

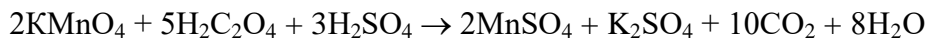
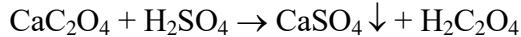
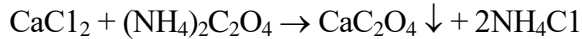
Лабораторна робота № 5

Тема: Хімічний аналіз рідин організму людини

I. Кількісне визначення кальцію в сироватці крові і в сечі

Дослід 1. Кількісне визначення кальцію в сироватці крові (за де Ваардом).

Принцип методу. Кальцій, що міститься у вигляді солей у сироватці крові, переводять в оксалат. При розчиненні останнього в сульфатній кислоті звільняється еквівалентна кількість щавлевої кислоти, яку відтитровують розчином перманганату калію:



Матеріальне забезпечення: сироватка крові, центрифуга, баня водяна, мікробюретка на 2 мл, піпетки з однією міткою на 1 мл (4 шт.), пробірки скляні центрифужні, колби конічні на 25 мл (2 шт.), 2% розчин амоніаку, оксалат амоніаку (насич.), 5% розчин сульфатної кислоти, 0,01 н. розчин перманганату калію.

Хід роботи. В одну пробірку для центрифугування вносять 1 мл негемолізованої сироватки крові, в іншу - 1 мл бідистильованої води (контроль). До обох пробірок доливають по 1 мл насиченого розчину оксалату амоніаку і залишають стояти на 1 годину. Після цього проби центрифугують при 3000 г протягом 10 хв. Зливають рідину, перекидаючи пробірку, або відсмоктують рідину скляним капіляром, кінчик якого трохи загнутий догори. Наливають у пробірки по 2 мл 2% розчину амоніаку, збовтують осад і знову центрифугують. Осад оксалату кальцію легко розчинний у мінеральних кислотах і нерозчинний в слаболужному середовищі. Тому надлишок оксалату амоніаку видаляють багаторазовим промиванням 2% розчином амоніаку (не менше 3 разів). Потім додають у кожен пробірку по 1 мл 5% розчину сульфатної кислоти. Осад перемішують скляною паличкою, домагаючись повного його розчинення. Кількісно переносять вміст пробірок у колби на 25 мл підігрітою 5% сульфатною кислотою, а гарячий розчин титрують з мікробюретки 0,01 н. розчином перманганату калію до появи слабо-рожевого забарвлення.

Вміст кальцію розраховують за формулою:

$$C = 0,2 \times (V_1 - V_2) \times 100 ,$$

де C - вміст кальцію, мг%; $0,2$ - маса кальцію (мг), що відповідає 1 мл 0,01 н. розчину KMnO_4 ; V_1 - об'єм (мл) 0,01 н. розчину KMnO_4 , витраченого на титрування дослідної проби; V_2 - об'єм (мл) 0,01 н. розчину KMnO_4 , витраченого на титрування контрольної проби.

У нормі вміст кальцію в сироватці крові людини становить від 9 до 11 мг%.

Пояснити отримані результати, зробити висновок, результати записати в робочий зошит.

Дослід 2. Кількісне визначення вмісту кальцію в сечі комплексометричним методом.

Принцип методу. Під час титрування трилоном Б (комплексон III, хелатон III, ЕДТА, етилендіамінтетраацетат) кальцій зв'язується в нову, більш стійку комплексну сполуку рожево-червоного кольору; у точці еквівалентності комплекс катіона з індикатором мурексидом (мурексид – амонієва сіль пурпурової кислоти, гідрат - $\text{C}_8\text{H}_8\text{N}_6\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$) як менш стійкий розпадається і розчин набуває іншого забарвлення — забарвлення вільного індикатора (синьо-фіолетове).

Матеріальне забезпечення: сеча, 0,01 М розчин трилону Б (3,72 г трилону Б розчиняють у мірній колбі на 1 л і доводять дистильованою водою до позначки), мурексид

(суміш мурексиду з натрію хлоридом у співвідношенні 1:50 розтирають у ступці й зберігають у закритому посуді), 10 % розчин натрію гідроксиду, піпетки, мікробюретки, колбочки для титрування.

Хід роботи. У колбу для титрування вливають мірною піпеткою 1 мл сечі, додають 10 мл дистильованої води, 5 мл розчину натрію гідроксиду і 2 мг мурексиду. Вміст колби титрують із бюретки 0,01 М розчином трилону Б, весь час перемішуючи, до появи синьо-фіолетового забарвлення. Розрахунок проводять за формулою:

$$C = 0,2 \times A \times D \text{ (мг/добу)},$$

де 0,2 — мг/екв кальцію відповідає 1 мл 0,01 М розчину трилону Б; A — кількість трилону Б, що пішла на титрування, мл; D — добовий діурез, мл; C — концентрація кальцію, мг на добу.

Нормальні значення вмісту кальцію в добовій сечі людини — 100-300 мг на добу або 2,5-7,5 ммоль на добу.

Пояснити отримані результати, зробити висновок, результати записати в робочий зошит.

Питання для контролю за виконанням роботи

1. Якими фізико-хімічними й хімічними методами можна визначити вміст кальцію в сироватці крові та сечі?
2. Які нормальні значення вмісту кальцію в сироватці крові та сечі?
3. Яке діагностичне значення має визначення вмісту кальцію в крові та сечі?
4. Яке значення має кальцій для організму?

II. Кількісне визначення вмісту неорганічного фосфору в сироватці крові

Дослід 1. Визначення вмісту неорганічного фосфору (неорганічних фосфатів) в сироватці крові колориметричним методом (за відновленням фосфатмолібдатної кислоти).

Принцип методу. Після осадження білків у центрифугаті сироватки крові залишається неорганічний фосфор, який у разі взаємодії з молібдатною кислотою утворює фосфатмолібдатну кислоту. Остання відновлюється ейконогеном до синього фосфатмолібдатного комплексу. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна концентрації неорганічного фосфору в біологічному субстраті.

Матеріальне забезпечення: розчин ТХОК (10 г на 100 мл), розчин амоніаку молібдату (5 г амоніаку молібдату доводять до 100 мл 5 н. розчином сульфатної кислоти), розчин амінонафтолсульфонової кислоти або ейконогену (6 г натрію гідрогенсульфіту або натрію піросульфату розчиняють у 20-25 мл води, додають 0,1 г ейконогену, окремо в невеликій кількості води розчиняють 1,2 г натрію піросульфату, обидва розчини змішують і об'єм доводять до 50 мл дистильованою водою; через 2-3 години реактив фільтрують, зберігають у холодильнику в посуді з темного скла), основний стандартний розчин калію дигідрогенфосфату, висушений до постійної маси за температури + 120 °С (0,4389 г калію дигідрогенфосфату розчиняють у дистильованій воді в мірній колбі на 100 мл, 1 мл цього розчину містить 1 мг фосфору; з основного готують робочий розчин із вмістом 0,02 мг фосфору в 1 мл, для цього 2 мл основного стандартного розчину фосфору доводять дистильованою водою в мірній колбі до 100 мл), ФЕК, центрифуга лабораторна, пробірки, колби, піпетки, сироватка крові, вода дистильована.

Хід роботи. 1 мл сироватки крові змішують з 4 мл дистильованої води і 5 мл ТХОК. Через 10 хв пробу центрифугують. До 5 мл центрифугату додають 1 мл амоніаку молібдату, 0,2 мл розчину ейконогену і 1,8 мл дистильованої води. Через 20 хв пробу колориметрують на ФЕК із червоним світлофільтром (довжина хвиль — 660-680 нм) у кюветі завтовшки 10 мм. Результати порівнюють із даними контрольної проби. У контрольну пробу замість

центрифугату додають 2,5 мл ТХОК і 2,5 мл дистильованої води. Розрахунок проводять за калібрувальною кривою.

Пояснити отримані результати, зробити висновок, результати записати в робочий зошит.

Питання для контролю за виконанням роботи

1. Які функції фосфору в організмі?
2. Які фізіологічні розлади можуть спостерігатись при порушенні обміну фосфору?
3. В чому полягає принцип методу визначення неорганічного фосфору в сироватці крові?

III. Визначення калію в сироватці крові

Дослід 1. Визначення калію в сироватці крові.

Принцип методу (за Крамером-Тисдалем). Калій осаджують із сироватки крові кобальтнітридом натрію. Отриманий осад відокремлюють центрифугуванням і титрують перманганатом калію в присутності сульфатної кислоти.

Матеріальне забезпечення: центрифуга, секундомір, баня водяна, бюретка пряма з краном на 25 мл (2 шт.), піпетки градуйовані на 1 мл (4 шт.) і на 5 мл, кобальтнітрид натрію, 0,01 н. розчин перманганату калію, 0,01 н. розчин щавлевої кислоти, 20% розчин сульфатної кислоти, стандартний розчин хлориду калію (0,3814 г KCl розчиняють і доводять дистильованою водою до 1 л; 1 мл розчину містить 0,2 мг калію).

Підготовка кобальтнітриду натрію. Готують 2 розчини: А – 25 г нітрату кобальту розчиняють в 12,5 мл льодяної оцтової кислоти і 50 мл дистильованої води; В – 120 г нітриду натрію розчиняють в 180 мл дистильованої води. Розчин А переносять в склянку Дрекселя і доливають 210 мл розчину В, добре перемішують. Відводну трубку приєднують до водострумєневого насосу і через розчин прокачують повітря до зникнення запаху оксидів азоту. При цьому розчин світлішає і стає прозорим. Повітря необхідно прокачувати протягом декількох днів по 2-3 години кожного дня. Реактив зберігають у темному прохолодному місці. Безпосередньо перед проведенням аналізу через нього знову прокачують повітря 10-20 хв і необхідну кількість реактиву фільтрують. Розчин придатний до використання протягом 1 місяця.

Хід роботи. У центрифужну пробірку наливають 0,5 мл сироватки крові і додають по краплях, увесь час збовтуючи, 1 мл кобальтнітрида натрію. Залишають на 45 хв, а потім додають 3 мл бідистильованої води і центрифугують при 5000 г протягом 10-15 хв. Рідину зливають, доливають 5 мл бідистильованої води і знову центрифугують. Цю операцію проводять доти, поки вода над осадом не стане безбарвною. По завершенні промивання додають з бюретки 2,5 мл 0,01 н. розчину перманганату калію, а піпеткою - 1 мл 20%-ного розчину сульфатної кислоти; пробірку поміщають у киплячу водяну баню на 90 с, увесь час перемішуючи вміст пробірки. Потім з іншої бюретки додають 1 мл розчину щавлевої кислоти. Якщо рідина не знебарвилася, то доливають ще 1 мл щавлевої кислоти. Знебарвлений розчин титрують 0,01 н. розчином перманганату калію до слабо-рожевого забарвлення.

Вміст калію (мг%) визначають за формулою:

$$C = [(V - V_1) - 0,06] \times a \times 200,$$

де V - увесь об'єм витраченого 0,01 н. розчину перманганату калію (2,5 мл + об'єм в мл, який було витрачено на титрування); V_1 - кількість (мл) 0,01 н. розчину щавлевої кислоти; 0,06 - об'єм (мл) 0,01 н. розчину перманганату калію, який витрачено для одержання розчину, що має слабо-рожеве забарвлення; 200 - коефіцієнт для перерахування (мг%) з урахуванням розведення; a - маса (мг) калію, який відповідає 1 мл 0,01 н. розчину перманганату калію.

Величину a встановлюють дослідним шляхом. Для цього 0,5 мл стандартного розчину хлориду калію (що містить 0,1 мг калію) обробляють і титрують так, як було описано вище. Припустимо, що витрачено 1,5 мл 0,01 н. розчину перманганату калію, тоді 1 мл цього розчину відповідає (0,1:1,5) 0,067 мг калію.

У нормі вміст калію в сироватці крові становить 17,5-22,5 мг%.

Пояснити отримані результати, зробити висновок, результати записати в робочий зошит.

Питання для контролю за виконанням роботи

1. В чому полягає принцип методу перманганатометрії?
2. Фізіологічне значення калію в організмі.

IV. Визначення окремих хімічних елементів (Fe, Cu, Zn, Mn) в біологічному матеріалі

Дослід 1. Визначення заліза в біологічному матеріалі роданідним методом .

Принцип методу. Метод ґрунтується на фотометричному визначенні інтенсивності червоного забарвлення, що з'являється при взаємодії іона заліза зі ступенем окиснення +3 з роданідом калію. Біологічний матеріал попередньо озолують мокрим шляхом.

Матеріальне забезпечення: фотоелектроколориметр (ФЕК), лійка ділильна, пробірки скляні хімічні з тугоплавкого скла, піпетки градуйовані на 2 і 5 мл, 10 н. сульфатна кислота, пергідроль (H_2O_2), 0,04% розчин перманганату калію, 20% розчин роданіду калію (інша назва - калію тіоціонат, KCN), ізоаміловий спирт, амоніак (конц.), стандартний розчин заліза (залізний дріт розчиняють у двічі перегнаній хлоридній кислоті з додаванням декількох крапель двічі перегнаної нітратної кислоти; спочатку готують розчин, що містить 100 мг заліза, з нього готують робочі розчини). Інші реактиви що застосовуються повинні бути вільні від слідів заліза.

Хід роботи. Для випробувань беруть біологічні рідини (молоко - 5 мл, сироватку крові - 2 мл), сухі тканини рослин або тварин - від 0,1 до 0,2 г. Зразок попередньо озолують в присутності сульфатної кислоти і пергідролю (див. метод Фіске-Суббароу). Після охолодження в пробірку з тугоплавкого скла, у який вели озолення, додають 5 мл води, енергійно перемішують вміст і фільтрують у ділильну лійку зі скла пірекс. Пробірку і фільтр промивають водою 3 рази, доводячи загальний об'єм фільтрату до 20 мл. Додають 1 краплю 0,04% розчину перманганату калію, розмішують і, якщо забарвлення зникає, додають ще краплю розчину перманганату. Після цього додають 15 мл ізоамілового спирту і 5 мл 20% розчину роданіду калію. Суміш струшують, шар ізоамілового спирту зливають у кювету фотоелектроколориметра і ведуть відлік проти чистого ізоамілового спирту при $\lambda=490$ нм.

Вміст заліза визначають за стандартною кривою, яку будують з після визначення заліза в серії стандартних розчинів (що містять 5, 10, 25 і 50 мкг/мл заліза), при цьому обов'язково ставлять контрольний (холостий) дослід на реактиви. З цією метою в пробірку вносять 1,5 мл 10 н. сульфатної кислоти, нагрівають на пісковій бані і додають стільки ж пергідролю, скільки було взято для дослідів. Отриману суміш частково нейтралізують концентрованим амоніаком, додаючи його в кількості, достатні для нейтралізації половини узятої в дослід сульфатної кислоти. До отриманого розчину додають той або інший стандартний розчин і обробляють зразок способом, що описано вище. Вміст заліза C (мг%) у біологічному матеріалі обчислюють за формулою:

$$C = \frac{a \times 100}{b} ,$$

де a — вміст заліза у випробуваному розчині, знайдений за калібровочною кривою (мг); b — об'єм біологічної рідини (мл) або маса тканини (г), які було взято для дослідження.

Пояснити і записати в робочий зошит отримані результати.

Дослід 2. Визначення міді в біологічному матеріалі.

Принцип методу. Мідь визначають за допомогою диетилдитіофосфатів, що утворюють з міддю осад, який розчиняється в органічних реагентах. Розчини диетилдитіофосфатів міді забарвлені в інтенсивний жовто-помаранчовий колір. Диетилдитіофосфат міді переходить в органічну фазу при слаболужній, нейтральній і кислій реакціях середовища. Диетилдитіофосфат нікелю реагує з міддю, як і всі тіофосфати, з утворенням осаду, який розчиняється в органічних рідинах. Велика вибіркова здатність даного реагенту стосовно міді дозволяє проводити визначення міді без додаткового її виділення.

Матеріальне забезпечення: фотоелектроколориметр (ФЕК), муфельна піч, лійка ділильна на 100 мл, колби мірні на 25 і 1000 мл, пробірки скляні хімічні, піпетки градуйовані на 1, 2 і 10 мл, лійка скляна (діаметр 3-4 см), тигель високий (діаметр 55 мм), сульфат міді (тричі перекристалізований з води), диетилдитіофосфат нікелю (0,005 М), вуглець чотирехлорний (хімічно чистий, перегнаний), хлоридна кислота (ρ 1,19 г/см³), сульфатна кислота (ρ 1,84 г/см³).

Хід роботи. Наважку 10-20 г рослинного матеріалу поміщають у тигель і прожарюють у муфельній печі при 550 °С до повного озолення. Тваринний матеріал найчастіше мінералізують сумішшю нітратної і сульфатної кислот у колбах Кьельдаля.

Золу розчиняють у суміші хлоридної і сульфатної концентрованих кислот (3:1), розбавляють водою і кількісно переносять у мірну колбу на 25 мл. 2 мл цього розчину (дослідна проба, у контрольній пробі - 2 мл води) поміщають у ділильну лійку на 100 мл, доливають 10 мл чотирехлорного вуглецю і 2 мл 0,005 М водного розчину диетилдитіофосфату нікелю. Останній реактив уводять повільно, по краплях при постійному помішуванні розчину. Диетилдитіофосфат міді, що утворився, негайно екстрагують шляхом енергійного струшування лійки протягом 1 хв. Шар чотирехлорного вуглецю зливають у суху пробірку і фільтрують через маленький беззольний фільтр у кювету фотоелектроколориметра. Оптичну густину забарвленого розчину вимірюють, використовуючи синій світлофільтр (465 нм) у кюветі товщиною 1 см. Вміст міді у випробуваних зразках розраховують за стандартною кривою.

Стандартний розчин міді готують у такий спосіб: 3,9330 г хімічно чистого, перекристалізованого мідного купоросу розчиняють у 1 л дистильованої води з додаванням 10 мл 6 н. розчину сульфатної кислоти. Такий розчин містить 1 мг міді в 1 мл, 10 мл цього розчину розбавляють водою до 1 л і одержують стандартний розчин із змістом 0,01 мг міді в 1 мл. Останній розчин розбавляють ще в 10 разів, одержуючи робочий стандартний розчин, що містить 1 мкг міді в 1 мл. З нього беруть для аналізу зразки, що містять 0,5, 1,5, 2, 2,5 і 3 мкг міді.

Пояснити отримані результати, зробити висновок, результати записати в робочий зошит.

Дослід 3. Визначення цинку в біологічному матеріалі.

Принцип методу. Метод ґрунтується на одержанні в слаболужному або нейтральному середовищі дитизонату цинку, що розчиняється в чотирехлорному вуглеці або хлороформі; розчин має яскраво-червоне забарвлення. Дуже важливо, щоб усі застосовувані реактиви не містили цинку. При виявленні в них цинку реактиви очищують перегонкою або обробляють розчином дитизона в чистому чотирехлорному вуглеці для звільнення їх від забруднення цинком. Скляний посуд (зі скла пирекс або кварцу), призначений для збереження амоніаку і цитрату калію, парафінують. Неприпустиме застосування каучукових (гумових) пробок. Розчини готують на двічі перегнаній воді (бідистильованій).

Матеріальне забезпечення: фотоелектроколориметр (ФЕК), лійки ділильні на 50-100 мл, пробірки градуйовані на 10 мл, циліндр мірний на 100 мл, піпетки градуйовані на 1 і 5 мл, амоніак (0,01 н.), цитрат калію або натрію (10%), хлоридна кислота (0,02 н.), диетилдитіокарбамат натрію (0,2%, свіжоприготовлений), чотирехлорний вуглець (очищений і перегнаний), хлороформ (ретельно очищений), дифенілтіокарбазон (C₁₃H₁₂N₄S або дитизон,

0,12%), тимолова синь (0,1% в 20% етанолі), фенолфталеїн (1%), вихідний стандартний розчин цинку (0,1 г хімічно чистого металевого цинку розчиняють у 1 мл концентрованої сульфатної кислоти і 50 мл води, після розчинення цинку об'єм розчину доводять водою до 1 л), розведений стандартний розчин цинку (5 мл вихідного стандартного розчину цинку поміщають у мірну колбу на 500 мл і доводять водою до позначки; 1 мл такого розчину містить 1 мкг цинку).

Хід роботи. Зразок рослинного або тваринного матеріалу попередньо озолують в присутності сульфатної кислоти і пергідролу (див. метод Фіске-Суббароу). Для визначення цинку в досліджуваному розчині беруть такий об'єм останнього, щоб вміст цинку становив від 0,1 до 1 мг. Цей розчин поміщають у ділильну лійку з притертою пробкою на 50-100 мл, додають 5 мл 10% розчину цитрату калію або натрію (для зв'язування заліза, алюмінію й інших катіонів) і 1-2 краплі тимолового синього. Потім доливають соляну кислоту до забарвлення розчину в червоний колір і нейтралізують його розведеним розчином амоніаку (1:10), домагаючись ослаблення червоного забарвлення, але не доводячи його до жовтого.

Для екстрагування міді додають 3-5 мл розчину дитизону і чотирехлорного вуглецю, ділильну лійку струшують протягом 5 хв. Забарвлений нижній шар зливають і відкидають. У лійку доливають 3-5 мл розчину дитизону, після струшування відокремлюють і знову відкидають нижній шар. Ця операція повторюється доти, поки розчин дитизону не перестане змінювати своє забарвлення. Після цього до розчину додають 5 мл 10% розчину цитрату калію, 1-2 краплі 1% розчину фенолфталеїна і розчин нейтралізують розведеним амоніаком до слабо-рожевого забарвлення. Додають 3-5 мл розчину дитизону і струшують 2 хв. Забарвлений шар чотирехлорного вуглецю, що містить дитизонат цинку, переносять в іншу чисту ділильну лійку на 100 мл. До досліджуваного розчину знову додають 3-5 мл розчину дитизону і вилучають цинк. Подібне вилучення повторюють доти, поки дитизон не перестане змінювати своє забарвлення. До отриманих екстрактів дитизоната цинку додають 50 мл 0,02 н. розчину хлоридної кислоти і ділильну лійку струшують 2-4 хв. При цьому дитизонат цинку переходить у водну фазу. До солянокислого водного розчину додають кілька разів по 0,5-1,0 мл чотирехлорного вуглецю і після струшування щоразу нижній шар відокремлюють і відкидають.

Далі приступають до останнього вилучення цинку дитизоном, що відбувається в присутності диетилдитіокарбамату натрію, що зв'язує Pb, Cd й інші елементи в більш стійкі комплекси, ніж відповідні комплекси з дитизоном. До отриманого солянокислого розчину додають 5 мл 10% розчину цитрату калію, 1-2 краплі 1% розчину фенолфталеїна і розчин нейтралізують гідроксидом амоніаку до одержання слабо-рожевого забарвлення. Потім додають 10 мл розчину диетилдитіокарбамату натрію, 3-5 мл розчину дитизону в чотирехлорному вуглеці і струшують 2 хв. Нижній шар відокремлюють у чисту ділильну лійку на 50 мл. Вилучення цинку розчином дитизона повторюють ще 1-2 рази. Всі екстракти збирають у ділильну лійку і додають до них 25 мл 0,01 н. розчину гідроксиду амоніаку. Після цього нижній шар відокремлюють і спускають у градуйовану пробірку на 10 мл із притертою пробкою. До розчину цинку додають чистий чотирехлорний вуглець до позначки і струшують 10 разів. Через 10-15 хв фотометрують проти чистого чотирехлорного вуглецю при зеленому світлофільтрі (530 нм).

Вміст цинку визначають за стандартною кривою. Для одержання стандартної кривої в ділильні лійки наливають послідовно 1, 2, 3 і 4 мл розведеного стандартного розчину цинку, додають воду до 5 мл, потім 5 мл 10% цитрату калію, 1-2 краплі 1% розчину фенолфталеїну й обробку ведуть так, як описано вище. Вміст цинку C (мг%) у біологічному матеріалі обчислюють за формулою:

$$C = \frac{a \times 100}{b},$$

де a — маса цинку у розчині, що випробовується, знайдена за калібрувальною кривою (мг); b — маса біологічної тканини (г), що була взята для дослідження.

Пояснити і записати в робочий зошит отримані результати.

Дослід 4. Визначення марганцю персульфатним методом.

Принцип методу. Персульфат амоніаку в кислому середовищі в присутності йонів срібла окиснює Mn^{+2} до $(MnO_4)^-$. Каталізатором реакції є нітрат срібла, що утворює пероксид Ag_2O_2 і перешкоджає випаданню осаду оксиду марганцю (IV).

Матеріальне забезпечення: фотоелектроколориметр (ФЕК), колби мірні на 50 мл, склянки скляні лабораторні високі з носиком на 100 мл, піпетки градуйовані на 1, 5 і 10 мл, сульфатна кислота (конц.), фосфорна кислота (конц.), нітрат срібла (2%, зберігають у темному місці), персульфат амоніаку (10%, свіжеприготовлений), сульфід натрію (10%), щавлева кислота, стандартний розчин марганцю, вода, що містить окиснювач (до 100 мл води додають 3 мл концентрованої сульфатної кислоти, 1 мл 2% розчину нітрату срібла і 5 мл 10% персульфату амоніаку; отриманий розчин кип'ятять, поки не припиниться виділення бульбашок газу).

Підготовка стандартного розчину марганцю. До 91 мл 1 н. розчину перманганату калію (титр перманганату калію визначають за щавлевою кислотою) додають 300 мл дистильованої води, 3 мл сульфатної кислоти (конц.) і по краплям 6 мл 10% розчину сульфиту натрію. Розчин кип'ятять до зникнення запаху оксиду сірки (IV), охолоджують, переносять в колбу на 1 л і доводять водою до позначки. Вміст марганцю в стандартному розчині становить 100 мкг/мл.

Хід роботи. 5 - 10 г рослинних або тваринних тканин піддають або сухому, або мокрому (сумішшю, що складається з нітратної і сульфатної кислот) озоленню (див. попередні досліди). Отриманий залишок у результаті сухого озолення розчиняють у 2-3 мл сульфатної кислоти, розбавляють водою і переносять у колбу на 100 мл. Мінералізатор, отриманий у результаті мокрого спалювання (озолування), переносять кількісно в мірну колбу на 100 мл і доводять дистильованою водою до позначки.

До 10 мл розчину, що випробовується, в хімічну склянку додають 2 мл концентрованої сульфатної кислоти і 2 мл концентровані фосфорної кислоти. Розчин доводять до 20 мл водою, а потім додають до нього 1 мл 2% розчину нітрату срібла і 5 мл 10% розчину персульфату амоніаку. Після цього для окиснювання марганцю і розкладання надлишку персульфату амоніаку розчин кип'ятять протягом 3-4 хв. Після охолодження розчин кількісно переносять у мірну колбу на 50 мл і доводять до позначки водою, що містить окиснювач. Отриманий розчин фотометрують на фотоелектроколориметрі з зеленим світлофільтром (530 нм) у кюветі товщиною 1 см.

Вміст марганцю визначають за стандартною кривою. Для побудови стандартної кривої в п'ять хімічних склянок об'ємом по 100 мл вносять, крім першого, 1, 2, 3 і 4 мл стандартного розчину марганцю, по 20 мл дистильованої води і реактиви, як описано вище. Після кип'ятіння й охолодження розчини кількісно переносять водою, що містить окиснювач, у 50 мл мірні колби і доводять до позначки. Розчини містять марганець у кількості 0, 2, 4, 6 і 8 мкг/мл. Вміст марганцю C (мкг%) у біологічному матеріалі обчислюють за формулою:

$$C = \frac{a \times 1000}{b},$$

де a — маса марганцю у розчині, що випробовується, знайдена за калібрувальною кривою (мкг); b — маса тканини (г), що було взято для дослідження; 1000 — коефіцієнт для перерахунку (мкг%) з урахуванням розведення.

Пояснити і записати в робочий зошит отримані результати.

Питання для контролю за виконанням лабораторної роботи

1. В чому полягає фізіологічне значення міді, заліза, марганцю, цинку для різних організмів?

2. На чому ґрунтується фотоколориметричний метод аналізу?

V. Визначення молочної та піровиноградної кислот

Дослід 1. Кількісне визначення концентрації молочної кислоти в сироватці крові за методом Бюхнера.

Молочна кислота в організмі є кінцевим продуктом гліколізу і глікогенолізу - анаеробних процесів окиснення глюкози та глікогену. Значна кількість молочної кислоти утворюється в м'язах, надходить у кров, переноситься до серцевого м'яза та в печінку, де окиснюється і використовується як енергетичний матеріал.

Принцип методу. Молочна кислота внаслідок нагрівання з концентрованою сульфатною кислотою перетворюється на оцтовий альдегід, який у разі взаємодії з гідрохіноном утворює сполуку червоно-коричневого кольору. Кількість молочної кислоти визначають колориметрично на ФЕК за синього світлофільтра.

Матеріальне забезпечення: сироватка крові, 5% розчин метафосфатної кислоти, 10 % розчин купруму сульфату, кальцію гідроксид у порошку, концентрована сульфатна кислота, 20 % розчин гідрохінону, стандартний розчин молочної кислоти, дистильована вода, пробірки з притертими корками на 15 мл, скляні лійки, скляні палички, фільтри, водяна баня, газовий пальник, ФЕК.

Хід роботи. У дві сухі пробірки наливають по 6 мл дистильованої води. Потім у першу додають 1 мл стандартного розчину молочної кислоти, у другу - 1 мл сироватки крові. Для осадження білків вливають у кожну пробірку по 1 мл метафосфатної кислоти, струшують та залишають на кілька хвилин, після чого відфільтровують. До фільтратів додають по 1 мл 10 % розчину купруму сульфату та по 0,5 г кальцію гідроксиду. Проби перемішують скляними паличками, через 5 хв відфільтровують. Відмірюють по 1 мл фільтрату в пробірки з притертими корками, додають по 0,1 мл 10 % розчину купруму сульфату та по 4 мл концентрованої сульфатної кислоти. Ставлять їх на киплячу водяну баню на 1,5 хв. Після охолодження додають по 0,1 мл 20 % спиртового розчину гідрохінону, добре перемішують та кип'ятять протягом 15 хв. Пробірки охолоджують та колориметрують при синьому світлофільтрі.

Концентрацію молочної кислоти розраховують за формулою:

$$C = \frac{C_{ст.} \times E_{досл.}}{E_{ст.}}$$

де C - концентрація молочної кислоти в сироватці крові, ммоль/л; $C_{ст.}$ - концентрація молочної кислоти в стандартному розчині; $E_{ст.}$ - оптична густина стандартного розчину молочної кислоти; $E_{досл.}$ - оптична густина дослідної проби.

Оцінити і пояснити отриманий результат.

Медичне значення. У крові здорової людини міститься 1-2 ммоль/л молочної кислоти. Збільшення вмісту молочної кислоти може бути пов'язане з виконанням людиною інтенсивної м'язової праці за короткий проміжок часу без достатнього надходження кисню. При цьому не відбувається достатнє окисне декарбоксілювання пірувату до ацетил-КоА, а тільки утворення лактату. Останній може бути використаний у відновний період у разі достатнього надходження кисню. Спостерігають збільшення вмісту молочної кислоти при гострому гнійному запальному ураженні тканин, важкій анемії, епілепсії, тетанії, правцю, гіпоксії, пов'язаній із серцевою та легеневою недостатністю, злоякісних новоутвореннях, захворюваннях печінки (гострому гепатиті, цирозі), цукровому діабеті, нирковій недостатності, гострому септичному ендокардиті, поліомієліті, лейкозі, інтенсивних і тривалих м'язових навантаженнях тощо. Для більшості вказаних станів (дактатацидоз) характерне збільшення співвідношення лактат/піровиноградна кислота, найчастіше воно становить 10:1.

Дослід 2. Кількісне визначення концентрації піровиноградної кислоти в сечі колориметричним методом.

Піровиноградна кислота - один із центральних метаболітів вуглеводного обміну. Визначення її кількості в плазмі крові та сечі широко використовують із діагностичною метою в клінічній практиці.

Принцип методу. Піровиноградна кислота з 2,4-динітрофенілгідразином (2,4-ДНФГ) у лужному середовищі утворює 2,4-динітрофенілгідразони піровиноградної кислоти коричнево-червоного забарвлення, інтенсивність якого пропорційна концентрації піровиноградної кислоти і визначається колориметрично.

Матеріальне забезпечення: сеча (або сироватка крові), стандартний розчин пірувату (піровиноградна кислота) - 625мг у 100 мл води, 0,1 % розчин 2,4-ДНФГ у 2 н. розчині хлоридної кислоти, 12 % розчин натрію гідроксиду, дистильована вода, штатив із пробірками, піпетки, ФЕК.

Хід роботи. Беруть 2 пробірки, в одну наливають 0,1 мл сечі, у другу - 0,1 мл піровиноградної кислоти, а потім в обидві пробірки додають по 0,9 мл дистильованої води. Після цього вміщують по 0,5 мл 0,1 % розчину 2,4-ДНФГ, змішують і на 20 хв ставлять у темне місце. Пізніше додають по 1 мл 12 % розчину натрію гідроксиду і через 10 хв колориметрують на ФЕК проти контролю (води) при синьому світлофільтрі.

Концентрацію піровиноградної кислоти вираховують за формулою:

$$C_{\text{досл.}} = \frac{C_{\text{ст.}} \times E_{\text{досл.}} \times V}{E_{\text{ст.}} \times a},$$

де $C_{\text{ст.}}$ - концентрація стандартного розчину піровиноградної кислоти; $C_{\text{досл.}}$ - концентрація піровиноградної кислоти у сечі, мг/добу; $E_{\text{досл.}}$ - оптична густина досліджуваної проби; $E_{\text{ст.}}$ - оптична густина стандарту; V - добова кількість сечі; a — 0,1 мл сечі, взятої для аналізу.

Порівняти отриманий результат із нормативними величинами. Зробити висновок.

Медичне значення. У крові здорової людини міститься 45-115 мкмоль/л піровиноградної кислоти, із сечею за добу виділяється 15-25 мг піровиноградної кислоти. Вміст піровиноградної кислоти у крові (разом з молочною кислотою) підвищується під час посиленої м'язової праці, а також при деяких патологічних станах, що супроводжуються судомами (тетанія, епілепсія, правець). Збільшується виділення піровиноградної кислоти із сечею при В₁-вітамінній недостатності, серцевій недостатності, токсикозах, захворюваннях печінки, інсулінозалежному цукровому діабеті, діабетичному кетоацидозі, дихальному алкалозі, уремії, гепатоцеребральній дистрофії, гіперфункції гіпофізарно-адреналової і симпатико-адреналової систем, а також після введення камфори, стрихніну, адреналіну. До збільшення вмісту піровиноградної кислоти призводять токсична дія ацетилсаліцилової кислоти, отруєння ртуттю, арсеном, сурмою. Вміст піровиноградної кислоти різко підвищується у спинномозковій рідині при травматичних захворюваннях ЦНС, запальних процесах (менінгіт, абсцес мозку). Під впливом наркозу рівень піровиноградної кислоти у крові дещо знижується. Усі фактори, які зумовлюють збільшення її концентрації, як правило, призводять до збільшення рівня молочної кислоти. Таким чином, основною причиною, нагромадження в крові піровиноградної та молочної кислот є порушення їх наступного ферментативного перетворення на звичайні продукти розпаду внаслідок різних причин.

Питання для контролю за виконанням лабораторної роботи

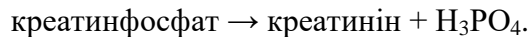
1. На чому ґрунтується метод визначання молочної кислоти в сироватці крові?
2. Яке клініко-діагностичне значення має визначення вмісту молочної кислоти?
3. На чому ґрунтується принцип методу визначення піровиноградної кислоти в сечі?
4. Яке клініко-діагностичне значення має визначення вмісту піровиноградної кислоти?

VI. Кількісне визначення вмісту креатиніну в сечі за методом Поппера

Принцип методу. Основним джерелом енергії запуску м'язової діяльності є макроергічна сполука креатинфосфат, яка утворюється за участю ферменту креатинкінази (2.7.3.2) за схемою:



Ця реакція швидко протікає у зворотному напрямку і тим самим сприяє швидкій регенерації АТФ. Вміст креатинфосфату в розслабленому м'язі у 3-8 разів більший, ніж вміст АТФ, що дозволяє виконувати м'язову роботу протягом 2-5 с. компенсується витрата АТФ завдяки гліколізу і окисному фосфорилуванню. Активність креатинкінази у біологічних рідинах можна визначити за кількістю креатину. Креатин утворюється за участю креатинкінази, а креатинін - у результаті неферментативного дефосфорилування креатинфосфату:



При захворюваннях м'язів виділення креатину збільшується, а креатиніну зменшується. Добове виділення креатиніну в норму – величина стала для кожної людини і прямо пропорційна масі м'язів.

Метод базується на кольоровій реакції (реакція Яффе) креатиніну з пікриновою кислотою в лужному середовищі з подальшим визначенням інтенсивності забарвлення на ФЕК.

Матеріальне забезпечення: сеча, насичений розчин пікринової кислоти, стандартний розчин креатиніну (8,8 ммоль/л), 10% розчин натрію гідроксиду, ФЕК, мірні циліндри на 100 мл, мірні піпетки, скляні палички.

Хід роботи. Беруть 3 циліндри: у перший відміряють 0,5 мл сечі (дослід), у другий - 0,5 мл стандартного розчину креатиніну, а в третій - 0,5 мл дистильованої води (контроль). У всі циліндри додають по 3 мл насиченого розчину пікринової кислоти, ретельно перемішують, а потім у кожний циліндр додають по 0,2 мл 10% розчину натрію гідроксиду, ще раз перемішують вміст циліндрів, залишають за кімнатної температури на 10 хв. У кожний циліндр додають дистильовану воду до позначки, перемішують скляними паличками і колориметрують проби досліді і стандартного розчину проти контролю у кюветі завтовшки 20 мм за довжини хвилі 500-560 нм (зелений світлофільтр). Розраховують кількість креатиніну за формулою:

$$X = \frac{8,8 \times E_{\text{досл.}} \times V_{\text{доб.}}}{E_{\text{ст.}} \times V_{\text{досл.}}},$$

де X — кількість креатиніну добової сечі, ммоль/л; 8,8 - концентрація стандартного розчину креатиніну, ммоль/л; $E_{\text{досл.}}$ - екстинкція дослідної проби; $E_{\text{ст.}}$ - екстинкція стандартної проби; $V_{\text{доб.}}$ - добовий об'єм сечі, мл; $V_{\text{досл.}}$ - об'єм сечі, взятої для аналізу, мл.

Пояснити отримані результати, зробити висновок, результати записати в робочий зошит.

Медичне значення. У середньому за добу із сечею виділяється креатиніну у чоловіків 8,8-17,7 ммоль на добу (1-2 г на добу), у жінок – 7,1-15,9 ммоль на добу (0,8-1,8 г на добу). Збільшення виділення креатиніну спостерігають у разі надмірного вживання м'ясної їжі (екзогенний креатинін), розпаду білків протоплазми, внаслідок фізичного навантаження, при акромегалії, цукровому і нецукровому діабеті, інфекційних та інших захворюваннях (ендогенний креатинін). Виділення креатиніну значно зменшується при захворюваннях нирок, м'язовій дистрофії, гіпертиреозі, анемії, лейкемії, у людей літнього та старечого віку, хронічному нефриті з уремією (при цьому вміст його в крові збільшується). Креатинін, на відміну від багатьох інших низькомолекулярних речовин, не

реабсорбується, тому за його екскрецією із сечею можна оцінювати стан клубочкової фільтрації.

Питання для контролю за виконанням роботи

1. На чому ґрунтується принцип методу визначення вмісту креатиніну в сечі?
2. Про що свідчить збільшення чи зменшення вмісту креатиніну в сечі?
3. Будова і функції АТФ.

VII. Кількісне визначення сечової кислоти в сечі

Принцип методу. Метод ґрунтується на здатності сечової кислоти відновлювати фосфатвольфраматний реактив до фосфатвольфраматного синього, інтенсивність забарвлення якого пропорційна вмісту сечової кислоти. Кількість фосфатвольфраматного синього визначають шляхом титрування червоною кров'яною сіллю. Остання окиснює фосфатвольфраматний синій, і сине забарвлення зникає.

Матеріальне забезпечення: сеча, фосфатвольфраматний реактив Фоліна (дивись лабораторну роботу № 6, дослід 3), 20% розчин натрію карбонату, 0,01 н. розчин калію фериціаніду $K_3[Fe(CN)_6]$ (червона кров'яна сіль), стандартний розчин сечової кислоти (0,5 мг в 1 мл), мікробюретки, колбочки для титрування, піпетки, пробірки.

Хід роботи. Паралельно до 1,5 мл сечі й 1,5 мл стандартного розчину сечової кислоти додають по 1 мл 20% розчину натрію карбонату і по 1 мл фосфатвольфраматного реактиву Фоліна, змішують і титрують 0,01 н. розчином калію фериціаніду до зникнення синього забарвлення.

Вміст сечової кислоти X (у міліграмах) у добовій сечі вираховують за формулою:

$$X = \frac{0,75 \times A \times C}{1,5 \times B},$$

де 0,75 – кількість сечової кислоти у стандартній пробі, мг; A – кількість калію фериціаніду, що пішла на титрування дослідної проби сечі, мл; B – кількість калію фериціаніду, що пішла на титрування стандартної проби сечової кислоти, мл; C – добовий діурез, мл.

Коефіцієнт перерахунку в одиниці СІ (ммоль/добу) становить 0,0059.

Пояснити отримані результати, зробити висновок, результати записати в робочий зошит.

Медичне значення. Утворена в результаті розпаду пуринових основ сечова кислота виділяється нирками. У нормі в людини з сечею виділяється 1,60 – 3,54 ммоль/добу (270 – 600 мг/добу) сечової кислоти. Нормальний вміст сечової кислоти в сироватці крові становить для чоловіків 240 – 530 мкмоль/л (0,05 – 0,06 г/л), для жінок приблизно на 24% менше – 185 – 440 мкмоль/л (0,04 – 0,05 г/л). Рівень сечової кислоти в крові підвищується внаслідок порушення її продукції, руйнування, виведення і перерозподілу в організмі у разі посиленого розпаду клітин, порушення виведення цього метаболіту із сечею, змін ендокринної регуляції обміну пуринових основ (вторинні гіперурикемії), а також при подагрі – захворюванні, яке зумовлене первинним порушенням обміну сечової кислоти (природжені ферментопатії).

Питання для контролю за виконанням роботи

1. В чому полягає принцип методу визначення сечової кислоти в сечі?
2. Який вміст сечової кислоти у крові й сечі здорової людини?
3. Для чого необхідно визначати вміст сечової кислоти?