціація речовин:

$$CH_3COOH \leftrightarrow CH_3COO^- + H^+ \quad (1)$$

$$CH_3COONa \leftrightarrow CH_3COO^- + Na^+$$

Оцтовокислий натрій є сильним електролітом, який практично повністю дисоційований на іони. Оцтова кислота є слабким електролітом, до того ж у присутності надлишку у розчині аніону солі CH_3COO^-, дисоціація оцтової кислоти пригнічується і стає незначною. Таким чином, концентрація кислоти у розчині буде представлена молекулярною формою CH_3COOH, а концентрація солі-аніоном CH_3COO^-.

Якщо до такого розчину добавити сильну кислоту, то йони водню будуть взаємодіяти із йоном солі, утворюючи слабо дисоційовану оцтову кислоту:

$$CH_3COO^- + H^+ \leftrightarrow CH_3COO^-$$

Отже, сильна кислота замінюється еквівалентною кількістю слабкої кислоти.

Якщо до буферного розчину добавляти сильну основу, то йони OH^- будуть нейтралізуватись оцтовою кислотою з утворенням аніону солі:

$$CH_3COOH + OH^- \leftrightarrow CH_3COO^- + H_2O$$

У обох випадках концентрація іонів H^+, а значить і pH, практично не змінюється.

Подібним чином пояснюється також буферна дія суміші розчинів солей багатоосновних кислот. У випадку фосфатної буферної системи однозаміщена сіль NaH_2PO_4 виступає як слабка кислота, а двохзаміщена Na_2HPO_4 – як сіль:

$$NaH_2PO_4 \leftrightarrow Na^+ + H_2PO_4^- \leftrightarrow H^+ + HPO_4^{2-}$$

$$Na_2HPO_4 \leftrightarrow 2Na^+ + HPO_4^-$$

Ступінь дисоціації йону HPO_4^{2-} є незначною у порівнянні із такою ж величиною: $H_2PO_4^-$.

pH буферних систем.

Розглянемо чим визначається величина pH буферної системи на прикладі ацетатного буфера.

У розчині оцтової кислоти існує рівновага:

$$CH_3COOH \leftrightarrow CH_3COO^- + H^+$$

Згідно закону діючих мас константа електролітичної дисоціації К складає:

$$K_a = [CH_3COO^-][H^+] / [CH_3COOH]$$

Звідси концентрація іонів водню:

$$[H^+] = K_a ([CH_3COOH] / [CH_3COO^-])$$

Отже, концентрація іонів H^+ у розчині залежить від величини константи дисоціації кислоти і співвідношення концентрації недисоційованих молекул кислоти і аніонів кислоти.

Позаяк у буферному розчині концентрація аніону CH_3COO^- визначається в основному концентрацією повністю дисоційованої солі, а концентрація кислоти – концентрацією недисоційованих молекул CH_3COOH, то можна записати:

$$[CH_3COOH]=[Na]=[сіль]$$

$$[CH_3COO^-]=[кислота], \text{ і тоді}$$

$$[H^+]=K_a ([кислота]/[сіль]) \text{ або у логарифмічному вигляді}$$

$$\lg[H^+]=\lg K_a +\lg([кислота]/[сіль])$$

оскільки pH= -lg[H^+], то

$$pH= -(\lg K_a +\lg([кислота]/[сіль]))$$

Приймаючи p K_a = -lgK_a

$$pH=pK_a +\lg([сіль]/[кислота])$$

Останнє рівняння носить назву Гендерсона-Хассельбаха.

Подібним чином може бути виведено рівняння pH і для аміачної буферної системи із слабкої основи NH_4OH і її солі NH_4Cl

$$[OH^-]=K_в ([основа/сіль])$$

$$pOH=pK_в +\lg([основа/сіль])$$

$$pH=14-pOH$$

Властивості буферних систем

Із рівнянь приведених вище, випливає, що pH даної буферної системи не залежить від абсолютної концентрації компонентів, а тільки від співвідношення їх концентрацій (кислоти і солі, основи і солі).

Тому при розведенні буферної системи незважаючи на зменшення концентрації складових компонентів, їх співвідношення не змінюється і, отже pH, також не змінюється.

Іншою важливою кількісною характеристикою буферних систем є буферна ємність. Здатність буферних систем підтримувати постійне значення pH не є безмежною. Ця межа і визначається буферною ємністю. Вона дорівнює числу молів сильної кислоти, або сильного лугу, яке потрібно добавити до 1 л буферного розчину, щоб змінити його pH на одиницю. в=A/ ρH_1 - ρH_2 , де A – кількість молярних мас еквіваленту кислоти або лугу.

Буферна ємність залежить як від абсолютної концентрації компонентів, так і від їх співвідношення. Тому при розведенні буферної системи буферна ємність зменшується. Найбільшою буферною ємністю дана буферна система володіє при однаковій концентрації компонентів, коли співвідношення [кислота]/[сіль] =1

Можливість підтримувати сталу величину pH для буферних систему в певному діапазоні pH визначається величиною константи дисоціації. Цей діапазон прийнято як величину $pK_д \pm 1$.

Наприклад $pK_д$ CH_3COOH складає $1{,}8 \cdot 10^{-5}$

$$pK\ CH_3COOH = -\lg 1{,}8 \cdot 10^{-5} = 4{,}75$$

Отже, ацетатну буферну систему можна використовувати у межах pH , що складає $4{,}75 \pm 1$, тобто від 3,75 до 5.75

Різноманітні буферні системи знайшли широке застосування у лабораторній практиці для проведення досліджень при певних значеннях pH у біохімії, мікробіології, агрохімії, тощо.

Значення буферних систем для живих організмів

Живі організми володіють властивістю підтримувати постійність окремих параметрів свого внутрішнього середовища (гомеостаз), в т.ч. і pH. Так, pH крові людини і більшості видів теплокровних тварин коливається в межах 7,35-7,45. Різкі зміни pH є небезпечними для життя. На величину pH крові впливають як речовини, що можуть поступити із зовнішнього середовища , так і ті, які утворюються в організмі внаслідок життєдіяльності у процесах обміну речовин. Значні кількості соляної кислоти утворюються у шлунку людини і моногастричних тварин, де pH підтримується нижче 2,0. Оцтова, пропіонова і масляна кислоти постійно утворюються у передшлунках жуйних тварин, як продукти бродіння. Молочна, піровиноградна і вугільна кислоти та аміак є нормальними продуктами внутрішньотканинного метаболізму вуглеводів, жирів і білків.

Для підтримання pH середовища у крові і тканинах організмів функціонує декілька основних буферних систем:

Гідрокарбонатна $H_2CO_3 / NaHCO_3$;

Фосфатна NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4;

Білкова $Б-COOH$ /$Б\text{-}COONa$

Гемоглобінова і оксигемоглобінова у вигляді вільного гемоглобіну та оксигемоглобіну і]х солей з K^+. Крім того, білкова буферна система може функціонувати як амфоліт, зв′язуючи іони H^+ і OH^- своїми функціональними групами.

Гідрокарбонатна буферна система найбільш потужна у плазмі крові і позаклітинній рідині, фосфатна буферна система більше внутрішньоклітинним буфером. Усі буферні системи крові взаємно поєднані одна з одною, що забезпечує більш ефективний механізм підтримання pH на сталому рівні як у здорових організмів, так і при різних захворюваннях. При порушенні функціонування буферних систем зменшується їх буферна ємність і може наступити зміна pH крові. Такі зрушення кислотно-основної рівноваги крові носять назву ацидоз – зрушення в бік зниження pH і алкалоз – зрушення в бік підвищення pH. Контроль за параметрами кислотно-основного стану організмів при захворюваннях людини і тварин має велике значення і здійснюється лабораторіями клінічної біохімії у медицині і ветеринарії.

Виконання лабораторної роботи

Виготовлення і визначення pH ацетатного та фосфатного буферних розчинів.

Буферні розчини готують змішуванням у різних співвідношеннях відповідних розчинів. Для виготовлення ацетатного буферу – це 0,1 м розчини CH_3COOH і CH_3COONa; для фосфатного – 0,1 М розчини KH_2PO_4 і Na_2HPO_4.

Для виготовлення кожного з них беруть по 7 пробірок однакового розміру. За схемою таблиці № 1 у кожну пробірку відмірюють певні об'єми розчинів кислоти і солі. Для фосфатного буферу як кислоту використовують розчин. У кожну пробірку додають по 10 крапель індикатора (для ацетатного буферу – метиловий червоний, для фосфатного – бромтимоловий синій).

Вміст кожної пробірки добре розмішують і визначають pH за допомогою шкали еталонів, одержані дані записують у таблицю в графу “колориметрично”, а також інструментально – за допомогою pH-метра. Для кожної пробірки проводять обчислення PH за формулою:

$$pH = -\left(\lg K + \lg\left[\frac{кислота}{сіль}\right]\right)$$

і далі також записують у таблицю в графу “розраховано”. Порівнюють результати експериментально визначені із теоретично розрахованими. При відомих концентрація розчинів і співвідношеннях компонентів буферної системи математичний розрахунок величини pH дає точні результати.

Таблиця 1 – Результати дослідження буферних систем

№ пробірки	Кислота, мл	сіль, мл	Результати визначення pH			
			ацетатний буфер		фосфатний буфер	
			колориметрично та інструментально	розраховано	колориметрично та інструментально	розраховано
1	9	1				
2	7	3				
3	6	4				
4	5	5				
5	4	6				
6	3	7				
7	1	9				

Додаткові відомості:

$$K_{CH_3COOH} = 1{,}8 \times 10^{-5}$$

$$K_{H_2PO_4^-} = 2 \times 10^{-7}$$

Таблиця логарифмів

число	логарифм	число	логарифм
1	0,00	8	0,90
2	0,30	9	0,95
3	0,47	10	1,00
4	0,60	1,8	0,25
5	0,69	10^{-5}	-5
6	0,77	10^{-7}	-7
7	0,84		

Дослідження властивостей буферних розчинів.

а) Вплив розведення на pH буферної системи.

Готують буферний розчин змішуванням по 50 мл. 0,1 н розчину CH_3COOH і CH_3COONa. Відбирають в окрему склянку 25 мл цієї суміші і розбавляють 25 мл дистильованої води (співвідношення 1:1). Відмірюють по 10 мл. нерозбавленої і розбавленої 1:1 буферних систем в окремі пробірки і визначають pH колориметрично, як у попередньому досліді з індикатором метиловим червоним. Роблять висновок про вплив розбавлення на pH буферної системи.

б) Визначення буферної ємності розбавленої і нерозбавленої буферних систем.

Для дослідження використовують буферні розчини з попереднього досліду. У дві склянки відмірюють окремо по 10 мл. відповідних буферних розчинів. В обидві додають по

2 краплі розчину фенолфталеїну і фільтрують 0,1 н розчином до появи слабо рожевого забарвлення. Така кінцева точка титрування відповідає величині pH 9. Таким чином pH_2=9, величину pH_1 беруть із досліду *а*.

Буферна ємність розраховується за формулою:

$$в=A/pH_2 - pH_1$$

де А – кількість молярних мас еквіваленту NaOH, що витрачена на титрування 1л буферного розчину.

В свою чергу ця величина розраховується за формулою:

$$A=vNaOH \cdot cNaOH \cdot 100/1000,$$

де vNaOH – кількість мл розчину NaOH, що витрачена на титрування;

cNaOH – його концентрація (0,1 моль-екв/л)

Роблять висновок про вплив розведення на буферну ємність.

Порядок виконання і звітування

Здійснити виготовлення і визначення pH ацетатного, фосфатного та буферних розчинів згідно методичних вказівок.

Провести дослідження властивостей буферних розчинів згідно методичних вказівок.

Відобразити у звіті:

7) основні теоретичні відомості;
8) порядок виконання дослідів;
9) висновки, які повинні містити основні результати виконання роботи.

Підсумок

Після виконання лабораторної роботи студенти повинні знати склад основних буферних систем організму, механізм їх дії, вплив на них кислотних і основних факторів; уміти готувати буферні розчини, розраховувати значення *pH* цих розчинів за їх складом та розраховувати співвідношення компонентів буферного розчину за заданим значенням *pH*.

Контрольні питання

1. Що таке іонний добуток води? Що таке pH? Чому дорівнює pH нейтрального, кислого і лужного розчинів?
2. Що таке буферні розчини, їх властивості?
3. Що таке буферна ємність?
4. Що таке гідроліз, константа гідролізу, ступінь гідролізу?
5. Якими методами вимірюють величину pH (водневий показник)?

6. Назвіть основні буферні системи живих організмів.
7. В чому суть механізму дії буферних розчинів?
8. Як впливає розбавлення буферного розчину на його pH та буферну ємність?
9. Який pH крові? Як він утримуєтеться?
10. Як залежать буферні властивості розчину від концентрації компонентів?

Лабораторна робота № 4
Дослідження ферментів та імуноферментний аналіз

Мета роботи – дослідити основні хімічні властивості ферментів.

Задачі роботи:

1) опрацювати теоретичні відомості за темою роботи;

2) провести відповідні біохімічні реакції;

3) зробити висновки за підсумками роботи.

Теоретичні відомості і методичні вказівки

1. Властивості та класифікація ферментів.

Ферментами називаються специфічні білки, що відіграють роль біологічних каталізаторів. Вони входять до складу всіх клітин і тканин живих організмів. Завдяки ферментам обмін речовин у живому організмі протікає великою швидкістю при звичайній температурі тіла і без участі сильнодіючих хімічних реагентів.

Відповідно до сучасних представлень ферменти збільшують швидкість хімічної реакції, знижуючи енергетичний бар'єр даної реакції.

Характерні властивості ферментів:

1. Залежність активності ферменту від величини pH;

2. Специфічність дії;

3. Термолабільність і температурний оптимум дії ферментів;

4. Вплив на активність ферментів різних речовин – активаторів і інгібіторів.

Відповідно до рекомендацій Міжнародного біохімічного союзу (1961 р.) усі фермени розділені на 6 класів.

1. Оксидоредуктази. каталізують окислювально-відновлювальні реакції. Оксидоредуктази підрозділені на 2 великі групи: а) дегидрогенази, що каталізують процес окислення органічних речовин шляхом відняття водню і переносу його на інший субстрат; б) оксидази, що каталізують перенос водню від субстрату, який піддівся окисленню, на кисень; в) цитохроми, а також каталаза та пероксидаза.

2. Трансферази. Ці ферменти каталізують реакції переносу хімічних груп (аміногруп, залишків фосфорної кислоти, метильних груп і т.д.)

3. Гідролази. Каталізують реакції гідролітичного розпаду складних сполук на більш прості. До цього класу відносяться численні ферменти, що діють на складноефірні зв'язки (естерази, ліпази), глікозильні сполуки (глікозидази), пептидні зв'язки (пептидази або пептиділгідролази), кислотноангідридні (полі- фосфатази) і ін.

4. Ліази. Каталізують негідролітичне відщеплення від субстратів хімічних груп з утворенням подвійного зв'язку.

5. Ізомерази. Ферменти, які віднесені до цього класу, каталізують різноманітні реакції ізомеризації, наприклад, перетворення цисформи в трансформу, взаємоперетворення альдоз і кетоз, внутрішньомолекулярний перенос груп (в останньому випадку ферменти називаються мутазами) і т.д.

6. Лігази (синтетази). Каталізують приєднання молекул одну до одної, спряження, пов'язане з розривом пірофосфорного зв'язку в молекулі АТФ (або аналогічних трифосфатів). Сюди відносяться ферменти, що утворять зв'язки між молекулами вуглецю і кисню, сірки, азоту або між молекулами вуглецю.

Крім цієї класифікації існують і інші. За структурою ферменти класифікуються на два класи: однокомпонентні (протеїни), до яких відносяться більшість гідролаз і двокомпонентні (протеїди, що складаються з білка-апоферменту і коферментної групи) до яких відносяться дегідрогенази, трансферази і багато інших ферментів.

2. Вивчення термолабільності ферментів.

Ферменти відрізняються від інших каталізаторів здатністю руйнуватися під час нагрівання – ця властивість називається термолабільністю.

Хід роботи. У дві пробірки наливають по 5 крапель слини і по 20 крапель дистильованої води (розведення 1:5). В одній пробірці розчин слини кип'ятять 2-3 хвилини і охолоджують під струмом водопровідної води, а в іншій – залишають без кип'ятіння. В обидві пробірки додають по 10 крапель 0,5% розчину крохмалю, рідину в пробірці перемішують і залишають при кімнатній температурі. Через 5 хвилин вміст кожної пробірки поділяють на дві частини: з однією частиною робляють реакцію з йодом на крохмаль, з іншою – пробу Фелінга і Тромера на цукор (мальтоза, глюкоза).

3. Вплив pH на активність амілази.

Активність ферментів виявляється в межах досить вузької зони, що називається оптимумом pH.

Хід роботи. У 7 пробірок наливають розчини 0,2 М двузаміненого фосфорнокислого натрію і 0,1 М лимонної кислоти, у кількостях зазначених у таблиці 1.

Таблиця 1

№ проби	Кількість 0,2 М розчину двузамі-щенного фосфату натрію	Кількість 0,1 М розчину лимонної кислоти	pH середо-вища	Кількість 0,5% розчину крохмалю, краплі	Кількість розведеної 1:100 слини (амілази), краплі	Фарбування (реакція з йодом)
1	0,58	0,42	5,6	10	10	
2	0,63	0,37	6,0	10	10	
3	0,69	0,31	6,4	10	10	
4	0,77	0,23	6,8	10	10	
5	0,87	0,13	7,2	10	10	
6	0,94	0,06	7,6	10	10	
7	0,97	0,03	8,0	10	10	

Одержують буферні розчини з pH від 5,6 до 8,0. У кожну пробірку додають по 10 крапель 0,5% розчину крохмалю і по 10 крапель слини, розведеної в 100 разів. Вміст пробірок перемішують і залишають при кімнатній температурі (або у водяній бані при 38 ^{o}C). Через 5 хвилин з четвертої пробірки, у якій pH середовища передбачається оптимальним для амілази, беруть краплинну пробу для реакції з йодом. Якщо одержують синє забарвлення, пробу повторюють через 5 хвилин. Коли в краплинній пробі буде отримане червоне або жовте забарвлення, в усі пробірки додають по 1 краплі 0,1% розчину йоду, вміст пробірки перемішують і відмічають колір. Оптимум pH для дії амілази визначають по тій пробірці, у якій відбулося більш глибоке розщеплення крохмалю (при реакції з розчином йода спостерігається червоний або жовтий колір).

Результати роботи фіксуються в таблиці.

4. Специфічність дії ферментів

Специфічність полягає в тому, що кожен фермент діє на конкретний субстрат.

Хід роботи. У дві пробірки наливають по 10 крапель 0,5% розчину крохмалю і додають у першу пробірку 5 крапель розведеної в 5 разів слини (амілаза), у другу – 5 крапель витяжки з дріжджів, що містить β – фруктофуранозидазу (сахаразу) (0,5 г дріжджів розтирають у порцеляновій ступці з 3 мл води, фільтрують, фільтрат – джерело сахарази), перемішують і залишають при кімнатній або температурі 38-40 ^{o}C. У 2 інші пробірки наливають по 10 крапель 0,5% сахарози, у першу додають 5 капель розведеної в 5 разів слини, у другу – 5 крапель витяжки з дріжджів і залишають за тих самих умов. Через 5 хвилин у перші дві пробірки із крохмалем додають по одній краплі 0,1% розчину йоду і відзначають фарбування. З вмістом 2 інших пробірок (дослід із сахарозою) роблять реакції Фелінга або Тромера. Дія ферментів виявляється або по зникненню субстрату, або по появі продуктів розщеплення (мальтоза, глюкоза, фруктоза).

Отримані результати заносять в табл. 2.

Таблиця 2

№ п/п	Субстрат	Фермент	Реакція на крохмаль з йодом	Реакція Тромера	Висновок
1	Крохмаль	Амілаза			
2	Крохмаль	Амілаза			
3	Сахароза	Сахараза			
4	Сахароза	Сахараза			

5. Вплив активаторів і інгібіторів на активність амілази.

Активаторами й інгібіторами називають речовини, здатні прискорювати чи гальмувати дію ферментів.

Хід роботи. У три пробірки наливають: у першу – 10 крапель дистильованої води, у другу – 8 крапель води і 2 краплі 1% розчину NaCl, а в третю – 8 капель води і 2 краплі 1% розчину $CuSO_4$. У кожну пробірку наливають по 10 капель слини, розведеної 1 : 5, перемішують, додають 5 крапель 0,5% розчину крохмалю, знову перемішують і залишають при кімнатній температурі. Через 5 хвилин у 3 пробірки з водою, підкрашеною краплею розчину йода, відливають по 2-3 краплі вмісту кожної пробірки досліду. У першій пробірці рідина забарвлюється у фіолетовий чи червоний, у другий – у червоний чи жовтий, у третій – у синій колір.

Отримані результати заносять в табл.. 3.

Таблиця 3

№ п/п	Варіант	Реакція з иодом	Висновки
1	Контроль		
2	+ NaCl		
3	+ $CuSO_4$		

6. **Кількісне визначення амілази слини за Вольгемутом**

Цей метод ґрунтується на визначенні мінімальної кількості ферментів, що здатна за певних умов (38 ^oC, 30 хвилин) розщепити певну кількість крохмалю.

Амілазну активність виражають у кількості субстрату (крохмалю), що розщеплюється 1 мл слини за певний проміжок часу (30 хвилин).

Хід роботи.

1. Наливають з бюретки в 10 пронумерованих пробірок по 1мл 0,85% NaCl.

2. У першу пробірку відмірюють 1 мл слини, розведеної в 10 разів водою.

3. Перемішують вміст першої пробірки шляхом трикратного втягування піпеткою рідини з пробірки і наступного випускання з піпетки. 1 мл отриманого розчину переносять з першої пробірки в другу.

4. Перемішують у такий же спосіб вміст другої пробірки і переносять 1 мл із другої пробірки в третю і т.п. З десятої пробірки 1 мл рідини виливають як зайвий.

5. Далі наливають з бюретки в усі 10 пробірок (починаючи з десятої) – по 2 мл 0,1% розчину крохмалю і перемішують вміст кожної пробірки.

6. Одночасно поміщають кожну пробірку в нагріту до 45 ^{o}C водяну баню.

7. Через 15 хвилин виймають пробірки з бані, швидко охолоджують їх під проточною холодною водою, перемішують вміст кожної пробірки і ставлять одну за одною в штатив.

8. Додають у кожну пробірку по 2 краплі йоду, перемішують і відзначають ту пробірку, у якій немає синього відтінку. Наприклад, якщо розчеплення крохмалю відбулося (жовтий колір з йодом) в пробірках 1, 2 та 3, то активність амілази розраховують за пробіркою 3, де слина розведена в 8 разів. Тобто, амілазна активність A_{15}^{45} дорівнює: A_{15}^{45} = 2 X 8 = 16, де 2 – кількість 0,1% крохмалю, мл.

7. Кількісне визначення активності каталази в крові за методом Баха-Зубкової

Метод заснований на вимірі кількості перекису водню, розщепленого каталазою. Каталаза каталізує розкладання перекису водню на молекулярний кисень і воду. За хімічною природою каталаза є гемоферментом, тому що до складу простетичної групи цього ферменту входить гем:

$$2H_2O_2 \longrightarrow O_2 + 2H_2O$$

Кількісне визначення активності каталази – це визначення “каталазного числа” і “показника активності каталази”. Каталазним числом називається кількість міліграмів H_2O_2, що розкладається 1 мікролітром (1мм^3) досліджуваної крові. Принцип визначення каталазного числа ґрунтується за наступною реакцією:

$$2KMnO_4 + 5H_2O_2 + 4H_2SO_4 \longrightarrow 2KHSO_4 + 2MnSO_4 + 8H_2O + 5O_2$$

Таким чином, про кількість розкладеного перекису водню судять по різниці кількостей марганцевокислого калію, витраченого на титрування до і після дії каталази.

Показником каталази називають дріб, у якій чисельником є каталазне число, а знаменник – число мільйонів еритроцитів в одному мм^3 досліджуваної крові.

Хід роботи.

1.Вносять піпеткою 0,1 мл досліджуваної крові, попередньо протерши кінчик капіляра від крові.

2. Піпетку промивають шляхом утягування і випускання назад рідини з мірної колби на 100 мл, куди попередньо наливають 10 мл дистильованої води.

3. Доливають мірну колбу водою до мітки і помічають час, коли кров була розведена. Цей розчин називають основним розчином крові (1:1000), що використовують для визначення каталазного числа.

4. У дві конічні колби наливають 7-8 мл дистильованої води і відмірюють у них по 1 мл основного розчину крові.

5. Вміст першої колби (контроль) зараз же кип'ятять протягом двох хвилин для руйнування каталази, обидві колби залишають на 10 хвилин.

6. У кожну колбу вносять по 2 мл розчиниу перекису водню (1%) і залишають на 30 хвилин.

7. Доливають у кожну колбу по 5 мл 10% розчину сірчаної кислоти й відтітровують вміст 0,1 н розчином марганцевокислого калію до появи рожевого кольору.

Каталаза розкладає перекис водню, тому на титрування другої колби піде менше розчину марганцевокислого калію, ніж на титрування вмісту першої колби, де каталаза була зруйнована. Цю різницю множать на 1,7 і одержують каталазне число досліджуваної крові. Принцип обчислення заснований на наступному. Грам-еквівалент перекису водню дорівнює 17. Отже, у 1 мл 0,1 н розчину міститься 1,7 мг перекису водню. 1 мл 0,1 н розчину марганцевокислого калію відповідає 1 мл перекису водню. Таким чином, помноживши 1,7 на різницю між кількістю міллілітрів 0,1 н розчину марганцевокислого калію, одержують кількість мл перекису водню, що розкладається в 1 мм^3 досліджуваній крові (каталазне число). Показник активності каталази тоді буде дорівнювати каталазному числу поділеному на кількість еритроцитів в 1 мм^3 досліджуваної крові.

Порядок виконання і звітування

Почергово провести всі реакції, описані в методичних вказівках.

Відобразити у звіті:

1) основні теоретичні відомості;
2) проведені біохімічні реакції та їх значення;
3) висновки, які повинні містити основні результати виконання роботи.

Підсумок

Після виконання лабораторної роботи студенти повинні знати будову і склад ферментів, їх фізико-хімічні властивості; уміти проводити реакції визначення ферментів та їх кількісний аналіз.

Контрольні питання

1. Властивості ферментів.
2. Класифікація ферментів.
3. Термолабільність ферментів та її визначення.
4. Як впливає кислотність розчину на активність ферментів?
5. Як можна довести специфічність дії певного ферменту?
6. Опишіть хід кількісного визначення амілази за Вольгемутом.
7. Охарактеризуйте метод Баха-Зубкової для каталази крові.
8. Охарактеризуйте біологічне значення ферментів.

Лабораторна робота № 5
Визначення кута контакту поверхні біокерамічного матеріалу і біологічної рідини

Мета роботи – дослідити змочувальні характеристики біоматеріалу та його взаємодію з рідиною..

Задачі роботи:

1) опрацювати теоретичні відомості за темою роботи;

2) провести відповідні досліди та відповідні вимірювання;

3) зробити висновки за підсумками роботи та оформити звіт.

Теоретичні відомості і методичні вказівки

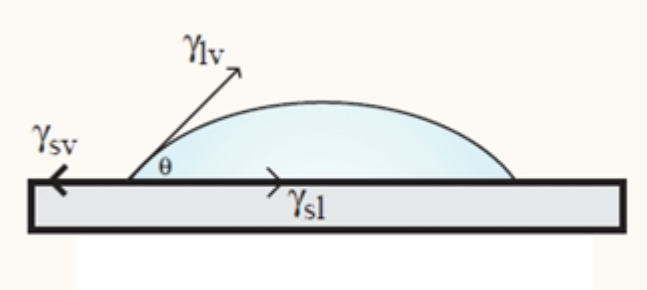
Кут контакта (***θ***) – це кут, який утворюється між краплею рідини та поверхнею твердої або іншої фази.

Рівновага сил, які впливають на кут контакту (θ), описується рівноважним рівнянням: $\gamma_{sv} = \gamma_{sl} + \gamma_{lv} \cos\theta$

γ_{lv} – рівноважний стан між рідиною і газовою фазою;

γ_{sv} – рівноважний стан між твердою фазою і газовою фазою;

γ_{sl} – рівноважний стан між твердою й рідкою фазами.



СТАТИЧНИЙ КУТ КОНТАКТУ

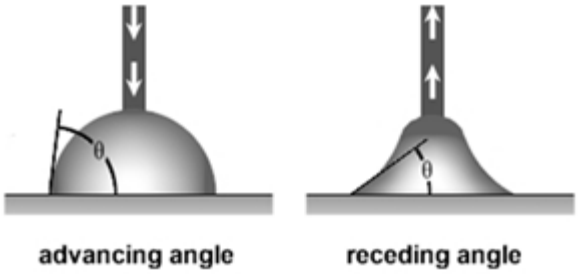
Статичний кут контакту вимірюється в тому випадку, коли крапля рідини знаходиться в нерухомому стані на твердій поверхні.

ДИНАМІЧНИЙ КУТ КОНТАКТУ

Динамічний кут контакту визначається в тому випадку, коли межа розподілу фаз рухається і відбувається зміна статичного кута контакту в часі. Динамічний кут контакту

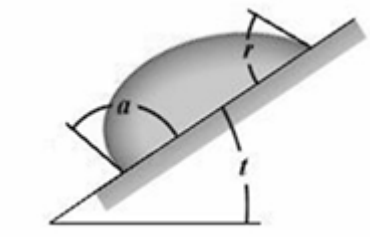
буває двох типів – наступальний і відступальний. Вимірювання може бути виконано за допомогою двох методів – методу вимірювання об’єму краплі та методу нахилу поверхні.

Наступальний кут змочування θ_a : найбільший кут контакту досягається шляхом збільшення міжфазної поверхні при додаванні додаткової кількості рідини.



Відступальний кут змочування θ_r: виникає при зменшенні об’єму рідкої краплі.

Кут гістерезису θ_H: є різницею між наступальним і відступальним кутом $\theta_H = \theta_a - \theta_r$



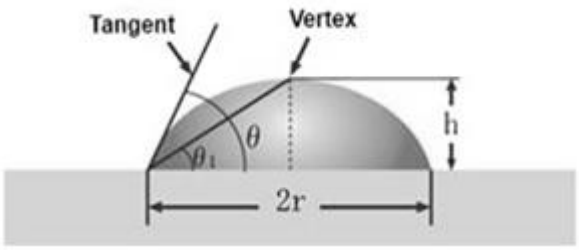
Метод нахилу: об’єднує як наступальний, так і відступальний кут контакту в одній краплі. Крапля розміщується на робочому столику, який поступово нахиляється. Наступальний кут вимірюється в нижній частині краплі (ліворуч на рисунку), коли вона починає рухатись. Відступальний кут контакту вимірюється у верхній частині краплі (на рисунку справа).

Методи вимірювання та розрахунку кута змочування лежачої краплі

Існує 4 методи вимірювання і розрахунку кута змочування лежачої краплі:

1. Напівкруговий метод
2. Круговий метод
3. Еліптичний метод
4. Тангенціальний метод

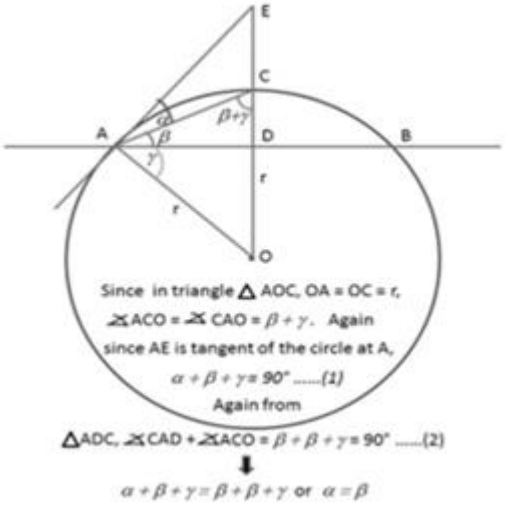
НАПІВКРУГОВИЙ МЕТОД



Якщо розмір краплі малий, то її можна уявити як частину сфери і профіль краплі в двох вимірах, тобто у вигляді напівкруга.

Тут ***h*** – висота, а ***r*** – половина ширини базової лінії. Таким чином, $\theta_1 = \tan^{-1}h/r$. І у випадку простої геометрії кут змочування можна виразити так: $\theta = 2\theta_1$. (див. рисунок).

Розрахувавши ***h*** і ***r*** за допомогою аналізу зображення, далі можна розрахувати кут контакту θ.



Цей метод підходить для крапель симетричної форми і малих розмірів. Для крапель більшего розміру та маси висота її вершини може бути знижена.

КРУГОВОЙ МЕТОД

Стадії розрахунку кута контакту круговим методом:

- захоплення і збереження зображення краплі;
- розпізнавання базової лінії;
- вибір 3 або більше точок на краю криволінійного профилю краплі;
- за кривою з цими точками можна знайти рівняння кола;
- кут змочування визначається як кут між дотичною та базовою лінією.

Цей метод є найбільш розповсюдженим для визначення кута контакту.

ЕЛІПТИЧНИЙ МЕТОД

В еліптичному методі застосовується побудова кривої профілю краплі. Тому він має дещо спільного з круговим методом.

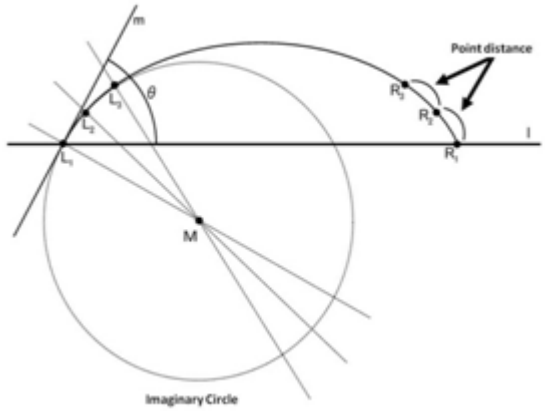
- захоплення і збереження зображення краплі;
- розпізнавання базової лінії;
- виділення 6 базових точок на кривій;
- розрахунок рівняння еліпса;
- кут змочування визначається як кут між дотичною та базовою лінією.

В порівнянні з іншими цей метод є доволі складним. Тому він використовується для визначення кута змочування в діапазоні 0 - 130°C.

ТАНГЕНЦІАЛЬНИЙ МЕТОД

Форму краплі представляють як частину контуру уявного кола. В цьому методі визначається центр уявного кола, а кут контакту визначається як кут між дотичною та колом

В данном методе определяется центр предполагаемой окружности, и угол контакта представляет собой угол между касательной и окружностью.



Три точки L1, L2 і L3 утворюються на уявному колі. Лівий кут контакту – це кут між дотичною m та базовою лінією l. Правий кут контакту може бути виміряний таким же чином за допомогою точок R1, R2, и R3.

Вимірювання межового кута

1. Підготовка зразка біоматеріалу

Зразки повинні бути підготовлені заздалегідь, і їх поверхні повинні бути належним чином очищені безпосередньо перед вимірюванням кута контакту. Зразок потрібно розміщувати

строго в горизонтальній позиції. Необхідно ретельно очистити голку шприца. Це важливо тому, що рідина, яка виходить з голки, може трохи підніматись вгору зовнішньою поверхнею голки під час експерименту. Бажано натерти жало голки неполярною речовиною (парафіном).

2. Забезпечення умов вологості / рівня пару

Зразок повинен бути розміщеним у вимірювальній комірці, заповненій робочою рідиною. Ці операції відбуваються за кілька хвилин до вимірювання кута контакту. На цьому етапі необхідно закріпити шприц, наповнений робочою рідиною, і вирівняти голку по відношенню до поверхні зразка.

3. Вимірювання статичного кута контакту

Після виходу рідини з голки повинна з’явитись крапля. Діаметр краплі повинен бути більше діаметра голки у 3–4 рази. Подача рідини повинна здійснюватися до того моменту, коли ціла крапля не вийде з голки. Далі голка повинна бути видалена. Потрібно почекати 1–3 хвилини для стабілізації краплі, після чого можна вимірювати статичний кут контакту.

4. Вимірювання наступального кута контакту

Голка повинна бути переміщена назад до краплі та необхідно додавати рідину до того моменту, поки не розтечеться база. Далі голка знімається та вимірюється наступальний кут контакту. Ця операція повторюється 3–5 разів, після чого береться середнє значення.

5. Вимірювання відступального кута контакту

Голка занурюється в краплю для того, щоб почати втягувати рідину в шприц, зменшуючи розміри краплі. Цю операцію слід проводити акуратно, не змінюючи діаметра краплі. Після обережного видалення голки можна вимірювати відступальний кут контакту. Вимірювання необхідно провести 3–5 разів, в підсумку усереднюючи одержані результати.

6. Відтворення результатів

Вимірювання кута контакту необхідно повторити або на 3–5 точках одного й того ж зразка, або на інших таких самих зразках, які пройшли ті самі стадії очищення.

Лабораторна робота № 6
Тестування полімерних біоматеріалів

Мета роботи – дослідити біоматеріали на твердість за різними методами.

Задачі роботи:

1) опрацювати теоретичні відомості за темою роботи;

2) провести відповідні досліди;

3) зробити висновки за підсумками роботи.

Теоретичні відомості і методичні вказівки

Твердість (*hardness*) - це властивість поверхневого шару матеріалу чинити опір пружній та пластичній деформаціям або руйнуванню при місцевій пластичній взаємодії з боку іншого, більш твердого тіла (індентора) відповідної форми та розмірів.

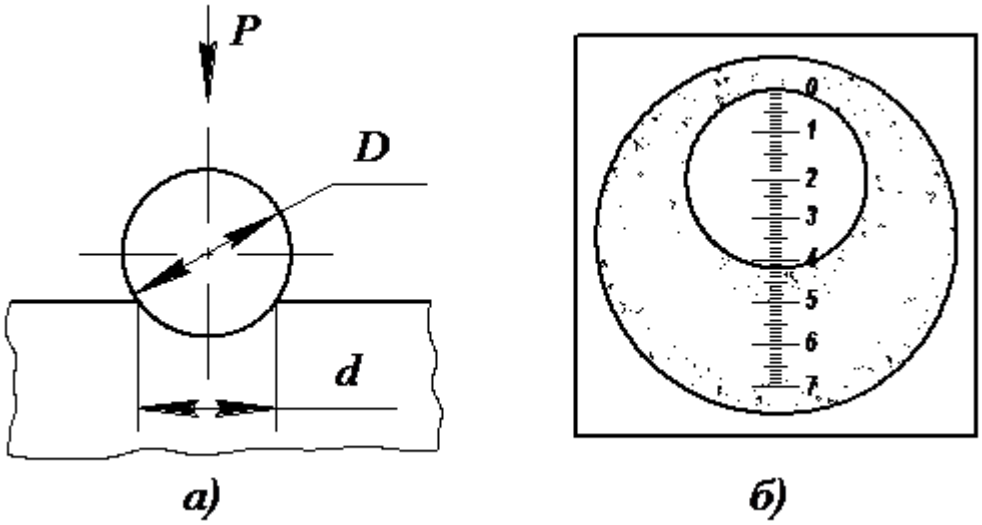


Рисунок 1 – Вимірювання твердості методом Брінелля:

а – схема утворення відбитка; *б* – вимірювання діаметра відбитка

Для багатьох сплавів встановлена чітка залежність між твердістю, механічними та технологічними характеристиками (міцністю, зносостійкістю, оброблюваністю різанням, тиском тощо). Тому вимірювання твердості є найбільш поширеним методом механічних випробувань. Способи визначення твердості поділяють на статичні та динамічні залежно від швидкості прикладання навантаження, а за способом його прикладання - на методи вдавлювання та шкрябання. Найбільш розповсюджені методи, де використовується статичне навантаження індентора перпендикулярно до поверхні зразка. Це методи Брінелля, Роквелла та Віккерса.

Твердість за методом Брінелля визначається відповідно до ГОСТ 9012-59. Як індентор використовується сталева загартована кулька діаметром 10; 5 або 2,5 *мм*, яка

вдавлюється у поверхню матеріалу під навантаженням від 153 до 29400 *Н* (від 15,6 до 3000 *кГ*). На поверхні зразка утворюється відбиток (лунка) у формі кульового сегмента діаметром *d* (рис. 1, *а*). Цей діаметр вимірюють за допомогою спеціального мікроскопа, на окуляр якого нанесена вимірювальна шкала з поділками, що дорівнюють одній десятій долі міліметра. Діаметр відбитка визначають середнім значенням двох його вимірювань у взаємно перпендикулярних напрямках з точністю до 0,05 *мм* (рис. 1, *б*). Число твердості за Брінеллем, яке позначається літерами *НВ* (*Н* - від англ. *hardness* - твердість, *В* – Брінелль), вимірюється відношенням навантаження *Р*, що діє на кульку діаметром D, до площі відбитка *F*:

$$HB = \frac{P}{F} = \frac{2P}{\pi D \cdot (D - \sqrt{D^2 - d^2})}.$$

Одиниця вимірювання твердості за Брінеллем - *кГ/мм*^{2} або *МПа (МН/м*^{2}*)*. В першому випадку твердість записується так: *НВ 200, НВ 250,* де *200; 250* - величина твердості в *кГ/мм*^{2}. Якщо твердість вимірюється в МН/м^2, то запис такий: *НВ* 2000 *МПа*, *НВ* 2500 *МПа*. Діаметр кульки, навантаження та час витримки під навантаженням вибирають залежно від сподіваної твердості та товщини матеріалу (таблиця 3). При вимірюванні твердості кулькою певного діаметра з відповідним навантаженням на практиці користуються стандартною таблицею, в якій наводяться значення *НВ* залежно від діаметра лунки і відношення P/D^2 (таблиця 1). При вимірюванні твердості за Брінеллем потрібно виконувати такі умови:

- поверхня зразка повинна бути плоскою, чистою та гладкою;

- зразок повинен лежати на столику-підставці стійко, щоб під час вимірювання твердості не відбувалося його зрушення або прогинання; товщина зразка повинна бути не менша десятикратної глибини відбитка (більше 1 ... 2 *мм*);

- відстань від центра відбитка до краю зразка повинна бути не менша 2,5*d*, а між центрами двох сусідніх відбитків - не менша *4d;* для металів з *НВ* < 350 відповідно 3*d* і 6*d*.

Таблиця 1 – Твердість за Брінеллем при D= 10 мм, Р = 29430 Н (3000 кГ) і Р = 30 D^2

d, мм	0.00	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.06	0.09
2.90	444	441	438	435	432	429	426	423	420	417
3.00	415	412	409	406	403	401	398	395	393	390
3.10	388	385	383	380	378	375	373	370	368	366
3.20	363	361	359	356	354	352	350	347	345	343
3.30	341	339	337	335	333	331	329	326	325	323
3.40	321	319	317	315	313	311	309	307	306	304
3.50	302	300	298	297	295	293	292	290	288	286
3.60	285	283	282	280	278	277	275	274	272	271
3.70	269	268	266	265	263	262	260	259	257	256
3.80	255	253	252	250	248	248	246	245	244	242
3.90	241	240	239	237	236	235	234	232	231	230
4.00	229	228	226	225	224	223	222	221	219	218

4.10	217	216	215	214	213	212	211	210	209	208
4.20	207	205	204	203	202	201	200	199	198	198
4.30	197	196	195	194	193	192	190	189	188	188
4.40	187	186	185	185	184	183	182	181	180	179
4.50	179	178	177	176	175	174	174	173	172	171
4.60	170	170	169	168	167	167	166	165	164	164
4.70	163	162	161	161	160	159	158	158	157	156
4.80	156	155	154	154	153	152	I52	151	150	150
4.90	149	149	148	147	I46	146	145	144	144	143
5.00	143	142	141	141	140	140	139	138	138	137
5.10	137	136	135	135	134	134	133	133	132	132
5.20	131	130	130	129	129	128	128	127	127	126
5.30	126	125	125	124	124	123	123	122	122	121
5.40	121	120	120	119	119	118	118	117	117	116
5.50	116	115	115	114	114	114	113	113	112	112
5.60	111	111	110	110	110	109	109	108	108	107
5.70	107	107	106	106	105	105	105	104	104	103
5.80	103	103	102	102	101	101	101	100	99.5	99.5
5.90	99.2	98.8	98.4	98.0	97.7	97.3	96.9	96.6	96.2	95.9
6.00	95.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Твердість за методом Роквелла визначається шляхом вдавлювання в зразок індентора у вигляді алмазного конуса з кутом при вершині 120° або сталевої кульки діаметром 1,568 *мм* (1/16 дюйма - $1/16^2$). Навантаження на індентор здійснюється послідовно: спочатку попереднє P_0, що дорівнює *100 Н*, потім основне P_1. Сума попереднього і основного навантаження складає загальне навантаження *P*, яке вибирається залежно від індентора і сподіваної твердості (таблиця 2).

За різницею глибин вдавлювання індентора під дією двох послідовних навантажень P_0 і P_1 роблять висновок про твердість матеріалу. Стрілка індикатора приладу Роквелла показує не цю різницю, а величину (100 - *в*) по чорній шкалі *C* або *A* та (130 - *в*) по червоній шкалі *B*, де $в = (h_1 - h_0) / 0{,}002$; h_1 і h_0 глибина вдавлювання індентора при прикладанні відповідно повного та попереднього навантаження; 0,002 - умовна одиниця твердості (ціна поділки шкали індикатора приладу).

Одиниця твердості за Роквеллом - безрозмірна величина, що відповідає осьовому переміщенню індентора на 0.002 мм. Твердість за Роквеллом позначається так: *HRB* 30, *HRC* 60, *HRA* 80, тобто твердість 30 за шкалою *B*, 60 - за шкалою С, 80 - за шкалою А. Числа *HRA* можна перевести на числа *HRC* за формулою $HRC = 2HRA - 104$.

Схема вимірювання твердості за Роквеллом наведена на рис. 2.

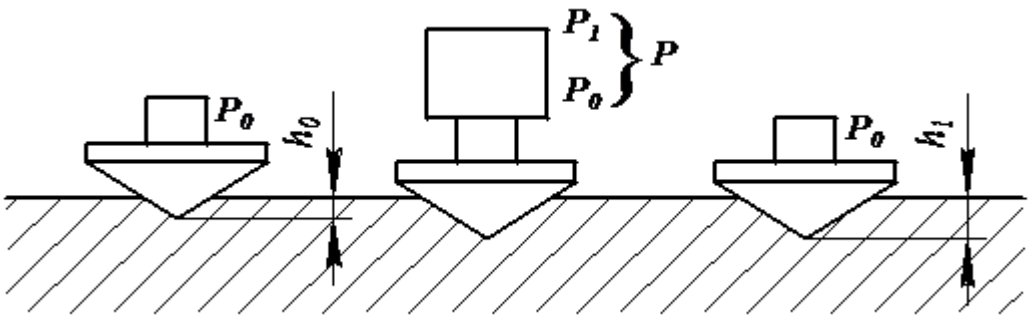


Рисунок 2 – Схема вимірювання твердості за Роквеллом

Число твердості за Віккерсом *HV* визначають діленням навантаження P на площу бічної поверхні отриманого пірамідального відбитка F:

$$HV = 2\,P\,sin\,(a / 2) / d^2 = 1.854\,P / d^2,$$

де d - середнє арифметичне двох діагоналей відбитка;

$a = 136°$ - кут при вершині піраміди.

Твердість вимірюють в *кГ/мм*^{2} і записують *HV* 200 без вказання одиниці вимірювання або в Н/м^2 і записують з вказанням одиниці вимірювання, наприклад, *HV* 2000 *МПа*.

Числа *HB* і *HV* близькі за абсолютною величиною, однак тільки до значення приблизно *HB* 400. Вище цих значень метод Брінелля дає спотворені результати внаслідок залишкової деформації сталевої кульки. Алмазна піраміда в методі Віккерса дозволяє визначати твердість практично будь-яких металевих матеріалів. Ще більш важлива перевага цього методу полягає у суворому зіставлені чисел твердості HV будь-яких матеріалів, випробуваних при різних навантаженнях.

Таблиця 2 – Умови вимірювання твердості за Роквеллом

Приблизна твердість за Брінеллем, *кГ/мм*^{2}	Сфера застосування	Шкала приладу Роквелла	Тип індентора	Навантаження *P*, *H*	Межі вимірювання твердості за шкалою Роквелла
Більше 700	Надтверді матеріали, цементовані сталі	*A* чорна	Алмазний конус	600	70 ... 90
230 ... 700	Тверді та термічно оброблені сталі	*C* чорна	Алмазний конус	1500	20 ... 67
60 ... 230	М’які матеріали	*B* червона	Сталева кулька	1000	25 ... 100

Інші методи визначення твердості. Для вимірювання твердості масивних деталей і конструкцій, коли описані способи застосувати неможливо, використовується метод ударного відбитка (ГОСТ 18661-73). Прилад для цієї мети складається з корпусу, бойка, кульки, пружини. В проріз корпусу вставляється еталонний зразок, твердість якого відома. Для вимірювання твердості виробу прилад ставиться кулькою на його поверхню і по бойку наноситься удар молотком. При цьому кулька одночасно утворює відбитки (лунки) у випробуваній деталі та в еталоні, поверхні яких пропорційні твердості цих матеріалів. Число твердості випробуваного матеріалу визначають в одиницях Брінелля

$$HB = HB_e \times F_e / F_д ,$$

де HB_e - твердість еталону в одиницях Брінелля;

F_e - площа поверхні відбитка на еталоні, $мм^2$;

$F_д$ - площа поверхні відбитка на деталі, $мм^2$.

З інших динамічних методів оцінки твердості слід відмітити метод ударного відскоку (метод Шора) - ГОСТ 23273-78. Твердість визначають за допомогою бойка з алмазним наконечником, що падає з фіксованої висоти H. При падінні бойка вагою q з висоти Н енергія удару витрачається на незворотний процес пластичної деформації та на пружну деформацію, яка повертається бойку у вигляді енергії пружного відскоку $A_2 = h \times q$. Повна енергія удару буде $A_1 = H \times q$. Енергія, що пішла на залишкову деформацію, буде $A = A_1 – A_2 = q\ (H – h)$. Таким чином, чим більша енергія пішла на залишкову деформацію, тим більш м'який матеріал і менша висота відскоку бойка h.

Висота відскоку бойка фіксується положенням стрілки на шкалі індикатора. Шкала має 140 поділок для оцінки висоти відскоку. Відскоку в 100 поділок відповідає твердість загартованої високовуглецевої сталі. Число твердості за Шором позначається *HSD*. Перевагою цього методу є можливість перевірки твердості шліфованих деталей баз порушення якості поверхні.

Останнім часом широко втілюється ультразвуковий метод вимірювання твердості.

Лабораторна робота № 7
Дослідження механічних властивостей біоматеріалів

Мета роботи – дослідити біоматеріали на міцність.

Задачі роботи:

1) опрацювати теоретичні відомості за темою роботи;

2) провести досліди на розривній машині;

3) зробити висновки за підсумками роботи.

7.1. Основні технічні характеристики обладнання

Універсальна розривна машина UIT STM-10 забезпечує випробування на розтяг циліндричних та плоских зразків згідно з ISO 6892-84, ГОСТ 1497-84, ДСТУ EN 10002-1:2006; випробувань на стиснення згідно ГОСТ 25.503; технологічних випробувань зразків.

Основні технічні дані і характеристики наведені в таблиці 1.1.

Таблиця 1.1. Основні технічні характеристики

Основні параметри машини випробувальної UIT STM-10	**Один. виміру**	**Характеристики**
Найменше граничне значення величини сили, не більше	кгс	10,00
Найбільше граничне значення величини сили, не менше	кгс	1 000,00
Відносна похибка системи вимірювання, відображення, реєстрації та запису сили, від величини сили, що вимірюється, при заданих видовженнях та в момент розриву, не більше	%	± 0,5
Діапазон переміщення траверси (без оснастки), не менше	мм	1 000,0
Точність системи вимірювання, відображення, реєстрації та запису переміщення, не менше	мм	± 1,0
Сервопривід з вбудованою функцією автоматичного усунення низькочастотної вібрації виконавчого механізму.		+
Енкодер підвищеної точності, що гарантує стабільну роботу на низьких швидкостях з характеристикою, не гірше	біт	20
Допустима похибка показів відносного видовження, від величини, що вимірюється, не більше	%	2,0
Найменше значення швидкості руху рухомого зажиму, не більше	мм/хв	0,05
Найбільше значення швидкості руху рухомого зажиму, не менше	мм/хв	1 000,0
Нижня границя діапазону температури робочого простору, за якого забезпечуються похибки вимірювань, не більше	ºС	10,0

Основні параметри машини випробувальної UIT STM-10	**Один. виміру**	**Характеристики**
Верхня границя діапазону температури робочого простору, за якого забезпечуються похибки вимірювань, не менше	ºС	45,0
Наявність модулю функцій утримання траверси під статичним навантаженням протягом тривалого часу		+
Напруга живлення	-	220 (±10%) В 50±1 Гц
Можливість установки пристосування для виміру твердості великогабаритних виробів з металу		+
Контактний екстензометр	мм	База 50 мм (розрахункова довжина), деформація 25 мм (50%)
Програмне забезпечення:		
- завдання швидкості навантаження; - відображення параметрів на дисплеї у реальному часі; - аналіз діаграми випробувань (масштабування, установка крапок); - складання протоколів випробувань та експорт даних.		+
Контрольні параметри при випробуванні на стиснення: - побудова графіку залежності «навантаження – переміщення траверси».		+



Зовнішній вигляд машини універсальної випробувальної UIT STM-10

Функціональні можливості машини випробувальної UIT STM-10:

Формування бланку звіту за формою «Замовника»

Функція реєстрації, відображення; протоколювання даних, що вимірюються та розраховуються:

- величина швидкості розтягу, мм/хв.;
- сила, індикація в режимі реального часу, кгс (Н);
- сила при заданому видовженні, кгс (Н);
- міцність при розтягу, кгс/см2 (МПа);
- переміщення, індикація в режимі реального часу, мм;
- відносне видовження, індикація в режимі реального часу, %;
- відносне видовження в момент розриву, %;
- напруження при заданому видовженні, кгс/см2 (МПа);
- побудова графіків в різних координатах

Пакет верифікованого програмного забезпечення сумісний з Microsoft Windows для вимірювання та оцінки параметрів згідно ГОСТ 1497:

- межі пропорційності,
- межі пружності,
- межі плинності фізичної,
- межі плинності умовної,
- тимчасового опору,
- відносного рівномірного подовження,
- відносного подовження після розриву,
- відносного звуження поперечного перетину.

Функція передачі даних по інтерфейсу USB в персональний комп'ютер

Функція захисту від перенавантажень випробувальної машини з оповіщенням оператора

Функція обмеження за навантаженням або переміщенням при випробуваннях на стискання

При випробуванні на розтяг для закріплення зразка ставлять спеціальні губки: для круглих зразків – губки з рельєфним жолобом, для плоских зразків – губки з плоскою поверхнею, що має насічку.

При випробуванні на стиск в корпусі верхнього затискача закріплюється опорна плита, а на нижньому – опора, яка само встановлюється. При випробуванні на згин в корпусі верхнього затискача встановлюється ніж, а на нижньому затискачі – стіл на згин (який представляє собою балку з двома опорами, які пересуваються).

7.2. Короткі теоретичні відомості

Питання про безпечну та надійну роботу штучних імплантів, моделювання поведінки під навантаженням різних видів з'єднувальної тканини вирішується, головним чином, на підставі дослідного вивчення характеристик відповідних матеріалів під навантаженням аж до їх руйнування.

Механічні випробування матеріалів різноманітні. Однак основний і найбільш розповсюджений вид випробувань – випробування на розтяг. Отримані в результаті характеристики міцності і пластичності дозволяють оцінити міцність матеріалу при статичному навантаженні і використовувати їх для розрахунку штучних імплантів.

За механічними властивостями матеріали розділені на дві основні групи: пластичні і крихкі. Перші мають порівняно велику пластичну (залишкову) деформацію, другі руйнуються при дуже малій залишковій деформації. Для вивчення цих властивостей матеріалів на випробувальних машинах встановлюються спеціальні прилади, що реєструють деформацію зразка Δl, розтягувальну силу P і викреслюють діаграму розтягу $P = f(\Delta l)$. Крива залежності між деформацією зразка Δl і силами, які її викликали, називається діаграмою розтягу (рис. 7.1).

На початку випробування на діаграмі розтягу викреслюється невелика криволінійна ділянка в зв'язку з ліквідацією зазорів між контактуючими деталями випробувальної машини і через обтиснення головок зразка в затискачах машини. При обробці експериментальних даних ця ділянка не розглядається. При подальшому збільшенні навантаження спостерігається прямолінійна похила ділянка OA. На ділянці OA існує лінійна залежність між видовженням зразка Δl і розтягувальною силою P, тобто матеріал зразка розтягується за законом Гука.

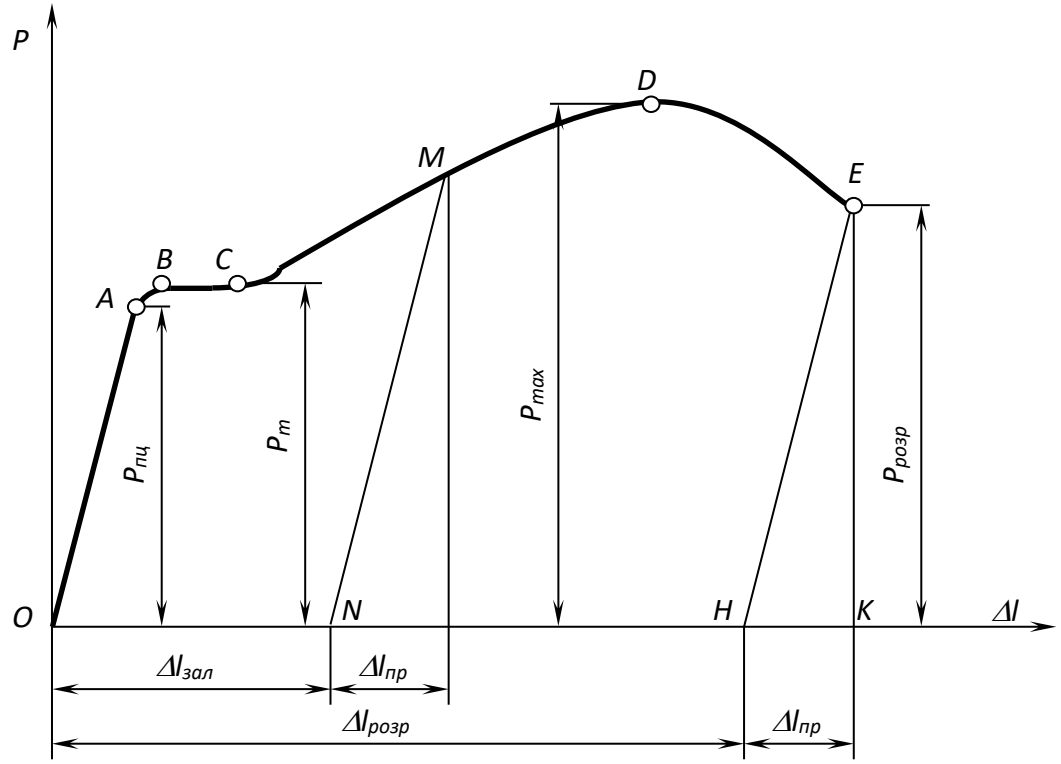


Рисунок 7.1 Діаграма розтягу маловуглецевої сталі

координатах $P - \Delta l$

Максимальне напруження, при якому ще зберігається пропорційна залежність між деформаціями і навантаженнями (точка *A* діаграми), називається границею пропорційності

$$\sigma_{пц} = \frac{P_{пц}}{F_0}, \qquad (7.1)$$

де $P_{пц}$ – зусилля, що відповідає точці *A* діаграми (див. рис. 7.1);

F_0 – початкова площа поперечного перерізу зразка.

При переході за точку *A* справедливість закону Гука порушується: видовження відбувається інтенсивніше росту сили *P*. Пряма *OA* переходить у криву *AB*. У точці *B* крива переходить у горизонтальну чи майже горизонтальну пряму *BC*, що вказує на збільшення довжини при постійному чи при дуже незначному зростанні сили. Матеріал "тече" (зона текучості).

Напруження, при якому спостерігається текучість матеріалу, називається границею текучості.

$$\sigma_m = \frac{P_m}{F_0}, \qquad (7.2)$$

де P_m – ордината точки *B* діаграми.

При навантаженні, що відповідає σ_m, помітно росте пластична деформація (відбуваються зсуви по всьому об'ємі зразка і на полірованій поверхні з'являються лінії Чернова - Людерса, які становлять кут $\alpha \approx 45°$ з напрямком осі зразка).

На ділянці *CD* діаграми (зона зміцнення) зразок одержує значні залишкові видовження. Якщо провести розвантаження зразка в цей момент часу, а потім знову навантажити, то механічні властивості зразка будуть відрізнятися від його початкових властивостей. Лінія розвантаження *MN* і повторного навантаження *NM* викреслюється паралельно відрізку *OA*. Після розвантаження в зразку зберігається залишкова деформація $\Delta l_{зал}$, а пружна частина повної деформації зникає. Звідси випливає важливий висновок – пружні деформації виникають у зразку і за границею пропорційності, причому тут вони як і раніше діють за законом Гука.

Підвищення границі пропорційності і зменшення пластичності внаслідок попередньої деформації зразка за границю текучості називають наклепом, дія якого на сталь аналогічна дії загартування. Позитивний ефект наклепу використовують при одержанні високоміцного дроту (холодне волочіння), попередній витяжці ланцюгів вантажопід'ємних машин і т.д.

Точка *D* діаграми визначає найбільше для даного випробування значення сили P_{max}. До навантаження P_{max} деформації розподілені рівномірно по довжині робочої частини зразка. При досягненні навантаження P_{max} деформація локалізується і на зразку з'являється місцеве звуження, назване шийкою. Вся деформація зразка зосереджується надалі тільки в області шийки і зразок видовжується тільки за рахунок пластичної деформації в шийці. Площа перерізу шийки зменшується інтенсивніше росту зусилля. На діаграмі ця обставина відзначається зменшенням зусилля *P* (ділянка *DE*).

Слід зазначити, що в області шийки має місце об'ємний напружений стан (нерівномірний всебічний розтяг). Точний закон розподілу напружень по перерізі не відомий. Тому за практичну характеристику міцності матеріалу при розтягу приймається

не напруження, що відповідає руйнуванню, а значно менше напруження, яке називається границею міцності
або тимчасовим опором матеріалу розриву:

$$\sigma_в = \frac{P_{max}}{F_0}, \tag{7.3}$$

де P_{max} – максимальне зусилля, що витримує зразок.

Характеристики пластичності

Здатність сталі деформуватися пластично без руйнування характеризується відносним залишковим видовженням

$$\varepsilon = \frac{\Delta l_{розр}}{\Delta l_0} 100\% \tag{7.4}$$

і відносним звуженням площі поперечного перерізу зразка після розриву

$$\Psi = \frac{F_0 - F_ш}{F_0} 100\%, \tag{7.5}$$

де $\Delta l_{разр}$ – абсолютне залишкове видовження робочої частини зразка;

$F_ш$ – площа перерізу шийки після розриву. Механічні характеристики матеріалу при розтягу, як показують досліди, залежать не тільки від його фізичних властивостей і умов, у яких проводиться випробування, але і від форми і розмірів зразка. Для того, щоб для одного і того ж матеріалу незалежно від розмірів зразка одержати завжди однакові результати, необхідно при виготовленні зразків дотримуватися таких умов:

$$\frac{\sqrt{F_1}}{l_1} = \frac{\sqrt{F_2}}{l_2} = ... = \frac{\sqrt{F_n}}{l_n} = const. \tag{7.6}$$

За нормами, які діють в Україні, основними співвідношеннями для вибору зразків є:

$$\frac{l_0}{\sqrt{F_0}} = 11{,}3; \tag{7.7}$$

$$\frac{l_0}{\sqrt{F_0}} = 5{,}65; \tag{7.8}$$

Відношення (2.1.7) відповідає так званому десятикратному зразку круглого перерізу, у якого розрахункова довжина $l_0 = 10d_0$; відношення (7.8) – п'ятикратному ($l_0 = 5d_0$). Зразки з діаметром $d_0 = 20$*мм* називають нормальними, інші – пропорційними.

У даній роботі застосовується сталевий (нержавіюча сталь 40Х13) або титановий зразок циліндричної форми (рис. 7.2) діаметром $d_0 = 3$ *мм* і довжиною робочої частини $l_0 =$ 30 *мм*. Випробування проводяться на універсальній випробувальній машині.

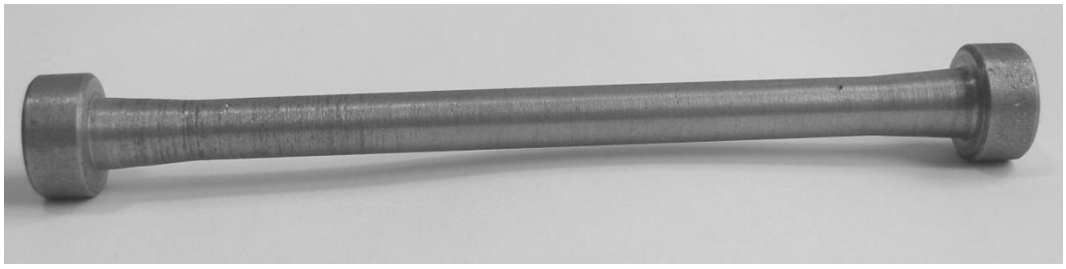


Рисунок 7.2

7.3. Порядок проведення випробувань

1. Накреслити ескіз зразка (рис. 7.3):

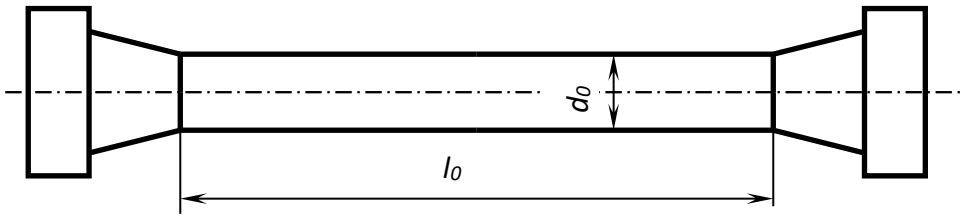


Рисунок 7.3

2. Виміряти діаметр зразка з точністю до 0,01 *мм* у трьох місцях по довжині (по середині і по краях), у кожному місці по двох взаємно перпендикулярних напрямках. У найменшому перерізі взяти середнє арифметичне значення двох взаємно перпендикулярних діаметрів, які прийняти за розрахункове значення d_0.

3. За розрахункову довжину зразка l_0 прийняти відстань між двома мітками, нанесеними по краях робочої частини зразка. Довжину l_0 виміряти штангенциркулем з точністю до 0,1 *мм*.

4. Встановити зразок у машину і провести випробування. При цьому на барабані машини автоматично записується залежність між навантаженням P, що діє на зразок, і його абсолютним видовженням Δl.

5. При проведенні випробування необхідно за шкалою силовимірювача відзначити навантаження P_m, при якому напруження в зразку досягли границі текучості σ_m (у цей час ріст навантаження на деякий час припиняється при зростаючій деформації зразка), максимальне навантаження P_{max}, яке витримує зразок; навантаження в момент розриву $P_{розр}$.

6. Після розриву зразка виміряти його діаметр $d_ш$ у місці розриву (шийці).

7. Обидві частини зразка після розриву прикладають одну до одної як якомого щільніше і вимірюють довжину l робочої частини зразка між двома мітками. Результати вимірювань занести в таблицю 7.1.

Таблиця 7.1

Розміри зразка				Опір зразка			
до випробування		після випрбування					
l_0, *мм*	d_0, *мм*	l, мм	d, *мм*	$P_{пц}$, *Н*	P_m , *Н*	P_{max} , *Н*	$P_{розр}$, *Н*

Обробка результатів випробувань

Значення навантажень $P_{пц}$,P_m і $P_{розр}$ беруть з діаграми, записаної на випробувальный машині.

За величинами d_0 і l_0 обчислюють початкову площу F_0 і об'єм робочої частини зразка V_0 , а по $d_ш$ – площу перерізу шийки $F_ш$.

За формулами (2.1.1) – (2.1.5) обчислюють характеристики міцності $\sigma_{пц}, \sigma_т, \sigma_в$ і характеристики пластичності ε, ψ.

Результати розрахунків занести в таблицю 7.2.

Таблиця 7.2 – Характеристики міцності та пластичності

	Марка сталі	$\sigma_{пц}$, МПа	$\sigma_т$, МПа	$\sigma_в$, МПа	ε %	Ψ %
Експеримент						
Довідник						

Використовуючи знайдені значення границі міцності $\sigma_в$, і відносного видовження ε, звуження Ψ, порівняти отримані дані із довідковими даними.

Контрольні питання

1. Які характерні точки має діаграма розтягу зразка?
2. Як визначити границі пропорційності текучості і міцності при випробуванні на розтяг?
3. При якому навантаженні виникає на зразку шийка?
4. Як визначити відносне видовження і звуження зразка після його розриву?
5. Як визначити за діаграмою розтягу долю пружних і залишкових деформацій за межами пропорційності?

Лабораторна робота № 8
Визначення модуля пружності матеріалів біомедичного призначення

Мета роботи – визначити ключову механічну характеристику біоматеріалу – модуль пружності.

Задачі роботи:

1) опрацювати теоретичні відомості за темою роботи;

2) провести досліди на розривній машині;

3) зробити висновки за підсумками роботи.

8.1. Короткі теоретичні відомості

У початковій стадії навантаження при розтяганні – стиску в межах пружності для більшості матеріалів існує лінійна залежність між осьовим навантаженням P і видовженням Δl:

$$\Delta l = \frac{Pl}{EF}, \tag{8.1}$$

де l – початкова довжина тієї частини зразка, видовження якої змінюється (наприклад, база екстензометра); F – площа поперечного перерізу зразка.

Значення сили P у виразі (8.1) не повинне перевищувати $P_{max} = \sigma_{пц} F$ де $\sigma_{пц}$ – границя пропорційності матеріалу зразка.

Поздовжню деформацію зразка характеризують абсолютною поздовжньою деформацією Δl і відносною поздовжньою деформацією:

$$\varepsilon = \frac{\Delta l}{l_0} \tag{8.2}$$

Для визначення значень пружних постійних E і μ досліджуваного матеріалу скористаємося формулами (8.1), (8.2), з яких знаходимо

$$E = \frac{P}{F \cdot \varepsilon} \tag{8.3}$$

Для підвищення точності вимірювань зразок навантажують ступенями, збільшуючи навантаження щоразу на одну і ту ж саму величину. Малі лінійні деформації вимірюються тензометром.

8.2.Порядок проведення випробувань

1. Накреслити ескіз зразка.
2. Закріпити зразок у затискачі випробувальної машини.
3. Встановити на зразок екстензометр.
4. Для усунення похибок на початку випробування (ліквідація зазорів у вузлах випробувальної машини, проковзування зразка в затискачах машини і т.п.) відлік значень ΔP варто вести від попереднього навантаження P = 100...200 Н.
5. Навантажити рівномірними етапами зразок до зусилля 8…9 кН.
6. Результати вимірювань занести в таблицю 8.1.

Таблиця 8.1

	Навантаження P, H	Деформація, що показує екстензометр, Δl, мм	Відносна деформація, ε_i
1			
2			
3			
4			
5			

Обробка результатів випробувань

Значення відносних деформацій ε на кожному ступені навантаження визначаються як різниця значень кінця ε_{i+1} і початку ε_i етапів. Середні значення будуть дорівнювати

$$< \varepsilon >= \frac{\varepsilon_1 + \varepsilon_2 + ... + \varepsilon_k}{K};$$

де K– число ступенів.

Модуль пружності за даними досліду розраховується за формулою

$$E = \frac{\Delta P}{< \varepsilon > F},$$

Контрольні питання

1. Який фізичний і геометричний зміст модуля пружності E?
2. Чому при визначенні E напруження не повинні перевищувати границі пропорційності?
3. Як залежить величина E від марки сталі?
4. Якими способами можна підвищити точність визначення E?

Список літератури

1. Da Poian, A. T. Integrative Human Biochemistry: A Textbook for Medical Biochemistry / Andrea T. Da Poian, and Miguel A. R. B. Castanho. – Springer, 2015. – 421 p.
2. Biomedical engineering fundamentals / eds.: Joseph D. Bronzino, and Donald R. Peterson. – CRC press, 2014.
3. Chen, Q. Biomaterials: a basic introduction / Qizhi Chen and George Thouas. – CRC Press, 2014.
4. Biomaterials in artificial organs / ed. John P. Paul. – Springer, 2016.
5. Ducheyne P. Comprehensive biomaterials. Vol. 1 / Paul Ducheyne. – Elsevier, 2015.
6. Molecular, Cellular, and Tissue Engineering / eds.: Bronzino, Joseph D., and Donald R. Peterson.. CRC Press, 2015.
7. Методичні вказівки для самостійної роботи студентів, лабораторні роботи та завдання із курсу біохімії / укл. Будняк О. К.та ін. – Одеса : ОНУ ім. І. І. Мечникова, 2003. – 60 с.
8. Біохімія : підручник / Л. І. Остапченко, Т. Р. Андрійчук, Ю. Д. Бабенюк та ін. ; упоряд. О. В. Скопенко. – К. : Київський університет, 2012. – 695 с.
9. Шевряков М. В. Практикум з біологічної хімії : навчальний посібник / Шевряков М. В., Яковенко Б. В., Явоненко О. Ф. – Суми : Університетська книга, 2003. – 204 с.
10. Явоненко, О. Ф. Біохімія : підручник / О. Ф. Явоненко, Б. В. Яковенко. – Суми : ВТД "Університетська книга", 2002. – 380 с. – ISBN 966-680-039-X.
11. Біохімія : підручник / М.Є.Кучеренко, Ю.Д.Бабенюк, О.М.Васильєв. – К. : Київський університет, 2002. – 480 с. – ISBN 966-594-334-0.

This project has been funded with support from the European Commission. This publication / communication reflects the views only of the author, and the Commission cannot be held responsibility for any use which may be made of the information contained therein.