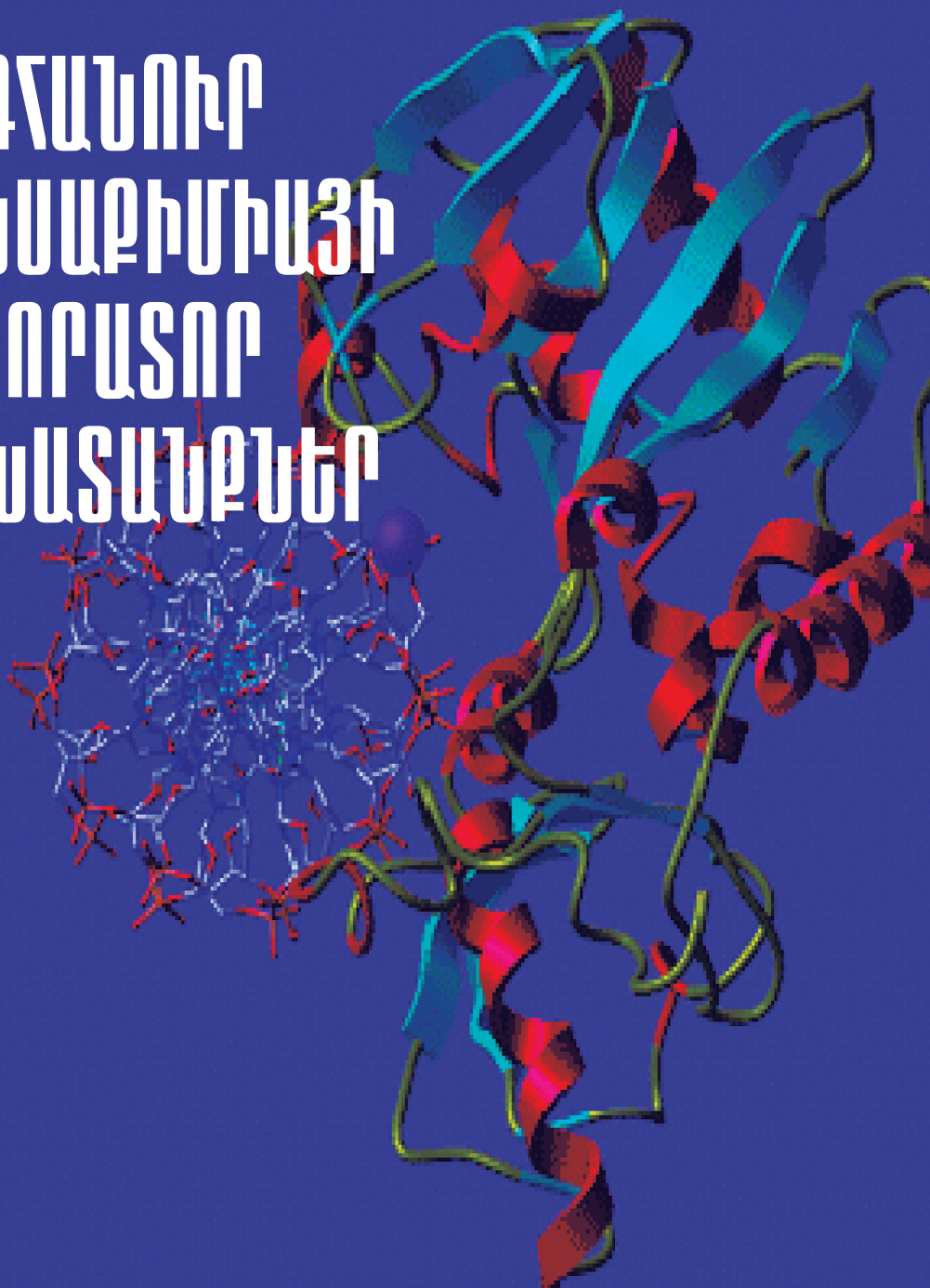
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ
ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

Ա.Հ. ԹՈՂՈՒՆՅԱՆ
Ն.Կ. ՀԱՅՐԱՊԵՏՅԱՆ
Հ.Մ. ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ

ԸՆԴՀԱՆՈՒՐ ԿԵՆՍԱՔԻՄԻԱՅԻ ԼԱԲՈՐԱՏՈՐ ԱՇԽԱՏԱՆՔՆԵՐ



ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

Ա. Հ. ԹՌՉՈՒՆՅԱՆ, Ն. Կ. ՀԱՅՐԱՊԵՏՅԱՆ,
Հ. Մ. ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ

ԸՆԴՀԱՆՈՒՐ ԿԵՆՍԱՔԻՄԻԱՅԻ ԼԱԲՈՐԱՏՈՐ ԱՇԽԱՏԱՆՔՆԵՐ

Ուսումնամեթոդական ձեռնարկ

ԵՐԵՎԱՆ
ԵՊՀ ՀՐԱՏԱՐԱԿՉՈՒԹՅՈՒՆ
2017

ՀՏԴ 577(07)
ԳՄԴ 28.072գ7
Թ 867

Հրատարակության է երաշխավորել
ԵՊՀ կենսաբանության ֆակուլտետի
գիտական խորհուրդը

Գրախոսներ՝

ՀԱԱՀ կենսաքիմիայի, մանրէակենսաբանության և վիրուսաբանության ամբիոնի կ.գ.դ., պրոֆեսոր Ռ. Գ. Քամալյան

ՀՀ ԳԱԱ Հ. Բունիաթյանի անվան կենսաքիմիայի ինստիտուտի «Ակտիվ թթվածնի նյութափոխանակության» լաբորատորիայի վարիչ, կ.գ.դ., պրոֆեսոր Մ. Ա. Սիմոնյան

Թռչունյան Ա. Հ., Հայրապետյան Ն. Կ., Կարապետյան Հ. Մ.
Թ 867 Ընդհանուր կենսաքիմիայի լաբորատոր աշխատանքներ: Ուսումնամեթոդական ձեռնարկ/ Թռչունյան Ա. Հ., Հայրապետյան Ն. Կ., Կարապետյան Հ. Մ.: -Եր., ԵՊՀ հրատ., 2017, 244 էջ:

Ձեռնարկի նպատակն է ուսանողներին ծանոթացնել փորձարարական կենսաքիմիայի կարևոր սկզբունքներին և մեթոդական հնարքներին: Ձեռնարկում բերված են կարևորագույն միացությունների որակական և քանակական որոշման կենսաքիմիական հիմնական մեթոդները, դրանց տեսական հիմնավորումը: Լաբորատոր աշխատանքների մանրամասն նկարագրությունը հնարավորություն կտա ուսանողներին ընկալել առաջարկվող մեթոդի սկզբունքը, նպատակահարմարությունը, դրանք իրականացնել ինքնուրույն, առանց լրացուցիչ ցուցումների, մշակել հետազոտությունների արդյունքում ստացված տվյալները:

Ձեռնարկը նախատեսված է կենսաքիմիայի, կենսատեխնոլոգիայի, կենսաբանության, բժշկության, դեղագործության տարբեր մասնագիտությունների ուսանողների, ինչպես նաև կենսաքիմիայի հիմնահարցերով բոլոր հետաքրքրվողների համար:

ՀՏԴ 577(07)
ԳՄԴ 28.072գ7

ISBN 978-5-8084-2261-2

© ԵՊՀ հրատ., 2017
© Թռչունյան Ա. Հ., Հայրապետյան Ն. Կ., Կարապետյան Հ. Մ., 2017

ՆԵՐԱԾՈՒԹՅՈՒՆ

Կենսաքիմիա առարկան ուսումնասիրում է օրգանիզմների քիմիական բաղադրամասերի մոլեկուլային կառուցվածքը, դրանց կենսաբանական գործառույթները, կենսագործունեության ընթացքում տեղի ունեցող փոփոխությունները: Կենսաքիմիական լաբորատորիաներում կատարում են հետազոտություններ՝ ուղղված օրգանիզմներում առկա միացությունների որակական, քանակական կազմի բացահայտմանը: Կենսաքիմիական հետազոտություններում նոր ֆիզիկաքիմիական մեթոդների կիրառումը նպաստում է կենսաքիմիայի զարգացմանը, ինչն ապահովում է օրգանիզմի կենսագործունեության օրինաչափությունների իմացության ավելի խորը մակարդակ:

Լաբորատոր աշխատանքների տվյալ ձեռնարկում ներկայացված են օրգանական միացությունների՝ սպիտակուցների, ֆերմենտների, ածխաջրերի, լիպիդների հատկությունների որակական, քանակական որոշման ժամանակակից մեթոդներ: Ժամանակակից կենսաքիմիական մեթոդների կիրառումը ուսանողներից պահանջում է հետազոտվող նմուշների հոմոգենատների, լուծամզվածքների պատրաստման իմացություն, լաբորատոր սարքավորումներով (հոմոգենիզատոր, ցենտրիֆուգ, լուսաէլեկտրագունաչափ) աշխատելու կարողություն: Ձեռնարկում ներառած աշխատանքները կնպաստեն նմանօրինակ գործնական հմտությունների ձեռքբերմանը: Ձեռնարկը համապատասխան գործնական աշխատանքների օգնությամբ ուսանողներին հնարավորություն կընձեռի ամրապնդել ստացած տեսական գիտելիքների պաշարը: Ձեռնարկում ներկայացված են տարբեր բարդության լաբորատոր աշխատանքներ, որոնց հիմնական խնդիրն է ուսանողներին ծանոթացնել փորձարարական կենսաքիմիայի կարևոր սկզբունքներին և մեթոդական հնարքներին:

Ձեռնարկի յուրաքանչյուր աշխատանք ներառում է մեթոդի սկզբունքի, աշխատանքի ընթացքի, օգտագործվող ռեակտիվների, սարքավորումների նկարագրություն: Աշխատանքների մանրամասն նկարագրությունը հնարավորություն կտա ուսանողներին ընկալել առաջարկվող մեթոդի սկզբունքը, նպատակահարմարությունը, դրանք իրականացնել ինքնուրույն, առանց լրացուցիչ ցուցումների, մշակել հետազոտությունների արդյունքում ստացված տվյալները:

Կենսաքիմիայի դասընթացի ավարտին ուսանողը կտիրապետի կենդանի օրգանիզմների կարևորագույն միացությունների որակական և քանակական որոշման հիմնական մեթոդներին:

Ուսումնամեթոդական ձեռնարկի աշխատանքները մշակված են «Կենսաքիմիա» առարկայի ուսումնական ծրագրին համապատասխան: Ձեռնարկը ներառում է 99 լաբորատոր աշխատանքներ, որոնք համապատասխանում են դասավանդվող առարկայի տեսական նյութին: Ձեռնարկի յուրաքանչյուր բաժին ներառում է ներկայացված նյութին վերաբերող հարցեր, լաբորատոր աշխատանքների և նկարների համարակալումը տրված է ըստ համապատասխան գլուխների:

ԱՆՎՏԱՆԳՈՒԹՅԱՆ ՏԵԽՆԻԿԱՅԻ ԿԱՆՈՆՆԵՐԸ ԿԵՆՍԱՔԻՄԻԱՅԻ ԼԱԲՈՐԱՏՈՐԻԱՅՈՒՄ

Լաբորատոր աշխատանքների իրականացման ընթացքում տարբեր սարքերի, քիմիական ռեակտիվների կիրառումը ուսանողներից պահանջում է անվտանգության կանոնների իմացություն:

Կենսաքիմիայի լաբորատորիայում աշխատելու առանձնահատկությունները

Անվտանգության կանոնների ընդհանուր պահանջները

1. Յուրաքանչյուր աշխատանք սկսել անվտանգության կանոններին ծանոթանալուց հետո:
2. Լաբորատորիայում աշխատել լաբորատոր խալաթով, անհրաժեշտության դեպքում՝ նաև ռետինե ձեռնոցներով:
3. Լաբորատոր աշխատանքը սկսելուց առաջ ծանոթանալ մեթոդին, ստուգել անհրաժեշտ ռեակտիվների, համապատասխան սարքավորումների առկայությունը:
4. Լաբորատոր աշխատանքը կատարել միայն մաքուր և չոր լաբորատոր ապակեղենով:
5. Օգտագործել ռեակտիվների համար նախատեսված չափիչ անոթներ, գլաններ, բաժակներ և այլն:
6. Եթե փորձի ընթացքում ռեակցիոն խառնուրդը պետք է տաքացնել, հետևել տաքացման առաջարկված եղանակին: Հեղուկների և պինդ նյութերի տաքացման ժամանակ անոթներն ուղղել հակառակ կողմ, չնայել դրանց մեջ:
7. Թափված ռեակտիվները մաքրել լաբորանտի ներկայությամբ՝ հետևելով կանոններին:
8. Աշխատանքի ավարտից հետո կարգի բերել աշխատանքային սեղանը, լվանալ ապակեղենը, անջատել էլեկտրական սարքերը:
9. Աշխատանքի ընթացքում պահպանել անձնական հիգիենայի կանոնները:

Անվտանգության կանոնների պահպանումը թթուների և հիմքերի հետ աշխատելու ընթացքում

1. Թթուները և հիմքերը հիմնականում վտանգավոր նյութեր են, կարող են առաջացնել քիմիական այրվածքներ, թունավորումներ և անհրաժեշտ է ուշադիր հետևել, որ դրանք չթափվեն դեմքին, ձեռքերին, հագուստին:
2. Չի կարելի «զբոսնել» լաբորատորիայով խիտ թթուները, հիմքերը ձեռքին:
3. Խիտ ազոտական, ծծմբական թթուները, աղաթթուն անոթից անոթ տեղափոխել քարշիչ պահարանում միացված օդափոխիչի պայմաններում:
4. Կաթոցիչի օգնությամբ բերանով վերցնել թթուները, հիմքերը արգելվում է:
5. Թթուների նոսրացման դեպքում թթուն բարակ շիթով ավելացնել ջրով անոթի մեջ՝ զգուշությամբ խառնելով լուծույթը: Թթվին ջուր ավելացնելն արգելվում է:
6. Չոր հիմքերը լուծելու նպատակով հիմքի բյուրեղները, անընդհատ խառնելով, դանդաղ ավելացնել ջրով անոթի մեջ: Հիմքի բյուրեղները վերցնել շպատելով:
7. Թափված թթուները կամ հիմքերը անմիջապես ծածկել ավազով, ապա մաքրել:
8. Մաշկի, հագուստի վրա թափված թթուն լվանալ ջրի մեծ քանակով, այնուհետև մաշկը մշակել 3-5% սոդայով կամ ամոնիակի նոսրացված լուծույթով:
9. Մաշկի, հագուստի վրա թափված հիմքը լվանալ ջրի մեծ քանակով, այնուհետև մաշկը մշակել 2-3% կիտրոնաթթվով կամ քացախաթթվով:

Անվտանգության կանոնների պահպանումը քիմիական ապակեղենի հետ աշխատելու ժամանակ

1. Ապակեղենով աշխատելու ընթացքում հիմնական վտանգն ապակու սուր բեկորներով վնասվելն է, բարձր ջերմաստիճանի պայմաններում տաքացվող ապակեղենի հետ անզգույշ վարվելիս այրվածքներ ստանալը: Ապակով վնասվելու դեպքում վնասված հատվածը մշակել 2%-անոց կալիումի պերմանգանատի լուծույթով, յոդով վիրակապ դնել: Այրվածքի դեպքում վնասված հատվածը ծածկել կալիումի պերմանգանատով թրջած բամբակով:

2. Ապակյա ձողիկով լուծույթները խառնել զգուշորեն՝ չվնասելով անոթը:
3. Տաք լուծույթով անոթները տեղափոխել երկու ձեռքով:
4. Լուծույթը տաքացնել միայն համապատասխան նիշ ունեցող ապակյա անոթում:
5. Լուծույթը տաքացնելիս լուծույթի ծավալը պետք է կազմի առավելագույնը անոթի 1/3 մասը:

Անվտանգության կանոնների պահպանումը էլեկտրասարքերի, սարքավորումների հետ աշխատելու ժամանակ

1. Էլեկտրասարքերի հետ կապված բոլոր աշխատանքները կատարել լաբորանտի ներկայությամբ:
2. Ջրային բաղնիքի օգտագործման ժամանակ ջրի տաքությունը ձեռքով չստուգել:
3. Այրվածքների դեպքում վնասված հատվածը ծածկել պերմանգանատով թրջած բամբակով:
4. Սարքավորումների անսարքության դեպքում դիմել լաբորանտին: Ինքնուրույն վերանորոգելն արգելվում է:
5. Ցենտրիֆուգելուց առաջ հավասարակշռել ցենտրիֆուգի փորձանոթները: Ցենտրիֆուգման ընթացքում խցիկը չբացել: Աշխատանքի ավարտից հետո թողնել թմբուկը (ռոտորը) լիարժեք կանգնի, ձեռքով չկանգնեցնել:

Անվտանգության կանոնների պահպանումը ռեակտիվների հետ աշխատելու ժամանակ

1. Ռեակտիվներն օգտագործել խնայողաբար:
2. Օգտագործվող լուծույթի մնացորդը չլցնել մայր լուծույթի մեջ:
3. Ռեակտիվը վերցնելուց հետո անոթը, սրվակը փակել:
4. Չոր նյութերը վերցնել մաքուր, չոր շպատելով:
5. Տարբեր ռեակտիվներ վերցնել տարբեր կաթոցիչներով:
6. Ռեակտիվի տարան չբացել ձեռքում պահած վիճակում:
7. Քիմիական նյութերը և պատրաստի ռեագենտները պահել նշանագրված տարաներում: Եթե տարայի պարունակությունը հայտնի չէ, նյութը՝ ոչնչացնել համաձայն քիմիական նյութերի ուտիլիզացման կանոնների:

Առաջին օգնության միջոցառումները

Հանքային թթուներով թունավորման դեպքում.

Ազոտական թթու – մաքուր օդ ապահովել, կատարել արհեստական շնչառություն:

Ծծմբական թթու – մաքուր օդ ապահովել, վերին շնչառական ուղիները լվանալ սողայի 2%-անոց լուծույթով: Մարսողական ուղիները լվանալ ջրի մեծ քանակով: Արհեստական փսխում չառաջացնել:

Հիմքերով թունավորման դեպքում – տաք ջրի գոլորշիներ ներշնչել (ջրին ավելացնել կիտրոնաթթու): Խմել տաք կաթ մեղրով: Մարսողական ուղիների վնասման դեպքում բերանի խոռոչը և կոկորդը մշակել 1% նովոկայինով: 3-5 րոպե ընդմիջումներով ընդունել 1% կիտրոնաթթու կամ 2-3 ճաշի գդալ բուսական յուղ, սառույցի կտորներ:

Եթերով, քլորոֆորմով կամ սպիրտով թունավորման դեպքում ապահովել մաքուր օդ, կատարել արհեստական շնչառություն:

ԳԼՈՒԽ 1
ՍՊԻՏԱԿՈՒՑՆԵՐ

Սպիտակուցները բարձրամոլեկուլային ազոտ պարունակող օրգանական միացություններ են, որոնց մոնոմերներն են ամինաթթուները: Կենդանի բնությունը անկենդան բնությունից տարբերվում է մի շարք հատկություններով, և գրեթե բոլոր այդ հատկությունները կապված են սպիտակուցների հետ: Կենդանի օրգանիզմներին բնորոշ է սպիտակուցային կառույցների լայն բազմազանություն: Կենդանի օրգանիզմների՝ իրենց նմաններին վերարտադրելու զարմանալի ունակությունը նույնպես կապված է սպիտակուցների հետ: Կծկողականությունն ու շարժումը անմիջականորեն պայմանավորված են մկանային ապարատի սպիտակուցային կառուցվածքով: Եվ վերջապես կյանքը անհնար է առանց նյութափոխանակության, այսինքն՝ առանց անաբոլիզմի և կատաբոլիզմի գործընթացների, որոնց հիմքում ընկած է սպիտակուց-ֆերմենտների կատալիտիկ ակտիվությունը:

Այսպիսով՝ սպիտակուցները կազմում են կենդանի օրգանիզմների և՛ կառուցվածքի, և՛ կենսագործունեության հիմքը: Բնության մեջ գոյություն ունեն 10^{10} - 10^{12} տարբեր սպիտակուցներ, որոնք ապահովում են զարգացման տարբեր մակարդակներ ունեցող մոտ 10^6 տեսակի կենդանի օրգանիզմների գոյությունը: Սպիտակուցների այս բազմազանության մեջ շատ փոքր խումբ են կազմում այն սպիտակուցները, որոնց կառուցվածքն ու կազմությունը ճշգրտորեն հայտնի են: Յուրաքանչյուր օրգանիզմ բնորոշվում է սպիտակուցների եզակի հավաքածուով: *E. coli* բջիջներում պարունակվում են ավելի քան 3000, իսկ մարդու բջիջներում՝ ավելի քան 100000 տարբեր սպիտակուցներ: Սպիտակուցների բաղադրության մեջ մտնող ամինաթթուները միմյանց միացած են պեպտիդային կապերով: Պրոտեինածին ամինաթթուները միանում են միմյանց ամենատարբեր հաջորդականություններով՝ ձևավորելով սպիտակուցների մեծ բազմազանություն: Սակայն բնությունը չի կարող թույլ տալ ամինաթթուների հաջորդականությունների պատահական համակցումներ: Օրգանիզմների յուրաքանչյուր տեսակին բնորոշ է ժառանգական նյութով պայմանավորված իր յուրահատուկ սպիտակուցային հավաքածուն: ԴՆԹ-ի նուկլեոտիդային հաջորդականությունն է որոշում սինթեզվող սպիտակուցի պոլիպեպտիդային շղթայում ամինաթթուների գծային հաջորդականությունը:

Առաջացած գծային պոլիպեպտիդային շղթան արդեն օժտված է այնպիսի գործառույթային ակտիվությամբ, որի համաձայն՝ կարող է ձևավորել իր կայուն եռաչափ կառուցվածքը, բայց ոչ թե պատահականորեն, այլ ամինաթթվային հաջորդականություններին խիստ համապատասխան:

ՍՊԻՏԱԿՈՒՑՆԵՐԻ ՖԻԶԻԿԱՔԻՄԻԱԿԱՆ ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Սպիտակուցների առավել բնորոշ ֆիզիկաքիմիական հատկություններն են լուծույթների բարձր մածուցիկությունը, աննշան դիֆուզիան, որոշակի սահմաններում ուռչելու ունակությունը, օպտիկական ակտիվությունը, շարժունակությունն էլեկտրական դաշտում, բարձր կամ ցածր օսմոսային ճնշումը, ուլտրամանուշակագույն ճառագայթները կլանելու ունակությունը, ինչը պայմանավորված է սպիտակուցներում արոմատիկ ամինաթթուների առկայությամբ:

Սպիտակուցները ազատ NH_3^+ և COO^- խմբերի շնորհիվ ամֆոտեր պոլիէլեկտրալիտներ են, ունեն և՛ հիմքերին, և՛ թթուներին բնորոշ հատկություններ: Կախված միջավայրի ռեակցիայից և թթվային ու հիմնային ամինաթթուների հարաբերությունից, սպիտակուցները կարող են կրել կա՛մ դրական, կա՛մ բացասական լիցք՝ էլեկտրական դաշտում շարժվելով համապատասխան բար ղեպի անոդ կամ կատոդ: Այս հատկությունն օգտագործվում է էլեկտրաֆորեզի մեթոդով սպիտակուցներն անջատելիս: Սպիտակուցները՝ որպես ամֆոլիտներ, բնորոշվում են իզոէլեկտրական կետով (pI), որի պայմաններում սպիտակուցի մոլեկուլները չունեն լիցք և էլեկտրական դաշտում չեն շարժվում: Սպիտակուցները, որոնց pI-ն փոքր է pH 7-ից, կոչվում են թթվային, իսկ սպիտակուցները, որոնց pI-ն մեծ է pH 7-ից, կոչվում են հիմնային:

Գոյություն ունեն հիդրոֆիլ և հիդրոֆոբ սպիտակուցներ: Լուծելի սպիտակուցները կարող են ուռչել մեծ սահմաններում: Սպիտակուցների լուծելիությունը փոխվում է նաև՝ կախված միջավայրի pH-ից և լուծույթում աղերի կոնցենտրացիայից: Հետևաբար միշտ կարելի է ընտրել այնպիսի պայմաններ, երբ սպիտակուցը կարող է ընտրողաբար նստել մյուս սպիտակուցների առկայությամբ: Այս մեթոդը լայնորեն օգտագործվում է սպիտակուցների անջատման և մաքրման համար: Հիդրոֆիլ սպիտակուցներին են պատկանում ցիտոպլազմի, կորիզի և միջբջջային նյութի համարյա բոլոր սպիտակուցները: Հիդրոֆոբ սպիտակուցներին են պատկանում ինտեգրալ սպիտակուցների միջթաղանթային դոմենները: Սպիտակուցների մոլեկուլները չեն կարող անցնել կիսաթափանցիկ արհեստական թաղանթներով, ինչպես նաև բուսական և

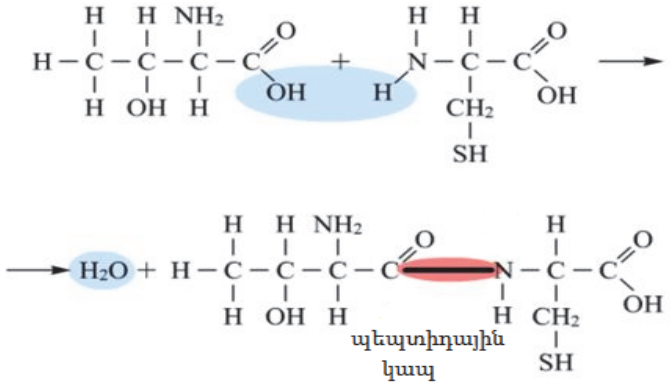
կենդանական հյուսվածքների կենսաբանական թաղանթներով: Բայց ախտաբանական որոշ իրավիճակներում, օրինակ՝ երիկամների օրգանական վնասվածքների դեպքում երիկամային կծիկը դառնում է թափանցելի արյան շիճուկի ալբումինների համար, և վերջիններս հայտնվում են մեզում:

Բոլոր ամինաթթուները, բացառությամբ գլիցինի, ունեն անհամաչափ ածխածին (խիրալ կենտրոն) և օժտված են օպտիկական ակտիվությամբ: Անհամաչափ ածխածնի առկայության շնորհիվ տարբերում են ամինաթթուների երկու իզոմերներ՝ L և D ձևեր, որոնք տարբերվում են բևեռացված լույսի հարթությունը շեղելու ուղղությամբ: Սպիտակուցներում հանդիպում են միայն L-ամինաթթուները, իսկ D-ամինաթթուները հանդիպում են որոշ հակաբիոտիկներում և բակտերիաների բջջապատում:

Սպիտակուցի մոլեկուլները շատ զգայուն են, կարող են քայքայվել տարբեր գործոնների ազդեցությամբ, ինչի արդյունքում փոխվում են դրանց կենսաբանական և ֆիզիկաքիմիական հատկությունները:

ՍՊԻՏԱԿՈՒՑԱՅԻՆ ՄՈԼԵԿՈՒԼՆԵՐԻ ԿԱՌՈՒՑՎԱԾՔԱՅԻՆ ՄԱԿԱՐԴԱԿՆԵՐԸ

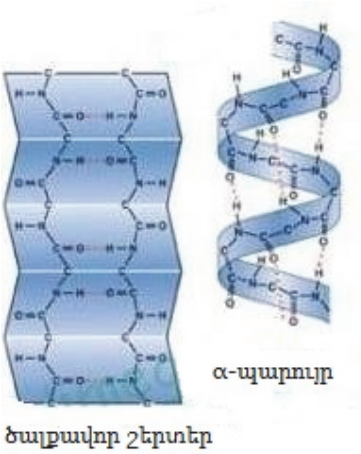
Սպիտակուցի մոլեկուլում ամինաթթուները միանում են միմյանց պեպտիդային կապերով և առաջացնում պոլիպեպտիդային շղթա: Պեպտիդային կապն առաջանում է մի ամինաթթվի կարբօքսիլ խմբի և մյուս ամինաթթվի ամինա խմբի միջև, ինչն ուղեկցվում է ջրի մոլեկուլի անջատմամբ (նկ. 1.1):



Նկ. 1.1 Պեպտիդային կապի առաջացումը:

Տարբերում են սպիտակուցի կառուցվածքային հետևյալ մակարդակները:

Առաջնային կառուցվածքը պոլիպեպտիդային շղթայում ամինաթթուների հաջորդականությունն է: Առաջնային կառուցվածքը պայմանավորում է սպիտակուցի գործառույթը:



Նկ. 1.2. Սպիտակուցի երկրորդային կառուցվածքը:

Երկրորդային կառուցվածքը պոլիպեպտիդային շղթայի պարուրաձև կառուցվածքն է, որը պահպանվում է ջրածնային կապերով (նկ. 1.2): **α-պարույրը** ներկայացվում է մոլեկուլի առանցքի շուրջ խիտ դասավորված գալարներով: Մեկ գալարի մեջ ներառված է 3,6 ամինաթթվային մնացորդ, իսկ պարույրի քայլը կազմում է 0.54 նմ: Պարույրը կայունացվում է միմյանցից 4 օղակ հեռու գտնվող պեպտիդային կապը կազմող – H և – O ատոմների միջև գործող ջրածնային կապերով: Պարույրը կազմված է միայն մեկ տիպի ստերիոիզոմերներից (L): Գոյություն ունեն ինչպես աջ պտտող, այնպես էլ ձախ պտտող պարույրներ, սակայն սպիտակուցներում գերակշռում է աջակողմյան պարույրը: Իրար մոտ դասավորված ասպարագինի, լեյցինի, սերինի և թրեոնինի մնացորդները կարող են խանգարել պարույրի առաջացմանը, իսկ պրոլինի մնացորդներն առաջացնում են ծալքեր, որոնք ևս խախտում են α-պարույրը:

β-կառուցվածք (ծալքավոր շերտեր) - մի քանի զիգզագաձև պոլիպեպտիդային շղթաներ են, որոնցում ջրածնային կապերն առաջանում են առաջնային կառուցվածքում համեմատաբար միմյանցից հեռու գտնվող (0,347 նմ) ամինաթթուների կամ սպիտակուցի տարբեր շղթաների միջև. այդ շղթաները սովորաբար N ծայրերով ուղղված են հակառակ կողմեր (հակազուգահեռ կողմնորոշում): β-ծալքերի առաջացման համար կարևոր են ամինաթթուների կողմնային խմբերի չափերը: β-կառուցվածքում սովորաբար գերակշռում են գլիցինը և ալանինը:

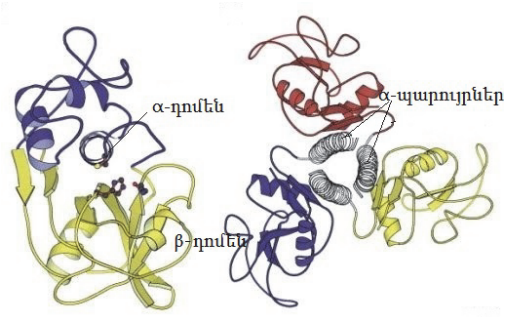
Կոլագենային պարույրը երեք α-շղթաների աջակողմյան պարույր է: Նման կառուցվածքը կոչվում է տրոպոկոլագեն: α-շղթայի մեկ պտույտը պարունակում է երեք ամինաթթվային մնացորդ: Սպիտակուցի առաջնային կառուցվածքի համար բնորոշ են գլիցինի բարձր պարունակությունը (30%), տրիպտոֆանի բացակայությունը և ծծումբ պարունակող ամինաթթուների ցածր պարունակությունը: Կոլագենը նաև պարունակում է ոչ ստանդարտ

ամինաթթուներ. ամինաթթվային մնացորդների 21%-ը կազմում են 3-հիդրօքսիպրոլինը, 4- հիդրօքսիպրոլինը և 5- հիդրօքսիլիզինը:

Գերերկրորդային կառուցվածքը բարձր կազմավորված կառույց է՝ ներկայացված միմյանց հետ փոխազդող երկրորդային կառուցվածքներով՝

- Երկու հակազուգահեռ α-պարույրային հատվածներ, որոնք փոխազդում են հիդրոֆոբ լրացչական մակերեսներով:
- Ռոսմանի ծալք (βαβαβ – այսինքն՝ α-պարույրի երկու հատվածներ մխրճված են երեք զուգահեռ β-շղթաների միջև):
- «B-մեանդր» (երեք հակազուգահեռ β-շղթաների շերտ), օրինակ՝ տրիոզֆոսֆատիզոմերազը և պիրուվատկինազի մեկ դոմենը ունեն գերերկրորդային կառուցվածք:
- Հիստոնները համալիրներ են առաջացնում լեյցինային մնացորդներով: Մեկ սպիտակուցի α-պարույրի լեյցինային մնացորդները հիդրոֆոբ փոխազդեցություններով կապվում են մյուս սպիտակուցի լեյցինային մնացորդներին:

Դոմեն – պոլիպեպտիդային շղթայի ներսում խիտ գլոբուլային կառուցվածքային միավոր է: Դոմենները կարող են կատարել տարբեր գործառույթներ, ենթարկվել փաթեթավորման՝ որպես անկախ խիտ գլոբուլային կառուցվածքային միավորներ, որոնք սպիտակուցի մոլեկուլի կազմում միմյանց միացած են ճկուն հատվածներով (նկ. 1.3):



Նկ. 1.3. Սպիտակուցի դոմենային կառուցվածքը:

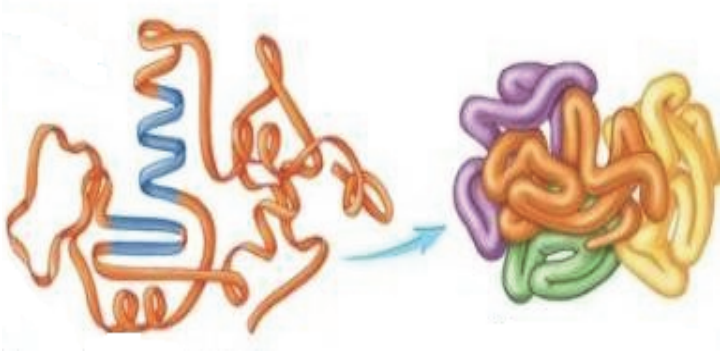
Երրորդային կառուցվածքը պոլիպեպտիդային շղթայի տարածական կառուցվածքն է՝ կազմված տարբեր կապերով կայունացվող երկրորդային կառուցվածքային տարրերից: Դիսուլֆիդային, իոնային, ջրածնային կապերը, ինչպես նաև հիդրոֆոբ փոխազդեցությունները ստիպում են սպիտակուցային շղթաներին ծալվել՝ առաջացնելով գլոբուլ: Երրորդային կառուցվածքի կայունացմանը մասնակցում են.

- Հիդրոֆոբ-հիդրոֆոբ փոխազդեցությունները: Շրջապատող ջրի մոլեկուլների հետ փոխազդելով՝ սպիտակուցի մոլեկուլն այնպես է շրջվում, որ ամինաթթվային մնացորդների կողմնային ոչ բևեռային

խմբերը մեկուսացվում են ջրային լուծույթից, իսկ սպիտակուցի մակերևույթին հայտնվում են հիդրոֆիլ կողմնային խմբերը:

- Կովալենտային կապերը, երբ երկու ցիստեինի մնացորդների միջև առաջանում են դիսուլֆիդային կամրջակներ:
- Էլեկտրաստատիկական փոխազդեցության ուժերը ամինաթթվային մնացորդների հակադիր լիցքավորված կողմնային խմբերի միջև:
- Աղային և ջրածնային կապերը, Վան-դեր-Վալսյան փոխազդեցությունները:

Հիդրոֆոբ ուժերի ազդեցությամբ մոլեկուլը ձեռք է բերում սպիտակուցի բնականոն կառուցվածքին նմանվող տարածական կառուցվածք, որը, սակայն, օժտված չէ տվյալ սպիտակուցին բնորոշ գործառույթային ակտիվությամբ: Այդ վիճակը կոչվում է «հալված գլոբուլ», որը բնականոն կառուցվածքից տարբերվում է խտության աստիճանով, կառուցվածքի կարգավորվածությամբ և մեծ չափերով:



ա **բ**

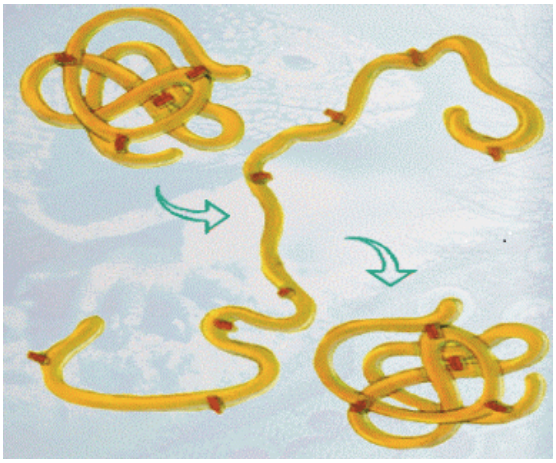
Նկ. 1.4. Սպիտակուցի ա) երրորդային և բ) չորրորդային կառուցվածքները:

Սպիտակուցի մոլեկուլը վերջնական կայունանում է Վան-դեր-Վալսյան ուժերի ազդեցության հաշվին, ինչպես նաև ջրածնային և իոնային կապերի ազդեցությամբ. փոխազդեցություններ, որոնք առավել բնորոշ և զգայուն են ատոմական կառուցվածքի նկատմամբ:

Չորրորդային կառուցվածքը մի քանի պոլիպեպտիդային շղթաների փոխադարձ դասավորվածությունն է մեկ միասնական սպիտակուցային համալիրի ներսում: Չորրորդային կառուցվածքի կազմի մեջ մտնող սպիտակուցային մոլեկուլները ռիբոսոմների վրա առաջանում են առանձին, փաթեթավորվում են և միայն դրանից հետո առաջացնում ընդհանուր վերմոլեկուլային կառույց (նկ. 1.4): Չորրորդային կառուցվածքի մեջ կարող են միավորվել ինչպես նմանատիպ, այնպես էլ տարբեր պոլիպեպտիդային շղթաներ: Չորրոր-

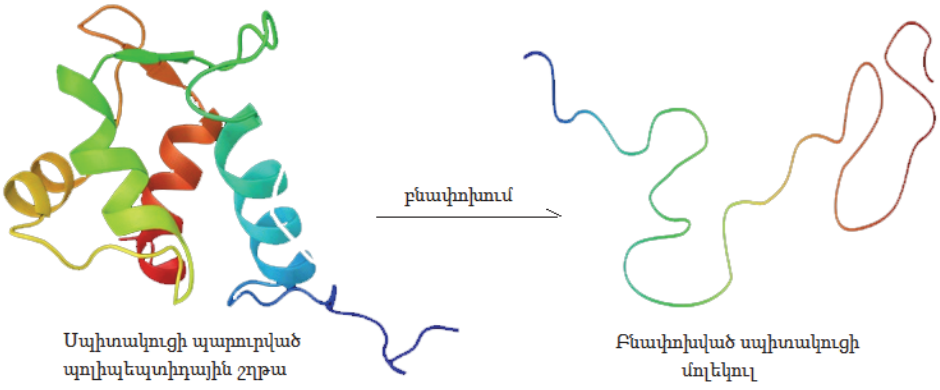
դային կառուցվածքի կայունացմանը մասնակցում են բոլոր այն փոխազդեցությունները, ինչ և երրորդային կառուցվածքի դեպքում՝ բացառությամբ դիսուլֆիդային կապերի:

Չորրորդային կառուցվածքը սպիտակուցային մոլեկուլի վերջին, բայց ոչ պարտադիր կառուցվածքային մակարդակն է: Սպիտակուցների մի մասը չունի չորրորդային կառուցվածք:



Նկ. 1.5. Սպիտակուցի դարձելի բնափոխումը:

Մի շարք գործոնների (տաքացում, ճառագայթում, ուժեղ թթուներ և հիմքեր, ծանր մետաղներ, օրգանական լուծիչներ) ազդեցությամբ սպիտակուցները ենթարկվում են բնափոխման: Սպիտակուցի մոլեկուլը դարձելի (ժամանակավոր) (նկ. 1.5) կամ ոչ դարձելի (նկ. 1.6) կորցնում է իր երրորդային կառուցվածքը կամ առաջացնում նստվածք՝ կորցնելով իր ֆիզիկաքիմիական հատկությունները և կենսաբանական ակտիվությունը:



Նկ. 1.6. Սպիտակուցի ոչ դարձելի բնափոխումը:

ՍՊԻՏԱԿՈՒՑՆԵՐԻ ԵՎ ՈՐՈՇ ԱՄԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻ ՀԱՅՏՆԱԲԵՐՄԱՆ ՌԵԱԿՑԻԱՆԵՐԸ

Որոշ քիմիական միացությունների և սպիտակուցների փոխազդեցության արդյունքում առաջանում են գունավորված միացություններ, ինչը պայմանավորված է սպիտակուցի մոլեկուլում այս կամ այն ամինաթթվի առկայությամբ: Սպիտակուցների գունավորման ռեակցիաները հաճախ օգտագործվում են որպես միացությունների սպիտակուցային բնույթը հաստատող միջոց: Այս ռեակցիաները կիրառվում են նաև ամինաթթվային կազմի որակական և քանակական ուսումնասիրման նպատակով:

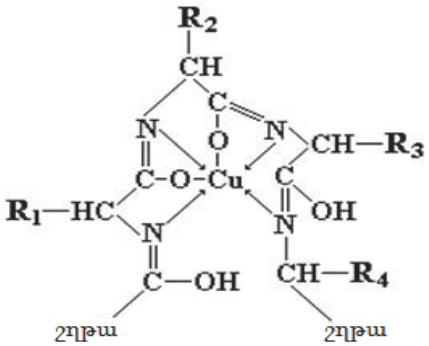
Աշխատանք 1.1. Բիուրետի ռեակցիա

Այն բոլոր միացությունները, որոնք իրենց մոլեկուլում ունեն առնվազն երկու պեպտիդային կապ, հիմնային միջավայրում պղնձարջասպի աղի ներկայությամբ առաջացնում են համալիր միացություններ, որոնք ունեն վարդագույնից մինչև մանուշակագույն գունավորում (նկ. 1.8): Պեպտիդային կապն առաջացնող խումբը հիմնային միջավայրում գլխավորապես գտնվում է էնոլային ձևով

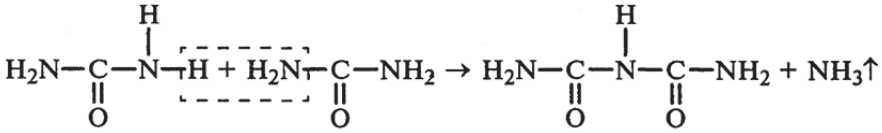


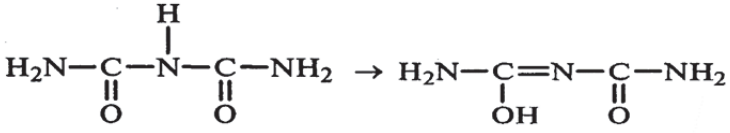
Հիմքի ավելցուկի պայմաններում կատարվում է OH խմբի դիսոցում, ի հայտ է գալիս բացասական լիցք, որի օգնությամբ թթվածինը փոխազդում է պղնձի հետ, առաջանում է աղանման կապ: Բացի այդ պղինձը պեպտիդային կապը կազմող ազոտի հետ առաջացնում է լրացուցիչ կոորդինացիոն կապեր՝ օգտագործելով դրանց էլեկտրոնային զույգերը:

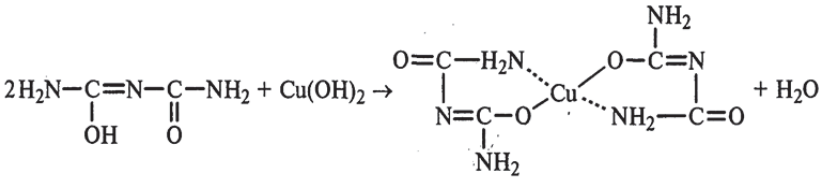
Առաջացած համալիրը բավականին կայուն է, իսկ նրա գունավորման ուժգնությունը կախված է սպիտակուցի կոնցենտրացիայից և լուծույթում պղնձի աղի քանակից:



Բիուրետի ռեակցիայով հայտնաբերվում են բոլոր սպիտակուցները, ինչպես նաև դրանց ոչ լրիվ հիդրոլիզի արգասիքները՝ պեպտոնները և պոլիպեպտիդները: Երկպեպտիդների և եռպեպտիդների համար բիուրետի ռեակցիան հուսալի չէ: Պեպտոններն առաջացնում են վարդագույն կամ կարմիր գունավորում (կախված պոլիպեպտիդային շղթայի երկարությունից): Բիուրետի ռեակցիան դրական է նաև մոլեկուլում ոչ պակաս, քան երկու պեպտիդային կապ պարունակող ոչ սպիտակուցային բնույթի միացությունների համար, որոնց թվին են պատկանում օքսամիդը՝ $NH_2 – CO – CO – NH_2$, և բիուրետը՝ $NH_2 – CO – NH – CO – NH_2$: Վերջինս առաջանում է միզանյութի տաքացման ժամանակ, երբ երկու մոլեկուլներ միանում են միմյանց և անջատվում է ամոնիակ, բիուրետը ենթարկվում է ներմոլեկուլային տեղաշարժի և պղնձի հետ առաջացնում վարդագույն գունավորում ունեցող հետևյալ համալիրը.







Նյութեր և ռեակտիվներ: Սպիտակուցի 1% լուծույթ (կազեին, ժելատին), ձվի սպիտակուց կամ շիճուկային ալբումին: Մեկ ձվի սպիտակուցը թորած ջրով նոսրացնել 15-20 անգամ: Լուծույթը զտել 3-4 շերտով ծալված թանզիֆով, պահել սառնարանում:

Միզանյութի (NH_2CONH_2) բյուրեղներ, նատրիումի հիդրօքսիդի (NaOH) 10 % լուծույթ, պղնձի սուլֆատի ($CuSO_4$) 1% լուծույթ, ամինաթթվի 1% լուծույթ:

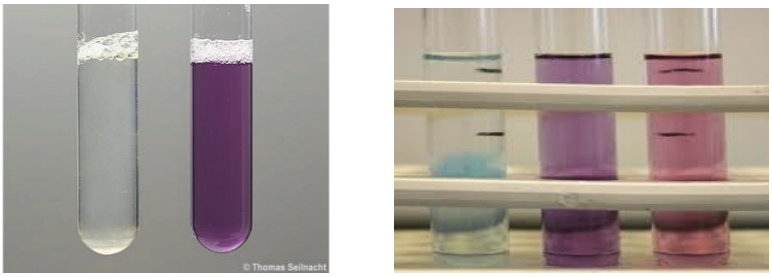
Պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ (նկ. 1. 7):



Նկ. 1.7. Ավտոմատ կաթոցիչ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Վերցնել 6 փորձանոթներ: Միզանյութի բյուրեղներ պարունակող փորձանոթը տաքացնել: Սկզբում միզանյութը հալչում է, անջատվում է ամոնիակ, այնուհետև սկսում է ամրանալ: Տաքացումը դանդաղեցնել և թողնել փորձանոթը սառչի: Առաջանում է բիուրետ: Ստացված բիուրետին ավելացնել 1 մլ NaOH-ի և 1-2 կաթիլ $CuSO_4$-ի լուծույթներ: Պետք է խուսափել $CuSO_4$-ի ավելցուկից՝ ռեակցիան չքողարկելու նպատակով: Առաջանում է վարդագույն գունավորում (նկ. 1.8.): Մյուս փորձանոթների մեջ լցնել 1-ական մլ ջուր, կազեինի լուծույթ, ձվի սպիտակուցի լուծույթ կամ շիճուկային ալբումին, ժելատինի լուծույթ, α-ամինաթթվի լուծույթ: Ապա յուրաքանչյուր փորձանոթի մեջ ավելացնել 1-ական մլ NaOH-ի և 1-2 կաթիլ $CuSO_4$-ի լուծույթներ, թափահարել և գունավորման առաջացման նպատակով 10 րոպե թողնել սենյակային ջերմաստիճանում:



ա բ գ դ ե

Նկ. 1. 8. Բիուրետի ռեակցիայի արգասիքները.
ա) սպիտակուցի լուծույթ, բ) և դ) սպիտակուցի և պղնձի իոնների համալիր, գ) ամինաթթու, ե) բիուրետի և պղնձի իոնների համալիր:

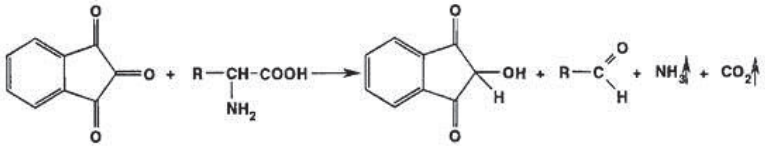
Ստացված արդյունքները գրանցել հետևյալ աղյուսակում:

Հետազոտվող նյութ	Արգասիքի գունավորում	Փոխազդող խումբ
Բիուրետի ռեակցիա		
Ջուր		
Սիզանյութ		
Կազեին		
Չվի սպիտակուց		
Ժելատին		
Ամինաթթու		

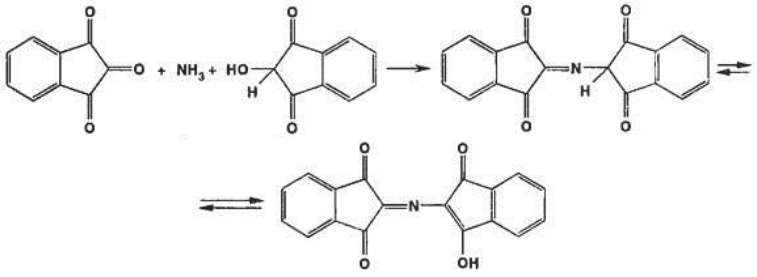
Աշխատանք 1.2. Նինհիդրինային ռեակցիա

Նինհիդրինային ռեակցիայով հայտնաբերվում են α-դիրքի ամինախմբերը: Սպիտակուցները, պոլիպեպտիդները և α-ամինաթթուները տաքացնելիս փոխազդում են նինհիդրինի (եռկետոհիդրինդենհիդրատ) հետ՝ առաջացնելով կոնդենսացման կապտամանուշակագույն արգասիք:

Ռեակցիան պայմանավորված է սպիտակուցի մոլեկուլում α-ամինաթթուների առկայությամբ: Նինհիդրինի հետ փոխազդելիս α-ամինաթթուներն օքսիդանում են և ճեղքվում՝ առաջացնելով ամոնիակ, ալդեհիդ և ածխաթթու գազ: Վերականգնված նինհիդրինն ամոնիակի ներկայությամբ փոխազդում է երկրորդ մոլեկուլ օքսիդացած նինհիդրինի հետ՝ առաջացնելով կոնդենսացման արգասիք. կապտամանուշակագույն համալիր (Ռուէմանի համալիր):



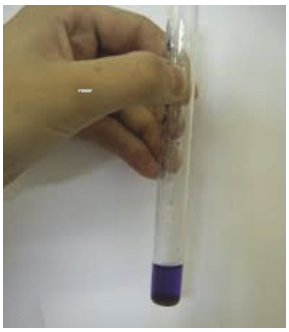
օքսիդացված նինհիդրին **վերականգնված նինհիդրին**



Ռուէմանի համալիր

Ռուէմանի համալիր առաջացնում են նաև առաջնային ամինները, ամոնիակը և որոշ այլ միացություններ: Երկրորդային ամինները, օրինակ՝ պրոլինը և օքսիպրոլինը, ստանում են դեղին գունավորում:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Սպիտակուցի 1% լուծույթ (կազեին, ժելատին), ձվի սպիտակուց կամ շիճուկային ալբումին, նինհիդրինի ($C_9H_6O_4$) 0.2 % սպիրտային լուծույթ, գլիցինի (NH_2-CH_2-COOH) 0,1 % լուծույթ:



Նկ. 1.9. Կապտամանուշակագույն գունավորում ունեցող Ռուէման:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, ջրային բաղնիք:

Աշխատանքի ընթացքը.

Վերցնել 5 փորձանոթներ, լցնել 1-ական մլ 1-ին փորձանոթի մեջ ջուր, 2-րդի մեջ՝ կազեինի լուծույթ, 3-րդի մեջ՝ ձվի սպիտակուց, 4-րդի մեջ՝ ժելատին, 5-րդ փորձանոթի մեջ՝ գլիցինի լուծույթ, ապա յուրաքանչյուր փորձանոթին ավելացնել 5-6 կաթիլ $C_9H_6O_4$-ի լուծույթ, պարունակությունը թափահարել և 3-5 րոպե թողնել եռացող ջրային բաղնիքում մինչև մանուշակագույն գունավորման առաջացումը (նկ. 1.9):

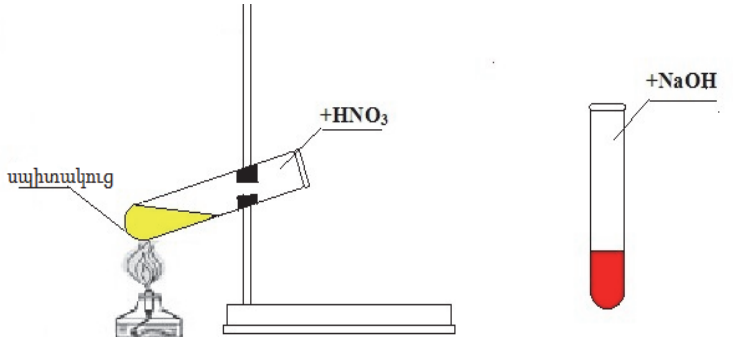
Ստացված արդյունքները համեմատել և գրանցել հետևյալ աղյուսակում:

Հետազոտվող նյութ	Արգասիքի գունավորում	Փոխազդող խումբ
Նինհիդրինային ռեակցիա		
Ջուր		
Կազեին		
Ձվի սպիտակուց		
Ժելատին		
Գլիցին		

Աշխատանք 1.3. Քսանտոպրոտեինային ռեակցիա

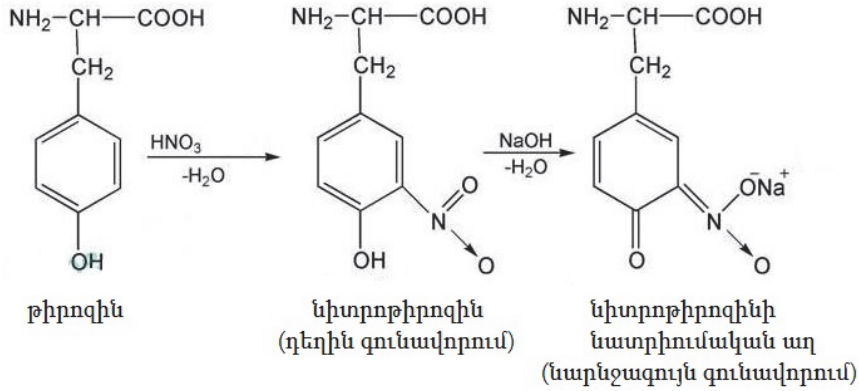
Այն բոլոր միացությունները, որոնց բաղադրության մեջ առկա են բենզոլային օղակ պարունակող ամինաթթուներ (թիրոզին, տրիպտոֆան, ֆենիլալանին) խիտ ազոտական թթվի հետ տաքացնելիս առաջացնում են դեղին գունավորում ունեցող արգասիք (հունարեն քսանտոս-դեղին), որը դառնում է ևարնջագույն միջավայրին հիմք ավելացնելիս: Ռեակցիան պայմանավորված է այդ ամինաթթուների բենզոլային օղակի նիտրացմամբ, որի արդյունքում առաջանում են դեղին գույնի նիտրոմիացություններ, իսկ նատրիումի

հիդրօքսիդի առկայությամբ ի հայտ են գալիս խինոիդային կառուցվածքով նարնջագույն աղեր (նկ. 1.10):



Նկ. 1.10. Քսանտոպրոտեինային ռեակցիայի արգասիքների առաջացումը:

Քսանտոպրոտեինային ռեակցիա ցուցաբերում են նաև բենզոլը և նրա հոմոլոգները, ֆենոլը և մյուս արոմատիկ միացությունները:



Քսանտոպրոտեինային ռեակցիան թիրոզին ամինաթթվի մասնակցությամբ

Նյութեր և ռեակտիվներ: Սպիտակուցի 1% լուծույթ (կազեին, ժելատին, ձվի սպիտակուց կամ շիճուկային ալբումին), խիտ HNO_3, NaOH-ի կամ NH_4OH-ի 10 % լուծույթ, C_6H_5OH-ի 0.1% լուծույթ:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, ջրային բաղնիք:

Աշխատանքի ընթացքը.

Փորձանոթների մեջ լցնել 1-ական մլ սպիտակուցի և ֆենոլի լուծույթներ, ապա յուրաքանչյուր փորձանոթին ավելացնել 10 կաթիլ խիտ HNO_3 և զգուշությամբ տեղադրել եռացող ջրային բաղնիք (5-8 րոպե): Թթվի ազդեցությամբ սկզբում առաջանում է սպիտակուցի նստվածք, որը տաքացնելիս վե-

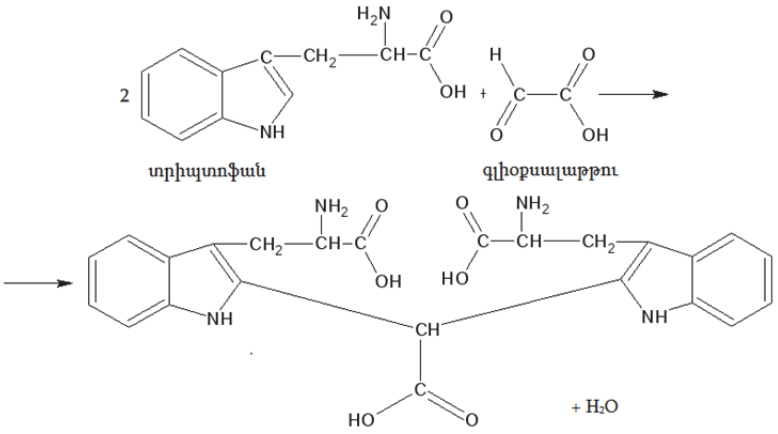
րածվում է դեղին գույնի միացության: Փորձանոթները սառեցնել, ապա ավելացնել 1-ական մլ NaOH-ի կամ NH_4OH-ի լուծույթ համապատասխանաբար մինչև ամոնիումային կամ նատրիումական աղի առաջացումը, որն ունի դեղնանարնջագույն գունավորում: Ֆենիլալանինը դժվարությամբ է ենթարկվում նիտրացման:

Փորձի արդյունքները գրանցել հետևյալ աղյուսակում:

Հետազոտվող նյութ	Արգասիքի գունավորում	Փոխազդող խումբ
Քսանտոպրոտեինային ռեակցիա		
Կազեին		
Չվի սպիտակուց		
Ժելատին		
Ֆենոլ		
Շիճուկային ալբումին		

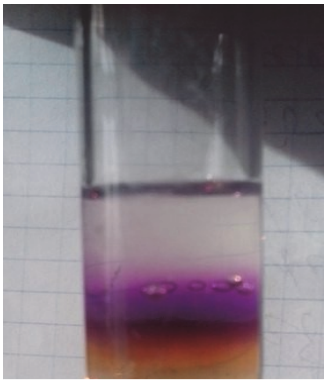
Աշխատանք 1.4 Ադամկևիչի ռեակցիա

Տրիպտոֆան պարունակող սպիտակուցները գլիօքսալաթթվի և ծծմբական թթվի առկայությամբ առաջացնում են կարմրամանուշակագույն գունավորմամբ համալիր: Ռեակցիան պայմանավորված է թթվային միջավայրում տրիպտոֆանի և ալդեհիդների (գլիօքսալաթթու) կոնդենսացման արդյունքում առաջացող գունավոր արգասիքով:



Գլիօքսալաթթվի և տրիպտոֆանի կոնդենսացման արգասիք

Գլիօքսալաթթու որոշ քանակությամբ միշտ առկա է սառցային քացախաթթվում:



Նկ. 1.11. Տրիպտոֆանի և գլիօքսալաթթվի կոնդենսացման արգասիքի առաջացումը:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Սպիտակուցի չնոսրացված լուծույթ, խիտ CH_3COOH, խիտ H_2SO_4, տրիպտոֆանի ($C_{11}H_{12}N_2O_2$) 0.1% լուծույթ:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, ջրային բաղնիք:

Աշխատանքի ընթացքը.

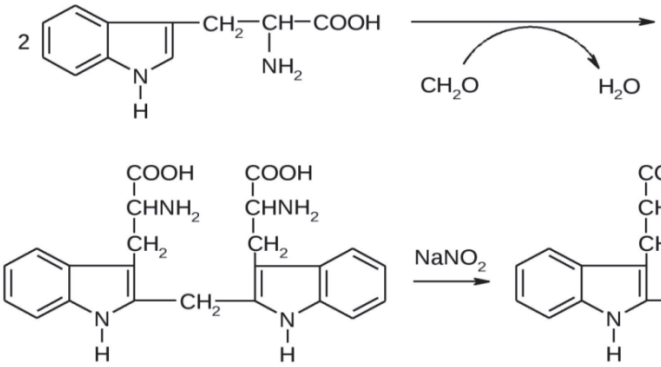
Փորձանոթի մեջ լցնել չնոսրացված սպիտակուց, ավելացնել 1 մլ խիտ CH_3COOH և զգուշությամբ տաքացնել մինչև նստվածքի լուծվելը: Սառեցնելուց հետո խառնուրդին զգուշորեն ավելացնել 1 մլ H_2SO_4 (կաթիլներով սահեցնել փորձանոթի պատերին այնպես, որ հեղուկները չխառնվեն): 5-10 րոպե անց երկու հեղուկների բաժանման սահմանին առաջանում է կարմրամանուշակագույն օղակ (նկ. 1.11): Նույն փորձը կատարել նաև տրիպտոֆանի լուծույթով:

Փորձի արդյունքները գրանցել հետևյալ աղյուսակում:

Հետազոտվող նյութ	Արգասիքի գունավորում	Փոխազդող խումբ
Ադամկևիչի ռեակցիա		
Սպիտակուց		
Տրիպտոֆան		

Աշխատանք 1.5. Վաուզենի ռեակցիա

Տրիպտոֆան պարունակող սպիտակուցները թթվային միջավայրում նատրիումի նիտրիտի և ֆորմալդեհիդի առկայությամբ առաջացնում են կապտամանուշակագույն գունավորում: Տրիպտոֆանը փոխազդում է ֆորմալդեհիդի հետ՝ առաջացնելով կոնդենսացման արգասիք՝ բիս-2-տրիպտոֆանիլմեթան, որը նատրիումի նիտրիտով օքսիդանում է մինչև բիս-2-տրիպտոֆանիլկարբոնիլի: Վերջինս հանքային թթուների առկայությամբ առաջացնում է կապտամանուշակագույն աղեր:



բիս-2-տրիպտոֆանիլմեթան **բիս-2-տրիպտոֆանիլկարբոնիլ**

Նյութեր և ռեակտիվներ: Սպիտակուցի 1% լուծույթ (կազեին, ժելատին, ձվի սպիտակուց կամ շիճուկային ալբումին) խիտ H_2SO_4, ֆորմալդեհիդի (HCOH) 2.5 % լուծույթ, նատրիումի նիտրիտի ($NaNO_2$) 0.5 % լուծույթ և տրիպտոֆանի 0.1% լուծույթ:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, սառցե բաղնիք:

Աշխատանքի ընթացքը

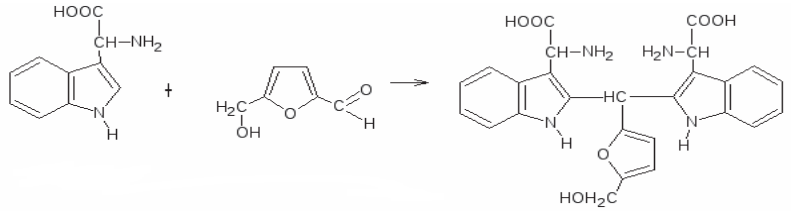
2 մլ ձվի սպիտակուցի լուծույթին ավելացնել 1 կաթիլ HCOH-ի լուծույթ: Զգուշությամբ խառնելով՝ ստացված լուծույթին ավելացնել 6 կաթիլ խիտ H_2SO_4, ապա փորձանոթը տեղադրել սառցե բաղնիքում: 10 րոպե անց խառնելով ավելացնել 10 կաթիլ $NaNO_2$-ի լուծույթ: Առաջանում է կապտամանուշակագույն գունավորում: Նույն ռեակցիան կատարել նաև տրիպտոֆանի լուծույթով:

Փորձի արդյունքները գրանցել հետևյալ աղյուսակում:

Հետազոտվող նյութ	Արգասիքի գունավորում	Փոխազդող խումբ
Վաուզենի ռեակցիա		
Կազեին		
Ձվի սպիտակուց		
Ժելատին		
Տրիպտոֆան		

Աշխատանք 1.6. Շուլցե-Ռասպայլի ռեակցիա

Խիտ ծծմբական թթվի ազդեցությամբ սախարոզը ենթարկվում է հիդրոլիզի, առաջացած մոնոսախարիդները ջրազրկվում են և վերածվում օքսիմեթիլֆուրֆուրոլի: Տրիպտոֆանի և օքսիմեթիլֆուրֆուրոլի փոխազդեցության արդյունքում առաջանում է կարմիր գույնի համալիր միացություն:



տրիպտոֆան 5-օքսիմեթիլֆուրֆուրոլ կոնդենսացման արգասիք

Ռեակտիվներ և նյութեր: Սպիտակուցների լուծույթներ, սախարոզի 10 % լուծույթ, խիտ H_2SO_4:

Պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ:

Աշխատանքի ընթացքը.

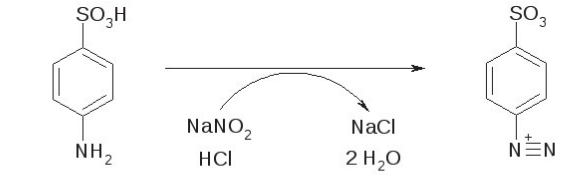
10 կաթիլ հետազոտվող լուծույթին ավելացնել 2 կաթիլ սախարոզ, լուծույթը խառնել և զգուշորեն ավելացնել նույն ծավալի խիտ H_2SO_4-ի լուծույթ (կաթիլներով սահեցնել փորձանոթի պատերին): Երկու հեղուկների սահմանին առաջանում է կարմիր օղակ:

Փորձի արդյունքները գրանցել հետևյալ աղյուսակում:

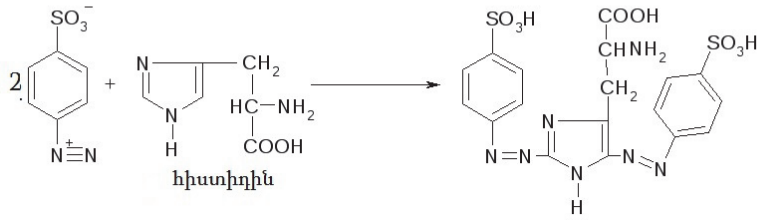
Հետազոտվող նյութ	Արգասիքի գունավորում	Փոխազդող խումբ
Շուլցե- Ռասպայլի ռեակցիա		
Կազեին		
Չվի սպիտակուց		
Ժելատին		
Տրիպտոֆան		

Աշխատանք 1.7. Պաուլի ռեակցիա

Պաուլի ռեակցիան թույլ է տալիս սպիտակուցներում հայտնաբերել հիստիդին և թիրոզին ամինաթթուները, որոնք դիազոբենզոլ-սուլֆոնաթթվի հետ առաջացնում են մուգ կարմիր գույնի համալիր՝ 2,5-բիս-պ-սուլֆոբենզոլազոհիստիդին: Դիազոբենզոլ-սուլֆոնաթթուն առաջանում է թթվային միջավայրում սուլֆանիլաթթվի և նատրիումի (կամ կալիումի) նիտրիտի փոխազդեցության արդյունքում:



սուլֆանիլաթթու 4-դիազոբենզոլսուլֆոնաթթու



հիստիդին

2,5-բիս-պ-սուլֆոբենզոլազոհիստիդին

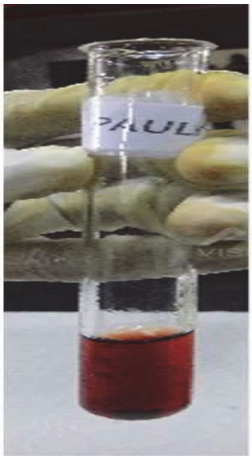
Ռեակտիվներ: Սպիտակուցի 1 % լուծույթ (ժելատին, ձվի սպիտակուց), սուլֆանիլաթթվի ($C_6H_7NO_3S$) 1 % լուծույթ (պատրաստել 5 % HCl-ում), HCl-ի 5 % լուծույթ, $NaNO_2$-ի 0.5 % լուծույթ, Na_2CO_3-ի 10 % լուծույթ, հիստիդինի ($C_6H_9N_3O_2$) 0.1 % լուծույթ:

Սարքավորումներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ:

Աշխատանքի ընթացքը.

1 մլ $C_6H_7NO_3S$ լուծույթին ավելացնել 2 մլ $NaNO_2$-ի լուծույթ, խառնել, ավելացնել 2 մլ սպիտակուցի լուծույթ, ապա ավելացնել 6 մլ Na_2CO_3-ի լուծույթ: Խառնուրդը թափահարելուց հետո առաջանում է մուգ կարմիր միացություն (նկ. 1.12): Նույն ռեակցիան կատարել նաև $C_6H_9N_3O_2$-ի լուծույթով:

Փորձի արդյունքները գրանցել հետևյալ աղյուսակում:

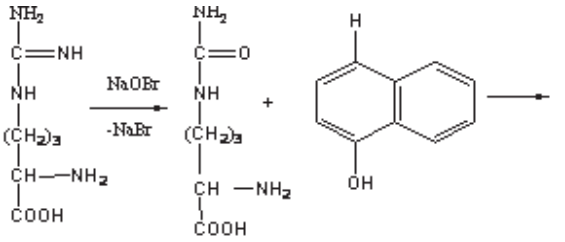


Նկ. 1.12. Հիստիդինի և սուլֆանիլաթթվի ռեակցիայի արգասիքի առաջացումը:

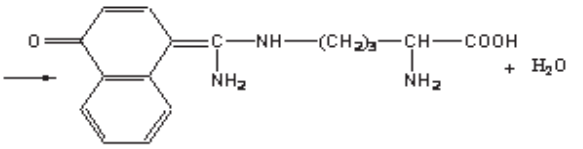
Հետազոտվող նյութ	Արգասիքի գունավորում	Փոխազդող խումբ
Պաուլի ռեակցիա		
Կազեին		
Ձվի սպիտակուց		
Ժելատին		
Հիստիդին		

Աշխատանք 1.8. Սակագուչիի ռեակցիա

Արգինին պարունակող սպիտակուցներն ալկալու առկայությամբ հիպոբրոմիտի և α-նաֆթոլի հետ առաջացնում են կարմիր գունավորում: Արգինինի գուանիդինային խումբը հիպոբրոմիտով օքսիդանում է և առաջացած ցիտրուլինը α-նաֆթոլի հետ կոնդենսացվելով՝ առաջացնում է կարմիր գույնի արգասիք:



արգինին ցիտրուլին α-նաֆթոլ



կոնդենսացման արգասիք

Նյութեր և ռեակտիվներ: Սպիտակուցի 0.5 % լուծույթ, NaOH-ի 10% լուծույթ, α-նաֆթոլի ($C_{10}H_7OH$) 0.1% սպիրտային լուծույթ, նատրիումի հիպոբրոմիտի (NaBrO) 2% լուծույթ, արգինինի ($C_6H_{14}N_4O_2$) 0.1% լուծույթ:

Պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ:

Աշխատանքի ընթացքը.

0.5 մլ սպիտակուցի լուծույթին ավելացնել 0.5 մլ NaOH-ի լուծույթ, 3 կաթիլ $C_{10}H_7OH$-ի լուծույթ, խառնել և ավելացնել 2-3 կաթիլ NaBrO-ի լուծույթ: Կառաջանա կարմիր գունավորում (նկ. 1.13): Նույն ռեակցիան կատարել արգինինի լուծույթով:



Նկ. 1.13. L-արգինինի և α-նաֆթոլի կոնդենսացման արգասիքի առաջացումը:

Փորձի արդյունքները գրանցել հետևյալ աղյուսակում:

Հետազոտվող նյութ	Արգասիքի գունավորում	Փոխազդող խումբ
Սակագուչիի ռեակցիա		
Ձվի սպիտակուց		
Արգինին		

Աշխատանք 1.9. Ֆոլի ռեակցիա

Այս ռեակցիայով սպիտակուցներում կարելի է հայտնաբերել ինչպես ազատ SH (թիոլային) խմբերով, այնպես էլ օքսիդացած և դիսուլֆիդային կապեր (-S-S-) առաջացրած ցիստեինի ռադիկալները:

Սպիտակուցը տաքացնելիս նրա մոլեկուլում պարունակվող ցիստեինի և ցիստինի մնացորդներն ալկալու խիտ լուծույթի և կապարի (կամ կապարի այլ լուծելի աղի) ացետատի (Ֆոլի ռեակտիվ) հետ առաջացնում են սև նստվածք: Ալկալու ազդեցությամբ ցիստեինի և ցիստինի ռադիկալներից ծծումբն անջատվում է ծծմբաջրածնի ձևով, որը, կապարի աղի (նախապես գոյանում է կապարի ացետատի և ալկալու փոխազդեցությունից) հետ փոխազդելով, առաջացնում է ծծմբային կապարի սև նստվածք (նկ. 1.14):

Ընթացող ռեակցիաներն են.

$$(CH_3COO)_2Pb + 2NaOH \longrightarrow Pb(OH)_2 + 2CH_3COONa$$

$$Pb(OH)_2 + 2NaOH \longrightarrow Na_2PbO_2 + 2H_2O$$

$$\begin{array}{l} CH_2\text{—}SH \\ | \\ CH\text{—}NH_2 \\ | \\ COOH \end{array} + 2NaOH \longrightarrow \begin{array}{l} CH_2\text{—}OH \\ | \\ CH\text{—}NH_2 \\ | \\ COOH \end{array} + Na_2S + H_2O$$

$$Na_2S + Na_2PbO_2 + 2H_2O \longrightarrow PbS + 4NaOH$$

Ալկալու հետ տաքացնելիս սպիտակուցի մի մասը ենթարկվում է հիդրոլիզի, բացի այդ՝ ամինոխմբերի մի մասն անջատվում է ամոնիակի ձևով, ինչը կարելի է հայտնաբերել հոտով և լակմուսով թրջված թղթով:

Ռեակտիվներ: Սպիտակուցի 1% լուծույթ (կազեին, ժելատին, ձվի սպիտակուց կամ շիճուկային ալբումին), NaOH-ի 20 % լուծույթ, քացախաթթվային կապարի ($(CH_3COO)_2Pb$) 0.5% լուծույթ:



Նկ. 1.14. Կապարի աղի առաջացումը:

Սարքավորումներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, ջրային բաղնիք:

Աշխատանքի ընթացքը.

Վերցնել 4 փորձանոթներ, յուրաքանչյուրի մեջ լցնել 1 մլ $(CH_3COO)_2Pb$-ի լուծույթ, ավելացնել NaOH-ի լուծույթ մինչև $Pb(OH)_2$-ի նստվածքի լուծվելը, ապա 1-ին փորձանոթի մեջ ավելացնել ջուր, 2-րդի մեջ՝ կազեինի, 3-րդի մեջ՝ ձվի սպիտակուցի և 4-րդի մեջ՝ ժելատինի (ժելատինում բացակայում են ծծումբ պարունակող ամինաթթուները) 0.5-ական մլ լուծույթներ: Խառնել, ապա 5-7 րոպե փորձանոթները թողնել եռացող ջրային բաղնիքում: Համեմատել փորձանոթներում առաջացած գունավորումները և ստացված արդյունքները գրանցել հետևյալ աղյուսակում:

Հետազոտվող նյութ	Արգասիքի գունավորում	Փոխազդող խումբ
Ֆոլի ռեակցիա		
Ջուր		
Կազեին		
Ձվի սպիտակուց		
Ժելատին		

ՍՊԻՏԱԿՈՒՑՆԵՐԻ ՖԻԶԻԿԱՔԻՄԻԱԿԱՆ ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ՍՊԻՏԱԿՈՒՑՆԵՐԻ ՆՍՏԵՑՄԱՆ ՌԵԱԿՑԻԱՆԵՐԸ

Սպիտակուցները կարելի է անջատել լուծույթներից նստեցման միջոցով: Այդ նպատակով անհրաժեշտ է օգտագործել սպիտակուցային մասնիկների լիցքը նվազեցնող կամ հիդրատային շերտը քայքայող տարբեր ազդակներ: Սպիտակուցների նստեցման ռեակցիաները բաժանվում են երկու խմբի.

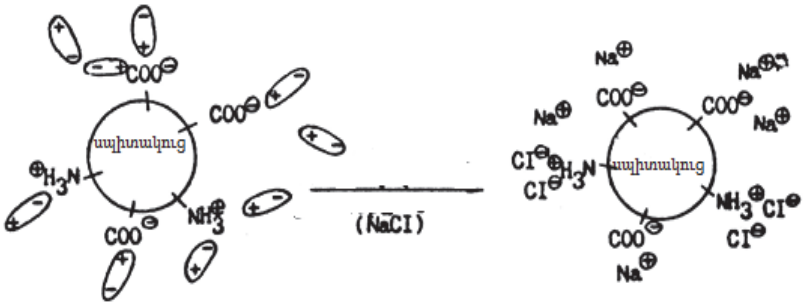
1. Նստեցման դարձելի ռեակցիաներ, երբ նստեցված սպիտակուցները խորը փոփոխությունների չեն ենթարկվում. խախտվում են դրանց չորրորդային, երրորդային և երկրորդային կառուցվածքները, և ստացված նստվածքները նորից կարող են լուծվել սկզբնական լուծիչում: Այս դեպքում սպիտակուցի մոլեկուլը հիմնականում պահպանում է իր կենսաբանական հատկությունները: Նստեցման դարձելի ռեակցիաների թվին են պատկանում սպիտակուցի աղայնացումը, նստեցումը ացետոնի կամ սպիրտի ոչ երկարատև, ինչպես նաև ցածր ջերմաստիճանի ազդեցության պայմաններում:
2. Նստեցման ոչ դարձելի ռեակցիաներ, երբ սպիտակուցի կառուցվածքը ենթարկվում է խորը փոփոխությունների (խախտվում է նաև առաջնային կառուցվածքը), և սպիտակուցը այլևս չի կարող լուծվել սկզբնական լուծիչում: Տեղի է ունենում սպիտակուցի բնավոխում, սպիտակուցը կորցնում է իր ֆիզիկաքիմիական և բնական կենսաբանական հատկությունները, զրկվում ջրում լուծվելու ունակությունից: Նստեցման ոչ դարձելի ռեակցիաների թվին են պատկանում նստեցումը ծանր մետաղների աղերով, ալկալոիդներով, խիտ թթուներով, ինչպես նաև տաքացմամբ:

Սպիտակուցների նստեցումն ունի գործնական նշանակություն, քանի որ հնարավորություն է տալիս.

1. ուսումնասիրել սպիտակուցների հատկությունները,
2. մաքրման եղանակով անջատել սպիտակուցային ֆրակցիան,
3. ախտորոշման նպատակներով մեզի մեջ հաստատել սպիտակուցի առկայությունը,
4. առանձին սպիտակուցային ֆրակցիաները բաժանել ալբումինների և գլոբուլինների,
5. ստանալ սպիտակուցներով հարստացված ֆրակցիա:

Աշխատանք 1.10. Սպիտակուցի նստեցումը տաքացման պայմաններում

Գրեթե բոլոր սպիտակուցները տաքացման պայմաններում (50-55°C և բարձր) ենթարկվում են բնավոխման: Ջերմային բնավոխման մեխանիզմի հիմքում ընկած է սպիտակուցի մոլեկուլի կառուցվածքի վերավոխումը, ինչի արդյունքում սպիտակուցը կորցնում է իր բնական հատկությունները, ձեռք է բերում լուծելիությունը ջրում (հիդրոֆիլ հատկության կորուստը հանգեցնում է հիդրատային թաղանթի խախտման): Աղերի առկայությունը և ջրածնի իոնների կոնցենտրացիան կարևոր դեր ունեն տաքացման պայմաններում բնավոխված սպիտակուցի նստեցման գործընթացում: Առավել լրիվ և արագ նստեցում հնարավոր է սպիտակուցի իզոէլեկտրական կետում, այսինքն՝ այնպիսի pH-ի պայմաններում, երբ սպիտակուցի կոլոիդ մասնիկները համարվում են առավել անկայուն: Հետևաբար տաքացման ընթացքում սպիտակուցը լրիվ նստեցնելու համար անհրաժեշտ է ստեղծել նրա իզոէլեկտրական կետին համապատասխանող միջավայր: Թթվային հատկությամբ օժտված սպիտակուցները նստում են թույլ թթվային միջավայրում, իսկ հիմնային հատկություններով սպիտակուցները՝ թույլ հիմնային: Տաքացման ընթացքում բնավոխված սպիտակուցը ուժեղ թթվային և ուժեղ հիմնային միջավայրերում չի առաջացնում նստվածք, քանի որ մասնիկները վերալիցքավորվում են (կամ տեղի է ունենում առկա լիցքի մեծացում) և կրում ուժեղ թթվային միջավայրում դրական, իսկ ուժեղ հիմնային միջավայրում՝ բացասական լիցքեր, ինչն էլ էլեկտրաստատիկական վանողության ուժերի հաշվին բարձրացնում է սպիտակուցների կայունությունը: Սակայն ուժեղ թթվային միջավայրում սպիտակուցները կարող են կոագուլացվել բավարար քանակությամբ չեզոք աղ ավելացնելիս:



հիդրատային թաղանթ **հիդրատային թաղանթի կորուստ**

Նկ. 1.15. Սպիտակուցի նստեցումը չեզոք աղերի առկայությամբ:



Նկ. 1.16. Պղտորության առաջացումը սպիտակուցի լուծույթը տաքացնելիս:

Չեզոք աղի իոնների ազդեցությունը սպիտակուցի մոլեկուլների նստեցման աստիճանի վրա կախված է սպիտակուցային մասնիկներին դրանց ադսորբվելու ունակությունից: Աղերի ադսորբված իոնները (եթե դրանք կոլոիդային մասնիկի լիցքին հակադիր լիցք են կրում) չեզոքացնում են մասնիկների լիցքերը, մոլեկուլների միջև գործող ձգողության ուժերը գերակշռում են, և սպիտակուցը նստում է:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Ձվի սպիտակուցի լուծույթ (առանց NaCl-ի), CH_3COOH-ի 1 % լուծույթ, խիտ CH_3COOH, NaOH-ի 10 % լուծույթ, NaCl-ի հագեցած լուծույթ:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, սպիրտայրոց:

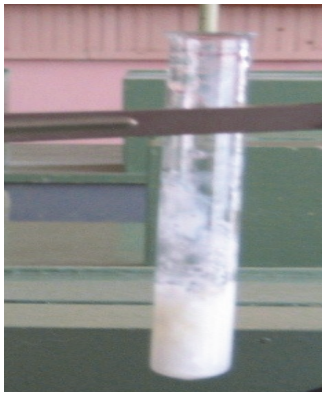
Աշխատանքի ընթացքը.

5 փորձանոթների մեջ լցնել 2-ական մլ սպիտակուցի լուծույթ:

Առաջին փորձանոթի լուծույթը տաքացնել մինչև եռալը: Հեղուկը պղտորվում է, քանի որ սպիտակուցի շուրջն առկա հիդրատային թաղանթը քայքայվում է, մասնիկները խոշորանում են: Սպիտակուցի միցելները պահպանում են լիցքը և նստվածք չեն առաջացնում (նկ. 1.16):

Երկրորդ փորձանոթը տաքացնել մինչև եռալը և ավելացնել CH_3COOH-ի 1 մլ 1% լուծույթ (թույլ թթվային միջավայր առաջացնելու նպատակով): Սպիտակուցի մասնիկները կորցնում են լիցքը, մոտենում իզոէլեկտրական վիճակի, և որոշ ժամանակ անց հայտնվում է սպիտակուցի բամբակեման նստվածք (նկ. 1.17):

Երրորդ փորձանոթի մեջ ավելացնել 2 մլ խիտ CH_3COOH-ի լուծույթ (ուժեղ թթվային միջավայր առաջացնելու նպատակով): Լուծույթը եռացնելիս նստվածք չի առաջանում, քանի որ սպիտակուցային միցելները վերալիցքավորվում են և կրում դրական լիցք, ինչն էլ բարձրացնում է դրանց կայունությունը:



Նկ. 1.17. Սպիտակուցի նստվածքի առաջացումը թույլ թթվային միջավայրում:

4-րդ փորձանոթի մեջ ավելացնել 2 մլ NaOH-ի

լուծույթ՝ ստեղծելով հիմնային միջավայր և եռացնել: Եռացնելիս նստվածք չի առաջանում, քանի որ հիմնային միջավայրում սպիտակուցի մասնիկների բացասական լիցքը մեծանում է:

5-րդ փորձանոթի մեջ լցնել 2 մլ խիտ CH_3COOH-ի և 2 մլ NaCl-ի հագեցած լուծույթներ, եռացնել: Նստում է սպիտակ բամբակենման նստվածք, քանի որ սպիտակուցի մասնիկները կորցնում են լիցքը աղի տարանում լիցքավորված իոնների հետ փոխազդեցության արդյունքում:

Ստորև բերված աղյուսակում գրանցել տաքացման պայմաններում տարբեր միջավայրերում սպիտակուցի նստեցման արդյունքները և յուրաքանչյուր դեպքում նշել սպիտակուցի նստվածքի առկայության կամ բացակայության պատճառը:

Հիմնային միջավայր	Չեզոք միջավայր	Թույլ թթվային միջավայր	Ուժեղ թթվային միջավայր	Ուժեղ թթվային միջավայր + էլեկտրալիտ

Աշխատանք 1.11 Սպիտակուցների նստեցումը տարբեր միացություններով

Սպիտակուցի նստեցումն օրգանական լուծիչներով

Սպիտակուցները ոչ բոլոր օրգանական լուծիչներում են լուծվում: Դրանց նստեցումն իրականացվում է միայն չեզոք ու թույլ թթվային միջավայրերում և լիարժեք է էլեկտրալիտների առկայությամբ: Օրգանական լուծիչները ջրազրկում են (քայքայում են հիդրատային թաղանթը) սպիտակուցի մասնիկները և նվազեցնում դրանց կայունությունը լուծույթում: Օրգանական լուծիչների կարճաժամկետ ազդեցության դեպքում պահպանվում է սպիտակուցի բնական վիճակը, իսկ երկարաժամկետ ազդեցությունը հանգեցնում է սպիտակուցների բնափոխման:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Չվի սպիտակուցի լուծույթ, էթիլ սպիրտ (C_2H_5OH) կամ ացետոն (CH_3COCH_3), NaCl-ի հագեցած լուծույթ:

Պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Փորձանոթի մեջ լցնել 1 մլ սպիտակուցի լուծույթ և 4 մլ սպիրտ կամ ացետոն: Լուծույթը կպղտորվի, իսկ 1-2 մլ NaCl-ի հագեցած լուծույթ ավելացնելիս կառաջանա սպիտակուցի նստվածք:

Սպիտակուցների նստեցումը խիտ հանքային թթուներով

Սպիտակուցի նստեցումը խիտ թթուներով իրականանում է սպիտակուցային մասնիկների ջրազրկման և դրանց լիցքերի չեզոքացման արդյունքում, ինչպես նաև մի շարք այլ պատճառներով (քնափոխում, աղերի առաջացում և այլն): Աղաթթվի և ծծմբական թթվի ավելցուկում կամ դրանց երկարատև ազդեցության պայմաններում սպիտակուցի նստվածքը լուծվում է, հավանաբար, սպիտակուցի վերալիցքավորման և մասնակի հիդրոլիզի հաշվին: Ազոտական թթվի ավելցուկում սպիտակուցը չի լուծվում:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Ձվի սպիտակուցի լուծույթ, խիտ HCl, H_2SO_4, HNO_3:

Պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ:

Աշխատանքի ընթացքը.

3 փորձանոթների մեջ զգուշությամբ լցնել 1-ական մլ խիտ հանքային թթուներ: Բոլոր փորձանոթներում պատերին սահեցնելով ավելացնել 1-ական մլ սպիտակուցի լուծույթ: Երկու հեղուկների բաժանման սահմանին գոյանում է սպիտակուցի նստվածքի շերտ: Այնուհետև փորձանոթները զգուշությամբ թափահարել, HCl և H_2SO_4 թթուների ավելցուկում սպիտակուցի նստվածքը լուծվում է, իսկ HNO_3-ի ավելցուկում՝ ոչ:

Սպիտակուցի նստեցումն օրգանական թթուներով

Սպիտակուցները լուծույթներից անջատվում են նստվածքի ձևով նաև օրգանական թթուներով: Սպիտակուցները շատ զգայուն են եռքլորքացախաթթվի և սուլֆասալիցիլաթթվի նկատմամբ: Օրգանական թթուներով սպիտակուցների նստեցման մեխանիզմը բացատրվում է սպիտակուցային մոլեկուլի ջրազրկմամբ և լիցքի չեզոքացմամբ:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Սպիտակուցի 0.5% լուծույթ, եռքլորքացախաթթվի ($CC1_3COOH$) 3% և սուլֆասալիցիլաթթվի ($C_6H_3(OH)(COOH)SO_3H$) 20 % լուծույթներ:

Պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Երկու փորձանոթների մեջ լցնել l-ական մլ սպիտակուցի լուծույթ, ապա փորձանոթներից մեկի մեջ ավելացնել մի քանի կաթիլ $CC1_3COOH$-ի, մյուսի մեջ՝ $C_6H_3(OH)(COOH)SO_3H$-ի լուծույթ: Փորձանոթներում առաջանում է նստվածք:

Սպիտակուցների նստեցումը ծանր մետաղների աղերով

Ծանր մետաղների աղերն բնավոխման են ենթարկում սպիտակուցի մոլեկուլը: Քնավոխված սպիտակուցի նստեցումը պայմանավորված է սպիտակուցային մոլեկուլի մակերևույթին ծանր մետաղների ադսորբմամբ և անլուծելի համալիրների առաջացմամբ: Սպիտակուցների ծանր մետաղներ միացնելու ունակությունը կիրառվում է բժշկության մեջ, քանի որ սնդիկի, կապարի, պղնձի և այլ մետաղների աղերով թունավորումների ժամանակ դրանք ծառայում են որպես հակաթույներ: Սպիտակուցները, ծանր մետաղների հետ առաջացնելով անլուծելի համալիրներ, սահմանափակում են դրանց ներծծումը: Որոշ ծանր մետաղների աղերի ավելցուկի պայմաններում առաջացած նրստվածքը լուծվում է, քանի որ կոլոիդային մասնիկների մակերևույթին ծանր մետաղներն ադսորբվում են, և սպիտակուցի մոլեկուլը ստանում է դրական լիցք: Արծաթի և սնդիկի աղերի ավելցուկի պայմաններում սպիտակուցի նստվածքը չի լուծվում: Այսպիսի նստեցում կիրառում են սպիտակուցները լուծույթներից անջատելու նպատակով:



1 **2**

Նկ. 1.18. 1-սպիտակուցի նստվածքի առաջացումը պղնձի սուլֆատով, 2- սպիտակուցի նստվածքի առաջացումը կապարի ացետատով:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Սպիտակուցի 1 % լուծույթ, $(CH_3COO)_2Pb$-ի 0,5 % լուծույթ և $CuSO_4$-ի 5 % լուծույթ:

Պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ:

Աշխատանքի ընթացքը.

2 փորձանոթների մեջ լցնել 1-ական մլ սպիտակուցի լուծույթ, ապա փորձանոթներից մեկին ավելացնել մի քանի կաթիլ $CuSO_4$-ի, մյուսին՝ մի քանի կաթիլ $(CH_3COO)_2Pb$-ի լուծույթ: Փորձանոթներում առաջանում է նստվածք (նկ. 1.18): Առաջին փորձանոթի մեջ ավելացնել $CuSO_4$-ի լուծույթ մինչև նստվածքի լուծվելը:

Փորձերի արդյունքները գրանցել հետևյալ աղյուսակում

Նստեցնող նյութեր	Օգտագործված ռեակտիվներ	Նստվածքի բնույթ և գույն	Ինչո՞վ է պայմանավորված ռեակցիան
Օրգանական լուծիչներ			
Խիտ հանքային թթուներ			
Օրգանական թթուներ			
Ծանր մետաղների աղեր			

Աշխատանք 1.12. Սպիտակուցների լուծելիությունը

Ալբումինների և գլոբուլինների լուծելիությունը

Շատ սպիտակուցներ լավ են լուծվում ջրում, ինչը պայմանավորված է սպիտակուցային մոլեկուլի մակերևույթին ազատ հիդրոֆիլ խմբերի (– OH, – NH_2, – COOH և այլն) առկայությամբ, իսկ շարակցական հյուսվածքի սպիտակուցները (կերատին, պրոտոկոլագեն, կոլագեն, էլաստին և այլն) հիմնականում ջրում անլուծելի են: Ջրում սպիտակուցի լուծելիությունը կախված է սպիտակուցի բնույթից, միջավայրի ռեակցիայից և էլեկտրալիտի առկայությունից: Թթվային միջավայրում լավ լուծվում են թթվային հատկություններ ունեցող սպիտակուցները (ալբումիններ, գլոբուլիններ, պրոլամիններ, գլյուտեիններ), հիմնային միջավայրում՝ հիմնային սպիտակուցները (պրոտամիններ, հիստոններ): Սակայն լուծելիության տարբերություններ դիտվում են ինչպես թթվային, այնպես էլ հիմնային սպիտակուցների միջև: Ալբումինները լուծվում են թորած ջրում, իսկ գլոբուլինները՝ միայն էլեկտրալիտի առկայությամբ:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Չնոսրացված ձվի սպիտակուց, NaCl-ի 5% լուծույթ:

Պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Փորձանոթի մեջ լցնել 2 կաթիլ չնոսրացված ձվի սպիտակուց, 20 կաթիլ թորած ջուր, այդ դեպքում ալբումինները լուծվում են, իսկ գլոբուլիններն առաջացնում են նստվածք:

Մյուս փորձանոթի մեջ լցնել 2 կաթիլ չնոսրացված ձվի սպիտակուց, 20 կաթիլ NaCl-ի լուծույթ: Թույլ աղային լուծույթում լուծվում են և՛ գլոբուլինները, և՛ ալբումինները (նկ. 1.19):

Կերատին (կենդանու մազեր) պարունակող երկու փորձանոթներից մեկի մեջ ավելացնել 20 կաթիլ թորած ջուր, մյուսի մեջ՝ 20 կաթիլ NaCl-ի լուծույթ: Կերատինը չի լուծվում ո՛չ ջրում, ո՛չ աղային լուծույթում:

Աշխատանքի արդյունքները գրանցել հետևյալ աղյուսակում:



Նկ. 1.19 Սպիտակուցների լուծելիությունը տարբեր միջավայրերում:

Սպիտակուցի անվանում	H_2O	NaCl-ի 5% լուծույթ
Ձվի ալբումին		
Ձվի գլոբուլին		
Կերատին		

Աշխատանք 1.13. Սպիտակուցների աղայնացում

Ձվի սպիտակուցում պարունակվող ալբումինների և գլոբուլինների բաժանումը

Աղայնացում է կոչվում ջրային լուծույթներից սպիտակուցների անջատումը ալկալիական և հողալկալիական մետաղների աղերի (Na_2SO_4, NaCl, $MgSO_4$ և այլն) չեզոք լուծույթներով: Սպիտակուցի լուծույթին մեծ քանակությամբ աղ ավելացնելիս դիտվում է սպիտակուցի ջրազրկում և լիցքի չեզոքացում, ինչի արդյունքում սպիտակուցները նստում են առանց փոխելու իրենց բնականոն կառուցվածքը: Սպիտակուցների նստեցման աստիճանը կախված է նստեցնող լուծույթի իոնային ուժից, սպիտակուցային մասնիկների չափերից, լիցքի մեծությունից, հիդրոֆիլությունից: Տարբեր սպիտակուցներ նստում են միևնույն աղերի տարբեր կոնցենտրացիաների պայմաններում: Այսինքն՝ աղի կոնցենտրացիայի աստիճանական բարձրացման ճանապարհով նստեցված առանձին սպիտակուցներ գտնվում են տարբեր ֆրակցիաներում: Սպիտակուցների աղայնացումը դարձելի գործընթաց է, և աղի հեռացումից հետո սպիտակուցը նորից ձեռք է բերում իրեն բնորոշ ֆիզիկաքիմիական և կենսա-

բանական հատկությունները: Հետևաբար արյան շիճուկի սպիտակուցների բաժանման, ինչպես նաև մեկուսացման նպատակով կարելի է իրականացնել աղայնացում: Աղայնացման եղանակով սպիտակուցների բաժանման համար լայնորեն օգտագործվում է $(NH_4)_2SO_4$: $(NH_4)_2SO_4$-ի խիտ լուծույթներն աղայնացնում են համարյա բոլոր սպիտակուցները: Գլոբուլինները նստում են $(NH_4)_2SO_4$-ի կիսահագեցած, իսկ ալբումինները՝ հագեցած լուծույթներում: Գլոբուլինները նստում են նաև NaCl-ի, $MgSO_4$-ի հագեցած լուծույթներում:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Ձվի սպիտակուցի լուծույթ, $(NH_4)_2SO_4$-ի հագեցած լուծույթ, NaOH-ի 10% լուծույթ, $CuSO_4$-ի 1% լուծույթ, $(NH_4)_2SO_4$-ի, NaCl-ի, $MgSO_4$-ի բյուրեղներ, CH_3COOH-ի 1% լուծույթ:

Պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, քիմիական բաժակ ու ձագար:

Աշխատանքի ընթացքը.

ա) Նստեցում NaCl-ով և $MgSO_4$-ով:

Երկու փորձանոթների մեջ լցնել 3-ական մլ սպիտակուցի լուծույթ: Առաջին փորձանոթում ավելացնել NaCl-ի, երկրորդ փորձանոթում՝ $MgSO_4$-ի բյուրեղներ մինչև լրիվ հագեցած լուծույթների առաջացումը: Մի քանի րոպե անց առաջանում է գլոբուլինների նստվածք: Փորձանոթների պարունակությունը զտել՝ առանձնացնելով գլոբուլինների նստվածքը և ալբումիններ պարունակող ֆիլտրատ (զտվածք) № 1-ը: Զտվածք № 1-ին ավելացնել մի քանի կաթիլ CH_3COOH-ի լուծույթ (թույլ թթվային միջավայրում ալբումինները նստում են): Մի քանի րոպե անց ալբումինային նստվածքը զտել: Ստացվում է զտվածք № 2 և ալբումինային նստվածք:



1 2

Նկ. 1.20. 1- Բիուրետի դրական ռեակցիա, 2 - Բիուրետի ռեակցիայի բացակայություն:

Զտվածք № 2-ում կատարել բիուրետի ռեակցիա և հաստատել սպիտակուցի բացակայությունը: Բիուրետի ռեակցիա կատարել նաև ալբումիններ պարունակող ֆիլտրի թղթով (նկ. 1.20): Այդ նպատակով ֆիլտրի թուղթը սպիտակուցի հետ միասին տեղափոխել մաքուր փորձանոթի մեջ, ֆիլտրի վրա ավելացնել 1 մլ NaOH-ի և 1 կաթիլ $CuSO_4$-ի լուծույթներ:

բ) Նստեցում $(NH_4)_2SO_4$-ով:

Փորձանոթի մեջ լցնել 3 մլ սպիտակուցի լուծույթ, ապա ավելացնել 3 մլ $(NH_4)_2SO_4$-ի հագեցած լուծույթ: Ստացված $(NH_4)_2SO_4$-ի կիսահագեցած լուծույթում նստում են գլոբուլինները: 5 րոպե անց նստվածքը զտել: Զտվածքում

մնում են ալբումինները: Ալբումինների աղայնացման նպատակով զտվածքին ավելացնել $(NH_4)_2SO_4$-ի բյուրեղներ մինչև հագեցած լուծույթի առաջացումը: Առաջացած ալբումինների նստվածքը զտել և զտվածքում կատարել բիուրետի ռեակցիա: Բացասական արդյունքը վկայում է սպիտակուցի բացակայության մասին: Ալբումինի նստվածքը ֆիլտրի հետ տեղափոխել փորձանոթի մեջ, լուծել 4-5 մլ թորած ջրում և նորից կատարել բիուրետի ռեակցիա:

Ստացված արդյունքները գրանցել հետևյալ աղյուսակում:

Սպիտակուցի անվանում	Օգտագործվող աղ	Հագեցման աստիճան	Օգտագործվող միջավայր	Նստվածքի առաջացում	Բիուրետի ռեակցիայի արդյունք
Գլոբուլիններ					
Ալբումիններ					

Արյան պլազմի սպիտակուցների նստեցումն ամոնիումի սուլֆատով

$(NH_4)_2SO_4$-ով մինչև 33 % հագեցնելիս արյան պլազմի ֆիբրինոգենը վերածվում է նստվածքի: Արյան պլազմի գլոբուլինները նստում են $(NH_4)_2SO_4$-ով կիսահագեցման, իսկ ալբումինները՝ լրիվ հագեցման պայմաններում:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Կենդանական արյան պլազմ, $(NH_4)_2SO_4$-ի հագեցած լուծույթ, NaOH-ի 10% լուծույթ, $CuSO_4$-ի 1% լուծույթ, $(NH_4)_2SO_4$ բյուրեղներ:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, չափիչ գլան, քիմիական բաժակ, դիալիզային խառնիչ:

Աշխատանքի ընթացքը.

1. 2 մլ արյան պլազմին ավելացնել 5 մլ թորած ջուր, 3.5 մլ $(NH_4)_2SO_4$-ի հագեցած լուծույթ: Ֆիբրինոգենն առաջացնում է նստվածք (հայտնվում է թույլ պղտորություն), որը պետք է զտելով հեռացնել: Զտվածքը (№ 1) օգտագործել հետագա աշխատանքի համար, իսկ ֆիլտրի վրա սպիտակուցի առկայությունը ստուգել բիուրետի ռեակցիայով: Սպիտակուցով ֆիլտրը տեղափոխել մաքուր փորձանոթի մեջ, ավելացնել 1 մլ NaOH-ի և 1 կաթիլ $CuSO_4$-ի լուծույթներ:
2. № 1 զտվածքին ավելացնել 4 մլ $(NH_4)_2SO_4$-ի հագեցած լուծույթ: Նստվածք անցած գլոբուլինները զտել, առաջանում է զտվածք № 2 և նստվածք, որտեղ սպիտակուցի առկայությունը պետք է հաստատել բիուրետի ռեակցիայով:
3. № 2 զտվածքին ավելացնել $(NH_4)_2SO_4$-ի բյուրեղներ մինչև հագեցած լուծույթի առաջացումը: Նստվածք են անցնում ալբումինները, որոնք

պետք է զտել: Ստացված № 3 զտվածքում կատարել բիուրետի ռեակցիա:

Ստացված արդյունքները գրանցել հետևյալ աղյուսակում:

Սպիտակուցի անվանում	$(NH_4)_2SO_4$-ով հագեցման աստիճան	Նստվածքի բնույթ	Բիուրետի ռեակցիայի արդյունք

Աշխատանք 1.14. Սպիտակուցի իզոէլեկտրական կետի որոշումը

Սպիտակուցների մոլեկուլներն օժտված են դրական և բացասական էլեկտրական լիցքով, քանի որ ունեն իոնացվելու ընդունակ ծայրային, ինչպես նաև կողմնային ռադիկալներում պարունակվող դիամինաթթուների և դիկարբոնաթթուների ամինա և կարբօքսիլ խմբեր:

Թթվային միջավայրում սպիտակուցներն ունեն գումարային դրական լիցք,

$$HOOC\text{-}CHR\text{-}NH_2 + H^+ \leftrightarrow HOOC\text{-}CHR\text{-}NH_3^+,$$

իսկ հիմնային միջավայրում՝ բացասական

$$HOOC\text{-}CHR\text{-}NH_2 + OH^- \leftrightarrow {}^-OOC\text{-}CHR\text{-}NH_2 + H_2O$$

Միջավայրի pH-ի որոշակի արժեքի պայմաններում սպիտակուցի մոլեկուլի դրական և բացասական լիցքերը հավասարվում են, ուստի գումարային լիցքը հավասարվում է զրոյի (սպիտակուցի իզոէլեկտրական վիճակ): pH-ի այն արժեքը, որի դեպքում սպիտակուցը գտնվում է իզոէլեկտրական վիճակում, կոչվում է սպիտակուցի իզոէլեկտրական կետ: Սպիտակուցի մոլեկուլի լիցքը լուծույթներում դրա կայունության կարևոր գործոններից է, քանի որ խոչընդոտում է սպիտակուցային մասնիկների միաձուլմանը և նստվածքի առաջացմանը: Սպիտակուցներն իզոէլեկտրական կետում անկայուն են և հեշտությամբ վերածվում են նստվածքի (հատկապես ջրազրկող նյութերի առկայությամբ, օրինակ՝ էթանոլի, ացետոնի): Սպիտակուցային մոլեկուլի հիդրատային շերտի առկայությունը նույնպես լուծույթներում դրանց կայունության ցուցանիշներից է: Հետևաբար սպիտակուցի իզոէլեկտրական կետի որոշման նպատակով որոշվում է լուծույթի pH-ը, որի դեպքում դիտվում է առավել ամբողջական և արագ նստեցում:

Մեթոդի հիմքում իզոէլեկտրական կետում սպիտակուցի նստվածք առաջացնելու ընդունակությունն է (արտահայտվում է լուծույթի պղտորությամբ): Էթիլ սպիրտի (ջրազրկող միջոց) ավելացումը հանգեցնում է սպիտակուցի նստեցման արագացմանը:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Կազեինի 0.4% լուծույթ պատրաստված CH_3COONa-ի 0.2 Մ լուծույթում, ժելատինի 1% լուծույթ, CH_3COOH-ի 0.1 Մ, 0.2 Մ և 1 Մ լուծույթներ, CH_3COONa-ի 0.1 Մ լուծույթ, 96% C_2H_5OH (կամ CH_3COCH_3)

Պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ:

Աշխատանքի ընթացքը.

1. **Կազեինի իզոէլեկտրական կետի որոշումը**

Համարակալված 6 փորձանոթների մեջ պատրաստել տարբեր pH-ի արժեքներով բուֆերային խառնուրդներ, ինչպես ներկայացված է ստորև աղյուսակում: Յուրաքանչյուր փորձանոթում (համապատասխան հարաբերությամբ պատրաստված լուծույթներում) հաստատվում է ջրածնի իոնների որոշակի կոնցենտրացիա: 5-10 րոպե անց փորձանոթներում դիտվում է պղտորություն: Առավելագույն պղտորություն դիտվում է այն փորձանոթում, որի pH-ը համապատասխանում է կազեինի իզոէլեկտրական կետին:

Փորձանոթ №	Բուֆերային խառնուրդի բաղադրություն		Կազեինի 0,4% լուծույթ պատրաստված 0.2 Մ CH_3COONa լուծույթում, մլ	Միջավայրի pH	Պղտորության աստիճան
	0.2Մ CH_3COOH, մլ	H_2O, մլ			
1	1.6	0.4	0.2	3.8	
2	0.8	1.2	0.2	4.1	
3	0.4	1.6	0.2	4.4	
4	0.2	1.8	0.2	4.7	
5	0.1	1.9	0.2	5.0	
6	0.06	1.94	0.2	5.3	

2. **Ժելատինի իզոէլեկտրական կետի որոշումը**

Համարակալված 6 փորձանոթների մեջ համապատասխան քանակներով (մլ) հաջորդաբար լցնել ռեակտիվները, ինչպես ներկայացված է հետևյալ աղյուսակում:

Փորձանոթ №	H_2O, մլ	0.1Մ CH_3COOH, մլ	1Մ CH_3COOH, մլ	0.1Մ CH_3COONa, մլ	ժելատինի 1% լուծույթ	Միջավայրի pH	Պղտորության աստիճան
1	3.8	0.8	-	2.0	2.0	5.6	
2	3.5	0.5	-	2.0	2.0	5.3	
3	3.0	1.0	-	2.0	2.0	5.0	
4	2.0	2.0	-	2.0	2.0	4.7	
5	-	4.0	-	2.0	2.0	4.4	
6	3.2	-	0.8	2.0	2.0	4.1	

Յուրաքանչյուր փորձանոթի պարունակությունը թափահարել, բոլոր փորձանոթների մեջ պատերին դանդաղ սահեցնելով՝ ավելացնել 2-ական մլ 96% C_2H_5OH (կամ CH_3COCH_3): 30 րոպե անց փորձանոթներում դիտվում է պղտորություն: Առավելագույն պղտորություն դիտվում է այն փորձանոթում, որի pH-ը համապատասխանում է ժելատինի իզոէլեկտրական կետին:

Փորձերի արդյունքները գրանցել աղյուսակների վերջին սյունակներում: Պղտորության բացակայությունը գրանցել (–) նշանով, պղտորության առկայությունը՝ (+) նշանով, իսկ զգալի պղտորությունը՝ մի քանի (+)-երով:

ՍՊԻՏԱԿՈՒՑՆԵՐԻ ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՕԲՅԵԿՏՆԵՐԻՑ

Սպիտակուցների անջատման գործընթացն իրականացվում է հետևյալ փուլերով.

1. կենսաբանական օբյեկտի (բույսեր, կենդանիների օրգաններ և հյուսվածքներ, միկրոօրգանիզմներ) մանրացում մինչև համասեռ զանգվածի ստացում,
2. սպիտակուցների անցում լուծված վիճակի,
3. լուծույթներից առանձին սպիտակուցային ֆրակցիաների ստեղծում,
4. սպիտակուցների խմբից առանձին սպիտակուցների անջատում,
5. սպիտակուցների անջատումը պետք է կատարել 5°C ջերմաստիճանում՝ օգտագործելով այնպիսի քիմիական ռեակտիվներ, որոնք պահպանում են սպիտակուցների բնական տարածական կառուցվածքը (խիտ թթուների և ալկալիների, ինչպես նաև ծանր մետաղների աղերի կիրառումը անթույլատրելի է):

Աշխատանք 1.15. Պարզ սպիտակուցների անջատումը բուսական օրգանիզմներից

Պարզ սպիտակուցները կազմված են պեպտիդային կապերով միացած α-ամինաթթուների մնացորդներից: Սպիտակուցները տարբերվում են ամինաթթվային կազմով և ըստ տարբեր լուծիչներում լուծվելու ունակության բաժանվում են հետևյալ խմբերի.

Ալբումիններ – լավ են լուծվում ջրում, ինչպես նաև չեզոք աղերի և ամոնիումի սուլֆատի 4-10% խտության ջրային լուծույթներում և նստում են այդ աղերի հագեցած լուծույթներում: Ալբումինները պարունակվում են բոլոր կենդանի օրգանիզմներում:

Գլոբուլիններ – ջրում չեն լուծվում, լավ են լուծվում չեզոք աղերի և ամոնիումի սուլֆատի 4-10% խտության ջրային լուծույթներում և նստում են այդ աղերի կիսահագեցած լուծույթներում: Գլոբուլինները հանդիպում են բոլոր օրգանիզմներում, առավել տարածված են բույսերում, հատկապես ընդավորների սերմերում:

Պրոլամիններ – լավ են լուծվում էթանոլի 60-80 % լուծույթում: Սպիտակուցների այս խումբը պարունակվում է միայն բույսերում և միայն հացազգիների սերմերում:

Գլյուտելիններ – լուծվում են շատ նոսր թթվային և ալկալային լուծույթներում, սակայն չեն լուծվում չեզոք լուծիչներում, օրինակ՝ ցորենի գլիադինը և բրնձի օրիզենինը:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Ցորենի կամ գարու և ոլոռի ալյուր: NaCl-ի 10% լուծույթ, C_2H_5OH-ի 70% լուծույթ, NaOH-ի 10% լուծույթ, $CuSO_4$-ի 1% լուծույթ, NaCl-ի հագեցած լուծույթ:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, թերմոստատ, մագնիսական խառնիչ, ցենտրիֆուգ (նկ. 1.21):

Աշխատանքի ընթացքը.

Ալբումինների անջատումը: 1 գ ցորենի կամ գարու ալյուր և 1 գ ոլոռի ալյուր պարունակող երկու փորձանոթների մեջ ավելացնել 10-ական մլ ջուր և 30 րոպե թողնել թերմոստատում, 37-38 ºC ջերմաստիճանում: Փորձանոթների պարունակությունը խառնել 6-10 րոպե ընդմիջումներով: 30 րոպե անց փորձանոթների պարունակությունը նստվածքի հետ միասին տեղափոխել ցենտրիֆուգի փորձանոթների մեջ և ցենտրիֆուգել 10 րոպե 3000 պտ/րոպե արագությամբ:



Նկ. 1.21. Ցենտրիֆուգ:

Ստացված ալբումինների թափանցիկ լուծույթը դատարկել մաքուր փորձանոթի մեջ և կատարել բիուրետի ռեակցիա: Գունավորման ուժգնությամբ կարելի է դատել հետազոտվող նմուշներում ալբումինի պարունակության մասին:

1 մլ ալբումինի լուծույթին 4 մլ NaCl-ի հագեցած լուծույթ ավելացնելիս սպիտակուցները կնստեն՝ սկզբում առաջացնելով պղտորություն, ապա՝ փորձանոթի հատակը իջնող նստվածք:

Գլոբուլինների անջատումը: Երկու փորձանոթներից մեկի մեջ լցնել 1 գ ցորենի կամ գարու ալյուր, մյուսի մեջ՝ 1 գ ոլոռի ալյուր: Փորձանոթներում ավելացնել 10-ական մլ NaCl-ի լուծույթ, խառնել և տեղադրել թերմոստատում, (37-38 ºC ջերմաստիճանում 30 րոպե)՝ 6-10 րոպե ընդմիջումներով խառնելով փորձանոթների պարունակությունը: 30 րոպե անց փորձանոթների պարունակությունը նստվածքի հետ տեղափոխել ցենտրիֆուգի փորձանոթների մեջ և ցենտրիֆուգել 10 րոպե 3000 պտ/րոպե արագությամբ: Ստացված

գլոբուլինների թափանցիկ լուծույթը դատարկել մաքուր փորձանոթի մեջ և կատարել բիուրետի ռեակցիա: Գունավորման ուժգնությամբ կարելի է դատել հետազոտվող նմուշներում գլոբուլինների պարունակության մասին:

1 մլ գլոբուլինի լուծույթին 1 մլ NaCl-ի հագեցած լուծույթ ավելացնելիս սպիտակուցները կնստեն՝ սկզբում առաջացնելով պղտորություն, ապա՝ փորձանոթի հատակը իջնող նստվածք:

Պրոլամինների անջատումը: Երկու փորձանոթներից մեկի մեջ լցնել 1 գ ցորենի կամ գարու ալյուր, մյուսի մեջ՝ 1 գ ոլոռի ալյուր: Փորձանոթներին ավելացնել 10-ական մլ C_2H_5OH-ի 70% լուծույթ, խառնել և 30 րոպե թողնել թերմոստատում (37-38 ºC)՝ 6-10 րոպե ընդմիջումներով խառնելով փորձանոթների պարունակությունը: 30 րոպե անց փորձանոթների պարունակությունը նստվածքի հետ տեղափոխել ցենտրիֆուգի փորձանոթների մեջ և ցենտրիֆուգել 10 րոպե 3000 պտ/րոպե արագությամբ: Ստացված պրոլամինների թափանցիկ լուծույթը դատարկել մաքուր փորձանոթի մեջ և կատարել բիուրետի ռեակցիա: Գունավորման ուժգնությամբ կարելի է դատել հետազոտվող նմուշներում պրոլամինների պարունակության վերաբերյալ:

2 մլ պրոլամինի լուծույթին 2 մլ ջուր ավելացնելիս սպիտակուցները կնստեն առաջացնելով պղտորություն:

Փորձի արդյունքները գրանցել հետևյալ աղյուսակում:

Հետազոտվող նմուշ	Ալբումիններ	Գլոբուլիններ	Պրոլամիններ
Ցորենի ալյուր			
Ոլոռ			

Աշխատանք 1.16. Սպիտակուցների անջատումը մկանային հյուսվածքից

Մկանային բջիջների մկանաթելիկները պարունակում են կծկվող (միոզին, ակտին) և կարգավորիչ (տրոպոմիոզին և տրոպոնին) սպիտակուցներ: Մկանաթելիկների սպիտակուցները ջրում չեն լուծվում, բայց դրանք մկանային հյուսվածքից կարելի է լուծամզել 0.5 մոլ/լ կոնցենտրացիայով աղի լուծույթով: Սարկոպլազմի շատ սպիտակուցներ լուծվում են ջրում և ցածր կոնցենտրացիայի (0.05 մոլ/լ) աղի լուծույթում: Մկանային հյուսվածքը KCl-ի 5% լուծույթով լուծամզման ենթարկելիս անջատվում են ինչպես մկանաթելիկների, այնպես էլ սարկոպլազմի սպիտակուցները:



Նկ. 1.22. Հախճապակյա հավանգ:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Մկանային հյուսվածք (առնետի, գորտի), ապակյա փոշի, KCl-ի 5% լուծույթ, սպիտակուցի գունավորման ռեակցիաների ռեակտիվներ:

Սարքեր և պարագաներ: Հախճապակյա հավանգ (նկ. 1.22), քիմիական բաժակ, ցենտրիֆուգ, էլեկտրոնային կշեռք (նկ. 1.23):

Աշխատանքի ընթացքը.

Կշռել 2 գ մկան, մկրատով մանրացնել և տեղափոխել հախճապակյա հավանգի մեջ, ավելացնել 2 մլ KCl-ի լուծույթ և ապակյա փոշիով տրորել մինչև համասեռ զանգվածի ստացումը:

Հոմոգենատին ավելացնել 3 մլ KCl-ի լուծույթ և 5 րոպե տրորել, ապա ավելացնել ևս 5 մլ KCl-ի լուծույթ և շարունակել տրորել: Հոմոգենատը զտել երկշերտ թանզիֆով կամ ցենտրիֆուգել 15 րոպե 4000 պտ/րոպե արագությամբ: Ջտվածքում կատարել սպիտակուցի բացահայտման ռեակցիաներ:



Նկ. 1.23. Էլեկտրոնային կշեռք:

Աշխատանք 1.17. Ալբումինի անջատումը ձվի սպիտակուցից

Ձվի սպիտակուցը մի քանի սպիտակուցների խառնուրդ է, որոնց 70%-ը կազմում են ալբումինները, որոնք հեշտությամբ առանձնանում են գլոբուլիններից: Ձվի սպիտակուցը թորած ջրով տասնապատիկ նոսրացնելիս գլոբուլինները նստում են (կարելի է առանձնացնել զտելով կամ ցենտրիֆուգմամբ), իսկ ալբումինները՝ մնում լուծույթում:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Ձվի սպիտակուց, սպիտակուցների հայտնաբերման ռեակտիվներ:

Պարագաներ: Չափիչ գլան, քիմիական բաժակ, ապակյա ձողիկ:

Աշխատանքի ընթացքը.

1. Չվի սպիտակուցը զգուշությամբ առանձնացնել, լցնել 500 մլ տարողությամբ բաժակի մեջ, ապա բաժակի մեջ ավելացնել 250 մլ թորած ջուր և պարունակությունը խառնել ռետինե ծայրով ապակյա ձողիկով:
2. Լուծույթը լցնել չափիչ գլանի մեջ և ծավալը թորած ջրով հասցնել 300 մլ: Լուծույթը 30 րոպե թողնել սենյակային ջերմաստիճանում գլոբուլինների բամբակեցման նստվածք ստանալու նպատակով:
3. Ստացված սուսպենզիայից առանձնացնել 20 մլ և երկու անգամ զտել:
4. Ալբումիններ պարունակող զտվածքում կատարել սպիտակուցների բացահայտման ռեակցիաներ:

ՍՊԻՏԱԿՈՒՑՆԵՐԻ ՀԻԴՐՈԼԻԶ

Հիդրոլիզը ջրի մասնակցությամբ ընթացող բարդ նյութի քայքայման գործընթաց է ավելի պարզ կառուցվածքային բաղադրամասերի առաջացմամբ: Կախված կատալիզատորից՝ տարբերում են թթվային, հիմնային և ֆերմենտային հիդրոլիզներ: Պարզ սպիտակուցի հիդրոլիզի վերջնական արգասիքները ամինաթթուներն են: Օրգանիզմում սպիտակուցի հիդրոլիզն ընթանում է պրոտեոլիտիկ ֆերմենտների ազդեցությամբ ինչպես մարսողության գործընթացում, այնպես էլ բջիջների կենսագործունեության ընթացքում: Սպիտակուցի թթվային հիդրոլիզի ընթացքում որոշ ամինաթթուներ քայքայվում են (տրիպտոֆանը լրիվ է քայքայվում, սերինը, տրեոնինը, ցիստեինը, թիրոզինը, ֆենիլալանինը՝ մասնակիորեն): Հիմնային հիդրոլիզի ժամանակ դիտվում է ամինաթթուների ավելի ուժեղ քայքայում: Թթվային հիդրոլիզի ընթացքում սպիտակուցները ճեղքվում են՝ սկզբում առաջացնելով բարձրամոլեկուլային պեպտիդներ, ապա երկպեպտիդներ և ամինաթթուներ:

Աշխատանք 1.18. Պարզ սպիտակուցների բացահայտումը թթվային հիդրոլիզի եղանակով

Նյութեր և ռեակտիվներ: Ձվի սպիտակուց կամ մկանային հյուսվածք (աշխ. 1.16), խիտ HC1, NaOH-ի 10 % և $CuSO_4$-ի 1 % լուծույթներ:

Պարագաներ: Անոթ, փորձանոթներ, կաթոցիչներ:

Աշխատանքի ընթացքը.

1. **Պարզ սպիտակուցի թթվային հիդրոլիզ:** Անոթի մեջ լցնել 20 մլ սպիտակուցի լուծույթ և 5 մլ խիտ HC1: Անոթը փակել երկար ապակյա խողովակ ունեցող խցանով և քարշիչ պահարանում 45 րոպե եռացնել (ջրային բաղնիքում):
2. **Հիդրոլիզատում սպիտակուցի ճեղքման միջանկյալ արգասիքների հայտնաբերում:**
   ա) Նախքան հիդրոլիզի գործընթացն իրականացնելը նախապես չեզոքացված հիդրոլիզատում կատարել բիուրետի ռեակցիա:
   բ) Բիուրետի ռեակցիա կատարել հիդրոլիզատում:

Սպիտակուցի ճեղքման միջանկյալ արգասիքները՝ պեպտոնները, բիուրետի ռեակցիայի արդյունքում առաջացնում են վարդագույն կամ կարմիր գունավորում, իսկ սպիտակուցները՝ կապտամանուշակագույն:

Աշխատանք 1.19. Սպիտակուցների թթվային հիդրոլիզ, ֆորմոլային տիտրում

Սպիտակուցների առաջնային կառուցվածքի բացահայտման կարևոր մեթոդ է լաբորատոր պայմաններում իրականացվող թթվային հիդրոլիզը, որի արդյունքում սպիտակուցը տրոհվում է ցածրամոլեկուլային պեպտիդների, երկպեպտիդների, ամինաթթուների: Պեպտիդային կապերի հիդրոլիզից առաջացած կարբօքսիլ (-COOH) խմբերի քանակության որոշման համար կիրառվում է ֆորմոլային տիտրում: Ջրային լուծույթում ամինաթթուներն առաջացնում են ներմոլեկուլային աղեր, հետևաբար առանց նախապես ֆորմալդեհիդով ամինախմբերի չեզոքացման հնարավոր չէ հիմքով տիտրել COOH-խմբերը: Ռեակցիայի ընթացքում ֆորմալդեհիդն ամինախմբի հետ առաջացնում է մեթիլենային միացություն:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Չվի սպիտակուց (մեկ ձվի սպիտակուցը լուծել 500 մլ ջրում, զտել), խիտ HCl, NaOH-ի 1% և 10% լուծույթներ, CH_3COOH-ի 1% լուծույթ, ֆորմալինի 20% լուծույթ, ֆենոլֆտալեին ($C_{20}H_{14}O_4$) (0.25 գ $C_{20}H_{14}O_4$-ը լուծել 25 մլ C_2H_5OH, ավելացնել 25 մլ ջուր), NaOH-ի 0.05 Ն լուծույթ:

Սարքեր և պարագաներ: Անոթ, փորձանոթներ, կաթոցիչներ, ջրային բաղնիք:

Աշխատանքի ընթացքը.

1) Սպիտակուցի լուծույթում COOH-խմբերի տիտրումը մինչ հիդրոլիզը. սպիտակուցի 1 մլ լուծույթին ավելացնել 5 կաթիլ ֆորմալինի լուծույթ և 3 կաթիլ ֆենոլֆտալեինի լուծույթ, 0.05 Ն NaOH-ի լուծույթով տիտրել մինչև բաց վարդագույն գունավորման առաջացումը: Ծախսված հիմքի քանակը ֆիքսել:

2) Սպիտակուցի թթվային հիդրոլիզ. սպիտակուցի 20 մլ լուծույթին ավելացնել 5 մլ խիտ HCl, անոթը փակել խցանով, եռացնել 45 րոպե:

3) COOH–խմբերի տիտրումը սպիտակուցի հիդրոլիզից հետո. հիդրոլիզատը սառեցնել, լցնել գլանի մեջ, ծավալը հասցնել 25 մլ և զտել: 1.25 մլ հիդրոլիզատին ավելացնել 3 կաթիլ ֆենոլֆտալեինի լուծույթ և չեզոքացնել 10% NaOH-ով մինչև բաց վարդագույն երանգավորում (այստեղ NaOH-ը անհրաժեշտ է HCl-ի չեզոքացման համար, և դրա քանակությունը չի կարևորվում): Եթե չեզոքացման ընթացքում լուծույթը ստանում է վառ կարմիր գունավորում, կաթիլներով ավելացնել 1% CH_3COOH-ի լուծույթ մինչև գունազրկումը (ավելցուկը չեզոքացնել 1% NaOH-ի լուծույթով մինչև բաց վարդագույն գունավորման առաջացումը): Ավելացնել 5 կաթիլ ֆորմալինի 20% լուծույթ, գունազրկված լուծույթը տիտրել 0.05 Ն NaOH-ով մինչև բաց վարդագույն գունավորում, նշել ծախսված հիմքի ճշգրիտ քանակությունը:

Ամինախմբերի ազոտի հաշվարկը կատարել ծախսված հիմքի քանակով ըստ նորմալության:

1 մլ 0.05 Ն NaOH-ի լուծույթին համապատասխանում է 0.07 մգ N: Ամինախմբերի քանակությամբ դատում են COOH–խմբերի քանակության մասին:

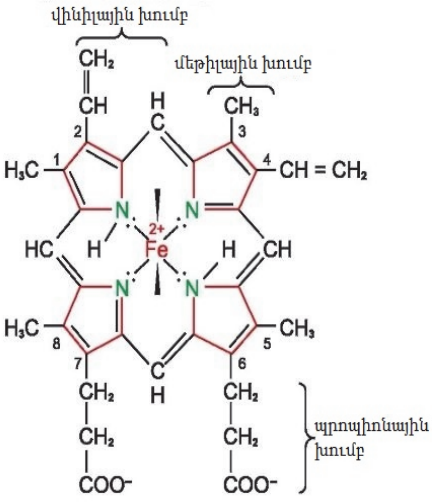
4) Հիդրոլիզատում սպիտակուցների քայքայման միջանկյալ արգասիքների բացահայտումը բիուրետի ռեակտիվով. փորձանոթի մեջ լցնել 5 մլ սպիտակուցի հիդրոլիզատ և չեզոքացնել 10% NaOH-ով (լակմուսով): Չեզոքացումից հետո կատարել բիուրետի ռեակցիա՝ ավելացնելով 2 կաթիլ $CuSO_4$-ի լուծույթ: Արդյունքում առաջանում է մանուշակագույն գունավորում: Սպիտակուցների լիարժեք հիդրոլիզից (2.5 ժամ) հետո հիդրոլիզատում բիուրետի ռեակցիան բացասական է:

ԲԱՐԴ ՍՊԻՏԱԿՈՒՑՆԵՐԻ ՀԱՅՏՆԱԲԵՐՈՒՄԸ

Բարդ սպիտակուցները կազմված են ամինաթթուներից և ոչ սպիտակուցային բաղադրամասից (պրոստետիկ խումբ): Բարդ սպիտակուցներին են պատկանում նուկլեոպրոտեիները, քրոմոպրոտեիները, գլիկոպրոտեիները, մետաղապրոտեիները և այլն:

Աշխատանք 1.20. Քրոմոպրոտեիների հայտնաբերումը

Քրոմոպրոտեիները բարդ սպիտակուցներ են, որոնց պրոստետիկային խումբը ներկայացված է ոչ սպիտակուցային բնույթի որևէ գունավոր միացությամբ: Տարբեր քրոմոպրոտեիների գունավոր պրոստետիկային խմբերը պատկանում են օրգանական միացությունների տարբեր դասերի (պորֆիրիններ, կարոտինոիդներ և այլն): Քրոմոպրոտեիների կարևորագույն խումբ են կազմում պորֆիրինային միացություններ պարունակող սպիտակուցները՝ արյան հեմոգլոբին, մկանների միոգլոբին, ցիտոքրոմներ, որոշ ֆերմենտներ (կատալազ, պերօքսիդազ, ՆԱԴՖՀ-օքսիդազ և այլն): Հեմոգլոբինը կազմված է գլոբինից և գունակային (պիգմենտային) հատվածից՝ հեմից: Ըստ քիմիական բնույթի՝ հեմը պրոտոպորֆիրին է, որի կազմության մեջ առկա է երկարժեք երկաթ, իսկ վերջինս համապատասխան պայմաններում կարող է վերածվել եռարժեք երկաթի:



հեմոգլոբին

Տեյխմանի հեմինային նմուշ. Չորացած արյունը սառցային քացախաթթվի հետ տաքացնելիս արյան պիգմենտը ճեղքվում է՝ առաջացնելով գլոբին և հեմատին: Հեմատինը նատրիումի քլորիդի և քացախաթթվի փոխազդեցության արդյունքում առաջացած աղաթթվի ազդեցությամբ վերածվում է հեմինի քլորածանցյալի, որը սառեցնելիս վերաբյուրեղանում է: Տեյխմանի նմուշն օգտագործում են դատաբժշկական փորձաքննությունների ընթացքում արյան հետքերի առկայությունն ապացուցելու նպատակով: Հեմինը հեմից տարբերվում է քլորի հետ միացած եռարժեք երկաթի առկայությամբ:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Արյուն (կենդանական), սառցային CH_3COOH, NaCl-ի հագեցած լուծույթ:

Սարքեր և պարագաներ: Առարկայակիր ապակիներ, ապակյա ձողիկ, մանրադիտակ:

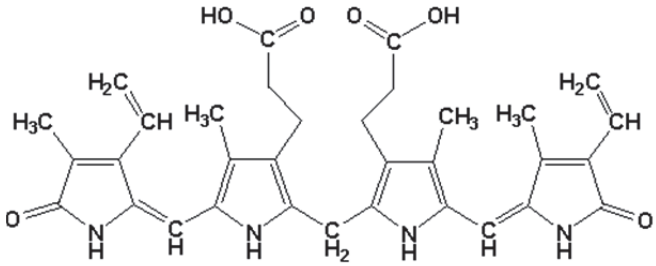
Աշխատանքի ընթացքը.

Թարմ արյան կաթիլը տեղադրել առարկայակիր ապակու վրա և չորացնել բարձր պահելով՝ սպիրտայրոցի կրակի վրա, խուսափելով 60 °C-ից բարձր ջերմաստիճանից (չեռացնել): Չորացած արյանն ավելացնել 1-2 կաթիլ խիտ CH_3COOH, խառնել ապակյա ձողիկով, ծածկել ապակիով և զգուշությամբ տաքացնել մինչև թթվի եռալը: Առարկայակիր ապակին պետք է կրակից բարձր պահել հեղուկի եռալը կանխելու նպատակով: Հետո պրեպարատը սառեցնել և մանրադիտակով դիտել հեմոգլոբինի քայքայումից առաջացած աղաթթվային հեմինի ռոմբաձև բյուրեղները: Եթե հնարավոր չէ հայտնաբերել բյուրեղները, ապա պետք է բարձրացնել ծածկող ապակին, ավելացնել 2-3 կաթիլ CH_3COOH, խառնուրդը տաքացնել և սառեցնելուց հետո նորից դիտել մանրադիտակով:

Արյան հին հետքերը դիտելու նպատակով հեմինային նմուշը պատրաստում են հետքի քերուկով կամ էլ հետք կրող հյուսվածքի կտորի հետ միասին բաժանում են մանր մասերի: Մինչև սառցային քացախաթթվով մշակելը ավելացնում են NaCl-ի բյուրեղիկ:

Ազատ և կապված բիլիռուբինի բացահատումը

Բիլիռուբինը կարևորագույն լեղագունակ է: Դրա առաջացումը սկսվում է ցանցաէնդոթելային համակարգում հեմոգլոբինի քայքայման ու դրանից հեմի անջատման ժամանակ: Հեմի պրոտոպորֆիրինային օղակը կորցնում է երկաթը և վերածվում բիլիվերդինի, որի վերականգնման դեպքում առաջանում է բիլիռուբինա-սպիտակուցային համալիր: Հեպատոցիտները գունակը միացնում են գլյուկուրոնաթթվին և արտազատում դեպի լեղային մազանոթները: Լեղու հետ բիլիռուբինն անցնում է աղիներ, որտեղ դրա մի մասը հեռանում է կղանքի հետ ստերկոբիլինի ձևով: Նորմայում բիլիռուբինը հանդիպում է լեղու մեջ լուծված վիճակում և ոչ մեծ քանակով արյան պլազմում:



բիլիռուբին

Նյութեր և ռեակտիվներ: Արյան շիճուկ, լեղի, C_2H_5OH, դիազոռեակտիվ՝ լուծույթ I-15 մգ $C_6H_7NO_3S$-ը տաքացնելով լուծել 3-4 մլ թորած ջրում, ավելացնել 0.15 մլ խիտ H_2SO_4 և ծավալը հասցնել 10 մլ, լուծույթ II-$NaNO_3$-ի 0.5% լուծույթ (օգտագործելուց առաջ 10 մլ 1-ին և 0.3 մլ 2-րդ լուծույթները խառնել), խիտ HCl:

Պարագաներ: Փորձանոթներ, ժամացույցի ապակի, կաթոցիչներ:

Աշխատանքի ընթացքը.

1. Ազատ բիլիռուբինի բացահայտումը

Փորձանոթի մեջ լցնել 1 մլ արյան շիճուկ, 2 մլ C_2H_5OH, խառնել և զտել: Զտվածքին ավելացնել 5 կաթիլ դիազոռեակտիվ, առաջանում է վարդագույն գունավորում:

2. Կապված բիլիռուբինի բացահայտումը

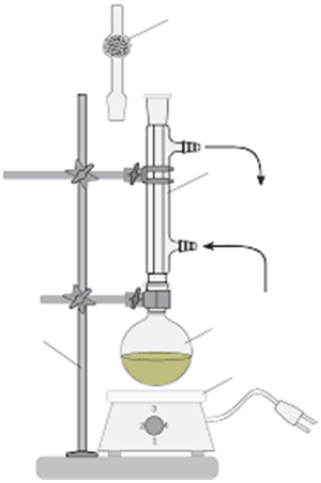
Ժամացույցի ապակու վրա կաթեցնել արյան շիճուկ և ավելացնել 3 կաթիլ դիազոռեակտիվ, ճողիկով խառնել: Զարգանում է բիլիռուբինին բնորոշ բաց կարմիր գունավորում:

Աշխատանք 1.21. Ֆոսֆոպրոտեինների հայտնաբերումը

Ֆոսֆոպրոտեիները բարդ սպիտակուցներ են, որոնց ոչ սպիտակուցային բաղադրամասը ֆոսֆորական թթուն է: Ֆոսֆորական թթուն սպիտակուցին միացած է սերինի և տրեոնինի հիդրօքսիլ խմբերի միջոցով: Ֆոսֆոպրոտեիները կենդանիների սաղմի զարգացմանը նպաստող միացություններ են: Ֆոսֆոպրոտեիների խմբին են պատկանում ձվի դեղնուցի վիտելլինը, ձկնկիթի իխտուլինը, կաթի կազեինոգենը և որոշ այլ սպիտակուցներ:

Կաթի սպիտակուցի 80 %-ը կազմում է կազեինը, որն օժտված է թթվային հատկություններով և կաթում ներկայացված է լուծված կալցիումական աղի ձևով: Թթվեցման դեպքում կազեինը անջատվում է սպիտակ բամբակենման նստվածքի ձևով, որը զտելիս հեշտությամբ առանձնանում է:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Կաթ, NaOH-ի 10% լուծույթ, CH_3COOH-ի 10 % լուծույթ, խիտ HNO_3, մոլիբդենային ռեակտիվ (7.5 գ $(NH_4)_2MoO_4$ լուծել 50 մլ HNO_3-ում), $CuSO_4$-ի 1% լուծույթ, $C_{20}H_{14}O_4$:



Նկ. 1.25. Հետադարձ սառնարան:

Սարքեր և պարագաներ: Չափիչ գլան, քիմիական բաժակ, ապակյա ձողիկ, ձնոթ, հետադարձ սառնարան (նկ. 1.25), ավազե բաղնիք, լակմուսի թուղթ:

Աշխատանքի ընթացքը.

1. Կազեինի անջատումը կաթից: Քիմիական բաժակի մեջ լցնել 2 մլ կաթ և 2 մլ թորած ջուր: Խառնուրդին ավելացնել 2-3 կաթիլ CH_3COOH-ի լուծույթ: Դիտվում է փխրուն նստվածքի առաջացում, որն անհրաժեշտ է զտել: Զտվածքը թափել, նստվածքի մի մասը ֆիլտրի վրայից ապակյա ձողիկով տեղափոխել հետադարձ սառնարանով փորձանոթի մեջ, իսկ մյուս մասի հետ կատարել բիուրետի ռեակցիա:

2. Կազեինի հիդրոլիզ: Կազեին պարունակող հետադարձ սառնարանով փորձանոթի մեջ ավելացնել 2 մլ NaOH-ի լուծույթ, 10-15 րոպե եռացնել ազբեստե ցանցի վրա, ապա սառեցնել և կատարել հիդրոլիզի արգասիքների հայտնաբերման ռեակցիաներ:

3. Սպիտակուցի հայտնաբերման բիուրետի ռեակցիա: Փորձանոթի մեջ լցնել 5 կաթիլ հիդրոլիզատ և ավելացնել 2 կաթիլ $CuSO_4$-ի լուծույթ: Առաջանում է վարդամանուշակագույն գունավորում:

4. Ֆոսֆորական թթվի հայտնաբերման ռեակցիա: Հիդրոլիզատի մյուս մասին ավելացնել 1-2 կաթիլ $C_{20}H_{14}O_4$, այնուհետև՝ 10-20 կաթիլ խիտ ազոտական թթու մինչև $C_{20}H_{14}O_4$-ի անգունացում (թույլ թթվային ռեակցիա): Չեզոքացման դեպքում առաջանում է նստվածք, որը կազմված է կազեինի ոչ լրիվ հիդրոլիզի ենթարկված բարձրամոլեկուլային արգասիքներից: Նստեցումից հետո հեղուկը զտել: 0.5 մլ զտվածքին ավելացնել 1 մլ մոլիբդենային ռեակտիվ և մի քանի րոպե եռացնել: Ֆոսֆորական թթվի առկայությամբ հեղուկը ստանում է դեղին գունավորում, իսկ սառեցնելուց հետո առաջանում է ամոնիումի ֆոսֆոմոլիբդատի $(NH_4)_3(PO_4 \times 12MoO_3)$ դեղին նստվածք:

$$H_3PO_4 + 12\ (NH_4)_2MoO_4 + 21\ HNO_3 \rightarrow (NH_4)_3(PO_4 \times 12MoO_3) + 21\ NH_4NO_3 + 12\ H_2O$$

Աշխատանք 1.22. Նուկլեոպրոտեինների հիդրոլիզի արգասիքների հայտնաբերումը

Նուկլեոպրոտեինները բարդ սպիտակուցներ են, որոնց պրոստետիկ խումբը կազմում են նուկլեինաթթուները: Նուկլեոպրոտեինների քիմիական կազմն ուսումնասիրելիս օգտագործում են խմորասնկեր, քանի որ վերջիններս հարուստ են նշված սպիտակուցներով: Նուկլեոպրոտեինների թթվային հիդրոլիզի արգասիքները հայտնաբերվում են առանձնահատուկ որակական ռեակցիաներով: Երկարատև հիդրոլիզի արդյունքում նուկլեինաթթուները ճեղքվում են մոնոնուկլեոտիդների, որոնք իրենց հերթին հիդրոլիզվում են պուրինային կամ պիրիմիդինային հիմքերի, պենտոզների և ֆոսֆորական թթվի:

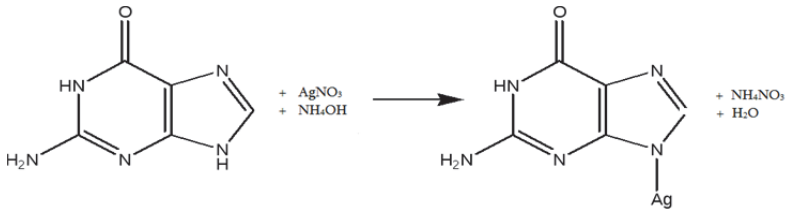
Նյութեր և ռեակտիվներ: Թթխմորային խմորասնկեր, խիտ H_2SO_4, H_2SO_4-ի 10% լուծույթ, խիտ NH_3, մոլիբդենային ռեակտիվ (աշխ. 1.21), $AgNO_3$-ի 1%, թիմոլի ($C_{10}H_{14}O$) 1 %, α-նաֆթոլի ($C_{10}H_7OH$) 0.2 % սպիրտային լուծույթներ, NaOH-ի l0% և 30 %, $CuSO_4$-ի l% և 7 %, դիֆենիլամինի ($C_6H_5NHC_6H_5$) l % լուծույթներ:

Սարքեր և պարագաներ: Հետադարձ սառնարանով անոթ, փորձանոթներ, ձագար, չափիչ գլան, կաթոցիչներ:

Աշխատանքի ընթացքը.

1. **Նուկլեոպրոտեինների հիդրոլիզ:** 2 գ թթխմորային խմորասնկերը տեղափոխել 100 մլ տարողությամբ կլորահատակ անոթի մեջ, ավելացնել 20 մլ 10% H_2SO_4-ի լուծույթ, 20 մլ թորած ջուր, անոթը փակել երկար ապակյա խողովակ ունեցող խցանով և քարշիչ պահարանում 1 ժամ եռացնել (ջրային բաղնիքում): Հիդրոլիզի ավարտից հետո անոթի պարունակությունը լցնել չափիչ գլանի մեջ, ջրով ծավալը հասցնել ելակետային մակարդակի և զտել: Զտվածքում կատարել նուկլեոպրոտեինների բաղադրամասերի հայտնաբերման որակական ռեակցիաներ:
2. **Պոլիպեպտիդների հայտնաբերման բիուրետի ռեակցիա:** Փորձանոթի մեջ լցնել 0.5 մլ հիդրոլիզատ, ավելացնել l մլ NaOH-ի l0% և 2 կաթիլ $CuSO_4$-ի 1% լուծույթներ: Առաջանում է վարդամանուշակագույն գունավորում
3. **Նուկլեինաթթուների բաղադրամասերի որակական ռեակցիաներ:**

ա) Պուրինային հիմքերի արծաթային նմուշ: l0 կաթիլ հիդրոլիզատին ավելացնել l կաթիլ խիտ NH_4OH և 5 կաթիլ $AgNO_3$-ի լուծույթ: 3-5 րոպե անց առաջանում է պուրինային հիմքերի արծաթային միացության բաց շագանակագույն (գորշ) փուխր նստվածք:



բ) Պենտոզների հայտնաբերման Մոլիշի ռեակցիա: Խիտ ծծմբական թթվի հետ հեքսոզների կամ պենտոզների փոխազդեցության արդյունքում տեղի է ունենում դրանց ջրազրկում: Պենտոզներից առաջանում է ֆուրֆուրոլ, իսկ հեքսոզներից՝ օքսիմեթիլֆուրֆուրոլ, որոնք խիտ H_2SO_4-ի առկությամբ թիմոլի կամ α-նաֆթոլի հետ առաջացնում են կարմիր գույնի կոնդենսացման արգասիք:

Փորձանոթի մեջ լցնել 10 կաթիլ զտված հիդրոլիզատ, 2-3 կաթիլ $C_{10}H_{14}O$-ի լուծույթ, խառնել և պատերին սահեցնելով՝ զգուշությամբ ավելացնել 20 կաթիլ խիտ H_2SO_4: Թափահարելիս փորձանոթի հատակին դիտվում է կարմիր գունավորում ֆուրֆուրոլի և թիմոլի կոնդենսացման արգասիքի առաջացման շնորհիվ:

գ) Ածխաջրերի որակական ռեակցիաև α-նաֆթոլի հետ: Փորձանոթի մեջ լցնել 5 կաթիլ հիդրոլիզատ, 2-3 կաթիլ $C_{10}H_7OH$-ի լուծույթ, խառնել և պատերին սահեցնելով՝ զգուշությամբ ավելացնել 20 կաթիլ խիտ H_2SO_4: Թափահարելիս փորձանոթի հատակին դիտվում է կարմրամանուշակագույն գունավորում:

դ) Ռիբոզի և դեզօքսիռիբոզի հայտնաբերման Թրոմերի ռեակցիա: Փորձանոթի մեջ լցնել 5 կաթիլ հիդրոլիզատ, l0 կաթիլ NaOH-ի 30% լուծույթ, l-3 կաթիլ $CuSO_4$-ի 7 % լուծույթ մինչև $Cu(OH)_2$ չանհետացող պղտորության առաջացումը: Փորձանոթի պարունակությունը ջրային բաղնիքում տաքացնելիս առաջանում է CuOH-ի դեղին կամ Cu_2O- կարմիր նստվածք:

ե) Ռիբոզի և դեզօքսիռիբոզի հայտնաբերումը դիֆենիլամինով: Դիֆենիլամինը դեզօքսիռիբոզի հետ առաջացնում է կապույտ, իսկ ռիբոզի հետ՝ կանաչ գունավորում: Փորձանոթի մեջ լցնել 1 մլ հիդրոլիզատ, 4 մլ $C_6H_5NHC_6H_5$-ի լուծույթ, փորձանոթը 15 րոպե տեղադրել եռացող ջրային բաղնիքում: Առաջանում է կապտականաչ գունավորում:

զ) Ֆոսֆորական թթվի հայտնաբերումը մոլիբդենային ևմուշով: 10 կաթիլ հիդրոլիզատին ավելացնել 20 կաթիլ մոլիբդենային ռեակտիվ և խառնուրդը մի քանի րոպե եռացնել: Հեղուկը ստանում է դեղին գունավորում, իսկ փորձանոթը ջրի շիթով սառեցնելուց հետո փորձանոթի հատակին առաջանում է ամոնիումի ֆոսֆոմոլիբդատի $(NH_4)_3(PO_4 \text{ x } 12MoO_3)$ դեղին նստվածք:

Բարդ սպիտակուցների բաղադրամասերի հայտնաբերման որակական ռեակցիաների արդյունքները գրանցել հետևյալ աղյուսակում:

Բարդ սպիտակուցի անվանում	Պրոստետիկ խմբի քիմիական կառուցվածք	Օգտագործվող ռեակտիվներ	Ռեակցիայի արգասիքներ	Ինչո՞վ է պայմանավորված ռեակցիան

ՍՊԻՏԱԿՈՒՅԻ ՔԱՆԱԿԱՆ ՈՐՈՇՈՒՄԸ

Գոյություն ունեն սպիտակուցների քանակական որոշման ֆիզիկական, քիմիական և կենսաբանական եղանակներ: Ֆիզիկական եղանակներից պարզագույնը մաքուր սպիտակուցը կշռելն է: Սակայն սպիտակուցները շատ խոնավածուծ են, և դրանց ջրազրկելը բավական դժվար է, ուստի այդ եղանակը հազվադեպ է կիրառվում: Սպիտակուցի քանակական որոշման ֆիզիկական մեթոդներից առավել տարածված են ռեֆրակտաչափական (ըստ սպիտակուցային լուծույթների բեկման ցուցանիշների), լուսագումաչափական (ըստ սպեկտրի ուլտրամանուշակագույն տիրույթում կլանման մեծության), բևեռագրաֆիկական (ըստ սպիտակուց պարունակող համակարգի հոսանքի ուժի և լարվածության միջև կախվածությունը ցույց տվող կորերի), պիկնոգրաֆիկական (ըստ սպիտակուցային լուծույթների խտության) եղանակները:

Սպիտակուցի քանակական որոշման քիմիական մեթոդները բազմազան են, որոնցից ամենապարզն ընդհանուր կամ սպիտակուցային (սպիտակուցը նստեցնելուց և ազոտ պարունակող լուծելի միացություններից առանձնացնելուց հետո) ազոտի քանակական որոշումն է:

Սպիտակուցի քանակական որոշման ամենատարածված մեթոդը գումաչափական մեթոդն է, որի հիմքում սպիտակուցի և համապատասխան ռեագենտի փոխազդեցության արդյունքում առաջացած գունավորման ուժգնության չափումն է: Սպիտակուցի կոնցենտրացիան հաշվելու նպատակով կառուցում են տրամաչափական կոր:

Սպիտակուցի քանակական որոշման կենսաբանական մեթոդները կիրառելի են միայն ֆերմենտային և հորմոնային ակտիվություն ունեցող սպիտակուցների նկատմամբ: Չափելով ֆերմենտային պատրաստուկի կենսաբանական ակտիվությունը՝ կարելի է գնահատել այդ ակտիվությամբ օժտված սպիտակուցի քանակական պարունակությունը, սակայն այս եղանակը բացարձակ արդյունքներ չի արձանագրում:

Աշխատանք 1.23. Սպիտակուցի քանակական որոշումը Բիուրետի մեթոդով

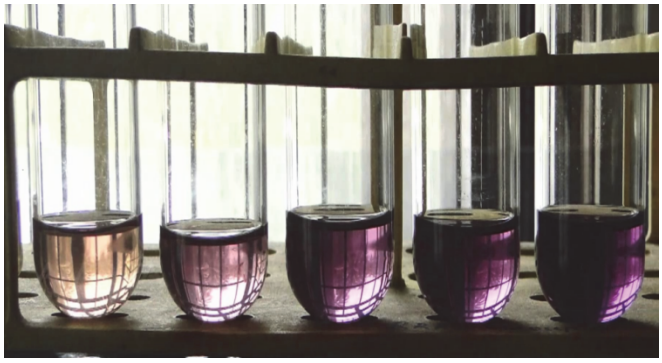
Սպիտակուցի լուծույթները հիմնային միջավայրում պղնձի սուլֆատի հետ փոխազդելիս առաջացնում են մանուշակագույն գունավորում: Գունավորման ուժգնությունը ուղիղ համեմատական է լուծույթում սպիտակուցի խտությանը:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Սպիտակուցի (ցուլի շիճուկային ալբումին) ստանդարտ լուծույթ 10 մգ/մլ, ձվի սպիտակուց, բիուրետի ռեակտիվ – 0.15 գ $CuSO_4$ x $5H_2O$ և 0.6 գ K/Na-ի տարտրատը (գինեթթվի K/Na-ական կամ սեգնետյան աղ ($KNa(C_4H_4O_6)$) լուծել 50 մլ ջրում, խառնելով ավելացնել 30 մլ 10% NaOH, ավելացնել 0.1 գ KI և լուծույթի ծավալը թորած ջրով հասցնել 100 մլ: Բիուրետի ռեակտիվը պահել պոլիէթիլենային անոթում:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, լուսաէլեկտրագունաչափ (ԼԷԳ), կյուվետներ:

Աշխատանքի ընթացքը.

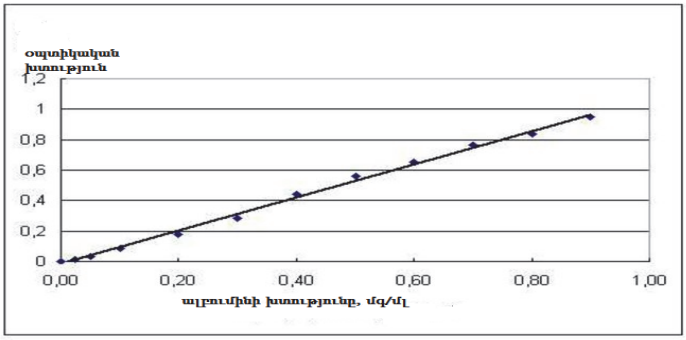
Վերցնել 5 փորձանոթներ (մեկը որպես ստուգիչ): Ստուգիչ փորձանոթի մեջ լցնել 1 մլ թորած ջուր, երեք փորձանոթների մեջ լցնել 2.5; 5.0 և 7.5 մգ սպիտակուց (ալբումին) պարունակող 1-ական մլ լուծույթներ: Այս երեք փորձանոթներն անհրաժեշտ են տրամաչափական կոր կառուցելու համար: 5-րդ փորձանոթի մեջ լցնել անհայտ խտության սպիտակուցի 1 մլ լուծույթ: Բոլոր փորձանոթներին ավելացնել 2 մլ բիուրետի ռեակտիվ, խառնել և գունավորման զարգացման նպատակով 20 րոպե թողնել սենյակային ջերմաստիճանում (նկ. 1.26): Այնուհետև գունավորված լուծույթները գունաչափել ստուգիչի դիմաց (ԼԷԳ, ալիքի երկարությունը 540-560 նմ, կանաչ լուսաֆիլտր, կյուվետի լայնությունը 0.5 սմ):



Նկ. 1.26. Տարբեր խտության սպիտակուցի լուծույթների գունավորումը բիուրետի ռեակցիայով:

Տրամաչափական կորի կառուցումը: Ստացված տվյալների հիման վրա կառուցել տրամաչափական կոր՝ աբսցիսների առանցքին տեղադրելով սպիտակուցի ստանդարտ լուծույթի խտությունների (մգ/մլ) արժեքները, իսկ օրդինատների առանցքին՝ օպտիկական խտությունների համապատասխան ար-

ժեքները: Ելնելով անհայտ խտությամբ սպիտակուցի լուծույթի օպտիկական խտության արժեքից ըստ տրամաչափական կորի որոշել վերջինիս քանակը:



Սպիտակուցի քանակական որոշման տրամաչափական կոր

Աշխատանք 1.24. Բրեդֆորդի մեթոդ

Մեթոդի հիմքում բրիլիանտ կումասի կապույտ թթվային ներկանյութի հետ սպիտակուցի միացման ունակությունն է: Սպիտակուցին միանալիս ներկանյութի կլանման սպեկտրը փոխվում է: Գունավորման ուժգնությունը կախված է նմուշում (1-10 մկգ/մլ տիրույթում) սպիտակուցի խտությունից: Քանի որ սպիտակուցները ներկանյութ միացնելու ունակությամբ տարբերվում են իրարից, ապա ցանկալի է կառուցել տրամաչափական կոր՝ օգտագործելով այն սպիտակուցը, որի կոնցենտրացիան անհրաժեշտ է որոշել:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Սպիտակուցի ստանդարտ լուծույթ (ցուլի շիճուկային ալբումին), 0.05 մգ/մլ, ներկանյութի լուծույթ - 10 մգ G-250 կումասին հոմոգենացնել ապակյա հոմոգենիզատորում 5 մլ 95 % C_2H_5OH-ով, ստացված լուծույթը խառնել 10 մլ 95 % H_3PO_4-ի հետ, նոսրացնել՝ ծավալը հասցնելով մինչև 100 մլ-ի: Ֆիլտրված ներկանյութի լուծույթը կարելի է պահել մինչև երկու շաբաթ:



Նկ. 1.27 Հոմոգենիզատոր:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, հոմոգենիզատոր (նկ. 1.27), լուսաէլեկտրագունաչափ:

Աշխատանքի ընթացքը.

10-50 մկգ սպիտակուց պարունակող 1.5 մլ լուծույթը խառնել 1.5 մլ ներկանյութի հետ և 3-5 րոպե անց չափել օպտիկական խտությունը՝ որպես ստու-

գիչ օգտագործելով սպիտակուց չպարունակող նմուշ (ԼԷԳ, ալիքի երկարությունը 540-560 նմ, կանաչ լուսաֆիլտր, կյուվետի լայնությունը 0.5 սմ):

Տրամաչափական կորի կառուցումը: 5 տարբեր փորձանոթներում ալբումինի ստանդարտ լուծույթից պատրաստել 10; 20; 30; 40 և 50 մկգ ալբումին պարունակող 1-ական մլ լուծույթներ, ավելացնել 1.5 մլ ներկանյութի լուծույթ, խառնել և 5 րոպե անց չափել օպտիկական խտությունը որպես ստուգիչ օգտագործելով սպիտակուց չպարունակող նմուշ (ԼԷԳ, ալիքի երկարությունը 540-560 նմ, կանաչ լուսաֆիլտր, կյուվետի լայնությունը 0.5 սմ): Կառուցել տրամաչափական կոր՝ աբսցիսների առանցքին տեղադրելով սպիտակուցի ստանդարտ լուծույթի խտությունը (մկգ/մլ), օրդինատների առանցքին՝ օպտիկական խտությունների համապատասխան արժեքները:

Հարցեր

1. Ի՞նչ են սպիտակուցները:
2. Ինչպե՞ս են միացած ամինաթթվի մնացորդները սպիտակուցի մոլեկուլում:
3. Ինչպե՞ս են ձևավորվում սպիտակուցի երկրորդային, երրորդային և չորրորդային կառուցվածքները:
4. Ո՞ր կապերն են մասնակցում երրորդային և չորրորդային կառուցվածքների կայունացմանը:
5. Ինչո՞վ են պայմանավորված սպիտակուցների գունավորման ռեակցիաները:
6. Ինչպե՞ս են պղնձի իոնները միանում սպիտակուցի պեպտիդային կապերին:
7. Սպիտակուցներից բացի՝ ո՞ր միացությունները կարող են բիուրետի ռեակցիա ցուցաբերել:
8. Ո՞ր ամինաթթուներով է պայմանավորված քսանտոպրոտեինային ռեակցիան:
9. Ինչպե՞ս է գլիօքսալաթթուն միանում տրիպտոֆանի հետ, և ի՞նչ համալիր է գոյանում:
10. Ինչպե՞ս կարելի է հայտնաբերել հիստիդին և տրիպտոֆան ամինաթթուները:
11. Արգինին ամինաթթվի ո՞ր խումբն է մասնակցում նրա հայտնաբերման ռեակցիայում:
12. Ո՞ր ամինաթթուներով է պայմանավորված ֆոլի ռեակցիան:
13. Ինչպե՞ս են իրենց դրսևորում ամինաթթուները և սպիտակուցները ջրային լուծույթներում թթուների ու ալկալիների առկայության պայմաններում:
14. Ինչի՞ց է կախված սպիտակուցի լիցքը ջրային լուծույթում:
15. Ինչի՞ց է կախված սպիտակուցի լուծելիությունը: Ո՞ր գործոններն են լուծույթում կայունացնում սպիտակուցները:
16. Որո՞նք են լուծույթից սպիտակուցի նստեցման ընդհանուր մեխանիզմները: Ի՞նչ եղանակներով կարելի է նստեցնել սպիտակուցն առանց բնափոխման ենթարկելու:
17. Ի՞նչ է նշանակում իզոէլեկտրական կետ, և ինչպե՞ս այն որոշել:
18. Որո՞նք են լուծույթում սպիտակուցը կայունացնող գործոնները:
19. Ի՞նչ է նշանակում սպիտակուցի աղայնացում:
20. Ամոնիումի սուլֆատի ո՞ր խտության դեպքում են նստում ալբումինները և գլոբուլինները:

21. Ի՞նչ է ճշանակում սպիտակուցի բնավոխում: Որո՞նք են սպիտակուցը բնավոխող գործոնները:
22. Ո՞րն է նստեցման և բնավոխման տարբերությունը:
23. Ի՞նչ եղանակով կարելի է նստեցնել սպիտակուցները լուծույթից՝ չենթարկելով դրանց բնավոխման:
24. Ինչպե՞ս կարելի է բաժանել արյան շիճուկի ալբումինները և գլոբուլինները:
25. Հիմք ընդունելով սպիտակուցների ոչ դարձելի նստեցման ռեակցիաները՝ ինչպիսի՞ միջոցառումներ կարելի է ձեռնարկել ծանր մետաղների աղերով թունավորվելու դեպքում:
26. Ի՞նչ է սպիտակուցի հիդրոլիզը, և սպիտակուցի հիդրոլիզի ի՞նչ տեսակներ կան:
27. Ինչո՞վ է պայմանավորված պարզ և բարդ սպիտակուցների տարբերությունը:
28. Բարդ սպիտակուցների ո՞ր խմբին է պատկանում հեմոգլոբինը: Ներկայացնել սպիտակուցների դասակարգումը:
29. Ի՞նչ բաղադրամասերից է կազմված հեմոգլոբինը:
30. Ի՞նչ են գլիկոպրոտեիները:
31. Ի՞նչ են ֆոսֆոպրոտեիները:
32. Ֆոսֆոպրոտեիներում ինչպե՞ս է ֆոսֆորական թթուն միանում սպիտակուցային հատվածի հետ, և ո՞ր ռեակցիայի օգնությամբ կարելի է հայտնաբերել դրանց ֆոսֆորական թթվի մնացորդը:
33. Նուկլեինաթթուների բաղկացուցիչ մասերի հայտնաբերման ի՞նչ որակական ռեակցիաներ կարելի է իրականացնել:
34. Ի՞նչ արգասիքներ են առաջանում մոնոնուկլեոտիդի հիդրոլիզի արդյունքում: Գրել մոնոնուկլեոտիդի հիդրոլիզի ռեակցիան:
35. Ինչպե՞ս են միացած մոնոնուկլեոտիդները նուկլեինաթթվի մոլեկուլում: Գրել դինուկլեոտիդի բանաձևը:

ԳԼՈՒԽ 2
ԱԾԽԱՋՐԵՐ

Բնության մեջ ամենատարածված միացությունները՝ ածխաջրերը, հանդիպում են ցանկացած բուսական, կենդանական, բակտերիային կամ սնկային բջջում ազատ կամ կապված ձևով: Բույսերում ածխաջրերն առաջանում են ֆոտոսինթեզի արդյունքում և կազմում դրանց չոր զանգվածի 80-90%-ը: Կենդանական օրգանիզմներում դրանք կազմում են չոր զանգվածի 2%-ը:

Ածխաջրերն օրգանական միացություններ են, որոնց կազմը հիմնականում արտահայտվում է $Cn(H_2O)n$ ընդհանուր բանաձևով:

Ածխաջրերի հիմնական գործառույթներն են.

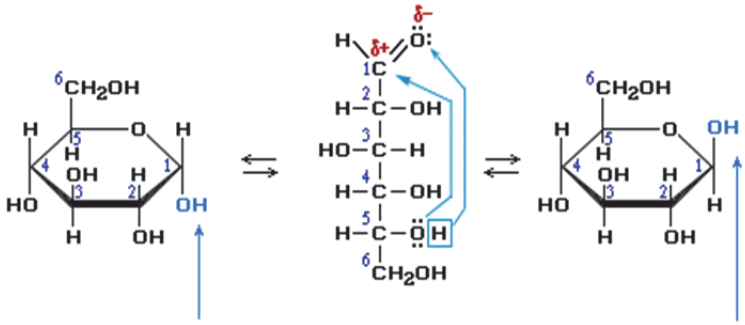
- պաշարային – օսլան, գլիկոգենը գլյուկոզի ժամանակավոր դեպոներ են: Կենդանական օրգանիզմներում ածխաջրերը պահեստավորվում են կմախքային մկաններում, լյարդում և այլ հյուսվածքներում գլիկոգենի տեսքով, բուսական օրգանիզմներում՝ օսլայի տեսքով.
- կառուցվածքային – ածխաջրերը (ռիբոզ, դեզօքսիռիբոզ) մասնակցում են նուկլեինաթթուների սինթեզին: Առանձին ածխաջրեր բջջային թաղանթների բաղկացուցիչ մաս են կազմում: Գլյուկոզի ածանցյալները (գլյուկուրոնաթթու, գլյուկոզամին) շարակցական, աճառային հյուսվածքների բարդ սպիտակուցների բաղադրամաս են.
- պաշտպանական – ներառված են իմունագլոբուլիններում, թթվային պոլիսախարիդներն առկա են հոդերում, մարսողական ուղիներում.
- կարգավորիչ – սննդի թաղանթանյութը չի ճեղքվում աղիներում, սակայն դյուրին է դարձնում սննդանյութերի մարսումը.
- էներգիային – ածխաջրերն օրգանիզմում հիմնական էներգիայի աղբյուր են: 1 գ ածխաջրերի օքսիդացումից անջատվում է 17.6 կՋ էներգիա: Օրգանիզմում էներգիայի աղբյուր են ածխաջրերի պաշարները գլիկոգենի, օսլայի տեսքով և ազատ գլյուկոզը:

Ածխաջրերը ներգրավված են հիբրիդային մոլեկուլների՝ գլիկոպրոտեինների, գլիկոլիպիդների կազմում:

Ածխաջրերի դասակարգման հիմքում դրանց կառուցվածքային առանձնահատկություններն են: Ածխաջրերը բաժանվում են մոնոսախարիդների, օլիգոսախարիդների, պոլիսախարիդների:

Մոնոսախարիդներ

Մոնոսախարիդները $(CH_2O)_n$ կամ պարզ շաքարները մեկ կառուցվածքային միավոր են, պարունակում են ալդեհիդային կամ կետոնային խումբ և մի քանի սպիրտային հիդրօքսիլ խմբեր: Եթե կարբոնիլային խումբը միացած է շղթայի առաջնային ածխածնին, մոնոսախարիդը ալդեհիդ է և անվանվում է ալդոզ, մյուս դեպքերում մոնոսախարիդը կետոն է և անվանվում է կետոզ: Մոնոսախարիդները սովորաբար պարունակում են ածխածնի 3-9 ատոմ, ավելի տարածված են պենտոզները և հեքսոզները: Բոլոր մոնոսախարիդներին հատուկ է ածխածնի վերջին անհամաչափ ատոմի OH-խմբի տեղակայմամբ պայմանավորված օպտիկական իզոմերիան: Ունենալով անհամաչափ կենտրոն՝ մոնոսախարիդը հանդես է գալիս երկու տարբեր փոխդասավորությամբ՝ էնանտիոմեր զույգերով (D և L ձևեր): Կենդանի օրգանիզմներում մոնոսախարիդները հանդիպում են գերազանցապես D-ձևով՝ բացառությամբ բակտերիային L-արաբինոզի, բուսական L - ռամնոզի, L - սորբոզի: Բյուրեղային վիճակում մոնոսախարիդները գտնվում են ցիկլիկ պիրանոզային կամ ֆուրանոզային ձևով, որպես կանոն ներկայացված են պիրանոզային մեկ ձևով (α կամ β), լուծույթում՝ տաուտոմերային խառնուրդի ձևով: Խառնուրդում գերակշռում են ցիկլիկ պիրանոզային ձևերը (թերմոդինամիկ առումով ավելի կայուն են), իսկ ացիկլիկ ձևերը ներկայացված են հետքային քանակություններով:



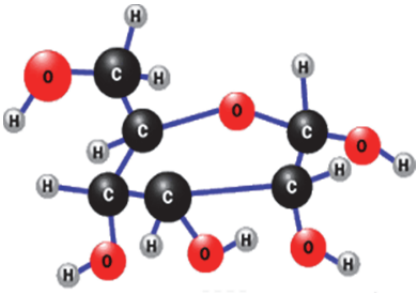
α - D գլյուկոզ կիսաացետալային (գլիկոզիդային) հիդրօքսիլ β - D գլյուկոզ

Գլյուկոզի տարածական ձևերը

Մոնոսախարիդների հիդրօքսիլ խմբերը (առաջնային, երկրորդային) և կիսաացետալային խումբն օժտված են տարբեր ռեակցիոն ունակությու-

ներով: Առավել բարձր ռեակցիոն ունակություն ունի կիսաացետալային խումբը, որի օքսիդացման արդյունքում առաջանում են ոնաաթթուներ:

Կիսաացետալային խմբի և մեթիլ սպիրտի փոխազդեցության արդյունքում առաջանում են O-գլիկոզիդներ: Ավելի հեշտ է ընթանում մոնոսախարիդների և ամինների փոխազդեցությունը. արդյունքում առաջանում են կենսաբանական ակտիվ միացություններ N-գլիկոզիդներ, օրինակ՝ նուկլեոզիդներ: Մոնոսախարիդների առաջնային հիդրօքսիլ խմբի ռեակցիոն ունակությունն ավելի բարձր է, քան երկրորդային հիդրօքսիլ խմբինը: Առաջնային հիդրօքսիլ խմբի օքսիդացման արդյունքում առաջանում են ուրոնաթթուներ:



Նկ. 2.1. Գլյուկոզի քիմիական կառուցվածքը:

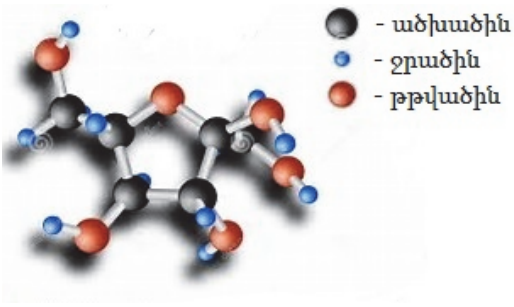
Բնության մեջ լայն տարածվածություն ունեցող մոնոսախարիդներն են՝ D - գլյուկոզը (ալդոհեքսոզ)՝ խաղողի շաքարը (նկ. 2.1), որն ազատ վիճակում պարունակվում է հատապտուղներում, մրգերում (խաղողում՝ մինչև 8%, սալորում՝ 5-6%): Գլյուկոզի մոլեկուլներից են կազմված օլիգոսախարիդներ մալթոզը, սախարոզը, լակտոզը, պոլիսախարիդներ օսլան, գլիկոգենը:

D - ֆրուկտոզը (կետոհեքսոզ) (նկ. 2.2)՝ պտղային շաքարը, պարունակվում է մեղրում (մինչև 37%), խաղողում (մինչև 7,7%), խնձորում (մինչև 5,5%), սախարոզի բաղադրիչն է:

D - գալակտոզը (ալդոհեքսոզ)՝ կաթնային շաքարը, պարունակվում է կաթնասունների կաթում, սերմերում, բուսական բջիջներում, լակտոզի բաղադրիչն է:

D - արաբինոզը (ալդոպենտոզ) պարունակվում է փշատերև բույսերում, ճակնդեղում, հայտնաբերված է բույսերի պեկտինային նյութերի կազմում, հեմիթաղանթանյութում, գլիկոպրոտեիններում:

D - քսիլոզը (ալդոպենտոզ)՝ փայտային շաքարը, պարունակվում է բամբակի թեփում, եգիպտացորենի ցողունում:



Նկ. 2.2. Ֆրուկտոզի քիմիական կառուցվածքը:

Մոնոսախարիդների շարքում հատուկ տեղ է զբաղեցնում D - ռի-

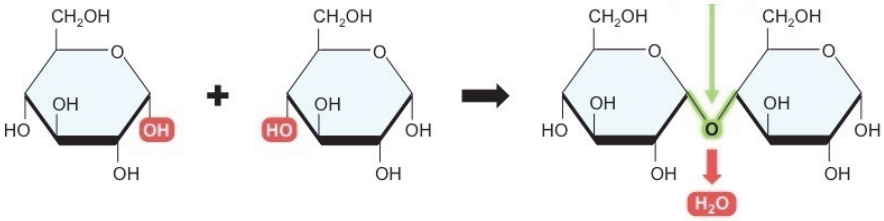
բոզը: Ինչո՞ւ է բնությունը բոլոր շաքարներից ընտրել հատկապես այս մոնոսախարիդը, պարզ չէ, սակայն ռիբոզն է ժառանգական տեղեկատվության փոխանցման համար պատասխանատու կենսաբանական ակտիվ միացությունների՝ ռիբոնուկլեինաթթվի, նաև ԱԵՖ-ի և ԱԿՖ-ի, ՆԱԴ-ի բաղադրիչը:

Բնության մեջ լայն տարածվածություն ունեն մոնոսախարիդների ածանցյալները՝ մոնոսախարիդային հիմք ունեցող միացությունները, որոնց մեկ կամ մի քանի հիդրօքսիլ խմբեր տեղակալված են գործառութային այլ միավորներով:

- Դեզօքսիշաքարներ – մեկ կամ մի քանի OH խմբեր տեղակալված են H ատոմով: Բազմաթիվ մոնո և դի-դեզօքսիշաքարներ մտնում են հակաբիոտիկների կազմի մեջ:
- Ամինաշաքարներ – մեկ կամ մի քանի OH խմբեր տեղակալված են ամինախմբերով (գլյուկոզամին, գալակտոզամին): Հազվադեպ են հանդիպում ազատ ձևով, հաճախ ձևավորում են տարբեր պոլիսախարիդների մոնոմերային օղակներ: Ամինաշաքարներով հատկապես հարուստ են տարբեր ամինաշաքարային հակաբիոտիկներ (օրինակ՝ կանամիցինը) սինթեզող *Streptomyces* ընտանիքի բորբոսասնկերը:
- Ուրոնաթթուներ – ալդոզների առաջնային հիդրօքսիլ խմբի օքսիդացման արգասիքներ են: D - գլյուկոզի օքսիդացման հետևանքով առաջացած գլյուկուրոնաթթուն առկա է շարակցական հյուսվածքի քսիլանների, կամեղիների, արյան գլիկոպրոտեիների կազմում: Գալակտոզից առաջացած գալակտուրոնաթթուն պեկտինային նյութերի մոնոմերն է:
- O - և N - գլիկոզիդներ – մոնոշաքարների կիսաացետալային հիդրօքսիլն օժտված է մեծ ռեակցիոն ունակությամբ և սպիրտների, ֆենոլների, կարբոնաթթուների, ամինների հետ փոխազդելիս տեղակալվում է այլ խմբերով՝ առաջացնելով գլիկոզիդներ: Բնական O - գլիկոզիդները հիմնականում β - ձևի են: N - գլիկոզիդների մոլեկուլի գլիկոզիդային մասը միացած է ոչ ածխաջրային ռադիկալին ազոտի ատոմով: Գլյուկոզամինը (2-ամինագլյուկոզ) սինթեզվում է հոդերի աճառային հյուսվածքում:

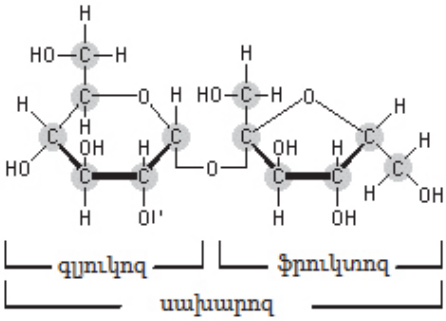
Օլիգոսախարիդներ

Օլիգոսախարիդները 2-10 մոնոսախարիդային մնացորդներից բաղկացած միացություններ են:



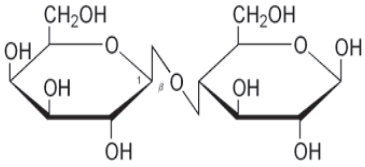
մոնոսախարիդներ դիսախարիդ մալթոզ

Ավելի տարածված են դիսախարիդներ սախարոզը, մալթոզը, լակտոզը, իզոմալթուլոզը, լակտուլոզը: Այն դիսախարիդները (օլիգոսախարիդները), որոնք ունեն ազատ կիսաացետալային հիդրօքսիլ խումբ անվանվում են վերականգնող դիսախարիդներ (օլիգոսախարիդներ):



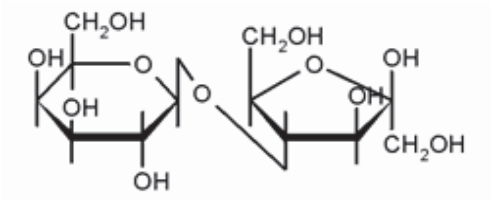
Սախարոզը (α-D-գլյուկոպիրանոզիլ-1,2-β-D-ֆրուկտոֆուրանոզիդ) ամենատարածված դիսախարիդն է, հայտնի է որպես կերակրի շաքար: Սախարոզը, ի տարբերություն շատ դիսախարիդների, օժվտած չէ վերականգնող հատկություններով:

Լակտոզը (β-D-գալակտոպիրանոզիլ-1,4-α-D-գլյուկոպիրանոզ) կաթի հիմնական դիսախարիդն է:



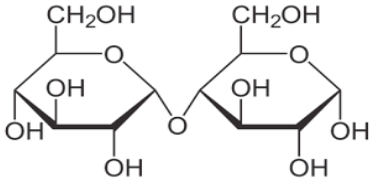
լակտոզ

Լակտուլոզը (β-D-գալակտոպիրանոզիլ-1,4-α-D-ֆրուկտոֆուրանոզ) ոչ բնական դիսախարիդ է, լակտոզի սինթետիկ ստերեոիզոմերը: Կիրառվում է որպես դեղամիջոց:



լակտուլոզ

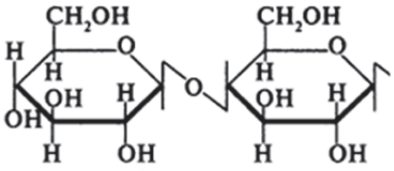
Մալթոզը (α-D-գլյուկոպիրանոզիլ-1,4-α-D-գլյուկոպիրանոզ) օսլայի մասնակի հիդրոլիզի արգասիքն է: Ավելի քիչ քաղցրություն ունի քան եղեգնաշաքարը, շաքարի ճակնդեղը:



մալթոզ

Իզոմալթոզը (α-D-գլյուկոպիրանոզիլ-1,6-α-D-գլյուկոպիրանոզ) բնության մեջ հանդիպում է մեղրի (0,7-1%), եղեգնաշաքարի բաղադրության մեջ, ունի ցածր գլիկեմիկ ինդեքս (30):

Լակտուլոզ և իզոմալթոզ դիսախարիդները լայնորեն կիրառվում են որպես սննդային հավելումներ: Կարող են առողջության վրա բարենպաստ ազդեցություն դրսևորել մեկ կամ մի քանի տեսակի բակտերիաների ակտիվության և աճի խթանման միջոցով:



ցելոբիոզ

Ցելոբիոզը (β-D-գլյուկոպիրանոզիլ-1,4-β-D-գլյուկոպիրանոզ) թաղանթանյութի կառուցվածքային բաղադրիչն է:

Ռաֆինոզը բնական եռսախարիդ է (կազմված է ֆրուկտոզից, գլյուկոզից, գալակտոզից), մեծ քանակությամբ հայտնաբերված է շաքարի ճակնդեղում:

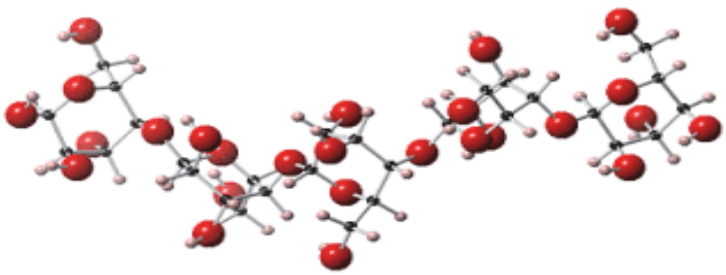
Բուսական օլիգոսախարիդներն ավելի բազմազան են, քան կենդանական հյուսվածքների օլիգոսախարիդները:

Պոլիսախարիդներ

Պոլիսախարիդները մոնոսախարիդների պոլիկոնդենսացման բարձրամոլեկուլային արգասիքներ են: Պոլիսախարիդները տարբերվում են մոնոսախարիդային կազմով, մոլեկուլային զանգվածով և կառուցվածքային առանձնահատկություններով: Միևնույն մոնոսախարիդներից բաղկացած պոլիսախարիդները հոմոպոլիսախարիդներ են, իսկ տարբեր մոնոմերներից բաղկացած պոլիսախարիդները՝ հետերոպոլիսախարիդներ:

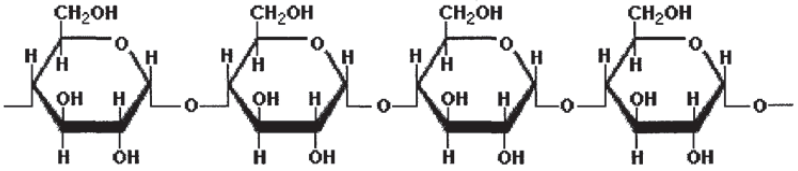
Պոլիսախարիդները բաժանվում են երկու հիմնական խմբի. կառուցվածքային պոլիսախարիդներ (թաղանթանյութ) և պաշարային պոլիսախարիդներ (գլիկոգեն, օսլա):

Օսլան $(C_6H_{10}O_5)n$ բույսերի հիմնական հոմոպոլիսախարիդն է: Օսլայի մոլեկուլային զանգվածը 10^5-10^7 Դա է, բաղկացած է ամիլոզից (10-30%) և ամիլոպեկտինից (70-90%), մոնոմերն է α-D-գլյուկոպիրանոզը (նկ. 2.3) :



Նկ. 2.3. Օսլայի պարուրաձև կառուցվածքը:

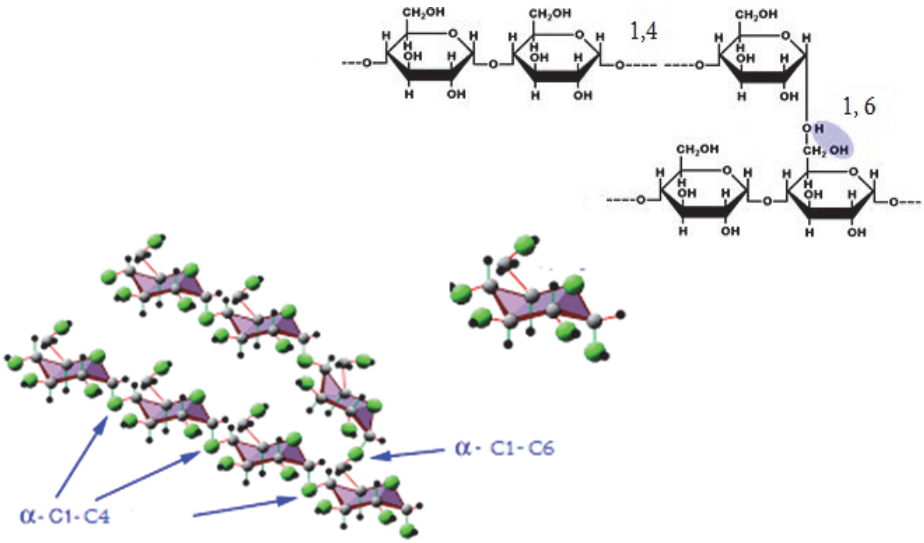
Ամիլոզը գծային պոլիսախարիդ է, կազմված α-1,4 գլիկոզիդային կապերով միացած մոտ 1000 գլյուկոզի մնացորդներից: Ամիլոզի մոլեկուլային զանգվածը տատանվում է 1,5-5 x 10^5 Դա՝ կախված բույսի տեսակից:



ամիլոզի α -1,4 գլիկոզիդային կապերը

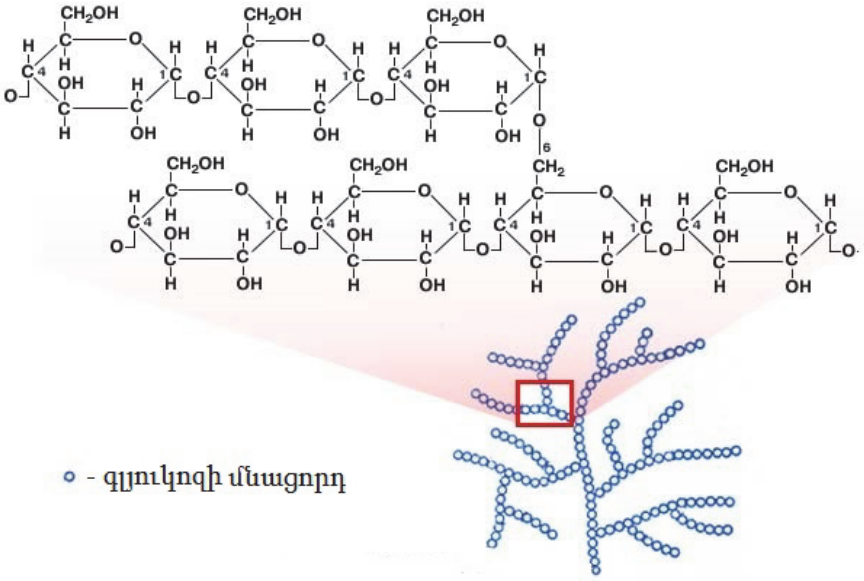
Ամիլոպեկտինը ճյուղավորված պոլիսախարիդ է, որի գծային շղթայում գլյուկոզի մնացորդները միացած են α-1,4, իսկ ճյուղավորման հատվածնե-

րում՝ α-1,6 գլիկոզիդային կապերով (նկ. 2.4): Ամիլոպեկտինի մոլեկուլում գծային հատվածները կազմված են 20-30 գլյուկոզի մնացորդներից:



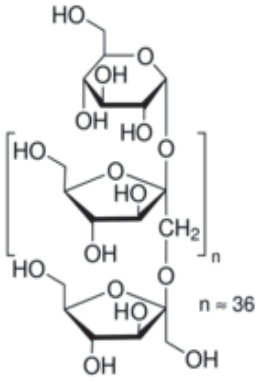
Նկ. 2.4. Ամիլոպեկտինի կառուցվածքը, α - 1,4, α - 1,6 գլիկոզիդային կապերը:

Գլիկոգենը $(C_6H_{10}O_5)_n$ կարևոր կենդանական պաշարային պոլիսախարիդ է՝ բաղկացած D-գլյուկոզի մնացորդներից (նկ. 2.5): Պարունակվում է կենդանիների և մարդու գրեթե բոլոր օրգաններում և հյուսվածքներում, առավելագույնս հայտնաբերված է լյարդում և մկաններում: Մոլեկուլային զանգվածը 10^5-10^8 Դա է: Գծային շղթայում գլյուկոզի մնացորդները միացած են α-1,4, ճյուղավորման հատվածներում՝ α-1,6-գլիկոզիդային կապերով: Կառուցվածքով նման է ամիլոպեկտինին, գծային հատվածները կազմված են 11-18 α-D-գլյուկոպիրանոզներից:



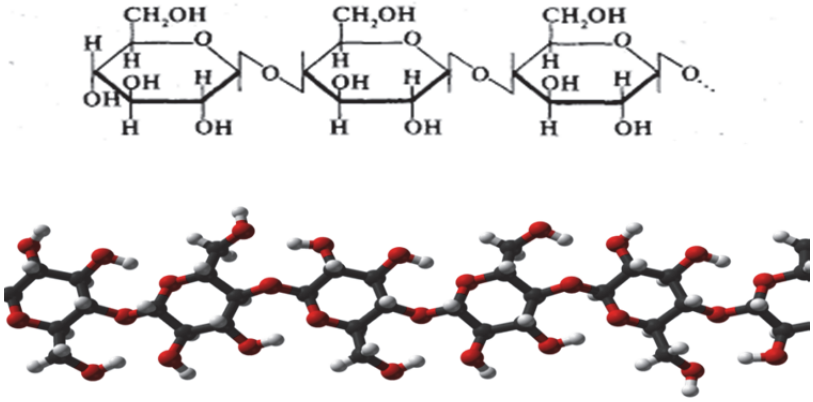
Նկ. 2.5. Գլիկոգեն, α-1,4 և α-1,6 գլիկոզիդային կապերը:

Ինուլին պոլիսախարիդի մոնոմերը ֆրուկտոզն է, որի հիդրոլիզի արդյունքում անջատվում են ֆրուկտոզի մնացորդներ (պոլիմերացման աստիճանը մոտ 35 ֆրուկտոզի մնացորդ է): Հանդիպում է գեորգինների, խատուտիկի, կանկարի արմատներում և պալարներում: Կիրառվում է երիկամների որոշ ֆիզիոլոգիական հետազոտությունների ժամանակ:



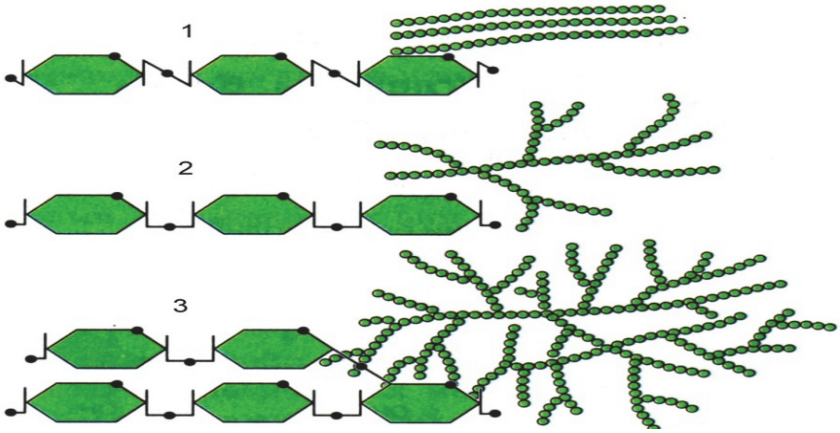
ինուլին

Թաղանթանյութը կառուցվածքային պոլիսախարիդ է, լայն տարածվածություն ունի բուսական աշխարհում. բոլոր բուսական բջիջների կառուցվածքային բաղադրիչն է (նկ. 2.6): Այս մակրոմոլեկուլի մոնոմերային օղակն է ցելոբիոզի մնացորդը: Թաղանթանյութի պոլիսախարիդային շղթան բաղկացած է β-1,4 գլիկոզիդային կապերով միացած β-D-գլյուկոպիրանոզներից:



Նկ. 2.6. Թաղանթանյութի կառուցվածքը:

Թաղանթանյութը չի լուծվում ջրում և այլ լուծիչներում: Լայն կիրառություն ունի արտադրության տարբեր ոլորտներում:



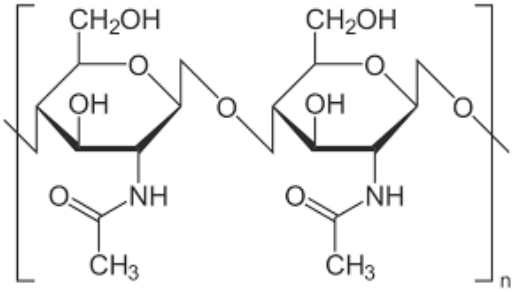
Նկ. 2.7. Հոմոպոլիսախարիդներ:
1 - թաղանթանյութ, 2 - օսլա, 3 - գլիկոգեն:

Շատ օրգանիզմների բջջաթաղանթի կառուցվածքային բաղադրիչ են ոչ թե թաղանթանյութը կամ խիտինը, այլ, օրինակ, հոմոգլիկան մաննանը, գլյուկանը (դեքստրան):

Դեքստրանը բակտերիային ծագման պոլիսախարիդ է, կազմված է շղթայում α-1,6-գլիկոզիդային կապերով միացած գլյուկոզի մնացորդներից, ճյուղավորման հատվածներում՝ 1,3 կամ 1,4 կապերով միացած գլյուկոզի

մնացորդներից: Բժշկության մեջ կիրառվում է որպես արյան պլազմը փոխարինող պատրաստուկ, կենսաքիմիական հետազոտություններում դեքստրանները՝ սեֆադեքսները, օգտագործվում են հել-քրոմատոգրաֆիայում:

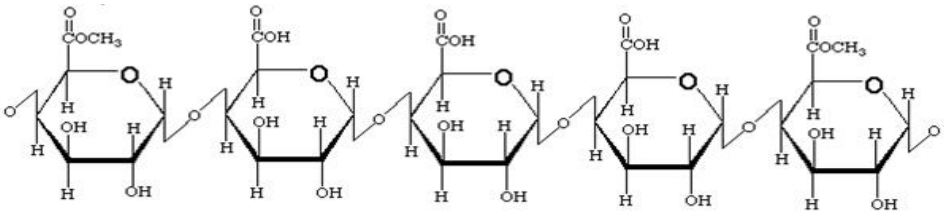
Խիտինը կառուցվածքային պոլիսախարիդ է, կազմված է β-1,4 կապերով միացած N-ացետիլգլյուկոզամինիներից: Խիտինն առկա է անողնաշարավորների արտաքին կմախքի, սնկերի բջջաթաղանթի կազմում, կատարում է մեխանիկական, հենարանային, պաշտպանական գործառույթներ:



N-ացետիլգլյուկոզամինագլիկան (խիտին)

Հեմիթաղանթանյութերը պոլիսախարիդներ են, բույսերի բջջապատի կառուցվածքային բաղադրիչներ: Մակրոմոլեկուլը ճյուղավորված է, կազմված է պենտոզներից (քսիլոզ, արաբինոզ) կամ հեքսոզներից (մանոզ, գալակտոզ, ֆրուկտոզ), պոլիմերացման աստիճանը 50-300 է, մոլեկուլային զանգվածն ավելի փոքր է թաղանթանյութի մոլեկուլային զանգվածից: Կախված կառուցվածքում գերակշռող մոնոսախարիդների կազմից հեմիթաղանթանյութերը բաժանվում են երեք խմբի՝ քսիլաններ, մաննաններ, գալակտաններ: Բույսերում առկա են տարբեր հեմիթաղանթանյութեր, սակայն ավելի տարածված են քսիլանները:

Բազմաթիվ հետազոտողներ հեմիթաղանթանյութի, թաղանթանյութի քայքայման արգասիք են համարում պեկտինային նյութերը՝ բուսական բջջապատի բարձրամոլեկուլային պոլիսախարիդները: Որոշ բույսերում պեկտինային նյութերի պարունակությունը կազմում է 30% (օրինակ՝ ցիտրուսների կեղևի սպիտակ հատվածում): Պեկտինային նյութերը դասակարգվում են ըստ մոնոմերների կառուցվածքի և պոլիմերացման աստիճանի: Պեկտինային նյութերն են պեկտաթթուն, պեկտինները, պեկտատները՝ պեկտաթթվի աղերը, պրոտոպեկտինները:



պեկտինի մեթիլացված մոնոմերները

Բույսերում այդ միացությունները հիմնականում ներկայացված են պեկտինների նախանյութ՝ անլուծելի պրոտոպեկտինների ձևով, հանդիպում են ինչպես բույսերի կանաչ, այնպես էլ ոչ քլորոֆիլային օրգաններում, իրականացնում են կառուցվածքային, իոնափոխանակային գործառույթներ, կարգավորում են ջրային փոխանակությունը, մասնակցում բուսական բջիջների աճի գործընթացին: Պեկտինային նյութերի բնական իոնափոխանակային կարողությունը պայմանավորում է այս միացությունների օրգանիզմից քսենոբիոտիկների (ռադիոնուկլիդների, ծանր մետաղների) դուրսբերման ունակությունը: Պեկտինային նյութերի հիմքում α-1,4 գլիկոզիդային կապերով միացած D - գալակտուրոնաթթվային մնացորդներից կազմված մոլեկուլային շղթան է: Քիմիական առումով նյութերը ներառում են երեք կառուցվածքային միավոր՝ գալակտան, պեկտին, արաբինան:

Կարագինանները սուլֆատացված գալակտոզներից կազմված շղթայական պոլիսախարիդներ են: Կարմիր ջրիմուռներից անջատված այս բնական խտանյութերը լայնորեն կիրառվում են սննդի արդյունաբերությունում:

Կառուցվածքային հետերոպոլիսախարիդներ

Երկու կամ ավելի տարբեր մոնոմերային միավորներ պարունակող շաքարներն անվանում են հետերոպոլիսախարիդներ:

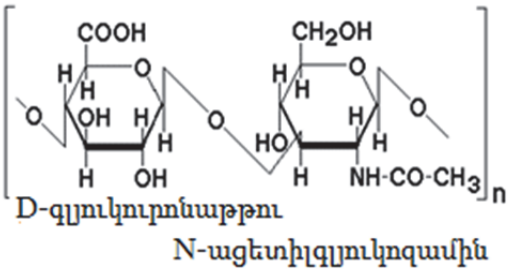
Կամեդին (գումմի) գլյուկոզ, գալակտոզ, արաբինոզ, ռամնոզ մոնոսախարիդներից բաղկացած բուսական հետերոպոլիսախարիդ է: Պոլիմերի գլխավոր շղթան թաղանթանյութի մոլեկուլ է նմանեցնում, ճյուղավորումները ներկայացված են գլյուկոզի, մանոզի, գլյուկուրոնաթթվի մոլեկուլների մնացորդներով, ացետիլային, պիրուվատային խմբերով: Կամեդինները կեղևի մեխանիկական վնասվածքների հետևանքով արտազատված հյութի հիմնական բաղադրիչն են, ունեն պաշտպանական նշանակություն:

Կառուցվածքային հետերոպոլիսախարիդների դասին են պատկանում թթվային հետերոպոլիսախարիդները (պարունակում են բազմաթիվ թթվային

խմբեր), որոնք անվանվում են նաև գլյուկոզամինագլիկաններ (պարունակում են ամինախմբեր):

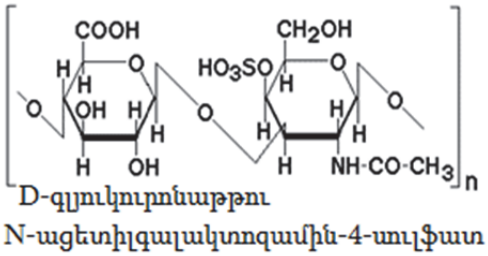
Գլյուկոզամինագլիկաններն օրգանիզմում ներկայացված են պրոտեագլիկանների կազմում: Պրոտեագլիկանները սպիտակուցների մեկ պոլիպեպտիդային շղթայից (5-10%) և գլյուկոզամինագլիկանների չճուղավորված շղթայից (90-95%) կազմված բարձրամոլեկուլային միացություններ են: Գլյուկոզամինագլիկանները լցնում են միջբջջային տարածությունը, միացնում ջրի մոլեկուլներ՝ ապահովելով հյուսվածքների լարվածությունը, աճառների առաձգականությունը: Ներկայումս պարզաբանված են վեց դասի գլյուկոզամինագլիկանների կառուցվածքները:

Հիալուրոնաթթու՝ կազմված է D-գլյուկուրոնաթթվից և N-ացետիլ-D-գլյուկոզամինից: Այս պոլիսախարիդն առկա է շարակցական հյուսվածքում, հոդերի ծուսպահեղուկում, սինթեզվում է տարբեր շտամների բակտերիաներում: Ենթադրվում է, որ հիալուրոնաթթուն նվազեցնում է հոդային մակերեսների շփումը: Մոլեկուլային զանգվածը տատանվում է մի քանի հարյուրից մինչև մի քանի հազար կԴա: Շարակցական հյուսվածքի հիալուրոնաթթվի հիմնական գործառույթը ջրի մոլեկուլ միացնելն է:

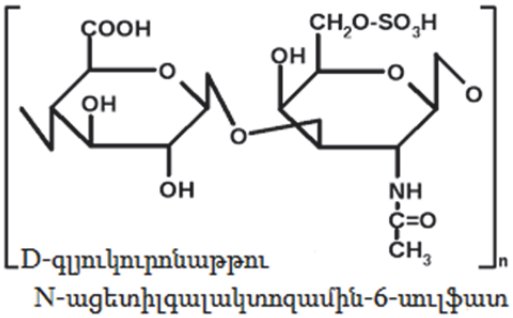


Հիալուրոնաթթվի կրկնվող դիսախարիդային միավորը

Խոնդրոիտինսուլֆատ՝ կազմված է β-1,3 և β-1,4-գլիկոզիդային կապերով միացած D-գլյուկուրոնաթթվի և N-ացետիլ-D-գալակտոզամին-սուլֆատի դիսախարիդային շղթաներից: Կախված N-ացետիլ-D-գալակտոզամին-սուլֆատի մոլեկուլում սուլֆատի մնացորդի տեղակայման դիրքից՝ տարբերում են խոնդրոիտին-4-սուլֆատ (խոնդրոիտին A), խոնդրոիտին-6-սուլֆատ (խոնդրոիտին B) (նկ. 2.8):



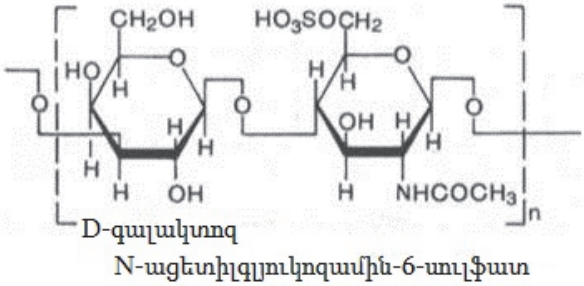
ա) խոնդրոիտին-4-սուլֆատի (A) կրկնվող դիսախարիդային միավորը



բ) խոնդրոիտին-6-սուլֆատի (B) կրկնվող դիսախարիդային միավորը

Նկ. 2.8 Խոնդրոիտին A և խոնդրոիտին B հետերոպոլիսախարիդների կառուցվածքային տարբերությունը:

Կերատանսուլֆատ՝ շարակցական հյուսվածքի հետերոգեն պոլիսախարիդ է, կառուցվածքով նման է խոնդրոիտինսուլֆատին: Հայտնաբերված է աճառային հյուսվածքում, միջողային սկավառակներում: Կազմված է β-1,4, β-1,3 կապերով միացած D-գալակտոզից և N-ացետիլ-D-գլյուկոզամինսուլֆատից:

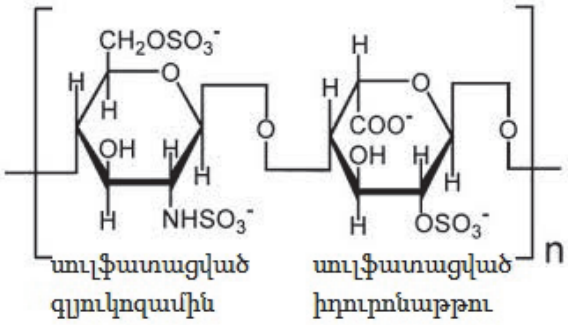


Կերատանսուլֆատի կրկնվող դիսախարիդային միավորը

Կերատանսուլֆատը, ի տարբերություն մյուս գլյուկոզամինագլիկանների, հեքսուրոնաթթվի փոխարեն պարունակում է գալակտոզի մնացորդ: Մեկ շղթայի մոլեկուլային զանգվածը տատանվում է 4-ից մինչև 20 կԴա:

Դերմատանսուլֆատ՝ մաշկի, արյունատար անոթների, սրտային փականների հետերոպոլիսախարիդ է, կազմված է L-իդուրոնաթթվից և N-ացետիլ գալակտոզամին-4-սուլֆատից: Այս գլյուկոզամինագլիկանների կենսաբանական դերը պարզաբանված չէ: Մեկ շղթայի մոլեկուլային զանգվածը տատանվում է 15-ից մինչև 40 կԴա:

Հեպարին՝ կազմված է կրկնվող դիսախարիդային միավորներից՝ գլիկոզիդային կապերով միացած D-գլյուկուրոնաթթվից կամ L-իդուրոնաթթվից և D-գլյուկոզամինից β-(1-4): D-գլյուկոզամինը սուլֆատացված է և ացետիլացված: Դիսախարիդային հատվածները միացած են α-(1-4)-գլիկոզիդային կապերով: Հեպարինը հակամակարդիչ է. մեծ քանակությամբ առկա է թոքերում, լյարդում, մաշկում: Մոլեկուլային զանգվածը 10-20 կԴա է:



Հեպարինի կրկնվող դիսախարիդային միավորը

ԱԾԽԱՋՐԵՐԸ ԲՆՈՒԹԱԳՐՈՂ ՈՐԱԿԱԿԱՆ ՌԵԱԿՑԻԱՆԵՐ

Ածխաջրերի որակական բացահայտումը հիմնված է դրանց քիմիական հատկությունների, առաջին հերթին՝ մոլեկուլում առկա ալդեհիդային կամ կետոնային խմբով պայմանավորված օքսիդավերականգնման հատկությունների վրա: Նման հատկությամբ օժտված են բոլոր մոնոսախարիդները, որոշ դիսախարիդներ (մալթոզ, լակտոզ), ևս հիդրոլիզի ենթարկված պոլիսախարիդները: Մոնոսախարիդներին բնորոշ են ինչպես սպիրտների, այնպես էլ կարբոնիլային միացությունների հատկությունները:

Մոնոսախարիդներին բնորոշ քիմիական ռեակցիաները կարելի է բաժանել երեք տիպերի՝ կարբոնիլային խմբին բնորոշ, հիդրօքսիլ խմբին բնորոշ քիմիական ռեակցիաներ և մոլեկուլի ածխածնային կմախքի փոփոխությունների՝ իզոմերացման հանգեցնող ռեակցիաներ: Չնայած տաուտոմերների խառնուրդում մոնոսախարիդները գտնվում են հիմնականում ցիկլիկ ձևով, որոշ քանակությամբ ացիկլիկ ձևերի առկայությունը թույլ է տալիս դրանց ցուցաբերել ալդոզներին և կետոզներին բնորոշ քիմիական հատկություններ: Մոնոսախարիդների (օրինակ, D-գլյուկոզի) և թիոլների փոխազդեցության հետևանքով առաջանում է D-գլյուկոզի միայն ացիկլիկ ձևով հանդիպող թիոացետալ: Թիոացետալների հետագա ձևափոխությունները, ըստ ազատ հիդրօքսիլ խմբերի, թույլ են տալիս ստանալ ացիկլիկ մոնոսախարիդների մի շարք ածանցյալներ:

Մոնոսախարիդների կարբոնիլային խմբերը թթվածնի, բրոմի կամ այլ օքսիդիչների ազդեցությամբ ենթարկվում են օքսիդացման՝ առաջացնելով ալդոնաթթուներ: Օքսիդացման հետևանքով մոնոսախարիդի կարբոնիլային խումբն օքսիդանում է՝ վերածվելով կարբօքսիլային խմբի, և առաջանում են համապատասխան թթուներ՝ գլյուկոնաթթու, գալակտոնաթթու և այլն:

$$CH_2OH - (CHOH)_4 - CHO \rightarrow CH_2OH - (CHOH)_4 - COOH$$

Ֆոսֆորիլացված D-գլյուկոնաթթուն կարևորվում է որպես ածխաջրերի փոխանակության միջանկյալ արգասիք:

Մոնոսախարիդների առաջնային սպիրտային խմբերի օքսիդացման դեպքում առաջանում են ուրոնաթթուներ՝ գլյուկուրոնաթթու, գալակտուրոնաթթու:

$$CH_2OH - (CHOH)_4 - CHO \rightarrow COOH - (CHOH)_4 - CHO$$

Մոնոսախարիդների կարբոնիլային խմբերի վերականգնման արդյունքում մոնոսախարիդները վերածվում են բազմատոմ սպիրտների՝ շաքարասպիրտների (գլյուկոզ – սորբիտ, մանոզ – մանիտ)՝

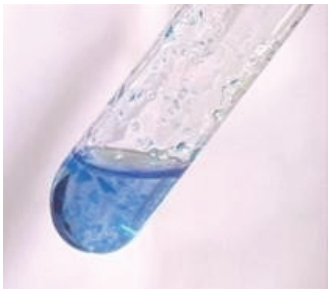
$$CH_2OH – (CHOH)_4 – CHO \rightarrow CH_2OH– (CHOH)_4– CH_2OH$$

Աշխատանք 2.1. Թրոմերի ռեակցիա

Թրոմերի ռեակցիան կիրառվում է վերականգնող մոնոսախարիդների բացահայտման նպատակով: Հիմնային միջավայրում մոնոսախարիդներն օքսիդանալով պղնձի օքսիդը վերականգնում են ենթօքսիդի և վերածվում համապատասխան ալդոնաթթուների: Ալդոզների օքսիդացումը մինչև կարբոնաթթուներ կարելի է ներկայացնել որպես հիդրիդ-իոնների անջատում: Հիդրիդ-իոնի էլեկտրոնը տեղափոխվում է օքսիդացնող պղնձի իոնի վրա, որը վերականգնվում է՝ վերածվելով ենթօքսիդի: Քանի որ մոնոսախարիդները հիմնային միջավայրում անկայուն են, դրանց օքսիդացման արդյունքում առաջանում է օքսիդացման արգասիքների խառնուրդ, այդ թվում՝ ալդոնաթթուների և ածխածնային կմախքի ապակազմավորման արգասիքներ:

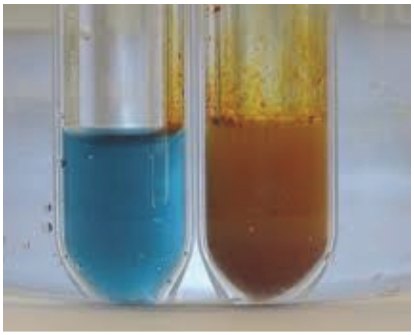
Ալդոզները կետոզներից ավելի հեշտ են օքսիդանում, սակայն հիմնային միջավայրում այդ տարբերությունը գրեթե չի արտահայտվում, քանի որ հիմքի ներկայությամբ ավելի հեշտ է ընթանում տաուտոմերային իզոմերացումը: Չեզոք միջավայրում վերականգնող հատկություններ դրսևորում են միայն ալդոզները:

Թրոմերի ռեակցիան բնորոշ է նաև որոշ դիսախարիդների: Լակտոզի (մալթոզի, ցելոբիոզի) երկու մոնոսախարիդների մնացորդներից մեկը, ունենալով ազատ գլիկոզիդային հիդրօքսիլ, նույնպես կարող է վերականգնել մետաղները: Լակտոզի β-D–գալակտոզի C_1 գլիկոզիդային հիդրօքսիլը միանում է α-D գլյուկոզի C_4 դիրքում գտնվող սպիրտային հիդրօքսիլ խմբին՝ առաջացնելով β-1,4-O-գլիկոզիդային կապ: Դիսախարիդներում, որոնց O-գլիկոզիդային կապն առաջանում է մեկ մոնոսախարիդի գլիկոզիդային OH - խմբի և մյուս մոնոսախարիդի որևէ սպիրտային OH - խմբի միջև, հնարավոր է ցիկլո-օքսո-տաուտոմերիա ազատ ալդեհիդային խմբի առաջացմամբ, ինչն էլ պայմանավորում է դիսախարիդի վերականգնողական հատկությունները: Սախարոզը չի ցուցա-



Նկ. 2.9. Ջրում չլուծվող պղնձի հիդրօքսիդի առաջացումը:

բերում վերականգնողական հատկություն, քանի որ ներմոլեկուլային կապի առաջացմանը մասնակցում են α-D-գլյուկոզի և β-D-ֆրուկտոզի մնացորդների երկու գլիկոզիդային հիդրօքսիլները (գլյուկոզի C_1 և ֆրուկտոզի C_2)՝ առաջացնելով β-1,2-գլիկոզիդային կապ: Այսպիսի դիսախարիդները չվերականգնող դիսախարիդներ են:



1 **2**

Նկ. 2.10. Պղնձի ենթօքսիդի նստվածքի առաջացումը:
1. Թրոմերի ռեակցիայի բացակայություն:
2. Թրոմերի դրական ռեակցիա:

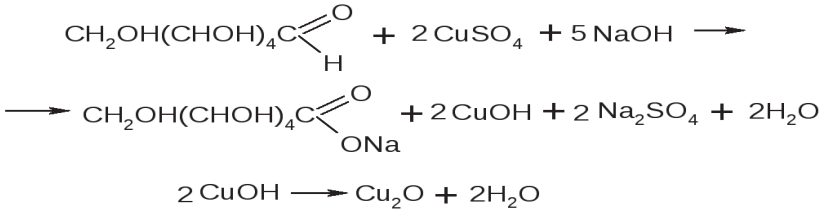
Ռեակտիվներ: Գլյուկոզի, ֆրուկտոզի, մալթոզի, սախարոզի 2% լուծույթներ, NaOH-ի 10% լուծույթ, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$-ի 4% լուծույթ:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, ջրային բաղնիք:

Աշխատանքի ընթացքը.

Փորձանոթների մեջ լցնել 1-ական մլ շաքարների լուծույթներ, ավելացնել 1-ական մլ NaOH, կաթիլներով ավելացնել 0.5 մլ $CuSO_4$ մինչև պղնձի հիդրօքսիդի ($Cu(OH)_2$) նստվածքի (չանհետացող պղտորության) առաջացումը (նկ. 2.9):

Խառնուրդը տաքացնել ջրային բաղնիքում, տաքացման ընթացքում $Cu(OH)_2$ (կապույտ գունավորում) վերականգնվում է CuOH-ի (դեղին գունավորում), այնուհետև վերջինիս քայքայման արդյունքում առաջանում է պղնձի ենթօքսիդի (Cu_2O) նստվածք (աղյուսա-կարմիր գունավորում)՝ Թրոմերի դրական ռեակցիա (նկ. 2.10):



$$CH_2OH(CHOH)_4C(=O)H + 2\,CuSO_4 + 5\,NaOH \longrightarrow$$

$$\longrightarrow CH_2OH(CHOH)_4C(=O)ONa + 2\,CuOH + 2\,Na_2SO_4 + 2H_2O$$

$$2\,CuOH \longrightarrow Cu_2O + 2H_2O$$

Հիմնային միջավայրում ածխաջրի ալդեհիդային խումբն օքսիդանում է $CuS0_4$-ից առաջացած $Cu(OH)_2$-ով: Կետոզների դեպքում (ի տարբերություն ալդոզների) պղնձի ենթօքսիդի կարմիր նստվածք առաջանում է երկարատև տաքացման արդյունքում՝ ի հաշիվ կետոզի էպիմերիզացման:

$CuSO_4$-ի ավելցուկը քողարկում է ռեակցիան, քանի որ պղնձի հիդրօքսիդը՝ $Cu(OH)_2$, կորցնելով ջրի մոլեկուլներ, վերածվում է պղնձի սև օքսիդի (CuO):

$$Cu(OH)_2 \rightarrow CuO\downarrow + H_2O$$

Աշխատանքի արդյունքները գրանցել աղյուսակ 1-ում (աշխ. 2.6)

Աշխատանք 2.2. Ֆելինգի ռեակցիա

Մոնոսախարիդների բացահայտման նպատակով հաճախ օգտագործում են ֆելինգի հեղուկ, որտեղ Cu^{2+} առկա է տարտրատների հետ համալիր միացության ձևով: Ռեակցիայի մեխանիզմը նույնն է, ինչ Թրոմերի ռեակցիայում, սակայն Ֆելինգի ռեակցիան առավելություն ունի. ռեակտիվի ավելցուկի դեպքում պղնձի օքսիդի (CuO) նստվածք չի առաջանում (ռեակցիան չի քողարկվում):

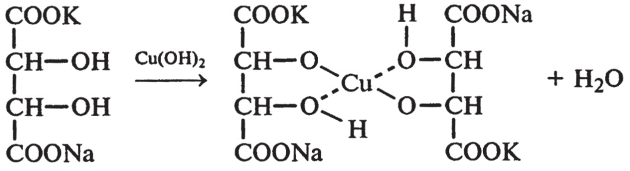
Ռեակտիվներ: Գլյուկոզի, ֆրուկտոզի, մալթոզի, սախարոզի 2% լուծույթներ, Ֆելինգի ռեակտիվ (հեղուկ). 1-ին լուծույթ – 3.46 գ $CuSO_4 \times 5H_2O$ լուծել 50 մլ թորած ջրում, 2-րդ լուծույթ – 17.3 գ սեգնետյան աղը ($KNa(C_4H_4O_6)$) լուծել 20-25 մլ թորած ջրում, ավելացնել 10 մլ NaOH (5 գ NaOH 10 մլ ջրում), ծավալը հասցնել 50 մլ: Աշխատանքից առաջ 1-ին և 2-րդ լուծույթները խառնել հավասար ծավալներով:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, ջրային բաղնիք:

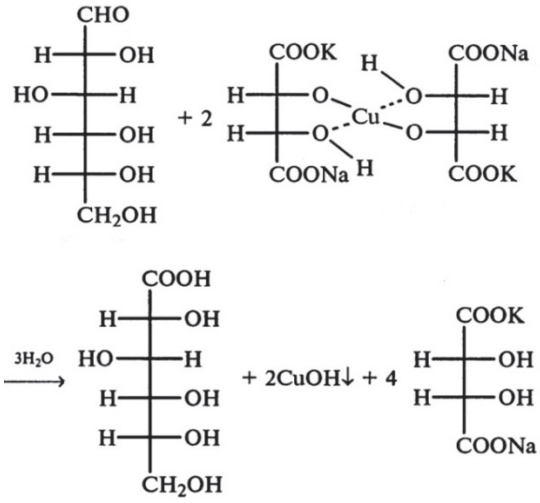
Աշխատանքի ընթացքը.

1-2 մլ շաքարների լուծույթներին ավելացնել հավասար ծավալով ֆելինգի ռեակտիվ, տաքացնել մինչև եռալը: Սկզբնական փուլում առաջանում է $Cu(OH)_2$, որն անմիջապես փոխազդում է $KNa(C_4H_4O_6)$ հետ, առաջացնում սեգնետյան աղի պղնձի գլյուկոլյատ՝ լուծույթին հաղորդելով կապույտ գունավորում:

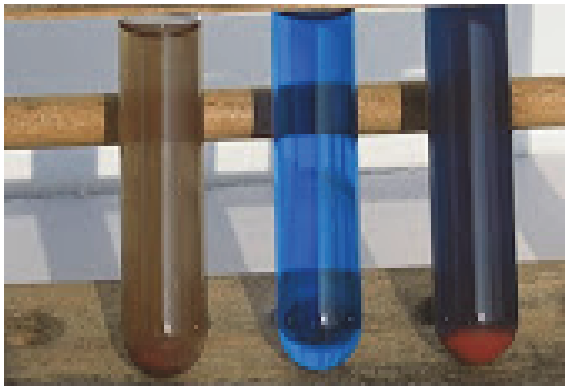
$$CuSO_4 + 2NaOH = Cu(OH)_2\downarrow + Na_2SO_4$$



սեգնետյան աղ **սեգնետյան աղի պղնձի գլյուկոլյատ**



Տաքացման ընթացքում լուծույթի գունավորումը փոփոխվում է. առաջանում է CuOH-ի դեղին գունավորում, որն աստիճանաբար վերածվում է Cu_2O-ի աղյուսակարմիր նստվածքի (նկ. 2.11): Ածխաջուրն օքսիդանում է համապատասխան ալդոնաթթվի:



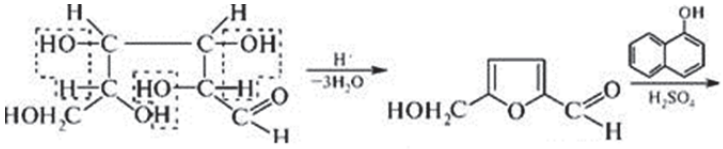
1 2 3

Նկ. 2.11. Ֆելինգի ռեակցիայի արդյունքները:
1. Մոնոսախարիդի օքսիդացման սկզբնական փուլը:
2. Պղնձի աղի և դիսախարիդի համալիրի առաջացումը:
3. Պղնձի ենթօքսիդի առաջացումը:

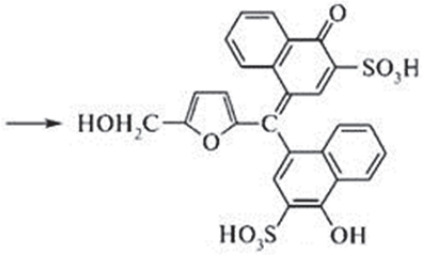
Աշխատանքի արդյունքները գրանցել աղյուսակ 1-ում (աշխ. 2.6):

Աշխատանք 2.3. Պողոբեդով - Մոլիշի ռեակցիա

Ածխաջրերի բացահայտման զգայուն մեթոդ է համարվում դրանց ռեակցիան α-նաֆթոլի (կամ թիմոլի) հետ: Ռեակցիան համընդհանուր է, բնորոշ է ինչպես ջրալույծ, այնպես էլ ջրում չլուծվող ածխաջրերին: Ռեակցիային մասնակցում են օլիգո և պոլիսախարիդների թթվային հիդրոլիզից առաջացած մոնոսախարիդները: Ռեակցիայի ընթացքում մոնոսախարիդները խիտ ծծմբական թթվի առկայությամբ կորցնում են 3 մոլեկուլ ջուր՝ վերածվելով ֆուրֆուրոլի (ալդոպենտոզներից) և հիդրօքսիմեթիլֆուրֆուրոլի (ալդոհեքսոզներից), որոնք կոնդենսացվում են α-նաֆթոլի կամ թիմոլի հետ՝ առաջացնելով համապատասխանաբար կարմրամանուշակագույն կամ կարմիր արգասիք:



գլյուկոզ 5-հիդրօքսիմեթիլֆուրֆուրոլ



կոնդենսացման արգասիք

Ռեակտիվներ: Գլյուկոզի, սախարոզի, մալթոզի 1% լուծույթներ, $C_{10}H_7OH$-ի 0.2% սպիրտային լուծույթ, $C_6H_3CH_3(OH(C_3H_7)$-ի 1% սպիրտային լուծույթ, խիտ H_2SO_4:

Պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Փորձանոթների մեջ լցնել 0.5-ական մլ սախարոզի, գլյուկոզի, մալթոզի լուծույթներ, ավելացնել 1-2 կաթիլ $C_{10}H_7OH$-ի ($C_6H_3CH_3(OH(C_3H_7)$) լուծույթ և զգուշությամբ, առանց թափահարելու, փորձանոթի պատերին սահեցնելով՝ ավելացնել 1-ական մլ H_2SO_4:

N	Թիմոլ (կաթիլ)	α-նաֆթոլ (կաթիլ)	H_2SO_4 (մլ)	Գունավորում
Գլյուկոզ (0,5 մլ)	1-2	–	1	
	–	1-2	1	
Սախարոզ (0,5 մլ)	1-2	–	1	
	–	1-2	1	
Մալթոզ (0,5 մլ)	1-2	–	1	
	–	1-2	1	

Մի քանի րոպեից հեղուկների բաժանման սահմանին առաջանում է կարմրամանուշակագույն օղակ (թիմոլի դեպքում՝ կարմիր օղակ): H_2SO_4-ի ազդեցությամբ ածխաջրերից առաջացած ֆուրֆուրոլը ($C_5H_4O_2$) կամ 5-օքսիմեթիլֆուրֆուրոլը ($C_6H_6O_3$) կոնդենսացվում է երկու մոլեկուլ $C_{10}H_7OH$-ի ($C_6H_3CH_3(OH(C_3H_7)$ հետ՝ առաջացնելով քրոմոգեններ, որոնք H_2SO_4-ի ազդեցությամբ օքսիդանում են՝ վերածվելով գունավոր խինոիդային միացություններ (նկ. 2.12):



Նկ. 2.12. Խինոիդային միացությունների առաջացումը:

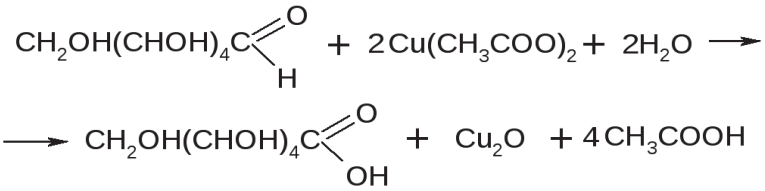
Աշխատանքի արդյունքները գրանցել աղյուսակ 1-ում (աշխ. 2.6)

Աշխատանք 2.4. Բարֆեդի ռեակցիա

Մոնոսախարիդները դիսախարիդներից տարբերակելու նպատակով կիրառվում է Բարֆեդի ռեակցիան: Բարֆեդի ռեակցիան տարբերվում է շաքարների բացահայտման մյուս ռեակցիաներից միջավայրի pH-ի պայմաններով: Բարֆեդի ռեակցիան ընթանում է գրեթե չեզոք միջավայրում, ինչը հնարավորություն է տալիս տարբերակելու դիսախարիդները մոնոսախարիդներից: Դիսախարիդներն այդ պայմաններում չեն օքսիդանում: Դիսախարիդներն օքսիդանում են միայն հիմնային, մոնոսախարիդները՝ նաև չեզոք (թույլ թթվային) միջավայրում: Բարֆեդի ռեակտիվի առկայությամբ ածխաջրերն օքսիդանում են՝ վերականգնելով պղնձի (II) հիդրօքսիդը պղնձի (I) ենթօքսիդի:

Բարֆեդի ռեակտիվը պղնձի ացետատի թթվեցրած լուծույթ է, որը ենթարկվում է հիդրոլիզի՝ առաջացնելով պղնձի (II) հիդրօքսիդ և քացախաթթու: Քանի որ պղնձի ացետատը ջրի հետ թույլ է փոխազդում, Բարֆեդի ռեակցիա-

յի ընթացքում առաջանում է համեմատաբար ավելի քիչ քանակությամբ պղնձի օքսիդի հիդրատ, հետևաբար և պղնձի ենթօքսիդ:



Ռեակտիվներ: Գլյուկոզի, ֆրուկտոզի, մալթոզի, սախարոզի, լակտոզի 2% լուծույթներ, Բարֆեդի ռեակտիվ՝ 1.33 գ պղնձի ացետատը $(CH_3COO)_2Cu$ լուծել 20 մլ տաք ջրում (70°C), լուծույթը զտել, ավելացնել 0.19 մլ սառցային CH_3COOH:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, ջրային բաղնիք:

Աշխատանքի ընթացքը.

Փորձանոթների մեջ լցնել շաքարների 1-ական մլ լուծույթներ, ավելացնել 1-ական մլ Բարֆեդի ռեակտիվ:

Խառնուրդները թափահարել, տաքացնել եռացող ջրային բաղնիքում մինչև աղյուսակարմիր գունավորման առաջացումը (մոնոսախարիդների վերականգնող հատկությունը դրսևորվում է 2-3 րոպեում):

Պետք է խուսափել լուծույթները եռացնելուց, քանի որ թթվային միջավայրում դիսախարիդները կարող են հիդրոլիզվել մոնոսախարիդների, որոնք էլ թթվային միջավայրում կդրսևորեն Բարֆեդի դրական ռեակցիա:

Դիսախարիդներ պարունակող փորձանոթում վերականգնման ռեակցիան կնկատվի 10-15 րոպե անց (թթուների առկայությամբ դիսախարիդները ենթարկվում են հիդրոլիտիկ ճեղքման):

Աշխատանքի արդյունքները գրանցել աղյուսակում:

Հետազոտվող նյութ	Գունավորված նստվածքի առկայություն (+/-)	Գունավորման առաջացման ժամանակ
Գլյուկոզ		
Ֆրուկտոզ		
Սախարոզ		
Մալթոզ		
Լակտոզ		

Աշխատանք 2.5. Նիլանդերի ռեակցիա

Շաքարների վերականգնող հատկությունների բացահայտման նպատակով օգտագործում են նաև բիսմուտի աղերը, որոնք վերականգնվում են մինչև մետաղական բիսմուտ:

$$3\ C_6H_{12}O_6 + 2Bi(OH)_2NO_3 + 5NaOH \rightarrow 3CH_2OH(CHOH)_4COONa + 2Bi\downarrow + 2NaNO_3 + 6H_2O$$

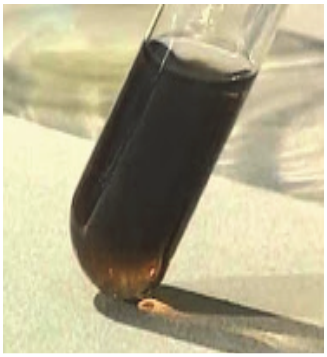
Բիսմուտի աղերը առավել հարմար է կիրառել մեզում շաքարների բացահայտման նպատակով, քանի որ, ի տարբերություն պղնձի աղերի, դրանք միզաթթվով չեն վերականգնվում:

Ռեակտիվներ: Գլյուկոզի, ֆրուկտոզի, սախարոզի, մալթոզի, լակտոզի 2% լուծույթներ, Նիլանդերի ռեակտիվ (1 գ ազոտաթթվային բիսմուտի հիմնային աղին ($Bi(OH)_2(NO_3)$) ավելացնել 1 գ $KNa(C_4H_4O_6)$ և թույլ տաքացնելով՝ լուծել 25 մլ NaOH-ի 10% լուծույթում, զտել, պահել մութ պայմաններում):

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, ջրային բաղնիք:

Աշխատանքի ընթացքը.

Փորձանոթների մեջ լցնել տարբեր ածխաջրերի 2-ական մլ լուծույթներ, ավելացնել 2-ական մլ Նիլանդերի ռեակտիվ: Փորձանոթները տաքացնել ջրային բաղնիքում (եռալուց հետո առնվազն 2 րոպե): Առաջանում է գորշ գունավորում, այնուհետև մետաղական բիսմուտի սև նստվածք (նկ. 2.13), ինչը վկայում է շաքարների վերականգնողական հատկության մասին:



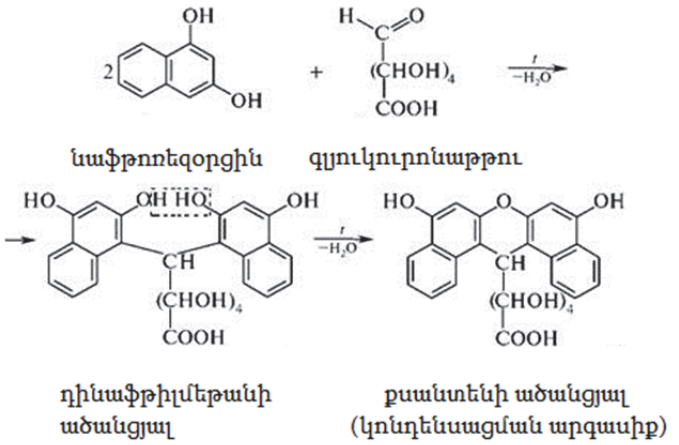
Նկ. 2.13. Մետաղական բիսմուտի առաջացումը:

Արդյունքները գրանցել աղյուսակ 1-ում (աշխ. 2.6):

Աշխատանք 2.6. Ածխաջրերը բնորոշող ընդհանուր ռեակցիաներ

Թոլենսի ռմուշ

Մոնոսախարիդների բացահայտման ռեակցիաներից առավել յուրահատուկ և զգայուն է համարվում Թոլենսի ռեակցիան: Ռեակցիայի առանձնահատկությունը նաֆթոռեզորցինի հետ ռեակցիայի արդյունքում առաջացած կոնդեսացման արգասիքների գունավորման կախվածությունն է ածխաջրի տեսակից: Օրինակ՝ գլյուկոզի, մանոզի, գալակտոզի դեպքում դրսևորվում է կապտականաչավուն գունավորում, ռամնոզի դեպքում՝ մանուշակագույն, արաբինոզի և քսիլոզի դեպքում՝ մուգ կապույտ գունավորում: Հաճախ այս ռեակցիան կիրառվում է ուրոնաթթուների բացահայտման նպատակով. ֆրակցիան ստանում է մանուշակագույն գունավորում:



Ռեակտիվներ: Գլյուկոզի, գալակտոզի, ռամնոզի, քսիլոզի 2 % լուծույթներ, նաֆթոռեզորցինի՝ 1.3-դիհիդրօքսինաֆթալինի ($C_{10}H_8O_2$) 1% սպիրտային լուծույթ, խիտ HCl, եթեր:

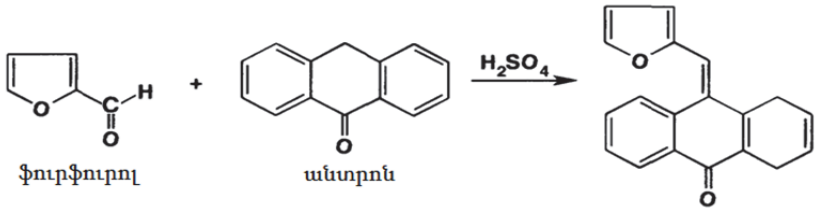
Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, ջրային բաղնիք:

Աշխատանքի ընթացքը.

Փորձանոթների մեջ լցնել տարբեր ածխաջրերի 3-ական մլ լուծույթներ, ավելացնել 0.5-ական մլ $C_{10}H_8O_2$ սպիրտային լուծույթ և նույն ծավալով HCl: Խառնուրդները զգուշորեն տաքացնել մինչև եռալը, տաքացումը շարունակել 1 րոպե: Փորձանոթները սառեցնել, բոլոր լուծույթներին ավելացնել 1-2-ական մլ եթեր, խառնուրդները թափահարել, գրանցել եթերային շերտերի գունավորման տարբերությունները:

Անտրոնի ռմուշ

Անտրոնի ռեակցիան բնորոշ է բոլոր վերականգնող ածխաջրերին: Խիտ ծծմբական թթվի ներկայությամբ մոնոսախարիդները վերածվում են ֆուրֆուրոլի (օքսիմեթիլֆուրֆուրոլի), որոնք անտրոնի հետ փոխազդելիս առաջացնում են կանաչ, երկնագույն կամ կապույտ գունավորմամբ քսանտենային տիպի կոնդենսացման արգասիքներ: Կոնդենսացումը տեղի է ունենում ֆուրֆուրոլի (օքսիմեթիլֆուրֆուրոլի) ալդեհիդային և անտրոնի ակտիվ մեթիլենային խմբերի հաշվին:



կոնդենսացման արգասիք

Ռեակտիվներ: Գլյուկոզի, ֆրուկտոզի կամ քսիլոզի 0.5% լուծույթներ, անտրոնային ռեակտիվ (0.1 գ անտրոնը լուծել 50 մլ խիտ H_2SO_4-ի լուծույթում, լուծույթը թողնել 4 ժամ մութ պայմաններում):

Պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ:

Աշխատանքի ընթացքը.

4-5 կաթիլ հեքսոզների լուծույթին ավելացնել 1-2 մլ անտրոնային ռեակտիվ, փորձանոթները թողնել 30 րոպե (սենյակային ջերմաստիճանի պայմաններում): Առաջանում են կոնդենսացման արգասիքներ:

Արդյունքները գրանցել աղյուսակ 1-ում:

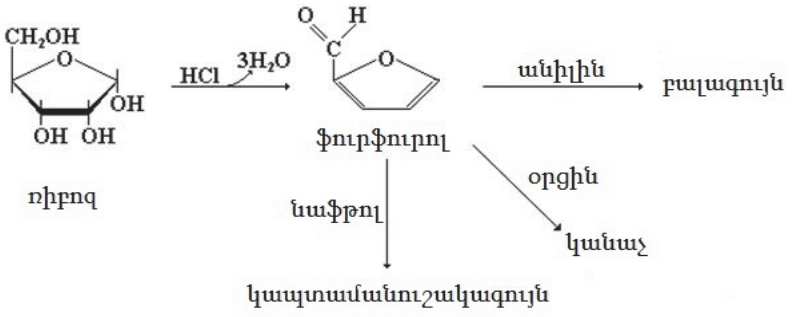
Աղյուսակ 1 Ածխաջրերի բացահայտման ռեակցիաների արդյունքները

Ռեակցիա	Գլյուկոզ	Ֆրուկտոզ	Սախարոզ	Մալթոզ	Լակտոզ	Ռամնոզ	Քսիլոզ
Թրոմերի							
Ֆելինգի							
Պոդոբեդով-Մոլիշի							
Բարֆեդի							
Նիլանդերի							
Թոլենսի ռմուշ							
Անտրոնի ռմուշ							

Աշխատանք 2.7. Պենտոզների բացահայտման ռեակցիա

Խիտ ծծմբական թթվի կամ աղաթթվի հետ տաքացնելիս պենտոզները կորցնում են երեք մոլեկուլ ջուր և վերափոխվում ֆուրֆուրոլի:

Վերջինս երկաթի քլորիդի (III) ներկայությամբ կոնդենսանում է α-նաֆթոլի, անիլինի կամ օրցինի հետ՝ առաջացնելով համապատասխանաբար կարմիր, կապույտ, կանաչ արգասիքներ:

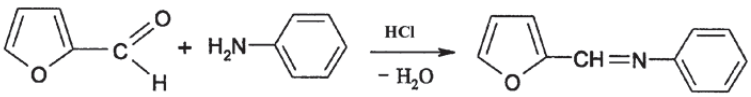


Ռեակտիվներ: Ռիբոզի, քսիլոզի 2% լուծույթներ, խիտ HCl, խիտ H_2SO_4, անիլին ($C_6H_5NH_2$), $C_{10}H_7OH$-ի 1% սպիրտային լուծույթ, օրցինի ռեակտիվ. 10 մգ $FeCl_3$ x $6H_2O$ լուծել 50 մլ HCl-ում, փորձնական աշխատանքից առաջ այդ լուծույթի անհրաժեշտ քանակին ավելացնել օրցին ($CH_3C_6H_3(OH)_2$) 4,76 մգ/մլ հարաբերությամբ:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, ջրային բաղնիք:

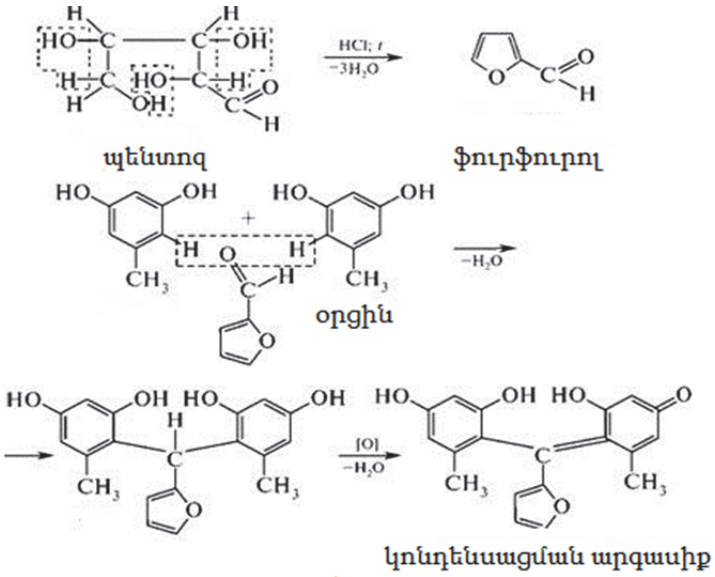
Աշխատանքի ընթացքը.

1 մլ ռիբոզի (քսիլոզի) լուծույթին ավելացնել 1 մլ HCl, խառնուրդը եռացնել ջրային բաղնիքում: $C_6H_5NH_2$-ի լուծույթում թրջած ֆիլտրի թղթի ժապավենը պահել գոլորշու վրա: Գրանցել ֆիլտրի թղթի գունավորումը (կարմիր):

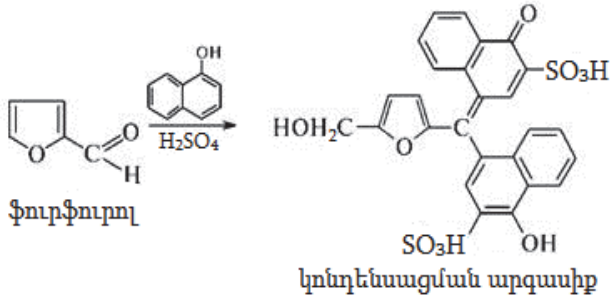


ֆուրֆուրոլ անիլին կոնդեսացման արգասիք

1 մլ ռիբոզի (քսիլոզի) լուծույթին ավելացնել 1 մլ $CH_3C_6H_3(OH)_2$-ի ռեակտիվ, խառնուրդը տաքացնել եռացող ջրային բաղնիքում 20 րոպե, առաջանում է կապտականաչ գունավորում:



1 մլ ռիբոզի (քսիլոզի) լուծույթին ավելացնել 3 մլ $C_{10}H_7OH$-ի լուծույթ: Փորձանոթի պատին զգուշորեն սահեցնել 1 մլ H_2SO_4: Երկու հեղուկների սահմանին առաջանում է կապտամանուշակագույն օղակ, հեքսոզներն առաջացնում են դեղնականաչ գունավորում:



Աշխատանքի արդյունքները գրանցել աղյուսակ 2-ում (աշխ. 2.11):

Աշխատանք 2.8. Դեզօքսիպենտոզների բացահայտման ռեակցիա

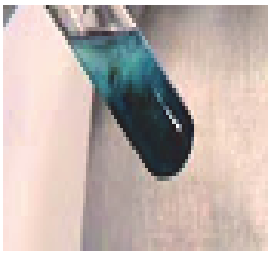
Դեզօքսիպենտոզները բթվի հետ տաքացնելիս առաջացնում են ֆուրֆուրիլային սպիրտ և քրոմոգեններ, որոնք, կոնդենսացվելով արոմատիկ ամիների, մասնավորապես դիֆենիլամինի հետ, առաջացնում են կապույտ գունավորում ունեցող միացություններ:

Ռեակտիվներ: Դեզօքսիռիբոզի ($C_5H_{10}O_4$) 2% լուծույթ, դիֆենիլամինի ($C_6H_5NHC_6H_5$) 1% լուծույթ:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, ջրային բաղնիք:

Աշխատանքի ընթացքը.

1 մլ $C_5H_{10}O_4$-ի լուծույթին ավելացնել 2 մլ ($C_6H_5NHC_6H_5$)-ի լուծույթ: Խառնուրդը եռացնել ջրային բաղնիքում 10 րոպե և գրանցել ստացված գունավորումը (նկ. 2.14):

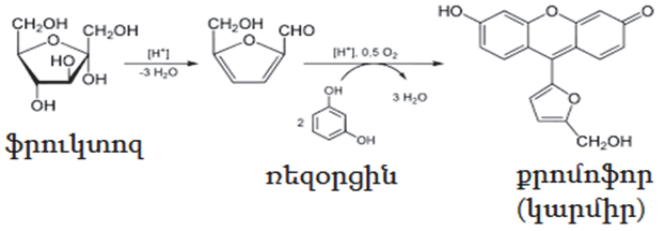


Նկ. 2.14. Դեզօքսիպենտոզների բացահայտումը:

Աշխատանքի արդյունքները գրանցել աղյուսակ 2-ում (աշխ. 2.11):

Աշխատանք 2.9. Կետոզների բացահայտման ռեակցիա

Ալդոզները թույլ թթվային միջավայրում տաքացնելիս ֆուրֆուրոլներ գրեթե չեն առաջացնում (1-2%), սակայն կետոզների դեպքում առաջանում է մինչև 20% ֆուրֆուրոլ կամ օքսիմեթիլֆուրֆուրոլ: Ֆրուկտոզից աղաթթվի ազդեցությամբ անջատվում է երեք մոլեկուլ ջուր, և առաջանում է օքսիմեթիլֆուրֆուրոլ (ավելի հեշտ, քան գլյուկոզից): Ռեակցիան հնարավորություն է տալիս բացահայտելու կետոհեքսոզները:



ֆրուկտոզ ռեզօրցին քրոմոֆոր (կարմիր)



Նկ.2.15. Կետոզների բացահայտումը:

Ռեակտիվներ: Գլյուկոզի, ֆրուկտոզի, սախարոզի, մալթոզի 2% լուծույթներ, HCl-ի 19% լուծույթ, ռեզօրցինի ($C_6H_4(OH)_2$) փոշի:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, ջրային բաղնիք:

Աշխատանքի ընթացքը.

Փորձանոթների մեջ լցնել տարբեր շաքարների 2-ական մլ լուծույթ, շպատելի ծայրով ավելացնել ($C_6H_4(OH)_2$) և 2-ական մլ HCl: Փորձանոթները տաքացնել ջրային բաղնիքում. օքսիմեթիլֆուրֆուրոլ - ռե-

զօրցին համալիրի առաջացման մասին վկայում է լուծույթի կարմիր գունավորումը (նկ. 2.15):

Գունավորման ուժգնությունը ուղիղ համեմատական է լուծույթում կետոզների խտությանը:

Աշխատանքի արդյունքները գրանցել աղյուսակ 2-ում (աշխ. 2.11):

Աշխատանք 2.10. Սախարոզի բացահայտման ռեակցիաներ

Ռեակտիվներ: Սախարոզի 1% լուծույթ, NaOH-ի 10% լուծույթ, $CuSO_4 \times 5H_2O$-ի 5% լուծույթ, HCl-ի 10% լուծույթ, $CoSO_4$-ի 2% լուծույթ:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, ջրային բաղնիք:

Աշխատանքի ընթացքը.

1 մլ ածխաջրի լուծույթին ավելացնել 1-ական մլ NaOH-ի և $CuSO_4$-ի լուծույթներ, տաքացնել ջրային բաղնիքում մինչև եռալը: Առաջանում է CuO-ի սև նստվածք. դիսախարիդ սախարոզի ներկայությամբ $Cu(OH)_2$ չի վերականգնվում, այլ վերածվում է CuO-ի և H_2O-ի:

1 մլ սախարոզի լուծույթին ավելացնել 10 կաթիլ HCl և եռացնել 3 րոպե: Կրկնել մոնոսախարիդների բացահայտման ռեակցիան: Այս դեպքում անջատվում է Cu_2O կարմիր նստվածք, քանի որ սախարոզի հիդրոլիզի հետևանքով անջատվում է վերականգնող հատկություններով օժտված գլյուկոզ:

Սախարոզի առկայությունը լուծույթում կարելի է բացահայտել նաև $CoSO_4$-ի օգնությամբ: Հիմնային միջավայրում սախարոզը $CoSO_4$-ի հետ առաջացնում է մանուշակագույն համալիր միացություն:

Փորձանոթի մեջ լցնել 2 մլ սախարոզ և մի քանի կաթիլ $CoSO_4$, հիմքի լուծույթի ավելցուկի պայմաններում (1մլ) լուծույթը կստանա մանուշակագույն երանգ: Ռեակցիան կատարել նաև լակտոզի, գլյուկոզի լուծույթներում:

Աշխատանքի արդյունքները գրանցել աղյուսակ 2-ում (աշխ. 2.11):

Աշխատանք 2.11. Լակտոզի բացահայտման ռեակցիաներ

Մալֆատիի ռեակցիա

Լակտոզը NaOH-ի և NH_3-ի ներկայությամբ տաքացնելիս առաջացնում է դեղնաևարնջագույն արգասիք:

Ռեակտիվներ: Լակտոզի 1% լուծույթ, NH_3-ի խիտ լուծույթ, NaOH-ի 10% լուծույթ:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, ջրային բաղնիք:

Աշխատանքի ընթացքը.

Փորձանոթի մեջ լցնել 1 մլ լակտոզի լուծույթ և 0.5 մլ NH_3-ի լուծույթ, ավելացնել 2 կաթիլ NaOH: Խառնուրդը տեղափոխել ջրային բաղնիք (15 րոպե), առաջանում է լակտոզի առկայությունը հաստատող նարնջագույն գունավորում (նկ. 2.16):



Նկ. 2.16. Լակտոզի բացահայտումը:

Լակտոզի բացահայտումը կաթում

Նյութեր և ռեակտիվներ: Կաթ, խիտ CH_3COOH, NaOH-ի 10% լուծույթ, $CuSO_4$-ի 5% լուծույթ:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, ձագար, կտորե ֆիլտր, ջրային բաղնիք:

Աշխատանքի ընթացքը.

10 մլ կաթին ավելացնել նույնքան H_2O, 2.5 մլ CH_3COOH մինչև սպիտակուցների փաթիլանման նստվածքի առաջացումը: 10-15 րոպե անց զտել կտորե ֆիլտրով: Այնուհետև 2-3 մլ զտվածքին (պղտոր) ավելացնել 1-2 մլ NaOH-ի լուծույթ և 2-3 կաթիլ $CuSO_4$-ի լուծույթ: Խառնուրդը մինչև եռալը տաքացնելիս կապույտ գունավորումն անհետանում է, առաջանում է դեղին կամ կարմիր նստվածք, ինչը հաստատում է լուծույթում վերականգնող շաքարի (լակտոզի) առկայությունը:

Աշխատանքի արդյունքները գրանցել աղյուսակ 2-ում:

Աղյուսակ 2. Ածխաջրերի նույնականացման ռեակցիաների արդյունքները

N	Բացահայտման ռեակցիա	Հետազոտվող լուծույթ	Ռեակցիայի բնույթ	Գունավորում
1	պենտոզներ	ռիբոզ քսիլոզ		
2	դեզօքսիպենտոզ	դեզօքսիրիբոզ		
3	կետոզներ	սախարոզ մալթոզ գլյուկոզ ֆրուկտոզ		
4	սախարոզ	սախարոզ լակտոզ գլյուկոզ		
5	լակտոզ	լակտոզ		

Աշխատանք 2.12. Ինուլինի հիդրոլիզ, ֆրուկտոզի հայտնաբերում

Ինուլինը բաղկացած է 1,2 գլիկոզիդային կապերով միացած β-D-ֆրուկտոզի մնացորդներից: Հայտնաբերված է խատուտիկի արմատներում, գետնատանձում, գեորգինում, որոշ ջրիմուռներում: Ցորենի, տարեկանի տերևներում, արմատներում հայտնաբերված ածխաջրերը՝ ինուլիդները, կազմված են 2,6 գլիկոզիդային կապերով միացած ֆրուկտոզի մնացորդներից: Ինուլինը և ինուլիդները ջրալույծ են, ինուլինի լուծույթները յողով չեն գունավորվում: Թթվային միջավայրում տաքացնելիս կամ ինուլազ ֆերմենտի ազդեցությամբ ինուլինի մոլեկուլները ենթարկվում են հիդրոլիտիկ ճեղքման՝ անջատելով β-D-ֆրուկտոզ:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Գեորգինի պալարներ կամ խատուտիկի արմատներ, ինուլինի 0.25% լուծույթ, HCl-ի 10% լուծույթ, ակտիվացված ածուխ, Սելիվանովի ռեակտիվ (աշխ. 2.23), կրաջուր ($Ca(OH)_2$), թրթնջկաթթու (HOOC-COOH), CH_3COCH_3:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, ջրային բաղնիք:

Աշխատանքի ընթացքը.

Ինուլինի անջատման նպատակով 10 գ գեորգինի պալարներին կամ խատուտիկի արմատներին ավելացնել 25 մլ տաք H_2O (60° C), թողնել 1.5 ժամ, զտել: Զտվածքին ավելացնել կրաջուր մինչև հիմնային ռեակցիա: Առաջացած նստվածքը զտել, զտվածքը տաքացնել մինչև 60-65° C և չեզոքացնել թրթնջկաթթվով մինչև pH 7, ավելացնել ակտիվացված ածուխ, խառնել, զտել: Ինուլինի ամորֆ զանգված ստանալու համար զտվածքը սառեցնել մինչև 2-3°C: Նորից զտել և թողնել ացետոնում 12-16 ժամ, այնուհետև չորացնել: Ստացված ինուլինի 2-3 մլ լուծույթին ավելացնել 2 մլ HCl, 8-10 րոպե տաքացնել ջրային բաղնիքում, ավելացնել 8-10 կաթիլ Սելիվանովի ռեակտիվ (կամ ռեզորցինի մի քանի բյուրեղ). ստացված լուծույթը ստանում է ֆրուկտոզի հայտնաբերմանը բնորոշ կարմիր գունավորում:

Աշխատանք 2.13. Օսլայի բացահայտման ռեակցիաներ

Բույսերի հիմնական պաշարային ածխաջուրը՝ օսլան, յողի լուծույթի նույնիսկ չնչին կոնցենտրացիայի առկայությամբ ստանում է մուգ կապույտ գունավորում (առաջանում է համալիր միացություն): Գունավորումը պայմանավորված է ամիլոզի առկայությամբ: Չնայած ամիլոպեկտինի պարունակու-

թյունը օսլայում մի քանի անգամ շատ է ամիլոզի քանակությունից, ամիլոզի կապույտ գունավորումը քողարկում է ամիլոպեկտինի կարմրամանուշակագույն գունավորումը: Տաքացման հետևանքով համալիրը քայքայվում է, գունավորումն անհետանում, սառչելու դեպքում՝ նորից հայտնվում (նկ. 2.17):

Այս ռեակցիան թույլ է տալիս հայտնաբերել միջավայրում օսլայի նույնիսկ աննշան քանակությունը:



1 **2** **3**

Նկ. 2.17. Օսլայի լուծույթներ

1. Յոդով գունավորված օսլայի լուծույթի անգունացում (տաքացնելու դեպքում):

2. Լուծույթի գունավորման առաջացում (սառեցնելու դեպքում):

3. Գունավորման վերականգնում:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Կարտոֆիլ, եփած բրինձ, խնձոր, բուսական յուղ, օսլայի 1% լուծույթ, Լյուգոլի ռեակտիվ:

Պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, հավանգ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Փորձանոթի մեջ լցնել 1 մլ օսլայի լուծույթ և 1 կաթիլ Լյուգոլի ռեակտիվ, առաջանում է կապտամանուշակագույն գունավորում:

Համարակալված փորձանոթների մեջ տեղափոխել 0.5 գ տարբեր սննդանյութեր (նախապես հավանգում տրորած), ավելացնել 2-3 մլ թորած ջուր, թափահարել, ավելացնել 1-2 կաթիլ Լյուգոլի ռեակտիվ: Փորձանոթներում առաջացած գունավորմամբ եզրակացնել սննդանյութերում օսլայի քանակության մասին:

Գունավորման արդյունքները գրանցել հետևյալ աղյուսակում:

N	Հետազոտվող լուծույթ	Գունավորում	Օսլայի պարունակություն
1			
2			
3			
4			
5			

Աշխատանք 2.14. Դեքստրինների գունավորման ռեակցիաները

Օսլայի մասնակի հիդրոլիզի հետևանքով առաջանում են ավելի քիչ պոլիմերացված դեքստրիններ: Հիդրոլիզի սկզբնական փուլում առաջանում են յոդի հետ կապտամանուշակագույն գունավորում առաջացնող ամիլոդեքստրիններ, ապա առաջանում են էրիթրոդեքստրիններ, ախրոդեքստրիններ և յոդով չգունավորվող մալթոդեքստրիններ: Հիդրոլիզի վերջնական փուլում անջատվում են դիսախարիդներ (մալթոզ), ապա գլյուկոզ:

$$(C_6H_{10}O_5)_n \xrightarrow{H_2O\ (H^+)} (C_6H_{10}O_5)_x \xrightarrow{H_2O\ (H^+)} n/2C_{12}H_{22}O_{11} \xrightarrow{H_2O\ (H^+)} nC_6H_{12}O_6$$

օսլա — դեքստրիններ — D-մալթոզ — D-գլյուկոզ

Ռեակտիվներ: Օսլայի 1% լուծույթ (0.5 գ օսլան լուծել ջրում, համասեռ զանգված ստանալուց հետո ավելացնել եռացրած ջուր, ծավալը հասցնել 50 մլ, լուծույթը եռացնել, սառեցնել), J_2-ի 1% սպիրտային լուծույթ կամ Լյուգոլի ռեակտիվ, H_2SO_4-ի 10% լուծույթ:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, անոթ, կաթոցիչներ, ջրային բաղնիք:



Նկ. 2.18. Օսլայի հիդրոլիզի արդյունքները:

Աշխատանքի ընթացքը.

Անոթի մեջ լցնել 5 մլ օսլայի և 1 մլ H_2SO_4-ի լուծույթներ, խառնուրդը տեղադրել եռացող ջրային բաղնիքում: Համարակալված փորձանոթների մեջ լցնել 5-ական մլ թորած H_2O և 1-ական կաթիլ J_2-ի լուծույթ: 2-3 րոպե անց անոթից 1 մլ տեղափոխել յոդի լուծույթ պարունակող փորձանոթի մեջ. առաջանում է կապույտ գունավորում: 1-2 րոպե անց 1 մլ տեղափոխել յոդի լուծույթ պարունակող հաջորդ փորձանոթի մեջ, գրանցել գունավորման փոփոխությունը: Կրկնել մինչև յոդին բնորոշ բաց դեղնավուն գունավորման առաջացումը (նկ. 2.18):

Ստացված լուծույթների գունավորման տարբերությամբ կարելի է դատել օսլայի հիդրոլիզի բազմափուլ բնույթի մասին: Սկզբում առաջանում են ամիլոդեքստրինները (մանուշակագույն), հետո՝ էրիթրոդեքստրինները (կարմիր), ախրոդեքստրինները (դեղնագորշ) և մալթոդեքստրինները՝ դիսախարիդ մալթոզի մնացորդները, յոդի հետ գունավորում չեն ցուցաբերում:

Աշխատանք 2.15. Օսլայի քանակական որոշումը

Օսլան բույսերի հիմնական պաշարային պոլիսախարիդն է: Մեծ քանակությամբ օսլա պարունակվում է բրնձի սերմերում (70-80%), եգիպտացորենում (65-75%), հացահատիկում (60-70%), կարտոֆիլում (12-22%): Օսլայի որոշման քիմիական մեթոդներից են յողի հետ գունավորման ուժգնության գնահատման եղանակը, օսլայի մոլեկուլից թթվային հիդրոլիզի հետևանքով անջատված գլյուկոզի քանակական որոշումը, օսլայի ֆերմենտային քայքայման հետևանքով անջատված գլյուկոզի քանակական որոշումը:

Հայտնի է, որ օսլայի մոլեկուլում ամիլոզի և ամիլոպեկտինի քանակական հարաբերությունը փոփոխական է՝ կախված բույսի տեսակից, օրգանից, տարիքից: Հայտնի է նաև, որ յոդային լուծույթի առկայությամբ օսլայի կազմի բարձրամոլեկուլային պոլիսախարիդ ամիլոզը ստանում է կապույտ, ամիլոպեկտինը՝ մանուշակագույն գունավորում: Յողի ներկայությամբ օսլայի լուծույթի գունավորման փոփոխությամբ կարելի է դատել օսլայի քանակության վերաբերյալ: Օսլայի ճեղքման հետ մեկտեղ փոփոխվում է լուծույթի երանգը. կապույտ գույնը փոխվում է կապտամանուշակագույնի, այնուհետև՝ կարմիրի: Օսլայի որոշման առավել ճշգրիտ մեթոդ է ֆերմենտային մեթոդը:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Չոր բուսական օբյեկտ, օսլայի 1% լուծույթ, սալիցիլաթթվի ($C_7H_6O_3$) լուծույթ (0.1 գ թթուն լուծել 1 մլ C_2H_5OH-ում և ծավալը թորած ջրով հասցնել 40 մլ (փաթիլների առաջացման դեպքում լուծույթը տաքացնել ջրային բաղնիքում մինչև թթվի լիարժեք լուծվելը), յոդի լուծույթ (20 մգ կալիումի յոդիդը (KJ) լուծել 0.2 մլ թորած ջրում, ավելացնել 10 մգ բյուրեղային յոդ (J_2), լուծել, ծավալը հասցնել 9 մլ, պահել մուգ անոթում), 0.1 Ն HCl-ի լուծույթ:

Սարքեր և պարագաներ: Չափիչ գլաններ, կոնաձև անոթներ, հետաղարձ սառնարան, կաթոցիչներ, ջրային բաղնիք, լուսաէլեկտրագունաչափ:

Աշխատանքի ընթացքը.

150 մգ չոր բուսական օբյեկտը տեղափոխել 50 մլ տարողությամբ հետադարձ սառնարանով անոթի մեջ, ավելացնել 10 մլ $C_7H_6O_3$ և տեղափոխել եռացող ջրային բաղնիք, ընթացքում անոթի պարունակությունը թափահարել 3-4 անգամ: 45 րոպե անց անոթը սառեցնել և լուծույթի ծավալը $C_7H_6O_3$-ով հասցնել 50 մլ: Լուծույթը նորից տաքացնել եռացող ջրային բաղնիքում և տաք վիճակում զտել: 1 մլ զտվածքը տեղափոխել չափիչ անոթի մեջ (10 մլ), ավելացնել 7 մլ թորած H_2O, 1.5 մլ HCl-ի լուծույթ, 0.2 մլ J_2-ի լուծույթ և ջրով ծավալը հասցնել համապատասխան նիշի, գունաչափել (ԼԷԳ, կարմիր լուսաֆիլտր,

կյուվետի լայնությունը 1 սմ): Օսլայի պարունակությունը բույսում որոշել տրամաչափական կորի օգնությամբ:

Տրամաչափական կոր.

50 մգ օսլային ավելացնել 10 մլ սալիցիլաթթու և տաքացնել եռացող ջրային բաղնիքում 45 րոպե, լուծույթի ծավալը $C_7H_6O_3$-ով հասցնել 50 մլ (ելակետային լուծույթի 1 մլ պարունակում է 1 մգ օսլա): Պատրաստել 1; 0.9; 0.8; 0.7; 0.6; 0.5; 0.4; 0.3 մգ օսլա պարունակող լուծույթներ, տեղափոխել 10 մլ գլանների մեջ, ավելացնել թորած H_2O, HCl-ի և J_2-ի լուծույթներ, ծավալները թորած ջրով հասցնել համապատասխան նիշի (ըստ աղյուսակի):

N	Օսլայի լ-թ, մլ	Թորած ջուր (մլ)	Աղա թթու (մլ)	J_2-ի լ-թ (մլ)	Սալի ցիլա թթու (մլ)	Ընդհա-նուր ծավալ (մլ)	Օպտիկա կան խտու-թյուն
1	1	7	1.5	0.2	–	10	
2	0.9	7	1.5	0.2	–	10	
3	0.8	7	1.5	0.2	–	10	
4	0.7	7	1.5	0.2	–	10	
5	0.6	7	1.5	0.2	–	10	
6	0.5	7	1.5	0.2	–	10	
7	0.4	7	1.5	0.2	–	10	
8	0.3	7	1.5	0.2	–	10	
9	0	7	1.5	0.2	1	10	

Ստուգիչ նմուշը օսլայի լուծույթի փոխարեն պարունակում է սալիցիլաթթու: Լուծույթները գունաչափել (ԼԷԳ, կարմիր լուսաֆիլտր, կյուվետի լայնությունը 1 սմ):

Ստացած արդյունքների հիման վրա կառուցել տրամաչափական կոր՝ աբսցիսների առանցքին տեղադրել օսլայի խտության ցուցանիշները, օրդինատների առանցքին՝ օպտիկական խտության համապատասխան արժեքները:

Աշխատանք 2.16. Գլիկոգենի բացահայտումը կենդանական հյուսվածքներում

Նյութեր և ռեակտիվներ: Մկանային հյուսվածք, HCl-ի 2.5% լուծույթ, CH_3COOH-ի 1% լուծույթ, Լյուգոլի ռեակտիվ, NaOH- ի 10% լուծույթ, Ֆելինգի հեղուկ, C_2H_5OH:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, հավանգ, հախճապակյա բաժակ, ջրային բաղնիք, ֆիլտրի թուղթ, ցենտրիֆուգ:

Աշխատանքի ընթացքը.

1 գ մկանային հյուսվածքը մանրացնել սառը պայմաններում, տեղափոխել հախճապակյա բաժակի մեջ, ավելացնել 5 մլ եռացրած թորած ջուր և եռացնել 2-3 րոպե: Զանգվածը տեղափոխել հավանգի մեջ, տրորել, այնուհետև նորից տեղափոխել հախճապակյա բաժակի մեջ և եռացնել 20-30 րոպե: Ջրի գոլորշիանալու ընթացքում կաթիլներով ջուր ավելացնել: Եռալու ընթացքում սպիտակուցները բնափոխվում են, գլիկոգենն անցնում է լուծույթի մեջ: Սպիտակուցների լիարժեք նստեցման նպատակով եռացող լուծույթին ավելացնել 5-10 կաթիլ 1% CH_3COOH-ի լուծույթ: Բաժակի պարունակությունը զտել, զտվածքը օգտագործել հետևյալ աշխատանքներում:

Գլիկոգենի բացահայտումը 10 կաթիլ գլիկոգեն պարունակող զտվածքին ավելացնել 2-3 կաթիլ Լյուգոլի ռեակտիվ: Լուծույթը ստանում է գորշ գունավորում: Գունավորման ուժգնությունը կախված է լուծույթում գլիկոգենի խտությունից:

Գլիկոգենի նստեցումը սպիրտով. 5 կաթիլ գլիկոգեն պարունակող զտվածքին ավելացնել 5-10 կաթիլ C_2H_5OH: Սկզբում առաջանում է պղտորություն, այնուհետև՝ գլիկոգենի նստվածք: Նստվածքն անջատել ցենտրիֆուգմամբ:

Գլյուկոզի բացահայտումը. Նստվածքին ավելացնել 3-4 մլ HCl-ի լուծույթ, եռացնել 15-20 րոպե ջրային բաղնիքում: Լուծույթը սառեցնել, չեզոքացնել NaOH-ի լուծույթով, ավելացնել նույնքան Ֆելինգի ռեակտիվ, նորից եռացնել: Առաջանում է պղնձի (I) օքսիդի կարմիր նստվածք:

Աշխատանք 2.17. Գլիկոգենի քանակական որոշումը կենդանական հյուսվածքներում

Նյութեր և ռեակտիվներ: Կենդանական հյուսվածք, KOH-ի 33 % լուծույթ, NH_4Cl-ի հագեցած լուծույթ, 96% C_2H_5OH, $CaCl_2 \cdot 6H_2O$-ի հագեցած լուծույթ, գլիկոգեն, KJ պարունակող յոդի ջրային լուծույթ (0.26 գ. բյուրեղային յոդը և 2.6 գ. KJ-ը լուծել 10 մլ թորած ջրում): Յոդային ռեակտիվ-130 մլ $CaCl_2$-ի հագեցած լուծույթը խառնել 0.5 մլ KJ պարունակող յոդի ջրային լուծույթի հետ (պատրաստել անմիջապես նմուշներին ավելացնելուց առաջ):

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, ջրային բաղնիք, ցենտրիֆուգ, լուսաէլեկտրագունաչափ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Առանձնացնել լյարդի, մկանի, սրտամկանի հյուսվածքը շարակցական և ճարպային հյուսվածքներից: Ցենտրիֆուգման փորձանոթներ տեղափոխել 100 մգ հետազոտվող հյուսվածք և ավելացնել 0.9 մլ KOH-ի լուծույթ: Փորձանոթները տեղադրել ջրային բաղնիքում 20 րոպե 100°C պայմաններում մինչև հյուսվածքներն ամբողջությամբ լուծվեն, այնուհետև փորձանոթները սառեցնել հոսող ջրի տակ: Ավելացնել 1.3 մլ 96 %-անոց էթիլ սպիրտ և թափահարել: Գլիկոգենի դուրս մղման նպատակով փորձանոթները նորից տեղափոխել ջրային բաղնիք մինչև լուծույթը եռա և անմիջապես սառեցնել սառցե բաղնիքում: Այս փուլում հիդրոլիզատը կարելի է թողնել սառնարանում 18-24 ժամ: Փորձանոթները սառեցնելուց հետո ցենտրիֆուգել 15 րոպե 3000 պտ/ր արագությամբ: Վերնստվածքը դատարկել, փորձանոթները չորացնել (շրջել ֆիլտրի թղթի վրա): Փորձանոթի պատին սահեցնելով՝ ավելացնել 0.2 մլ NH_4Cl-ի հագեցած լուծույթ և նստվածքը զգուշությամբ խառնել: Այս փուլը կարևոր է հիմքի ավելցուկի չեզոքացման համար, քանի որ pH > 7 դեպքում առաջանում է հիպոյոդիտ, որը նվազեցնում է լուծույթի օպտիկական խտությունը: Այնուհետև փորձանոթները տաքացնել ջրային բաղնիքում (5 րոպե 100°C) և սառեցնել հոսող ջրի տակ: Փորձանոթների մեջ ավելացնել 0.2 մլ թորած ջուր, 2.6 մլ յոդային ռեակտիվ:

Ստուգիչ նմուշ. խառնել 0.2 մլ NH_4Cl-ի հագեցած լուծույթ, 0.2 մլ թորած ջուր, 2.6 մլ յոդային ռեակտիվ:

Լուծույթների օպտիկական խտությունը չափել ստուգիչի դիմաց (ԼԷԳ, կանաչ լուսաֆիլտր, կյուվետի լայնությունը 0.5 սմ): Գունավորումը կայուն է 1 ժամ: Անհրաժեշտության դեպքում նմուշները նոսրացնել յոդային ռեակտիվով և հաշվարկման ժամանակ հաշվի առնել նոսրացումը:

Գլիկոգենի քանակությունը հյուսվածքներում որոշել ըստ գլիկոգենի տրամաչափական կորի:

Տրամաչափական կորի կառուցումը: Պատրաստել 2 մգ/մլ խտությամբ գլիկոգենի լուծույթ (լուծույթ I)՝ 10 մգ գլիկոգենը լուծել 5 մլ թորած ջրում (գլիկոգենի լիարժեք լուծման համար լուծույթը տեղադրել ջրային բաղնիք-37°C): 1 մլ լուծույթ I ավելացնել 9 մլ թորած ջուր (0.2 մգ/մլ խտությամբ լուծույթ II): Գլիկոգենի I և II լուծույթներից, համաձայն ստորև ներկայացված աղյուսակի, 11 փորձանոթների մեջ պատրաստել համապատասխան նմուշներ:

Փորձանոթ N	Գլիկոգենի լուծույթ N	Գլիկոգենի լուծույթ, մլ	Թորած ջուր, մլ	Գլիկոգենի քանակը նմուշում, մգ
1	-	-	0.4	0
2	I	0.2	0.2	0.4
3	I	0.15	0.25	0.3
4	I	0.1	0.3	0.2
5	I	0.05	0.35	0.1
6	II	0.4	-	0.08
7	II	0.3	0.1	0.06
8	II	0.2	0.2	0.04
9	II	0.15	0.25	0.03
10	II	0.1	0.3	0.02
11	II	0.05	0.35	0.01

Ստացված նմուշներին ավելացնել 2.6 մլ յոդային ռեակտիվ: Լուծույթների օպտիկական խտությունները չափել ստուգիչ նմուշի դիմաց (ԼԷԳ, 440 նմ ալիքի երկարություն, կանաչ լուսաֆիլտր, կյուվետի լայնությունը 0.5 սմ): Կառուցել տրամաչափական կոր՝ աբսցիսների առանցքին տեղադրելով գլիկոգենի քանակը (մգ), իսկ օրդինատների առանցքին՝ օպտիկական խտությունների համապատասխան արժեքները:

Աշխատանք 2.18. Պեկտինային նյութերի բացահայտումը

Պեկտինային նյութերը բույսերում լայն տարածում ունեցող բարձրամոլեկուլային պոլիմերներ են, ածխաջրերի ածանցյալներ: Պեկտինային նյութերը հիդրոֆիլ հատկությունների շնորհիվ պաշտպանում են բույսերը չորանալուց: Պեկտինային նյութերի մոլեկուլային զանգվածը 50-300 կԴա է, գլխավոր բաղադրիչն է գալակտուրոնաթթուն, ինչը պայմանավորում է միացության թթվային հատկությունները: Գալակտուրոնաթթուների մնացորդները կապված են գլիկոզիդային կապերով, մնացորդների կարբօքսիլ խմբերի մեծ մասը մեթիլացված է:

Մեթիլացված պոլիգալակտուրոնաթթուն անվանվում է պեկտինաթթու կամ լուծվող պեկտին:

Լուծվող պեկտինի անջատումը

Սարքեր և պարագաներ: Կոնաձև անոթներ (Էրլենմեյերի անոթներ), չափիչ անոթներ, չափիչ բաժակներ, հավանգ, ձագար, ֆիլտրի թուղթ, ջրային բաղնիք, ցենտրիֆուգ:

Աշխատանքի ընթացքը.

5 գ թարմ նյութը (խնձոր, շաքարի ճակնդեղ) տրորել ճենապակյա հավանգում մինչև միասեռ զանգվածի ստացումը, տեղափոխել կոնաձև անոթի մեջ, ավելացնել 20 մլ տաք ջուր (45°C), տեղադրել ջրային բաղնիք (20-25 րոպե, 37° C), որից հետո անոթը փակել և 15-20 րոպե թափահարել: Լուծույթը ցենտրիֆուգել 10-15 րոպե 3000g-ի պայմաններում կամ զտել թղթյա ֆիլտրով 100 մլ չափիչ անոթի մեջ: Պեկտինի լիարժեք անջատման նպատակով նստվածքին ավելացնել 30 մլ ջուր և ստանալ 2-րդ լուծամզվածքը, այնուհետև ավելացնել 25 մլ ջուր և ստանալ 3-րդ լուծամզվածքը (յուրաքանչյուր անգամ լուծվող պեկտինը նստվածքներից անջատել ցենտրիֆուգելով կամ զտելով): Լուծամզվածքները միացնել, ընդհանուր ծավալը չափիչ անոթում հասցնել 100 մլ: Լուծույթը պարունակում է ջրալույծ պեկտիններ (I), նստվածքը՝ պրոտոպեկտիներ: Լուծույթի պղտորության դեպքում այն նորից զտել:

Լուծվող պեկտինը որոշել պեկտատային եղանակով (աշխ. 2.19):

Պրոտոպեկտինի անջատումը

Չհասունացած պտուղներում պարունակվում է պրոտոպեկտին: Ջրում անլուծելի պրոտոպեկտինում պեկտինի մոլեկուլները միացած են բջջապատի թաղանթանյութի, հեմիթաղանթանյութի հետ: Պտուղների, հատապտուղների հասունացման ժամանակ պեկտինային նյութերը ճեղքվում են լեկտոլիտիկ ֆերմենտներով (պեկտինազ), և պրոտոպեկտինը վերածվում է լուծվող պեկտինի, իսկ պեկտինի բոլոր ձևերը քայքայվում են մինչև ազատ գալակտուրոնաթթու:

Ռեակտիվներ: Ամոնիումի ցիտրատի ($C_3H_5O(COONH_4)_3$) 1% լուծույթ, HCl-ի 0.3 Ն լուծույթ:

Սարքեր և պարագաներ: Կոնաձև անոթներ, չափիչ անոթներ, հետադարձ սառնարան, ջրային բաղնիք, ձագար, ֆիլտրի թուղթ, ցենտրիֆուգ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Նախորդ աշխատանքում ստացված նստվածքից անջատել պրոտոպեկտինը՝ պեկտինի չլուծվող ձևը: Նստվածքը տեղափոխել 30 մլ HCl պարունակող կոնաձև անոթի մեջ, անոթին միացնել հետադարձ սառնարան և լուծույթը տաքացնել եռացող ջրային բաղնիքում (20 րոպե):

Հիդրոլիզատը զտել կամ ցենտրիֆուգել, նստվածքը մի քանի անգամ լվանալ տաք ջրով: Վերնստվածքը և նստվածքի լվացման հեղուկը հավաքել 200 մլ տարողությամբ չափիչ անոթի մեջ: Ֆիլտրը նստվածքով տեղափոխել կոնաձև անոթի մեջ, ավելացնել 30-40 մլ $C_3H_5O(COONH_4)_3$-ի լուծույթ և տեղա-

դրել եռացող ջրային բաղնիք (20 րոպե): Ջտել նույն չափիչ անոթի մեջ (200 մլ), անջատված նստվածքը լվանալ տաք ջրով, սառեցնել: Անոթի պարունակությունը ջրով հասցնել համապատասխան նիշի: Ստացած լուծույթը (II) պարունակում է պրոտոպեկտին և պեկտինաթթու:

Լուծամզվածքներում (I և II) պեկտինը որոշվում է նույն եղանակով:

Աշխատանք 2.19. Պեկտինային նյութերի քանակական որոշումը կալցիումի պեկտատով

Պեկտինի քանակական որոշման հիմքում ընկած է պեկտինային նյութերի հիդրոլիզը և պոլիգալակտուրոնաթթվի նստեցումը կալցիումի պեկտատի տեսքով:

Ռեակտիվներ: NaOH-ի 0.4% լուծույթ, CH_3COOH-ի 1 Ն լուծույթ, $CaCl_2$-ի 2 Ն լուծույթ, $AgNO_3$-ի 1% լուծույթ:

Սարքեր և պարագաներ: Կոնաձև անոթներ, չափիչ անոթներ, քիմիական բաժակներ, ձագարներ, ջրային բաղնիք:

Աշխատանքի ընթացքը.

100 մլ կոնաձև անոթի կամ քիմիական բաժակի մեջ լցնել 50 մլ պեկտինի լուծույթ (աշխ. 2.18) և ավելացնել 50 մլ NaOH-ի լուծույթ: Թողնել մի քանի ժամ. լուծվող պեկտինը վերածվում է պեկտինաթթվի նատրիումական աղի: Թթվեցնել 50 մլ CH_3COOH-ով, առաջանում է ազատ պեկտինաթթու (պոլիգալակտուրոնաթթու): 5 րոպե անց ստացած պեկտինաթթվին ավելացնել 10 մլ $CaCl_2$, թողնել 1 ժամ: Առաջանում է կալցիումի պեկտատի նստվածք: Առաջացած նստվածքը զտել նախապես կշռված ֆիլտրի թղթով (ֆիլտրը նախապես բազմիցս լվանալ ջրով և չորացնել 100° C մինչև կայուն կշիռը), այնուհետև նստվածքը լվանալ թորած ջրով ($CaCl_2$-ից ազատվելու նպատակով) մինչև $AgNO_3$-ը քլորիդ-իոնի հետ ցուցաբերի բացասական ռեակցիա: Աղերից ազատվելու համար մի քանի անգամ լվանալ տաք ջրով: Նստվածքը ֆիլտրի թղթով չորացնել չորացնող պահարանում մինչև կայուն կշիռ (100°C պայմաններում): Ֆիլտրի նախնական և կալցիումի պեկտատով կշիռների տարբերությամբ հաշվարկել կալցիումի պեկտատի քանակությունը պեկտատի լուծույթում: Նստվածքի կշիռը չպետք է գերազանցի 0.03 գ:

Պեկտինաթթվի քանակության որոշման բանաձևը.

$$C = \frac{x \cdot V \cdot 92}{a \cdot V_1}$$

որտեղ

C – պեկտինաթթվի պարունակությունն է (%),

a – բուսական նյութի քանակությունը (գ),

V_1 – կալցիումի պեկտատի նստեցման նպատակով վերցված զտվածքի ծավալը (մլ),

V – պեկտինի լուծույթի նախնական ծավալը (մլ),

X – հայտնաբերված կալցիումի պեկտատի քանակությունը (գ),

92 – վերահաշվարկի գործակից (հիմք ընդունելով, որ կալցիումի պեկտատում կալցիումի քանակությունը 8 % է), (%):

ԳԼԻԿՈՊՐՈՏԵԻՆՆԵՐԻ ԱԾԽԱՋՐԱՅԻՆ ԲԱՂԱԴՐԻՉԻ ԲԱՑԱՀԱՅՏՈՒՄԸ

Աշխատանք 2.20. Ածխաջրերի բացահայտումը օվալբումինում

Գլիկոպրոտեիները ածխաջուր պարունակող բարդ սպիտակուցներ են: Ածխաջրային մասը կազմում է մակրոմոլեկուլի 10-20%: Բացառություն են կազմում էրիթրոցիտների գլիկոպրոտեիները, որոնց ածխաջրային մասը կազմում է մակրոմոլեկուլի 80%: Գլիկոպրոտեիններում ածխաջուրը միացած է սպիտակուցին կովալենտ կապով: Գլիկոպրոտեիների ոչ սպիտակուցային բաղադրիչը կարող է ներկայացված լինել տարբեր մոնոսախարիդներով կամ դրանց ածանցյալներով՝ գլյուկոզ, մանոզ, գալակտոզ, քսիլոզ, ֆուկոզ, ռամնոզ, գլյուկոզամին, ացետիլգլյուկոզամին, գլյուկուրոնաթթու:

Գլիկոպրոտեին են արյան պլազմի փոխադրող սպիտակուցները (հապտոգլոբին, տրանսֆերին), արյան մակարդելիության գործոնները (պրոթրոմբին, ֆիբրինոգեն), իմունագլոբուլինները, ֆերմենտները (խոլինէսթերազ, ռիբոնուկլեազ), հորմոնները (կորտիկոտրոպին): Այս բարդ սպիտակուցները լայն տարածվածություն ունեն կենդանական օրգանիզմներում, առկա են թքի, ստամոքսահյութի կազմում:

Գլիկոպրոտեիների ածխաջրային բաղադրիչի մոնոսախարիդային կազմը կարելի է բացահայտել որակական և քանակական անալիզի եղանակներով: Մեթողի հիմքում ծծմբական թթվի ներկայությամբ գլիկոպրոտեիների հեքսոզից առաջացած հիդրօքսիմեթիլֆուրֆուրոլի և α-նաֆթոլի կոնդենսացման կարմրամանուշակագույն արգասիքի առաջացումն է:

Գլիկոպրոտեիների պրոստետիկ խմբի որակական ռեակցիաները կիրառվում են կենսաբանական տարբեր հեղուկներում, դեղամիջոցներում դրանց բացահայտման նպատակով:

Օվալբումինը (ձվի ալբումին) պարունակում է մեկ ածխաջրային շղթա և այդ իսկ պատճառով հանդիսանում է գլիկոպրոտեին: Օվալբումինի գլիկոպրոտեինային բնույթի հաստատման համար անհրաժեշտ է այն անջատել ձվի սպիտակուցից: Անջատման փուլերից մեկը նախատեսում է ամոնիումի սուլֆատի կիրառումը: Ածխաջրային բաղադրիչի բացահայտումը օվալբումինի կազմում իրականացվում է շաքարները բացահայտող զգայուն թեստի օգնությամբ:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Ձվի օվալբումին, $(NH_4)_2SO_4$-ի հագեցած լուծույթ, $C_{10}H_7OH$–ի 0,1% լուծույթ, $C_6H_3CH_3(OH(C_3H_7)$-ի 1% լուծույթ, խիտ H_2SO_4:

Պարագաներ: Չափիչ բաժակներ, փորձանոթներ, կաթոցիչներ, ձագար, բանզիֆ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Ձվի օվալբումինի պատրաստուկի ստացումը: Ձվի սպիտակուցը անջատել (մեկ ձվի սպիտակուցի զանգվածը միջինում կշռում է 30 գ), տեղափոխել չափիչ բաժակի մեջ, իննապատիկ ծավալով ջուր ավելացնել: Ստացած լուծույթը թափահարել, 2 շերտ թանզիֆով զտել, նստվածքում մնում են չլուծված գլոբուլինները: Գլոբուլիններից լիարժեք ազատվելու համար 40 մլ զտվածքին ավելացնել նույն ծավալով $(NH_4)_2SO_4$-ի հագեցած լուծույթ: Անջատված գլոբուլինային ֆրակցիան զտել. զտվածքում մնում են օվալբումիններ (հավի ձվում օվալբումինների միջին կոնցետրացիան մոտ 6% է)**:**

Երկու փորձանոթների մեջ լցնել 4-ական մլ ձվի օվալբումինի լուծույթ: Առաջին փորձանոթի մեջ ավելացնել 0,5 մլ $C_{10}H_7OH$, մյուսի մեջ՝ 0,5 մլ $C_6H_3CH_3(OH(C_3H_7)$: Երկու փորձանոթները թափահարել, փորձանոթների պատերին սահեցնելով ավելացնել 1-ական մլ H_2SO_4: Քիչ անց լուծույթների սահմանին կառաջանան ածխաջրերի առկայությունը հաստատող գունավորված օղակներ (մոնոսախարիդների գունավորման ռեակցիաներ):

ԳԼՅՈՒԿՈԶԻ ՔԱՆԱԿԱԿԱՆ ՈՐՈՇՄԱՆ ԵՂԱՆԱԿՆԵՐԸ

Գլյուկոզի որոշման մեթոդներն են.

Գունաչափական մեթոդներ

- Գուլտմանի օրթոտոլուիդինային մեթոդ – հիմքում թթվային միջավայրում արոմատիկ ամին օրթոտոլուիդինի և գլյուկոզի ալդեհիդային խմբի փոխազդեցության արդյունքում առաջացած գունավորված լուծույթի ուժգնության որոշումն է:
- Անիլինային մեթոդ – օրթոտոլուիդինային մեթոդի զգայունությունը պահպանվում է, բայց ավելի յուրահատուկ է:
- Գլյուկոզի կոնցենտրացիայի որոշումը ըստ Մորիսի և Ռոէի – ծծմբական թթվի ներկայությամբ գլյուկոզը դեհիդրատացվում է և առաջացնում օքսիմեթիլֆուրֆուրոլ, որը կոնդենսացվում է անտրոնի հետ՝ առաջացնելով կապույտ գույնի միացություն:

Ֆերմենտային մեթոդներ

- Գլյուկոզօքսիդազային մեթոդ – հիմքում գլյուկոզի օքսիդացումն է՝ գլյուկոնաթթվի և գերօքսիդի առաջացմամբ: Գլյուկոզօքսիդազը կատալիզում է երկու ջրածնային ատոմի տեղափոխումը գլյուկոզի առաջին ածխածնային ատոմից թթվածնին (առաջանում է ջրածնի գերօքսիդ): Գերօքսիդը գերօքսիդազի ներկայությամբ օքսիդացնում է անգույն օրթոտոլիդինը՝ առաջացնելով կապտականաչ երանգի միացություն: Գունավորման ուժգնությունը ուղղակիորեն կախված է գլյուկոզի քանակությունից:

  Այս եղանակով գլյուկոզի քանակությունը կարելի է որոշել պղնձի իոնների, ֆենոլի ներկայությամբ:

  Պղնձի իոնների ներկայությամբ գերօքսիդազը ֆենոլֆտալինն օքսիդացնում է ֆենոլֆտալեինի, որը հիմնային միջավայրում մորու գույն է ստանում:

  Ֆենոլի ներկայությամբ գերօքսիդազն օքսիդացնում է 4-ամինաանտիպիրինը՝ առաջացնելով վառ վարդագույն միացություն:
- Ախտորոշիչ շերտերի կիրառում - գլյուկոզօքսիդազ - գերօքսիդազային ռեակցիան և բենզիդինի ածանցյալները կիրառվում են որպես քրոմոգեն:

Տիտրաչափական մեթոդ – հիմքում ածխաջրերի օքսիդավերականգնման հատկությունն է: Մեթոդի առավելությունը լաբորատոր պայմաններում կիրառելու մատչելիությունն է:

Գլյուկոզի քանակական որոշման համար նպատակահարմար է կիրառել Հագեդորն - Յենսենի մեթոդը, գլյուկոզօքսիդազային և օրթոտոլուիդինային մեթոդները:

Աշխատանք 2.21. Գլյուկոզի քանակական որոշումը Հագեդորն-Յենսենի մեթոդով

Կենդանական օրգանիզմներում ամենատարածված ածխաջուրը գլյուկոզն է: Գլյուկոզից կարող են առաջանալ մյուս մոնոսախարիդները, և տարբեր մոնոսախարիդներ կարող են վերածվել գլյուկոզի: Գլյուկոզը մասնակցում է գլիկոգենի, գլիցերինի, ճարպաթթուների, գլիկոպրոտեինների կենսասինթեզին: Լյարդում, մկանային հյուսվածքում, երիկամներում իրականացող գործընթացների (գլիկոլիզ, եռկարբոնաթթուների օքսիդացում, գլիկոգենեզ և գլիկոգենոլիզ, գլյուկոնեոգենեզ) արդյունքում տեղի են ունենում արյան գլյուկոզի քանակական փոփոխություններ: Գլյուկոզի քանակությունը լուծույթներում, արյան շիճուկում, տարբեր հյուսվածքներում կարելի է որոշել Հագեդորն-Յենսենի մեթոդով: Մեթոդի հիմքում շաքարների օքսիդավերականգնման հատկությունն է: Կարմիր արյան աղի ազդեցությամբ մոնոսախարիդներն օքսիդանում են համապատասխան թթվի՝ վերականգնելով կարմիր արյան աղը դեղին արյան աղի: Կարմիր արյան աղի ավելցուկը որոշվում է յոդաչափական եղանակով:

$$CH_2OH\text{-}(CHOH)_4\text{-}CHO + K_3[Fe(CN)_6] \rightarrow CH_2OH\text{-}(CHOH)_4\text{-}COOH + K_4[Fe(CN)_6] + K_3[Fe(CN)_6]$$

գլյուկոզ — կարմիր արյան աղ — գլյուկոնաթթու — դեղին արյան աղ — մնացորդային աղ

Այս ռեակցիան դարձելի է, և դեղին արյան աղը նորից կարող է վերածվել կարմիր արյան աղի, սակայն միջավայրում $ZnSO_4$-ի առկայությամբ առաջանում է դեղին արյան աղի անլուծելի միացություն, և ռեակցիայի դարձելիության վտանգը վերանում է:

$$2\ K_4[Fe(CN)_6] + 3ZnSO_4 \rightarrow K_2Zn_3[Fe(CN)_6] + 3K_2SO_4$$

Կարմիր արյան աղի ավելցուկը, KI-ի հետ փոխազդելով, միջավայր է անջատում համարժեք քանակով ազատ յոդ, որը տիտրում են հիպոսուլֆիտով և ծախսված հիպոսուլֆիտի քանակով համապատասխան միջավայրում որոշում շաքարի քանակությունը:

$$2\ K_3[Fe(CN)_6] + 2KI \rightarrow 2K_4[Fe(CN)_6] + J_2$$
$$2\ Na_2S_2O_3 + J_2 \rightarrow 2NaJ + Na_2S_4O_6$$

Նյութեր և ռեակտիվներ: Արյան շիճուկ (կամ մկանային հյուսվածք), կադմիումի ռեակտիվ. 1.3 գ $CdSO_4$-ը լուծել 6.35 մլ 1 Ն H_2SO_4-ում և ծավալը թորած ջրով հասցնել 100 մլ, NaOH-ի 0.1 Ն լուծույթ, $ZnSO_4$-ի 0.45% լուծույթ, գլյուկոզի 0.1% լուծույթ, 0.005 Ն կալիումի ֆերիցիանիդ ($K_3Fe(CN)_6$) Na_2CO_3-ի 0.1 Մ լուծույթում, եռյակ լուծույթ (25.0 գ NaCl, 5.0 գ $ZnSO_4$ լուծել 100 մլ ջրում, անմիջապես աշխատանքից առաջ 100 մլ լուծույթին ավելացնել 2.5 գ KJ), հիպոսուլֆիտի ($Na_2S_2O_3$) 0.005 Ն լուծույթ, CH_3COOH-ի 3% լուծույթ, օսլայի 1% լուծույթ:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, ջրային բաղնիք:

Աշխատանքի ընթացքը.

Արյան շիճուկում գլյուկոզի քանակությունը որոշելու նպատակով 0.1 մլ շիճուկին ավելացնել 4 մլ $ZnSO_4$-ի և 1 մլ NaOH-ի լուծույթներ (սպիտակուցները հեռացնելու նպատակով): Լուծույթը տաքացնել եռացող ջրային բաղնիքում 3 րոպե, սառեցնել և զտել: Զտվածքում որոշել գլյուկոզի քանակությունը:

Հյուսվածքում գլյուկոզի քանակությունը որոշելու նպատակով այն մշակել կադմիումի ռեակտիվով. 0.1 գ հյուսվածքին ավելացնել 1.8 մլ կադմիումի ռեակտիվ և 1.1 մլ NaOH-ի լուծույթ: Առաջացած $Cd(OH)_2$ նստեցնում է հյուսվածքի սպիտակուցները: Խառնուրդը 20 րոպե անց զտել կրկնակի ֆիլտրի թղթով, սպիտակուցներից ազատված զտվածքում որոշել գլյուկոզի քանակությունը:

Լուծույթում գլյուկոզի քանակությունը որոշելու նպատակով երեք փորձանոթների մեջ լցնել տարբեր քանակությամբ (0.05-0.2 մլ) գլյուկոզի լուծույթներ, չորրորդում թորած ջուր: Բոլոր փորձանոթների մեջ ավելացնել 2-ական մլ $K_3Fe(CN)_6$:

Հյուսվածքի զտվածքում (կամ արյան շիճուկի զտվածքում) գլյուկոզի քանակությունը որոշելու նպատակով համապատասխան նմուշներին ավելացնել 2 մլ $K_3Fe(CN)_6$ և ընդհանուր ծավալը ջրով հասցնել 14-15 մլ: Զուգահեռ պատրաստել գլյուկոզ չպարունակող ստուգիչ նմուշ՝ 2 մլ $K_3Fe(CN)_6$, լուծույթի ծավալը ջրով հասցնել 14-15 մլ:

Նմուշները տեղադրել եռացող ջրային բաղնիք (15 րոպե). գլյուկոզը վերականգնում է կարմիր արյան աղը $K_3Fe(CN)_6$ (ֆերիցիանիդ) դեղին արյան աղի $K_4Fe(CN)_6$ (ֆերոցիանիդ): 15 րոպե անց փորձանոթները սառեցնել, ավելացնել 3-ական մլ եռյակ լուծույթ ռեակցիայի դարձելիության կանխման նպատակով, 2-ական մլ CH_3COOH-ի 3% լուծույթ, 2-3 կաթիլ օսլա: Ռեակցիային չմասնակցած $K_3Fe(CN)_6$ մնացորդն եռյակ լուծույթում առկա KJ-ից անջատում է ազատ J_2: Անջատված J_2 տիտրել $Na_2S_2O_3$-ի լուծույթով մինչև կապույտ գունավորման անհետացումը:

Գլյուկոզի քանակությունը հետազոտվող լուծույթներում, արյան շիճուկում և ստուգիչ նմուշներում որոշել ըստ Հագեդորն-Յենսենի աղյուսակի (շաքարի պարունակությունը արտահայտված է մգ):

Գլյուկոզի քանակությունը հյուսվածքներում մգ/% հաշվարկել հետևյալ բանաձևով.

$$X = p \cdot 100 \cdot W \cdot H \cdot V,$$

որտեղ

X – գլյուկոզի քանակությունը (մգ/%),

P – գլյուկոզի քանակության տարբերությունը տիտրվող փորձնական և ստուգիչ նմուշներում (մգ)՝ ըստ աղյուսակի,

W – նմուշի ընդհանուր ծավալը (մլ),

V – հետազոտվող զտվածքի քանակությունը (մլ),

H – հյուսվածքի կշիռը (մգ),

մգ/% մկմոլ-ի վերածելու նպատակով ստացած արժեքը բազմապատկել 10 և բաժանել 180 (գլյուկոզի մոլային զանգվածի):

Աղյուսակ. Գլյուկոզի քանակությունը (մգ)՝ ըստ Հագեդորն-Յենսենի մեթոդի

Հիպո սուլֆիտ մլ-ով	0.00	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09
0.0	0.385	0.382	0.379	0.376	0.373	0.370	0.367	0.364	0.361	0.358
0.1	0.355	0.352	0.350	0.348	0.345	0.343	0.341	0.338	0.336	0.333
0.2	0.331	0.329	0.327	0.325	0.323	0.321	0.318	0.316	0.314	0.312
0.3	0.310	0.308	0.306	0.304	0.302	0.300	0.298	0.296	0.294	0.292
0.4	0.290	0.288	0.286	0.284	0.282	0.280	0.278	0.276	0.274	0.272
0.5	0.270	0.268	0.266	0.264	0.262	0.260	0.259	0.257	0.255	0.253
0.6	0.251	0.249	0.247	0.245	0.243	0.241	0.240	0.238	0.236	0.234
0.7	0.232	0.230	0.228	0.226	0.224	0.222	0.221	0.219	0.217	0.215
0.8	0.213	0.211	0.209	0.208	0.206	0.204	0.202	0.200	0.199	0.197
0.9	0.195	0.193	0.191	0.190	0.188	0.186	0.184	0.182	0.181	0.179
1.0	0.177	0.175	0.173	0.172	0.170	0.168	0.166	0.164	0.163	0.161
1.1	0.159	0.157	0.155	0.154	0.152	0.150	0.148	0.146	0.145	0.143
1.2	0.141	0.139	0.138	0.136	0.134	0.132	0.131	0.129	0.127	0.125
1.3	0.124	0.122	0.120	0.119	0.117	0.115	0.113	0.111	0.110	0.108
1.4	0.106	0.104	0.102	0.101	0.099	0.097	0.095	0.096	0.092	0.090
1.5	0.088	0.086	0.084	0.083	0.081	0.079	0.077	0.075	0.074	0.072
1.6	0.070	0.068	0.066	0.065	0.063	0.061	0.059	0.057	0.056	0.054
1.7	0.052	0.050	0.048	0.047	0.045	0.043	0.041	0.039	0.038	0.036
1.8	0.034	0.032	0.031	0.029	0.027	0.025	0.024	0.022	0.020	0.019
1.9	0.017	0.015	0.014	0.012	0.010	0.008	0.007	0.005	0.003	0.002

Աշխատանք 2.22. Գլյուկոզի քանակական որոշումը (ըստ Վոզնեսենսկու)

Նյութեր և ռեակտիվներ: Բուսական օբյեկտ, $Pb(CH_3COO)_2$-ի 10% լուծույթ, Ֆելինգի լուծույթ, գլյուկոզի ստանդարտ լուծույթ (1 մգ/մլ), կալցիումի կարբոնատ ($CaCO_3$):

Սարքեր և պարագաներ: Պոտեր-Էլվեջեյմի հոմոգենիզատոր (կամ հավանգ), ցենտրիֆուգ, կոնաձև անոթներ, չափիչ անոթներ, փորձանոթներ, կաթոցիչներ, ջրային բաղնիք, լուսաէլեկտրագունաչափ (նկ. 2.19):

Աշխատանքի ընթացքը.

Բուսական լուծամզվածքի պատրաստումը: 4-8 գ բուսական օբյեկտը (կախված շաքարների պարունակությունից) տրորել հավանգում կամ հոմոգենացնել Պոտեր-Էլվեջեյմի հոմոգենիզատորով, տեղափոխել 100 մլ կոնաձև անոթի մեջ և ավելացնել 40 մլ տաք թորած ջուր: Լուծույթը տաքացնել ջրային բաղնիքում 75-80°C պայմաններում 30 րոպե: Որոշ բուսական օբյեկտներից (բարձր թթվայնությամբ՝ լոլիկ, խնձոր, կիտրոն) շաքարների անջատման ընթացքում կարող է տեղի ունենալ սախարոզի հիդրոլիզ, դրանից խուսափելու նպատակով լուծույթը տաքացնելուց առաջ շպատելի ծայրով ավելացնել $CaCO_3$ (օրգանական թթուները չեզոքացնելու նպատակով): Այնուհետև լուծույթը տեղափոխել 100 մլ չափիչ անոթի մեջ, սառեցնել: Սպիտակուցները նստեցնել 1 մլ $Pb(CH_3COO)_2$ լուծույթով, ծավալը հասցնել համապատասխան նիշի, զտել: Լուծամզվածքում որոշել գլյուկոզի քանակությունը:



Նկ. 2.19 Լուսաէլեկտրագունաչափ (ԼԷԳ), գունաչափման կյուվետ:

Գլյուկոզի քանակական որոշումը: Երեք փորձանոթների մեջ լցնել 6-ական մլ լուծամզվածք, 3-ական մլ Ֆելինգի հեղուկ: Երկու փորձանոթները տեղադրել եռացող ջրային բաղնիք 10 րոպե, այնուհետև արագ սառեցնել

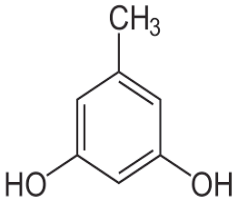
հոսող ջրի տակ: Երրորդ փորձանոթը չեռացնել (ստուգիչ նմուշ): Փորձնական նմուշները ցենտրիֆուգել 10 րոպե 3000-4000 պտ/րոպե արագությամբ: Առաջացած Cu_2O-ի նստվածքն անջատել, վերնստվածքների օպտիկական խտությունը որոշել երրորդ՝ ստուգիչ նմուշի դիմաց (ԼԷԳ, կարմիր լուսաֆիլտր, կյուվետի լայնությունը 2 սմ):

Օպտիկական խտությանը համապատասխանող շաքարի քանակությունը որոշելու համար կառուցել տրամաչափական կոր: Պատրաստել տարբեր խտության գլյուկոզի լուծույթներ. 1.0; 2.0; 3.0; 4.0; 5.0; 6.0 մգ գլյուկոզ 6 մլ ջրում: Լուծույթներին ավելացնել 3-ական մլ Ֆելինգի հեղուկ (ընդհանուր ծավալը հասցնել 9 մլ): Նմուշները տեղադրել եռացող ջրային բաղնիք 10 րոպե, այնուհետև ցենտրիֆուգել: Վերնստվածքներում որոշել օպտիկական խտությունը: Որպես ստուգիչ նմուշ՝ օգտագործել 6 մլ թորած ջրի և 3 մլ Ֆելինգի հեղուկի խառնուրդը (խառնուրդը չեռացնել):

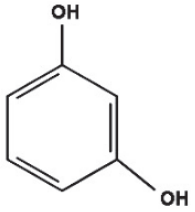
Տրամաչափական կոր. աբսցիսների առանցքին տեղադրել գլյուկոզի կոնցենտրացիայի ցուցանիշները, օրդինատների առանցքին՝ օպտիկական խտության համապատասխան արժեքները:

Աշխատանք 2.23. Ֆրուկտոզի քանակական որոշումը (ըստ Սելիվանովի)

Հանքային թթուների խիտ լուծույթներում կետոզներն ենթարկվում են դեհիդրատացման՝ առաջացնելով ֆուրֆուրոլ (չհագեցած ցիկլիկ ալդեհիդ) պենտոզների դեպքում և օքսիմեթիլֆուրֆուրոլ՝ հեքսոզների դեպքում: Կետոհեքսոզների դեպքում օքսիմեթիլֆուրֆուրոլի առաջացման արագությունը մի քանի անգամ ավելի բարձր է, քան ալդոհեքսոզների դեպքում, ինչը պայմանավորում է Սելիվանովի ռեակցիայի յուրահատկությունը: Աղաթթվի ներկայությամբ ֆրուկտոզից անջատվում է երեք մոլեկուլ ջուր, առաջանում է օքսիմեթիլֆուրֆուրոլ: Հաջորդ փուլում ֆուրֆուրոլը ֆենոլների (օրցին, ռեզօրցին, կարբազոլ) հետ կոնդենսացման հետևանքով առաջացնում է կարմիր գույնի միացություն (կոնդենսացման արգասիք՝ քսանտենային ներկանյութ): Սելիվանովի ռեակցիան բնորոշ է նաև ֆրուկտոզ պարունակող դիսախարիդ սախարոզին, քանի որ աղաթթվի ներկայությամբ տեղի է ունենում սախարոզի հիդրոլիզ, անջատվում է ազատ կետոզ:



օրցին



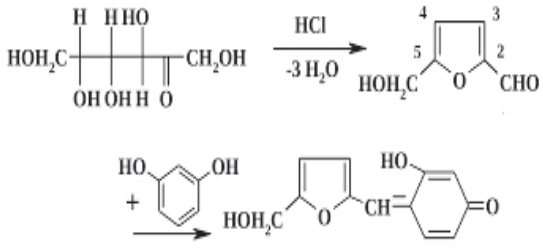
ռեզօրցին

Ռեակտիվներ: Ֆրուկտոզի հետազոտվող (10-100 մգ/մլ) և ստանդարտ (0.125 գ ֆրուկտոզը լուծել 50 մլ ջրում) լուծույթներ, Սելիվանովի ռեակտիվ. $C_6H_4(OH)_2$-ի 0.1% լուծույթ 96% C_2H_5OH-ում կամ 0.05 գ $C_6H_4(OH)_2$-ը լուծել 100 մլ 20% HCl-ում, HCl-ի 30% լուծույթ:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, չափիչ անոթներ, ջրային բաղնիք, լուսաէլեկտրագունաչափ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Փորձնական նմուշ – 1.0 մլ հետազոտվող լուծույթին ավելացնել 1.0 մլ $C_6H_4(OH)_2$ և 3.0 մլ HCl: Ստուգիչ նմուշ – 0.5 մլ ֆրուկտոզի ստանդարտ լուծույթի ծավալը հասցնել 50 մլ: 1.0 մլ լուծույթին (պարունակում է 25 մկգ ֆրուկտոզ) ավելացնել 1.0 մլ $C_6H_4(OH)_2$ և 3.0 մլ HCl: Փորձանոթները թափահարել, տեղադրել ջրային բաղնիքում 8 րոպե 80°C պայմաններում. առաջանում է կարմիր գունավորում (նկ. 2.20):



5-հիդրօքսիմեթիլֆուրֆուրոլի և ռեզորօցինի կոնդենսացման արգասիքի առաջացումը



1 2

Նկ. 2.20. Օքսիմեթիլֆուրֆուրոլի և ռեզօրցինի կոնդեսացման արգասիքը: 1. Ռեակցիայի բացակայությունը: 2. Քսանտենային ներկանյութի առաջացումը:

Ֆրուկտոզից առաջացած օքսիմեթիլֆուրֆուրոլի և ռեզօրցինի կոնդենսացման արգասիքը պարունակող լուծույթի օպտիկական խտությունը որոշել գունաչափման եղանակով

ռեակտիվի դիմաց՝ ֆրուկտոզը փոխարինելով ջրով (ԼԷԳ, կանաչ լուսաֆիլտր, ալիքի երկարությունը 490 նմ, կյուվետի լայնությունը 1.0 սմ):

Լուծույթի գունավորման ուժգնությունը կախված է լուծույթում շաքարի խտությունից:

Ֆրուկտոզի քանակությունը (մկգ) որոշել հետևյալ բանաձևով.

$$C = \frac{a \cdot E}{E_1},$$

որտեղ

a – ֆրուկտոզի քանակությունն է ստանդարտ լուծույթի նմուշում (մկգ),

E – հետազոտվող լուծույթի օպտիկական խտությունը,

E_1 – ստանդարտ լուծույթի օպտիկական խտությունը:

Աշխատանք 2.24. Պենտոզների բանակական որոշումը (ըստ Մեյբաումի)

Այս մեթոդով կարելի է որոշել պենտոզները նուկլեոզիդներում, նիկոտինամիդադենինդինուկլեոտիդում:

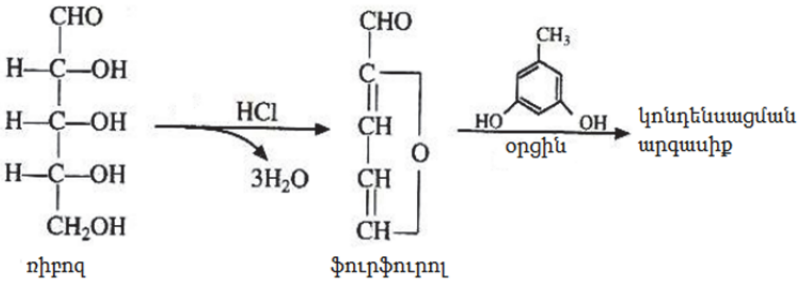
Ռեակտիվներ: Ածխաջրերի՝ ռիբոզի, արաբինոզի կամ քսիլոզի հետազոտվող լուծույթներ (10-100 մգ 100 մլ), ստանդարտ լուծույթներ (25 մգ համապատասխան շաքարը լուծել 25 մլ ջրում), օրցինի ռեակտիվ:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, չափիչ անոթներ, ջրային բաղնիք, լուսաէլեկտրագունաչափ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Փորձնական նմուշ – 3 մլ հետազոտվող լուծույթին ավելացնել 3 մլ օրցինի ռեակտիվ:

Ստուգիչ նմուշ – ստանդարտ լուծույթի 3 մլ-ին (այս ծավալում պարունակվում է 30 մկգ պենտոզ), ավելացնել 3 մլ օրցինի ռեակտիվ: Երկու փորձանոթները տեղադրել եռացող ջրային բաղնիք (20 րոպե), սառեցնել, գունաչափել (ԼԷԳ, կանաչ լուսաֆիլտր, ալիքի երկարությունը 660 նմ, կյուվետի լայնությունը 0.5 սմ) ռեակտիվների դիմաց (պենտոզը կամ հետազոտվող լուծույթը փոխարինել 3 մլ ջրով):



Պենտոզների քանակությունը հետազոտվող նմուշում որոշել հետևյալ բանաձևով.

$$C = \frac{a \cdot E}{E_1},$$

որտեղ

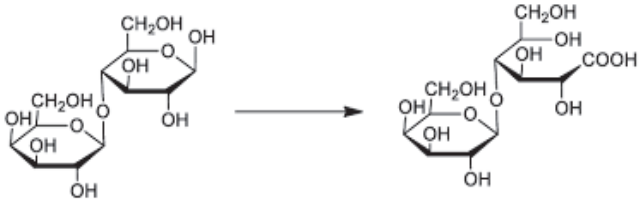
a – պենտոզի քանակությունն է ստանդարտ լուծույթի նմուշում (մկգ),

E – հետազոտվող լուծույթի օպտիկական խտությունը,

E_1 – ստանդարտ լուծույթի օպտիկական խտությունը:

Աշխատանք 2.25. Լակտոզի քանակական որոշումը յոդաչափական եղանակով

Յոդաչափական եղանակի հիմքում հիմնային միջավայրում շաքարների ալդեհիդային խմբերի օքսիդացումն է յոդով (մեթոդը չի կիրառվում չվերականգնող շաքարների դեպքում): Ալդոշաքարներն օքսիդանում են համապատասխան թթուների. լակտոզը՝ լակտոբիոնաթթվի:



լակտոզ **լակտոբիոնաթթու**

Լակտոզն օքսիդանում է ոչ թե յոդով, այլ նատրիումի յոդատից անջատված ատոմային թթվածնով, որն առաջանում է NaOH-ի հետ յոդի փոխազդեցության արդյունքում.

$$3J_2 + 6NaOH \longrightarrow 5NaJ + NaJO_3 + 3H_2O$$
$$NaJO_3 \longrightarrow NaJ + 3\,[O]$$

$$C_{11}H_{21}O_{10}CHO + [O] \rightarrow C_{11}H_{21}O_{10}COOH$$

Կետոզները հիմնային միջավայրում յոդով չեն օքսիդանում, ինչը հնարավորություն է տալիս որոշել ալդոզների քանակությունը կետոզների առկայության պայմաններում:

Ռեակտիվներ: Կաթի փոշի, $CuSO_4$-ի 4% լուծույթ, NaOH-ի 0.5 Ն լուծույթ, յոդի (J_2) 0.1 Ն լուծույթ, HCl-ի 0.5 Ն լուծույթ, օսլայի 1% լուծույթ, $Na_2S_2O_3$-ի 0.1 Ն լուծույթ:

Պարագաներ: Չափիչ անոթներ, կոնաձև անոթներ, կաթոցիչներ:

Աշխատանքի ընթացքը.

4 գ կաթի փոշին կշռել բաժակում, տեղափոխել 100 մլ չափիչ անոթի մեջ, բաժակը ողողել թորած ջրով և ջուրը լցնել անոթի մեջ: Սպիտակուցների և ճարպերի նստեցման նպատակով ավելացնել 0.4 մլ $CuSO_4$ և 0.2 մլ NaOH, թորած H_2O-ով ծավալը հասցնել նիշին: Անոթի պարունակությունը խառնել, թողնել 20-30 րոպե: Զտել, առաջին 10 մլ դատարկել, զտումը շարունակել: 10 մլ զտվածքը տեղափոխել 100 մլ կոնաձև անոթի մեջ, ավելացնել 4 մլ I_2-ի լուծույթ և 2 մլ NaOH-ի լուծույթ (անընդհատ թափահարելով): Անոթը փակել, թողնել 20 րոպե մութ պայմաններում: Այս ընթացքում լակտոզի ալդեհիդային խումբը փոխազդում է ատոմային թթվածնի հետ:

20 րոպե անց ռեակցիոն անոթի մեջ հիմքը չեզոքացնելու նպատակով ավելացնել 2 մլ HCl-ի լուծույթ. արդյունքում անջատվում է ազատ I_2, որը գունավորում է զտվածքը (լուծույթը ստանում է շագանակագույն գունավորում): Դարձելի ռեակցիայի հավասարակշռությունը ուղղված է դեպի ազատ յոդի անջատումը: J_2-ի մի մասը փոխազդում է լակտոզի հետ, մյուս՝ ռեակցիային չմասնակցած J_2-ը տիտրվում է $Na_2S_2O_3$-ի լուծույթով:

Լուծույթի տիտրումը իրականացնել երկու փուլով. սկզբում արագ տիտրել մինչև շագանակագույն գունավորումը վերածվի բաց դեղին երանգի, այնուհետև ավելացնել 0.4 մլ օսլա (լուծույթը ստանում է կապույտ գույն) և դանդաղ տիտրել մինչև կապույտ գունավորման անհետացումը: Գրանցել փորձնական նմուշի (կաթի զտվածքի) տիտրման վրա ծախսված $Na_2S_2O_3$-ի ծավալը (b):

$$J_2 + 2Na_2S_2O_3 \longrightarrow 2NaJ + Na_2S_4O_6$$

Na տետրաթիոնատ

Փորձնական նմուշին զուգահեռ պատրաստել ստուգիչ նմուշ՝ փորձանոթի մեջ լցնել 4 մլ J_2-ի լուծույթ, աստիճանաբար ավելացնել 2 մլ NaOH: Անոթը փակել, թողնել 20 րոպե մութ պայմաններում: Այնուհետև ավելացնել 2 մլ HCl-ի լուծույթ և J_2-ը տիտրել $Na_2S_2O_3$-ի լուծույթով 1 մլ օսլայի ներկայությամբ մին-

չև կապույտ գույնի անհետացումը: Գրանցել ստուգիչ նմուշի տիտրման վրա ծախսված $Na_2S_2O_3$-ի ծավալը (b):

Լակտոզի քանակությունը որոշել հետևյալ բանաձևով (%).

$$X = 1.75 \cdot (a-b),$$

որտեղ

a – ստուգիչ նմուշի տիտրման վրա ծախսված 0.1 Ն $Na_2S_2O_3$-ի քանակությունն է (մլ),

b – փորձնական նմուշի տիտրման վրա ծախսված 0.1 Ն $Na_2S_2O_3$-ի քանակությունը (մլ),

1.75 – վերահաշվարկի գործակից

ԱԾԽԱՋՐԵՐԻ ՓՈԽԱՆԱԿՈՒԹՅՈՒՆ ԳԼԻԿՈԼԻԶԻ ԱՐԴՅՈՒՆԱՎԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳՆԱՀԱՏՈՒՄԸ

Աերոբ պայմաններում ընթացող գլիկոլիզի արդյունքում ածխաջրերը մի շարք միջանկյալ միացությունների միջոցով վերափոխվում են պիրոխաղողաթթվի, որը դեկարբօքսիլացվելով օքսիդանում է ածխաթթու գազի և ջրի: Անաերոբ պայմաններում օքսիդացումն ավարտվում է պիրոխաղողաթթվից կաթնաթթվի առաջացմամբ: Հյուսվածքներում գլիկոլիզի արդյունավետության մասին կարելի է դատել կամ ելակետային ելանյութի՝ գլյուկոզի սպառմամբ, կամ վերջնանյութի՝ կաթնաթթվի կուտակմամբ: Գլյուկոզի քանակական փոփոխությանը հնարավոր է հետևել գլյուկոզօքսիդազային (ֆերմենտային) մեթոդի կիրառմամբ, կաթնաթթվի կուտակմանը՝ պ-օքսիդիֆենիլի հետ փոխազդեցության ռեակցիայի օգնությամբ:

Գլիկոլիզի ակտիվության ուսումնասիրման նպատակով անհրաժեշտ է ստանալ մկանային լուծամզվածքի պատրաստուկ:

Աշխատանք 2.26. Մկանային լուծամզվածքի ստացումը

Նյութեր և ռեակտիվներ: Սկանային հյուսվածք, NaCl-ի 0.9% լուծույթ:

Սարքեր և պարագաներ: Պոտեր-Էլվեջեյմի հոմոգենիզատոր, չափիչ գլան, չափիչ բաժակ, ճագար, թանզիվ, ցենտրիֆուգ, pH-չափիչ:

Աշխատանքի ընթացքը.

2 գ մանրացված մկանային հյուսվածքը հոմոգենացնել NaCl-ի լուծույթում (ապահովել սառը պայմաններ), այնուհետև տեղափոխել չափիչ գլանի մեջ: Հոմոգենատի ծավալը հասցնել համապատասխան նիշի այնպես, որ 1 մլ հոմոգենատը պարունակի 200 մգ հյուսվածք (նոսրացումը 1:5):

Մկանային լուծամզվածքի ստացումը:

Քայքայված բջիջների մնացորդները, բջջակորիզները հեռացնելու նպատակով մկանային հոմոգենատը ցենտրիֆուգել 3000 պտ/ր արագությամբ 10 րոպե: Վերնստվածքը պարունակում է գլիկոլիզի ցիտոպլազմային ֆերմենտներ, միտոքոնդրիումներ, միկրոսոմներ: Միտոքոնդրիումներից ազատվելու նպատակով վերնստվածքը լրացուցիչ ցենտրիֆուգել 10 րոպե 11000 պտ/ր արագությամբ: Վերնստվածքի pH-ի արժեքը հասցնել 7.4:

Ստացված մկանային լուծամզվածքում ուսումնասիրել գլյուկոզի գլիկոլիտիկ ճեղքման ակտիվությունը: Գլիկոլիզի արդյունավետության մասին կա-

րելի է դատել գլյուկոզի քանակության նվազմամբ և կաթնաթթվի քանակության աճով:

Աշխատանք 2.27. ԱԵՖ-ի մակարդակի ազդեցությունը գլիկոլիզի արագության վրա

Նյութեր և ռեակտիվներ: Սկանային լուծամզվածք (աշխ. 2.26), ֆոսֆատաղային բուֆերային խառնուրդ (ՖԲԽ, pH=7.4 - 80 մլ թորած ջրում լուծել 800 մգ NaCl, 20 մգ KCl, 142 մգ Na_2HPO_4, 24 մգ KH_2PO_4: Բուֆերի pH-ը HCl-ով հասցնել 7.4-ի: Լուծույթի ծավալը հասցնել 100 մլ), գլյուկոզի 0.02 Մ լուծույթ ֆոսֆատաղային բուֆերային խառնուրդում, ԱԵՖ-ի 0.06 Մ և 0.6 Մ լուծույթներ ֆոսֆատաղային բուֆերային խառնուրդում, $ZnSO_4$ x $7H_2O$-ի 5% լուծույթ, NaOH-ի 0.3 Մ լուծույթ, CCl_3COOH-ի 5% լուծույթ:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, ջրային բաղնիք, ցենտրիֆուգ, pH-չափիչ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Պատրաստել նմուշներ ըստ աղյուսակի. առաջին փորձանոթ՝ ստուգիչ նմուշ, երկրորդ փորձանոթ՝ փորձնական նմուշ, երրորդ փորձանոթ՝ արգելակող խտությամբ ԱԵՖ պարունակող փորձնական նմուշ: Փորձանոթները տեղավոխել սառը պայմաններ (5 րոպե): 5 րոպե անց բոլոր փորձանոթների մեջ ավելացնել 1.5-ական մլ սկանային լուծամզվածք, թափահարել:

Նմուշներ, մլ	N 1	N 2	N 3
Գլյուկոզի 0.02 Մ լ-ք	0.5	0.5	0.5
ԱԵՖ-ի 0.06 Մ լ-ք	0.5	0.5	–
ԱԵՖ-ի 0.6 Մ լ-ք	–	–	0.5
ՖԲԽ (բուֆերային խառնուրդ)	0.5	0.5	0.5

Առաջին նմուշը տեղավոխել սառը պայմաններ, իսկ երկրորդ և երրորդ նմուշները՝ ջրային բաղնիք (26°C): 30 րոպե անց վերջինները տեղավոխել սառը պայմաններ:

Այնուհետև որոշել գլյուկոզի և կաթնաթթվի քանակությունը նմուշներում:

Լուծամզվածք ավելացնելուց անմիջապես հետո առաջին նմուշից վերցնել 0.5 մլ խառնուրդ և տեղավոխել 2.5 մլ H_2O, 2 մլ $ZnSO_4$, 1 մլ NaOH պարունակող փորձանոթի մեջ: Փորձանոթում մնացած խառնուրդին ավելացնել նույն ծավալով CCl_3COOH-ի լուծույթ:

Երկրորդ և երրորդ նմուշներից (30 րոպե անց) վերցնել 1-ական մլ և տեղափոխել 2.5 մլ H_2O, 2 մլ $ZnSO_4$, 1 մլ NaOH պարունակող փորձանոթների մեջ: Նմուշներում մնացած խառնուրդներին ավելացնել CCl_3COOH-ի լուծույթ (նույն ծավալով):

Նմուշներում առաջացած սպիտակուցների նստվածքը հեռացնել ցենտրիֆուգմամբ (3000 պտ/ր արագությամբ 10 րոպե): $ZnSO_4$-ի խառնուրդով նստեցված նմուշների վերնստվածքներում գլյուկոզի քանակությունը որոշել ֆերմենտային եղանակով (աշխ 2.30): CCl_3COOH-ի լուծույթով նստեցված նմուշների վերնստվածքներում որոշել կաթնաթթվի քանակությունը (աշխ. 2.31):

Աշխատանք 2.28. ԱՄՖ-ի ազդեցությունը գլիկոլիզի արագության վրա

Նյութեր և ռեակտիվներ: Սկանային լուծամզվածք (աշխ. 2.26), ֆոսֆատաղային բուֆերային խառնուրդ (ՖԲԽ pH=7,4), գլյուկոզի 0.02 Մ լուծույթ ֆոսֆատաղային բուֆերային խառնուրդում, ԱԵՖ-ի 0.06 Մ լուծույթ ֆոսֆատաղային բուֆերային խառնուրդում, ԱՄՖ-ի 0.6 Մ լուծույթ – ֆոսֆատաղային բուֆերային խառնուրդում, $ZnSO_4$ x 7 H_2O-ի 5% լուծույթ, NaOH-ի 0.3 Մ լուծույթ, CCl_3COOH-ի 5% լուծույթ:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, ջրային բաղնիք, ցենտրիֆուգ, pH-չափիչ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Պատրաստել նմուշներ ըստ աղյուսակի. առաջին փորձանոթ՝ ստուգիչ նմուշ, երկրորդ փորձանոթ՝ փորձնական նմուշ, երրորդ փորձանոթ՝ բարձր խտությամբ ԱՄՖ պարունակող փորձնական նմուշ:

Նմուշներ (մլ)	N 1	N 2	N 3
գլյուկոզի 0.02 Մ լ-ք	0.5	0.5	0.5
ԱԵՖ-ի 0.06 Մ լ-ք	0.5	0.5	0.5
ԱՄՖ-ի 0.6 Մ լ-ք	–	–	0.5
ՖԲԽ (բուֆերային խառնուրդ)	0.5	0.5	–

Փորձանոթները տեղափոխել սառը պայմաններ (5 րոպե): 5 րոպե անց բոլորի մեջ ավելացնել 1.5-ական մլ մկանային լուծամզվածք, թափահարել: Առաջին նմուշը թողնել սառը պայմաններում, երկրորդ և երրորդ նմուշները տեղափոխել ջրային բաղնիք (26°C): 30 րոպե անց վերջինները տեղափոխել սառը պայմաններ:

Այնուհետև որոշել գլյուկոզի և կաթնաթթվի քանակությունը նմուշներում:

Լուծամզվածք ավելացնելուց անմիջապես հետո առաջին նմուշից վերցնել 0.5 մլ խառնուրդ և տեղափոխել 2.5 մլ H_2O, 2 մլ $ZnSO_4$, 1 մլ NaOH պարունակող փորձանոթի մեջ: Փորձանոթում մնացած խառնուրդին ավելացնել նույն ծավալով CCl_3COOH-ի լուծույթ:

Երկրորդ և երրորդ նմուշներից (30 րոպե անց) վերցնել 1-ական մլ և տեղափոխել 2.5 մլ H_2O, 2 մլ $ZnSO_4$, 1 մլ NaOH պարունակող փորձանոթների մեջ: Նմուշներում մնացած խառնուրդներին ավելացնել CCl_3COOH-ի լուծույթ (նույն ծավալով):

Նմուշներում առաջացած սպիտակուցների նստվածքը հեռացնել ցենտրիֆուգմամբ (3000 պտ/ր արագությամբ 10 րոպե): $ZnSO_4$-ի խառնուրդով նստեցված նմուշների վերնստվածքներում որոշել գլյուկոզի քանակությունը ֆերմենտային եղանակով (աշխ. 2.30): CCl_3COOH-ի լուծույթով նստեցված նմուշների վերնստվածքներում որոշել կաթնաթթվի քանակությունը (աշխ. 2.31):

Աշխատանք 2.29. Լիմոնաթթվի ազդեցությունը գլիկոլիզի արագության վրա

Նյութեր և ռեակտիվներ: Սկանային լուծամզվածք (աշխ. 2.26), ֆոսֆատաղային բուֆերային խառնուրդ (pH 7.4), գլյուկոզի 0.02 Մ լուծույթ ֆոսֆատաղային բուֆերային խառնուրդում, ԱԵՖ-ի 0.06 Մ լուծույթ ֆոսֆատաղային բուֆերային խառնուրդում, ԱՄՖ-ի 0.3 Մ լուծույթ, $Na_3C_6H_5O_7$-ի 0.3 Մ լուծույթ ֆոսֆատաղային բուֆերային խառնուրդում, Na-ցիտրատ/ԱՄՖ (0.6 Մ/0.3 Մ)՝ ֆոսֆատ-աղային բուֆերային խառնուրդում, $ZnSO_4$ x 7 H_2O-ի 5% լուծույթ, NaOH-ի 0.3 Մ լուծույթ, CCl_3COOH-ի 5% լուծույթ:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, ցենտրիֆուգ, pH-չափիչ (նկ. 2.21), ջրային բաղնիք:

Աշխատանքի ընթացքը.

Պատրաստել չորս նմուշ՝ ըստ ստորև աղյուսակի. առաջին փորձանոթ՝ ստուգիչ նմուշ, երկրորդ փորձանոթ՝ փորձնական նմուշ, երրորդ փորձանոթ՝ նատրիումի ցիտրատի արգելակող խտություն պարունակող նմուշ և չորրորդ փորձանոթ՝ ցիտրատի և



Նկ. 2.21. pH-չափիչ:

ԱՄՖ-ի խառնուրդ պարունակող նմուշ:

Նմուշներ (մլ)	N1	N 2	N 3	N 4
Գլյուկոզի 0.02 Մ լ-թ	0.5	0.5	0.5	0.5
ԱԵՖ-ի 0.06 Մ լ-թ	0.5	0.5	0.5	0.5
Na – ցիտրատի 0.3 Մ լ-թ	–	–	0.5	–
Na-ցիտրատ/ ԱՄՖ (0.6Մ /0.3 Մ)	–	–	–	0.5
ՖԲԽ (բուֆերային խառնուրդ)	0.5	0.5	–	–

Փորձանոթները տեղափոխել սառը պայմաններ (5 րոպե): 5 րոպե անց բոլոր փորձանոթների մեջ ավելացնել 1.5-ական մլ մկանային լուծամզվածք, թափահարել: Առաջին նմուշը թողնել սառը պայմաններում, 2, 3 և 4 նմուշները տեղադրել ջրային բաղնիք (26°C): 30 րոպե անց վերջինները տեղափոխել սառը պայմաններ:

Այնուհետև որոշել գլյուկոզի և կաթնաթթվի քանակությունը նմուշներում:

Լուծամզվածք ավելացնելուց անմիջապես հետո առաջին նմուշից վերցնել 0.5 մլ խառնուրդ և տեղափոխել 2.5 մլ H_2O, 2 մլ $ZnSO_4$, 1 մլ NaOH պարունակող փորձանոթի մեջ: Փորձանոթում մնացած խառնուրդին ավելացնել նույն ծավալով CCl_3COOH-ի լուծույթ:

Երկրորդ, երրորդ և չորրորդ (30 րոպե անց) նմուշներից վերցնել 1-ական մլ և տեղափոխել 2,5 մլ H_2O, 2 մլ $ZnSO_4$, 1 մլ NaOH պարունակող փորձանոթների մեջ: Փորձանոթներում մնացած խառնուրդներին ավելացնել CCl_3COOH-ի լուծույթ (նույն ծավալով):

Նմուշներում առաջացած սպիտակուցների նստվածքը հեռացնել ցենտրիֆուգմամբ (3000 պտ/ր արագությամբ 10 րոպե): $ZnSO_4$-ի խառնուրդով նստեցված նմուշների վերնստվածքներում որոշել գլյուկոզի քանակությունը ֆերմենտային եղանակով (աշխ. 2.30): CCl_3COOH-ի լուծույթով նստեցրած նմուշների վերնստվածքներում որոշել կաթնաթթվի քանակությունը (աշխ. 2.31):

Աշխատանք 2.30. Գլյուկոզի քանակական որոշումը գլյուկոզօքսիդազային եղանակով

Մեթոդի հիմքում գլյուկոզօքսիդազ ֆերմենտի ազդեցությամբ գլյուկոզի օքսիդացումն է գլյուկոնաթթվի: Գլյուկոզի մոլեկուլի առաջին ածխածնի ատոմից անջատվում են ջրածնի երկու ատոմ, որոնք փոխանցվում են գլյուկոզօքսիդազի կոֆերմենտ ՖԱԴ-ին: ՖԱԴ-ից ջրածնի ատոմները փոխանցվում են մոլեկուլային թթվածնին՝ առաջացնելով գերօքսիդ, որն օքսիդացնում է ելանյութը (օրթոտոլիդինի կամ օ-դիանիզիդինի կախված՝ թեստ - հավաքածուից)՝

առաջացնելով գունավորված արգասիք: Գունավորման ուժգնությունն արտահայտում է գլյուկոզի քանակությունը:

$$CH_2OH(CHOH)_4COH + O_2 + H_2O \rightarrow \underset{\text{գլյուկոնաթթու}}{CH_2OH(CHOH)_4COOH} + 2H_2O_2$$

$$\underset{\text{(վերականգնված)}}{\text{o-տոլիդին}} + H_2O_2 \rightarrow \underset{\text{(օքսիդացած)}}{\text{o-տոլուիդին}} + H_2O$$

Նյութեր և ռեակտիվներ: Սկանային լուծամզվածքի վերնստվածք (աշխ. 2.26), CCl_3COOH-ի 3% լուծույթ, 0.25 Մ ացետատային բուֆեր pH 4.8, գլյուկոզի ստանդարտ լուծույթ (5.55 մմոլ/լ), գլյուկոզի քանակական որոշման ռեակտիվ (ֆերմենտային):

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, pH-չափիչ, ջրային բաղնիք, լուսաէլեկտրագունաչափ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Պատրաստել փորձնական, ստանդարտ և ստուգիչ նմուշներ՝ համաձայն հետևյալ աղյուսակի:

Նմուշներ (մլ)	Փորձնական	Ստանդարտ	Ստուգիչ (մլ)
Վերնստվածք	0.2	–	–
Գլյուկոզի ստանդարտ լուծույթ	–	0.2	–
Թորած ջուր	–	–	0.2
Ֆերմենտային ռեակտիվ	2.0	2.0	2.0

Փորձնական և ստանդարտ նմուշները տեղափոխել ջրային բաղնիք 15 րոպե 37° C պայմաններում:

Փորձնական և ստանդարտ նմուշների օպտիկական խտությունը չափել ստուգիչ նմուշի դիմաց (ԼԷԳ, ալիքի երկարությունը 490-540 նմ, կյուվետի լայնությունը 1 սմ): Գունավորումը կայուն է 15 րոպե: Եթե նմուշի օպտիկական խտությունը գերազանցում է 0.85, այն նոսրացնել թորած ջրով 1:1 հարաբերությամբ, արդյունքը բազմապատկել 2-ով:

Գլյուկոզի կոնցենտրացիան C (մմոլ/լ) նմուշում որոշել հետևյալ բանաձևով.

$$C = \frac{A \cdot Cստ}{Aստ} \cdot 12 \ \ (N1 \text{ նմուշ})$$

$$C = \frac{A \cdot Cստ}{Aստ} \cdot 6 \ (N2, 3 \text{ նմուշներ}),$$

որտեղ,

C – գլյուկոզի քանակությունն է հետազոտվող նմուշում, մմոլ/լ,

A – հետազոտվող նմուշի օպտիկական խտությունը,

$C_{ստ}$ – գլյուկոզի քանակությունը ստանդարտ նմուշում,

$A_{ստ}$ – ստանդարտ նմուշի օպտիկական խտությունը,

12 – N1 նմուշի նոսրացումը սպիտակուցների նստեցման ժամանակ,

6 – N2, 3 (4) նմուշների նոսրացումը սպիտակուցների նստեցման ժամանակ:

Աշխատանք 2.31. Կաթնաթթվի քանակական որոշումը մկանային հյուսվածքում

Ծծմբական, ֆոսֆորական թթուների և պղնձի աղերի ներկայությամբ կաթնաթթվից առաջանում է քացախալդեհիդ, որը, փոխազդելով պարաօքսիդիֆենիլի հետ, առաջացնում է ֆենոլային կոնդենսացման մանուշակագույն արգասիք - 1,1 - դիօքսիդիֆենիլէթան:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Սկանային լուծամզվածքի վերնատվածք (աշխ. 2.26), կաթնաթթվի ($CH_3CH(OH)COOH$) ստանդարտ լուծույթ (2.5 մմոլ/լ), CCl_3COOH-ի 5% լուծույթ, խիտ H_2SO_4, պարաօքսիդիֆենիլի ($C_6H_5C_6H_4OH$) 1.5% լուծույթ դիմեթիլֆորմամիդում ($HCON[CH_3]_2$), խառնուրդ՝ 3 գ $CuSO_4$ և 9 մլ H_3PO_4:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, ջրային բաղնիք, սպեկտրալուսաչափ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Պատրաստել փորձնական, ստանդարտ, ստուգիչ նմուշներ՝ ըստ հետևյալ աղյուսակի:

Նմուշներ (մլ)	փորձնական	ստանդարտ	ստուգիչ
վերնատվածք	0.1	–	–
կաթնաթթու	–	0.2	–
CCl_3COOH	–	–	0.2
H_2O	0.1	–	–
խառնուրդ	0.1	0.1	0.1
խիտ H_2SO_4	2.5	2.5	2.5

Նմուշները թափահարել և ճիշտ 3 րոպե անց տեղադրել եռացող ջրային բաղնիք (3 րոպե), այնուհետև 3 րոպե սառեցնել: Ավելացնել 1-ական կաթիլ $C_6H_5C_6H_4OH$ (փորձանոթի կենտրոնում), թափահարել և թողնել 10 րոպե սեն-

յակային ջերմաստիճանում: Այնուհետև տաքացնել եռացող ջրային բաղնիքում 90 վայրկյան, սառեցնել, փորձնական նմուշների օպտիկական խտությունը որոշել ստուգիչի դիմաց (սպեկտրալուսաչափ, ալիքի երկարությունը 565 նմ):

Կաթնաթթվի կոնցենտրացիան (մմոլ/լ) նմուշներում որոշել հետևյալ բանաձևով.

$$C_1 \text{ (մմոլ/լ)} = (A_{\text{x}} C_{\text{ստ}} / A_{\text{ստ}})_{\text{x}} 2$$

$$C_2 \text{ (մմոլ/լ)} = (A_{\text{x}} C_{\text{ստ}} / A_{\text{ստ}})_{\text{x}} 2,$$

որտեղ

C_1 – կաթնաթթվի կոնցենտրացիան է հետազոտվող նմուշում (մինչև գլիկոլիզը),

C_2 – կաթնաթթվի կոնցենտրացիան հետազոտվող նմուշում (գլիկոլիզի ավարտից հետո),

A – օպտիկական խտությունը հետազոտվող նմուշում,

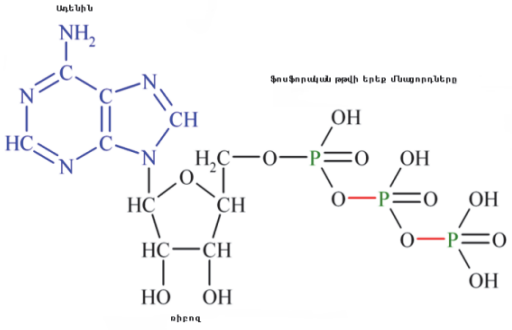
$C_{\text{ստ}}$ – կաթնաթթվի կոնցենտրացիան ստանդարտ նմուշում (2.5 մմոլ/լ),

$A_{\text{ստ}}$ – ստանդարտ նմուշի օպտիկական խտությունը,

2 – նմուշների նոսրացումը նստեցման փուլում:

Աշխատանք 2.32. ԱԵՖ-ի որոշումը կմախքային մկաններում

Էներգիայի հիմնական աղբյուր են համարվում այն միացությունները, որոնց 1 մոլի հիդրոլիզից անջատվում է 7 կկալ-ից ոչ պակաս էներգիա: Մկանային հյուսվածքում էներգիայի հիմնական աղբյուր են ԱԵՖ-ը (նկ. 2.22) և կրեատինֆոսֆատը: Մկաններում ԱԵՖ-ն առաջանում է միտոքոնդրիումներում ընթացող օքսիդատիվ ֆոսֆորիլացման շնորհիվ, կրեատինֆոսֆատը՝ ԱԵՖ-ի մասնակցությամբ հանգստի ժամանակ: Ակտիվ մկանային աշխատանքի ժամանակ կրեատինֆոսֆատը բարձրաէներգիային ֆոսֆատի աղբյուր է ԱԵՖ-ի սինթեզի համար:



Նկ. 2.22. ԱԵՖ-ի կառուցվածքը

ԱԵՖ-ից նույնիսկ ոչ երկարատև թթվային հիդրոլիզի հետևանքով հեշտությամբ անջատվում են վերջին երկու ֆոսֆորական մնացորդները՝ անկա-

յուն (լաբիլ) ֆոսֆորը: Այս հատկությունը հնարավորություն է տալիս, համեմատելով անօրգանական ֆոսֆորի քանակության փոփոխությունները հիդրոլիզից առաջ և հետո, պատկերացում կազմել մկանային հյուսվածքում էներգիայով հարուստ միացություններին անկայուն միացած ֆոսֆորի քանակության վերաբերյալ: Ֆոսֆորի քանակությունը որոշում են ասկորբինաթթվի ներկայությամբ, ամոնիումի մոլիբդատի հետ առաջացրած համալիրի գունավորման ուժգնությամբ:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Մկանային հյուսվածք, CCl_3COOH-ի 5% լուծույթ, HCl-ի 1 Մ լուծույթ, NaOH-ի 1 Մ լուծույթ, $(NH_4)_2MoO_4$-ի 1% լուծույթ, $C_6H_8O_6$-ի 1% լուծույթ:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, Պոտեր-Էլվեջեյմի հոմոգենիզատոր, լուսաէլեկտրագունաչափ:

Աշխատանքի ընթացքը.

0.5 գ մկանային հյուսվածքը հոմոգենացնել սառեցված 5.0 մլ CCl_3COOH լուծույթում սառը պայմաններում: Հոմոգենատի վերնստվածքը տեղափոխել սառույցում տեղադրված փորձանոթի մեջ: Նստվածքին ավելացնել 5.0 մլ սառը թորած H_2O, ապակյա ձողիկով խառնել 5 րոպե, լուծամզվածքը զտել նույն փորձանոթի մեջ, ծավալը հասցնել 10.0 մլ և լուծույթն օգտագործել մակրոէրգիկ միացության քանակության որոշման համար: Պատրաստել խառնուրդներ՝ հետևյալ աղյուսակի համաձայն:

Ռեակտիվներ	Նմուշներ (մլ)	
	Փորձնական	Ստուգիչ
Զտվածք	0.5	0.5
HCl	1.0	1.0
	Եռացնել 10 րոպե	Չեռացնել
NaOH	1.0	1.0
H_2O	7.5	7.5
	Փորձնական և ստուգիչ նմուշներից 5-ական մլ տեղափոխել մաքուր փորձանոթների մեջ	
$(NH_4)_2MoO_4$	0.5	0.5
$C_6H_8O_6$	0.5	0.5
H_2O	2.0	2.0

Լուծույթները խառնել, թողնել սենյակային ջերմաստիճանում 10 րոպե, գունաչափել H_2O-ի դիմաց (ԼԷԳ, ալիքի երկարությունը 630-670 նմ, կարմիր լուսաֆիլտր, կյուվետի լայնությունը 1.0 սմ):

Փորձնական նմուշում (հիդրոլիզից հետո) որոշվող անօրգանական ֆոսֆատը կազմում է հյուսվածքների ֆոսֆատային աղերի և անկայուն կապված ֆոսֆորի գումարը: Ստուգիչ նմուշում որոշվում է միայն հյուսվածքների ֆոսֆատային աղերի քանակությունը: Փորձնական և ստուգիչ նմուշների օպտիկական խտության տարբերությունը ցույց է տալիս թույլ կապված ֆոսֆորի քանակությունը (ֆոսֆորի քանակությունը որոշել տրամաչափական կորի օգնությամբ (աշխ. 2.33), անօրգանական ֆոսֆատի կոնցենտրացիան նմուշներում 20-200 մկգ):

Հաշվարկել 100 գ հյուսվածքի անկայուն կապված ֆոսֆորի քանակությունը (մգ)՝ հաշվի առնելով նոսրացումները

$$X = 100 \cdot A \cdot (3.3 \cdot 400),$$

որտեղ

X – մակրոէրգիկ միացությունների (ԱԵՖ) պարունակությունն է մգ-ով 100 գ հյուսվածքում, մգ/%,

A – ֆոսֆորի քանակությունը նմուշում, մգ,

$3.3 \cdot 400$ – 1 գ հյուսվածքին համապատասխանող վերահաշվարկի գործակիցը ըստ նոսրացումների:

ԱԾԽԱՋՐԵՐԻ ՓՈԽԱՆԱԿՈՒԹՅԱՆ ՄԻՋԱՆԿՅԱԼ ԱՐԳԱՍԻՔՆԵՐԸ

Աշխատանք 2.33. Ֆոսֆոտրիոզների քանակական որոշումը

Գլիկոլիզի միջանկյալ արգասիք Ֆրուկտոզ-1,6-երկֆոսֆատը ճեղքվում է ալդոլազ ֆերմենտով (E.C. 4.1.2.13)՝ առաջացնելով գլիցերալդեհիդ-3-ֆոսֆատ և դիօքսիացետոնֆոսֆատ: Ռեակցիան դարձելի է, ռեացիայի հավասարակշռությունը ուղղված է դեպի ֆոսֆոտրիոզների առաջացումը: Առաջացած տրիոզները փոխակերպվում են միմյանց իզոմերազ ֆերմենտի մասնակցությամբ և ռեակցիայի հավասարկշռությունն ուղղվում է դեպի դիօքսիացետոնֆոսֆատի (97%) առաջացումը (22:1): Սակայն գլիկոլիզի հաջորդ փուլում ներգրավված է գլիցերալդեհիդ-3-ֆոսֆատը, հետևաբար առաջացած դիօքսիացետոնֆոսֆատը վերափոխվում է գլիցերալդեհիդֆոսֆատի, երբ բջիջն էներգիայի կարիք ունի, և ակտիվացած է գլյուկոզի օքսիդացումը: Ֆոսֆոտրիոզներ գլիցերալդեհիդֆոսֆատը և դիօքսիացետոնֆոսֆատը սենյակային ջերմաստիճանի պայմաններում, հիմնային միջավայրում հեշտությամբ են-թարկվում են հիդրոլիզի՝ անջատելով անօրգանական ֆոսֆատ: Անջատված ֆոսֆատի քանակությունը համապատասխանում է միջավայրում ֆոսֆոտրիոզների քանակությանը:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Մկանային հյուսվածք, CCl_3COOH-ի 10% լուծույթ, KOH-ի կամ NaOH-ի 2 Մ լուծույթ, HCl-ի կամ H_2SO_4-ի 2 Մ լուծույթ, $(NH_4)_2MoO_4$-ի 1% լուծույթ H_2SO_4-ի 0.025 Մ լուծույթում, ասկորբինաթթվի ($C_6H_8O_6$) 1% լուծույթ (թարմ պատրաստած):

Սարքեր և պարագաներ: Չափիչ գլաններ, չափիչ անոթներ, հավանգ, ձագար, փորձանոթներ, կաթոցիչներ, լուսաէլեկտրագունաչափ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Ֆոսֆոտրիոզների քանակությունը կարելի է որոշել փորձնական նմուշում (հիմնային միջավայր) և ստուգիչում (առանց հիմքի) առաջացած անօրգանական ֆոսֆատի քանակության տարբերությամբ:

0,5 գ մկանային հյուսվածքը մանրացնել, ավելացնել 5 մլ սառը CCl_3COOH, թողնել 10 րոպե (սառույցի վրա), ճողիկով անընդհատ խառնել: Ավելացնել 5 մլ թորած H_2O և զտել թղթյա ֆիլտրով: Պատրաստել փորձնական և ստուգիչ նմուշներ: Փորձնական նմուշը պետք է պարունակի 1 մլ մկանային լուծամզվածքի զտվածք (սպիտակուցից զուրկ), 1 մլ NaOH-ի լուծույթ: Խառնուրդը թափահարել, թողնել 20 րոպե սենյակային ջերմաստիճանում, հիմքի չեզոքացման նպատակով ավելացնել 1 մլ HCl-ի լուծույթ: Ստուգիչ

նմուշում լցնել 1 մլ NaOH-ի լուծույթ և 1 մլ HCl-ի լուծույթ, ավելացնել 1 մլ զտվածք, խառնել, թողնել 20 րոպե: Փորձնական և ստուգիչ նմուշներին ավելացնել 0.5 մլ $(NH_4)_2MoO_4$-ի լուծույթ և 0.5 մլ $C_6H_8O_6$-ի լուծույթ, ծավալները հասցնել 10 մլ, թողնել 10 րոպե սենյակային ջերմաստիճանում: Նմուշները գունաչափել H_2O-ի դիմաց (ԼԷԳ, ալիքի երկարությունը 630-670 նմ, կարմիր լուսաֆիլտր, կյուվետի լայնությունը 1 սմ): Փորձնական նմուշը գունաչափել ստուգիչի դիմաց և նմուշում ֆոսֆորի քանակությունը հաշվարկել ըստ ֆոսֆորի տրամաչափական կորի:

Ֆոսֆոտրիոզների քանակությունը հաշվարկել հետևյալ բանաձևով.

$$X = Dm * 200 * 100,$$

$$Dm = m_1 - m_2$$

որտեղ,

X – ֆոսֆոտրիոզների քանակությունն է 100 գ մկանային հյուսվածքում,

100 – նմուշի նոսրացումը,

200 – 100 գ մկանային հյուսվածքին համապատասխան վերահաշվարկի գործակիցը,

D_1 – փորձանական նմուշի օպտիկական խտությունը,

D_2 – ստուգիչ նմուշի օպտիկական խտությունը,

m_1 – PO_4^{3-}-ի քանակությունը փորձնական նմուշում,

m_2 – PO_4^{3-}-ի քանակությունը ստուգիչ նմուշում,

Dm – Ֆոսֆոտրիոզներին համարժեք անկայուն (լաբիլ) ֆոսֆորի քանակությունը:

Ֆոսֆորի քանակական որոշումը

Մեթոդը թույլ է տալիս բացահայտել 3-6 մկգ ֆոսֆոր 1 մլ հետազոտվող լուծույթում: Մեթոդի զգայունությունը բարձրանում է պղնձի իոնների ներկայությամբ:

Տրամաչափական կորի կառուցումը.

Ռեակտիվներ: Ստանդարտ լուծույթ - 0.0439 գ KH_2PO_4-ը լուծել 100 մլ ջրում (1 մլ լուծույթը կպարունակի 0.1 մգ ֆոսֆոր), ստանդարտ լուծույթը նոսրացնել 4 անգամ (25 մլ ֆոսֆատային լուծույթի ծավալը չափիչ անոթում հասցնել 100 մլ, 1մլ աշխատանքային լուծույթը կպարունակի 0.025 մգ ֆոսֆոր), ացետատային բուֆեր pH 4.0 (56.88 մլ 1 Ն CH_3COOH լուծույթին ավելացնել 10 մլ 1 Ն NaOH-ի լուծույթ, ծավալը հասցնել 100 մլ), $(NH_4)_2MoO_4$-ի 1%

լուծույթ H_2SO_4-ի 0.025 Մ լուծույթում, $C_6H_8O_6$-ի 1% լուծույթ (թարմ պատրաստված):

Տրամաչափական կորի կառուցման համար պատրաստել նմուշներ՝ ըստ հետևյալ աղյուսակի:

N	KH_2PO_4 լ-քի խտություն, մկգ/մլ	KH_2PO_4, մլ	Ացետատային բուֆեր, մլ	$(NH_4)_2MoO_4$, մլ	$C_6H_8O_6$, մլ	Ընդհանուր ծավալ, մլ	Օպտիկական խտություն
1	12.5	0.05	5.5	0.5	0.5	6.5	
2	25	0.1	5.4	0.5	0.5	6.5	
3	50	0.2	5.3	0.5	0.5	6.5	
4	75	0.3	5.2	0.5	0.5	6.5	
5	100	0.4	5.1	0.5	0.5	6.5	
6	125	0.5	5.0	0.5	0.5	6.5	

10 րոպե անց նմուշները գունաչափել H_2O-ի դիմաց (ԼԷԳ, ալիքի երկարությունը 630-670 նմ, կարմիր լուսաֆիլտր, կյուվետի լայնությունը 1 սմ):

Աշխատանք 2.34. Կաթնաթթվի քանակական որոշումն ըստ Ուֆելմանի (I եղանակ)

Նյութեր և ռեակտիվներ: Սկանային հյուսվածք, $CH_3CH(OH)COOH$-ի ստանդարտ լուծույթ (25 մկգ/մլ), CCl_3COOH-ի 10% լուծույթ, C_6H_5OH-ի 1% լուծույթ, $FeCl_3$-ի 1% լուծույթ:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, հավանգ, ցենտրիֆուգ, լուսաէլեկտրագունաչափ:

Աշխատանքի ընթացքը.

2 գ մկանային հյուսվածքը տրորել հավանգում, ավելացնել 10 մլ CCl_3COOH: 10 րոպե անց նմուշը ցենտրիֆուգել 3000 պտ/ր արագությամբ 10 րոպե, վերնստվածքն անջատել:

Տրամաչափական կորի կառուցումը: Հինգ փորձանոթների մեջ լցնել 1-ական մլ տարբեր քանակներ պարունակող կաթնաթթու (5; 10; 15; 20; 25 մկգ), վեցերորդ փորձանոթի մեջ՝ 1 մլ մկանային հյուսվածքի վերնստվածք, ստուգիչ նմուշի մեջ՝ 1 մլ թորած H_2O: Փորձանոթների մեջ ավելացնել 1-ական մլ C_6H_5OH-ի և 0.5-ական մլ $FeCl_3$-ի լուծույթներ: Կաթնաթթուն երկաթի ֆենոլյատի ներկայությամբ (Ուֆելմանի ռեակցիա) վերածվում է երկաթի լակտատի (դեղնականաչավուն գունավորում):

15 րոպե անց նմուշները գունաչափել H_2O-ի դիմաց (ԼԷԳ, կանաչ լուսաֆիլտր, ալիքի երկարությունը 425 նմ, կյուվետի լայնությունը 0.5 սմ), տվյալները գրանցել աղյուսակում:

Կաթնաթթու (մկգ/մլ)	5	10	15	20	25	Սկանային լուծամզվածք	Ստուգիչ (մլ)
Օպտիկական խտություն							

Ստացված տվյալների հիման վրա կառուցել տրամաչափական կոր: Աբսցիսների առանցքին տեղադրել կաթնաթթվի քանակությունը, օրդինատների առանցքին՝ օպտիկական խտության համապատասխան արժեքները (երկու զուգահեռ որոշումների միջին թվաբանականը): Սկանային լուծամզվածքում կաթնաթթվի քանակությունն որոշել ըստ տրամաչափական կորի:

Աշխատանք 2.35. Կաթնաթթվի քանակական որոշումը (II եղանակ)

Կաթնաթթվի քանակական որոշման գունաչափական մեթոդի հիմքում կաթնաթթվի և երկաթի քլորիդի փոխազդեցության հետևանքով դեղին երանգավորման առաջացումն է: Գունավորման ուժգնությունն աճում է թթվի կոնցենտրացիային համարժեք:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Արյան շիճուկ, $CH_3CH(OH)COOH$ (տրամաչափական կորի կառուցման համար), մկանային հյուսվածք, $BaCl_2$-ի 10% լուծույթ, NaOH-ի 0.66 Ն լուծույթ, $ZnSO_4$-ի 22% լուծույթ, $FeCl_3$-ի 1% լուծույթ:

Սարքեր և պարագաներ: Չափիչ անոթներ, փորձանոթներ, կաթոցիչներ, ձագար, լուսաէլեկտրագունաչափ:

Աշխատանքի ընթացքը.

5 մլ շիճուկին ավելացնել 2 մլ $BaCl_2$-ի լուծույթ, 2 մլ NaOH-ի լուծույթ և 1 մլ $ZnSO_4$-ի լուծույթ: Ռեակտիվները լցնել արագ, յուրաքանչյուր ռեակտիվը լցնելուց հետո խառնուրդը թափահարել 30 վրկ.: Ստացված հեղուկը զտել: Զտվածքից 1 մլ տեղափոխել 100 մլ ծավալով չափիչ անոթի մեջ, ծավալը հասցնել 100 մլ: Ստացած լուծույթի 10 մլ-ին ավելացնել 1 մլ $FeCl_3$: Որոշել լուծույթի օպտիկական խտությունը (ԼԷԳ, կապույտ լուսաֆիլտր, կյուվետի լայնությունը 1 սմ): Կաթնաթթվի քանակությունը որոշել՝ համաձայն տրամաչափական կորի (աշխ 2.34):

Աշխատանք 2.36. Պիրոխաղողաթթվի քանակական որոշումն արյան շիճուկում

Կենսաբանական հեղուկներում, տարբեր հյուսվածքներում կիրառվում են պիրոխաղողաթթվի որոշման տարբեր մեթոդներ՝ ֆերմենտային, գունաչափական: Պիրոխաղողաթթվի քանակական որոշման գունաչափական մեթոդը հիմնված է հիմնային միջավայրում պիրոխաղողաթթվի և 2,4-դինիտրոֆենիլհիդրազինի փոխազդեցության հետևանքով առաջացած 2,4-դինիտրոֆենիլհիդրազոնի դեղնանարնջագույն երանգավորման վրա: Գունավորման ուժգնությունն աճում է պիրոխաղողաթթվի կոնցենտրացիային համարժեք:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Արյան շիճուկ, 2,4-դինիտրոֆենիլհիդրազինի ($C_6H_6N_4O_4$) 0.1% լուծույթ լուծված 1 Ն HCl-ում, CCl_3COOH 5% լուծույթ, KOH-ի 2.5% սպիրտային լուծույթ, պիրոխաղողաթթվի ($C_3H_4O_3$) ստանդարտ լուծույթ (1 մլ-ում 50 մկգ պիրոխաղողաթթու):

Սարքեր և պարագաներ: Չափիչ անոթներ, փորձանոթներ, կաթոցիչներ, լուսաէլեկտրագունաչափ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Փորձանոթի մեջ լցնել 1 մլ շիճուկ, ավելացնել 1 մլ CCl_3COOH, խառնել 1 րոպե, ցենտրիֆուգել 5 րոպե 3000 պտ/ր արագությամբ: Վերնստվածքին ավելացնել 0.5 մլ $C_6H_6N_4O_4$, խառնել, թողնել 15 րոպե սենյակային ջերմաստիճանի պայմաններում: Ստուգիչ նմուշ – 1 մլ H_2O, 1 մլ CCl_3COOH: Փորձնական նմուշի օպտիկական խտությունը չափել ըստ ստուգիչի (ԼԷԳ, ալիքի երկարությունը 465 նմ, կապույտ լուսաֆիլտր, կյուվետի լայնությունը 0.5 սմ):

Նմուշում պիրոխաղողաթթվի քանակությունը որոշել տրամաչափական կորի օգնությամբ:

Տրամաչափական կորի կառուցումը: Վեց փորձանոթների մեջ լցնել 0.1; 0.2; 0.4; 0.6; 0.8; 1 մլ $C_3H_4O_3$-ի ստանդարտ լուծույթ: Առաջին հինգ փորձանոթների մեջ ավելացնել թորած H_2O՝ նմուշների ծավալները հասցնելով 1 մլ: Յոթերորդ փորձանոթի՝ ստուգիչի մեջ լցնել 1 մլ թորած H_2O: Բոլոր ութ փորձանոթներին ավելացնել 1-ական մլ KOH, պարունակությունը 1 րոպե խառնել, ավելացնել 0.5-ական մլ $C_6H_6N_4O_4$, խառնել և թողնել սենյակային ջերմաստիճանի պայմաններում 10-15 րոպե:

Ստացած նմուշները գունաչափել (ԼԷԳ, ալիքի երկարությունը 465 նմ, կապույտ լուսաֆիլտր, կյուվետի լայնությունը 0.5 սմ), տվյալները գրանցել աղյուսակում:

Պիրոխաղողաթթվի ստանդարտ լուծույթ (մլ)	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	Ստուգիչ (մլ)
Պիրոխաղողաթթվի կոնցենտրացիա, (մկգ/մլ)							
Լուծույթի օպտիկական խտություն							

Կառուցել տրամաչափական կոր: Աբսցիսների առանցքին տեղադրել պիրոխաղողաթթվի կոնցենտրացիայի (մկգ) ցուցանիշները, օրդինատների առանցքին՝ օպտիկական խտության համապատասխան արժեքները (երկու զուգահեռ որոշումների միջին թվաբանականը):

Աշխատանք 2.37. Պիրոխաղողաթթվի քանակական որոշումը կենդանական հյուսվածքներում (Յոկ-Լամպրեխտի մեթոդ)

Պիրոխաղողաթթուն՝ ածխաջրային փոխանակության կարևորագույն միջանկյալ միացությունը, անաերոբ պայմաններում լակտատդեհիդրոգենազի ազդեցությամբ վերականգնվում է կաթնաթթվի՝

$$\text{պիրոխաղողաթթու} + \text{ՆԱԴ-H} + H^+ \leftrightarrow \text{կաթնաթթու} + \text{ՆԱԴ}^+$$

Թթվածնի առկայության պայմաններում պիրուվատդեհիդրոգենազային համալիրի ազդեցությամբ պիրոխաղողաթթուն վերածվում է ացետիլ-KoA-ի: Ացետիլ-KoA-ն Կրեբսի ցիկլում օքսիդանում է մինչև CO_2 և H_2O՝ դառնալով էներգիայի աղբյուր:

Ռեակցիայի ընթացքում օգտագործված պիրոխաղողաթթուն համարժեք է ՆԱԴ-H-ի քանակությանը: Ֆիզիոլոգիական պայմաններում առավել կարևոր է պիրոխաղողաթթվի փոխակերպման առաջին և ամենադանդաղ փուլը կատալիզող պիրուվատդեհիդրոգենազային ֆերմենտային համալիրի բաղադրիչի՝ պիրուվատդեհիդրոգենազի ակտիվության կարգավորումը: Պիրոխաղողաթթվի փոխանակությանը մասնակցող պիրուվատդեհիդրոգենազ ֆերմենտի դերը տարբեր օրգաններում տարբեր է:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Կենդանական հյուսվածք, $HClO_4$-ի 0.6 Ն լուծույթ (պատրաստել աշխատանքից առաջ), K_2CO_3-ի 5 Մ լուծույթ, 0.5 Մ եռէթանոլամինային լուծույթ՝ պատրաստված 5 մՄ ԷԴՏԱ-ում (էթիլենդիամինտետրաացետատ) pH 7.6 (պատրաստել աշխատանքի նախորդ օրը, օգտագործելուց առաջ pH-ը ստուգել), 6 մՄ ՆԱԴ-H -ի լուծույթ (պատրաստել անմիջապես աշխատանքից առաջ), լակտատդեհիդրոգենազի նոսրացված պատ-

րաստուկ (0.5 մգ ֆերմենտային սպիտակուցը 1 մլ H_2O-ում) կամ մկանային լուծամզվածք (1:25):

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, հոմոգենիզատոր, ցենտրիֆուգ, սպեկտրալուսաչափ:

Աշխատանքի ընթացքը.

200 մգ հյուսվածքը (գլխուղեղի, լյարդի, սրտամկանի) հոմոգենացնել 4°C պայմաններում 1.8 մլ $HClO_4$-ում (1:9): Հոմոգենատը տեղափոխել ցենտրիֆուգի փորձանոթի մեջ, թողնել 15 րոպե սառը պայմաններում (պիրոխաղողաթթվի լիարժեք լուծամզման նպատակով): Նստեցրած սպիտակուցներն անջատել հոմոգենատը ցենտրիֆուգելով 10 րոպե (3000 g): Սպիտակուց չպարունակող վերնստվածքը նորից տեղափոխել ցենտրիֆուգի փորձանոթի մեջ, $HClO_4$-ի ավելցուկից ազատվելու համար ավելացնել 0.2 մլ K_2CO_3, 10 րոպե թողնել սառը պայմաններում: Նստվածքն անջատել ցենտրիֆուգմամբ (10 րոպե, 3000 g) կամ զտմամբ: Ստացված լուծամզվածքում որոշել պիրոխաղողաթթվի քանակությունը:

Ստացված վերնստվածքից 0.8 մլ տեղափոխել սպեկտրալուսաչափի կյուվետի մեջ, ավելացնել 1.2 մլ եռէթանոլամինային լուծույթ, հաստատել սպեկտրալուսաչափի «0»-ական ցուցանիշ: Կյուվետի մեջ ավելացնել 0.05 մլ ՆԱԴ-Հ, խառնել և չափել օպտիկական խտության ելակետային արժեքը (E_1): Այնուհետև նմուշին ավելացնել 0.05 մլ լակտատդեհիդրոգենազի պատրաստուկ (կամ հյուսվածքային լուծամզվածք), խառնել և ֆերմենտային ռեակցիայի դադարից (օպտիկական խտության կայուն արժեքի հաստատումից) 5-10 րոպե անց չափել E_2-ը: Ֆերմենտային սպիտակուցի ավելացման հետևանքով նմուշի օպտիկական խտության փոփոխությունը հաշվի առնելու նպատակով լակտատդեհիդրոգենազային ռեակցիայի ավարտից անմիջապես հետո նմուշին ավելացնել 0.05 մլ ֆերմենտային պատրաստուկ, խառնել և անմիջապես չափել օպտիկական խտությունը (E_3): Ռեակցիայի ընթացքում ծախսված պիրոխաղողաթթվի քանակությունը համարժեք է ՆԱԴ-Հ-ի քանակության նվազմանը, ինչը գրանցվում է սպեկտրալուսաչափով (ալիքի երկարությունը 340 նմ, կյուվետի լայնությունը 1 սմ):

Պիրոխաղողաթթվի պարունակությունը (մկմոլ/գ հյուսվածքում) հաշվարկել հետևյալ բանաձևով.

$$X = \Delta E \cdot V \cdot K / 6.22 \text{ (մկմոլ/գ)},$$

որտեղ,

ΔE – օպտիկական խտության փոփոխությունն է պիրոխաղողաթթվի վերականգնման ռեակցիայի ընթացքում,

$\Delta E = (E_1 - E_2) – (E_3 - E_2)$,

V – նմուշի վերջնական ծավալը կյուվետում (2.1 մլ),

6.22 – պիրիդինդիոկլեոտիդների վերականգնված ձևի օպտիկական խտության գործակիցը, կյուվետի 1 սմ լայնության և 340 նմ ալիքի երկարության դեպքում,

K – 1գ հյուսվածքի նոսրացման գործակիցը, տվյալ դեպքում համապատասխանում է 12.44:

Հարցեր

1. Ո՞ր ռեակցիաներն են բացահայտում շաքարների վերականգնող հատկությունները:
2. Ո՞րն է Թրոմերի ռեակցիայի սկզբունքը:
3. Ո՞ր ռեակցիան է ավելի բնորոշ կետոզների բացահայտման համար:
4. Ո՞ր շաքարներին է բնորոշ Բարֆեդի ռեակցիան:
5. Ո՞րն է Սելիվանովի ռեակցիայի սկզբունքը:
6. Ո՞րն է սախարոզի բացահայտման եղանակը:
7. Որո՞նք են գլյուկոզի քանակական որոշման եղանակները:
8. Որտե՞ղ և ո՞ր ֆերմենտներն են իրականացնում ածխաջրերի մարսումը:
9. Որո՞նք են ածխաջրերը բնորոշող որակական ռեակցիաները:
10. Ինչո՞վ են պայմանավորված շաքարների վերականգնող հատկութունները:
11. Ո՞ր ռեակցիայի շնորհիվ են բացահայտվում դեզօքսիպենտոզները:
12. Ո՞րն է գլյուկոզի որոշման Հագեդորն-Յենսենի եղանակի առավելությունը:
13. Ի՞նչ թթուներ են առաջանում մոնոսախարիդների ալդեհիդային խմբի օքսիդացման արդյունքում:
14. Որո՞նք են օլիգո և մոնոսախարիդները տարբերակող ռեակցիաները:
15. Ո՞ր օլիգոսախարիդները չեն ցուցաբերում վերականգնող հատկություններ և ինչո՞ւ:
16. Ինչպե՞ս բացահայտել միջավայրում օսլայի առկայությունը:
17. Որո՞նք են ալդոպենտոզները բնորոշող ռեակցիաները:
18. Ո՞րն է Ուֆելմանի ռեակցիայի սկզբունքը:
19. Ինչպե՞ս ապացուցել, որ մկանային հյուսվածքում ընթանում է գլիկոլիզ:
20. Ո՞ր ածխաջրերն են թթվային միջավայրում փոխազդում ռեզորցինի հետ:
21. Ի՞նչ գործառույթ է իրականացնում թաղանթանյութը բույսերում:
22. Որո՞նք են գլիկոլիզի վերջնական արգասիքները:
23. Նշված ո՞ր ածխաջրերին է (ֆրուկտոզ, գլյուկոզ, մալթոզ, սախարոզ, ռեզօքսիռիբոզ) բնորոշ Թրոմերի ռեակցիան:
24. Ո՞րն է ԱԵՖ-ի որոշման նպատակը:

ԳԼՈՒԽ 3
ԼԻՊԻԴՆԵՐ

Լիպիդները բնական օրգանական միացություններ են, որոնց պատկանում են չեզոք լիպիդները, մոմերը, ֆոսֆոլիպիդները, գլիկոլիպիդները, ստերոիդները: Բոլոր լիպիդների ընդհանուր հատկությունը լուծելիությունն է օրգանական ոչ բևեռային լուծիչներում՝ քլորոֆորմում, բենզոլում, տաք սպիրտում, եթերում: Լիպիդները լայն տարածվածություն ունեն, հանդիպում են յուրաքանչյուր բջջում: Շատ լիպիդներ և դրանց ածանցյալները կենսաբանական ակտիվ միացություններ են:

Բուսական օրգանիզմներում լիպիդները կուտակվում են սերմերի, պտուղների պաշարային հյուսվածքների բջիջներում: Լիպիդների պարունակությունը սերմերում, պտուղներում կախված է տարբեր գործոններից, առաջին հերթին բույսի տեսակից, աճի պայմաններից: Արևածաղկի սերմերում լիպիդների քանակությունը կազմում է 33-57%, եգիպտացորենի սաղմում՝ 18-50%, կակաոյում՝ 49-57%, սոյայի սերմերում՝ 14-25%:

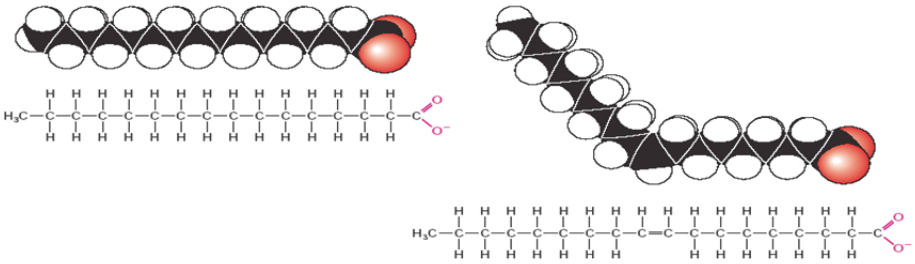
Կենդանական ճարպերը տեղակայված են ճարպային հյուսվածքի բջիջներում՝ ադիպոցիտներում, և զբաղեցնում են այդ բջիջների կենտրոնական մասը: Ճարպերը կազմում են ճարպային հյուսվածքի զանգվածի 98%-ը:

Լիպիդների հիմնական գործառույթներն են՝

- կառուցվածքային – բջիջների կենսաբանական թաղանթների բաղադրիչներից են, իսկ որոշ լիպիդներ վիտամինների, հորմոնների նախանյութ են,
- էներգիային – 1 գ ճարպի օքսիդացումից անջատվում է 39 կՋ էներգիա,
- պաշարային – նորմայում հասուն մարդու օրգանիզմում պարունակվում է 6-10 կգ ճարպ, որը քաղցի պայմաններում 40-50 օր կարող է էներգիայով ապահովել օրգանիզմը,
- պաշտպանական – պաշտպանում է օրգանիզմը ջերմային ազդեցությունից, մեխանիկական, ֆիզիկական վնասվածքներից, ջրազրկումից:

Լիպիդները բաժանվում են երկու հիմնական դասերի՝ պարզ և բարդ լիպիդների:

Պարզ լիպիդների հիդրոլիզի արգասիքներն են ճարպաթթուները և սպիրտները: Ճարպաթթուները էներգիայի կարևորագույն աղբյուր են, օրգանիզմներում հանդիպում են ինչպես ազատ ձևով, այնպես էլ տարբեր լիպիդների (չեզոք ճարպեր, գլիցերոֆոսֆոլիպիդներ, սֆինգոֆոսֆոլիպիդներ և այլն) կազմում: Օրգանիզմի ճարպաթթուները հիմնականում բաղկացած են 12-24 ածխածնի ատոմներից (ավելի հաճախ 16 կամ 18): Ճարպաթթուները տարբերվում են ածխաջրածնային շղթայի երկարությամբ, կրկնակի կապերի քանակով և դիրքով, ինչպես նաև լիպիդի մոլեկուլում իրենց դիրքով: Բոլոր ճարպաթթուների ¾ չհագեցած են: Չհագեցած ճարպաթթուները պարունակում են մեկ կամ մի քանի կրկնակի կապեր: Մարդու օրգանիզմի առավել կարևոր չհագեցած ճարպաթթուներից են օլեինաթթուն, լինոլեաթթուն, լինոլենաթթուն, արախիդոնաթթուն, հագեցած ճարպաթթուներից՝ պալմիտինաթթուն, ստեարինաթթուն (նկ. 3.1):

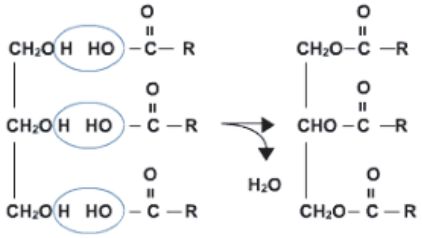


հագեցած պալմիտինաթթու **չհագեցած օլեինաթթու**

Նկ. 3.1. Ճարպաթթուների մոլեկուլներ:

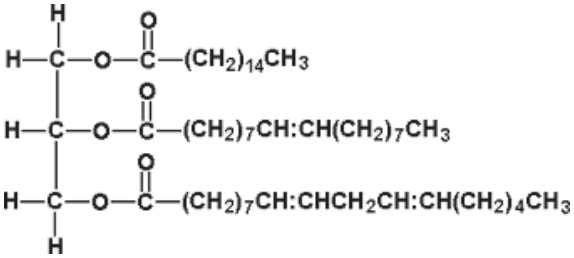
Օրգանիզմում լինոլեաթթվից սինթեզվում է էյկոզանոիդների նախանյութ արախիդոնաթթուն: Էյկոզանոիդները ֆիզիոլոգիապես ակտիվ միացություններ են, որոնք ներկայացված են երեք հիմնական խմբով՝ պրոստագլանդիններ, լեյկոտրիեններ, թրոմբոքսաններ: Այս անկայուն, ջրում անլուծելի միացությունները ցուցաբերում են հորմոնանման ազդեցություն: Սակայն ի տարբերություն հորմոնների՝ էյկոզանոիդները ներգործում են իրենց սինթեզի վայրում գտնվող բջիջների վրա:

Պարզ լիպիդները՝ չեզոք ճարպերը (եռացիլգլիցերոլներ), գլիցերոլի և ճարպաթթվի բարդ եթերներ են, պահեստավորվում են ճարպային հյուսվածքի բջիջներում՝ ադիպոցիտներում, համարվում են էներգիայի պահպանման առավել սեղմ և էներգատար ձևը: Եռացիլգլիցերոլների ֆիզիկաքիմիական հատկությունները պայմանավորված են ճարպաթթուների կազմով և դրանց



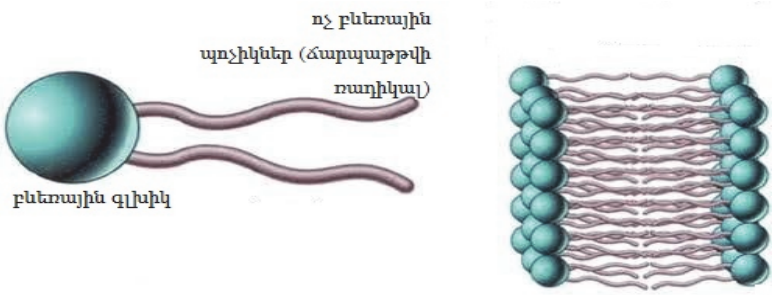
եռգլիցերիդի առաջացումը

տեղակայմամբ: Եռացիլգլիցերոլներում հայտնաբերված են մոտ 200 տեսակի կարբոնաթթուներ: Առավել տարածված են 12-18 ածխածնի ատոմ պարունակող ճարպաթթուները: Եթե ճարպաթթուներով էսթերացված են գլիցերինի բոլոր հիդրօքսիլ խմբերը, միացությունն անվանվում է եռացիլգլիցերոլ, եթե երկուսը՝ դիացիլգլիցերոլ, մեկը՝ մոնոացիլգլիցերոլ: Ճարպերի կազմում ճարպաթթուները կարող են լինել միատեսակ կամ տարատեսակ:



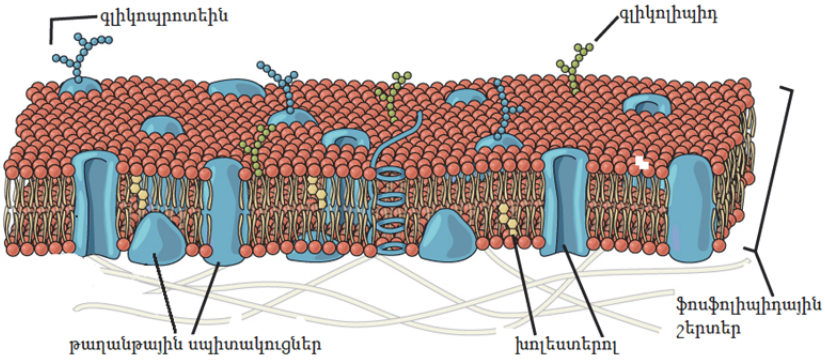
Կենդանական ճարպերը պարունակում են զգալի քանակությամբ հագեցած ճարպաթթուներ և սենյակային ջերմաստիճանում պինդ են: Հեղուկ ճարպերում (բուսական) մեծ է չհագեցած ճարպաթթուների քանակը:

Բարդ լիպիդները, օրինակ՝ ֆոսֆոլիպիդները, ամֆիֆիլ հատկությունների շնորհիվ կարող են առաջացնել թաղանթային երկշերտ կառուցվածքներ և կազմության մեջ առկա հիդրոֆիլ մասի՝ ֆոսֆորական թթվի շնորհիվ լիպոպրոտեինների մակերեսին ձևավորել հիդրոֆիլ մոնոշերտ: Այս բարդ լիպիդների առանձնահատկությունը մոլեկուլում ֆոսֆորական թթվի մնացորդի առկայությունն է (նկ. 3.2):



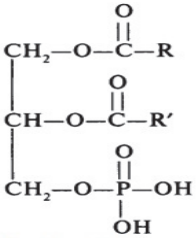
Նկ. 3.2. Ֆոսֆոլիպիդի ամֆիֆիլ կառուցվածքը:

Ֆոսֆոլիպիդները բաժանվում են գլիցերո և սֆինգոֆոսֆոլիպիդների, որոնց կազմում, բացի ֆոսֆորական թթվից, առկա են նաև գլիցերին կամ ամինասպիրտ սֆինգոզին, ճարպաթթուներ, ազոտային միացություններ (սերին, էթանոլամին, խոլին): Ֆոսֆոլիպիդները լայն տարածվածություն ունեն, որպես հիմնական կառուցվածքային բաղադրիչներ՝ ներգրավված են կենդանական, բուսական օրգանիզմների, մանրէների բջջաթաղանթներում, բնորոշում են բջջաթաղանթի կառուցվածքը, թափանցելիությունը, նաև թաղանթներում տեղակայված մի շարք ֆերմենտների ակտիվությունը (նկ. 3.3):



Նկ. 3.3. Բջջաթաղանթի կառուցվածքը:

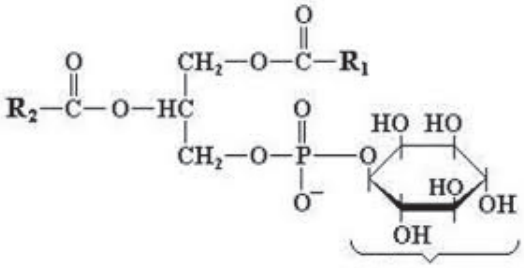
Գլիցերոֆոսֆոլիպիդները՝ ֆոսֆատիդաթթվի ածանցյալները, բջջաթաղանթի կարևոր լիպիդային բաղադրիչներ են, ֆոսֆորական թթվի աղբյուր են ծառայում մարդու կենսագործունեության ընթացքում:



ֆոսֆատիդաթթու

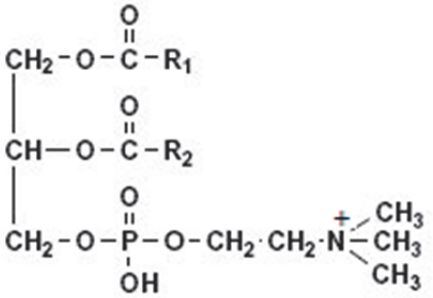
Գոյություն ունի գլիցերոֆոսֆոլիպիդների մի քանի խումբ՝ լեցիտիններ (ֆոսֆատիդիլխոլին), կեֆալիններ (ֆոսֆատիդիլէթանոլամին), ֆոսֆատիդիլսերին, ֆոսֆատիդիլինոզիտոլ, կարդիոլիպին, պլազմալոգեն: Կենդանական և բուսական օրգանիզմներում ավելի մեծ է լեցիտինների և կեֆալինների քանակությունը: Մեծ քանակությամբ ֆոսֆատիդիլխոլին հայտնաբերված է մարդու,

կենդանիների ուղեղի հյուսվածքում, արևածաղկի սերմերում, ցորենի սաղմում: Բակտերիաներում ֆոսֆատիդիլինոլինի պարունակությունը չնչին է:

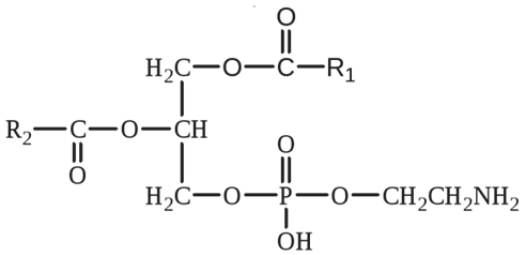


ինոզիտոլ

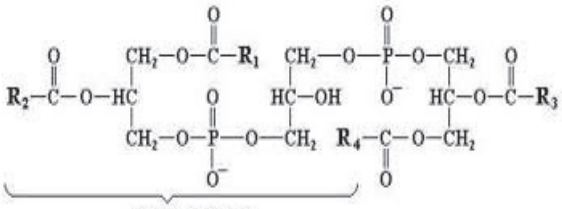
ֆոսֆատիդիլ ինոզիտոլ



ֆոսֆատիդիլխոլին



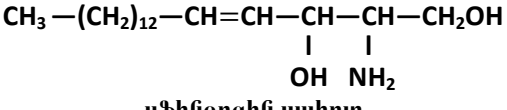
ֆոսֆատիդիլէթանոլամին



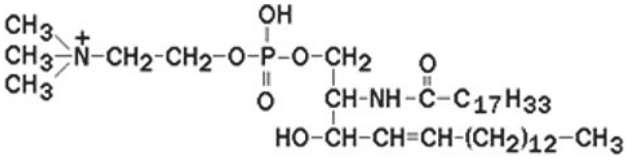
ֆոսֆատիդիլգլիցերոլ

կարդիոլիպին

Սֆինգոլիպիդները գլիցերոլիպիդների կառուցվածքային անալոգներն են, դրանց կազմում գլիցերինի փոխարեն սֆինգոզին սպիրտն է: Սֆինգոլիպիդները ներգրավված են բազմաթիվ բջիջների թաղանթների կազմում, հատկապես նյարդային բջիջների, որտեղ ձևավորում են նեյրոնների միելինային թաղանթները: Սֆինգոլիպիդների խմբին են պատկանում սֆինգոֆոսֆոլիպիդները (սֆինգոմիելիններ):

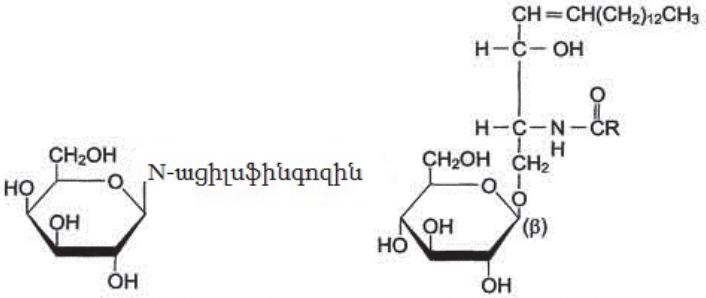


սֆինգոզին սպիրտ



սֆինգոմիելին

Գլիկոլիպիդները լայնորեն տարածված են ուղեղի հյուսվածքում, ներկայացված են երկու խմբով՝ ցերեբրոզիդներ, գանգլիոզիդներ: Ցերեբրոզիդները կազմված են սֆինգոզին սպիրտից, ճարպաթթվից (24 ածխածին), գլյուկոզից կամ գալակտոզից: Ցերեբրոզիդների պարունակությունը մեծ է ուղեղի սպիտակ նյութում:

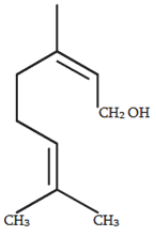


գալակտոցերեբրոզիդ **գլյուկոցերեբրոզիդ**

Գանգլիոզիդները բաղկացած են սֆինգոզին սպիրտից, ճարպաթթվից, մոնոսախարիդի փոխարեն պարունակում են փոփոխական օլիգոսախարիդային մաս:

Գանգլիոզիդների պարունակությունը մեծ է ուղեղի գորշ նյութում, հայտնաբերված են նյարդային հանգույցներում, առկա են էրիթրոցիտների թաղանթներում:

Լայն տարածվածություն ունեն չօճառացվող (չեն հիդրոլիզվում հիմքերում, թթուներում) լիպիդները՝ ստերոիդները և տերպենները: Տերպենները կազմված են 2, 3 և ավելի իզոպրենային հատվածներից՝ $(C_5H_8)_n$, հայտնաբերված են տարբեր եթերային յուղերում՝ վարդի, ճարդոսի, կիտրոնի, անանուխի, փշատերևի խեժում: Տերպեններին են պատկանում նաև բուսական գունանյութերը, ճարպալույծ վիտամինները, տերպենոիդային հատվածներ կան տարբեր կենսաբանական ակտիվ միացությունների կազմում: Տերպենները տարբերվում են իզոպրենային օղակներով, ունեն ցիկլիկ և ացիկլիկ կառուցվածք:



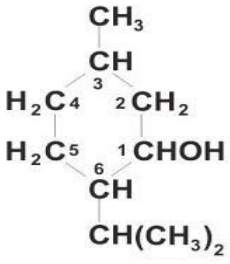
ացիկլիկ տերպեն գերանոիլ

Ացիկլիկ կառուցվածք ունեցող տերպենների տիպիկ ներկայացուցիչ է գայլուկի, դափնիների եթերային յուղի կազմի մոնոտերպեն - միրցենը:

Ցիկլիկ տերպենների ներկայացուցիչ է մենթոլը (հակաենխման միջոց, ցավազրկող), կամֆորան (սրտի աշխատանքի «խթանիչ»):

Կրկնվող իզոպրենային օղակներից կառուցված բնական պոլիմերները պոլիտերպենոիդներն են. դիտերպենոիդ ($C_{20}H_{32}$) ռետինոլը՝ վիտամին A-ի ակտիվ ձևը, եռտերպենոիդներ ($C_{30}H_{48}$) սկվալենը և լանոստերինը (ստերոիդների սինթեզի միջանկյալ միացությունները): Տետրատերպենոիդներ են ($C_{40}H_{64}$) կարոտինոիդները, բուսական գունանյութերը, որոնք բուսական հյուսվածքներին հաղորդում են դեղին, նարնջագույն, կարմիր գունավորում: Սրանց են պատկանում, օրինակ, α, β, γ - կարոտինները:

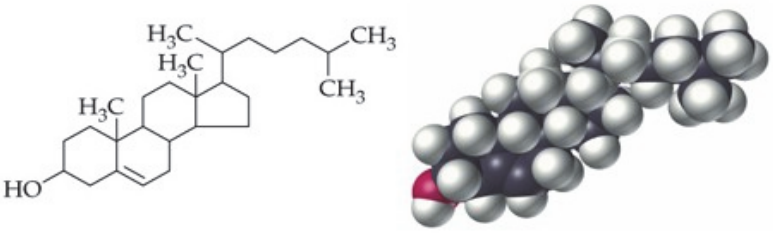
Ստերոիդները ցիկլոպենտանպերհիդրոֆենանտրենի ածանցյալներ են, կազմված են ոչ գծային կոնդենսացված 3 ցիկլոհեքսանային և մեկ ցիկլոպենտանային օղակներից, լայնորեն տարածված են բնության մեջ. հայտնի է ստերոիդների մոտ 2000 տեսակ: Ստերոիդներին են պատկանում կենսաբանական կարևոր միացությունները՝ լեղաթթուները, սեռական հորմոնները, մակերիկամի որոշ հորմոնները, սրտային գլիկոզիդները, բուսական ալկալոիդները, որոշ թույներ: Ստերոիդների կարևոր ներկայացուցիչներն են ստերինները (ստերոլները)՝ ստերոիդային սպիրտները: Տարբերում են զոոստերիններ (կենդանիների), ֆիտոստերիններ (բույսերի), միկոստերիններ (սնկերի), միկրոօրգանիզմների ստերիններ: Խմորասնկերի ստերոլներից կարելի է առանձնացնել վիտամին D_2-ի նախանյութ



ցիկլիկ տերպեն մենթոլ

էրգոստերոլը: Կարևոր ստերոլներից է բրդի լիպիդներում հայտնաբերված լանոստերոլը:

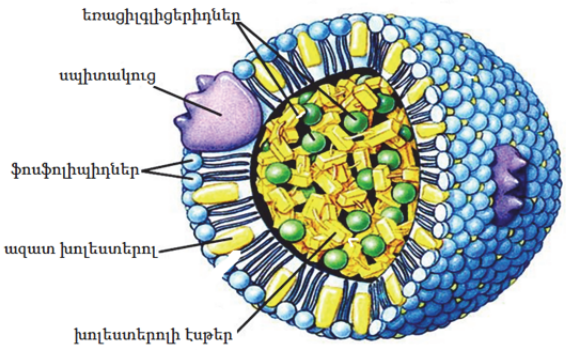
Խոլեստերինը (խոլեստերոլը) ստերինների գլխավոր ներկայացուցիչը, հայտնաբերված է կենդանական օրգանիզմների գրեթե բոլոր հյուսվածքներում, ինչպես ազատ, այնպես էլ ճարպաթթուների բարդ եթերների՝ խոլեստերիդների ձևով (նկ. 3.4): Խոլեստերինը բոլոր բջիջների թաղանթների պարտադիր բաղադրիչ է, արյան պլազմի լիպոպրոտեինների, լեղաթթուների, վիտամին D_3-ի, ստերոիդ հորմոնների սինթեզի նախանյութ:



Նկ. 3.4. Խոլեստերինի կառուցվածքը:

Օրգանիզմից խոլեստերինն արտազատվում է լեղաթթուների տեսքով, քանի որ մարդու օրգանիզմում չկան գանգանային (ստերանային) օղակները քայքայող ֆերմենտներ: Հայտնի են չորս լեղաթթուներ, որոնցից երկուսը՝ խոլաթթուն և խենոդեզօքսիխոլաթթուն, առաջնային են, սինթեզվում են լյարդում խոլեստերինի քայքայման արգասիքներից: Մյուս երկուսը՝ լիտոխոլաթթուն և դեզօքսիխոլաթթուն, երկրորդային են, առաջանում են առաջնային լեղաթթուներից աղիների միկրոօրգանիզմների ֆերմենտների ազդեցությամբ: Լեղաթթուները լեղու կազմում առկա են գլիցինի ($RCO\text{-}NH\text{-}CH_2\text{-}COONa$) և տաուրինի ($RCO\text{-}NH\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}SO_3Na$) հետ կոնյուգացված ձևով:

Լիպիդները օրգանիզմի ջրային միջավայրում չեն լուծվում, և դրանց տեղաշարժն արյան հոսքով իրականացնում են հատուկ միավորներ՝ լիպոպրոտեինները (լիպիդները միանում են սպիտակուցներին՝ առաջացնելով լիպոպրոտեիններ): Բոլոր լիպոպրոտեիններն



Նկ. 3.5. Լիպոպրոտեինի կառուցվածքը:

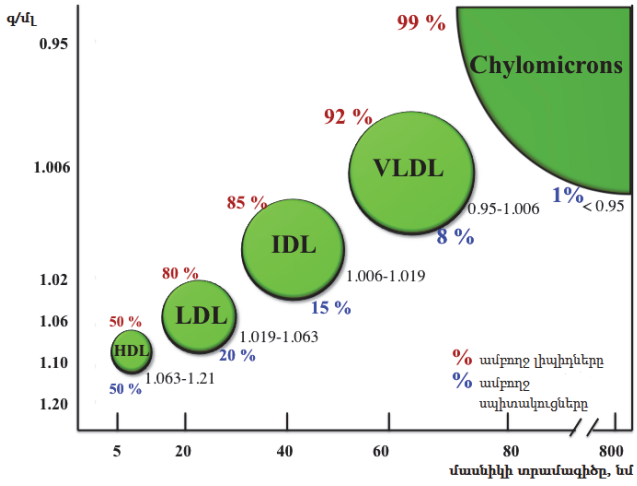
(նկ. 3.5) ունեն կառուցվածքային նմանություն՝ հիդրոֆոբ մոլեկուլներից կազմված (եռացիլգլիցերոլներ, խոլեստերոլի էսթերներ) միջուկ և արտաքին շերտ՝ բաղկացած ապոլիպոպրոտեիններից և ֆոսֆոլիպիդներից (վերջիններիս բևեռային խմբերն ուղղված են ջրային միջավայր, հիդրոֆոբ խմբերը՝ դեպի լիպոպրոտեինի հիդրոֆոբ միջուկ):

Լիպոպրոտեինների սպիտակուցներն անվանում են ապոսպիտակուցներ: Ամբողջական (ինտեգրալ) ապոսպիտակուցները կառուցվածքային բաղադրիչ են, ծայրային ապոսպիտակուցները կարող են փոխանցվել ապոլիպոպրոտեինի մի տեսակից մյուսին:

Տարբերակում են լիպոպրոտեինների չորս տեսակ՝

- բարձր խտության լիպոպրոտեիններ (ԲԽԼ),
- ցածր խտության լիպոպրոտեիններ (ՑԽԼ),
- շատ ցածր խտության լիպոպրոտեիններ (ՇՑԽԼ),
- խիլոմիկրոններ:

Լիպոպրոտեինները տարբերվում են սպիտակուցների քանակությամբ, լիպիդային բաղադրամասերի տոկոսային պարունակությամբ: Ինչքան շատ է լիպիդների քանակությունը լիպոպրոտեիններում, այնքան ցածր է դրանց խտությունը: Բարձր խտության լիպոպրոտեինները պարունակում են սպիտակուցների մեծ քանակություն (50-60%): Շատ ցածր խտության լիպոպրոտեինները պարունակում են քիչ սպիտակուց և մեծ քանակությամբ լիպիդներ (մոլեկուլային զանգվածի մինչև 95%): Լիպոպրոտեինները տարբերվում են նաև չափերով. ամենամեծը խիլոմիկրոնների մոլեկուլներն են, ամենափոքրը՝ բարձր խտության լիպոպրոտեինների մոլեկուլները (նկ. 3.6):



Նկ. 3.6. Տարբեր խտության լիպոպրոտեիններ:

Ցածր խտության լիպոպրոտեիները լյարդից հյուսվածքներ են տեղափոխում էնդոգեն խոլեստերինը, եռացիլգլիցերիդները և ֆոսֆոլիպիդները: Այս լիպոպրոտեիները պարունակում են 45% խոլեստերին, արյան մեջ խոլեստերինի փոխադրող ձևն են: Առաջանում են շատ ցածր խտության լիպոպրոտեիններից լիպոպրոտեինլիպազի ազդեցությամբ: Տեղափոխում են հյուսվածքին անհրաժեշտ խոլեստերինը, սակայն ավելցուկի դեպքում անոթների պատերին աթերոսկլերոտիկ վահանակների առաջացման վտանգը մեծանում է: Ցածր խտության լիպոպրոտեիների մակարդակի աճ է գրանցվում վահանաձև գեղձի հիպոֆունկցիայի դեպքում, նվազում՝ ենթաստամոքսային գեղձի բորբոքման, սուր վարակիչ գործընթացների դեպքում:

Շատ ցածր խտության լիպոպրոտեիները սինթեզվում են լյարդում, պարունակում են 50% եռացիլգլիցերիդներ և լյարդում սինթեզվող էնդոգեն լիպիդները տեղափոխում են հյուսվածքներ: Արյան ԾՅԽԼ ավելցուկի դեպքում արյունը դառնում է պղտոր և ստանում կաթնային երանգ: ԾՅԽԼ-ի կոնցենտրացիան բարձր է շաքարային դիաբետի, երիկամների ախտահարումների դեպքում: Այս լիպոպրոտեիները «վատ» խոլեստերինի աղբյուր են:

Բարձր խտության լիպոպրոտեիները սինթեզվում են լյարդում, ապահովում են խոլեստերինի փոխադրումը հակառակ ուղղությամբ՝ հյուսվածքներից լյարդ: Արյան բարձր խտության լիպոպրոտեիների քանակի ավելացումն արտահայտվում է ճարպակալման, լյարդի ցիրոզի, ալկոհոլային թունավորման դեպքում, նվազումը պայմանավորված է հյուսվածքներում խոլեստերինի կուտակմամբ: Արյան մեջ բարձր խտության լիպոպրոտեիների կոնցենտրացիայի իջեցումը վկայում է անոթների աթերոսկլերոտիկ ախտահարման մասին:

Խիլոմիկրոններ արյան մեջ հայտնաբերվում են միայն լիպիդային փոխանակության խանգարումների դեպքում: Սինթեզվում են բարակ աղիների լորձաթաղանթի էպիթելային հյուսվածքում: Աղիներից էկզոգեն ճարպը տեղափոխում են ծայրամասային հյուսվածքներ, լյարդ: Տեղափոխվող լիպիդների մեծ մասը եռացիլգլիցերիդներ են, ֆոսֆոլիպիդներ և խոլեստերին: Լյարդում համապատասխան ֆերմենտների ազդեցությամբ եռացիլգլիցերիդները ճեղքվում են՝ առաջացնելով ճարպաթթուներ: Ճարպաթթուների մի մասը տեղափոխվում է մկաններ, ճարպային հյուսվածք, մյուս մասը՝ միանում ալբումիններին, տեղափոխվում բջիջներ, ենթարկվում օքսիդացման:

ԼԻՊԻԴՆԵՐԻ ԲԱՑԱՀԱՅՏՄԱՆ ՌԵԱԿՑԻԱՆԵՐ

Աշխատանք 3.1. Ճարպերի և լիպիդների ֆիզիկաքիմիական հատկությունները

Լիպիդները ջրում չեն լուծվում, բայց լուծվում են օրգանական լուծիչներում՝ եթեր, քլորոֆորմ, բենզին, սպիրտ: Որոշ լուծիչներում, օրինակ՝ սպիրտում, ճարպը լուծելու համար անհրաժեշտ է տաքացնել:

Ճարպերը ջրում առաջացնում են էմուլսիաներ, որոնց կայունությունը կախված է այն միջավայրից, որտեղ դրանք առաջանում են: Մակերեսային ակտիվ լարվածություն ունեցող միացությունների՝ էմուլգատորների (օճառ, լեղաթթուներ, կարբոնատներ) առկայությամբ էմուլսիաները ջրում դառնում են ավելի կայուն, քանի որ դրանք շրջապատում են ճարպային կաթիլները՝ կանխելով դրանց միավորումը:

Մարսողական համակարգում ճարպերը մինչև մարսողական ֆերմենտների՝ լիպազների ազդեցությանն ենթարկվելը նախապես էմուլգացվում են լեղաթթուներով: Լեղու հետ լեղաթթուներն անցնում են 12-մատնյա աղիք, ծածկում ճարպի կաթիլները, թուլացնում մակերեսային լարվածությունը՝ խոչընդոտելով դրանց միացումը: 12-մատնյա աղիքում պարունակվող սպիտակուցները, օճառները, ածխաթթվի աղերը ևս էմուլգացնում են ճարպերը:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Բուսական յուղ, լեղի, Na_2CO_3-ի 1% լուծույթ, օճառի ($C_{17}H_{35}COONa$) 1% լուծույթ, ձվի սպիտակուցի լուծույթ, եթեր, ացետոն, քլորոֆորմ ($CHCl_3$):

Պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ:

Աշխատանքի ընթացքը.

1. Ճարպերի լուծելիությունը:

Տարբեր փորձանոթների մեջ լցնել 2-3-ական մլ թորած ջուր, սպիրտ, քլորոֆորմ, եթեր, ացետոն: Բոլոր փորձանոթներին ավելացնել 1-2 կաթիլ բուսական յուղ և համեմատել ճարպերի լուծելիությունը ջրում և օրգանական լուծիչներում:

2. Ճարպերի էմուլսիաների ստացումը:

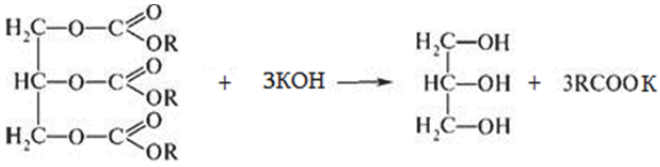
5 տարբեր փորձանոթներում լցնել 0.5-ական մլ թորած ջուր, լեղի, Na_2CO_3-ի լուծույթ, օճառի լուծույթ, ձվի սպիտակուցի լուծույթ, ապա բոլոր փորձանոթներին ավելացնել 3-4 կաթիլ բուսական յուղ, թափահարել, թողնել 5 րոպե, այնուհետև համեմատել փորձանոթներում էմուլսիաների առաջացումը և կայունությունը: Ստացված արդյունքները ներկայացնել հետևյալ աղյուսակում:

Ճարպի էմուլգացումը

Էմուլգատոր / Ճարպի անվանումը	Օճառ	Ջուր	Լեղի	Սպիտակուց	Սոդա
Բուսական յուղ					

3. Ճարպի հիդրոլիզը և դրա բաղադրամասերի հայտնաբերումը:

Ճարպի հիդրոլիզը կամ օճառացումը ալկալիներով հանգեցնում է գլիցերինի և բարձրամոլեկուլային ճարպերի աղերի առաջացմանը:



ճարպ գլիցերին օճառ

Նյութեր և ռեակտիվներ: Բուսական յուղ կամ կենդանական ճարպ, KOH-ի 10 % սպիրտային լուծույթ, NaOH-ի 10% լուծույթ, $CuSO_4$-ի 2% լուծույթ, H_2SO_4-ի 10 % լուծույթ, HCl-ի 10% լուծույթ, $CaCl_2$-ի 5%, NaCl-ի 30% և $(CH_3COO)_2Pb$-ի 10 % լուծույթներ:

Սարքեր և պարագաներ: Հետադարձ սառնարանով փորձանոթ, կաթոցիչներ, ջրային բաղնիք:

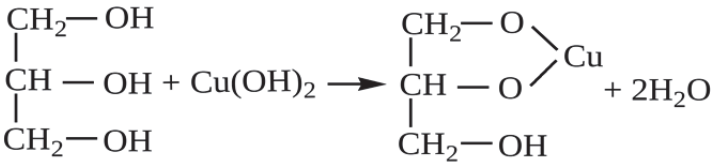
Աշխատանքի ընթացքը.

1. Ճարպի օճառացում:

Փորձանոթի մեջ լցնել 1 մլ բուսական յուղ կամ 1 գ կենդանական ճարպ, ավելացնել 10 մլ KOH-ի սպիրտային լուծույթ, փորձանոթը փակել հետադարձ սառնարան ունեցող խցանով և 25-30 րոպե տաքացնել ջրային բաղնիքում (աշխատանքի այս հատվածն իրականացնել քարշիչ պահարանում): Այնուհետև փորձանոթի մեջ ավելացնել 10 մլ տաք ջուր, թափահարել, առաջանում է ճարպաթթուների կալիումական աղեր և գլիցերին պարունակող համասեռ լուծույթ, որն օգտագործվում է գլիցերինի և ճարպաթթուների հայտնաբերման նպատակով:

2. Գլիցերինի հայտնաբերումը: 2-3 մլ հիդրոլիզատին ավելացնել հավասար ծավալով NaOH-ի և մի քանի կաթիլ $CuSO_4$-ի լուծույթներ, թափահարել.

պղնձի գլիցերատի առաջացման արդյունքում դիտվում է թույլ կապույտ գունավորում:



գլիցերին **պղնձի գլիցերատ**

3 **Լուծույթից օճառի անջատումը**: 2 մլ հիդրոլիզատին ավելացնել 2 մլ NaCl-ի լուծույթ: Դիտվում է լուծույթից օճառի անջատում (աղայնացում):

4. **Ճարպաթթուների բացահայտումը**: Փորձանոթի մեջ լցնել 1 մլ հիդրոլիզատ, ավելացնել 1 մլ H_2SO_4-ի կամ HCl-ի լուծույթ և տեղադրել եռացող ջրային բաղնիքում մինչև մակերևույթին ճարպաթթուների շերտի առաջացումը:

$$2R\text{-}COOK + H_2SO_4 \rightarrow 2R\text{-}COOH + K_2SO_4$$

5. **Կալցիումի և կապարի անլուծելի օճառների առաջացումը:** Վերցնել 1-ական մլ հիդրոլիզատ պարունակող 2 փորձանոթ, մեկին ավելացնել 0.5 մլ 5% $CaCl_2$, մյուսին՝ $(CH_3COO)_2Pb$-ի 10 % լուծույթ, թափահարել: Առաջանում են կալցիումի և կապարի անլուծելի օճառներ:

$$2R\text{-}COOK + CaCl_2 \rightarrow (R\text{-}COO)_2Ca\downarrow + 2KCl$$

$$2R\text{-}COOK + PbCl_2 \rightarrow (R\text{-}COO)_2Pb\downarrow + 2KCl$$

Աշխատանք 3.2. Չհագեցած ճարպաթթուների հայտնաբերումը բուսական յուղերում

Բուսական յուղի վրա բրոմաջուր, յոդի սպիրտային լուծույթ կամ կալիումի պերմանգանատի լուծույթ ավելացնելիս բրոմի դեղին, պերմանգանատի մանուշակագույն գունավորումներն անհետանում են: Այս երևույթը պայմանավորված է բուսական յուղերում չհագեցած ճարպաթթուների առկայությամբ, որոնք կրկնակի կապերի հաշվին իրենց են միացնում բրոմ, յոդ, իսկ կալիումի պերմանգանատի առկայությամբ վերածվում են դիոլների.

Ընթացող ռեակցիաների հավասարումներն են.

$$R\text{-}CH{=}CH(CH_2)_7\text{-}COOH + Br_2 \rightarrow R\text{-}CHBr\text{-}CHBr(CH_2)_7\text{-}COOH$$

$$R\text{-}CH{=}CH(CH_2)_7\text{-}COOH + J_2 \rightarrow R\text{-}CHJ\text{-}CHJ(CH_2)_7\text{-}COOH$$

$$3R\text{-}CH{=}CH(CH_2)_7\text{-}COOH + 2KMnO_4 + 4H_2O \rightarrow$$
$$3R\text{-}CH(OH)\text{-}CH(OH)(CH_2)_7\text{-}COOH + 2MnO_2 + 2KOH$$

Նյութեր և ռեակտիվներ: Բուսական յուղ, բրոմաջուր (Br_2), J_2-ի 1% սպիրտային լուծույթ, $KMnO_4$-ի 1% լուծույթ, օսլայի 1% լուծույթ:

Պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ:

Աշխատանքի ընթացքը.

3 փորձանոթների մեջ լցնել 1-ական մլ բուսական յուղ, այնուհետև առաջին փորձանոթին ավելացնել 0.5 մլ բրոմաջուր, երկրորդին՝ 1 մլ ջուր և 2 կաթիլ յողի սպիրտային լուծույթ, երրորդին՝ 5 կաթիլ $KMnO_4$-ի լուծույթ: Փորձանոթները ուժգին թափահարելուց հետո 1-ին և 3-րդ փորձանոթներում առաջացած կապույտ գունավորումն անհետանում է, իսկ 2-րդ փորձանոթում անհրաժեշտ է ավելացնել մի քանի կաթիլ օսլայի լուծույթ, որտեղ կապույտ գունավորում չպետք է առաջանա ազատ յողի բացակայության հետևանքով:

Չհագեցած ճարպերի բացահայտումը

Նյութեր և ռեակտիվներ: Բուսական յուղ, կենդանական յուղ, մարգարին, քլորոֆորմ ($CHCl_3$), յողի (J_2) 0.001 Ն լուծույթ պատրաստված $CHCl_3$-ում:

Պարագաներ: Ամոթներ, կաթոցիչներ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Երեք ամոթների (քիմիական բաժակների) մեջ տեղափոխել համապատասխանաբար 0.5-ական գ կենդանական ճարպ, մարգարին և 15 մլ բուսական յուղ: Բոլոր նմուշների մեջ ավելացնել 3-ական մլ $CHCl_3$, ճարպերը լուծել (պինդ ճարպերը սկզբում հալեցնել): Ստացված լուծույթները տիտրել J_2-ի լուծույթով մինչև ընդգծված վարդագույն երանգի առաջացումը: Արդյունքները գրանցել հետևյալ աղյուսակում:

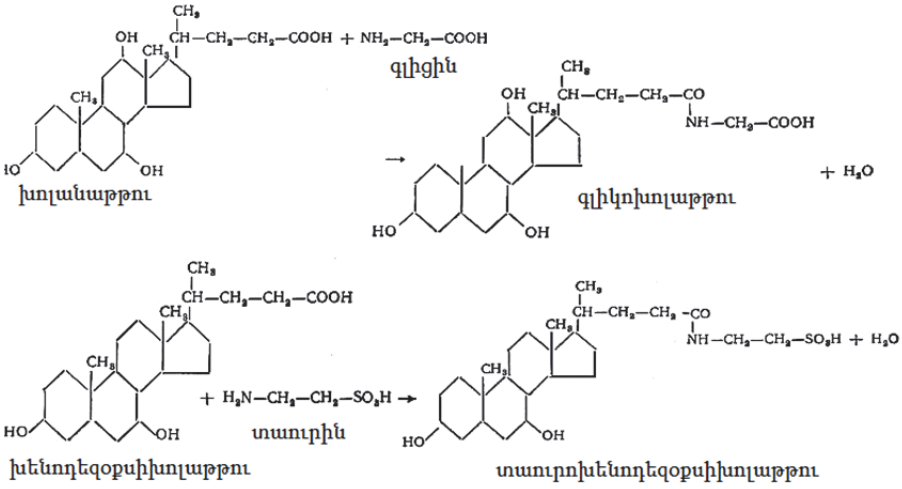
N	Հետազոտվող ճարպ	Տիտրման համար ծախսած ռեակտիվի քանակ, մլ	Արդյունքներ
1			
2			
3			

Աշխատանք 3.3. Լեղաթթուների հայտնաբերման որակական ռեակցիա

Լեղաթթուները խոլանաթթվի ածանցյալներ են, կառուցվածքով նման են խոլեստերինին, առաջանում են լյարդում և լեղու հետ արտազատվում գլիցինի (գլիկոկոլի) կամ տաուրինի հետ կոնյուգացված զույգ միացությունների ձևով:

Վերջիններս ճարպաթթուների, խոլեստերինի և մի քանի այլ օրգանական ոչ ջրալույծ միացությունների հետ առաջացնում են ջրում լուծելի համալիրներ:

Ճարպաթթուները, կախված շղթայի երկարությունից, միանում են 2, 3 կամ 4 զույգ լեղաթթուների հետ: Այս համալիրում ճարպաթթվի մոլեկուլը գտնվում է ներսում, իսկ լեղաթթուները՝ դրսում: Ընդ որում՝ լեղաթթուների հիդրոֆոբ մասը նույնպես գտնվում է համալիրի ներսում, դրսում միայն հիդրոֆիլ մասն է: Այսպիսով՝ ամբողջ համալիրը ներծծվում է:



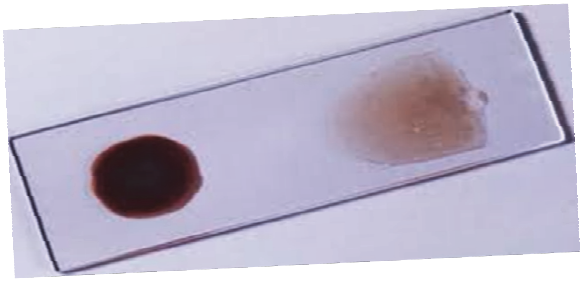
Լեղաթթուների առկայությունը կարելի է բացահայտել Պետտենկոֆերի ռեակցիայով: Լեղաթթուներն օքսիմեթիլֆուրֆուրոլի հետ առաջացնում են կարմիր գունավորում: Վերջինս առաջանում է սախարոզի մոնոմեր հեքսոզից խիտ ծծմբական թթվի ազդեցությամբ:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Ջրով 2 անգամ նոսրացված լեղի, սախարոզի ($C_{12}H_{22}O_{11}$) 20 % լուծույթ, ֆրուկտոզի ($C_6H_{12}O_6$) 3% լուծույթ, խիտ H_2SO_4:

Պարագաներ: Փորձանոթներ, ժամացույցի ապակի, կաթոցիչներ:

Աշխատանքի ընթացքը.

1. Ժամացույցի չոր ապակու վրա, որի տակ դրված է սպիտակ թուղթ, կաթեցնել 1 կաթիլ լեղի, 1 կաթիլ 20 % $C_{12}H_{22}O_{11}$-ի լուծույթ, ապակյա ձողիկով լավ խառնել: Կողքը կաթեցնել 3 կաթիլ ծծմբական թթու (ապակին պետք չէ շարժել):



Նկ. 3.7. Լեղաթթուների հայտնաբերման ռեակցիա:

Որոշ ժամանակ անց կաթիլների միացման տեղում դիտվում է կարմրավուն գունավորման առաջացում, որն աստիճանաբար անցնում է կարմրամանուշակագույնի:

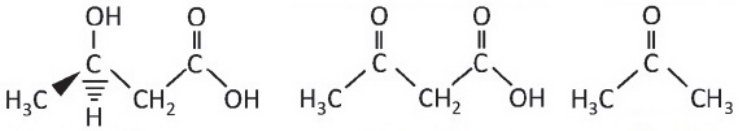
2. 10 կաթիլ նոսրացրած լեղուն ավելացնել 1-2 կաթիլ $C_6H_{12}O_6$-ի լուծույթ: Փորձանոթը թեքել, զգուշությամբ պատին սահեցներով՝ ավելացնել H_2SO_4-ի լուծույթ: Շերտերի սահմանին առանձնանում է ալ կարմիր օղակ, որը հետո ստանում է կարմրամանուշակագույն երանգ (նկ. 3.7):

Արդյունքները գրանցել հետևյալ աղյուսակում:

N	Լեղի	H_2SO_4	Փոխազդող խմբեր	Գունավորում
Սախարոզ				
Ֆրուկտոզ				

Աշխատանք 3.4. Կետոնային մարմինների հայտնաբերումը

Կետոնային մարմիններին են պատկանում ացետոնը, ացետոքացախաթթուն, β-օքսիկարագաթթուն: Ացետոքացախաթթուն և β-օքսիկարագաթթուն ճարպաթթուների ոչ լրիվ օքսիդացման արգասիքներ են: Նորմայում մարդու արյան մեջ վերջիններս առկա են աննշան քանակությամբ (1 մգ-ից պակաս), քանի որ հյուսվածքներում շատ արագ օքսիդանում են մինչև ածխաթթու գազ ու ջուր և սովորական որակական ռեակցիաներով չեն հայտնաբերվում:



1. Ռոզերի նմուշ

Որոշ ախտահարումների դեպքում կետոնային մարմինների պարունակությունը զգալիորեն բարձրանում է և հայտնաբերվում է մեզում: Այս դեպքում այն հնարավոր է հայտնաբերել նատրիումի նիտրոպրուսիդի օգնությամբ: Հիմնականում հիմնային միջավայրում կետոնային մարմինները նատրիումի նիտրոպրուսիդի հետ առաջացնում են նարնջակարմրավուն գունավորում, ապա խիտ քացախաթթվով ազդելուց հետո առաջանում է բալագույն հետևյալ միացությունը.

$$CH_3COCH_3 + Na_2[Fe(CN)5NO] + 2NaOH \rightarrow Na_4[Fe(CN)_5NO{=}CHCOCH_3] + H_2O$$

ներնջակարմրավուն համալիր

$$Na_3[Fe(CN)_5NO\text{-}CH_2COCH_3]$$

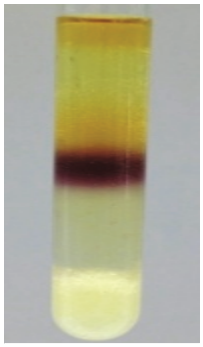
բալագույն համալիր

Ռեակտիվներ: Նատրիումի նիտրոպրուսիդի ($Na_2[Fe(CN)_5NO]$) թարմ պատրաստված 10 % լուծույթ, NaOH-ի 10 % լուծույթ, CH_3COCH_3, խիտ CH_3COOH:

Պարագաներ: Փորձանոթներ, ժամացույցի ապակի, կաթոցիչներ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Ժամացույցի ապակու վրա կաթեցնել 1 կաթիլ CH_3COCH_3, 1 կաթիլ NaOH-ի և 1 կաթիլ թարմ պատրաստված $Na_2[Fe(CN)5NO]$-ի լուծույթ: Առաջանում է ներնջակարմրավուն գունավորում, երբ այս լուծույթին ավելացնում են 3 կաթիլ CH_3COOH, հայտնվում է բալագույնը:



Նկ. 3.8. Գերխարդի ամուշ:

2. Գերխարդի ամուշ

Ռեակտիվներ: CH_3COCH_3, $FeCl_3$-ի 5 % լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Մի քանի կաթիլ CH_3COCH_3-ի լուծույթին ավելացնել $FeCl_3$-ի լուծույթ, առաջանում է կարմրավուն նստվածք, որն աստիճանաբար անգունանում է (նկ. 3.8):

3. Լիբենի ամուշ

Ռեակտիվներ: NaOH-ի 10 % լուծույթ, CH_3COCH_3, Լյուգոլի լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Մի քանի կաթիլ CH_3COCH_3-ի վրա ավելացնել 3-4 կաթիլ NaOH-ի լուծույթ, ապա մի քանի կաթիլ Լյուգոլի լուծույթ, առաջանում է թույլ դեղնավուն գունավորում, որն աստիճանաբար պղտորվում է:

Աշխատանք 3.5. Ընդհանուր ֆոսֆոլիպիդների որոշումն արյան շիճուկում

Ֆոսֆատիդաթթվի ածանցյալներ ֆոսֆոլիպիդները կենսաբանական թաղանթների գլխավոր լիպիդային բաղադրիչներն են, ներկայացված են ֆոսֆատիդիլխոլինով (լեցիտիններ), ֆոսֆատիդիլէթանոլամինով (կեֆալիններ), ֆոսֆատիդիլսերինով: Բացի այդ՝ հյուսվածքներում առկա են ֆոսֆատիդիլինոզիտոլներ, կարդիոլիպին, սֆինգոֆոսֆատիդներ: Նորմայում արյան շիճուկի ընդհանուր ֆոսֆոլիպիդների պարունակությունը 1.52-3.62 գ/լ է (152-362 մգ/%), լեցիտինների պարունակությունը՝ 0.75-12 գ/լ (75-120 մգ/%): Կարևոր ցու-

ցանիշ է ֆոսֆոլիպիդ/խոլեստերին հնդեքսը, որը ֆիզիոլոգիական պայմաններում 1.0-1.5 է:

Ֆոսֆոլիպիդների կոնցենտրացիան որոշում են լիպիդային ֆոսֆորի քանակությամբ: Գլիցերաֆոսֆոլիպիդներում ֆոսֆորը կազմում է լիպիդների մոլեկուլային զանգվածի 4%-ը: Բազմապատկելով լիպիդային ֆոսֆորի ստացված քանակությունը 25-ով՝ կարելի է հաշվարկել գլիցերաֆոսֆոլիպիդների ընդհանուր քանակությունը: Լիպիդային ֆոսֆատը որոշում են կա՛մ լիպիդային լուծամզվածքում, կա՛մ արյան շիճուկում սպիտակուցները եռքլորքացախաթթվով նստեցնելուց հետո: Եռքլորքացախաթթվով սպիտակուցների հետ նստվածք են անցնում նաև ֆոսֆոլիպիդները:

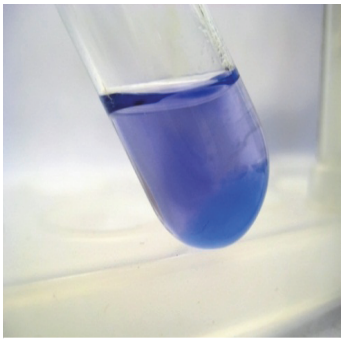
Մեթոդի հիմքում ֆոսֆոլիպիդներից անջատված անօրգանական ֆոսֆատի և ամոնիումի մոլիբդատի փոխազդեցության արդյունքում գոյացած ֆոսֆոմոլիբդենաթթվի վերականգնումն է՝ ասկորբինաթթվով ֆոսֆոմոլիբդենային համալիրի առաջացմամբ (մոլիբդենային կապույտ):

Նյութեր և ռեակտիվներ: Արյան պլազմ կամ շիճուկ, CCl_3COOH-ի 10% լուծույթ, $(NH_4)_2MoO_4$-ի 2.5% լուծույթ, $C_6H_8O_6$-ի 1% լուծույթ պատրաստած HCl-ի 0.1 Ն լուծույթում (պահել սառնարանում), խիտ $HClO_4$:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, ցենտրիֆուգ, լուսաէլեկտրագունաչափ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Փորձնական նմուշի մեջ լցնել 2.8 մլ H_2O և 0.2 մլ արյան պլազմ կամ շիճուկ, ավելացնել 3 մլ CCl_3COOH (առաջին 1.5 մլ ավելացնել կաթիլներով, մյուս 1.5 մլ՝ ավելի արագ): Ստուգիչ նմուշի մեջ լցնել 3 մլ H_2O և 3 մլ CCl_3COOH: Խառնուրդները թողնել 2 րոպե, ցենտրիֆուգել 3000 պտ/ր արագությամբ 15 րոպե: Վերնստվածքները դատարկել, նստվածքներին ավելացնել 1-ական մլ խիտ $HClO_4$, զգուշությամբ խառնել: Փորձանոթները տեղափոխել եռացող ջրային բաղնիք (20-30 րոպե) մինչև լուծույթի անգունացումը (փրփուրի առաջացումը): Փորձանոթները սառեցնելուց հետո լուծույթներին ավելացնել 3-ական մլ H_2O, ավելացնել 1-ական մլ $(NH_4)_2MoO_4$-ի լուծույթ, 0.5-ական մլ $C_6H_8O_6$-ի լուծույթ, լուծույթների ծավալը հասցնել 10 մլ, թողնել 5-10 րոպե սենյակային ջերմաստիճանում (գունավորման զարգացման համար) (նկ. 3.9):



Նկ. 3.9. Ֆոսֆոմոլիբդենային կապույտի առաջացումը:

Փորձնական նմուշները գունաչափել ստուգիչի դիմաց (ԼԷԳ, ալիքի երկարությունը 630-670 նմ, կարմիր լուսաֆիլտր, կյուվետի լայնությունը 1.0 սմ):

Արյան շիճուկի ընդհանուր ֆոսֆոլիպիդների (գ/լ) քանակությունը հաշվարկել հետևյալ բանաձևով.

$$X = \frac{m \cdot 5000 \cdot 25}{10}$$

որտեղ

m – անօրգանական ֆոսֆորի քանակությունն է նմուշում՝ ըստ տրամաչափական կորի (աշխ. 2.33),

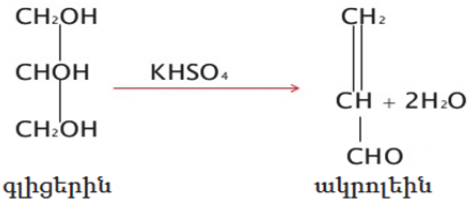
5000 – մգ-ից գ վերահաշվարկելու գործակիցը,

25 – վերահաշվարկի գործակիցը (լիպիդային ֆոսֆորը կազմում է ֆոսֆոլիպիդների մոլային զանգվածի 4%),

Լիպիդային ֆոսֆորը մմոլ/լ վերահաշվարկելու համար ստացած արժեքը բազմապատկել 0.323 գործակցով:

Աշխատանք 3.6. Ֆոսֆատիդիլխոլինի (լեցիտինի) բացահայտումը

Ճարպերի առկայությունը միջավայրում կարելի է հաստատել ակրոլեինային ռեակցիայով, ինչը բնորոշ է ճարպի գլիցերինային մնացորդին: Տաքացնելիս ճարպի գլիցերինային մնացորդից (ազատ գլիցերինից) անջատվում է ջուր և գլիցերինը վերածվում է յուրահատուկ սուր հոտով չհագեցած ալդեհիդի՝ ակրոլեինի: Գլիցերին չպարունակող լիպիդները (մոմեր, ճարպաթթուներ, ստերիններ) ակրոլեինային ռեակցիա չեն ցուցաբերում:



Նյութեր և ռեակտիվներ: Բուսական յուղ, մոմ, $KHSO_4$-ի բյուրեղներ:

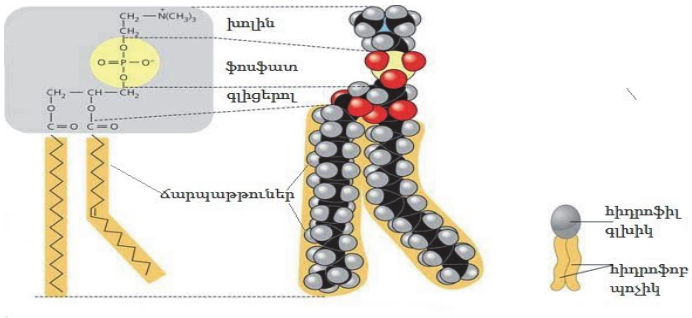
Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, ջերմակայուն անոթ, ջրային բաղնիք:

Աշխատանքի ընթացքը.

Փորձանոթի մեջ տեղափոխել 1-2 կաթիլ բուսական յուղ (կամ մոմ), շպատելի ծայրով ավելացնել $KHSO_4$ (որպես ջրազրկող միջոց), անոթը տաքացնել (մինչև ակրոլեինի սուր հոտով սպիտակ գոլորշու առաջացումը):

Լեցիտինների ստացումը

Գլիցերաֆոսֆոլիպիդների դասին պատկանող լեցիտինը բջջաթաղանթի հիմնական կառուցվածքային բաղադրիչներից է, մեծ քանակությամբ լեցիտիններ պարունակվում են ուղեղում:



Ֆոսֆատիդիլխոլինի կառուցվածքը

Լեցիտինները ջրում առաջացնում են կայուն էմուլսիաներ, ացետոնում չեն լուծվում, լուծվում են սպիրտում, եթերում, քլորոֆորմում:

Ռեակտիվներ: Չվի դեղնուց, CH_3COCH_3, $CdCl_2$-ի խիտ լուծույթ:

Պարագաներ: Քիմիական բաժակ, ձագար, փորձանոթներ, կաթոցիչներ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Լեցիտինի ստացումը – քիմիական բաժակի մեջ տեղափոխել կես ձվի դեղնուց (եփված), թափահարելով ավելացնել 40 մլ եռացող սպիրտ, խառնել 10 րոպե: Դեղնուցից անջատվում են լեցիտինները, գունանյութերը: Եռացիլ-գլիցերոլները սպիրտում գրեթե չեն լուծվում: Ստացված լուծամզվածքը դեղին է, դեղնուցը՝ զգալի անգունացած: Լուծույթը սառեցնել, զտել (զտվածքը պետք է թափանցիկ լինի, եթե զտվածքը պղտոր է, նույն ֆիլտրի թղթով նորից զտել): Թափանցիկ զտվածքը լեցիտինի սպիրտային լուծույթն է:

Փորձանոթի մեջ լցնել 10 կաթիլ CH_3COCH_3-ի լուծույթ, մի քանի կաթիլ լեցիտինի լուծույթ, առաջանում է լեցիտինի սպիտակ նստվածք:

Փորձանոթի մեջ լցնել 20 կաթիլ թորած H_2O, կաթիլներով լեցիտին մինչև կայուն էմուլսիայի առաջացումը:

1 մլ լեցիտինի սպիրտային լուծույթին կաթիլներով ավելացնել $CdCl_2$-ի լուծույթ, առաջանում է լեցիտինի և $CdCl_2$ սպիտակ նստվածք: Առաջացած դժվարալույծ միացությունում լեցիտինը կազմում է 3 մաս, $CdCl_2$ 4 մաս:

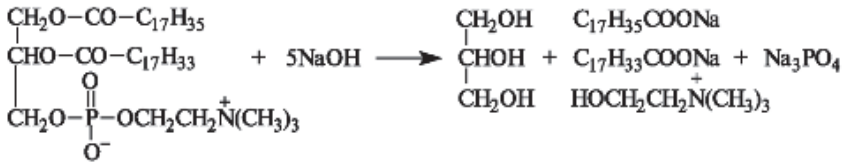
Լեցիտինների հիդրոլիզ

Ռեակտիվներ: NaOH-ի 10% լուծույթ, HCl-ի 10% լուծույթ, $C_{20}H_{14}O_4$-ի 1% լուծույթ, $KHSO_4$-ի բյուրեղներ, $CuSO_4$-ի 2% լուծույթ, KNO_3-ի և Na_2CO_3-ի բյուրեղներ, HNO_3-ի 10% լուծույթ, $(NH_4)_2MoO_4$-ի 2.5% լուծույթ:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, հետադարձ սառնարան, ջրային բաղնիք:

Աշխատանքի ընթացքը.

Հետադարձ սառնարանով փորձանոթի մեջ տեղափոխել 2 մլ լեցիտինի սպիրտային լուծույթ, ավելացնել 10 մլ NaOH-ի լուծույթ, եռացնել ջրային բաղնիքում 5-10 րոպե: Հիմնային միջավայրում տաքացնելիս լեցիտինի եթերային կապերը ենթարկվում են հիդրոլիզի, անջատվում են խոլին, ճարպաթթուներ, գլիցերին, ֆոսֆորական թթու: Լուծույթում հնարավոր է հաստատել այս միացությունների առկայությունը:



ֆոսֆատիդիլխոլին

Խոլին. լեցիտինի հիդրոլիզից առաջացած խոլինը հիմնային միջավայրում անկայուն է և հիդրոլիզի ընթացքում քայքայվում է՝ առաջացնելով եռմեթիլամին, ինչը բացահայտվում է յուրահատուկ հոտով:

Ճարպաթթուներ. հիդրոլիզատը թթվեցնել HCl-ի լուծույթով (լակմուսի կարմիր գունավորում) մինչև ազատ ճարպաթթուների նստվածքի առաջացումը: Լուծույթը զտել, անջատել ճարպաթթուները:

Գլիցերին. թափանցիկ զտվածքին ավելացնել $C_{20}H_{14}O_4$-ի կաթիլ և NaOH-ի լուծույթ մինչև բաց վարդագույն երանգի առաջացումը: Չեզոքացված զտվածքը գոլորշիացնել սպիրտայրոցի վրա: Չոր զանգվածի մի մասը տեղափոխել փորձանոթի մեջ, ավելացնել $KHSO_4$-ի բյուրեղներ, տաքացնել: Գլիցերինից անջատվում է ջուր, առաջանում է ակրոլեին, որը բացահայտվում է սուր յուրահատուկ հոտով:

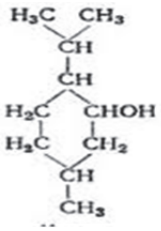
Ֆոսֆորական թթու. Զտվածքի չոր նստվածքի մյուս մասին ավելացնել KNO_3 (2 մաս) և Na_2CO_3 (1 մաս) բյուրեղներ, զգուշորեն տաքացնել: Առաջացած մոխիրը սառեցնել, լուծել HNO_3-ի լուծույթում (թթուն ավելացնել կաթիլներով՝ խառնելով ապակյա ձողիկով): Ստացված լուծույթին ավելացնել 2 մլ

$(NH_4)_2MoO_4$-ի լուծույթ, խառնուրդը տաքացնել 2-3 րոպե: Առաջանում է ֆոսֆոմոլիբդենաթթվային ամոնիումի կապտավուն նստվածք, ինչը հաստատում է ֆոսֆորական թթվի առկայությունը:

Աշխատանք 3.7. Տերպենների բացահայտումը

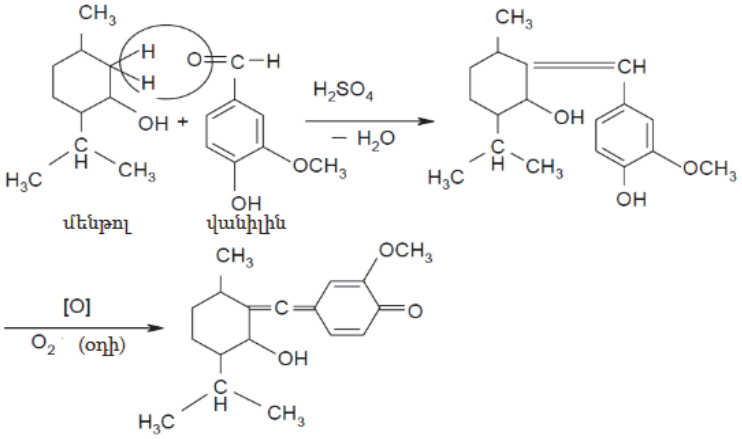
Մենթոլի բացահայտումը

Մենթոլը մոնոցիկլիկ մոնոտերպենների ներկայացուցիչ է, որը հայտնաբերված է անանուխի եթերային յուղի կազմում *(Mentha piperita)*, բույսին հաղորդում է բնորոշ բույր: Բժշկության մեջ կիրառվում է որպես անոթլայնիչ:



մենթոլ (1-մեթիլ-4-իզոպրոպիլցիկլոհեքսանոլ-3)

Մենթոլը կամ վալիդոլը, OH խմբի հարևանությամբ ունենալով ազատ α դիրք, խիտ H_2SO_4-ի ներկայությամբ կոնդենսանում են արոմատիկ ալդեհիդների հետ



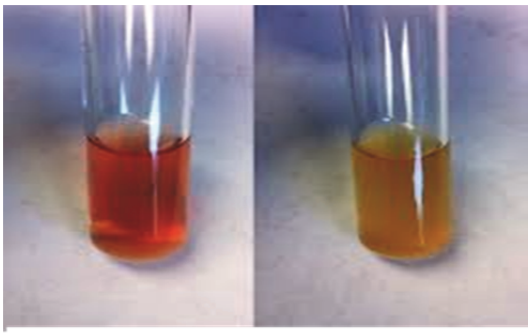
(վանիլին)՝ առաջացնելով կարմիր գունավորում ունեցող արգասիքներ:

Ռեակտիվներ: Մենթոլ (կամ վալիդոլ), վանիլին, խիտ H_2SO_4:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, ջերմակայուն անոթ, ջրային բաղնիք:

Աշխատանքի ընթացքը.

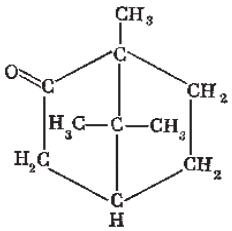
Ջերմակայուն անոթի մեջ տաքացնել մենթոլի, վանիլինի մի քանի բյուրեղ և մի քանի կաթիլ H_2SO_4: Առաջանում է դեղին գունավորում, ջրով նոսրացումից հետո՝ կարմիր գունավորում (նկ. 3.10):



Նկ. 3.10. Մենթոլի բացահայտումը:

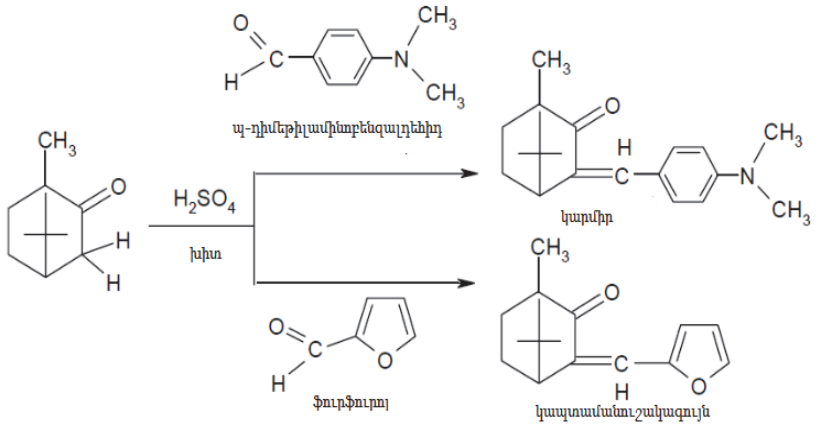
Կամֆորայի բացահայտումը

Կամֆորան բիցիկլիկ մոնոտերպենների ներկայացուցիչ է, հայտնաբերված է կամֆորային դափնու եթերային յուղում (*Cinnamomum camphora*): Կամֆորան սրտային գործունեության խթանիչ է: Կիրառվում է պլաստմասների արտադրությունում, ներկայումս սինթեզվում է արհեստականորեն:



Կամֆորա

Կամֆորան, մոլեկուլում ունենալով կետոխմբի հարևանությամբ գտնվող շարժուն ջրածնի ատոմ, կարող է կոնդենսացվել ալդեհիդների հետ: Կոնդենսացման արգասիքները գունավոր են, հետևաբար կարող են կիրառվել կամֆորայի առկայության հաստատման նպատակով: Ալդեհիդներից խիտ H_2SO_4-ի ներկայությամբ առաջացած ֆուրֆուրոլի հետ կոնդենսացման արդյունքում առաջանում է կապտամանուշակագույն (ֆորմալինի դեպքում՝ կարմիր) գունավորում (նկ. 3.11):



Ռեակտիվներ: Կամֆորայի սպիրտային լուծույթ, ալդոշաքարի 1% լուծույթ, ֆորմալդեհիդ (HCHO), խիտ H_2SO_4:

Պարագաներ: Փորձանոթներ, ջերմակայուն անոթ, կաթոցիչներ, ջրային բաղնիք:

Աշխատանքի ընթացքը.

Ջերմակայուն անոթի մեջ խառնել 0,5-ական մլ ալդոշաքարի (ֆորմալդեհիդի) և կամֆորայի լուծույթներ, ավելացնել մի քանի կաթիլ H_2SO_4, տաքացնել մինչև եռալը: Լուծույթը ստանում է կարմիր գունավորում (նկ. 3.11):



Նկ. 3.11. Կամֆորայի կոնդենսացման արգասիք:

Աշխատանք 3.8. Խոլեստերինի բացահայտման ռեակցիաները

Ստերոիդային միացությունները՝ ստերինները և ստերիդները լայն տարածվածություն ունեն կենդանական և բուսական օրգանիզմներում: Կենդանական օրգանիզմների ստերոիդ խոլեստերինը կենսաբանական հեղուկներում, հյուսվածքներում հանդիպում է և՛ ազատ, և՛ խոլեստերիդների՝ ճարպաթթուների էսթերների ձևով: Խոլեստերինով ավելի հարուստ է ձյարդային հյուսվածքը (20-30 մգ/գ): Խոլեստերինն անջատվում է քլորոֆորմով, տաք սպիրտով, ացետոնով: Գործնականում օգտագործում են օրգանական լուծիչների խառնուրդներ: Ջրում խոլեստերինն առաջացնում է էմուլսիաներ, ի տարբերություն մյուս լիպիդների՝ խիտ հիմքերի ազդեցությամբ չի քայքայ-

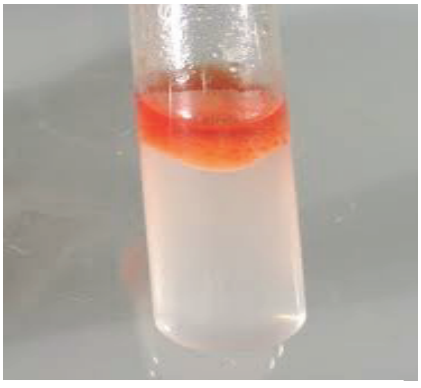
վում: Բուսական ստերինները (ֆիտոստերիններ)՝ էրգոստերինը, ստիգմաստերինը, սիտոստերինը, ֆուկոստերինը, պարունակվում են բուսական յուղերում, պտուղներում, ջրիմուռներում:

Կենսաբանական հեղուկների, հյուսվածքների բջջաքիմիական, հիստոքիմիական հետազոտությունների ժամանակ խոլեստերինի բացահայտման ռեակցիաների կիրառումը կարևորվում է խոլեստերինի փոխանակության խանգարումների դեպքում: Այդ ռեակցիաները կիրառվում են նաև ստերոիդ հորմոնների, լեղաթթուների, բուսական ստերինների բացահայտման և դեղամիջոցներում այդ միացությունների որակական անալիզի իրականացման նպատակով:

Խոլեստերինի գունավորման բոլոր ռեակցիաների՝ Շիֆի, Սալկովսկու, Լիբերման-Բուրխարդի քիմիական փոխարկումները բնույթով նմանատիպ են. H_2SO_4-ի և քացախաթթվի անհիդրիդի ազդեցությամբ խոլեստերինի մոլեկուլից անջատվում է ջուր, առաջանում են դիմերներ (բիխոլեստադիեններ. $C_{54}H_{86}$, $C_{54}H_{88}$), որոնք էլ ծծմբական թթվի հետ փոխազդելիս առաջացնում են դիենային թթուներ. երկու մոլեկուլ H_2SO_4-ի հետ՝ կարմիր գույնի արգասիք, մեկ մոլեկուլ H_2SO_4-ի հետ՝ կանաչ գույնի արգասիք (Լիբերման-Բուրխարդի ռեակցիա): Գունավորումն անկայուն է:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Ուղեղի հյուսվածքից անջատված խոլեստերինի քլորոֆորմային լուծույթ (1 գ ուղեղի հյուսվածքը տրորել հավանգում 2-3 գ գիպսի հետ, ստացված զանգվածը (հոմոգենատը) ապակյա ձողիկով տարածել առարկայակիր ապակու վրա և չորացնել սպիրտայրոցի վրա (60° C)՝ ապակին պահելով 20 սմ հեռավորության վրա), չորացրած հոմոգենատը տեղափոխել փորձանոթի մեջ, ավելացնել 5 մլ $CHCl_3$, անընդհատ թափահարելով՝ 5 րոպե թողնել սենյակային ջերմաստիճանում, զտել:

Ձվի դեղնուցից անջատված խոլեստերինի քլորոֆորմային լուծույթ (ճենապակյա հավանգում տրորել ձվի չորացրած դեղնուցը (կես դեղնուց) տեղափոխել կոնաձև անոթի մեջ, ավելացնել 10 մլ $CHCl_3$, խառնել 15 րոպե, խառնուրդը զտել): Խիտ H_2SO_4, քացախաթթվային անհիդրիդ ($(CH_3CO)_2O$), 0.05% $FeCl_3$-ի լուծույթ սառցե CH_3COOH-ի լուծույթում:



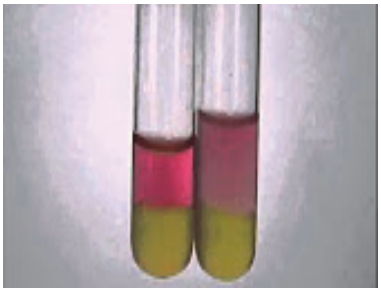
Նկ. 3.12. Շիֆի ռեակցիա:

Պարագաներ: Կոնաձև անոթ, փորձանոթներ, կաթոցիչներ, հավանգ, ջրային բաղնիք:

Աշխատանքի ընթացքը.

Շիֆի ռեակցիա: Փորձանոթի մեջ լցնել 1 մլ խոլեստերինի քլորոֆորմային լուծույթ, փորձանոթի պատին սահեցնելով՝ ավելացնել 1 մլ խիտ H_2SO_4, չխառնել: 10-15 րոպե անց հեղուկների սահմանին առաջանում է կարմիր գույնի օղակ (նկ. 3.12)

Սալկովսկու ռեակցիա: Խիտ H_2SO_4 ազդեցությամբ խոլեստերինի մոլեկուլը դեհիդրատացվում է, առաջանում է կարմիր գույնի խոլեստերիլեն: Փորձանոթի մեջ լցնել 1 մլ խոլեստերինի քլորոֆորմային լուծույթ և փորձանոթի պատին սահեցնելով՝ նույնքան խիտ H_2SO_4: Զգուշորեն թափահարել, երկու հեղուկների սահմանին առաջանում է նարնջագույն օղակ, որը քիչ անց վերածվում է կարմիր օղակի: Լուծույթը զգուշորեն խառնել: Լուծույթը բաժանվում է երկու շերտի. վերին շերտ՝ քլորոֆորմային (կարմիր, դեղնանարնջագույն, այնուհետև կարմրամանուշակագույն գունավորում), ներքին շերտ՝ ծծմբական թթու (դեղին գունավորում) (նկ. 3.13):



Նկ. 3.13. Խոլեստերիլենի առաջացումը:

Շիֆի և Սալկովսկու ռեակցիաները կարելի է կատարել նույն փորձանոթում (Շիֆի ռեակցիայից հետո, լուծույթը զգուշորեն թափահարել):

Լիբերման-Բուրխարդի ռեակցիա: Փորձանոթի մեջ լցնել 2 մլ խոլեստերինի քլորոֆորմային լուծույթ, 0.3 մլ (10 կաթիլ) $(CH_3CO)_2O$ և 2 կաթիլ խիտ H_2SO_4: Փորձանոթը տեղավոխել ջրային բաղնիք (40° C, 1-2 րոպե), այնուհետև թողնել սենյակային ջերմաստիճանում 5-10 րոպե (նկ. 3.14): Սկզբում առաջանում է կարմիր գունավորում, որը փոփոխվում է (լուծույթը ստանում է մանուշակագույն, կապույտ, այնուհետև կանաչ գունավորում):

Երկաթի քլորիդի ռեակցիա. Խոլեստերինի և երկաթի քլորիդի փոխազդեցության արդյունքում առաջանում է կարմրամանուշակագույն համալիր միացություն:

3 կաթիլ խոլեստերինի քլորոֆորմային լուծույթին ավելացնել 10 կաթիլ $FeCl_3$-ի լուծույթ և 15 կաթիլ H_2SO_4-ի լուծույթ: Լուծույթը թափահարել, առաջանում է կարմրամանուշակագույն գունավորում:



Նկ. 3.14. Ջրային բաղնիք:

ՃԱՐՊԵՐԻ ՔԱՆԱԿԱԿԱՆ ՈՐՈՇՄԱՆ ԵՂԱՆԱԿՆԵՐ

Աշխատանք 3.9. Խոլեստերոլի քանակական որոշումն արյան շիճուկում և կենդանական հյուսվածքներում

Խոլեստերոլի քանակական որոշումը կենդանական հյուսվածքներում

Խոլեստերոլն օրգանիզմում իրականացնում է մի շարք գործառույթներ. բջջաթաղանթի լիպիդային շերտի բաղադրիչ է, մասնակցում է կորտիկոստերոիդ հորմոնների, վիտամին D-ի, լեղաթթուների նյութափոխանակությանը: Էուկարիոտների պլազմատիկ թաղանթները պարունակում են մեծ քանակությամբ խոլեստերոլ (մոտ մեկ մոլեկուլ խոլեստերոլ յուրաքանչյուր ֆոսֆոլիպիդի մոլեկուլին): Խոլեստերոլը ջրում չի լուծվում, լուծվում է եթերում, քլորոֆորմում, բենզոլում:

Խոլեստերոլը (լուծված սպիրտ-եթեր խառնուրդում կամ քլորոֆորմում) փոխազդելով քացախաթթվային անհիդրիդի և ծծմբական թթվի հետ ստանում է կարմիր գունավորում, որը վերածվում է կապույտի, այնուհետև կանաչի (Լիբերման-Բուրխարդի ռեակցիա): Խիտ H_2SO_4-ի ազդեցությամբ խոլեստերոլից անջատվում է ջուր, չհագեցած ածխաջրածինը կոնդենսանում է H_2SO_4-ի հետ՝ առաջացնելով գունավորված արգասիքներ:

Նյութեր և ռեակտիվներ: 100 մգ ուղեղի հյուսվածք (200-300 մգ լյարդի հյուսվածք), սպիրտ-եթերային խառնուրդ (3:1), C_2H_5OH, $(CH_3CO)_2O$, խիտ H_2SO_4, խոլեստերոլի ստանդարտ լուծույթ (1 մգ խոլեստերոլ/1 մլ C_2H_5OH-ում)

Սարքեր: Չափիչ անոթներ, կաթոցիչներ, ֆիլտրի թուղթ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Հյուսվածքը տեղափոխել 15 մլ սպիրտ-եթերի խառնուրդ պարունակող 25 մլ չափիչ անոթի մեջ, թափահարել, տեղադրել ջրային բաղնիքում և խառնուրդը հասցնել եռման աստիճանի (թողնել 30 վրկ.): Անոթը սառեցնելուց հետո ավելացնել սպիրտ-եթերային խառնուրդ մինչև համապատասխան նիշը: Անոթի պարունակությունը խառնել և զտել: 5-10 մլ լուծամզվածքը տեղափոխել լայն փորձանոթի մեջ և եռացող ջրային բաղնիքում ջրազրկել: Մնացորդը լուծել 1 մլ C_2H_5OH-ում: Ստացված լուծույթից 0.5 մլ տեղափոխել փորձանոթի մեջ, ավելացնել 1 մլ $(CH_3CO)_2O$ և 4 կաթիլ խիտ H_2SO_4: Խառնուրդը թափահարել, գունավորման զարգացման նպատակով թողնել մութ պայմաններում 25-30 րոպե: Կանաչ գունավորման ուժգնությունը որոշել լուսաէլեկտրագու-

նաչափման եղանակով (ԼԷԳ, կարմիր լուսաֆիլտր, ալիքի երկարությունը 630-670 նմ, կյուվետի լայնությունը 0.5 սմ):

Ստուգիչ նմուշ է ծառայում 0.5 մլ C_2H_5OH, 1 մլ $(CH_3CO)_2O$ և 4 կաթիլ խիտ H_2SO_4 պարունակող լուծույթը:

Խոլեստերոլի քանակությունը որոշել տրամաչափական կորի օգնությամբ և հաշվարկել հետևյալ բանաձևով.

$$X = \frac{a \cdot Y \cdot Y_2 \cdot 1000}{b \cdot Y_1 \cdot Y_3} \quad \text{(մգ/կգ)},$$

որտեղ,

y_2 – խոլեստերոլի էթանոլային լուծույթի քանակությունն է (1 մլ),

a – խոլեստերոլի քանակությունը գունաչափվող նմուշում, մգ (ըստ տրամաչափական կորի),

y – սպիրտ - եթերային խառնուրդի ընդհանուր ծավալը (25 մլ),

y_1 – որոշման համար օգտագործված սպիրտ – եթերային լուծամզվածքի ծավալը (5 կամ 10 մլ),

y_3 – խոլեստերոլի էթանոլային լուծույթի ծավալը (0.5 մլ),

b – հյուսվածքի զանգվածը, մգ:

Տրամաչափական կորի կառուցումը. Պատրաստել տարբեր խտության խոլեստերոլի լուծույթներ: Ստանդարտ լուծույթը պետք է պարունակի 1 մգ խոլեստերոլ 1 մլ C_2H_5OH-ում: Կորի ստացման նպատակով օգտագործել 0.1 -0.5 մլ խոլեստերոլի լուծույթներ (նմուշների ծավալները հասցնել 0.5 մլ C_2H_5OH-ով), ավելացնել 1 մլ $(CH_3CO)_2O$, 4 կաթիլ H_2SO_4, թողնել մութ պայմաններում 25-30 րոպե, ապա նմուշները գունաչափել (ԼԷԳ, կարմիր լուսաֆիլտր, ալիքի երկարությունը 630-670 նմ, կյուվետի լայնությունը 0.5 սմ): Ստացված տվյալների հիման վրա կառուցել տրամաչափական կոր:

Խոլեստերոլի քանակական որոշումն արյան շիճուկում

Նորմայում մարդու արյան շիճուկի խոլեստերոլի քանակությունը 3.0-6.2 մմոլ/լ է: Խոլեստերոլի քանակության աճ (հիպերխոլեստերինեմիա) գրանցվում է աթերոսկլերոզի, շաքարային դիաբետի, լյարդի ախտահարումների դեպքում:

Խոլեստերոլի քանակական որոշման հիմքում Լիբերման-Բուրխարդի ռեակցիան է: Ռեակցիայի ընթացքում առաջացած կանաչ գունավորումը ուղիղ համեմատական է խոլեստերոլի քանակությանը:

Խոլեստերոլի քանակական որոշման ռեակցիայի ընթացքում անհրաժեշտ է աշխատել բացարձակ մաքուր և չոր լաբորատոր ապակեղենով, քանի որ կիրառվող ռեակտիվը հաշվարկված է այնպես, որ արյան շիճուկի սպիտակուցները նստվածք չառաջացնեն: Պղտորություն կարող է առաջանալ միայն ապակեղենում ջրի առկայության դեպքում

Նյութեր և ռեակտիվներ: Արյան շիճուկ, Իլկեի ռեակտիվ (10 մլ սառցային CH_3COOH-ին ավելացնել 50 մլ $(CH_3CO)_2O$, խառնելով ավելացնել 10 մլ խիտ H_2SO_4, լուծույթը պետք է լինի անգույն կամ դեղնավուն երանգի, լուծույթը պահել սառնարանում), խոլեստերոլի ստանդարտ լուծույթ (232 մգ խոլեստերոլը լուծել 2-3 մլ $CHCl_3$-ում, տեղափոխել 100 մլ չափիչ անոթի մեջ, ծավալը սպիրտով հասցնել նիշին (լուծույթը պարունակում է 6 մմոլ/լ խոլեստերոլ, լուծույթը պահել մուգ անոթում սառնարանում):

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, չափիչ անոթ, թերմոստատ, լուսաէլեկտրագունաչափ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Փորձնական նմուշի մեջ լցնել 2.1 մլ Իլկեի ռեակտիվ, զգուշությամբ փորձանոթի պատին սահեցնելով՝ ավելացնել 0.1 մլ արյան շիճուկ: Փորձանոթը թափահարել 10-12 անգամ, տեղադրել թերմոստատում (20 րոպե 37° C պայմաններում) գունավորման զարգացման նպատակով: Ստուգիչ նմուշի մեջ լցնել 2.2 մլ Իլկեի ռեակտիվ: Գունավորման ուժգնությունը չափել ստուգիչ նմուշի դիմաց (ԼԷԳ, ալիքի երկարությունը 630-670 նմ, կարմիր լուսաֆիլտր, կյուվետի լայնությունը 0.5 սմ):

Տրամաչափական կորի կառուցումը: Չորս փորձանոթների մեջ լցնել խոլեստերոլի լուծույթներ՝ ըստ ստորև բերված աղյուսակի, ավելացնել Իլկեի ռեակտիվ, նմուշների ընդհանուր ծավալը պետք է կազմի 2.2 մլ:

N	Խոլեստերոլի ստանդարտ լուծույթ, մլ	Իլկեի ռեակտիվ, մլ	Խոլեստերոլի կոնցենտրացիա, մմոլ/լ
1	0.05	2.15	3
2	0.10	2.10	6
3	0.15	2.05	9
4	0.20	2.00	12

Փորձանոթները թափահարել, թողնել 20 րոպե 37° C պայմաններում, գունաչափել ստուգիչ նմուշի դիմաց (ԼԷԳ, ալիքի երկարությունը 625 նմ, կարմիր լուսաֆիլտր, կյուվետի լայնությունը 0.5 սմ): Խոլեստերոլի ստանդարտ լուծույթով ռեակցիոն խառնուրդը կանաչ գունավորում ունի, շիճուկի նմուշի գունավորումը կարող է լինել կանաչ, կապույտ, գորշ, քանի որ շիճուկի տարբեր

բաղադրիչներ կարող են մասնակցել ռեակցիային: Բացի այդ՝ ազատ խոլեստերոլը և դրա էսթերներն առաջացնում են մոլեկուլային կլանման տարբեր գործակից ունեցող գունավոր համալիրներ:

Կառուցել տրամաչափական կոր, գտնել խոլեստերոլի քանակությունը 0.1 մլ արյան շիճուկում:

0.05 մլ լուծույթ պարունակող տրամաչափական նմուշի գունավորումը համապատասխանում է արյան շիճուկում խոլեստերոլի 3 մմոլ/լ կոնցենտրացիային, 0.1 մլ-ը՝ 6 մմոլ/լ կոնցենտրացիային և այլն:

Աշխատանք 3.10. Ցածր խտության լիպոպրոտեիների որոշումն արյան շիճուկում

Արյան լիպիդների զգալի մասը գտնվում է ճարպասպիտակուցային համալիրների կազմում՝ խիլոմիկրոններ, α և β լիպոպրոտեիններ: Լիպոպրոտեինները կարելի է անջատել տարբեր եղանակներով՝ ցենտրիֆուգման, էլեկտրաֆորեզի, քրոմատոգրաֆիայի: Ուլտրացենտրիֆուգման եղանակով անջատվում են խիլոմիկրոնները, տարբեր խտության լիպոպրոտեինները (բարձր խտության լիպոպրոտեինները՝ α - ԲԽԼ, ցածր խտության՝ β - ՑԽԼ, շատ ցածր խտության լիպոպրոտեինները): Լիպոպրոտեինները տարբերվում են սպիտակուցի քանակով, լիպոպրոտեինների մոլեկուլային զանգվածով, առանձին լիպիդային բաղադրիչների կազմով: α-լիպոպրոտեիններում մեծ է սպիտակուցների քանակը (մոլեկուլային զանգվածի 50-60%) և բարձր է հարաբերական խտությունը (1.063-1.21), β-լիպոպրոտեիններում մեծ է լիպիդների քանակը (մինչև 95%) և ցածր՝ հարաբերական խտությունը (1.01-1.063): β-լիպոպրոտեիններում խոլեստերինի քանակը կազմում է մոտավորապես 47%:

Նորմայում մարդու արյան շիճուկի լիպոպրոտեինների պարունակությունը 3.6-6.5 գ/լ է: Հաճախ արյան շիճուկի լիպոպրոտեինների քանակության աճը պայմանավորված է խոլեստերոլով հարուստ β-լիպոպրոտեիններով: β-լիպոպրոտեինների աճ է գրանցվում լիպիդային փոխանակության խանգարումների հետ կապված աթերոսկլերոզի, շաքարային դիաբետի դեպքում: Այս միացությունների կոնցենտրացիայի փոփոխությունները կարևորվում են նաև որպես լյարդի գործառույթների ցուցանիշներ:

Ցածր խտության լիպոպրոտեինները հեպարինի հետ առաջացնում են համալիր, որը կալցիումի քլորիդի ազդեցությամբ անջատվում է նստվածքի ձևով: Լուծույթի պղտորության աստիճանով կարելի է դատել արյան շիճուկում ցածր խտության լիպոպրոտեինների կոնցենտրացիայի մասին:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Չհեպարինացված արյան շիճուկ, $CaCl_2$-ի 0.27% լուծույթ, հեպարինի 1% լուծույթ:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, լուսաէլեկտրագունաչափ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Փորձանոթի մեջ լցնել 2 մլ $CaCl_2$-ի լուծույթ և 0.2 մլ արյան շիճուկ, խառնել: Որոշել լուծույթի օպտիկական խտությունը (E_1) $CaCl_2$-ի լուծույթի դիմաց (ԼԷԳ, ալիքի երկարությունը 620-670 նմ, կարմիր լուսաֆիլտր, կյուվետի լայնությունը 0.5 սմ): Գունաչափված լուծույթին ավելացնել 0.04 մլ հեպարին և ճիշտ 3 րոպե անց նորից գունաչափել (E_2) նույն պայմաններում:

Հաշվարկները կատարել հետևյալ բանաձևով.

$$X\ (\text{մգ}/\%) = (E_2 - E_1) \cdot 1000,$$

որտեղ

1000 – գ/լ վերահաշվարկի փորձարարական գործակիցն է:

ՃԱՐՊԵՐԻ ՔԱՆԱԿԱԿԱՆ ՅՈՒՅԱՆԻՇՆԵՐԻ ՈՐՈՇՈՒՄԸ

Աշխատանք 3.11. Թթվային թվի որոշումը

Թթվային թիվը բնութագրում է ճարպերի թթվայնությունը և որոշվում է KOH-ի մգ քանակով, որն անհրաժեշտ է 1 գ ճարպում առկա ազատ ճարպաթթուների չեզոքացման համար: Ճարպի երկար պահպանման դեպքում տեղի է ունենում ացիլգլիցերոլների հիդրոլիզ, ինչը հանգեցնում է ազատ ճարպաթթուների կուտակմանը, այսինքն՝ թթվայնության մեծացմանը: Ճարպի թթվայնության բարձրացումը բերում է նրա որակի իջեցմանը:

Թթվային թիվը նաև ցույց է տալիս՝ ճարպը հասուն, թե չհասունացած սերմերից է անջատվել, քանի որ չհասունացած սերմերում ազատ ճարպաթթուների քանակությունն ավելի շատ է: Թթվային թիվը հաստատուն մեծություն չէ:

Սեթողի հիմքում ճարպում պարունակվող ազատ ճարպաթթուների չեզոքացումն է, որն իրականացվում է KOH-ով.

$$R\text{-}COOH + KOH \rightarrow R\text{-}COOK + H_2O$$

Ճարպաթթվի չեզոքացման վրա ծախսված KOH-ի քանակով որոշվում է թթվային թիվը:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Թարմ և կծվեցված կենդանական յուղ, սպիրտ, եթեր, KOH-ի 0.1 Ն սպիրտային լուծույթ, $C_{20}H_{14}O_4$-ի 1% սպիրտային լուծույթ:

Պարագաներ: Անոթներ, կաթոցիչներ:

Աշխատանքի ընթացքը.

100 մլ տարողությամբ 2 անոթներից մեկում լցնել 1 գ թարմ յուղ, մյուսում՝ 1 գ կծվեցված յուղ: Յուրաքանչյուր անոթի մեջ լցնել 10-ական մլ 1:1 հարաբերությամբ խառնված եթերի և սպիրտի խառնուրդ, ավելացնել 1-2 կաթիլ $C_{20}H_{14}O_4$-ի լուծույթ, թափահարել մինչև ճարպի լուծվելը և տիտրել 0.1 Ն KOH-ի սպիրտային լուծույթով մինչև բաց վարդագույն գունավորման առաջացումը: Եթե փորձի համար վերցվել է մուգ գունավորում ունեցող ճարպ, որտեղ դժվար է դիտել վարդագույն գունավորումը, ապա ֆենոլֆտալեինի փոխարեն պետք է օգտագործել թիմոլֆտալեինի 1% սպիտային լուծույթ և տիտրել մինչև կապույտ գունավորման առաջացումը:

Թթվային թիվը հաշվել հետևյալ բանաձևով.

$$\text{Թթվային թիվ} = \frac{5.6 \cdot V}{a},$$

որտեղ

V – տիտրման համար ծախսված 0,1 Ն KOH-ի լուծույթի ծավալն է (մլ),

a – յուղի կշիռը (գ),

5.6 – 0.1 Ն KOH-ի սպիրտային լուծույթի 1 մլ-ում պարունակվող KOH-ի զանգվածը (մգ):

Աշխատանք 3.12. Յոդային թվի որոշումը

Յոդային թիվը ցույց է տալիս յողի այն քանակը մգ-ներով, որը կարող է միանալ 100 գ ճարպի հետ: Քանի որ յողը միանում է ճարպի բաղադրության մեջ առկա չհագեցած ճարպաթթուներին կրկնակի կապի դիրքում, ապա յոդային թիվը բնորոշում է ճարպում չհագեցած ճարպաթթուների պարունակությունը: Որքան բարձր է յոդային թիվը, այնքան ավելի հեղուկ է տվյալ ճարպը և սննդային նպատակներով օգտագործելու համար պակաս պիտանի, սակայն այն կարելի է կիրառել լաքեր, ներկեր պատրաստելու նպատակով: Որքան բարձր է յոդային թիվը, այնքան հեշտ է կատարվում ճարպի օճառացումը:

Ճարպի յողացումն ընթանում է հետևյալ ռեակցիայով.

$$\text{R-CH=CH- R} + I_2 + H_2O \rightarrow \text{R-CHI-CHOH- R} + HI$$

Նյութեր և ռեակտիվներ: Տարբեր բուսական ճարպեր, J_2-ի 0.1 Ն սպիրտային լուծույթ, օսլայի 1% լուծույթ, $Na_2S_2O_3$-ի 0.1 Ն լուծույթ:

Պարագաներ: Կաթոցիչներ, փորձանոթներ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Փորձանոթում լցնել 2-3 մլ բուսական յուղ, ավելացնել 25 մլ 0.1 Ն J_2-ի սպիրտային լուծույթ, պարունակությունը խառնել, փակել խցանով և 2 ժամ տևողությամբ թողնել մութ տեղ: Այնուհետև որպես ցուցանշիչ ավելացնել 3-4 կաթիլ օսլայի լուծույթ և տիտրել 0.1 Ն $Na_2S_2O_3$-ի լուծույթով մինչև կապույտ գունավորման անհետացումը, որը պայմանավորված է միջավայրում մնացորդային ազատ յողի առկայությամբ: 1 մլ 0.1 Ն $Na_2S_2O_3$-ի լուծույթին համապատասխանում է 1 մլ 0.1 Ն J_2 լուծույթ կամ 0.01269 գ J_2:

Յոդային թիվը 100 գ ճարպին միացած յողի միլիգրամների քանակությունն է, որը կարելի է հաշվարկել հետևյալ բանաձևով.

$$\text{Յոդային թիվ} = \frac{(a-b)\cdot T\cdot 0.01269\cdot 100}{B},$$

որտեղ

a – 0.1 Ն J_2-ի լուծույթի ծավալն է (մլ),

b – J_2-ի տիտրման վրա ծախսված 0.01 Ն $Na_2S_2O_3$-ի ծավալը (մլ),

B – ճարպի կշիռը (գ),

T – $Na_2S_2O_3$-ի լուծույթի ուղղումը

0.001269 – 0.01 Ն $Na_2S_2O_3$-ի լուծույթի տիտրը:

Աշխատանք 3.13. Գերօքսիդային թվի որոշումը

Ճարպերի բաղադրության մեջ մտնող ճարպաթթուներն օդի թթվածնի առկայությամբ կարող են մասնակիորեն օքսիդանալ՝ վերածվելով գերօքսիդների: Այս երևույթը դիտվում է ճարպերի կծվելու, ինչպես նաև դրանց չորացալու դեպքում: Հետևաբար պերօքսիդային թիվը ճարպերի օքսիդացման ցուցանիշ է: Սովորաբար գերօքսիդային թիվն արտահայտվում է յոդի միլիգրամներով, որն անջատվում է KJ-ից 100 գ ճարպում պարունակվող գերօքսիդների հետ դրանց փոխազդեցության արդյունքում:

Գերօքսիդային թվի որոշման հիմքում ընկած է թթվային միջավայրում կալիումի յողիդի և ճարպերի պերօքսիդային միացությունների փոխազդեցությունը, ինչի արդյունքում անջատվում է յոդ: Անջատված յոդը տիտրում են նատրիումի հիպոսուլֆիտի լուծույթով.

$$2\ Na_2S_2O_3 + J_2 \rightarrow 2NaJ + Na_2S_4O_6$$

Ծախսված հիպոսուլֆիտի քանակով որոշում են գերօքսիդային թիվը:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Տարբեր ճարպեր, սառցային CH_3COOH, KI-ի հագեցած լուծույթ, $CHCl_3$, օսլայի 1% լուծույթ, $Na_2S_2O_3$-ի 0.01 Ն լուծույթ:

Պարագաներ: Անոթներ, կաթոցիչներ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Կշռել 1 գ ճարպ և տեղափոխել 100 մլ տարողությամբ անոթի մեջ, երկրորդ՝ ստուգիչ անոթի մեջ լցնել 2-3 մլ ջուր: Անոթներին ավելացնել 10-ական մլ $CHCl_3$, ճարպը լուծել, ապա ավելացնել 20-ական մլ սառցային CH_3COOH և 1-ական մլ KI-ի հագեցած լուծույթ (թարմ պատրաստված): Անոթների պարունակությունը խառնել և թողնել 3 րոպե: Այնուհետև ավելացնել 1-ական մլ 1% օսլայի լուծույթ և անջատված յոդը տիտրել 0.01 Ն $Na_2S_2O_3$-ի լուծույթով մինչև կապույտ գունավորման անհետացումը:

Գերօքսիդային թիվը հաշվել հետևյալ բանաձևով.

$$X = \frac{(a-b)\cdot T \cdot 0.0001269 \cdot 100}{B},$$

որտեղ

X – գերօքսիդային թիվը,

a – ճարպի և կալիումի յոդիդի փոխազդեցությունից անջատված յոդի տիտրման վրա ծախսված 0.01 Ն $Na_2S_2O_3$-ի ծավալը (մլ),

b – ստուգիչ նմուշի տիտրման վրա ծախսված 0.01 Ն $Na_2S_2O_3$-ի ծավալը (մլ),

T – $Na_2S_2O_3$-ի լուծույթի ուղղումը,

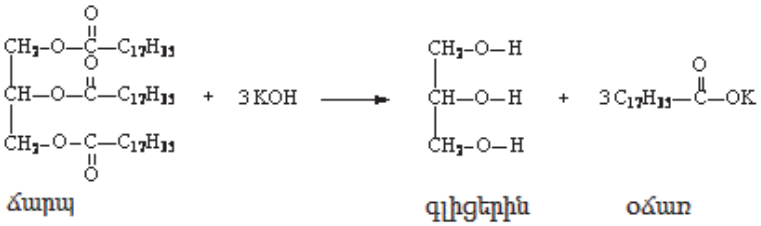
B – ճարպի կշիռը (գ),

0.001269 –0.01 Ն նատրիումի հիպոսուլֆիտի լուծույթի տիտրը:

Աշխատանք 3.14. Օճառացման թվի և եթերային թվի որոշումը

Օճառացման թիվ է կոչվում KOH-ի միլիգրամների այն քանակը, որն անհրաժեշտ է 1 գ ճարպում պարունակվող բոլոր ազատ և գլիցերինի հետ կապված ճարպաթթուների չեզոքացման համար: Եթերացման թիվ է կոչվում KOH-ի միլիգրամների քանակը, որն անհրաժեշտ է 1 գ ճարպում պարունակվող այն ճարպաթթուների չեզոքացման համար, որոնք անջատվում են եռգլիցերիդների օճառացման արդյունքում: Բուսական ճարպերում օճառացման թիվը կարող է զգալիորեն փոփոխվել: Կոկոսի, արմավենու և որոշ այլ բույսերի ճարպերն ունեն օճառացման բարձր, իսկ խաչածաղկավորների և գերչակի ճարպերը՝ օճառացման ցածր թիվ:

Ճարպը KOH-ի առկայությամբ եռացնելիս հիդրոլիզվում է, ազատ ճարպաթթուները փոխազդում են KOH-ի հետ.



$$R\text{-}COOH + KOH \rightarrow R\text{-}COOK + H_2O$$

Ճարպաթթուների հետ չփոխազդած հիմքի ավելցուկը տիտրվում է աղաթթվով:

Բոլոր ճարպաթթուների չեզոքացման վրա ծախսված KOH-ի քանակով կարելի է հաշվել օճառացման թիվը:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Տարբեր ճարպեր, KOH-ի 0.5 Ն սպիրտային լուծույթ, HCl-ի 0.5 Ն լուծույթ, $C_{20}H_{14}O_4$-ի 1% լուծույթ:

Պարագաներ: Աման, կաթոցիչներ:

Աշխատանքի ընթացքը:

1. **Օճառացման թվի որոշումը:** Կշռել 1 գ յուղ, լցնել 100 մլ տարողությամբ ամանի մեջ, ավելացնել 20 մլ KOH-ի սպիրտային լուծույթ, ամանը փակել հետադարձ սառնարան ունեցող խցանով և խառնուրդը եռացնել ջրային բաղնիքում 40-50 րոպե: Սառեցնել, ավելացնել 2 կաթիլ ֆենոլֆտալեինի լուծույթ, 10 մլ ջուր, խառնել և տիտրել HCl-ի լուծույթով մինչև գունավորման անհետացումը: Նույնը կատարել ստուգիչ նմուշի հետ, որը յուղի փոխարեն պարունակում է 1 մլ ջուր: Ստուգիչ և փորձնական նմուշների տիտրման համար ծախսված HCl-ի տարբերությունը համապատասխանում է հետազոտվող ճարպում պարունակվող ազատ և կապված ճարպաթթուների չեզոքացման համար ծախսված KOH-ի քանակությանը: Օճառացման թիվը հաշվել հետևյալ բանաձևով:

$$\text{օ.թ} = \frac{(V_1 - V_2) \cdot 28}{B},$$

որտեղ

V_1 – ստուգիչ նմուշի տիտրման համար ծախսված HCl-ի լուծույթի ծավալը (մլ),

V_2 – փորձնական նմուշի տիտրման համար ծախսված HCl-ի լուծույթի ծավալը (մլ),

B – ճարպի կշիռը (գ),

28 – KOH-ի 1մլ լուծույթում պարունակվող KOH-ի զանգվածը (մգ):

2. Եթերային թվի որոշումը – ճարպերի եթերային թիվը որոշել օճառացման և թթվայնության թվերի տարբերությամբ:

Օգտագործելով եթերային թիվը՝ կարելի ճարպում որոշել .ևաև գլիցերինի պարունակությունը՝ հաշվի առնելով, որ 1 մոլեկուլ եռացիլգլիցերինի օճառացման համար ծախսվում է 3 մոլեկուլ KOH, և անջատվում է 1 մոլեկուլ գլիցերին:

Հարցեր

1. Ի՞նչ հիմնական գործառույթներ են իրականացնում լիպիդները:
2. Ի՞նչ եղանակով կարելի է բացահայտել ճարպերի բաղադրամասերի առկայությունը:
3. Ո՞րն է ճարպերի հագեցվածության աստիճանի որոշման սկզբունքը: Ո՞ր ճարպերում են գերակշռում չհագեցած ճարպաթթուները:
4. Կառուցվածքային ինչպիսի՞ առանձնահատկություններով է բացատրվում ճարպաթթուների հալման ջերմաստիճանը:
5. Ի՞նչ հատկություններով է օժտված հիմնականում չհագեցած ճարպաթթուներ պարունակող ճարպը:
6. Որո՞նք են արյան շիճուկի հիմնական լիպոպրոտեինները: Նշել դրանց կազմի մեջ մտնող հիմնական բաղադրամասերը:
7. Ո՞րն է ֆոսֆոլիպիդների քանակական որոշման նպատակը:
8. Ի՞նչ որակական ռեակցիաներ են բնորոշ լեղաթթուներին:
9. Խոլեստերոլի քանակական որոշման ի՞նչ մեթոդ է հայտնի:
10. Ինչպե՞ս կարելի է անջատել լեցիտինները, կեֆալինները:
11. Ինչպե՞ս կարելի է որոշել ճարպի թթվային թիվը, օճառացման թիվը:
12. Ո՞րն է յոդային թվի որոշման սկզբունքը:
13. Ինչի՞ մասին է վկայում ճարպի թթվային թվի արժեքի աճը:
14. 2.5, թե՞ 5.3 թթվային թիվ ունեցող ճարպն է ավելի որակյալ:
15. Ինչո՞ւ է կաթի ճարպի օճառացման թիվը մեծ կենդանական և բուսական յուղերի օճառացման թվից:
16. Ո՞ր որակական ռեակցիաներն են բնորոշ խոլեստերոլին:
17. Ինչպե՞ս կատարել ֆոսֆատիդիլխոլինի բաղադրիչների բացահայտում:
18. Ո՞ր որակական ռեակցիան է կիրառվում ֆոսֆոգլիցերիդների բացահայտման նպատակով:
19. Ֆոսֆատիդիլխոլինի կազմում առկա է արդյո՞ք ազոտի ատոմ:
20. Ի՞նչ ազոտային միացություն է պարունակում ֆոսֆատիդիլխոլինը:
21. Ճարպերի կառուցվածքի և հատկությունների ո՞ր յուրօրինակություններն են ապահովում դրանց կենսաբանական գործառույթների իրականացումը:
22. Ի՞նչ բաղադրամասեր են պարունակում գլիկոլիպիդները:
23. Կարո՞ղ են լիպիդներն իրականացնել կատալիտիկ ֆունկցիա:
24. Լիպիդների կազմում առկա՞ է ֆոսֆորական թթու:
25. Ո՞րն է կարդիոլիպինի կառուցվածքի առանձնահատկությունը:
26. Որո՞նք են ճարպի հիդրոլիզն ապահովող նպաստավոր պայմանները՝ ֆերմենտ, ֆերմենտի խթանիչ, ջերմաստիճան:
27. Օրգանիզմում ի՞նչ միացություններ են առաջանում խոլեստերոլից:

ԳԼՈՒԽ 4
ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐ

Ֆերմենտները քիմիական ռեակցիաներն արագացնող սպիտակուցային բնույթի կատալիզատորներ են: Դրանք օժտված են սպիտակուցներին բնորոշ հատկություններով և կատալիտիկ ունակությունները պայմանավորող կառուցվածքային յուրահատկություններով:

Ֆերմենտները և անօրգանական բնույթի կատալիզատորները ունեն ընդհանուր հատկանիշներ.

- կատալիզում են միայն էներգիային տեսանկյունից հնարավոր ռեակցիաները,
- չեն փոփոխում ռեակցիայի հավասարակշռությունը,
- չեն ծախսվում ռեակցիայի ընթացքում,
- չեն մասնակցում ռեակցիայի արգասիքների առաջացմանը:

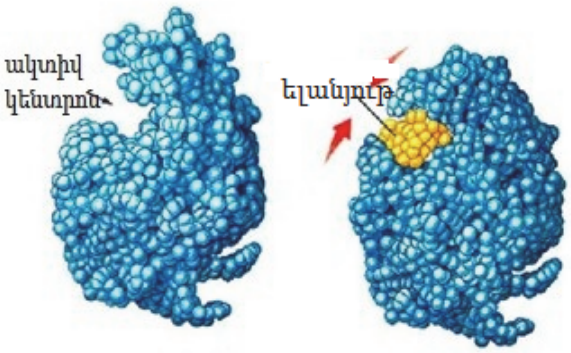
Ֆերմենտները և անօրգանական բնույթի կատալիզատորներն ունեն տարբերություններ.

- ֆերմենտները բացառապես սպիտակուցային բնույթի մոլեկուլներ են,
- ֆերմենտները ցուցաբերում են բարձր յուրահատկություն ելանյութի, կատալիզվող ռեակցիայի նկատմամբ,
- ֆերմենտները կարգավորվող ակտիվությամբ օժտված կատալիզատորներ են,
- ֆերմենտներն աշխատում են որոշակի պայմաններում:

Ֆերմենտները հիմնականում բաղկացած են երկու կամ ավելի պոլիպեպտիդային շղթաներից՝ ենթամիավորներից: Մի քանի ենթամիավորներից բաղկացած ֆերմենտներն անվանվում են օլիգոմեր ֆերմենտներ:

Ֆերմենտները, ըստ կառուցվածքի, կարող են լինել պարզ կամ բարդ, եթե կառուցվածքում ունեն նաև ոչ սպիտակուցային բաղադրիչ: Մի շարք ֆերմենտներ կարող են նույն օրգանիզմում, նույն բջջում հանդես գալ տարբեր մոլեկուլային ձևերով: Նույն տեսակի, նույն բջջի ֆերմենտների գենետիկորեն պայմանավորված տարբեր ձևերն անվանվում են իզոֆերմենտներ:

Ֆերմենտային ռեակցիային մասնակցող ելանյութերի մոլեկուլները զգալիորեն փոքր են ֆերմենտների մոլեկուլներից, այսինքն՝ ելանյութի հետ ռեակցիայի ընթացքում փոխազդում է ֆերմենտի միայն որոշակի հատված: Այդ հատվածն անվանվում է ֆերմենտի ակտիվ կենտրոն (նկ. 4.1): Ակտիվ կենտրոնը պայմանականորեն բաժանվում է ֆերմենտի ամինաթթվային մնացորդների գործառույթային խմբի և ելանյութի միացումը ապահովող և ելանյութի քիմիական վերափոխումը ապահովող կատալիտիկ հատվածների: Պարզ ֆերմենտների կատալիտիկ կենտրոնը կազմված է միայն ամինաթթվային մնացորդներից, բարդ ֆերմենտներում կատալիտիկ կենտրոնի գործառույթն իրականացնում է ապոֆերմենտի հետ միացած կոֆերմենտը: Շատ ֆերմենտներ կատալիտիկ ակտիվություն դրսևորում են ոչ սպիտակուցային միացությունների՝ կոֆակտորների առկայությամբ: Տարբերակում են կոֆակտորների երկու խումբ՝ մետաղի իոններ և կոֆերմենտներ:



Նկ. 4.1. Ֆերմենտ-ելանյութ համարիլի առաջացումը:

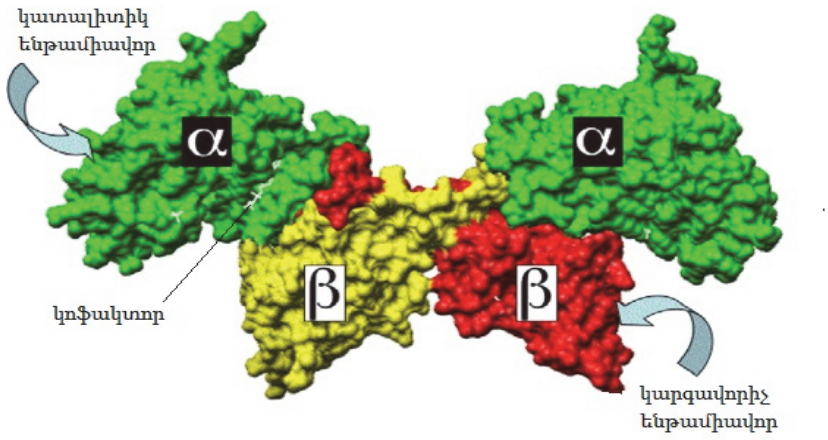
Մետաղի իոնները ֆերմենտի գործունեությանը մասնակցում են տարբեր եղանակներով.

- փոխում են ելանյութի մոլեկուլի տարածական կառուցվածքը, ինչն ապահովում է ֆերմենտի ակտիվ կենտրոնի հետ վերջինիս փոխազդեցությունը,
- ապահովում են ֆերմենտի ակտիվ կենտրոնի բնականոն տարածական կառուցվածքը: Mg^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+}, Mo^{2+} իոնները մասնակցում են ակտիվ կենտրոնի կայունացմանը և նպաստում կոֆերմենտի միացմանը ակտիվ կենտրոնին,
- կայունացնում են ֆերմենտի սպիտակուցային մոլեկուլի տարածական կառուցվածքը: Օրինակ՝ ալկոհոլդեհիդրոգենազի չորրորդային կառուցվածքի կայունության համար անհրաժեշտ են Zn^{2+} իոններ,
- ֆերմենտային կատալիզի անմիջական մասնակից են:

Կոֆերմենտներն օրգանական միացություններ են, հաճախ վիտամինների ածանցյալներ, տեղակայված են ֆերմենտի ակտիվ կենտրոնում, անմի-

ջականորեն մասնակցում են ֆերմենտային կատալիզին: Կոֆերմենտ պարունակող և հետևաբար կատալիտիկ ակտիվությամբ օժտված ֆերմենտներն, անվանվում են հոլոֆերմենտ (նկ. 4.2): Այդ ֆերմենտների սպիտակուցային բաղադրիչը կոֆերմենտի բացակայության պայմաններում կատալիտիկ ակտիվություն չի ցուցաբերում.

Կոֆերմենտ + Ապոֆերմենտ ↔ Հոլոֆերմենտ
(սպիտակուց)
ակտիվ չէ ակտիվ է



Նկ. 4.2. Հոլոֆերմենտի կազմավորումը

Կոֆերմենտը կարող է միանալ ֆերմենտի սպիտակուցային հատվածին միայն ռեակցիայի իրականացման պահին կամ կարող է միացած լինել ապոֆերմենտին ամուր կովալենտ կապերով: Առավել տարածված կոֆերմենտներն են CoA-ն, SH-ը, թիամինպիրոֆոսֆատը, ֆոլատային կոֆերմենտները, բիոտինը, կոբալամինային (B_{12}) կոֆերմենտները, ջրածին տեղափոխող կոֆերմենտներ ՆԱԴ-ը, ՆԱԴՀ-ը, ՖԱԴ-ը, ՖՄՆ-ը, լիպոաթթուն, կոէնզիմ Q-ն:

Ֆերմենտների ելանյութային կենտրոնը լինելով ելանյութ-ֆերմենտ համալիրի ստեղծման պատասխանատու, հանդիսանում է «խարիսխային» տարածք ելանյութ-ֆերմենտ փոխազդեցությունն ապահովող իոնային, հիդրոֆոբ, ջրածնային, դիսուլֆիդային կապերի համար:

Բազմաթիվ ֆերմենտներ ակտիվ կենտրոնի հետ մեկտեղ ունենում են նաև կարգավորիչ (ալոստերիկ) կենտրոն(ներ): Ալոստերիկ կենտրոնը ֆերմենտի մոլեկուլի հատված է, որին միանում է ցածրամոլեկուլային միացու-

թյուն և փոփոխում ֆերմենտի երրորդային կառուցվածքը, ինչի հետևանքով փոխվում է ֆերմենտի ակտիվությունը: Ֆերմենտների ազդեցության մեխանիզմը կարելի ներկայացնել հետևյալ տեսքով.

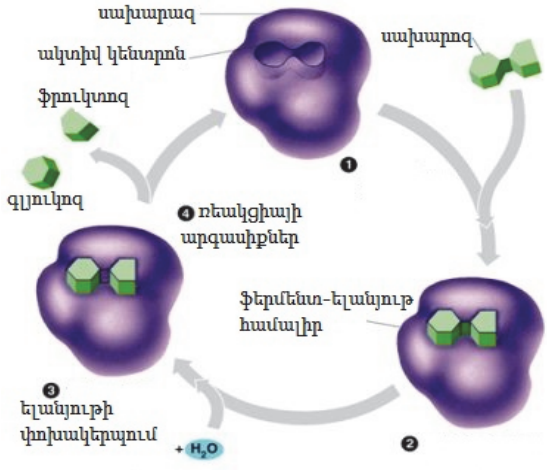
$$E+S \rightarrow [ES] \rightarrow [ES1] \rightarrow [EP] \rightarrow E + P,$$

որտեղ

E – ֆերմենտ,

S – ելանյութ,

P – արգասիք:



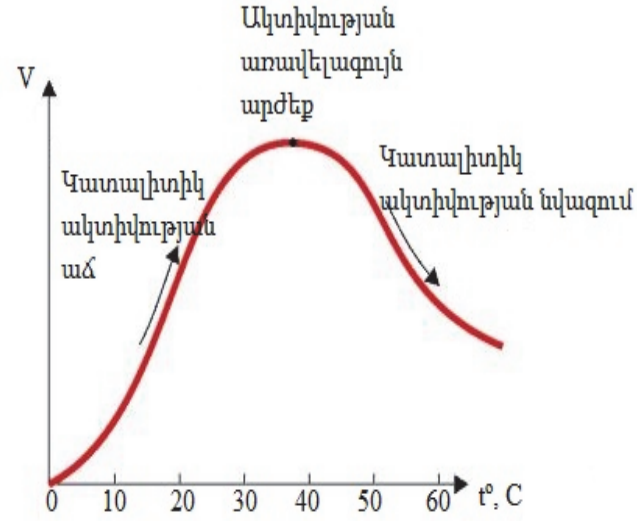
Նկ. 4.3. Ֆերմենտային կատալիզ:

Ֆերմենտային կատալիզի առաջին փուլն արտահայտվում է ելանյութ-ֆերմենտ համալիրի (ելանյութը միանում է ֆերմենտի ակտիվ կենտրոնին) առաջացմամբ, ինչն էլ որոշում է կատալիտիկ գործընթացի յուրահատկությունը: Այս փուլում կարող է դրսևորվել ֆերմենտային ակտիվության կարգավորում ալոստերիկ կենտրոնին կարգավորիչ նյութի միացման հաշվին. արդյունքում տեղի է ունենում ֆերմենտի ակտիվ կենտրոնի տարածական կառուցվածքի փոփոխություն, ավելի դյուրին է դառնում ելանյութ միացնելու ունակությունը: Ելանյութ-ֆերմենտ (ES) համալիրը կազմավորվում է ակնթարթորեն: Հաջորդ փուլը բնորոշվում է ֆերմենտ-ելանյութային համալիրի ակտիվացմամբ: Ելանյութն ենթարկվում է որոշակի փոփոխության, դառնում ավելի մատչելի քիմիական ռեակցիայի համար: Այս փուլը որոշում է ռեակցիայի արագությունը: Երրորդ փուլում ընթանում է ռեակցիան, առաջանում է ֆեր-

մենտ-ռեակցիայի արգասիք համալիրը, և եզրափակիչ փուլ-համալիրից անջատվում է արգասիքը:

Ֆերմենտների կարևոր հատկություններից են.

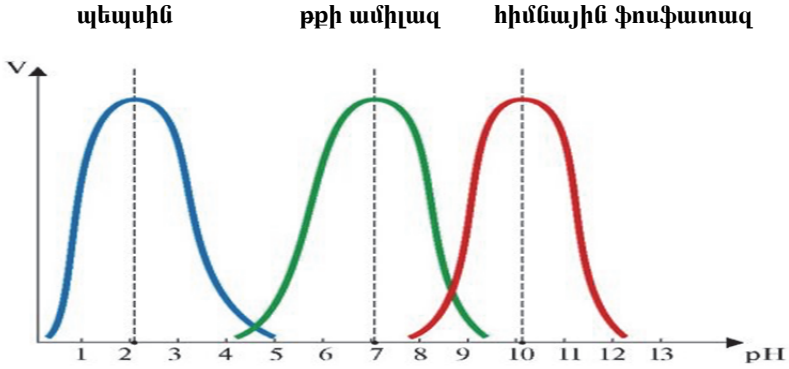
- յուրահատկությունը. ֆերմենտը «ընտրողաբար է մոտենում» քիմիական ռեակցիայի իրականացմանը: Տարբերակում են ֆերմենտի ելանյութային և կատալիտիկ յուրահատկություն՝
  - ✓ ելանյութային յուրահատկություն – յուրաքանչյուր ֆերմենտ ընդունակ է փոխազդելու մեկ կամ մի քանի ելանյութերի հետ,
  - ✓ բացարձակ յուրահատկություն – ֆերմենտի ակտիվ կենտրոնը համապատասխանում է միայն մեկ ելանյութի (ուրեազը կատալիզում է միայն միզանյութի հիդրոլիզը),
  - ✓ խմբակային յուրահատկություն – ֆերմենտը կատալիզում է կառուցվածքով միանման ելանյութերի նույնատիպ ռեակցիաներ (ալկոհոլդեհիդրոգենազը կատալիզում է էթանոլի և ալիֆատիկ այլ սպիրտների վերափոխման ռեակցիաները),
  - ✓ ստերեոյուրահատկություն – ֆերմենտը ցուցաբերում է բացարձակ յուրահատկություն ելանյութի գոյություն ունեցող ստերեոիզոմերներից միայն մեկի նկատմամբ,
  - ✓ կատալիտիկ յուրահատկություն – մեկ ելանյութը կարող է ենթարկվել վերափոխման մի քանի ֆերմենտների ազդեցությամբ (լյարդի բջիջներում գլյուկոզ-6-ֆոսֆատը չորս տարբեր ֆերմենտների ելանյութ է՝ ֆոսֆոգլյուկոմուտազ, ֆոսֆոգլյուկոիզոմերազ, գլյուկոզ-6-ֆոսֆատդեհիդրոգենազ, գլյուկոզ-6-ֆոսֆատազ),
- ֆերմենտային ռեակցիայի արագության կախվածությունը միջավայրի ջերմաստիճանից: Ռեակցիան կընթանա առավելագույն արագությամբ տվյալ ֆերմենտի համար նպաստավոր ջերմաստիճանի պայմաններում: Ֆերմենտի ակտիվության կախվածությունը ջերմաստիճանից նկարագրվում է զանգակաձև կորով (նկ. 4.4):



Նկ. 4.4. Ֆերմենտային ռեակցիայի արագության կախվածությունը միջավայրի ջերմաստիճանից:

Այն կանոնը, որ ջերմաստիճանի բարձրացումը 10°C-ով բարձրացնում է ռեակցիայի արագությունը 2-4 անգամ, գործում է մինչև 55-60°C սահմաններում, մինչև բնափոխման ջերմաստիճանը: Սակայն, կան բացառություններ. որոշ մանրէների ֆերմենտներ գործում են տաք աղբյուրներում, գեյզերներում: Ջերմաստիճանի նվազումը զգալիորեն իջեցնում է ֆերմենտի ակտիվությունը, սակայն չի դադարեցնում: Ձմեռային քուն մտնող որոշ կենդանիների մարմնի ջերմաստիճանը նվազում է մինչև 3-5°C: Ֆերմենտների այս հատկությունը կիրառվում է կրծքավանդակի շրջանում իրականացվող վիրահատությունների ժամանակ, երբ անհրաժեշտ է հիվանդի ջերմությունն իջեցնել մինչև 22°C:

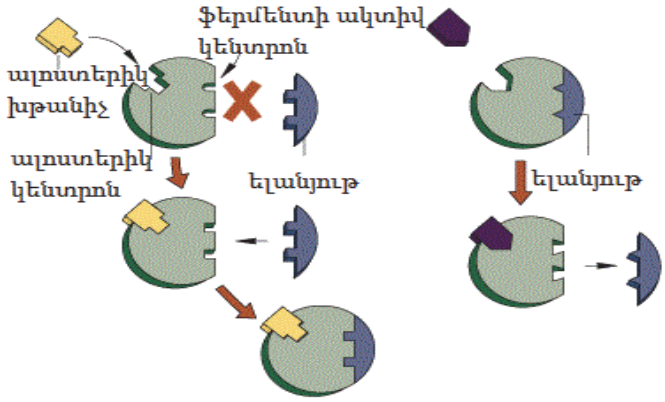
- Ֆերմենտի ակտիվության կախվածությունը միջավայրի pH-ից նույնպես արտահայտվում է զանգակածև կորով: Յուրաքանչյուր ֆերմենտ ունի իր pH-ի նեղ սահմանները (նկ. 4.5): Բջջում և բջջից դուրս pH-ի արժեքի տատանումները կարևորվում են հիվանդությունների առաջացման և զարգացման տեսանկյունից, քանի որ փոխում են տարբեր նյութափոխանակային ուղիների ֆերմենտների ակտիվությունները:



Նկ. 4.5. Ֆերմենտային ռեակցիայի արագության կախվածությունը միջավայրի pH-ից, որտեղ V-ն ռեակցիայի արագությունն է:

- Ֆերմենտային ռեակցիայի կարգավորման հնարավորությունը տարբեր միացությունների ազդեցությամբ:

Ֆերմենտի ակտիվության վրա ազդող միացություններն անվանվում են էֆեկտորներ: Էֆեկտորները կարող են արգելակել կամ խթանել ռեակցիան (նկ. 4.6):



Նկ. 4.6. Ֆերմենտ-խթանիչ փոխազդեցություն:

Տարբերակում են դարձելի և անդարձելի արգելակում: Դարձելի արգելակիչները միանում են ֆերմենտին թույլ կապերով և որոշակի պայմաններում հեշտ դիսոցվում են: Անդարձելի արգելակիչները ֆերմենտին միանում են ամուր կովալենտ կապերով: Ըստ ազդեցության մեխանիզմի՝ տարբերում են մրցակցային և ոչ մրցակցային դարձելի արգելակիչները: Խոչընդոտելով ֆերմենտ-ենթաստրատային համալիրի առաջացմանը՝ մրցակցային արգելակումը

ավազեցնում է ֆերմենտային ռեակցիայի արագությունը: Մրցակցային արգելակման յուրահատկությունն այն է, որ ելանյութի կոնցենտրացիայի բարձրացման հետևանքով արգելակումը դադարում է, քանի որ արգելակիչը չի փոփոխում ֆերմենտի կառուցվածքը: Օրինակ՝ խնձորաթթուն ունենալով սաթաթթվին նմանատիպ կառուցվածք, միանում է սուկցինատդեհիդրոգենազի ակտիվ կենտրոնին և արգելակում սուկցինատդեհիդրոգենազային ռեակցիան: Ֆերմենտների արգելակիչների ուսումնասիրությունը դեղագործության զարգացման տեսանկյունից ունի գործնական մեծ նշանակություն: Կլինիկայում կիրառվում են բազմաթիվ դեղամիջոցներ, որոնք գործում են որպես ֆերմենտների մրցակցային արգելակիչներ:

Ոչ մրցակցային դարձելի արգելակման դեպքում արգելակիչը ֆերմենտի հետ փոխազդում է ակտիվ կենտրոնից դուրս, մոլեկուլի այլ հատվածում (ալոստերիկ կենտրոնում): Ոչ մրցակցային արգելակիչները ելանյութի կառուցվածքային անալոգներ չեն և դրանց միացումը ֆերմենտին փոփոխում է ֆերմենտի ակտիվ կենտրոնի կոնֆորմացիան, նվազեցնում ռեակցիայի արագությունը կամ դադարեցնում ռեակցիան: Ոչ մրցակցային արգելակման օրինակ է ծանր մետաղների փոխազդեցությունը ֆերմենտների գործառույթային խմբերի հետ:

Ներկայումս հայտնի են բջիջների տարբեր կոմպարտմենտներում տեղակայված ֆերմենտների մոտավորապես 2000 տեսակ: Ֆերմենտները դասակարգվում են ըստ կատալիզվող քիմիական ռեակցիաների բնույթի, և տարբերում են ֆերմենտների վեց դաս՝ օքսիդառեդուկտազներ, տրանսֆերազներ, հիդրոլազներ, լիազներ, իզոմերազներ, լիգազներ:

Տարբեր ֆերմենտներով կատալիզվող ռեակցիաները

N	Ֆերմենտի դաս	Կատալիզվող ռեակցիաների բնույթ
1	Օքսիդառեդուկտազներ	Օքսիդավերականգնող
2	Տրանսֆերազներ	Ֆունկցիոնալ խմբերի տեղափոխումը դոնորից ակցեպտորին
3	Հիդրոլազներ	Կովալենտ կապերի հիդրոլիտիկ ճեղքում
4	Լիազներ	Որոշակի խմբերի (CO_2, H_2O, NH_3) անջատում (միացում) ելանյութից ոչ հիդրոլիտիկ եղանակով
5	Իզոմերազներ	Ներմոլեկուլային փոխակերպումներ
6	Լիգազներ (սինթետազներ)	Կովալենտ կապի առաջացում երկու կամ ավելի միացությունների միջև (ԱԵՖ-ի էներգիայի օգտագործմամբ)

Ֆերմենտների ակտիվության որոշումը

Կենսաբանական օբյեկտներում ֆերմենտների քանակական պարունակության որոշումը կապված է որոշ դժվարությունների հետ, քանի որ հյուսվածքներում և բջիջներում դրանք առկա են չնչին քանակներով: Այդ իսկ պատճառով ֆերմենտների քանակության մասին դատում են որոշակի պայմաններում կատալիզվող ռեակցիայի արագությամբ: Նպաստավոր ջերմաստիճանի և միջավայրի pH-ի պայմաններում ելանյութով ֆերմենտի լրիվ հագեցման դեպքում կատալիզվող ռեակցիայի արագությունն ուղիղ համեմատական է ֆերմենտի կոնցենտրացիային: Ֆերմենտային ռեակցիայի արագությունը որոշվում է կա՛մ ելանյութի քանակության նվազմամբ, կա՛մ արգասիքի քանակության աճով: Որպես ֆերմենտային ակտիվության միավոր (E)՝ ընդունում են ֆերմենտի այն քանակությունը, որը տվյալ պայմաններում կատալիզում է 1 րոպեում 1 մկմոլ ելանյութի վերափոխումը: Երաշխավորված ջերմաստիճան է համարվում 25°C, հակառակ դեպքում պետք է նշել փաստացի ջերմաստիճանը, որի պայմաններում կատարվել է ռեակցիան: Մնացած պայմանները (pH, ելանյութի կոնցենտրացիա և այլն) պետք է լինեն նպաստավոր:

Ֆերմենտի ակտիվությունն որոշվում է նաև տեսակարար ակտիվությամբ, որն արտահայտվում է 1 մգ սպիտակուցին բաժին ընկնող ֆերմենտի ակտիվության միավորներով (E/մգ):

Ելանյութի մոլեկուլների քանակը, որը միավոր ժամանակում վերափոխման է ենթարկվում մեկ մոլեկուլ ֆերմենտի կողմից, երբ վերջինս լրիվ հագեցած է ելանյութի մոլեկուլներով, ընդունված է անվանել ֆերմենտի պտույտների թիվ կամ մոլային ակտիվություն:

Ֆերմենտի մոլեկուլային ակտիվությունը բնութագրվում է ելանյութի այն մոլեկուլների թվով, որոնք վերափոխման են ենթարկվում 1 րոպեում 1 մոլեկուլ ֆերմենտով:

ԳԼԻԿՈԶԻԴԱԶՆԵՐԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՈՒՄԸ

Աշխատանք 4.1. Ֆերմենտների անջատումը բուսական օբյեկտներից
Ամիլազի ստացումը ցորենի ալյուրից

Նյութեր և ռեակտիվներ: Ցորենի ալյուր, ացետատային բուֆեր 0.01 Մ (pH 5.5), $CaCl_2$ (20 մգ 100 մլ բուֆերում):

Պարագաներ: Հավանգ, անոթ, ֆիլտրի թուղթ, ձագար:

4 գ ցորենի ալյուրը տրորել հավանգում՝ ավելացնելով $CaCl_2$ պարունակող ացետատային բուֆեր մինչև համասեռ զանգվածի ստացումը (ընդհանուր ծավալը հասցնել 25 մլ), զտել: Ստացված լուծամզվածքը ծառայում է ամիլազի աղբյուր: Լուծամզվածքը պատրաստել աշխատանքից անմիջապես առաջ:

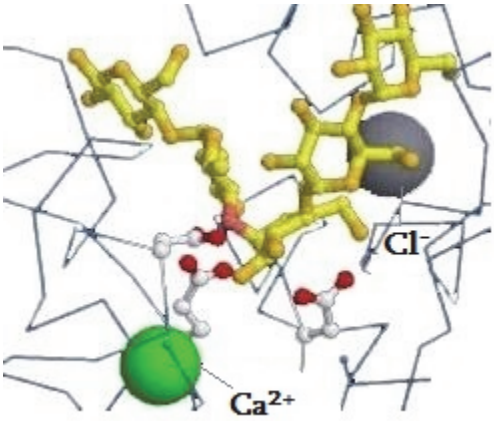
Ամիլազի ստացումը ածիկից

Նյութեր և ռեակտիվներ: Ածիկ, NaCl-ի 1% լուծույթ, $(CH_3COO)_2Ca$-ի բյուրեղներ, Na_2HPO_4-ի 0.15 Մ լուծույթ, HCl-ի 0.1 Մ լուծույթ:

Սարքեր և պարագաներ: Հավանգ, անոթ, ձագար, ջրային բաղնիք:

4 գ մանրեցրած ածիկը տրորել հավանգում՝ ավելացնելով 10 մլ NaCl-ի լուծույթ մինչև համասեռ զանգվածի ստացումը: Ստացված զանգվածը տեղափոխել չափիչ անոթի մեջ, ծավալը NaCl-ով հասցնել 50 մլ, թողնել 1-2 ժամ (3-4°C), զտել: Լուծամզվածքը ծառայում է որպես ամիլազի աղբյուր:

Ածիկում առկա են ինչպես α, այնպես էլ β-ամիլազներ: Ածիկի լուծամզվածքի մինչև 70°C տաքացման դեպքում β-ամիլազը բնափոխվում է, իսկ α-ամիլազը պահպանում է ակտիվությունը: β-ամիլազի նպաստավոր pH-ը 4.8 է, α-ամիլազը միջավայրի pH-ի 4.8 արժեքի դեպքում կորցնում է ակտիվությունը, իսկ pH 3.3 պայմաններում՝ բնավոխվում: Ֆերմենտների զգայունության շեմի տարբերությունները հնարավորություն են տալիս տարանջատելու դրանք՝ փոփոխե-



Նկ. 4.7. Ամիլազի ակտիվ կենտրոնի կառուցվածքը (Ca^{2+} իոնը ֆերմենտի ակտիվ կենտրոնը կայունացնող գործոն է):

լով միջավայրի պայմանները:

α-ամիլազի (նկ. 4.7) **անջատումը**. փորձանոթի մեջ լցնել 5 մլ լուծամզվածք, ավելացնել $(CH_3COO)_2Ca$-ի բյուրեղներ, փորձանոթը տեղափոխել ջրային բաղնիք (68°C) և հետևել, որ ջերմաստիճանը չբարձրանա 70°C-ից, չիջնի 66°C-ից: 15 րոպե անց փորձանոթները սառեցնել: Այս պայմաններում α-ամիլազը պահպանում է ակտիվությունը, β -ամիլազը՝ կորցնում:

β-ամիլազի անջատումը. 50 մլ տարողությամբ անոթի մեջ լցնել 5 մլ լուծամզվածք, ավելացնել 4 մլ H_2O, 1 մլ HCl-ի լուծույթ (խառնուրդի pH 3.3): Փորձանոթը տեղափոխել սառը պայմաններ (15 րոպե): Այս պայմաններում α-ամիլազը կորցնում է ակտիվությունը, β-ամիլազը պահպանում ակտիվությունը: Լուծույթին 15 րոպե հետո ավելացնել 2 մլ Na_2HPO_4, pH-ի (pH 6.0) փոփոխման նպատակով: Լուծույթն օգտագործել β-ամիլազի ակտիվության որոշման համար:

Սախարազի անջատումը խմորասնկերից

Խմորասնկերի սախարազը, աշխատանքային անվանումը β-ֆրուկտոֆուրանոզիդազ (E.C. 3.2.1.48), կատալիզում է սախարոզի և ռաֆինոզի մոլեկուլներում β-գլիկոզիդային կապերի հիդրոլիզը: Սախարոզը ճեղքվում է գլյուկոզի և ֆրուկտոզի, ռաֆինոզը՝ ֆրուկտոզի և մելիբիոզի (գալակտոպիրանոզիլ-α-1,6-գլյուկոպիրանոզ):

1 գ գարեջրային կամ թթխմորային չորացրած խմորասնկերը տրորել 3 մլ ջրում 5 րոպե, ավելացնել 17 մլ ջուր, տեղափոխել թերմոստատ (37°C, 20 րոպե), ընթացքում խառնել: Լուծամզվածքը ցենտրիֆուգել 10 րոպե 3000 պտ/ր արագությամբ և վերնստվածքն օգտագործել որպես սախարազի աղբյուր:



Նկ. 4.8. Թերմոստատ:

Աշխատանք 4.2. Ֆերմենտների և անօրգանական կատալիզատորների ազդեցության համեմատությունը

Նյութեր և ռեակտիվներ: Ածիկի լուծամզվածք (աշխ. 4.1), օսլայի 1% լուծույթ, H_2SO_4-ի և HCl-ի 10% լուծույթներ, J_2-ի 1% սպիրտային լուծույթ:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, հավանգ, թերմոստատ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Հինգ փորձանոթների մեջ լցնել 3-ական մլ օսլա: Առաջին և հինգերորդ փորձանոթներին ավելացնել 1-ական մլ H_2O, երկրորդի մեջ՝ 1 մլ ածիկի լուծամզվածք, երրորդի և չորրորդի մեջ՝ համապատասխանաբար 1-ական մլ HCl-ի և H_2SO_4-ի լուծույթներ: Փորձանոթները թափահարել, առաջին երեք փորձանոթները տեղափոխել թերմոստատ (37°C), չորրորդը և հինգերորդը եռացող ջրային բաղնիք: 20 րոպե անց փորձանոթները սառեցնել, ավելացնել 3-ական մլ J_2-ի լուծույթ: Օսլայի քայքայումն ընթացել է այն փորձանոթներում, որտեղ լուծույթները ստացել են դեղին, կարմիր, մանուշակագույն երանգ: Արդյունքները գրանցել հետևյալ աղյուսակում:

N	Ելանյութ	Կատալիզատոր	t°	Գունավորում
1	Օսլա	H_2O	37°C	
2	Օսլա	Ամիլազ	37°C	
3	Օսլա	HCl	37°C	
4	Օսլա	H_2SO_4	100°C	
5	Օսլա	H_2O	100°C	

Աշխատանք 4.3. Սախարազի բացահայտումը և ակտիվության որոշումը

Նյութեր և ռեակտիվներ: Սախարազ պարունակող լուծամզվածք (աշխ. 4.1), սախարոզի 1% լուծույթ, NaOH-ի 10% լուծույթ, $CuSO_4$-ի 5% լուծույթ:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, թերմոստատ, հավանգ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Սախարազի ակտիվության բացահայտման համար երկու փորձանոթների մեջ լցնել 0.5-ական մլ սախարազի լուծամզվածք: Նմուշներից մեկը ֆերմենտի ապաակտիվացման նպատակով



Նկ. 4.9. Սախարազի ակտիվության դրսևորումը:

եռացնել ջրային բաղնիքում 3 րոպե: Երկու նմուշներին ավելացնել 3-ական մլ սախարոզի լուծույթ, փորձանոթները տեղափոխել թերմոստատ (40°C): 15 րոպե անց նմուշներում կատարել Թրոմերի ռեակցիա:

Թրոմերի ռեակցիա: Լուծույթներին ավելացնել 2-ական մլ NaOH-ի լուծույթ՝ թափահարելով՝ $CuSO_4$ (կաթիլներով) մինչև պղտորության առաջացումը: Փորձանոթները տաքացնել մինչև գույնի փոփոխությունը. սկզբում առաջանում է CuOH-ի դեղին գունավորում, հետո՝ Cu_2O-ի կարմիր նստվածք (նկ. 4.9):

Ի տարբերություն ապաակտիվացած ֆերմենտ պարունակող նմուշին, որտեղ նստվածք չի առաջանում, մյուս նմուշում առաջանում է Cu_2O-ի կարմիր նստվածք: Քանի որ սախարոզը չվերականգնող շաքար է, Թրոմերի ռեակցիան երկրորդ նմուշում վկայում է սախարոզի ճեղքման հետևանքով վերականգնող մոնոսախարիդների առաջացման մասին:

Աշխատանք 4.4. Սախարազի ազդեցության յուրահատկությունը

Նյութեր և ռեակտիվներ: Սախարազ պարունակող լուծամզվածք (աշխ. 4.1), սախարոզի 1% լուծույթ, օսլայի 1% լուծույթ, NaOH-ի 10% լուծույթ, $CuSO_4$-ի 5% լուծույթ:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, հավանգ, թերմոստատ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Սախարազի ազդեցության առանձնահատկության գնահատման նպատակով պատրաստել խառնուրդներ. առաջին՝ 1 մլ սախարազի լուծույթ և 1 մլ սախարոզի լուծույթ, երկրորդ՝ 1 մլ սախարազի լուծույթ և 1 մլ օսլայի լուծույթ, երրորդ՝ 1 մլ սախարոզի լուծույթ: Խառնուրդները տեղափոխել թերմոստատ (38°C): 15 րոպե անց նմուշներում կատարել Թրոմերի ռեակցիա (աշխ. 4.3.): Ռեակցիայի արդյունքները գրանցել ստորև բերված աղյուսակում:

N	Սախարազ (մլ)	Սախարոզ (մլ)	Օսլա (մլ)	Թրոմերի ռեակցիա
1	1	1	–	
2	1	–	1	
3	–	1	–	

Աշխատանք 4.5. Ամիլազի և սախարազի ազդեցության յուրահատկությունը

Ամիլազը կատալիզում է α-1,4-գլիկոզիդային կապերի հիդրոլիզն օսլայի (գլիկոգենի) մոլեկուլում: Հիդրոլիզը տեղի է ունենում աստիճանաբար: Հիդրոլիզի խորությունն արտահայտվում է յոդի հետ գունավորման ռեակցիայով:

Սախարազը կատալիզում է դիսախարիդ սախարոզի β-գլիկոզիդային կապերի հիդրոլիզը: Հիդրոլիզի հետևանքով առաջացած արգասիքների առկայությունը դրսևորվում է Թրոմերի ռեակցիայի դրական արդյունքով:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Սախարազ և ամիլազ պարունակող լուծամզվածքներ (աշխ. 4.1), օսլայի 1% լուծույթ, սախարոզի 1% լուծույթ, NaOH-ի 10% լուծույթ, $CuSO_4$-ի 5% լուծույթ, Լյուգոլի լուծույթ:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, հավանգ, թերմոստատ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Պատրաստել նմուշներ՝ համաձայն հետևյալ աղյուսակի:

N	Ելանյութ 3 մլ	Ֆերմենտ 1 մլ	Յոդի փորձարկում	Թրոմերի ռեակցիա
1	Օսլա	Ջուր		–
2	Օսլա	Ամիլազ		–
3	Օսլա	Սախարազ		–
4	Սախարոզ	Ջուր	–	
5	Սախարոզ	Ամիլազ	–	
6	Սախարոզ	Սախարազ	–	

Փորձանոթները տեղափոխել թերմոստատ 37°C պայմաններում: 20 րոպե անց առաջինից երրորդ նմուշներում կատարել փորձարկում Լյուգոլի լուծույթով, մյուսներում՝ կատարել Թրոմերի ռեակցիա (աշխ. 4.3.):

ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ԿԱՐԳԱՎՈՐՄԱՆ ՈՒՂԻՆԵՐԸ

Հաստատված է ֆերմենտների ակտիվության կախվածությունը միջավայրի տարբեր գործոններից (ջերմաստիճան, pH, ֆերմենտի կոնցենտրացիա, ելանյութի կոնցենտրացիա, խթանիչների, արգելակիչների առկայություն): Ֆերմենտների ակտիվության փոփոխության աստիճանը կարելի է որոշել ֆերմենտային ռեակցիայի արագությամբ: Ռեակցիայի արագության չափանիշ է որոշակի ժամանակահատվածում փոխակերպման ենթարկված ելանյութի կոնցենտրացիան:

Ֆերմենտային ռեակցիայի արագության վրա ազդող գործոնների ուսումնասիրման ընթացքում մյուս գործոնները պետք է մնան անփոփոխ և ունենան նպաստավոր արժեքներ:

Աշխատանք 4.6. Ամիլազի ակտիվության բացահայտումը և կախվածությունը միջավայրի pH-ից

Ռեակցիայի նպաստավոր pH է համարվում միջավայրի այն pH-ը, որի դեպքում ռեակցիան ընթանում է առավելագույն արագությամբ: Ցանկացած ուղղությամբ pH-ի շեղումը նվազեցնում է ռեակցիայի արագությունը, ինչը պայմանավորված է ֆերմենտների բնականոն կառուցվածքն ապահովող դրական և բացասական լիցքավորված խմբերի առկայությամբ: pH-ի նպաստավոր պայմաններում բարդ սպիտակուցների ձևով ներկայացված շատ ֆերմենտների ոչ սպիտակուցային բաղադրիչները միացած են ապոֆերմենտին թույլ իոնային, ջրածնային կապերով: Եվ pH-ի փոփոխությունը հանգեցնում է ակտիվ կենտրոնի կառուցվածքի քայքայմանը, կոֆակտորի անջատմանը: pH-ի շատ բարձր կամ շատ ցածր արժեքների պայմաններում հնարավոր է ֆերմենտի բնավոխում:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Ածիկի կամ ցորենի ալյուրի լուծամզվածք (աշխ. 4.1), 1/15 Ն ֆոսֆատային բուֆեր (pH - 5.8-8.0), Լյուգոլի լուծույթ, օսլայի 1% լուծույթ, HCl-ի 10% լուծույթ:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, հավանգ, թերմոստատ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Որոշել ածիկի ամիլազի ակտիվությունը:

Փորձանոթի մեջ լցնել 2 մլ օսլայի լուծույթ, 0.5 մլ ածիկի լուծամզվածք, տեղադրել ջրային բաղնիքում (37-38°C): Պարբերաբար 5 րոպե ընդմիջումներով նմուշից 3-4 կաթիլ հիդրոլիզատ տեղափոխել 0.5 մլ H_2O և 3 կաթիլ Լյու-

գոլի լուծույթ պարունակող փորձանոթի մեջ: Կարմրագորշ գունավորման առաջացումը հուշում է էրիթրոդեքստրինների առաջացման մասին: Ցանկալի է, որ մինչև էրիթրոդեքստրիններ հիդրոլիզն ընթանա 10-15 րոպե:



Նկ. 4.10. Օսլայի ճեղքման արդյունավետությունը pH-ի տարբեր պայմաններում:

Համարակալված փորձանոթների մեջ լցնել 4-ական մլ բուֆերային լուծույթներ համապատասխան pH-ի արժեքներով (համաձայն ստորև աղյուսակի): Նմուշներին ավելացնել 2-ական մլ էրիթրոդեքստրինների լուծույթ և 0.5-ական մլ լուծամզվածք: Նմուշները թափահարել, տեղափոխել ջրային բաղնիք (10 րոպե, 37-38°C): Հիդրոլիզի ընթացքին հետևել Լյուգոլի լուծույթի ներկայությամբ առաջացած գունավորմամբ: Յուրաքանչյուր փորձանոթից վերցնել նմուշ, ավելացնել 2-3 կաթիլ Լյուգոլի լուծույթ, գրանցել գունավորումը: Պարբերաբար 3-5 րոպե ընդմիջումներով փորձարկել մինչև նմուշներից մեկում դեղնակարմրավուն երանգի առաջացումը: Այնուհետև բոլոր փորձանոթների մեջ ավելացնել 1-ական մլ HCl-ի 10% լուծույթ (ֆերմենտի ազդեցությունը կանխելու նպատակով), 3-ական կաթիլ Լյուգոլի լուծույթ, լուծույթները խառնել: Նմուշների գունավորման տարբերությամբ (նկ. 4.10) պարզել ածիկի ամիլազի նպաստավոր pH-ը, հիդրոլիզի արդյունքները գրանցել աղյուսակում, կառուցել կոր:

Աբսցիսների առանցքին տեղադրել pH-ի արժեքները, օրդինատների առանցքին՝ օսլայի ճեղքման աստիճանը:

N	1	2	3	4
pH	5.8	6.6	7.0	8.0
Գունավորում				

Աշխատանք 4.7. Ամիլազի ակտիվության կախվածությունը միջավայրի pH-ից (II եղանակ)

Նյութեր և ռեակտիվներ: Ածիկի կամ ցորենի ալյուրի լուծամզվածք (աշխ. 4.1), Լյուգոլի լուծույթ, օսլայի 1% լուծույթ, 1/15 Ն ֆոսֆատային բուֆեր (pH -5.8-8.0), HCl-ի 0.2% լուծույթ:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, հավանգ, թերմոստատ:

Համարակալված ութ փորձանոթների մեջ լցնել 1-ական մլ թորած H_2O: Առաջին փորձանոթի մեջ ավելացնել 1 մլ HCl-ի լուծույթ, խառնել: Խառնուրդից 1 մլ տեղափոխել երկրորդ փորձանոթի մեջ, խառնել և 1 մլ տեղափոխել երրորդի մեջ: Կրկնել մինչև ութերորդ փորձանոթը: Ութերորդ փորձանոթի խառնուրդից 1 մլ թափել: HCl-ի տարբեր նոսրացումները համապատասխանում են միջավայրի տարբեր pH-ին (pH-ի արժեքները որոշել ցուցանշիչով): Բոլոր փորձանոթների մեջ ավելացնել 2-ական մլ օսլա և 1-ական մլ ֆերմենտի լուծույթ, փորձանոթները թափահարել, տեղափոխել թերմոստատ (15 րոպե, 37°C): Փորձանոթները սառեցնել, ավելացնել 1-ական մլ J_2-ի լուծույթ: Աղյուսակում գրանցել հիդրոլիզի արդյունքները, եզրակացնել՝ pH-ի որ արժեքի դեպքում է տեղի ունեցել օսլայի լիարժեք հիդրոլիզ:

N	1	2	3	4	5	6	7	8
pH								
Արդյունքներ								

Աշխատանք 4.8. Ամիլազի ակտիվության կախվածությունը միջավայրի ջերմաստիճանից

Հիմնականում ֆերմենտային ռեակցիաների իրականացման նպաստավոր ջերմաստիճանը 37-40°C է, բուսական օրգանիզմներում՝ 40-50°C: Ջերմաստիճանի զգալի բարձրացումը հանգեցնում է ֆերմենտի բնափոխման: Նպաստավոր արժեքների նվազման պարագայում յուրաքանչյուր 10° C իջեցման դեպքում ռեակցիայի արագությունը նվազում է 2-2.5 անգամ, ռեակցիան դադարում է 18°C պայմաններում: Պատճառը ելանյութի մոլեկուլների շարժման արագության, հետևաբար ֆերմենտ-ելանյութային համալիրի առաջացման դանդաղեցումն է:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Ածիկի լուծամզվածք (աշխ. 4.1), օսլայի 1% լուծույթ, Լյուգոլի լուծույթ, HCl-ի 10% լուծույթ:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, հավանգ, թերմոստատ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Ութ փորձանոթ տեղադրել երկու շարքով: Առաջին շարքի չորս փորձանոթների մեջ լցնել 3-ական մլ օսլա, երկրորդ շարքի չորս փորձանոթների մեջ՝ 0.5-ական մլ ածիկի լուծամզվածք: Երկու շարքերից մեկական՝ ֆերմենտ և ելանյութ պարունակող փորձանոթները տեղադրել եռացող ջրային բաղնիքում, հաջորդ երկուսը՝ թերմոստատում (37°C-38°C), մյուս երկուսը՝ սառը պայ-

մաններում, վերջին երկուսը թողնել սենյակային ջերմաստիճանի պայմաններում: 10 րոպե անց զույգ նմուշների (ելանյութ և ֆերմենտ) պարունակությունը խառնել և թողնել նույն պայմաններում: Այս պահը համարել հետազոտման սկիզբ:

Երեք փորձանոթների մեջ լցնել 1-ական մլ H_2O, 3-ական կաթիլ Լյուգոլի լուծույթ: Այս փորձանոթներն անհրաժեշտ են հիդրոլիզի ընթացքին հետևելու համար:



1 2 3

Նկ. 4.11. Օսլայի ճեղքման արդյունքները տարբեր ջերմաստիճանային պայմաններում: 1. Ռեակցիան ընթացել է 37°-38° C պայմաններում: 2. Ռեակցիան ընթացել է 100° C պայմաններում: 3. Ռեակցիան ընթացել է սենյակային ջերմաստիճանի պայմաններում:

2-5 րոպե անց սենյակային ջերմաստիճանի պայմաններում դրված փորձանոթից վերցնել 0.3 մլ և տեղափոխել Լյուգոլի լուծույթով նմուշի մեջ: Եթե առաջանա կապույտ կամ մանուշակագույն գունավորում, բոլոր փորձանոթները թողնել նույն պայմաններում ևս 5 րոպե:

Լյուգոլի լուծույթի հետ փոխազդեցության ռեակցիան կրկնել: Սենյակային ջերմաստիճանի պայմաններում գտնվող լուծույթում կարմրագորշ երանգավորման առաջացումից անմիջապես հետո բոլոր փորձանոթների մեջ ավելացնել 1-ական մլ HCl և 3-ական կաթիլ Լյուգոլի լուծույթ, նմուշները խառնել (նկ. 4.11): Հիդրոլիզի խորությունը որոշել ըստ Լյուգոլի լուծույթի հետ առաջացրած գունավորման:

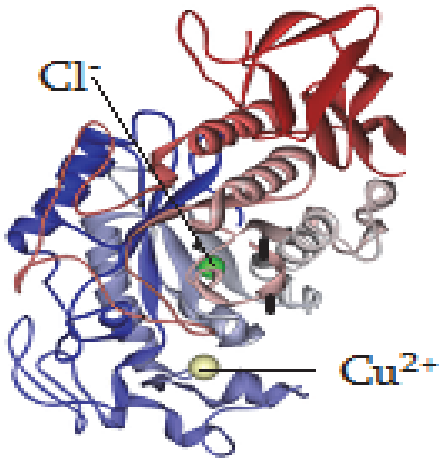
Ստացված տվյալների հիման վրա կազմել աղյուսակ, կառուցել կոր:

t°C	Առաջացած միացությունների գունավորում
0°	
18°– 22°	
37° – 38°	
100°	

Աբսցիսների առանցքին տեղադրել ջերմաստիճանի ցուցանիշները, օրդինատների առանցքին՝ գույները հետևյալ հաջորդականությամբ՝ կապույտ, մանուշակագույն, կարմիր (տարբեր երանգները), դեղին:

Աշխատանք 4.9. Արգելակիչների և խթանիչների ազդեցությունը ամիլազի ակտիվության վրա

Ֆերմենտների ակտիվությունը կախված է ռեակցիոն միջավայրում որոշ իոնների կամ միացությունների (կարգավորիչների) առկայությունից: Դրանցից որոշները կարող են ճնշել ֆերմենտային ռեակցիայի արագությունը (արգելակիչներ), մյուսները՝ խթանել (խթանիչներ): Այս կարգավորիչները հաճախ ներկայացված են մետաղների իոններով (նկ. 4.12):



Նկ. 4.12. α-ամիլազի տարածական կառուցվածքը,
Cl^- իոնը – ֆերմենտի խթանիչ,
Cu^{2+} իոնը – ֆերմենտի արգելակիչ:

Մետաղների իոնները կարող են փոփոխել ֆերմենտի ակտիվությունը՝ նպաստելով ֆերմենտ-ելանյութային համալիրի առաջացմանը: Հանդիսանալով ֆերմենտի կոֆակտոր՝ որոշ դեպքերում կարող են նպաստել կոֆերմենտի միացմանը ապոֆերմենտին, ապահովել ֆերմենտի մոլեկուլի երրորդային և չորրորդային կառուցվածքների կայունացումը:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Ածիկի լուծամզվածք (աշխ. 4.1), օսլայի 1% լուծույթ, Լյուգոլի լուծույթ, NaCl-ի 1% լուծույթ, $CuSO_4$-ի 1% լուծույթ:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, հավանգ, թերմոստատ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Երեք փորձանոթների մեջ լցնել 2-ական մլ ամիլազի լուծույթ: Առաջին նմուշին ավելացնել 4 կաթիլ H_2O, երկրորդ նմուշին՝ 4 կաթիլ NaCl-ի լուծույթ, երրորդին՝ 4 կաթիլ $CuSO_4$-ի լուծույթ: Նմուշներին ավելացնել 20-ական կաթիլ օսլայի լուծույթ: Փորձանոթները տեղադրել թերմոստատում (37°C 10-15 րոպե): Բոլոր նմուշներին ավելացնել Լյուգոլի լուծույթի 2-ական կաթիլ, լուծութ-

ները խառնել, հետևել գունավորման զարգացմանը և բացատրել գունավորման (կապտամանուշակագույն, դեղին, կապույտ) տարբերությունները:

Արդյունքները գրանցել հետևյալ աղյուսակում:

Նմուշներ	H_2O	NaCl	$CuSO_4$
Գունավորում			

Աշխատանք 4.10. Յոդենի ալյուրի ամիլազի ակտիվության որոշումը (ըստ օսլայի հիդրոլիզի աստիճանի)

Ամիլազները հիդրոլազների դասի ֆերմենտներ են, ըստ ազդեցության բնույթի՝ տարբերակում են α-ամիլազներ, β-ամիլազներ, ամիլոպեկտին-1,6-գլյուկանահիդրոլազներ: Օսլայի հիդրոլիզը արագացնող այս ֆերմենտները պարունակվում են միկրոօրգանիզմներում, բուսական, կենդանական օրգանիզմների հյուսվածքներում, թքում և կենսաբանական այլ հեղուկներում: Թուքը և մարսողական այլ հյութերը համարվում են ամիլազ ֆերմենտներ պարունակող խիտ լուծույթներ: Բուսական օրգանիզմներից բարձր ամիլազային ակտիվությամբ օժտված են ածիկը, հացահատիկային այլ բույսեր:

α-ամիլազները (E.C. 3.2.1.1.) պարունակվում են թքում, ենթաստամոքսային գեղձի հյութում, հացահատիկներում: Կատալիզում են α-1,4-գլիկոզիդային կապերի հիդրոլիզը երեք և ավելի α-D-գլյուկոզների մնացորդ պարունակող ածխաջրերում: α-ամիլազների ազդեցության հետևանքով օսլան ճեղքվում է՝ առաջացնելով փոքր մոլեկուլային զանգված ունեցող ղեքստրիններ և մալթոզներ: α-ամիլազները զգայուն են միջավայրի թթվայնության փոփոխություններին (նպաստավոր pH-ը 5,6 - 6,3), սակայն բավական ջերմակայուն են (65°C):

β-ամիլազները (E.C. 3.2.1.2.) կատալիզում են α-1,4 գլիկոզիդային կապերի ճեղքումը պոլիսախարիդներում՝ անջատելով մալթոզի մնացորդներ շղթայի չվերականգնող ծայրից: β-ամիլազները ճեղքում են ամիլոզը մինչև մալթոզի մոլեկուլներ, իսկ ամիլոպեկտինը հիդրոլիզում են մալթոզի և ղեքստրինների (ավելի մեծ մոլեկուլային զանգված ունեցող, քան α-ամիլազների հիդրոլիզից առաջացած ղեքստրինները) առաջացմամբ (յողի հետ առաջացնում են կարմրամանուշակագույն գունավորում): β-ամիլազների ազդեցությունը դադարում է ամիլոպեկտինի ճյուղավորման հատվածում: β-ամիլազներն ավելի ակտիվ են թթվային միջավայրում (նպաստավոր pH-ը 4,8 է):

Գլյուկոամիլազները (E.C. 3.2.1.3.) կամ էկզո α-1,4-D-գլյուկոզիդազները հիդրոլիզում են օսլան՝ առաջացնելով հիմնականում գլյուկոզ և քիչ քանակությամբ դեքստրիններ: Գլյուկոամիլազ ֆերմենտի պատրաստուկները ստանում են բորբոսասնկերից: Այս ֆերմենտի օգնությամբ օսլայից ստանում են գլյուկոզի բյուրեղներ:

Ամիլոպեկտին-1,6-գլյուկանահիդրոլազները (E.C. 3.2.1.4.) հիդրոլիզում են ամիլոպեկտինի, գլիկոգենի α-1,6-գլիկոզիդային կապերը:

Կենսաբանական օբյեկտում ֆերմենտի առկայությունը հաստատվում է համապատասխան ելանյութի քանակության փոփոխմամբ:

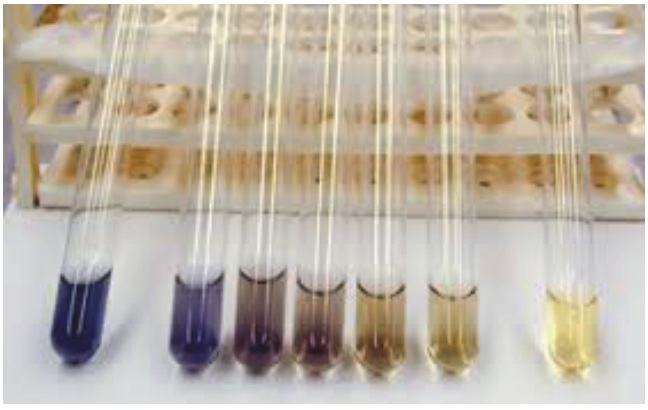
Նյութեր և ռեակտիվներ: Ամիլազ պարունակող լուծամզվածք (աշխ. 4.1), օսլայի 1% լուծույթ, Լյուգոլի լուծույթ:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, հավանգ, թերմոստատ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Ամիլազի բացահայտման նպատակով ֆերմենտ պարունակող լուծույթից 2 մլ տեղափոխել փորձանոթի մեջ, ավելացնել 4 մլ օսլա (կրկնակի ծավալ), թափահարել: Ֆերմենտ-ելանյութ խառնուրդը տեղադրել թերմոստատում (37°C, 30 րոպե):

Ֆերմենտի ակտիվությունը բացահայտել J_2-ի լուծույթի փորձարկումով. պարբերաբար (5-7 րոպե ընդմիջումով) փորձանոթների մեջ լցնել հետազոտվող լուծույթ և ավելացնել մի քանի կաթիլ Լյուգոլի լուծույթ (1 մլ լուծույթին 1 կաթիլ), թափահարել (նկ. 4.12): Օգտվելով ստորև բերված աղյուսակից՝ առաջացած գունավորմամբ որոշել ռեակցիայի արգասիքները:



Նկ. 4.12. Օսլայի ճեղքման արգասիքները:

Օսլա, հիդրոլիզի արգասիքներ	Մոլեկուլային զանգված	Գունավորում
Օսլա	1 միլիոն և ավելի	Կապույտ
Ամիլոդեքստրիններ	10000	Մանուշակագույն
Էրիթրոդեքստրիններ	6000-4000	Կամրամանուշակագույն
Ախրոդեքստրիններ	3700	Դեղնագորշ
Մալթոդեքստրիններ	1000	Դեղին
Մալթոզ	342	Դեղին

Աշխատանք 4.11. Ամիլազի ակտիվության քանակական որոշումը

Ամիլազային ակտիվությունը կարելի է արտահայտել որոշակի ժամանակահատվածում (օրինակ՝ 30 րոպե) 1 մլ ֆերմենտային պատրաստուկով ճեղքված ելանյութի (օսլայի) քանակով:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Ամիլազ պարունակող լուծամզվածք (աշխ. 4.1), օսլայի 1% լուծույթ, Լյուգոլի լուծույթ, HCl-ի 10% լուծույթ (5 մլ H_2O ավելացնել 2.36 մլ խիտ HCl և ծավալը հասցնել 10 մլ):

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, հավանգ, թերմոստատ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Համարակալված յոթ փորձանոթների մեջ լցնել 1-ական մլ H_2O: Առաջին փորձանոթի մեջ ավելացնել 1 մլ ֆերմենտային պատրաստուկ, խառնել և այդ խառնուրդից 1 մլ տեղափոխել երկրորդ փորձանոթի մեջ: Խառնել և դրանից 1 մլ տեղափոխել երրորդ փորձանոթի մեջ և նոսրացումը շարունակել մինչև վերջին 7-րդ նմուշը: Խառնելուց հետո վերջին նմուշից 1 մլ թափել: Այսպիսով՝ նոսրացումների շարքում յուրաքանչյուր հաջորդ փորձանոթում լուծամզվածքի պարունակությունը նախորդից 2 անգամ քիչ է: Նոսրացրած լուծույթներին ավելացնել 2-ական մլ օսլայի լուծույթ: Բոլոր փորձանոթները տեղադրել թերմոստատում 37-38°C պայմաններում: 30 րոպե անց ավելացնել 1-ական մլ HCl (ռեակցիան դադարեցնելու նպատակով) և 2-ական կաթիլ Լյուգոլի լուծույթ: Գրանցել ո՞ր փորձանոթում է օսլան ենթարկվել լիարժեք հիդրոլիզի (լուծույթի դեղին գունավորում):

Հաշվարկել հետազոտվող լուծամզվածքի ամիլազային ակտիվությունը: Ենթադրենք՝ դա 4-րդ փորձանոթն է (5-րդ փորձանոթում լուծույթը արդեն ունի կապույտ երանգ), որտեղ լուծամզվածքի մասնաբաժինը 1/16 մլ է:

1/16 մլ լուծամզվածքը ճեղքում է 2 մլ 1% օսլայի լուծույթ

1 մլ _____X մլ

X = 32

1 մլ չնոսրացված լուծամզվածքը 30 ր-ում 37° C պայմաններում ճեղքում է 32 մլ 1% օսլայի լուծույթ:

Աշխատանք 4.12. α և β-ամիլազների ակտիվության որոշումը ցորենի ալյուրում

Ամիլազների ազդեցությունն օսլայի վրա կարելի հաստատել կամ օսլայի քանակի նվազմամբ կամ դրա ճեղքման արգասիքների՝ շաքարների կուտակմամբ: Ամիլազի ակտիվությունը, ըստ ճեղքված օսլայի, որոշվում է գունաչափական եղանակով:

Կաթնասունների օրգանիզմի երեք ամիլազներն են թքագեղձի α-ամիլազը, ենթաստամոքսային գեղձի β-ամիլազը, լիզոսոմների, միկրոսոմների, հիալոպլազմի γ-ամիլազը:

α-ամիլազը հայտնաբերված է կենդանական, բուսական բոլոր օրգանիզմներում, մանրէներում: Հավանական է մարդու, կաթնասունների օրգանիզմում ունի երկու գործառույթ. իրականացնում է սննդային պոլիսախարիդների ճեղքումը մինչև ցածրամոլեկուլային ածխաջրեր և ճեղքում գլիկոգենը մինչև գլիկոգենի սինթեզի համար մերան ծառայող դեքստրիններ: α-ամիլազը Ca^{2+}-կախյալ ֆերմենտ է և Ca^{2+}-ի իոնների բացակայությունը հանգեցնում է ֆերմենտի ապաակտիվացման: Cl^--ի իոնների 10 մմոլ/լ և բարձր կոնցենտրացիաները ֆերմենտի ալոստերիկ խթանիչ են: Ֆերմենտը ներկայացված է մեկ պոլիպեպտիդային շղթայով, հարուստ է թիրոզինով, տրիպտոֆանով, ասպարագինաթթվով, գլյուտամինաթթվով: Ֆերմենտի մոլեկուլային զանգվածը 50 կԴա է, պոլիպեպտիդային շղթային միացած է օլիգոսախարիդ: α-ամիլազը ջրում լավ լուծվող ֆերմենտ է: α-ամիլազները հիդրոլիզում են օսլայի α-1,4-գլիկոզիդային կապերը անկանոն՝ առաջացնելով յողի հետ գունավորում չցուցաբերող արգասիքներ: Ֆերմենտի ակտիվությունը գնահատվում է լուծույթի գունավորման ուժգնության նվազմամբ:

β-ամիլազի նպաստավոր pH-ը 4.8 է, բնորոշ է բարձրագույն բույսերին, կատալիզում է օսլայի ճեղքումը մինչև բարձրամոլեկուլային դեքստրիններ, մալթոզներ: Ակտիվության դրսևորման համար կոֆակտոր չի պահանջում, մոլեկուլային զանգվածը 50-200 կԴա է: Կարևորվում է գլիկոգենոզների ախտորոշման դեպքում: β-ամիլազները հիդրոլիզում են գլիկոզիդային կապերը

պոլիսախարիդային շղթայի չվերականգնող ծայրից հաջորդաբար անջատելով մալթոզի մոլեկուլներ:

α-ամիլազների (էնդոամիլազների) և β-ամիլազների (էկզոամիլազների) տարբերակումը պայմանավորված է միջավայրի տարբեր պայմաններում այդ ֆերմենտների կայունության և դրսևորած ակտիվության տարբերությամբ:

Ամիլազներով կատալիզվող ռեակցիաները ընթանում են երկու փուլով. առաջին փուլին մասնակցող էնդոամիլազները, պոլիմեր շղթաներում քայքայելով ներմոլեկուլային կապերը, արագ նվազեցնում են ելանյութի մոլեկուլային զանգվածը՝ առաջացնելով գծային և ճյուղավորված օլիգոսախարիդներ: Երկրորդ փուլը շարունակվում է մինչև շատ կարճ օլիգոսախարիդային արգասիքների առաջացումը: Երկրորդ փուլն ընթանում է շատ ավելի դանդաղ:

γ-ամիլազը պարունակվում է կենդանական օրգանիզմների արյան կազմում, բորբոսասնկերում, բակտերիաներում: Տարբերում են թթվային և չեզոք γ-ամիլազներ: Կաթնասունների, մարդու օրգաններում, հյուսվածքներում թթվային γ-ամիլազը (նպաստավոր pH 3.0) տեղակայված է լիզոսոմներում, չեզոք γ-ամիլազը (նպաստավոր pH մոտ 6.0)՝ միկրոսոմներում: γ-ամիլազը ճեղքում է գլիկոգենը, օսլան մինչև գլյուկոզ, մոլզանգվածը 50-200 կԴա է: Հաստատված է, որ գլիկոգենոզը կախված է լյարդի, սրտամկանի, կմախքային մկանների լիզոսոմներում թթվային γ-ամիլազի բացակայությունից, ինչը հանգեցնում է վնասված օրգանների բջիջներում գլիկոգենի կուտակման (մեծ քանակներով):

Նյութեր և ռեակտիվներ: Ցորենի ալյուրի լուծամզվածք, α-ամիլազի լուծամզվածք, β-ամիլազի լուծամզվածք (աշխ. 4.1.), օսլայի 2% լուծույթ (1 գ օսլան լուծել 10 մլ սառը ջրում, ավելացնել 40 մլ եռացրած ջուր 1 րոպե եռացնել, սառեցնել և ծավալը հասցնել 50 մլ), ացետատային բուֆեր pH 5.5 (11.48 մլ 1 Մ CH_3COOH-ին ավելացնել 10 մլ NaOH-ի 1 Մ լուծույթ և ընդհանուր ծավալը հասցնել 100 մլ), HCl-ի 1 Ն և 0.1 Ն լուծույթներ, $Ca(CH_3COO)_2$)-ի բյուրեղներ, Լյուգոլի լուծույթ, ենթաստամոքսային գեղձի β-ամիլազի ուսումնասիրման ժամանակ՝ pH 7.4 ֆոսֆատային բուֆեր:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, չափիչ անոթներ, հավանգ, թերմոստատ, լուսաէլեկտրագունաչափ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Ամիլազների գումարային ակտիվության որոշման նպատակով պատրաստել 6 փորձանոթներ (մեկը որպես ստուգիչ)՝ ըստ աղյուսակի:

Բաղադրիչներ (մլ)	Փորձանոթներ					
	1	2	3	4	5	6
Լուծամզվածք	–	0.1	0.2	–	–	–
α-ամիլազ	–	–	–	0.2	0.4	–
β-ամիլազ	–	–	–	–	–	1.0
Ջուր	1.0	0.9	0.8	0.8	0.6	–
Բուֆեր	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Օսլա	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Նոսրացում	–	10	5	5	2.5	2.4

Փորձանոթները տեղադրել թերմոստատում (37°C-38°C): Այս պայմաններում կարելի է որոշել ինչպես ամիլազների գումարային ակտիվությունը, այնպես էլ α-ամիլազի և β-ամիլազի ակտիվությունները: 30 րոպե անց նմուշներին ավելացնել 2-ական մլ 1 Ն HCl ֆերմենտների ազդեցությունը կանխելու նպատակով և 3-ական կաթիլ Լյուգոլի լուծույթ: Այն նմուշները, որոնք ստացել են դեղին գունավորում առանձնացնել, իսկ կապույտ, մանուշակագույն, կարմիր գունավորում ունեցող նմուշներում շարունակել ուսումնասիրությունը (եթե J_2 ավելացնելուց հետո նույն ֆերմենտային պատրաստուկով բոլոր նմուշները ստանում են դեղին գունավորում, փորձը կրկնել նոսրացրած ֆերմենտային պատրաստուկով):

Պատրաստել փորձանոթներին համապատասխան համարակալված չափիչ անոթներ (50 մլ): Անոթների մեջ լցնել 30-40-ական մլ H_2O, 0.5-ական մլ 0.1 Ն HCl, 5-ական կաթիլ Լյուգոլի լուծույթ և համապատասխան փորձանոթից 0.5-ական մլ խառնուրդ: Անոթների լուծույթների ծավալները ջրով հասցնել նիշին: Լուծույթները գունաչափել ջրի դիմաց (ԼԷԳ, ալիքի երկարությունը 630-670 նմ, կարմիր լուսաֆիլտր, կյուվետի լայնությունը 1.0 սմ):

Ամիլազային ակտիվությունը արտահայտվում է 1 ժամում 1 մլ ֆերմենտային լուծույթով հիդրոլիզի ենթարկված օսլայի մգ քանակով և հաշվարկվում է հետևյալ բանաձևով,

$$A = \frac{E_k - E_0}{E_k} \cdot \frac{2 \cdot 2}{60}$$

որտեղ

A – ամիլազի ակտիվությունն է՝ արտահայտված 1 ժամում 1 գ ածիկում ճեղքված օսլայի մգ-ով,

E_k – ստուգիչ նմուշի օպտիկական խտությունը,

E_0 – փորձնական նմուշի օպտիկական խտությունը,

2 x 2 – 1 ժամի և 1 մլ ֆերմենտային լուծույթի վերահաշվարկի գործակիցները,

60 – 1 մգ օսլայի վերահաշվարկի գործակից (2% օսլայի լուծույթի 3 մլ պարունակում է 60 մգ օսլա), մգ:

β-ամիլազի որոշումը. համարիչում ավելացնել 2.4 գործակիցը, ինչը համապատասխանում է β-ամիլազի անջատման ժամանակ կատարած լուծամզվածքի բոլոր նոսրացումներին:

Աշխատանք 4.13. Ամիլազի ակտիվության որոշումն արյան շիճուկում (ըստ Կարավեի)

α-ամիլազն ածխաջրերի հիդրոլիզն իրականացնող հիմնական ֆերմենտ է, սինթեզվում է ենթաստամոքսային գեղձում և թքագեղձում: Արյան շիճուկում տարբերակում են ենթաստամոքսային (P-տիպի) α-ամիլազ և թքի (S-տիպի) α-ամիլազ:

α-ամիլազի ակտիվության որոշումը կենսաբանական հեղուկներում (օրինակ՝ արյան շիճուկում) կիրառվում է ենթաստամոքսային գեղձի ախտահարումների ախտորոշման նպատակով, հատկապես քրոնիկ պանկրեատիտի դեպքում, երբ ընդհանուր ամիլազի ակտիվության մակարդակը նորմայի սահմաններում է: Քրոնիկ պանկրեատիտով հիվանդների արյան շիճուկում P-տիպի ամիլազը կազմում է արյան ընդհանուր ամիլազի 75-80%: Սուր պանկրեատիտի դեպքում արյան շիճուկում ամիլազային ակտիվությունն աճում է 10-30 անգամ, հատկապես առաջին օրը, հետո աստիճանաբար 3-4-րդ օրը վերականգնվում է: α-ամիլազի ակտիվության աճն արյան շիճուկում ուղեկցվում է մեզի α-ամիլազի ակտիվության աճով, քանի որ ֆերմենտն արտազատվում է երիկամներով: Ենթաստամոքսային գեղձի ամիլազի ակտիվությունը, ի տարբերություն ընդհանուր ամիլազի, չի աճում շաքարային կետոացիդոզի, պարոտիտի, թոքի քաղցկեղի դեպքում:

Արյան շիճուկի α-ամիլազի որոշման հիմքում հիդրոլիզի ընթացքում α-ամիլազի ազդեցությամբ օսլայի քանակության նվազումն է: Մինչև հիդրոլիզը և հիդրոլիզից հետո օսլայի կոնցենտրացիայի տարբերությունը ուղիղ համեմատական է ամիլազի ակտիվությանը:

Ֆերմենտի ակտիվությունը որոշելիս օքսալատային և ցիտրատային արյուն պետք չէ օգտագործել, քանի որ թրթնջկաթթուն և կիտրոնաթթուն α- ամիլազի ակտիվության արգելակիչներ են:

Նորմայում մարդու արյան շիճուկի ամիլազի ակտիվությունը 15-30 գ/ժ.լ է:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Արյան շիճուկ, ֆոսֆատային բուֆեր 0.1 Մ, pH 7.2 (72 մլ 0.1 Մ Na_2HPO_4 և 28 մլ 0.1 Մ KH_2PO_4), օսլայի 2% լուծույթ (պատրաստել օգտագործման օրը, աշխ. 4.11), NaCl-ի 3% լուծույթ, HCl-ի 1 Ն լուծույթ, յոդի (J_2) լուծույթ (0.18 գ KJ և 0.018 գ բյուրեղային յոդը լուծել 10 մլ թորած ջրում, պահել մուգ անոթում):

Սարքեր և պարագաներ: Չափիչ անոթներ, փորձանոթներ, կաթոցիչներ, թերմոստատ, լուսաէլեկտրագունաչափ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Երկու փորձանոթների մեջ՝ փորձնական և ստուգիչ, լցնել 0.3-ական մլ ֆոսֆատային բուֆեր, 0.5-ական մլ օսլայի լուծույթ և 0.1-ական մլ NaCl-ի լուծույթ: Փորձանոթները տեղափոխել թերմոստատ (37°C), 10 րոպե անց փորձնական նմուշին ավելացնել 0.1 մլ արյան շիճուկ, ստուգիչ նմուշին՝ 1 մլ HCl-ի լուծույթ և 0.1 մլ արյան շիճուկ, խառնել և թողնել 10 րոպե 37° C պայմաններում: Փորձնական նմուշին ավելացնել 1 մլ HCl-ի լուծույթ՝ ամիլազի ազդեցությունը կանխելու նպատակով: Փորձանոթներից 0.2-ական մլ լուծույթ տեղափոխել 15-20 մլ H_2O պարունակող չափիչ անոթների մեջ, ավելացնել 0.5-ական մլ J_2-ի լուծույթ, ծավալը հասցնել 25 մլ: Ստացված նմուշներն անմիջապես գունաչափել ջրի դիմաց (ԼԷԳ, ալիքի երկարությունը 630-670 նմ, կարմիր լուսաֆիլտր, կյուվետի լայնությունը 1.0 սմ):

Ամիլազի ակտիվությունն արտահայտվում է 1 ժամում 1 լ կենսաբանական հեղուկով հիդրոլիզված օսլայի քանակությամբ (մգ), հաշվարկվում է հետևյալ բանաձևով.

$$X = (E_{ստ} - E_{փ}) \cdot 0.01 \cdot 2 \cdot 1000 / E_{ստ} \cdot 0.1,$$

որտեղ

X – արյան շիճուկի ամիլազի ակտիվությունն է, մգ/ժ·լ,

$E_{ստ}$ – ստուգիչ նմուշի օպտիկական խտությունը,

$E_{փ}$ – փորձնական նմուշի օպտիկական խտությունը,

0.01 – օսլայի կշիռը, գ,

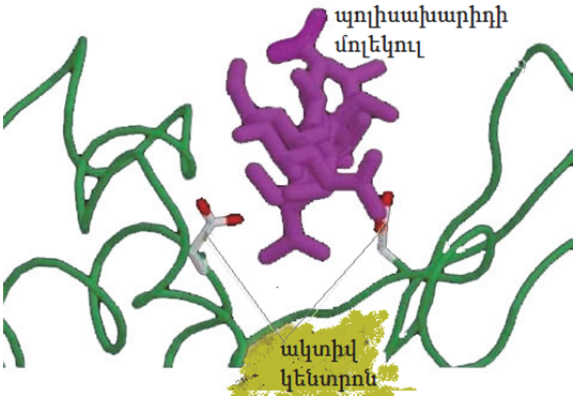
2 – ռեակցիայի տևողության վերահաշվարկը,

1000 – 1 լ արյան շիճուկի վերահաշվարկի գործակիցը,

0.1 – հետազոտվող արյան շիճուկի ծավալը, մլ:

Աշխատանք 4.14. Լիզոցիմի ակտիվության որոշումը

Լիզոցիմները (E.C. 3.2.1.17) O-գլիկոզիդային հիդրոլազներ են, կատալիզում են մուկոպոլիսախարիդների, մուկոպեպտիդների էնդոհիդրոլիզը, ճեղքելով N-ացետիլ մուրամաթթվի և 2-ացետամիդա-2-դեզօքսի-D-գլյուկոզի միջև առկա β-1,4 կապերը (նկ. 4.13): Ֆերմենտի իզոէլեկտրական կետը pH 10.5-ի սահմանում է, կայուն է չեզոք և թթվային միջավայրերում, մինչև 100°C տաքացնելիս չի բնազրկվում: Ֆերմենտի մոլեկուլային զանգվածը 14.6-15 կԴա է, կազմված է 129 ամինաթթվային մնացորդ պարունակող մեկ պոլիպեպտիդային շղթայից:



Նկ. 4.13. Լիզոցիմի կառուցվածքը, պոլիսախարիդի միացումը լիզոցիմին:

Կենդանական օրգանիզմներում լիզոցիմների հիմնական աղբյուր են թուքը, բարակ և հաստ աղիների գեղձերը, արյան շիճուկը, լեյկոցիտները (լեյկոցիտային զանգվածի 1 գ պարունակում է 5000 մկգ լիզոցիմներ), մեզը: Բջջում լիզոցիմները գերօքսիդազի և լիզոսոմային ֆերմենտների հետ մեկտեղ կուտակվում են փոքր գրանուլներում: Լիզոցիմներն *in vitro* ակտիվանում են կատիոնային ՄԱՆ-ով (մակերեսային ակտիվ նյութեր), *in vivo* - կատիոնային սպիտակուցներով. ավիդին, պրոտամիններ, հիստոններ, ֆոսֆոլիպազ A: Օժտված է ազդեցության լայն սպեկտրով. բակտերիաստատիկական՝ նվազեցնում է գրամ դրական բակտերիաների կայունությունը դետերգենտների, հալոգենների նկատմամբ, իմունաճնավորող՝ խթանում է տարբեր հակագենների նկատմամբ իմունային պատասխանի զարգացումը, իրականացնում է լիպոպոլիսախարիդային բնույթի տոքսինների ապաակտիվացումը, կարգավորիչ՝ խթանում է IgA իմունագլոբուլինների *in vivo* կենսասինթեզը:

Լիզոցիմների ակտիվության որոշման մեթոդների հիմքում ֆերմենտի բակտերիալիտիկ ունակությունն է հիդրոլիզելու գրամ դրական բակտերիաների բջջապատերը:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Ֆերմենտի աղբյուրներ. արյան շիճուկ, հյուսվածքի հոմոգենատ՝ պատրաստված NaCl-ի 0.9% լուծույթում (աշխ. 2.26), ելանյութ. *Micrococcus Lysodeicticues* բակտերիաների ացետոնային փոշու

10.0 մգ հոմոգենացնել 50.0 մլ 0.1 Մ K-Na-ֆոսֆատային բուֆերում pH 6.2 (0.3 գ Na_2HPO_4-ը լուծել 25 մլ H_2O, 0.22 գ KH_2PO_4-ը լուծել 25 մլ H_2O: 9.2 մլ Na_2HPO_4-ի լուծույթին ավելացնել KH_2PO_4-ի լուծույթ՝ ընդհանուր ծավալը հասցնելով 50 մլ) ցենտրիֆուգել 2-3 րոպե 2500 պտ/ր արագությամբ:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, հավանգ, ձագար, թղթյա ֆիլտր, ցենտրիֆուգ, սպեկտրալուսաչափ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Կյուվետի մեջ լցնել 3.0 մլ ելանյութ և 0.1 մլ ֆերմենտային պատրաստուկ (37°C): Նմուշը գունաչափել ռեակցիայի 1-ին և 5-րդ րոպեներին K-Na-ֆոսֆատային բուֆերի դիմաց (ՍՖ, ալիքի երկարությունը 540 նմ, կյուվետի լայնությունը 1.0 սմ):

Լիզոցիմի ակտիվությունն արտահայտել 1 ժ-ում 1 մգ (մլ) ֆերմենտով հիդրոլիզի ենթարկված ելանյութի քանակով (մգ).

$$A = \frac{C \cdot V \cdot n \cdot 60}{V_a \cdot t}$$

որտեղ

C – ելանյութի քանակությունն է (մգ)՝ ըստ փորձնական նմուշի 1-ին և 5-րդ րոպեների օպտիկական խտությունների տարբերության (համաձայն տրամաչափական կորի),

n – լիզոցիմ պարունակող ֆերմենտային պատրաստուկի նոսրացումը,

V – 1 գ հյուսվածքի հոմոգենատի ծավալը,

60 – ժամային գործակիցը,

Va – լիզոցիմ պարունակող ֆերմենտային պատրաստուկի ծավալը նմուշում,

t – ռեակցիայի տևողությունը, րոպե:

Տրամաչափական կորի կառուցումը. Փորձանոթների մեջ լցնել 2; 4; 8; 16 անգամ նոսրացված 3-ական մլ բակտերիային պատրաստուկ և 0.1 մլ թորած H_2O, գունաչափել բուֆերի դիմաց (ՍՖ, ալիքի երկարությունը 540 նմ, կանաչ լուսաֆիլտր, կյուվետի լայնությունը 0.5 սմ): Կառուցել ելանյութի կոնցենտրացիայից լուծույթի օպտիկական խտության կախվածության կոր:

ՊՐՈՏԵՈԼԻՏԻԿ ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՈՒՄԸ

Օրգանիզմում սպիտակուցների հիդրոլիզն ընթանում է պրոտեազների մասնակցությամբ, որպես հիդրոլիզի վերջնական արգասիք՝ առաջանում են ամինաթթուներ:

Պրոտեազների ակտիվության որոշման հիմքում պրոտեազներով (պեպտիդհիդրոլազներով) սպիտակուցի ստանդարտ լուծույթների (հեմոգլոբին, կազեին, ալբումին) հիդրոլիզի արդյունքում անջատված թիրոզինի (կամ թիրոզին պարունակող պեպտիդների) քանակի որոշումն է: Մնացորդային չճեղքված սպիտակուցը նստեցնում են եռքլորքացախաթթվով և զտում: Զտվածքի հետ Ֆոլինի ռեակտիվը ցուցաբերում է գունավորման ռեակցիա, և ստացված լուծույթի օպտիկական խտությունը որոշվում է լուսաէլեկտրագունաչափով, 630-670 նմ ալիքի երկարությամբ:

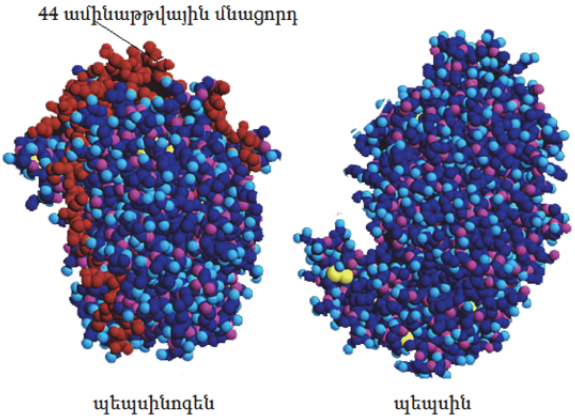
Ֆերմենտի պրոտեոլիտիկ ակտիվությունը (ՊԱ) սպիտակուցների քայքայումը մինչև պեպտիդներ կամ ամինաթթուներ կատալիզելու ունակությունն է: Որպես պրոտեոլիտիկ ակտիվության միավոր՝ ընդունվում է ֆերմենտի այն քանակը, որը 30^0C-ում 1 րոպեում ճեղքում է 1 մկմոլ թիրոզինին համապատասխանող կազեին մինչև ամինաթթուներ (1 մկմոլ թիրոզինը 0,181 մգ է), ակտիվությունն արտահայտվում է 1 մգ սպիտակուցում ֆերմենտային միավորներով (Ե/մգ):

Աշխատանք 4.15. Պեպսինի ազդեցության ուսումնասիրությունը

Պեպսինը (E.C. 3.4.4.1.) պրոտեոլիտիկ ֆերմենտ է, էնդոպեպտիդազ, հիմնականում ճեղքում է սպիտակուցի մոլեկուլի արոմատիկ ամինաթթուներով առաջացած պեպտիդային կապերը, որոնց հասանելիությունն աճում է pH 1.5-4.5 պայմաններում մոլեկուլի բնավոխման արդյունքում և ավելի դանդաղ ճեղքում է լեյցինով և դիկարբոնաթթուներով առաջացած կապերը: Պեպսինի ազդեցության արդյունքում առաջանում են կարճ պեպտիդներ:

Ստամոքսահյութի հիմնական ֆերմենտ պեպսինն արտազատվում է նախա նյութի՝ պեպսինոգենի (նկ. 4.14) ձևով: Պեպսինոգենը (մոլեկուլային զանգվածը՝ 42.5 կԴա) 70-100°C-ում միայն մասնակիորեն է բնավոխվում, pH 9.0-ի պայմաններում ենթարկվում է դարձելի բնավոխման: Պեպսինը (մոլեկուլային զանգվածը 34 կԴա) pH 7.0 և 70° C պայմաններում քայքայվում է: pH-ի 6.0-ից ցածր արժեքների դեպքում պեպսինի առկայությամբ պեպսինոգենի մոլեկուլից աուտոկատալիտիկ եղանակով N-ծայրից անջատ-

վում են 44 ամինաթթվային մնացորդներ: Այս ամինաթթուները պեպսինոգենի գրեթե բոլոր դրական լիցք ունեցող ամինաթթուներն են, հետևաբար ակտիվ պեպսինում գերակշռում են բացասական լիցք ունեցող ամինաթթուները: Պեպսինի նպաստավոր pH-ը 1.5-4.0 սահմաններում է:

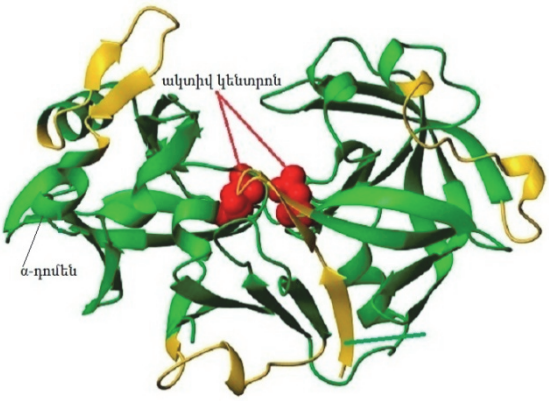


Նկ. 4.14. Պեպսինը և դրա ոչ ակտիվ ձևը՝ պեպսինոգենը:

Հայտնի են պեպսինի բազմաթիվ ձևեր. պեպսին 1-նպաստավոր pH-ը 1.9 (մոլեկուլային զանգվածը 43.8 կԴա), պեպսին 2-նպաստավոր pH-ը 2.1 (մոլեկուլային զանգվածը 40 կԴա), պեպսին 3-նպաստավոր pH-ը 2.4-2.8 (մոլեկուլային զանգվածը 37 կԴա), պեպսին 4-նպաստավոր pH-ը 3.5 ցածրի դեպքում ֆերմենտը անկայուն է, պեպսին 5-նպաստավոր pH-ը 2.8-3.6 (մոլեկուլային զանգվածը 34.6 կԴա):

Պեպսինի (նկ. 4.15) ազդեցությունը կարելի ուսումնասիրել՝ հետևելով արյան պլազմի ոչ լուծելի սպիտակուց ֆիբրինի լուծելի վիճակի վերածվելու գործընթացին: Պեպսինի ազդեցությամբ ֆիբրինի ճեղքումից առաջացած պեպտիդները ցուցաբերում են բիուրետի դրական ռեակցիա:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Ֆիբրին կամ եփած ձվի սպիտակուց, 0.1% պեպսինի լուծույթ՝ պատրաստված 0.2 % HCl-ի լուծույթում, $NaHCO_3$-ի 10% լուծույթ, լակմուս:



Նկ. 4.15. Պեպսինի տարածական կառուցվածքը:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, թերմոստատ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Երեք փորձանոթների մեջ լցնել 1-ական մլ պեպսինի լուծույթ: 1-ին փորձանոթի պարու-

նակությունը եռացնել 2 րոպե և սառեցնել: 2-րդ փորձանոթի պարունակությունը չեզոքացնել 3-4 կաթիլ l0% $NaHCO_3$-ի լուծույթով: 3-րդ փորձանոթը թողնել նույնությամբ:

Երեք փորձանոթներին ավելացնել ֆիբրին կամ քիչ քանակությամբ ձվի սպիտակուց: Փորձանոթները տեղադրել թերմոստատում (37ºC) և թողնել 30-45 րոպե: Փորձանոթները թափահարել և նշել սպիտակուցի տեսանելի փոփոխությունները (լուծում, ուռչեցում) և կատարել բիուրետի ռեակցիա: Բիուրետի դրական ռեակցիան դիտվում է միայն 3-րդ փորձանոթում:

Ստացված արդյունքները գրանցել հետևյալ աղյուսակում՝ կատարելով համապատասխան եզրակացություններ

Փորձանոթ N	Ելանյութ	Ֆերմենտ	Տեսանելի փոփոխություններ	Բիուրետի ռեակցիա	Եզրակացություններ

Աշխատանք 4.16. Պեպսինի ակտիվության որոշումը

Արյան շիճուկում, ստամոքսահյութում, մեզում պեպսինի ակտիվության որոշման հիմքում ֆերմենտի ազդեցությամբ սպիտակուցային ելանյութի հիդրոլիզված պեպտիդային կապերի քանակության գնահատումն է: Ելանյութ կարող է ծառայել արյան պլազմի ալբումինը (որոշվում է ազատ ամինաթթուների կլանմամբ, 275 նմ), հեմոգլոբինը (Ֆոլինի ռեակտիվի օգնությամբ որոշվում է ազատ թիրոզինային մնացորդների քանակությունը):

Նյութեր և ռեակտիվներ: Հյուսվածքի հոմոգենատ պատրաստված NaCl-ի 0.9% լուծույթով (աշխ. 2.26), 0.2 Մ Na-ացետատային բուֆեր (pH 3.5), CCl_3COOH-ի 10% լուծույթ, շիճուկային ալբումինի (ելանյութ) 1% լուծույթ պատրաստված pH 3.5 ացետատային բուֆերում (ավելացնել 1-2 կաթիլ տոլուոլ, պահել սառնարանում մեկ շաբաթ), թիրոզինի կամ ֆենիլալանինի (10 մկմոլ/մլ) ստանդարտ լուծույթ՝ պատրաստված pH 3.5 ացետատային բուֆերում:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, հավանգ, ձագար, թղթյա ֆիլտր, թերմոստատ, ցենտրիֆուգ, սպեկտրալուսաչափ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Փորձանոթի մեջ լցնել 2.0 մլ ելանյութ և 0.5 մլ հյուսվածքի հոմոգենատ: Ստուգիչ նմուշում ելանյութին ավելացնել ֆերմենտի պատրաստուկ 0.5 մլ CCl_3COOH-ի լուծույթ ավելացնելուց հետո: Նմուշները տեղադրել թերմոստա-

տում (60 րոպե, 37°C): Փորձնական նմուշում ռեակցիան դադարեցնել՝ ավելացնելով 0.5 մլ CCl_3COOH-ի լուծույթ: Նմուշները ցենտրիֆուգել 15 րոպե 5000 պտ/ր արագությամբ: Վերնստվածքների օպտիկական խտությունները որոշել CCl_3COOH-ի լուծույթի դիմաց (սպեկտրալուսաչափ, ալիքի երկարությունը 275 նմ, կյուվետի լայնությունը 0.5 սմ):

Պեպսինի ակտիվությունն արտահայտել 1 ժ-ում 1 մգ (մլ) ֆերմենտով ալբումինից անջատված ֆենիլալանինի կամ թիրոզինի մկմոլ-ով.

$$A = \frac{C \cdot V \cdot n \cdot 60}{V_a \cdot t}$$

որտեղ

C – ֆենիլալանինի կամ թիրոզինի (մկմոլ) քանակությունն է՝ ըստ տրամաչափական կորի,

V – 1 գ հյուսվածքի հոմոգենատի ծավալը,

n – պեպսին պարունակող ֆերմենտի պատրաստուկի նոսրացումը,

60 – րոպեները ժամի փոխակերպման գործակիցը,

Va – պեպսին պարունակող ֆերմենտի աղբյուրի ծավալը նմուշում,

t – ռեակցիայի տևողությունը, րոպե,

Տրամաչափական կորի կառուցումը. փորձանոթների մեջ լցնել 1-ական մլ թորած H_2O և 2-ական մլ 2; 4; 8; 16 անգամ նոսրացված ամինաթթվի ստանդարտ լուծույթներ, ապա լուծույթների օպտիկական խտությունները որոշել թորած H_2O դիմաց (սպեկտրալուսաչափ, ալիքի երկարությունը 275 նմ, կյուվետի լայնությունը 0.5 սմ): Կառուցել ամինաթթվի կոնցենտրացիայից լուծույթի օպտիկական խտության կախվածության կոր:

Աշխատանք 4.17. Թթվային պրոտեազի՝ պեպսինի ակտիվության որոշումն արյան շիճուկում

Մեթոդի հիմքում ընկած են հետազոտվող ֆերմենտային պատրաստուկի ազդեցությամբ հեմոգլոբինի հիդրոլիզը և չհիդրոլիզված սպիտակուցի նստեցումը CCl_3COOH-ով:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Կենդանու արյան շիճուկ կամ պեպսինի 0.1 % լուծույթ՝ պատրաստված 0.2 % HCl-ում (4.5 մլ խիտ HCl-ը չափիչ անոթում հասցնել 1 լ), հեմոգլոբինի 1 % լուծույթ (պատրաստված ֆոսֆատ-լիմոնաթթվային բուֆերում pH 2.2), ֆոսֆատ-լիմոնաթթվային բուֆեր pH 2.2, Na_2CO_3-ի կամ NaOH-ի 0.5 Մ լուծույթ, CCl_3COOH-ի 5 % լուծույթ, 1 մլ-ում

500 մկմոլ թիրոզին պարունակող լուծույթ տրամաչափական կորի կառուցման համար (4.53 մգ թիրոզինը լուծել 50 մլ 0.2% HCl-ում), Ֆոլինի ռեակտիվ (նոսրացված 1:2 հարաբերությամբ):

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, թերմոստատ, լուսաէլեկտրագունաչափ, pH-չափիչ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Երկու փորձանոթների մեջ լցնել 1-ական մլ հեմոգլոբինի լուծույթ և 1.5-ական մլ Ֆոսֆատ-լիմոնաթթվային բուֆեր (pH 2.2) և փորձանոթները 5 րոպե տեղադրել թերմոստատում (37-38°C): Միաժամանակ թերմոստատում պահել նաև ֆերմենտի լուծույթը: 5 րոպե անց փորձանոթներից մեկի մեջ (ստուգիչ) ավելացնել 5 մլ 5 % CCl_3COOH և խառնել: 2 փորձանոթներին ավելացնել թերմոստատում տեղադրված 0.5 մլ ֆերմենտային պատրաստուկ (օրինակ՝ պեպսին), պարունակությունը խառնել և փորձանոթները 30 րոպե թողնել 37-38°C թերմոստատում: Այնուհետև փորձնական նմուշին ավելացնել 5 մլ CCl_3COOH և թողնել թերմոստատում 10-15 րոպե չճեղքված սպիտակուցի և ֆերմենտի նստեցման համար: 2 փորձանոթների պարունակությունը զտել և թափանցիկ զտվածքում որոշել ֆերմենտային հիդրոլիզի արգասիք հանդիսացող թիրոզինի (կամ թիրոզին պարունակող պեպտիդների) քանակը: CCl_3COOH-ը չի նստեցնում սպիտակուցի ճեղքման արգասիքը (նկ. 4.16):



Նկ. 4.16. Եռքլորքացախաթթվի ազդեցությունը ֆերմենտային ռեակցիայի արգասիքների վրա:

2 փորձանոթների մեջ լցնել 2-ական մլ զտվածք համապատասխանաբար ստուգիչ և փորձնական նմուշներից: Յուրաքանչյուրի մեջ դանդաղ ավելացնել 5 մլ Na_2CO_3-ի (կամ NaOH-ի) լուծույթ և 1-ական մլ նոսրացված Ֆոլինի ռեակտիվ:

Փորձանոթների պարունակությունը խառնել, 20 րոպե թողնել սենյակային ջերմաստիճանում, ապա ստուգիչ և փորձնական նմուշները գունաչափել լուսաէլեկտրագունաչափով (ԼԷԳ, կարմիր լուսաֆիլտր, ալիքի երկարությունը 630-670 նմ, կյուվետի լայնությունը 1.0 սմ): Նմուշներում թիրոզինի քանակը որոշել տրամաչափական կորի միջոցով:

Պրոտեոլիտիկ ակտիվությունն արտահայտել 1 ր-ում 1 մգ սպիտակուցից (կամ 1 մլ ֆերմենտային լուծույթում) անջատված թիրոզինի մգ-ների (կամ մկմոլերի) քանակով: Հաշվարկի ժամանակ հաշվի առնել ռեակցիայի տևողությունը (30 րոպե):

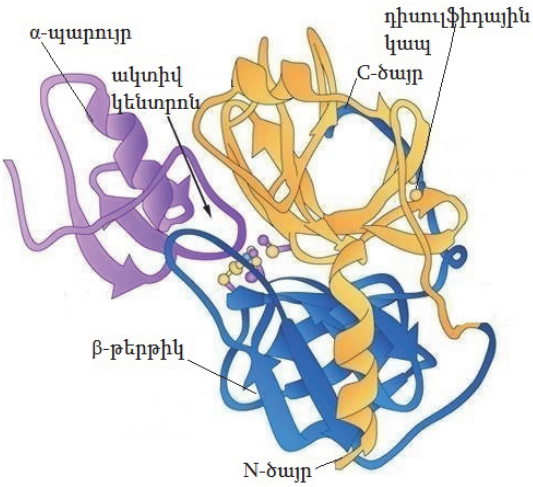
Գրանցել աշխատանքի արդյունքները և եզրակացություն անել ֆերմենտային պատրաստուկի ակտիվության վերաբերյալ:

Տրամաչափական կորի կառուցումը. փորձանոթների մեջ լցնել 2-ական մլ 2; 4; 8; 16 անգամ նոսրացված թիրոզինի ստանդարտ լուծույթ, 5-ական մլ Na_2CO_3 (կամ NaOH) և 1-ական մլ նոսրացված ֆոլինի ռեակտիվ: Փորձանոթների պարունակությունը խառնել, թողնել 20 րոպե սենյակային ջերմաստիճանում և գունաչափել ստուգիչ նմուշի դիմաց, որը թիրոզինի փոխարեն պարունակում է 2 մլ թորած ջուր (ԼԷԳ, կարմիր լուսաֆիլտր, ալիքի երկարությունը 630-670 նմ, կյուվետի լայնությունը 1.0 սմ):

Կառուցել ամինաթթվի քանակից լուծույթի օպտիկական խտության կախվածության կոր:

Աշխատանք 4.18. Տրիպսինի պրոտեոլիտիկ ակտիվության որոշումը

Տրիպսինի (E.C. 3.4.4.4.) պրոտեոլիտիկ ակտիվությունը որոշվում է կազեինի ճեղքման արգասիք հանդիսացող թիրոզինի քանակով (նկ. 4.17): Որպես թիրոզինի հայտնաբերման ազդանյութ՝ օգտագործվում է Ֆոլինի ռեակտիվ, որը թիրոզինի հետ առաջացնում է կապույտ գունավորում և վերջինիս ուժգնությունը որոշվում է գունաչափական եղանակով:



Նկ. 4.17. Տրիպսինի կառուցվածքը:

Ռեակտիվներ: 1/15 Մ (0.067 Մ) ֆոսֆատային բուֆեր pH 8 (95 : 5 ծավալային հարաբերությամբ վերցված NaH_2PO_4 x 12 H_2O (23.87 գ/լ) և KH_2PO_4- ի (9.07 գ/լ) լուծույթներ), 0.4 % կազեինի լուծույթ՝ պատրաստված 0.2 Մ CH_3COONa-ում,

$5x10^{-4}$ % տրիպսինի լուծույթ՝ պատրաստված 0.005 Մ HCl-ում, CCl_3COOH-ի 10 % լուծույթ, NaOH-ի 0.5 Մ լուծույթ, Ֆոլինի ռեակտիվ:

Սարքեր և պարագաներ: Անոթներ, կաթոցիչներ, փորձանոթներ, լուսաէլեկտրագունաչափ, pH-չափիչ, թերմոստատ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Երկու փորձանոթներում պատրաստել խառնուրդներ՝ համաձայն հետևյալ աղյուսակի:

Նմուշ	Կազեինի լուծույթ, մլ	Ֆոսֆատային բուֆեր, մլ	CCl_3COOH -ի լուծույթ, մլ	Տրիպսինի լուծույթ, 1 մգ/մլ
Փորձնական	1	1.5	-	0.5
Ստուգիչ	1	1.5	3	0.5

Նմուշները խառնել և տեղափոխել թերմոստատ (37°C, 20 րոպե): Այնուհետև փորձնական նմուշի մեջ ռեակցիան կանգնեցնելու նպատակով ավելացնել 3 մլ CCl_3COOH-ի լուծույթ: 5-10 րոպե հետո նմուշները զտել թղթյա ֆիլտրով:

Երկու առանձին փորձանոթների մեջ լցնել 5-ական մլ NaOH-ի լուծույթ, դրանցից մեկի մեջ ավելացնել 2.5 մլ փորձնական նմուշի զտվածք, մյուսի մեջ՝ 2.5 մլ ստուգիչ նմուշի զտվածք: Փորձանոթներին ավելացնել 0.5-ական մլ ֆոլինի ռեակտիվ: Խառնուրդները թափահարել և 20 րոպե անց առաջացած կապույտ գունավորման ուժգնությունը գունաչափել լուսաէլեկտրագունաչափով ստուգիչի դիմաց (ալիքի երկարությունը՝ 630-690 նմ, կյուվետի լայնությունը՝ 1 սմ): Տրամաչափական կորի (աշխ. 4.17) միջոցով որոշել կազեինի ֆերմենտային հիդրոլիզի արդյունքում լուծույթում առաջացած թիրոզինի քանակության աճը:

Տրիպսինի ակտիվությունը 1 մլ ֆերմենտի լուծույթում որոշել ֆերմենտային միավորներով (ընդհանուր ակտիվություն) և 1 մգ սպիտակուցի հաշվարկով (տեսակարար ակտիվություն): Հաշվի առնելով նոսրացումը՝ ֆերմենտի ընդհանուր ակտիվությունը 1 մլ ֆերմենտային լուծույթում հաշվել հետևյալ կերպ.

$$\frac{\text{Թիրոզինի քանակը, մկմոլ/նմուշ}}{\text{2.5 մլ x 0.5 մլ x 20 րոպե}}$$

Տեսակարար ակտիվությունը որոշելիս հաշվի առնել, որ ֆերմենտի 1 մլ-ը պարունակում է 0.5 մգ տրիպսին:

Աշխատանք 4.19. Տրիպսինի ազդեցության դիտարկումը որոշակի ժամանակահատվածում

Ռեակտիվներ: 0.4% կազեինի լուծույթ՝ պատրաստված 0.2 Մ CH_3COONa-ում, $5x10^{-4}$% տրիպսինի լուծույթ՝ պատրաստված 0.005 Մ HCl-ում, 0.1 Մ ֆոսֆատային բուֆեր (pH 8), CCl_3COOH-ի 5% լուծույթ, NaOH-ի 0.5 Մ լուծույթ, Ֆոլինի ռեակտիվ:

Սարքեր և պարագաներ: Կաթոցիչներ, փորձանոթներ, թերմոստատ, լուսաէլեկտրագունաչափ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Հինգ փորձանոթներում լցնել 1-ական մլ կազեինի լուծույթ, 1.5-ական մլ ֆոսֆատային բուֆեր, այնուհետև 1-4 փորձանոթներում ավելացնել 0.5-ական մլ տրիպսին, իսկ 5-րդ փորձանոթում (ստուգիչ) ավելացնել 3 մլ CCl_3COOH-ի լուծույթ: Նմուշները տեղադրել թերմոստատում (37ºC): Պարբերաբար յուրաքանչյուր 10 րոպեն մեկ թերմոստատից հանել 1 փորձանոթ, ավելացնել 3 մլ CCl_3COOH-ի լուծույթ, խառնել և զտել:

Թիրոզինի խտությունը որոշելու նպատակով յուրաքանչյուր նմուշից 2.5-ական մլ զտվածք տեղափոխել նոր փորձանոթների մեջ, ավելացնել 0.5-ական մլ ֆոլինի ռեակտիվ և խառնել: 20 րոպե անց առաջացած կապույտ գունավորման ուժգնությունը գունաչափել լուսաէլեկտրագունաչափով ստուգիչի դիմաց (ԼԷԳ, ալիքի երկարությունը 630-670 նմ, կարմիր լուսաֆիլտր, կյուվետի լայնությունը 1.0 սմ): Տրամաչափական կորի (աշխ. 4.17) միջոցով որոշել կազեինի ֆերմենտային հիդրոլիզի արդյունքում լուծույթում առաջացած թիրոզինի քանակության փոփոխությունը՝ կախված ժամանակից:

Կառուցել թիրոզինի խտության փոփոխության կախումը ժամանակից ցույց տվող գրաֆիկ և գտնել ռեակցիայի սկզբնական արագությունը:

Աշխատանք 4.20. Տրիպսինի pH-ի նպաստավոր արժեքի որոշումը

Ռեակտիվներ: 0.4% կազեինի լուծույթ՝ պատրաստված 0.2 Մ CH_3COONa-ում, $5x10^{-4}$% տրիպսինի լուծույթ՝ պատրաստված 0.005 Մ HCl-ում, 0.1 Մ ֆոսֆատային բուֆեր (pH 5.4; pH 6.2; pH 7.0; pH 8), 5% CCl_3COOH-ի լուծույթ, NaOH-ի 0.5 Մ լուծույթ, Ֆոլինի ռեակտիվ:

Սարքեր և պարագաներ: Կաթոցիչներ, փորձանոթներ, թերմոստատ, լուսաէլեկտրագունաչափ:

Աշխատանքի ընթացքը

4 փորձանոթներում լցնել 1-ական մլ pH-ի տարբեր արժեքներով ֆոսֆատային բուֆերներ: Ավելացնել 1-ական մլ կազեինի և 0.5-ական մլ տրիպսինի լուծույթներ: Նմուշները խառնել, տեղադրել թերմոստատում (37°C, 15 րոպե): 15 րոպե անց նմուշներին ավելացնել 2-ական մլ CCl_3COOH-ի լուծույթ՝ ռեակցիան կանգնեցնելու նպատակով, զտել և զտվածքում որոշել անջատված թիրոզինի քանակը:

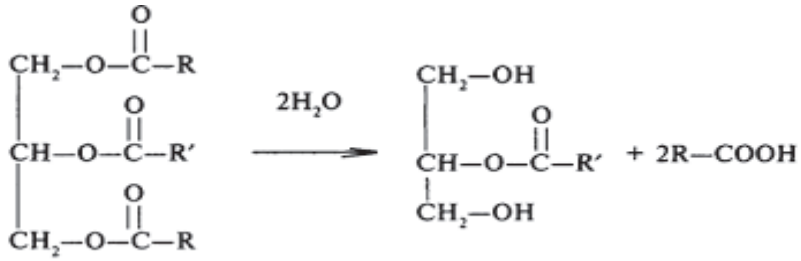
Թիրոզինի քանակը ըստ տրամաչափական կորի (աշխ. 4.17) որոշելու նպատակով պատրաստել 4 փորձանոթներ՝ 2.5-ական մլ զտվածքներով, ավելացնել 0.5-ական մլ ֆոլինի ռեակտիվ, խառնել: 20 րոպե հետո առաջացած կապույտ գունավորման ուժգնությունը որոշել լուսաէլեկտրագունաչափով (ԼԷԳ, ալիքի երկարությունը 630-670 նմ, կարմիր լուսաֆիլտր, կյուվետի լայնությունը 1.0 սմ):

Ստացված արդյունքները գրանցել աղյուսակում, նշել տրիպսինի ակտիվության նպաստավոր pH-ի արժեքը, կառուցել կոր:

Նմուշ	pH	Օպտիկական խտություն	Ֆերմենտի ակտիվություն
1	5.4		
2	6.2		
3	7.0		
4	8.0		

Աշխատանք 4.21. Լիպազի ակտիվության որոշումը

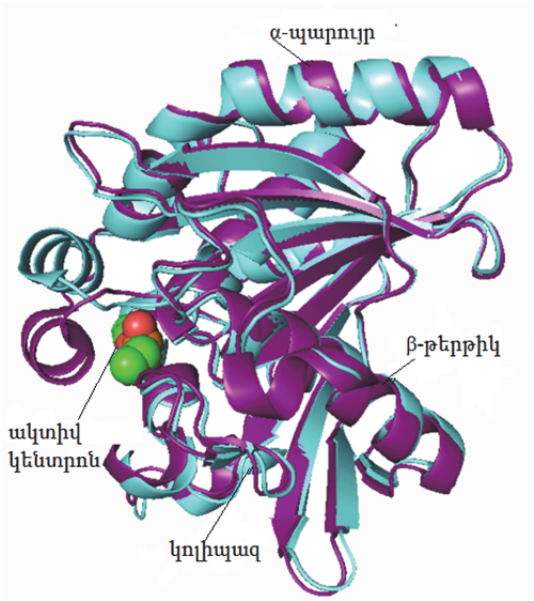
Լիպազը հիդրոլազների դասին, էսթերազների ենթաղասին պատկանող ֆերմենտ է: Լիպազները եռացիլգլիցերոլներից սկզբում անջատում են 1 և 3 դիրքերի ճարպաթթուների մնացորդները, այնուհետև՝ 2 դիրքի ճարպաթթվի մնացորդը:



եռացիլգլիցերոլ **մոնոացիլգլիցերոլ** **ճարպաթթուներ**

Ճարպերի կամ եռացիլգլիցերոլների հիդրոլիզն ընթանում է բարակ աղիներում, կատալիզվում է ենթաստամոքսային գեղձում արտադրվող լիպոլիտիկ ֆերմենտներով՝ լիպազներով (նկ. 4.18):

Ենթաստամոքսային գեղձի լիպազն (E.C. 3.1.1.3.) արագացնում է ճարպերում բարդ եթերային կապերի հիդրոլիզը: Լիպազները տարածված են կաթնասունների բոլոր հյուսվածքներում (հատկապես ճարպային հյուսվածքում), ենթաստամոքսային գեղձում, արյան շիճուկում:



Նկ. 4.18. Ենթաստամոքսային գեղձի լիպազի կառուցվածքը:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Կաթ, կենդանական հյուսվածքի հոմոգենատ (հյուսվածքը լվանալ սառեցված (+4°C) NaCl-ի 0.9% լուծույթով, հոմոգենացնել ջերմաստիճանային նույն պայմաններում NaCl-ի լուծույթում 1:10 հարաբերությամբ, զտել), լեղի, $C_{20}H_{14}O_4$-ի 1% սպիրտային լուծույթ, NaOH-ի 0.01 Մ լուծույթ:

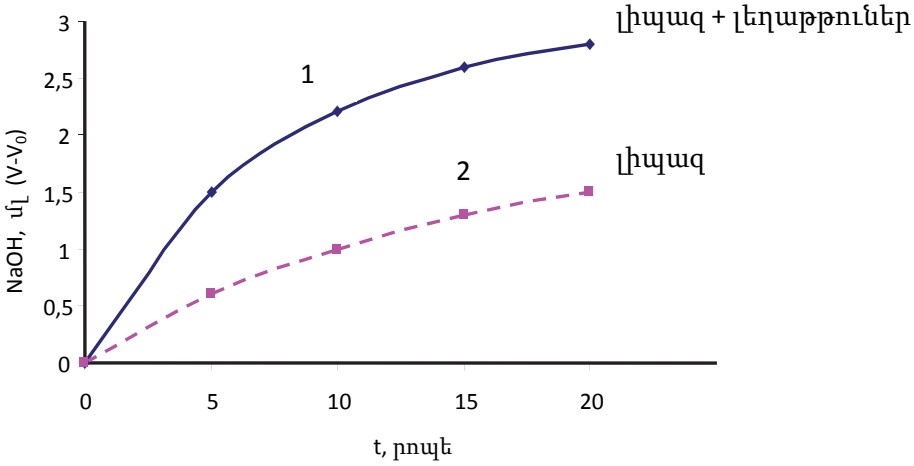
Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, քիմիական բաժակներ, հոմոգենիզատոր, ձագար, թղթյա ֆիլտր, թերմոստատ:

Աշխատանքի ընթացքը

Առաջին փորձնական նմուշի մեջ լցնել 20 մլ կաթ և 2 մլ լիպազ (հյուսվածքի հոմոգենատ), երկրորդի մեջ՝ 20 մլ կաթ, 2 մլ լիպազ և 2 մլ լեղի: Ստուգիչ փորձանոթի մեջ լցնել 20 մլ կաթ և 2 մլ նախապես ապաակտիվացված (եռացնելով) լիպազ: Նմուշները խառնել, յուրաքանչյուր նմուշից 2-ական մլ տեղափոխել տիտրման բաժակի մեջ, ավելացնել 2-ական կաթիլ $C_{20}H_{14}O_4$, տիտրել NaOH-ով մինչև բաց վարդագույն գունավորումը (գունավորումը պետք է կայուն լինի 30 վրկ.): Առաջին տիտրումից չեզոքացվում են օրգանական թթուները՝ կաթնաթթու և այլ: Այնուհետև նմուշները տեղափոխել թերմոստատ (38-40°C): 5, 10, 15, 20, 30 րոպե պարբերությամբ յուրաքանչյուր նմուշից վերցնել 2-ական մլ և տիտրել NaOH-ի լուծույթով մինչև բաց վարդագույն գունավորումը: Հաշվարկել 2-րդ և 3-րդ նմուշների և ստուգիչ նմուշի տիտրման արժեքների տարբերությունը: Ստացած արդյունքները գրանցել հետևյալ աղյուսակում, տվյալների հիման վրա կառուցել կոր (նկ. 4.19):

t	0	5	10	15	20	30
Լեղի պարունակող նմուշ, NaOH (մլ)						
Լեղի չպարունակող նմուշ, NaOH (մլ)						

Աբսցիսների առանցքին նշել ժամանակը (րոպե), օրդինատների առանցքին՝ լիպազի ակտիվությունը:



Նկ. 4.19. Լիպազի ակտիվության դրսևորումը:

Լիպազի ակտիվությունն արտահայտել տվյալ ժամանակահատվածում 1 գ ճարպի հիդրոլիզի արդյունքում առաջացած ազատ ճարպաթթուների չեզոքացման համար ծախսված հիմքի քանակով, մլ

$$X = \frac{(a-b)}{n}$$

որտեղ

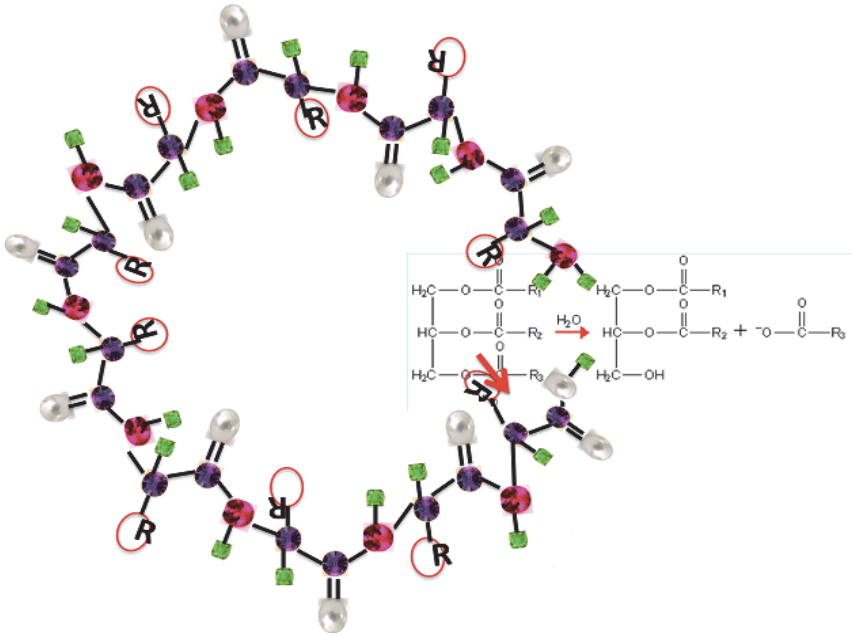
a – փորձնական նմուշի տիտրման համար ծախսված հիմքի քանակն է, մլ,

b – ստուգիչ նմուշի տիտրման համար ծախսված հիմքի քանակը, մլ,

n – հետազոտվող հյուսվածքի զանգվածը, գ:

Աշխատանք 4.22. Լիպազի ակտիվության որոշումը գերչակի (*Ricinus communis L.*) սերմերում

Լիպազի ակտիվությունը կարող է աճել սննդային հումքի պահպանման, վերամշակման ընթացքում: Օրինակ՝ կաթի պաստերիզացումը ակտիվացնում է լիպազը. կաթի ճարպի եռացիլգլիցերոլների հիդրոլիզի արդյունքում (նկ. 4.20) անջատվում են ցածրամոլեկուլային ճարպաթթուներ (կարագաթթու, կապրոնաթթու, կապրիլաթթու):



Նկ. 4.20. Լիպազի ազդեցությունը եռացիլգլիցերոլների վրա:

Որոշ տեսակի, հատկապես շատ ճարպ պարունակող ալյուրների (վարսակի ալյուր), գերչակի սերմերի, ընդեղենի պահեստավորումը բարձր ջերմաստիճանի, խոնավության պայմաններում նպաստում է լիպազի ազդեցությամբ եռացիլգլիցերոլների հիդրոլիզին, դա էլ հանգեցնում է թթվայնության բարձրացման, սննդամթերքի կծվահամության:

Նյութեր և ռեակտիվներ: 1 գ գերչակի սերմեր (կեղևից մաքրած), բուսական յուղ, ացետատային բուֆեր (pH 4.7), էթանոլ-եթեր խառնուրդ (1:1), KOH-ի 1 Ն սպիրտային լուծույթ, $C_{20}H_{14}O_4$-ի 1% սպիրտային լուծույթ:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, հավանգ, թերմոստատ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Երկու հավանգների մեջ (փորձնական և ստուգիչ) տրորել 1-ական գ սերմեր: Փորձնական նմուշին ավելացնել 3 մլ բուսական յուղ, 2 մլ բուֆերային լուծույթ և տեղափոխել թերմոստատ (37°C): 30 րոպե անց ավելացնել 30 մլ սպիրտ-եթերի խառնուրդ և մի քանի կաթիլ $C_{20}H_{14}O_4$: Անջատված ճարպաթթուները տիտրել KOH-ի լուծույթով մինչև բաց վարդագույն երանգի առաջացումը (գունավորումը պետք է պահպանվի 30 վրկ):

Ստուգիչ նմուշին ավելացնել 30 մլ սպիրտ-եթերի խառնուրդ, 2 մլ բուֆերային լուծույթ, 3 մլ բուսական յուղ: Լուծույթը խառնել և ավելացնել 3-5 կաթիլ $C_{20}H_{14}O_4$: Լուծույթը տիտրել մինչև բաց վարդագույն երանգի առաջացումը (գունավորումը պետք է պահպանվի 30 վրկ):

Նմուշների տիտրման վրա ծախսված KOH-ի ծավալների տարբերությամբ որոշել լիպազի ակտիվությունը:

$$X = \frac{(a-b)}{c}$$

որտեղ

a – փորձնական նմուշի տիտրման համար ծախսված հիմքի քանակն է, մլ,

b – ստուգիչ նմուշի տիտրման համար ծախսված հիմքի քանակը, մլ,

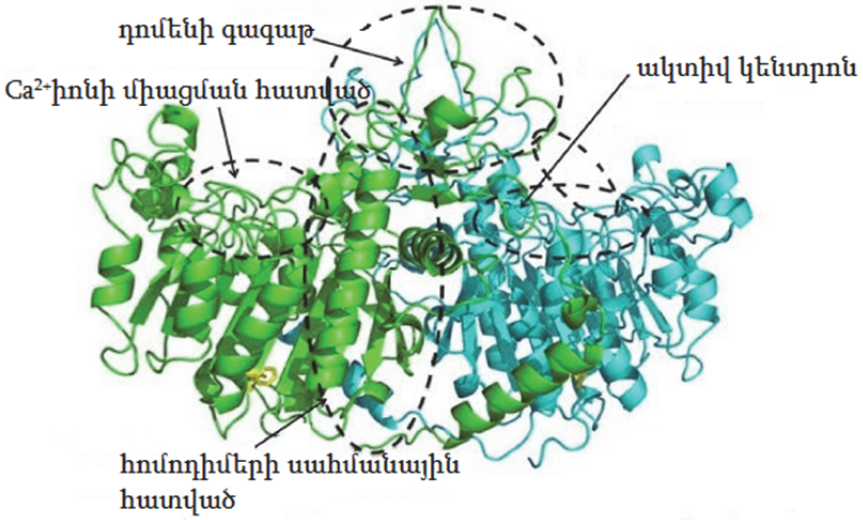
c – ֆերմենտային պատրաստուկի զանգվածը, գ:

Աշխատանքի արդյունքները գրանցել ստորև բերված աղյուսակում:

Հետազոտվող նյութ (գ)	KOH-ի ծավալ (մլ)		Տարբերություն (մլ)
	Փորձնական նմուշ	Ստուգիչ նմուշ	

Աշխատանք 4.23. Հիմնային ֆոսֆատազի ակտիվության որոշումն արյան շիճուկում

Հիմնային ֆոսֆատազը (E.C. 3.1.3.1.) հիդրոլազների դասի ֆերմենտ է, առկա է մարդու օրգանիզմի բոլոր հյուսվածքներում (նկ. 4.21): Ֆերմենտը դիմեր է՝ կազմված երկու սպիտակուցային ենթամիավորներից: Յուրաքանչյուր ենթամիավորի ակտիվ կենտրոնում առկա է կոֆերմենտ Zn^{2+}-ի իոն: Նպաստավոր pH-ը 8.6-10,1 է, մոլեկուլային զանգվածը՝ 70-120 կԴա, ունի 4 իզոֆերմենտ:



Նկ. 4.21. Ֆոսֆատազի կառուցվածքի առանձնահատկությունները:

Ֆերմենտի արգելակիչ են ԷԴՏԱ-ն, Ca^{2+} իոնը, գլյուտամինաթթուն, խթանիչ են Mg^{2+}-ի, Mn^{2+}-ի իոնները: Աղիների լորձաթաղանթում ֆերմենտի պարունակությունը 30-40 անգամ ավելի շատ է, քան լյարդում, ենթաստամոքսային գեղձում և 100-200 անգամ շատ՝ թքագեղձում, ստամոքսի լորձաթաղանթում:

Ֆերմենտի ազդեցությամբ օրգանական միացություններից անջատվում է անօրգանական ֆոսֆոր: Ֆերմենտի ակտիվությունը համարժեք է անջատված անօրգանական ֆոսֆորի քանակությանը:

Հիմնային ֆոսֆատազի ակտիվության փոփոխությունը վկայում է որոշակի ախտահարումների մասին: Ակտիվության բարձրացում արձանագրվում է ոսկրային տարբեր ախտահարումների, լյարդի ախտահարումների, աղիքային բակտերիային վարակների դեպքում: Ֆերմենտի ակտիվության նվազումը կարող է վկայել սակավարյունության, հիպոթիրեոզի մասին:

Հիմնային ֆոսֆատազի կենսաքիմիական հետազոտություն ճշանակվում է լյարդի, երիկամների, ոսկրային համակարգի հիվանդությունների ախտորոշման նպատակով:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Արյան շիճուկ, CCl_3COOH-ի 10% լուծույթ, տրիս-HCl բուֆեր (pH 8.92), $(NH_4)_2MoO_4$-ի 1% լուծույթ՝ պատրաստված H_2SO_4-ի 0.025 Մ լուծույթում, $C_6H_8O_6$-ի 1% լուծույթ:

Սարքեր և պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, pH-չափիչ, թերմոստատ, ցենտրիֆուգ, լուսաէլեկտրագունաչափ:

Աշխատանքի ընթացքը.

Երկու փորձանոթներում պատրաստել խառնուրդներ՝ համաձայն ստորև բերված աղյուսակի: Փորձնական նմուշը տեղափոխել թերմոստատ (1 ժամ 37^0C): Ռեակցիայի ավարտից հետո նմուշներին ավելացնել 4.5-ական մլ CCl_3COOH-ի լուծույթ, ցենտրիֆուգել 10 րոպե 3000 պտ/րոպե արագությամբ:

Յուրաքանչյուր նմուշից վերցնել 3-ական մլ վերնստվածք և տեղափոխել մաքուր փորձանոթի մեջ, ավելացնել 1-ական մլ $(NH_4)_2MoO_4$-ի լուծույթ, 1-ական մլ $C_6H_8O_6$-ի լուծույթ:

Լուծույթները թափահարել, թողնել 10-15 րոպե մինչև գունավորման զարգացումը, գունաչափել (ԼԷԳ, ալիքի երկարությունը 670 նմ, կարմիր լուսաֆիլտր, կյուվետի լայնությունը 0.5 սմ):

Նմուշ	Տրիս-HCl բուֆեր, pH 8.92	Արյան շիճուկ	t°
Փորձնական (մլ)	5.0 մլ	0.5 մլ	37℃
Ստուգիչ (մլ)	5.0 մլ	0.5 մլ	սենյակ. t°

Առաջին նմուշում որոշվում է գումարային անօրգանական ֆոսֆորը, որը ներառում է հիմնային ֆոսֆատազով հիդրոլիզված ֆոսֆորը, երկրորդ նմուշում՝ արյան շիճուկի չհիդրոլիզված անօրգանական ֆոսֆորի քանակությունը:

Հաշվարկել օպտիկական խտության տարբերությունը (D_1-D_2) և ֆոսֆորի տրամաչափական կորի միջոցով (աշխ. 2.33) որոշել հիմնային ֆոսֆատազի ազդեցությամբ անջատված ֆոսֆորի քանակությունը (մգ): Ստացված արժեքը բազմապատկել 200-ով: Հիմնային ֆոսֆատազի ակտիվությունը արտահայտվում է մմոլ/ժ·լ-ով:

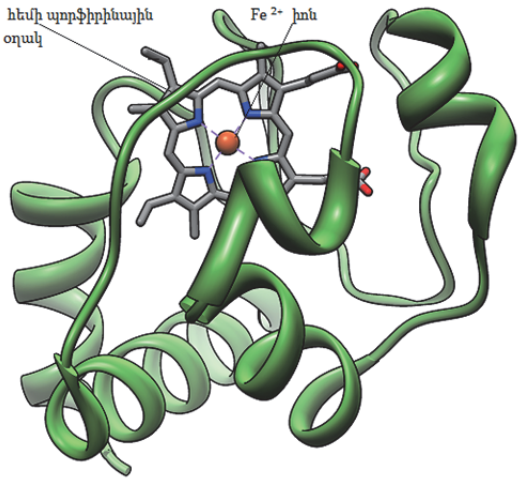
Աշխատանք 4.24. Ցիտոքրոմօքսիդազի բացահայտումը

Ցիտոքրոմօքսիդազը (E.C. 1.9.3.1.) միտոքոնդրիումների շնչառական շղթայի եզրափակիչ ֆերմենտ է (IV համալիր), հեմոպրոտեին է, կատալիզում է ցիտոքրոմ c-ի օքսիդացումը մոլեկուլային թթվածնով: Կաթնասունների ցիտոքրոմօքսիդազը բաղկացած է 13 ենթամիավորներից:

Շնչառական շղթայով էլեկտրոնների հոսքը ապահովում են 3 հիմնական կատալիտիկ ենթամիավորները:

II ենթամիավորը պարունակում է երկու Cu^{2+} իոններ (Cu_A), I ենթամիավորը՝ a_1 և a_3 ցիտոքրոմներ և Cu^{2+} իոն (Cu_B): Յուրաքանչյուր ցիտոքրոմ ունի թթվածին միացնելու կենտրոն՝ երկաթպորֆիրինային պրոստետիկ խումբ:

Էլեկտրոնների փոխադրմանը մասնակցում են a_1 և a_3 ցիտոքրոմների հեմի երկաթի իոնները (նկ. 4.22) և պղնձի իոնները: Համալիրի յուրահատկությունը սպիտակուցային հատվածի հետ միացած Cu^{2+} իոնների առկայությունն է (Cu_A, Cu_B): Cu_B-ն փոխադրում է էլեկտրոնները թթվածնին:



Նկ. 4.22. Ցիտոքրոմօքսիդազի տարածական կառուցվածքը:

Համալիրի մուգ կանաչ գունավորումը պայմանավորված է մյուս տասը ենթամիավորներով:

Թթվածնի ներկայությամբ ֆերմենտն օքսիդացնում է ոչ միայն շնչառական շղթայի բաղադրիչները, նաև այլ միացություններ, օրինակ՝ դիմեթիլպարաֆենիլենդիամինը, α-նաֆթոլը: Վերջինների օքսիդացման հետևանքով առաջանում է ինդոֆենոլային կապույտ, որի գունավորման ուժգնությունը ուղիղ համեմատական է ֆերմենտի ակտիվությանը: Այս ռեակցիան կենդանական օրգանիզմներում չի ընթանում, սակայն լայնորեն կիրառվում է ցիտոքրոմօքսիդազի բացահայտման նպատակով: Ռեակցիան անվանվել է ՆԱԴԻ-ի ռեակցիա՝ «նաֆթոլ» և «դիմեթիլ» բառերի առաջին վանկերով, իսկ դիմեթիլպարաֆենիլենդիամին և α-նաֆթոլ պարունակող ռեակտիվը՝ ՆԱԴԻ ռեակտիվ:

Ցիտոքրոմօքսիդազի բացահայտումը կիրառվում է կենդանի հյուսվածքներում, արյան բջիջների քսուկներում ցիանիդներով, սուլֆիդներով և ցիտոքրոմօքսիդազի հեմի երկաթի հետ փոխազդող այլ միացություններով թունավորման հետևանքով առաջացած շնչառական շղթայի խանգարումների ախտորոշման նպատակով:

Նյութեր և ռեակտիվներ: Սկանային հյուսվածք (աշխ. 2.26), դիմեթիլպարաֆենիլենդիամինի ($C_8H_{12}N_2$) 1% ջրային լուծույթ, $C_8H_{12}N_2$-ի 1% սպիրտային լուծույթ, Na_2CO_3-ի 1.5% լուծույթ, α-նաֆթոլի ($C_{10}H_8O$) 1.5% լուծույթ, NaCl-ի 0.9% լուծույթ, ՆԱԴԻ ռեակտիվ. 1 մլ $C_8H_{12}N_2$-ի ջրային լուծույթին ավելացնել 1 մլ $C_8H_{12}N_2$-ի սպիրտային լուծույթ, խառնուրդին ավելացնել 1 մլ Na_2CO_3-ի և 1 մլ $C_{10}H_8O$-ի լուծույթներ (ռեակտիվը պատրաստել փորձից 1 ժամ առաջ, ռեակտիվը մուգ շագանակագույն է):

Պարագաներ: Փորձանոթներ, կաթոցիչներ, հավանգ, ձագար, թղթյա ֆիլտր, ջրային բաղնիք:

Աշխատանքի ընթացքը.

1 գ մկանային հյուսվածքը տրորել 5.0 մլ NaCl-ում: Ստացված զանգվածի մի մասը տեղավոխել փորձանոթի մեջ և եռացնել ջրային բաղնիքում 25 րոպե: Փորձանոթի պարունակությունը զտել թղթյա ֆիլտրով: Բնավոխված մկանային սպիտակուցներով ֆիլտրի վրա լցնել 3 կաթիլ ՆԱԴԻ ռեակտիվ, քանի որ ֆերմենտն ապաակտիվացված է, գունավորում չի նկատվում: Զուգահեռ զտել լուծույթի մյուս մասը: Չբնավոխված ֆերմենտով ֆիլտրի վրա լցնել 3 կաթիլ ՆԱԴԻ ռեակտիվ, հետևել ֆիլտրի թղթի վրա գույնի առաջացմանը (կապտամանուշակագույն):

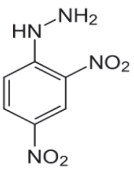
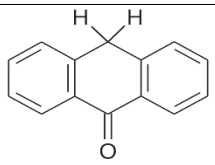
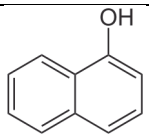
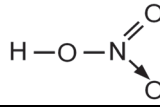
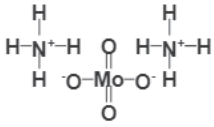
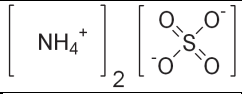
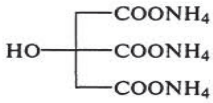
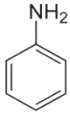
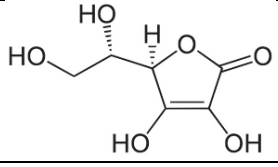
Հարցեր

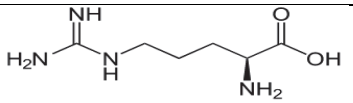
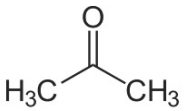
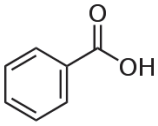
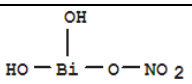
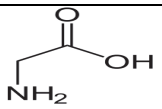
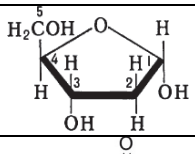
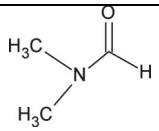
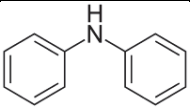
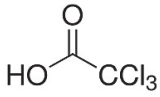
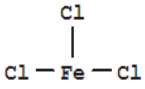
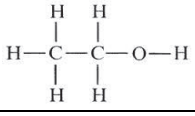
1. Ո՞րն է α - ամիլազի ակտիվության որոշման սկզբունքը:
2. Ինչպե՞ս բացահայտել օսլայի ճեղքման արգասիքները:
3. Միջավայրի ո՞ր գործոններն են թելադրում ֆերմենտի ակտիվության լիարժեք դրսևորումը:
4. Ինչպե՞ս բացահայտել ֆերմենտի ազդեցության յուրահատկությունները:
5. Ինչպե՞ս բացահայտել α - ամիլազի խթանիչի, արգելակիչի ազդեցությունը:
6. Ո՞ր պայմաններում է օսլայի ճեղքումն ընթանում ավելի ակտիվ:
7. Ո՞րն է արյան շիճուկի ամիլազի ակտիվության որոշման սկզբունքը:
8. Միջավայրի ո՞ր գործոնների շնորհիվ կարելի է տարբերակել α և β-ամիլազները:
9. Ինչպե՞ս որոշել ֆերմենտային ակտիվության նպաստավոր պայմանները:
10. Ի՞նչ պայմաններում է ապաակտիվանում β - ամիլազը:
11. Ո՞րն է պեպսինի ակտիվության որոշման սկզբունքը:
12. Ո՞րն է պրոտեոլիտիկ ֆերմենտների ակտիվացման ուղին:
13. Ինչպե՞ս գնահատել պեպսինի ակտիվությունը:
14. Ինչպե՞ս տարանջատել ամիլազները բուսական օբյեկտում:
15. Միջավայրի pH-ի ո՞ր արժեքների դեպքում է α-ամիլազն առավել ակտիվ:
16. Ո՞րն է բուսական օբյեկտից β-ամիլազի անջատման սկզբունքը:
17. Ինչպե՞ս հաստատել սախարազի ելանյութային յուրահատկությունը:
18. Ինչպե՞ս որոշել օսլայի լիարժեք հիդրոլիզն իրականացնող ամիլազի առավելագույն նոսրացումը:
19. Ո՞րն է լիպազի ակտիվության որոշման մեթոդի սկզբունքը:
20. Ի՞նչ ախտաբանական նշանակություն ունի ենթաստամոքսային գեղձի լիպազի ակտիվության որոշումը:
21. Ո՞րն է հիմնային ֆոսֆատազի որոշման սկզբունքը:
22. Որո՞նք են տրիպսինի ակտիվության դրսևորման նպաստավոր պայմանները:
23. Ո՞րն է լիզոցիմների ակտիվության որոշման մեթոդի առանձնահատկությունը:
24. Ո՞ր դեպքերում են որոշում ցիտոքրոմօքսիդազի առկայությունը:
25. Ինչպե՞ս բացահայտել ֆերմենտի առկայությունը կենսաբանական նյութում:
26. Արդյո՞ք ցիտոքրոմները համարվում են հեմոպրոտեիններ:

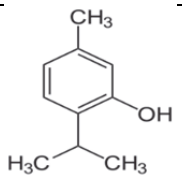
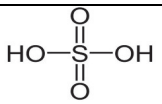
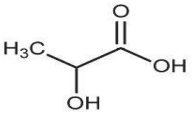
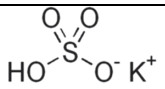
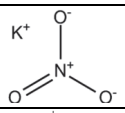
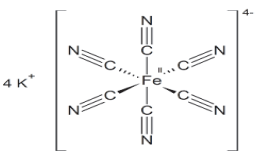
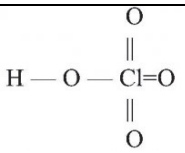
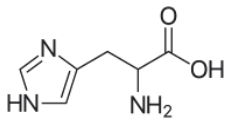
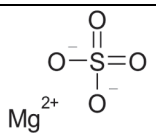
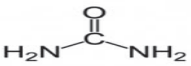
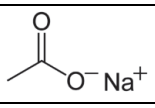
27. Ո՞րն է լիպազի, պեպսինի, ամիլազի ազդեցության յուրահատկությունը:
28. Որտե՞ղ են տեղակայված Կրեբսի ցիկլի ֆերմենտները:
29. Արդյո՞ք լիպազի ակտիվությունը խթանվում է լեղու առկայությամբ:
30. Ինչպե՞ս բացահայտել պեպսինի ազդեցության յուրահատկությունը:
31. Հնարավո՞ր է անջատել ֆերմենտներն աղայնացման եղանակով:
32. Հայտնի՞ են ստերեոյուրահատկությամբ օժտված ֆերմենտներ:
33. Ֆերմենտի արգելակումը մի՞շտ է անդարձելի:
34. Ո՞ր կապերն է օսլայում ճեղքում ամիլազը:
35. Ո՞ր կապերն է ճեղքում լիպազը:
36. Լիպազները կարո՞ղ են ճեղքել պեպտիդային կապերը:
37. Հնարավո՞ր է ֆերմենտային ակտիվության դրսևորում առանց ֆերմենտելանյութային համալիրի առաջացման:
38. Հնարավո՞ր է ֆերմենտի ակտիվության պահպանումը բնավոխումից հետո:
39. Ո՞ր ֆերմենտներն են մասնակցում ածխաջրերի մարսողությանը:

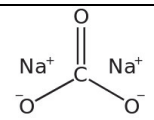
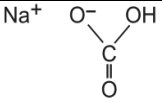
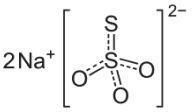
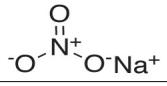
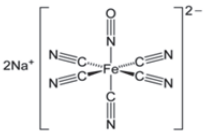
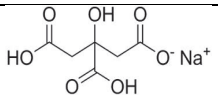
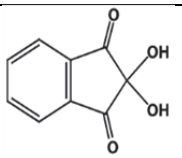
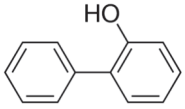
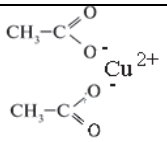
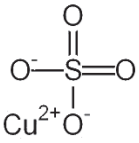
Հավելված 1

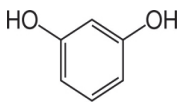
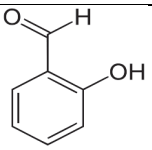
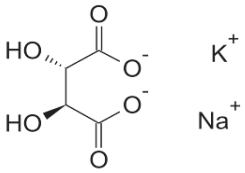
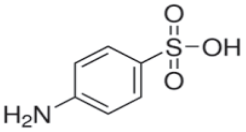
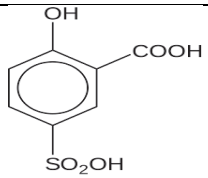
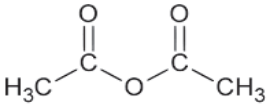
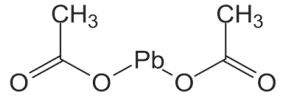
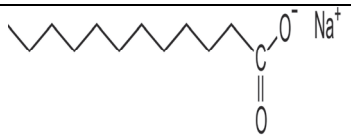
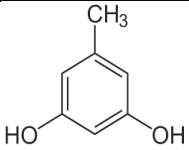
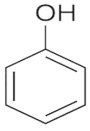
ՔԻՄԻԱԿԱՆ ՆՅՈՒԹԵՐ ԵՎ ՌԵԱԿՏԻՎՆԵՐ

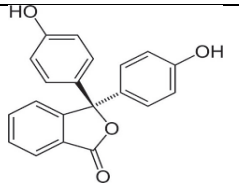
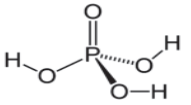
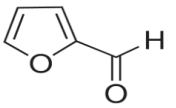
Միացության անվանում	**Միացության բանաձև**	**Միացության կառուցվածքային բանաձև**
2,4-դինիտրո-ֆենիլհիդրազին	$C_6H_6N_4O_4$	
Անտրոն	$C_6H_4(CO)(CH_2)C_6H_4$	
α-նաֆթոլ	$C_{10}H_7OH$	
Ազոտական թթու	HNO_3	
Աղաթթու	HCl	H-Cl
Ամոնիումի մոլիբդատ	$(NH_4)_2MoO_4$	
Ամոնիումի սուլֆատ	$(NH_4)_2SO_4$	
Ամոնիումի ցիտրատ	$C_3H_5O(COONH_4)_3$	
Անիլին	$C_6H_5NH_2$	
Ասկորբինաթթու	$C_6H_8O_6$	

Արգինին	$C_6H_{14}N_4O_2$	
Ացետոն	CH_3COCH_3	
Բարիումի քլորիդ	$BaCl_2$	$[Cl]^- [Ba]^{2+} [Cl]^-$
Բենզոյաթթու	C_6H_5COOH	
Բիսմուտի հիմնային աղ	$(Bi(OH)_2(NO_3)$	
Գլիցին	NH_2-CH_2-COOH	
Դեզօքսիռիբոզ	$C_5H_{10}O_4$	
Դիմեթիլֆորմամիդ	$[CH_3]_2$ NCOH	
Դիֆենիլամինի	$C_6H_5NHC_6H_5$	
Եռքլորքացախաթթու	$CC1_3COOH$	
Երկաթի քլորիդ	$FeCl_3$	
Էթանոլ	C_2H_5OH	

Թիմոլ	$C_{10}H_{14}O$ $C_6H_3CH_3(OH(C_3H_7))$	
Ծծմբական թթու	H_2SO_4,	
Կադմիումի քլորիդ	$CdCl_2$-ի	$[Cl]^-[Cd]^{2+}[Cl]^-$
Կաթնաթթու	$CH_3CH(OH)COOH$	
Կալիումի հիդրոսուլֆատ	$KHSO_4$	
Կալիումի նիտրատ	KNO_3	
Կալիումի քլորիդ	KCl	$[K]^+[Cl]^-$
Կալիումի ֆերիցիանիդ	$K_3[Fe(CN)_6]$	
Հիպերքլորական թթու	$HClO_4$	
Հիստիդին	$C_6H_9N_3O_2$	
Մագնեզիումի սուլֆատ	$MgSO_4$	
Միզանյութ	NH_2CONH_2	
Նատրիումի ացետատ	CH_3COONa	

Նատրիումի կարբոնատ	Na_2CO_3	
Նատրիումի հիդրոկարբոնատ	$NaHCO_3$	
Նատրիումի հիպոբրոմիտ	NaBrO	Na-O-Br
Նատրիումի հիպոսուլֆիտ	$Na_2S_2O_3$	
Նատրիումի նիտրատ	$NaNO_3$	
Նատրիումի նիտրոպրուսիդ	$Na_2[Fe(CN)_5NO]$	
Նատրիումի ցիտրատ	$Na_3C_6H_5O_7$	
Նատրիումի քլորիդ	NaCl	$[Na]^+[Cl]^-$
Նինհիդրին	$C_9H_6O_4$	
Պարաօքսիդիֆենիլ	$C_6H_5C_6H_4OH$	
Պղնձի ացետատ	$(CH_3COO)_2Cu$	
Պղնձի սուլֆատ	$CuSO_4$	

Ռեզորցին	$C_6H_4(OH)_2$	
Սալիցիլաթթու	$C_6H_4(OH)COOH$	
Սեգնետյան աղ՝ տարտրատ	$KNa(C_4H_4O_6)$	
Սուլֆանիլաթթու	$C_6H_7NO_3S$	
Սուլֆասալիցիլաթթու	$C_6H_3(OH)(COOH)SO_3H$	
Քացախաթթվային անհիդրիդ	$(CH_3CO)_2O$	
Քացախաթթվային կապար	$(CH_3COO)_2Pb$	
Օճառ	$C_{17}H_{35}COONa$	
Օրցին	$CH_3C_6H_3(OH)_2$	
Ֆենոլ	C_6H_5OH	

Ֆենոլֆտալեին	$C_{20}H_{14}O_4$	
Ֆոսֆորական թթու	H_3PO_4	
Ֆուրֆուրոլ	$C_5H_4O_2$	

Լուծույթների պատրաստում

Ֆելինգի ռեակտիվ (հեղուկ) – 1-ին լուծույթ – 3.46 գ պղնձարջասպը ($CuSO_4 \times 5H_2O$) լուծել 50 մլ թորած ջրում, 2-րդ լուծույթ – 17.3 գ $KNa(C_4H_4O_6)$-ը լուծել 20-25 մլ թորած ջրում, ավելացնել 10 մլ NaOH (5 գ NaOH 10 մլ ջրում), ծավալը հասցնել 50 մլ: Աշխատանքից առաջ 1-ին և 2-րդ լուծույթները միացնել հավասար ծավալներով:

Օրցինի ռեակտիվ – 10 մգ $FeCl_3 \times 6H_2O$ լուծել 50 մլ HCl-ում, լաբորատոր աշխատանքից առաջ այդ լուծույթի անհրաժեշտ քանակին ավելացնել օրցին ($CH_3C_6H_3(OH)_2$) 4.76 մգ/մլ հարաբերությամբ կամ 0.1 գ $CH_3C_6H_3(OH)_2$ լուծել 50 մլ 30% HCl -ում, ավելացնել 0.5 մլ 10% $FeCl_3$:

Լյուգոլի ռեակտիվ – 20 մգ կալիումի յոդիդը (KJ) լուծել 0.2 մլ թորած ջրում, ավելացնել 10 մգ բյուրեղային յոդ (J_2 լուծել), ծավալը հասցնել 9 մլ, պահել մուգ անոթում:

Յոդի (J_2) 0.1 Ն լուծույթ – 0.63 գ բյուրեղային J_2 և 1-1.2 գ KJ լուծել 3 մլ թորած H_2O-ում: Յոդը լուծելուց հետո լուծույթի ծավալը հասցնել 50 մլ: Բյուրեղային յոդը դժվար է լուծվում ջրում, լուծվում է KJ-ի ներկայությամբ՝ կալիումի եռյոդիդի առաջացման արդյունքում.

$$KJ + J_2 \Leftrightarrow K[J_3]$$

Կադմիումի ռեակտիվ – 1.3 գ $CdSO_4$ և 6.35 մլ 1 Ն H_2SO_4-ը լուծել100 մլ ջրում:

Ֆոսֆատաղային բուֆերային խառնուրդ (ՖԲԽ) – pH=7.4 - 80 մլ թորած ջրում լուծել 800 մգ NaCl, 20 մգ KCl, 142 մգ Na_2HPO_4 , 24 մգ KH_2PO_4: Բուֆերի pH-ը HCl-ով հասցնել 7.4-ի: Լուծույթի ծավալը հասցնել 100 մլ:

Պիրոխաղողաթթվի լուծույթ – 50 մգ պիրոխաղողաթթուն կամ 62.5 մգ պիրոխաղողաթթվի նատրիումական աղը լուծել 100 մլ թորած ջրում: 1 մլ լուծույթը պարունակում է 0.5 մգ պիրոխաղողաթթու:

2,4-դիֆենիլհիդրազին, 0.1% լուծույթ – 20 մլ խիտ աղաթթվի ծավալը թորած ջրով հասցնել 100 մլ (2 Ն HCl): Էրլենմեյերի անոթի մեջ տեղափոխել 100 մգ 2,4-դիֆենիլհիդրազին, ավելացնել 100 մլ 2 Ն HCl (աստիճանաբար) մինչև լիարժեք լուծվելը: Լուծույթը զտել, պահել սառնարանում:

NaCl, հագեցած լուծույթ – 30 գ NaCl լուծել 100 մլ թորած ջրում և նստեցնել NaOH-ի 10 % լուծույթով:

Հավելված 2

Լուծույթի խտության որոշման լուսաէլեկտրագունաչափական մեթոդի սկզբունքը

Գունավորված լուծույթի խտության որոշման լուսաէլեկտրագունաչափական մեթոդի սկզբունքը կարելի է ներկայացնել հետևյալ սխեմայով՝

հետազոտվող նյութի խտություն

↓

լույսի կլանումը գունավորված լուծույթով

↓

գունավորված լուծույթով անցած և ֆոտոէլեմենտին վոխանցված լույսի հոսքի ուժգնություն

↓

լուծույթի օպտիկական խտության արժեք

Քիմիական միացություններն ունակ են կլանել որոշակի երկարության ալիքների էներգիան: Իմանալով հետազոտվող նյութի կլանման առավելագույն արժեքը՝ կարելի է ընտրել այնպիսի լուսաֆիլտր, որի միջով կանցնեն միայն գունավորված նյութով կլանվող ճառագայթները:

Լուսաֆիլտրի ընտրության նպատակով օգտվել հետևյալ աղյուսակից:

Համապատասխան լուսաֆիլտրի գույն	Լուծույթով ճառագայթների առավելագույն կլանման տիրույթ, նմ	Հետազոտվող նյութի գունավորում
Մանուշակագույն	400 – 435	Դեղնականաչ
Կապույտ	435 – 480	Դեղին
Կապտականաչ	480 – 490	Նարնջագույն
Կապտականաչ	490 – 500	Կարմիր
Կանաչ	500 – 560	Վառ կարմիր
Դեղնականաչ	560 – 580	Մանուշակագույն
Դեղին	580 – 595	Կապույտ
Նարնջագույն	595 – 625	Կապտականաչ
Կարմիր	625 – 730	Կապտականաչ

ԲՈՒՖԵՐԱՅԻՆ ԽԱՌՆՈՒՐԴՆԵՐԻ ՊԱՏՐԱՍՏՈՒՄ

Ֆոսֆատ- լիմոնաթթվային բուֆեր, pH 2.2 – 8.0

(Այս բուֆերը չի կարող օգտագործվել, եթե լուծույթում առկա են կալցիումի կամ մագնեզիումի իոններ:)

(Na_2HPO_4 $2H_2O$, մոլ. զանգ =178.05; լիմոնաթթու·H_2O, մոլ. զանգ=210.14)

pH	Na_2HPO_4, 0.2 Մ, մլ	Լիմոնաթթու 0.1 Մ, մլ	pH	Na_2HPO_4, 0.2 Մ, մլ	Լիմոնաթթու 0.1 Մ, մլ
2.2	0.40	19.60	5.2	10.72	9.28
2.4	1.24	18.76	5.4	11.15	8.85
2.6	2.18	17.82	5.6	11.60	8.40
2.8	3.17	16.83	5.8	12.09	7.91
3.0	4.11	15.89	6.0	12.63	7.37
3.2	4.94	15.06	6.2	13.22	6.78
3.4	5.70	14.30	6.4	13.85	6.15
3.6	6.44	13.56	6.6	14.55	5.45
3.8	7.10	12.90	6.8	15.45	4.55
4.0	7.71	12.29	7.0	16.47	3.53
4.2	8.28	11.72	7.2	17.39	2.61
4.4	8.82	11.18	7.4	18.17	1.83
4.6	9.35	10.65	7.6	18.73	1.27
4.8	9.86	10.14	7.8	19.15	0.85
5.0	10.30	9.70	8.0	19.45	0.55

Ացետատային բուֆեր (0.2 Մ), pH 3.6 – 5.8

(Na-ացետատ **x** $3H_2O$, մոլ. զանգ. = 136.09)

pH	Na-ացետատ 0.2 Մ, մլ	CH_3COOH 0.2 Մ, մլ	pH	Na-ացետատ 0.2 Մ, մլ	CH_3COOH 0.2 Մ, մլ
3.6	0.75	9.25	4.8	5.90	4.10
3.8	1.20	8.80	5.0	7.00	3.00
4.0	1.80	8.20	5.2	7.90	2.10
4.2	2.65	7.35	5.4	8.60	1.40
4.4	3.70	6.30	5.6	9.10	0.90
4.6	4.90	5.10	5.8	9.40	0.60

Na_2HPO_4-NaH_2PO_4 (Na-ֆոսֆատային բուֆեր) (0.1 Մ), pH 5.8 – 8.0

(Na_2HPO_4 x $2H_2O$, մոլ. զանգ. = 178.05; Na_2HPO_4 x $12H_2O$, մոլ. զանգ. = 358.22; NaH_2PO_4 x H_2O, մոլ. զանգ. = 138.0;

pH	Na_2HPO_4 0.2 Մ, մլ	NaH_2PO_4 0.2 Մ, մլ	pH	Na_2HPO_4 0.2, մլ	NaH_2PO_4 0.2 Մ, մլ
5.8	8.0	92.0	7.0	61.0	39.0
6.0	12.3	87.7	7.2	72.0	28.0
6.2	18.5	81.5	7.4	81.0	19.0
6.4	26.5	73,5	7.6	87.0	13.0
6.6	37.5	62.5	7.8	91.5	8.5
6.8	49.0	51.0	8.0	94.7	5.3

Ծավալը թորած ջրով հասցնել մինչև 200 մլ:

K- ֆոսֆատային բուֆեր (0.05 Մ), pH 5.8 – 8.0

(KH_2PO_4,. մոլ. զանգ. = 136.09)

pH	KH_2PO_4 0.2 Մ, մլ	KOH 0.2Մ, մլ	pH	KH_2PO_4 0.2 Մ, մլ	KOH 0.2 Մ, մլ
5.8	5	0.36	7.0	5	2.91
6.0	5	0.56	7.2	5	3.47
6.2	5	0.81	7.4	5	3.91
6.4	5	1.16	7.6	5	4.24
6.6	5	1.64	7.8	5	4.45
6.8	5	2.24	8.0	5	4.61

Ծավալը թորած ջրով հասցնել մինչև 20 մլ:

“Տրիս”-HCl բուֆեր (0.05 Մ), pH 7.2 – 9.1

(Տրիս-(օքսիմեթիլ)-ամինոմեթան, մոլ. զանգ. = 121,14)

pH		Տրիս	HCl
23°C	**37°C**	**0.2 Մ, մլ**	**0.2 Մ, մլ**
9.1	8.95	25	5.0
8.92	8.78	25	7.5
8.74	8.60	25	10.0
8.62	8.48	25	12.5
8.5	8.37	25	15.0
8.4	8.27	25	17.5
8.32	8.18	25	20.0
8.23	8.10	25	22.5
8.14	8.00	25	25.0
8.05	7.90	25	27.5
7.96	7.82	25	30.0
7.87	7.73	25	32.5
7.77	7.63	25	35.0
7.66	7.52	25	37.5
7.54	7.40	25	40.0
7.36	7.22	25	42.5
7.20	7.05	25	45.0

Ծավալը թորած ջրով հասցնել մինչև 100 մլ:

Գլիցինային բուֆեր (0.05 Մ), pH 8.6 – 10.6

(Գլիցին, մոլ. զանգ. = 75,07)

pH	Գլիցին 0.2 Մ, մլ	NaOH 0.2 Մ, մլ
8.6	50	4.0
8.8	50	6.0
9.0	50	8.8
9.2	50	12.0
9.4	50	16.8
9.6	50	22.4
9.8	50	27.2
10.0	50	32.0
10.4	50	38.6
10.6	50	45.5

Ծավալը թորած ջրով հասցնել մինչև 200 մլ:

Քիկարբոնատային բուֆեր (0.1 Մ); pH 9.2 – 10.8

(Այս բուֆերը չի կարող օգտագործվել, եթե լուծույթում առկա են կալցիումի կամ մագնեզիումի իոններ:)

(Na_2CO_3 x $10H_2O$, մոլ. զանգ. = 286.2; $NaHCO_3$, մոլ. զանգ. = 84)

pH		**Na_2CO_3**	**$NaHCO_3$**
20°C	**37°C**	**0.1 Մ, մլ**	**0.1 Մ, մլ**
9.16	8.77	1	9
9.40	9.12	2	8
9.51	9.40	3	7
9.78	9.50	4	6
9.90	9.72	5	5
10.14	9.90	6	4
10.28	10.08	7	3
10.53	10.28	8	2
10.83	10.57	9	1

Հավելված 4

Ազոտական թթվի լուծույթների հարաբերական խտություններ և մոլային կոնցենտրացիաներ

Հարաբե-րական խտություն	**Մոլային կոնցեն տրացիա**	**Պարունա-կություն (գ) 100 գ-ում**	**Հարաբե-րական խտություն**	**Մոլային կոնցեն տրացիա**	**Պարունա-կություն (գ) 100 գ-ում**
1.100	2.985	17.10	1.440	17.06	74.68
1.200	6.159	32.34	1.460	18.53	79.98
1.300	9.795	47.48	1.480	20.21	86.05
1.340	11.49	54.07	1.500	22.39	94.09
1.360	12.42	57.57	1.510	23.50	98.10
1.380	13.42	61.27	1.520	24.04	99.67

Ծծմբական թթվի լուծույթների հարաբերական խտություններ և նորմալություն

Հարա-բերական խտու-թյուն	**Նորմալու-թյուն**	**Պարունա-կություն (գ) 100 գ-ում**	**Հարաբե-րական խտություն**	**Նորմալու-թյուն**	**Պարունա-կություն (գ) 100 գ-ում**
1.100	3.219	14.35	1.8400	35.87	95.60
1.200	6.685	27.32	1.8405	35.99	95.95
1.300	10.39	39.19	1.8410	36.17	96.38
1.400	14.31	50.11	1.8415	36.54	97.35
1.500	18.26	59.70	1.8410	36.87	98.20
1.600	22.41	68.70	1.8405	36.99	98.52
1.700	26.75	77.27	1.8400	37.03	98.72
1.800	31.89	86.92	1.8395	37.05	98.77
1.810	32.59	88.30	1.8390	37.18	99.12
1.820	33.42	90.05	1.8385	37.23	99.31
1.830	34.39	92.10	1.8370	37.66	100.00

Աղաթթվի լուծույթների հարաբերական խտությունները և մոլային կոնցենտրացիաները

Հարաբե-րական խտություն	Մոլային կոնցեն տրացիա	Պարունա-կություն (գ) 100 գ-ում	Հարաբե-րական խտություն	Մոլային կոնցեն տրացիա	Պարունա-կություն (գ) 100 գ-ում
1.100	6.037	20.01	1.160	10.03	31.52
1.110	6.673	21.92	1.170	10.74	33.46
1.120	7.317	23.82	1.180	11.45	35.38
1.130	7.981	25.75	1.190	12.15	37.23
1.140	8.648	27.66	1.200	12.87	39.11
1.150	9.327	29.57			

Ամոնիակի լուծույթների հարաբերական խտությունները և մոլային կոնցենտրացիաները

Հարաբե-րական խտություն	Մոլային կոնցեն տրացիա	Պարունա-կություն (գ) 100 գ-ում	Հարաբե-րական խտություն	Մոլային կոնցեն տրացիա	Պարունա-կություն (գ) 100 գ-ում
0.960	5.58	9.91	0.910	13.35	24.99
0.950	7.10	12.74	0.900	14.97	28.33
0.940	8.63	15.63	0.890	16.59	31.75
0.930	10.18	18.64	0.882	18.10	34.95
0.920	11.75	21.75			

Խիտ թթուների և ամոնիակի լուծույթների հարաբերական խտությունները և մոլային կոնցենտրացիաները

Ռեակտիվ	Հարաբերական խտություն (գ/մլ)	Պարունակություն (գ) 100 գ-ում	Մոլային կոն-ցենտրացիա (մոլ/լ)
Աղաթթու	1.18	35.4	11.3
Ազոտական թթու	1.40	65.6	14.5
Ծծմբական թթու	1.84	95.3	18.0
Պերքլորական թթու	1.15	70.0	11.6
Ֆոսֆորական թթու	1.69	85.0	14.7
Քացախաթթու	1.05	99.5	17.4
	1.07	80.0	14.3
Ամոնիակի լուծույթ	0.90	15.0	28.3

Գրականություն

1. Աղաջանյան Ա. Խ., Դավթյան Մ. Ա., Սեմերջյան Հ. Հ., Բարսեղյան Է. Խ., Կարապետյան Ս. Ա., Խաչատրյան Մ. Հ., Գաբրիելյան Գ. Ա., Կենսաքիմիայի պրակտիկում, Երևան, ԵՊՀ հրատ., 2002, 97 էջ:
2. Կարապետյան Հ. Մ., Բարսեղյան Է. Խ., Էնզիմոլոգիայի ուսումնամեթոդական ձեռնարկ: Երևան, ԵՊՀ հրատ., 2016, 142 էջ:
3. Հայրապետյան Ն. Կ., Դավթյան Մ. Ա., Կենսաքիմիայի լաբորատոր աշխատանքներ, Երևան, ԵՊՀ հրատ., 2015, 56 էջ:
4. Андреева Л. В., Марьяновская Ю. В., Севостьянова Н. Н., Биологическая химия. Индивидуальный практикум, Великий Новгород, НовГУ, 2014, 35 с.
5. Березовская В. А., Биохимия, Лаб. практикум для студентов напр. «Технология продуктов питания», Петропавловск-Камчатский, Изд. Камчат ГТУ, 2005, 84 с.
6. Бокуть С. Б., Сяхович В. Э., Практикум по общей и экологической биохимии, Минск, МГЭУ, 2004, 89 с.
7. Вистовская В. П., Иркитова И. Д. и др., Практикум по биохимии, Барнаул, Изд. АлтГУ, 2013, 202 с.
8. Вовчук И. Л. и др., Методические указания: Методы определения активности трансфераз и гидролаз, Одесса, 2011, 69 с.
9. Губич О. И., Мохорева С. И., Биоэнергетика Минск, БГУ, 2010, 40 с.
10. Заводник Л. Б., Будько Т. Н. и др., Практикум для лаб. работ по «Общей биохимии», Часть 2, Гродно, УО ГГАУ, 2012, 42 с.
11. Семак И. В., Зырянова Т. Н., Губич О. Н. ,Биохимия белков, Минск, БГУ, 2007, 49 с.
12. Сенчук В. В., Мохорева С. И., Орел Н. М. и др., Биохимия. Лабораторный практикум, Минск, БГУ, 2004, 77 с.
13. Соколова Т. Н., Кузина О. В., Белов Д. В. и др., Лабораторный практикум по биохимии, Углеводы: метод. указания к лаб. работам, Н. Новгород, НГТУ, 2013, 36 с.
14. Таганович А. Д. и др., Дополнительное руководство к практическим занятиям по биол. химии, Минск, БГМУ, 2011, 49 с.
15. Титова Н. М., Савченко А. А., Замай Т. Н. и др., Биохимия и молекулярная биология. Лаб. практикум, Красноярск, ИПК СФУ, 2008, 346с.
16. Труфанова Л. В. и др., Биол. химия: сборник методич. указаний, Красноярск, КрасГМУ, 2013, 122 с.
17. Шапкарин В. В., Королев А. П., Гридина С. Б., Зинкевич Е. П., Биохимия. Сборник лабораторных работ, Кемерово, 2005, 83 с.

18. Шарапов В. И., Практикум к лабораторным занятиям по биохимии, Новосибирск, НГМУ, 2012, 40 с.
19. Шарлаева Е. А., Вистовская В. П., Биохимия. Малый практикум, Барнаул, 2015, 180 с.
20. Шлейкин А. Г., Скворцова Н. Н., Бландов А. Н., Биохимия. Лаб. практикум, Углеводы. Липиды, С.-Петербург, ИТМО, 2015, 64 с.
21. Шмелева В. Г., Методы определения активности ферментов. Методические указания, С.-Петербург, СПб, 1997, 42 с.
22. Шмелева В. Г., Выделение ферментов. Методические указания, С.-Петербург, СПбГТИ, 2004, 31 с.
23. Bankowski M., Galewska Z. et al., Biochemistry workbook, Bialystok, MUB, 2013, 130 p.
24. Boyer R., Biochemistry laboratory: modern theory and technigues, New Jersey, 2012, 362 p.
25. Welsh D., Biochemistry laboratory manual, Peru, PSC, 2013.

ԲՈՎԱՆԴԱԿՈՒԹՅՈՒՆ

ՆԵՐԱԾՈՒԹՅՈՒՆ 3
ԱՆՎՏԱՆԳՈՒԹՅԱՆ ՏԵԽՆԻԿԱՅԻ ԿԱՆՈՆՆԵՐԸ ԿԵՆՍԱՔԻՄԻԱՅԻ ԼԱԲՈՐԱՏՈՐԻԱՅՈՒՄ 5
Կենսաքիմիայի լաբորատորիայում աշխատելու առանձնահատկությունները 5
Անվտանգության կանոնների ընդհանուր պահանջները 5
Անվտանգության կանոնների պահպանումը թթուների և հիմքերի հետ աշխատելու ընթացքում 6
Անվտանգության կանոնների պահպանումը քիմիական ապակեղենի հետ աշխատելու ժամանակ 6
Անվտանգության կանոնների պահպանումը էլեկտրասարքերի, սարքավորումների հետ աշխատելու ժամանակ 7
Անվտանգության կանոնների պահպանումը ռեակտիվների հետ աշխատելու ժամանակ 7
Առաջին օգնության միջոցառումները 8
ԳԼՈՒԽ 1. ՍՊԻՏԱԿՈՒՑՆԵՐ 9
ՍՊԻՏԱԿՈՒՑՆԵՐԻ ՖԻԶԻԿԱՔԻՄԻԱԿԱՆ ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ 10
ՍՊԻՏԱԿՈՒՑԱՅԻՆ ՄՈԼԵԿՈՒԼՆԵՐԻ ԿԱՌՈՒՑՎԱԾՔԱՅԻՆ ՄԱԿԱՐԴԱԿՆԵՐԸ 11
ՍՊԻՏԱԿՈՒՑՆԵՐԻ ԵՎ ՈՐՈՇ ԱՄԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻ ՀԱՅՏՆԱԲԵՐՄԱՆ ՌԵԱԿՑԻԱՆԵՐԸ 16
Աշխատանք 1.1. Բիուրետի ռեակցիա 16
Աշխատանք 1.2. Նինհիդրինային ռեակցիա 19
Աշխատանք 1.3. Քսանտոպրոտեինային ռեակցիա 20
Աշխատանք 1.4 Ադամկևիչի ռեակցիա 22
Աշխատանք 1.5. Վաուզենի ռեակցիա 23
Աշխատանք 1.6. Շուլցե-Ռասպայլի ռեակցիա 24
Աշխատանք 1.7. Պաուլի ռեակցիա 25
Աշխատանք 1.8. Սակագուչիի ռեակցիա 27
Աշխատանք 1.9. Ֆոլի ռեակցիա 28
ՍՊԻՏԱԿՈՒՑՆԵՐԻ ՖԻԶԻԿԱՔԻՄԻԱԿԱՆ ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ՍՊԻՏԱԿՈՒՑՆԵՐԻ ՆՍՏԵՑՄԱՆ ՌԵԱԿՑԻԱՆԵՐԸ 30
Աշխատանք 1.10. Սպիտակուցի նստեցումը տաքացման պայմաններում 31
Աշխատանք 1.11 Սպիտակուցների նստեցումը տարբեր միացություններով 33
Սպիտակուցի նստեցումն օրգանական լուծիչներով 33
Սպիտակուցների նստեցումը խիտ հանքային թթուներով 34
Սպիտակուցի նստեցումն օրգանական թթուներով 34
Սպիտակուցների նստեցումը ծանր մետաղների աղերով 35
Աշխատանք 1.12. Սպիտակուցների լուծելիությունը 36
Ալբումինների և գլոբուլինների լուծելիությունը 36
Աշխատանք 1.13. Սպիտակուցների աղայնացում 37
Չվի սպիտակուցում պարունակվող ալբումինների և գլոբուլինների բաժանումը 37

Արյան պլազմի սպիտակուցների նստեցումն ամոնիումի սուլֆատով 39
Աշխատանք 1.14. Սպիտակուցի իզոէլեկտրական կետի որոշումը 40
ՍՊԻՏԱԿՈՒՑՆԵՐԻ ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ
ՕԲՅԵԿՏՆԵՐԻՑ 43
Աշխատանք 1.15. Պարզ սպիտակուցների անջատումը
բուսական օրգանիզմներից 43
Աշխատանք 1.16. Սպիտակուցների անջատումը մկանային հյուսվածքից 45
Աշխատանք 1.17. Ալբումինի անջատումը ձվի սպիտակուցից 46
ՍՊԻՏԱԿՈՒՑՆԵՐԻ ՀԻԴՐՈԼԻԶ 48
Աշխատանք 1.18. Պարզ սպիտակուցների բացահայտումը
թթվային հիդրոլիզի եղանակով 48
Աշխատանք 1.19. Սպիտակուցների թթվային հիդրոլիզ, ֆորմոլային տիտրում ... 49
ԲԱՐԴ ՍՊԻՏԱԿՈՒՑՆԵՐԻ ՀԱՅՏՆԱԲԵՐՈՒՄԸ 51
Աշխատանք 1.20. Քրոմոպրոտեինների հայտնաբերումը 51
Ազատ և կապված բիլիռուբինի բացահատումը 52
Աշխատանք 1.21. Ֆոսֆոպրոտեինների հայտնաբերումը 53
Աշխատանք 1.22. Նուկլեոպրոտեինների հիդրոլիզի արգասիքների
հայտնաբերումը 55
ՍՊԻՏԱԿՈՒՑԻ ՔԱՆԱԿԱԿԱՆ ՈՐՈՇՈՒՄԸ 58
Աշխատանք 1.23. Սպիտակուցի քանակական որոշումը Բիուրետի մեթոդով 58
Աշխատանք 1.24. Բրեդֆորդի մեթոդ 60
ԳԼՈՒԽ 2. ԱԾԽԱՋՐԵՐ 64
Մոնոսախարիդներ 65
Օլիգոսախարիդներ 67
Պոլիսախարիդներ 70
Կառուցվածքային հետերոպոլիսախարիդներ 75
ԱԾԽԱՋՐԵՐԸ ԲԱՑԱՀԱՅՏՈՂ ՈՐԱԿԱԿԱՆ ՌԵԱԿՑԻԱՆԵՐ 79
Աշխատանք 2.1. Թրոմերի ռեակցիա 80
Աշխատանք 2.2. Ֆելինգի ռեակցիա 82
Աշխատանք 2.3. Պոդոբեդով - Մոլիշի ռեակցիա 84
Աշխատանք 2.4. Բարֆեդի ռեակցիա 85
Աշխատանք 2.5. Նիլանդերի ռեակցիա 87
Աշխատանք 2.6. Ածխաջրերը բնորոշող ընդհանուր ռեակցիաներ 88
Աշխատանք 2.7. Պենտոզների բացահայտման ռեակցիա 90
Աշխատանք 2.8. Դեզօքսիպենտոզների բացահայտման ռեակցիա 91
Աշխատանք 2.9. Կետոզների բացահայտման ռեակցիա 92
Աշխատանք 2.10. Սախարոզի բացահայտման ռեակցիաներ 93
Աշխատանք 2.11. Լակտոզի բացահայտման ռեակցիաներ 93
ՊՈԼԻՍԱԽԱՐԻԴՆԵՐԻ ԲԱՑԱՀԱՅՏՄԱՆ ՌԵԱԿՑԻԱՆԵՐ 95
Աշխատանք 2.12. Ինուլինի հիդրոլիզ, ֆրուկտոզի հայտնաբերում 95
Աշխատանք 2.13. Օսլայի բացահայտման ռեակցիաներ 95
Աշխատանք 2.14. Դեքստրինների գունավորման ռեակցիաները 97
Աշխատանք 2.15. Օսլայի քանակական որոշումը 98
Աշխատանք 2.16. Գլիկոգենի բացահայտումը կենդանական հյուսվածքներում .. 99
Աշխատանք 2.17. Գլիկոգենի քանակական որոշումը կենդանական
հյուսվածքներում 100

Աշխատանք 2.18. Պեկտինային նյութերի բացահայտումը 102
Լուծվող պեկտինի անջատումը 102
Պրոտոպեկտինի անջատումը 103
Աշխատանք 2.19. Պեկտինային նյութերի քանակական որոշումը կալցիումի պեկտատով 104
ԳԼԻԿՈՊՐՈՏԵԻՆՆԵՐԻ ԱԾԽԱՋՐԱՅԻՆ ԲԱՂԱԴՐԻՉԻ ԲԱՑԱՀԱՅՏՈՒՄԸ 106
Աշխատանք 2.20. Ածխաջրերի բացահայտումը օվալբումինում 106
ԳԼՅՈՒԿՈԶԻ ՔԱՆԱԿԱԿԱՆ ՈՐՈՇՄԱՆ ԵՂԱՆԱԿՆԵՐԸ 108
Աշխատանք 2.21. Գլյուկոզի քանակական որոշումը Հագեդորն-Յենսենի մեթոդով 109
Աշխատանք 2.22. Գլյուկոզի քանակական որոշումը (ըստ Վոզնեսենսկու) 112
Աշխատանք 2.23. Ֆրուկտոզի քանակական որոշումը (ըստ Սելիվանովի) 113
Աշխատանք 2.24. Պենտոզների քանակական որոշումը (ըստ Մեյբաումի) 115
Աշխատանք 2.25. Լակտոզի քանակական որոշումը յոդաչափական եղանակով 116
ԱԾԽԱՋՐԵՐԻ ՓՈԽԱՆԱԿՈՒԹՅՈՒՆ
ԳԼԻԿՈԼԻԶԻ ԱՐԴՅՈՒՆԱՎԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳՆԱՀԱՏՈՒՄԸ 119
Աշխատանք 2.26. Մկանային լուծամզվածքի ստացումը 119
Աշխատանք 2.27. ԱԵՖ-ի մակարդակի ազդեցությունը գլիկոլիզի արագության վրա 120
Աշխատանք 2.28. ԱՄՖ-ի ազդեցությունը գլիկոլիզի արագության վրա 121
Աշխատանք 2.29. Լիմոնաթթվի ազդեցությունը գլիկոլիզի արագության վրա 122
Աշխատանք 2.30. Գլյուկոզի քանակական որոշումը գլյուկոզօքսիդազային եղանակով 123
Աշխատանք 2.31. Կաթնաթթվի քանակական որոշումը մկանային հյուսվածքում 125
Աշխատանք 2.32. ԱԵՖ-ի որոշումը կմախքային մկաններում 126
ԱԾԽԱՋՐԵՐԻ ՓՈԽԱՆԱԿՈՒԹՅԱՆ ՄԻՋԱՆԿՅԱԼ ԱՐԳԱՍԻՔՆԵՐԸ 129
Աշխատանք 2.33. Ֆոսֆոտրիոզների քանակական որոշումը 129
Աշխատանք 2.34. Կաթնաթթվի քանակական որոշումն ըստ Ուֆելմանի (I եղանակ) 131
Աշխատանք 2.35. Կաթնաթթվի քանակական որոշումը (II եղանակ) 132
Աշխատանք 2.36. Պիրոխաղողաթթվի քանակական որոշումն արյան շիճուկում 133
Աշխատանք 2.37. Պիրոխաղողաթթվի քանակական որոշումը կենդանական հյուսվածքներում (Ցոկ-Լամպրեխտի մեթոդ) 134
ԳԼՈՒԽ 3. ԼԻՊԻԴՆԵՐ 138
ԼԻՊԻԴՆԵՐԻ ԲԱՑԱՀԱՅՏՄԱՆ ՌԵԱԿՑԻԱՆԵՐ 148
Աշխատանք 3.1. Ճարպերի և լիպիդների ֆիզիկաքիմիական հատկությունները 148
Աշխատանք 3.2. Չհագեցած ճարպաթթուների հայտնաբերումը բուսական յուղերում 150
Չհագեցած ճարպերի բացահայտումը 151
Աշխատանք 3.3. Լեղաթթուների հայտնաբերման որակական ռեակցիա 151
Աշխատանք 3.4. Կետոնային մարմինների հայտնաբերումը 153
Աշխատանք 3.5. Ընդհանուր ֆոսֆոլիպիդների որոշումն արյան շիճուկում 154

Աշխատանք 3.6. Ֆոսֆատիդիլխոլինի (լեցիտինի) բացահայտումը 156
Լեցիտինների նստեցումը 157
Լեցիտինների հիդրոլիզ 158
Աշխատանք 3.7. Տերպենների բացահայտումը 159
Աշխատանք 3.8. Խոլեստերինի բացահայտման ռեակցիաները 161
ՃԱՐՊԵՐԻ ՔԱՆԱԿԱԿԱՆ ՈՐՈՇՄԱՆ ԵՂԱՆԱԿՆԵՐ 164
Աշխատանք 3.9. Խոլեստերոլի քանակական որոշումն արյան շիճուկում և կենդանական հյուսվածքներում 164
Խոլեստերոլի քանակական որոշումը կենդանական հյուսվածքներում 164
Խոլեստերոլի քանակական որոշումն արյան շիճուկում 165
Աշխատանք 3.10. Ցածր խտության լիպոպրոտեինների որոշումն արյան շիճուկում 167
ՃԱՐՊԵՐԻ ՔԱՆԱԿԱԿԱՆ ՑՈՒՑԱՆԻՇՆԵՐԻ ՈՐՈՇՈՒՄԸ 169
Աշխատանք 3.11. Թթվային թվի որոշումը 169
Աշխատանք 3.12. Յոդային թվի որոշումը 170
Աշխատանք 3.13. Գերօքսիդային թվի որոշումը 171
Աշխատանք 3.14. Օճառացման թվի և եթերային թվի որոշումը 172
ԳԼՈՒԽ 4. ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐ 175
Ֆերմենտների ակտիվության որոշումը 183
ԳԼԻԿՈՋԻԴԱԶՆԵՐԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՈՒՄԸ 184
Աշխատանք 4.1. Ֆերմենտների անջատումը բուսական օբյեկտներից
Ամիլազի ստացումը ցորենի ալյուրից 184
Ամիլազի ստացումը ածիկից 184
Սախարազի անջատումը խմորասնկերից 185
Աշխատանք 4.2. Ֆերմենտների և անօրգանական կատալիզատորների ազդեցության համեմատությունը 186
Աշխատանք 4.3. Սախարազի բացահայտումը և ակտիվության որոշումը 186
Աշխատանք 4.4. Սախարազի ազդեցության յուրահատկությունը 187
Աշխատանք 4.5. Ամիլազի և սախարազի ազդեցության յուրահատկությունը 188
ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ԿԱՐԳԱՎՈՐՄԱՆ ՈՒՂԻՆԵՐԸ 189
Աշխատանք 4.6. Ամիլազի ակտիվության բացահայտումը և կախվածությունը միջավայրի pH-ից 189
Աշխատանք 4.7. Ամիլազի ակտիվության կախվածությունը միջավայրի pH-ից (II եղանակ) 190
Աշխատանք 4.8. Ամիլազի ակտիվության կախվածությունը միջավայրի ջերմաստիճանից 191
Աշխատանք 4.9. Արգելակիչների և խթանիչների ազդեցությունը ամիլազի ակտիվության վրա 193
Աշխատանք 4.10. Ցորենի ալյուրի ամիլազի ակտիվության որոշումը (ըստ օսլայի հիդրոլիզի աստիճանի) 194
Աշխատանք 4.11. Ամիլազի ակտիվության քանակական որոշումը 196
Աշխատանք 4.12. α և β-ամիլազների ակտիվության որոշումը ցորենի ալյուրում 197
Աշխատանք 4.13. Ամիլազի ակտիվության որոշումն արյան շիճուկում (ըստ Կարավեի) 200
Աշխատանք 4.14. Լիզոցիմի ակտիվության որոշումը 202

ՊՐՈՏԵՈԼԻՏԻԿ ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՈՒՄԸ 204
Աշխատանք 4.15. Պեպսինի ազդեցության ուսումնասիրությունը 204
Աշխատանք 4.16. Պեպսինի ակտիվության որոշումը 206
Աշխատանք 4.17. Թթվային պրոտեազի՝ պեպսինի ակտիվության որոշումն արյան շիճուկում 207
Աշխատանք 4.18. Տրիպսինի պրոտեոլիտիկ ակտիվության որոշումը 209
Աշխատանք 4.19. Տրիպսինի ազդեցության դիտարկումը որոշակի ժամանակահատվածում 211
Աշխատանք 4.20. Տրիպսինի pH-ի նպաստավոր արժեքի որոշումը 211
Աշխատանք 4.21. Լիպազի ակտիվության որոշումը 212
Աշխատանք 4.22. Լիպազի ակտիվության որոշումը գերչակի (*Ricinus communis L.)* սերմերում 215
Աշխատանք 4.23. Հիմնային ֆոսֆատազի ակտիվության որոշումն արյան շիճուկում 216
Աշխատանք 4.24. Ցիտոքրոմօքսիդազի բացահայտումը 218

Հավելված 1 223
Հավելված 2 229
Հավելված 3 230
Հավելված 4 234

Գրականություն 236

ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

Ա. Հ. ԹՌՉՈՒՆՅԱՆ, Ն. Կ. ՀԱՅՐԱՊԵՏՅԱՆ,
Հ. Մ. ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ

ԸՆԴՀԱՆՈՒՐ ԿԵՆՍԱՔԻՄԻԱՅԻ ԼԱԲՈՐԱՏՈՐ ԱՇԽԱՏԱՆՔՆԵՐ

ՈՒՍՈՒՄՆԱՄԵԹՈԴԱԿԱՆ ՁԵՌՆԱՐԿ

Համակարգչային ձևավորումը՝ Կ. Չալաբյանի
Կազմի ձևավորումը՝ Ա. Պատվականյանի
Հրատ. խմբագրումը՝ Մ. Հովհաննիսյանի

Տպագրված է «Արման Ամանգույան» ԱՁ-ում:
ք. Երևան, Հր. Ներսիսյան 1/125

Ստորագրված է տպագրության՝ 25.12.2017:
Չափսը՝ 60x84 $^{1}/_{16}$: Տպ. մամուլը՝ 15.25:
Տպաքանակը՝ 100:

ԵՊՀ հրատարակչություն
ք. Երևան, 0025, Ալեք Մանուկյան 1
www.publishing.am

ՀՐԱՏԱՐԱԿՉՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆ 2017
publishing.ysu.am