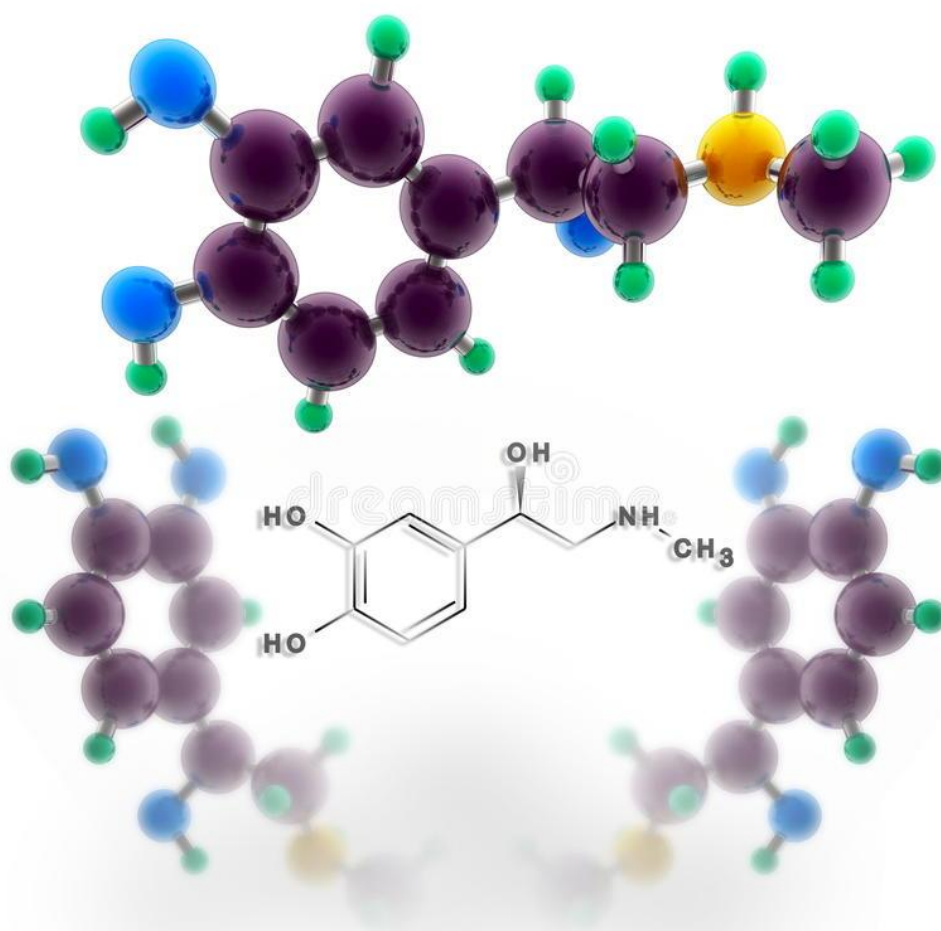


Ульяновский государственный университет  
Экологический факультет  
Кафедра общей и биологической химии

О.А. Индирякова, О.В. Фролова

## БИОХИМИЯ СПОРТА

Методические указания  
для самостоятельной работы бакалавров очного отделения  
направлений подготовки бакалавров  
49.03.02 Физическая культура для лиц с отклонениями в  
состоянии здоровья (адаптивная физическая культура)  
49.03.01 Физическая культура



Ульяновск, 2019

**Рекомендовано к введению в образовательный процесс решением  
Ученого совета Института медицины, экологии и физической культуры  
Протокол №9/209 от 15.05.2019 г**

**Рецензент** – кандидат биологических наук, доцент кафедры анатомии  
человека Т.А. Индирякова

**Фролова О.В., Индирякова О.А.**

**Биохимия спорта:** Методические указания для самостоятельной работы бакалавров очного отделения направления подготовки 49.03.01 Физическая культура и 49.03.02 Физическая культура для лиц с отклонениями в состоянии здоровья (адаптивная физическая культура)/ О.А. Индирякова, О.В. Фролова. – Ульяновск: УлГУ, 2019. – 41 с.

Методическое пособие по дисциплине «Биохимия спорта» предназначено в помощь студентам очного отделения, обучающимся по направлению подготовки бакалавров 49.03.01 Физическая культура и 49.03.02 Физическая культура для лиц с отклонениями в состоянии здоровья (адаптивная физическая культура), для самостоятельного изучения отдельных разделов курса. Методические указания включают в себя требования к результатам освоения дисциплины, тематический план дисциплины, список рекомендуемой литературы, тесты для самоподготовки, контрольные вопросы к зачету.

© Индирякова О.А., Фролова О.В. 2019  
© Ульяновский государственный университет, 2019

# СОДЕРЖАНИЕ

## Оглавление

1. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ ОСВОЕНИЯ ДИСЦИПЛИНЫ:.....	4
2. МЕСТО ДИСЦИПЛИНЫ В СТРУКТУРЕ ОПОП:.....	4
3. СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4. РАЗДЕЛЫ ДИСЦИПЛИНЫ И ВИДЫ УЧЕБНЫХ ЗАНЯТИЙ .....	8
5. ТЕМАТИЧЕСКИЙ ПЛАН ДИСЦИПЛИНЫ .....	9
6. ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ, ПРАКТИКУМЫ .....	12
7. КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ПО ДИСЦИПЛИНЕ (ВОПРОСЫ К ЭКЗАМЕНУ).....	40

## **1. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ ОСВОЕНИЯ ДИСЦИПЛИНЫ:**

### **Цель освоения дисциплины:**

- обеспечение будущих специалистов по физической культуре и спорту знаниями химических основ процессов жизнедеятельности, в особенности тех биохимических процессов, которые совершаются в организме человека при занятиях физическими упражнениями и спортом

### **Задачи освоения дисциплины:**

- изучение особенностей биохимических процессов и механизмов их регуляции при физических нагрузках и занятиях видами спорта;
- установить биохимические основы обмена веществ в организме человека;
- рассмотреть особенности энергетического обмена в организме человека и механизмов энергообеспечения при мышечной деятельности;
- изучить биохимические процессы при адаптации организма к систематическим физическим нагрузкам;
- дать знания о метаболических основах утомления и восстановления после физических нагрузок;
- изучить биохимические критерии оценки эффективности тренировочного процесса, состояния перетренированности или перенапряжения систем организма

## **2. МЕСТО ДИСЦИПЛИНЫ В СТРУКТУРЕ ОПОП:**

Учебная дисциплина «Биохимия спорта» относится к обязательным дисциплинам вариативной части блока 1.

Требованиями к входным знаниям для освоения дисциплины «Биохимия спорта» является знание школьного курса по химии и биологии.

Последующие дисциплины: для успешного изучения дисциплин «Физиология человека», «Физиология спорта», «Спортивная медицина», студенту необходимо знать биохимические основы питания лиц, занимающихся физической культурой и спортом, уметь проводить наблюдения за биохимическими явлениями и реакциями организма на спортивные нагрузки, владеть способами прогнозирования физического состояния организма учащихся, занимающихся физической культурой и спортом, с применением адекватных и современных медико-биологических методов, приемами контроля правильного физического развития воспитанников, корректного составления программ и грамотного ведения тренировочного процесса на основе знаний о биохимических процессах, протекающих в организме.

В результате изучения дисциплины студент должен:

Знать:

- закономерности, принципы и методы биохимических исследований;
- биохимические особенности физкультурно-спортивной деятельности и характер ее влияния на организм человека с учетом пола и возраста.
- закономерности, принципы и методы биохимических исследований;
- биохимические особенности физкультурно-спортивной деятельности и характер ее влияния на организм человека с учетом пола и возраста.
- сущность биохимических превращений, обеспечивающих выполнение мышечной работы
- сущность и закономерности протекания химических превращений, обеспечивающих восстановление организма после выполнения мышечной работы
- закономерности адаптационных биохимических изменений под влиянием систематической тренировки, лежащих в основе совершенствования таких физических качеств человека, как сила, быстрота, выносливость

Уметь:

- используя биохимические исследования, оценивать соответствие физических нагрузок функциональному состоянию организма человека с учетом пола и возраста, определять признаки перетренированности.
- на основе результатов биохимического контроля определять функциональное состояние, физическое развитие и уровень подготовленности занимающихся в различные периоды возрастного развития
- использовать знания, полученные в процессе изучения курса, для подбора наиболее эффективных средств и методов тренировки, рационализации тренировочного процесса в зависимости от задач тренировки и индивидуальных особенностей;
- подобрать адекватные поставленным задачам методы биохимического контроля и интерпретировать получаемые в ходе исследований результаты.

Владеть:

- навыками оценки общей работоспособности, людей, занимающихся физической культурой и спортом.
- навыками рационального использования учебно-лабораторного оборудования, специальной аппаратуры.
- средствами и методами формирования здорового стиля жизни на основе потребности в физической активности и регулярном применении физических упражнений и природных факторов с целью оздоровления и физического совершенствования обучаемых

## а) Список рекомендуемой литературы

### Основная:

1. Михайлов С.С. Биохимия двигательной деятельности : учебник для вузов и колледжей физической культуры / С.С. Михайлов. - 6-е изд., доп. - М. : Спорт, 2016. - 296 с. - ISBN 978-5-906839-41-1 - Текст : электронный // ЭБС "Консультант студента" : [сайт]. - URL : <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785906839411.html>
2. Спортивная биохимия с основами спортивной фармакологии : учебное пособие для вузов / Л. В. Капилевич, Е. Ю. Дьякова, Е. В. Кошельская, В. И. Андреев. — Москва : Издательство Юрайт, 2019 ; Томск : Томский политехнический университет. — 151 с. — (Университеты России). — ISBN 978-5-534-11890-2 (Издательство Юрайт). — ISBN 978-5-98298-987-1 (Томский политехнический университет). — Текст : электронный // ЭБС Юрайт [сайт]. — URL: <https://www.biblio-online.ru/bcode/446368>

### Дополнительная:

1. Джалилов П.Б., Словарь терминов по биохимии спорта / П.Б. Джалилов, С.С. Михайлов - М. : Советский спорт, 2013. - 40 с. - ISBN 978-5-9718-0645-5 - Текст : электронный // ЭБС "Консультант студента" : [сайт]. - URL : <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785971806455.html>
2. Ершов Ю.А., Общая биохимия и спорт: учебное пособие / Ершов Ю.А. - М. : Издательство Московского государственного университета, 2010. - 368 с. - ISBN 978-5-211-05595-7 - Текст : электронный // ЭБС "Консультант студента" : [сайт]. - URL : <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785211055957.html>
3. Кулиненко О.С. Биохимия в практике спорта / О.С. Кулиненко, И.А. Лапшин - М. : Спорт, 2018. - 184 с. - ISBN 978-5-9500179-7-1 - Текст : электронный // ЭБС "Консультант студента" : [сайт]. - URL : <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785950017971.html>
4. Кудря О.Н., Избранные лекции по спортивной биохимии : учебное пособие / Кудря О.Н. - Омск : Изд-во СибГУФК, 2014. - ISBN 978-5-91930-034-2 - Текст : электронный // ЭБС "Консультант студента" : [сайт]. URL: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785919300342.html>

### Учебно-методическая:

1. Фролова О. В. Биохимия спорта : методические указания для самостоятельной работы бакалавров очного отделения направления подготовки 49.03.01 Физическая культура и 49.03.02 Физическая культура для лиц с отклонениями в состоянии здоровья (адаптивная физическая культура) / О. В. Фролова, О. А. Индирякова; УлГУ, ИМЭиФК, Экол. фак. - Ульяновск : УлГУ, 2019. - Загл. с экрана; Неопубликованный ресурс. - Электрон. текстовые дан. (1 файл : 823 КБ). - Текст : электронный. URL : <http://lib.ulsu.ru/MegaPro/Download/MObject/1491>

Согласовано:

Гл. библиотекарь НБ УлГУ / Стадольникова Д.Р. /  / \_\_\_\_\_

**б) Программное обеспечение**

1. Microsoft Office
2. ОС Windows Professional
3. Антиплагиат ВУЗ

**в) Профессиональные базы данных, информационно-справочные системы**

1. **IPRbooks** [Электронный ресурс]: электронно-библиотечная система / группа компаний Ай Пи Эр Медиа . – Электрон. дан. - Саратов , [2019]. - Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru>.
2. **ЮРАЙТ** [Электронный ресурс]: электронно-библиотечная система / ООО Электронное издательство ЮРАЙТ. - Электрон. дан. – Москва , [2019]. - Режим доступа: <https://www.biblio-online.ru>.
3. **Консультант студента** [Электронный ресурс]: электронно-библиотечная система / ООО Политехресурс. - Электрон. дан. – Москва, [2019]. - Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/pages/catalogue.html>.
4. **КонсультантПлюс** [Электронный ресурс]: справочная правовая система. /Компания «Консультант Плюс» - Электрон. дан. - Москва : КонсультантПлюс, [2019].
5. **База данных периодических изданий** [Электронный ресурс] : электронные журналы / ООО ИВИС. - Электрон. дан. - Москва, [2019]. - Режим доступа: <https://dlib.eastview.com/browse/udb/12>.
6. **Национальная электронная библиотека** [Электронный ресурс]: электронная библиотека. - Электрон. дан. – Москва, [2019]. - Режим доступа: <https://нэб.рф>.
7. **Электронная библиотека диссертаций РГБ** [Электронный ресурс]: электронная библиотека / ФГБУ РГБ. - Электрон. дан. – Москва, [2019]. - Режим доступа: <https://dvs.rsl.ru>.
8. **Федеральные информационно-образовательные порталы:**  
Информационная система Единое окно доступа к образовательным ресурсам. Режим доступа: <http://window.edu.ru>  
Федеральный портал Российское образование. Режим доступа: <http://www.edu.ru>
9. **Образовательные ресурсы УлГУ:**  
Электронная библиотека УлГУ. Режим доступа : <http://lib.ulsu.ru/MegaPro/Web>  
Образовательный портал УлГУ. Режим доступа : <http://edu.ulsu.ru>

**Согласовано:**

Зам.нач. УИТиТ  
Должность сотрудника УИТиТ

А.В. Клочкова /  
ФИО

  
подпись

\_\_\_\_\_  
дата

### 3. РАЗДЕЛЫ ДИСЦИПЛИНЫ И ВИДЫ УЧЕБНЫХ ЗАНЯТИЙ

Название разделов и тем	Всего	Виды учебных занятий					Форма текущего контроля знаний
		Аудиторные занятия			Занятия в интерактивной форме	Самостоятельная работа	
		Лекции	Практические занятия, семинары	Лабораторные работы, практикумы			
1	2	3	4	5	6	7	
<b>Модуль 1. Строение, свойства и превращения важнейших химических соединений, входящих в состав организма человека</b>							
Тема 1. Введение в биохимию. Химический состав организма человека. Общие закономерности обмена веществ	5	1		-		4	Устный опрос, тест
Тема 2. Биокатализ	13	1		4		8	Устный опрос, тест
Тема 3. Биоэнергетика	13	1		4		8	Устный опрос, тест
Тема 4. Обмен углеводов	13	1		4		8	Устный опрос, тест
Тема 5. Обмен липидов	7	1		2		4	Устный опрос, тест
Тема 6. Обмен белков и нуклеиновых кислот	13	1		4		8	Устный опрос, тест
Тема 7. Обмен воды и минеральных соединений	7	1		2		4	Устный опрос, тест
Тема 8. Взаимосвязь и регуляция обмена веществ в организме человека Гормоны, их роль в регуляции обмена веществ	13	1		4		8	Устный опрос, тест
<b>Модуль 2. Биохимические основы мышечной деятельности</b>							
Тема 9. Биохимия мышц и мышечного сокращения	12	2		4		6	Устный опрос, тест, задачи
Тема 10. Энергетическое обеспечение мышечной деятельности	12	2		4		6	Устный опрос, тест
Тема 11. Биохимические изменения в организме при мышечной деятельности различного характера. Биохимические процессы при утомлении.	10	2		2		6	Устный опрос, тест



Тема 12. Биохимические превращения в период восстановления после мышечной работы	12	2		2		8	Устный опрос, тест
Тема 13. Биохимическое обоснование методики занятий физической культурой с лицами разного возраста и пола	7	1		-		6	Устный опрос, тест
Тема 14. Биохимические основы рационального питания при занятиях физической культурой	7	1		-		6	Устный опрос, тест
	144	18		36		90	

#### 4. ТЕМАТИЧЕСКИЙ ПЛАН ДИСЦИПЛИНЫ

##### *Модуль 1. Строение, свойства и превращения важнейших химических соединений, входящих в состав организма человека*

##### **Тема 1. ВВЕДЕНИЕ В БИОХИМИЮ. ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА. ОБЩИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ**

**Самостоятельная работа.** Особенности протекания обменных процессов в различных состояниях организма: относительного покоя, активной деятельности, отдыха после работы. Зависимость обмена веществ от возраста, особенностей питания, других факторов. Изменение обменных процессов под влиянием факторов внешней среды как основа биохимической адаптации организма к условиям существования. Общие принципы регуляции обмена веществ. Механизмы деятельности важнейших регуляторных систем организма: системы дифференцировки клеток, системы клеточной авторегуляции, эндокринной системы, нервной системы.

**Основные знания и умения.** Студент должен знать предмет и объекты биохимии. Место биохимии в системе наук. Современные достижения в области биохимии спорта. Понимать важность практического значения биохимии в сфере физического воспитания и спортивной тренировки.

##### **Тема 2. БИОКАТАЛИЗ**

###### **Лабораторный практикум**

###### **Лабораторная работа № 1. Изучение кинетических свойств ферментов**

**Самостоятельная работа** Биохимические механизмы участия витаминов в обеспечении обменных процессов. Роль витаминов в образовании коферментов.

Биологическая роль и пищевые источники водорастворимых и жирорастворимых витаминов. Понятие о гиповитаминозе, авитаминозе и гипервитаминозе.

**Основные знания, умения и навыки.** Студент должен знать функции, классификацию и механизмы действия ферментов и витаминов. Уметь различать специфические и неспецифические функции ферментозной активности. Иметь навык определения функций ферментов.

##### **Тема 3. БИОЭНЕРГЕТИКА**

###### **Лабораторный практикум**

###### **Лабораторная работа № 2: Обнаружение оксидоредуктаз в биологическом материале**

**Самостоятельная работа.** Энергетический эффект биологического окисления: аккумуляция энергии в макроэргических связях и теплообразование. Общие представления о механизмах окислительного фосфорилирования.

**Основные знания, умения и навыки.** Знать закономерности обмена веществ и энергии в организме. Уметь классифицировать основные источники энергии. Иметь навыки обнаружения в биологических объектах, исследования свойств и определения активности ферментов.

#### **Тема 4. ОБМЕН УГЛЕВОДОВ**

**Лабораторный практикум.** Лабораторная работа №3: Открытие углеводов

**Самостоятельная работа.** Аэробная стадия превращений углеводов.

Превращения ацетилкофермента А в цикле трикарбоновых кислот. Связь циклатрикарбоновых кислот с системой переноса водорода на кислород и ресинтеза АТФ. Энергетическая эффективность аэробного распада углеводов. Использование углеводов в пластических целях. Образование и роль в организме гетерополисахаридов.

**Основные знания, умения и навыки.** Знать функциональное значение углеводов в организме. Уметь выстраивать цепь гликолиза с устранением молочной кислоты. Иметь навыки составления химической цепи расщепления моно- и полисахаридов в результате пищеварения.

#### **Тема 5. ОБМЕН ЛИПИДОВ**

**Лабораторный практикум.** Лабораторная работа № 4. Определение липопротеидов в сыворотке крови.

**Самостоятельная работа (4 часа).** Использование жиров в качестве источника энергии. Мобилизация резервного жира. Липолиз и его регуляция. Транспорт глицерина и жирных кислот. Бета-окисление жирных кислот, образование ацетилкофермента А. Энергетический эффект окисления жиров. Общие представления о синтезе жирных кислот из продуктов углеводного и белкового обмена, внутриклеточных превращениях фосфолипидов, гликолипидов, стероидов.

**Основные знания, умения и навыки.** Знать функциональное значение липидов в организме. Уметь выстраивать цепь липолиза. Иметь навыки составления химической цепи расщепления липидов в результате пищеварения и мышечной деятельности

#### **Тема 6. ОБМЕН БЕЛКОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ**

**Лабораторный практикум.** Лабораторная работа № 5. Качественные (цветные) реакции на функциональные группы белков и аминокислот

**Лабораторная работа № 6. Качественные реакции на компоненты нуклеиновых кислот**

**Самостоятельная работа (8 часов).** Катаболические превращения аминокислот. Реакции переаминирования, дезаминирования, декарбоксилирования. Образование заменимых аминокислот и биологически активных производных аминокислот. Связь превращений аминокислот с циклом трикарбоновых кислот. Образование аммиака при дезаминировании аминокислот и азотистых оснований. Транспорт аммиака.

**Основные знания, умения и навыки.** Необходимо знать функцию белков и аминокислот, биохимические основы генетического кода. Уметь интерпретировать пути использования аминокислот в организме. Иметь навык обнаружения мочевой кислоты.

#### **Тема 7. ОБМЕН ВОДЫ И МИНЕРАЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ**

**Лабораторный практикум.** Лабораторная работа № 7 Исследование минерального состава мочи

**Самостоятельная работа.** Минеральные соединения организма человека, и содержание, распределение между отдельными тканями и роль в организме. Ионы, роль ионов в образовании клеточных структур и поддержании пространственной конфигурации молекул биополимеров. Ионная регуляция ферментативной активности. Потребность организма человека в различных минеральных соединениях и ее изменение в зависимости от внешних условий и функционального состояния. Выделение минеральных соединений с потом и мочой. Биохимические механизмы регуляции минерального обмена.

**Основные знания, умения и навыки.** Необходимо знать, какие питательные вещества усваиваются на разных уровнях пищеварительной системы. Уметь различать ферменты, участвующие в пищеварении. Иметь навык исследования минерального состава мочи.

#### **Тема 8. ВЗАИМОСВЯЗЬ И РЕГУЛЯЦИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ В ОРГАНИЗМЕ ЧЕЛОВЕКА.**

##### **ГОРМОНЫ, ИХ РОЛЬ В РЕГУЛЯЦИИ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ**

**Лабораторный практикум.** Лабораторная работа № 8. Качественные реакции на витамины

**Самостоятельная работа.** Эндокринная регуляция обмена веществ. Общие представления о химической природе гормонов: гормоны - полипептиды, гормоны – производные аминокислот, стероидные гормоны, простагландины. Рецепторы гормонов. Роль циклических АМФ и ГМФ, ионов кальция как посредников в изменении ферментативной активности гормонами. Влияние гормонов на проницаемость клеточных мембран. Роль гормонов в индукции и репрессии синтеза ферментов.

Нервная регуляция обмена веществ. Образование медиаторов и нейрогормонов, химизм их воздействия на клеточную систему авторегуляции.

## **Раздел 2. БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ МЫШЕЧНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ**

### **Тема 9. БИОХИМИЯ МЫШЦ И МЫШЕЧНОГО СОКРАЩЕНИЯ**

**Лабораторный практикум.** Лабораторная работа №9: Выявление гликолиза в мышечной ткани

**Самостоятельная работа.** АТФ-азная активность миозина и ее роль в сократительной деятельности мышц. Взаимодействие актина и миозина в процессе сокращения. Химические реакции при расслаблении мышц. Роль АТФ в двухфазной мышечной деятельности. Связь показателей механической производительности мышц с особенностями их химического состава и строения, особенностями молекулярного строения миофибрилл.

**Основные знания, умения и навыки.** Студент должен знать химический состав мышечной ткани и последовательность химических реакций мышечного сокращения. Уметь объяснять химическую природу образования АТФ и роль ацетилхолина, ионов кальция и модуляторных белков в процессе мышечного сокращения. Обладать навыками биохимического анализа состава мышечной ткани.

### **Тема 10. ЭНЕРГЕТИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ МЫШЕЧНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ**

**Лабораторный практикум.** Лабораторная работа №10: Количественное определение креатина и креатинина в моче по методу Брауна

**Самостоятельная работа .** Молочная кислота, особенности ее влияния на обменные процессы при работе. Пути устранения молочной кислоты при работе и в период восстановления. Биохимические факторы, определяющие кинетические характеристики гликолиза и их изменение под влиянием специализированной тренировки. Ресинтез АТФ в процессе гликолиза. Роль гликолиза в энергетическом обеспечении мышечной работы.

**Основные знания, умения и навыки.** Студент должен знать аэробные и анаэробные пути ресинтеза АТФ при мышечной работе. Уметь различать особенности количественных характеристик биоэнергетических процессов: мощность, емкость, скорость развертывания, эффективность. Иметь навыки составления химической цепи ресинтеза креатинфосфата.

### **Тема 11. БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ОРГАНИЗМЕ ПРИ МЫШЕЧНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ РАЗЛИЧНОГО ХАРАКТЕРА.**

#### **БИОХИМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ ПРИ УТОМЛЕНИИ**

**Лабораторный практикум .** Лабораторная работа № 11: Определение кетоновых тел и глюкозы в моче

**Самостоятельная работа.** Утомление и выносливость. Биохимические изменения, приводящие к развитию утомления: истощение энергетических субстратов, нарушение гомеостаза внутренних сред организма, угнетение ферментативной активности продуктами «рабочего» обмена, нарушение пластического обеспечения функций, изменения нервной и гормональной регуляции. Роль «центральных» и «периферических» биохимических изменений в развитии утомления. Биохимические факторы, определяющие проявление выносливости.

**Основные знания, умения и навыки.** Знать основные биохимические сдвиги организма при утомлении. Уметь обозначать особенности биохимических изменений в критических условиях мышечной деятельности: на уровне «порога анаэробного обмена», на «критической» мощности, на «мощности истощения», на уровне максимальной анаэробной мощности, при выполнении упражнений разных зон относительной мощности. Иметь навык определения содержания кетоновых тел и глюкозы в моче.

### **Тема 12. БИОХИМИЧЕСКИЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ В ПЕРИОД ВОССТАНОВЛЕНИЯ**

## ПОСЛЕ МЫШЕЧНОЙ РАБОТЫ

**Лабораторный практикум.** Лабораторная работа № 12: Количественное определение мочевины в сыворотке крови и моче

**Самостоятельная работа.** Анаболическая фаза обмена веществ. Явление суперкомпенсации. Особенности регуляции обменных процессов в период восстановления. Биохимическое обоснование средств и методов ускорения восстановительных процессов.

**Основные знания, умения и навыки.** Необходимо знать направленность биохимических превращений в период восстановления. Уметь разрабатывать рекомендации по ускорению восстановительных процессов. Иметь навыки составления комплекса средств и методов ускорения восстановительных процессов с использованием биохимического анализа.

### Тема 13. БИОХИМИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ МЕТОДИКИ ЗАНЯТИЙ ФИЗИЧЕСКОЙ

**Самостоятельная работа.** Возрастные особенности протекания обменных процессов при занятиях адаптивной физической культурой. Биохимические особенности зрелого и стареющего организма. Возрастные изменения протекания обменных процессов, его регуляции, биохимического статуса организма в различные периоды после завершения роста. Нормализующее влияние систематических занятий физическими упражнениями на биохимические параметры зрелого и стареющего организма. Биохимическое обоснование методики применения специфических физических упражнений при коррекции отклонений в состоянии здоровья у лиц зрелого и пожилого возраста.

**Основные знания, умения и навыки.** Знать возрастные особенности протекания обменных процессов при занятиях адаптивной физической культурой. Уметь разрабатывать рекомендации при коррекции отклонений в состоянии здоровья у лиц зрелого и пожилого возраста. Иметь навыки составления комплекса упражнений с учетом возрастных особенностей и особенностей функционального состояния организма.

### Тема 14. БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ РАЦИОНАЛЬНОГО ПИТАНИЯ ПРИ ЗАНЯТИЯХ ФИЗИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРОЙ

**Самостоятельная работа.** Биохимическое обоснование «углеводной ориентации» питания спортсменов. Биохимическое обоснование особенностей питания спортсменов в дни тренировок и соревнований, особенностей питания «на дистанции», при сгонке веса, при тренировках и соревнованиях в условиях среднегорья. Химический состав и технология применения наиболее распространенных пищевых добавок, предназначенных для решения различных практических задач.

**Основные знания, умения и навыки.** Студент должен знать биохимию обмена энергии в результате питания. Иметь навык составления рациона питания в зависимости от профессиональной деятельности человека (квалификации и специализации спортсмена, умственного и физического труда, пола и возраста).

## 5. ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ, ПРАКТИКУМЫ

### Лабораторный практикум по дисциплине "Биохимия спорта"

#### Лабораторная работа № 1

#### Изучение кинетических свойств ферментов

Кинетика ферментативных реакций – это раздел энзимологии, который изучает зависимость скорости реакций, катализируемых ферментами, от химической природы реагирующих веществ (т.е. субстратов и ферментов) и от условий их взаимодействия, т.е. от температуры, концентрации компонентов, рН среды, состава среды, присутствия модификаторов и т.д. Изучение кинетики ферментативных реакций показывает не только их отличия от небиологических катализаторов, обусловленные прежде всего белковой природой ферментов, но и многообразие условий, от которых зависит правильное определение активности любого фермента.

Скорость реакции, т.е. убыль субстрата или прирост количества продукта за определенные промежутки времени, является мерой каталитической активности фермента или просто *активностью фермента*.

Использование методов качественного анализа субстратов и продуктов реакции позволяет

выявить присутствие фермента в биологическом материале, а количественное определение их дает возможность определить содержание фермента или его активность в расчете на единицу массы или объема исследуемого образца.

Кинетика ферментативных реакций на примере  $\alpha$ -амилазы слюны

**Реактивы.** Крахмал, 1%-ный раствор, свежеприготовленный; раствор иода в иодиде калия<sup>\*</sup>; фосфатно-цитратный буфер, 0,1 М с рН 5,6; 6,4; 6,8; 7,2 и 8,0<sup>\*</sup>.

**Оборудование.** Штатив с пробирками; водяная баня; лабораторный термометр; пипетки вместимостью 1 и 5 мл; бюретка вместимостью 25 мл; химические стаканы (для льда или снега).

**Материал.** Слюна разбавленная

**а. Зависимость скорости реакции от количества фермента.** Метод основан на определении скорости гидролиза крахмала, выявляемого пробой с иодом, в зависимости от количества добавленной  $\alpha$ -амилазы слюны.

**Ход определения.** Разводят исходную разбавленную слюну водой в пробирках в 20, 40, 80 и 160 раз. Берут четыре пробирки и вносят в каждую 1 мл одного из полученных разведений слюны. В пробирки из бюретки добавляют по 4 мл раствора крахмала, быстро помещают их в водяную баню при 38°C и засекают время начала реакции.

Через каждые 1-2 мин отбирают по 2 капли жидкости из каждой пробы и приливают к ним по 1 капле раствора иода в иодиде калия. Вначале пробы дают синее, затем красно-фиолетовое и, наконец, красное окрашивание.

Отмечают с точностью до 0,5 мин время от начала опыта до появления в каждой из четырех пробирок красного окрашивания – стадия образования эритродекстринов из крахмала.

**Оформление работы.** Результаты изобразить графически, откладывая по оси ординат  $v$  – скорость реакции (величина, обратная времени образования эритродекстринов), а по оси абсцисс [С] – относительную концентрацию амилазы (разведение). Сделать вывод о зависимости скорости реакции от концентрации фермента и сравнить с той же зависимостью для небиологических катализаторов.

**б. Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры.** Метод основан на определении скорости гидролиза  $\alpha$ -амилазой слюны крахмала в зависимости от температуры.

**Ход определения.** В пробирку помещают 5 капель слюны, кипятят 1-2 мин на водяной бане и остужают. В две другие помещают по 5 капель некипяченой слюны.

Вносят во все пробы по 10 капель раствора крахмала и ставят первую и вторую пробирки в водяную баню при 38°C, а третью – в воду со льдом или снегом на 3 мин. Затем прибавляют в каждую пробирку по 1 капле раствора иода в иодиде калия и сравнивают развивающуюся окраску.

**Оформление работы.** Данные оформляют в виде таблицы, делают вывод о зависимости ферментативной реакции от температуры и причинах этой зависимости.

Фермент	Субстрат	Окрашивание с иодом	Температура
---------	----------	---------------------	-------------

**в. Зависимость скорости ферментативной реакции от рН среды.** Метод основан на сравнении скорости гидролиза крахмала, определяемого пробой с иодом, под действием  $\alpha$ -амилазы слюны при разных рН среды. В результате устанавливается оптимум рН действия  $\alpha$ -амилазы.

**Ход определения.** В пять пробирок отмеривают по 10 капель растворов фосфатно-цитратного буфера со следующими значениями рН: 5,6; 6,4; 6,8; 7,2; 8,0. Прибавляют во все пробы по 5 капель разведенной в 10 раз слюны и по 10 капель раствора крахмала и ставят пробирки в водяную баню при 38°C. Через 1-2 мин отбирают по 1 капле содержимого в другие пробирки и приливают по 1 капле раствора иода в иодиде калия. Отмечают время наступления красного окрашивания (стадия образования эритродекстринов) в каждой из пяти проб.

**Оформление работы.** Данные оформить графически, откладывая по оси абсцисс значения рН среды и по оси ординат – время (в мин), которое необходимо для гидролиза крахмала до стадии эритродекстринов. Сделать вывод об оптимуме рН действия  $\alpha$ -амилазы слюны.

**Практическое значение работы.** Кинетические свойства ферментов изучаются для подбора оптимальных условий (концентрация субстрата, оптимум рН среды и температуры, ионный состав среды), определения активности ферментов в научных и клинических исследованиях, а также при стандартизации ферментных препаратов. Неверно подобранные стандартные условия определения конкретного фермента приводят к ошибкам в диагностике заболеваний и контроле качества ферментных препаратов.

#### 4. Специфичность действия ферментов

Ферменты в отличие от небиологических катализаторов обладают высокой специфичностью. Однако степень специфичности разных энзимов неодинакова, что позволяет клеткам живых организмов приспосабливаться к изменениям среды.

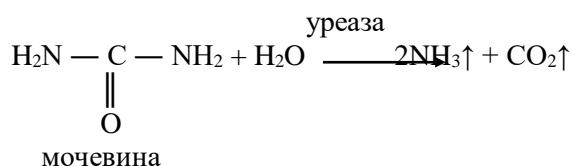
. Демонстрация абсолютной субстратной специфичности уреазы (карбамидагидролаза; КФ 3.5.1.5.)

**Реактивы.** Мочевина, 1%-ный раствор; тиомочевина, 1%-ный раствор; ацетамид, 1%-ный раствор; фенолфталеин, 0,5%-ный спиртовой раствор; лакмусовая бумага.

**Оборудование.** Аптечные весы с разновесами; штатив с пробирками; глазные пипетки; пипетки вместимостью 1 мл.

**Материал.** Соевая мука.

Метод основан на определении аммиака, образующегося под действием уреазы соевой муки на мочевины:



Выделение аммиака обнаруживается по запаху и по изменению окраски фенолфталеина и красной лакмусовой бумаги.

Сравнивают возможность гидролиза уреазой веществ, сходных по строению с мочевиной:



**Ход определения.** В одну пробирку помещают 1 мл раствора мочевины, во вторую – тиомочевины, в третью – ацетамида.

В каждую пробирку добавляют примерно 100 мг соевой муки и 2 капли раствора фенолфталеина, тщательно перемешивают стеклянной палочкой и оставляют стоять при комнатной температуре.

Следят за появлением розовой окраски содержимого в пробирках. Выделение аммиака обнаруживают также по запаху и с помощью влажной лакмусовой бумажки, которую подносят к отверстию пробирок. Сравнивают результаты выявления аммиака в трех пробах.

**Оформление работы.** Данные оформить в виде таблицы, сделать вывод о специфичности уреазы и ее практическом значении.

Фермент	Субстрат	<b>6. Пробы на аммиак</b>		
		Фенолфталеин	<b>7. Запах</b>	Лакмусовая бумага

**Практическое значение работы.** Ферменты с абсолютной субстратной специфичностью, к которым относится уреаса, катализируют превращение только одного вещества. Эти ферменты используют в клинической биохимии и фармации как аналитические реагенты для определения веществ, к которым они имеют абсолютную специфичность. Например, уреаса используется для определения мочевины в биологическом материале.

### Лабораторная работа №2 Выявление ферментов, относящихся к разным классам

Все ферменты в зависимости от типа катализируемых химических реакций делятся на шесть классов: оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы, лигазы (синтеказы). Внутри каждого класса ферменты подразделяются на подклассы, подподклассы, которые уточняют природу ферментативной реакции.

Для обнаружения ферментов каждого класса в биологическом материале имеются свои

особенности, поэтому необходимо определить условия для протекания ферментативной реакции. Качественные реакции на ферменты используются в клинике для обнаружения ферментов в мазках крови, биоптатах и микропрепаратах при энзимоцитохимических исследованиях, а также в гигиенической практике при постановке проб на присутствие ферментов в продуктах питания (молоко, картофель и т.д.). При разделении ферментов методом электрофореза их идентификацию также производят с помощью качественных реакций.

### Обнаружение оксидоредуктаз в биологическом материале

В реакциях, катализируемых оксидоредуктазами, окисляемый субстрат рассматривается как донор водорода или электронов, а акцептором могут быть природные вещества (коферменты – НАД, НАДФ, ФМН, ФАД, КоQ, кислород, органические соединения, цитохромы и др.) и ксенобиотики.

Для большинства ферментов этого класса рекомендуются названия: дегидрогеназы и редуктазы. В тех случаях, когда акцептором служит O<sub>2</sub>, используется термин оксидаза, а если кислород в ходе реакции включается в состав субстрата, то фермент называется оксигеназа. Пероксидаза является ферментом, использующим H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в качестве акцептора, а каталаза – ферментом, катализирующим реакции, где донорно- акцепторную пару составляют две молекулы H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Реактивы.** Формальдегид, 0,4%-ный раствор; метиленовый синий, 0,01%-ный раствор.

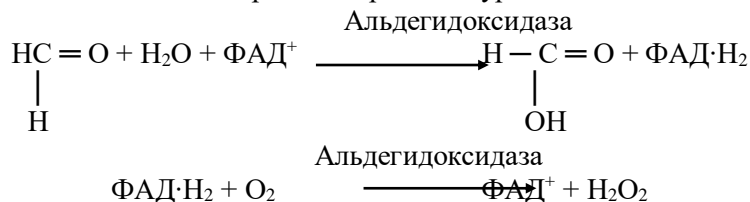
**Оборудование.** Штатив с пробирками; водяная баня; лабораторный термометр; пипетки вместимостью 1 и 5 мл.

**Материал.**

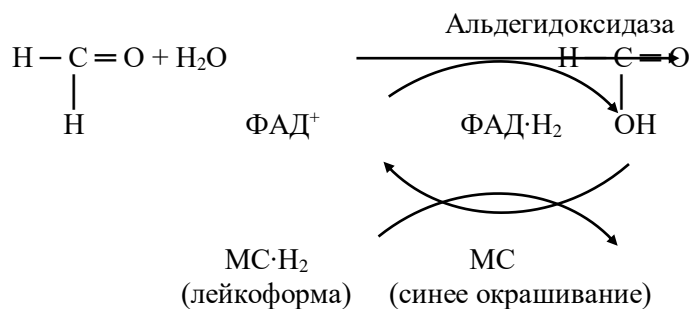
1. Картофельный сок (сырой картофель натирают на терке и отжимают через два слоя марли).
2. Свежее коровье молоко.

**а. Выявление альдегидоксидазы (альдегид: кислород оксидоредуктаза; КФ 1.2.3.1) в молоке.** Метод основан на визуальном наблюдении за обесцвечиванием метиленового синего (МС), связывающего водород, который отщепляется с участием альдегидоксидазы от субстрата.

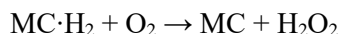
Альдегидоксидаза катализирует реакцию дегидрирования различных альдегидов, например, формальдегида. Водород переносится на ФАД<sup>+</sup>, являющийся коферментом данного фермента, а затем на конечный акцептор – кислород – по уравнению



При добавлении МС – искусственного акцептора водорода – в бескислородных условиях образуется его восстановленная форма (лейкоформа) МС·Н<sub>2</sub>:



Если бесцветный раствор метиленового синего встряхнуть, то он вновь приобретет синюю окраску:



**Ход определения.** В две пробирки вносят по 5 мл свежего молока и добавляют в первую 1 мл воды, а во вторую такой же объем раствора формальдегида. В обе пробы приливают по 1 мл раствора метиленового синего, содержимое перемешивают и приливают 3-4 капли вазелинового масла (для предохранения жидкой смеси от контакта с кислородом воздуха).

Пробирки ставят в водяную баню, нагретую до 37°C. Через 5-10 мин сравнивают изменение окрашивания в пробах. Сильно встряхнув, вновь отмечают переход окраски.

**б. Выявление пероксидазы (донор: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> оксидоредуктаза; КФ 1.11.1.7) в картофеле и в молоке.** В основе метода лежит реакция с бензидином (см. работу 9, а).

Ход определения. В две пробирки наливают по 1 мл соответственно сырого молока и картофельного сока. Добавляют в обе пробы по 5 капель спиртового раствора бензидина и по капле раствора пероксида водорода. Отмечают характерное окрашивание.

Оформление работы. Результаты занести в таблицу и отметить характерное окрашивание индикатора реакции.

Материал	Выявленный фермент	Субстрат (донор)	8. Акцептор	Индикатор реакции	Результат
----------	--------------------	------------------	-------------	-------------------	-----------

В выводах указать на присутствие в биологическом материале изучаемых ферментов и практическое значение работы.

### Лабораторная работа № 3.

#### Открытие углеводов

##### Цель работы:

- 1 ознакомить студентов с методиками проведения качественных реакций на углеводы;
- 2 закрепить представления об особенностях строения молекул углеводов;
- 3 выработать навыки обращения с химической посудой, реактивами;
- 4 ознакомить со способами утилизации отработанных реактивов;
- 5 привить навыки работы со справочной литературой и оформления отчета по лабораторной работе

К природным высокомолекулярным соединениям относятся углеводы, белки, нуклеиновые кислоты.

Углеводы (сахара) – обширная группа природных органических соединений, химическая структура которых часто отвечает общей формуле C<sub>m</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>, т.е. углерод + вода. Используемый термин возник более 100 лет назад, когда так называли природные соединения, отвечающие формуле (CН<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>, т.е. гидраты углерода. Углеводы включают соединения, начиная с низкомолекулярных, содержащих всего несколько атомов углерода, до веществ, молекулярная масса которых достигает нескольких миллионов.

**Реактивы и оборудование:** 0,5 г α-нафтола, спирт, 0,5 г резорцина, 20% соляная кислота, 0,25 г орцина, 30% соляная кислота (ρ = 1,15 г/мл), 10% раствор хлорного железа, 13,3 г кристаллического сульфата меди, дистиллированная вода, едкий натр, глицерин, 1% раствор сахарозы, 1% спиртовой раствор тимола, 1% раствор фруктозы, 1% раствор пентозы, концентрированная соляная кислота, анилин, 10 % раствор гидроокиси натрия, фильтровальная бумага, 10% раствор уксусной кислоты, 1% раствор глюкозы, мальтозы, сахарозы и крахмала, 10% раствор гидроокиси натрия и 5% раствор сульфата меди, безводный карбонат натрия.

По химической природе углеводы представляют собой альдегиды или кетоны многоатомных спиртов. Для жизнедеятельности организма большое значение имеют отдельные представители моносахаридов (глюкоза, галактоза, фруктоза, рибоза, дезоксирибоза и др.), олигосахаридов (сахароза, лактоза и др.), полисахаридов (гликоген, крахмал), в том числе мукополисахаридов (гиалуроновая кислот, гепарин, хондроитинсульфаты и др.).

**Приготовление реактивов:** 0,5 г α-нафтола растворяют в 50 мл спирта. Перед употреблением разводят водой в 5 раз.

*Реактив Селиванова:* 0,5 г резорцина растворяют в 100 мл 20% соляной кислоты.

*Орциновый реактив:* 0,25 г орцина растворяют в 125 мл 30% соляной кислоты (ρ = 1,15 г/мл) к раствору добавляют 1 мл 10% раствора хлорного железа. Хранят в темной плотно закрытой склянке.

*Реактив Гайнеса:* а) 13,3 г кристаллического сульфата меди растворяют в 400 мл дистиллированной воды; б) 50 г едкого натра растворяют в 400 мл воды; в) 15 г глицерина



растворяют в 800 л воды. Для приготовления реактива Гайнеса смешивают реактивы «а» и «б», после чего к ним прибавляют реактив «в».

### Качественные реакции на углеводы.

#### Обнаружение углеводов в экстрактах из растительных материалов

**Материал исследования:** 1% растворы глюкозы, фруктозы, мальтозы, сахарозы и крахмала, морковь, яблоко, капуста и раствор меда.

**Реактивы:** 10% раствор NaOH, 5% раствор  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 10% спиртовой раствор  $\alpha$ -нафтола,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (конц.), реактив Фелинга, реактив Барфедда (6-7% раствор  $(\text{CH}_3\text{COOH})_2\text{Cu}$  растворяют в 1% растворе  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), реактив Селиванова (0,05 г резорцина растворяют в 100 мл разбавленной 1:1 HCl).

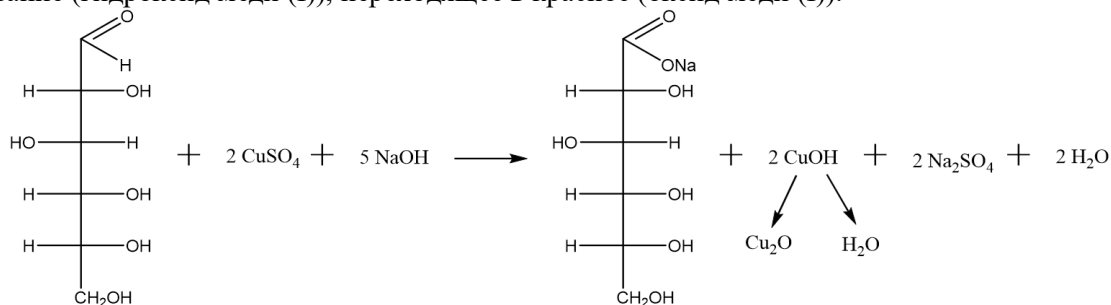
**Приборы и оборудование:** термоустойчивые стаканы на 100 мл, пробирки, пипетки, воронки, стеклянные палочки, фильтры (бумажные и марлевые), водяная баня, спиртовки, терки, ступки керамические, держатели, весы электронные.

#### Экспериментальная часть

#### Часть А. Качественные реакции на углеводы

##### 1. Реакция Троммера.

В 5 пробирок наливают по 1 мл 1% растворов глюкозы, фруктозы, мальтозы, сахарозы и крахмала, добавляют равный объем 10% раствора гидроксида натрия. К смеси прибавляют при встряхивании по каплям 5% раствор сульфата меди до появления не исчезающей мути гидроксида меди (II). Осторожно нагревают верхнюю часть содержимого пробирки. Появляется желтое окрашивание (гидроксид меди (I)), переходящее в красное (оксид меди (I)).



##### 2. Реакция с фелинговой жидкостью.

В 5 пробирок наливают по 1 мл 1% растворов глюкозы, фруктозы, мальтозы, сахарозы, крахмала и добавляют равный объем фелинговой жидкости (смешивают по 5 мл растворы 1 и 2: раствор 1 - в 100 мл воды растворяют 3,5 г медного купороса (крист.); раствор 2 - в 100 мл воды растворяют 17,3 г сегнетовой соли (крист.) и 6 г гидроксида натрия). Смесь нагревают до начала кипения. В некоторых пробирках образуется красный осадок.

Механизм реакции редуцирующих углеводов с фелинговой жидкостью такой же, как и реакции Троммера. Преимуществом фелинговой жидкости является то, что медь при избытке реактива не выпадает в виде оксида меди (II).

##### 3. Реакция Барфедда (отличие восстанавливающих дисахаридов от моносахаридов).

В 3 пробирки приливают по 5 мл раствора реактива Барфедда и добавляют по 1 мл 1% растворов глюкозы, мальтозы, и сахарозы. Смесь нагревают на водяной бане в течение 10 мин. В некоторых пробирках образуется красный осадок.

Проба Барфедда отличается тем, что окисление сахара протекает не в щелочной среде, а в среде, близкой к нейтральной. В этих условиях редуцирующие дисахариды в противоположность моносахаридам практически не окисляются, что позволяет отличить их от моносахаридов.

##### 4. Реакция Подобедова-Молиша с $\alpha$ -нафтолом.

Является чувствительной на все углеводы. В 5 пробирок наливают по 1 мл 1% растворов глюкозы, фруктозы, мальтозы, сахарозы и крахмала, добавляют 2 капли  $\alpha$ -нафтола и осторожно по стенке приливают 2 мл концентрированной серной кислоты (**не перемешивать!**). На границе двух жидкостей возникает буро-фиолетовое кольцо.

Фурфурол и 5-оксиметилфурфурол, образующиеся из углеводов под действием серной кислоты, конденсируясь с 2 моль сульфированного  $\alpha$ -нафтола, дают триарилметановый хромоген, который окисляется серной кислотой в окрашенное хиноидное соединение.

##### 5. Реакция Селиванова на кетозы.

В две пробирки наливают по 3 мл реактива Селиванова в одну из них добавляют 3 капли

раствора фруктозы, а в другую 3 капли раствора глюкозы. Помещают пробирки в водяную баню при 80<sup>0</sup>С и держат 8 мин. В пробирке с фруктозой развивается красное окрашивание.

При нагревании фруктозы (и других кетогексоз) с соляной кислотой образуется оксиметилфурфурол, который с резорцином образует соединение, окрашенное в вишнево-красный цвет. Альдозы также дают эту реакцию, но реакция у них протекает медленнее и в особых условиях (температура и кислотность среды).

#### 6. Открытие крахмала

**Ход работы.** В пробирку вносят 10 капель 1% раствора крахмала и каплю 1% раствора йода в йодиде калия. Наблюдается сине-фиолетовое окрашивание.

Результаты реакций занесите в таблицу 1.

Таблица 1.

Реакции	Углеводы				
	Глюкоза	Фруктоза	Мальтоза	Сахароза	Крахмал
Реакция Троммера					
Реакция с фелинговой жидкостью					
Реакция Барфедда					
Реакция Подобедова-Молиша с α-нафтолом					
Реакция Селиванова					

#### Порядок работы

1. Получить у преподавателя задание.
2. Выполнить работу согласно методическим рекомендациям.
3. Оформить отчет.
4. Вылить отработанные растворы, посуду вымыть. Сдать рабочее место.

#### Содержание отчета

1. Тема, цель и задачи работы.
2. Наблюдения.
3. Выводы по проделанной работе.

**Реакция на обнаружение углеводов.** С помощью реакции с α-нафтолом или тимолом обнаруживаются незначительные количества углеводов или углеводных компонентов в сложных соединениях.

**Ход работы.** В две пробирки вносят по 10 капель 1% раствора сахарозы. Затем в одну из них добавляют 3 капли 1% спиртового раствора α-нафтола, а в другую – такое же количество 1% спиртового раствора тимола. В обе пробирки осторожно настилают по 0,5 мл концентрированной серной кислоты и на границе двух жидкостей наблюдают фиолетовое окрашивание в пробирке с α-нафтолом и красное в пробирке с тимолом.

**Открытие фруктозы (реакция Селиванова).** Кетогексозы (фруктоза) при нагревании с соляной кислотой и резорцином дают вишнево-красное окрашивание.

**Ход работы.** В пробирку наливают 10 капель реактива Селиванова и 2 капли 1% раствора фруктозы и осторожно нагревают. Развивается красное окрашивание.

**Открытие пентоз.** Пентозы при нагревании с концентрированными кислотами теряют воду и превращаются в фурфурол, который при взаимодействии с орцином дает зеленое окрашивание, а с анилином – красное.

**Ход работы.** В пробирку наливают 10 капель орцинового реактива, нагревают до кипения и быстро добавляют 2-3 капли мочи или раствора пентозы. Развивается сине-зеленое окрашивание.

Пробирку с 10 каплями 1% раствора пентозы (рибоза, арабиноза, ксилоза) и 10 каплями

концентрированной соляной кислоты осторожно нагревают до кипения, и после охлаждения вносят в нее 5 капель анилина и 5 капель ледяной уксусной кислоты. Раствор окрашивается в красный цвет.

**Открытие лактозы. Ход работы.** К 1 мл мочи добавляют 0,5 мл концентрированного аммиака и 3 капли 10 % гидроксида натрия. Нагревают до кипения. Появляется ярко-желтое окрашивание, свидетельствующее о наличии в моче лактозы и галактозы.

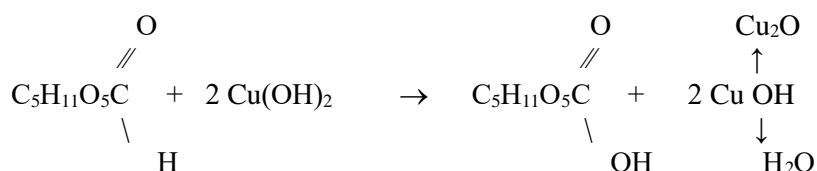
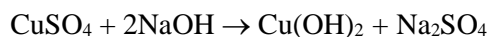
**Открытие мукополисахаридов. Ход работы.** 15 капель мочи наносят на фильтровальную бумагу и высушивают. Затем опускают в раствор толуидинового синего, после чего бумагу отмывают 10% раствором уксусной кислоты. Пурпурная окраска свидетельствует о наличии в моче мукополисахаридов.

#### Свойства углеводов

Среди различных свойств углеводов их способность восстанавливать металлы из окислов широко используется для открытия углеводов в клинике, в частности для обнаружения глюкозы в крови и моче.

**Реакции на восстанавливающие свойства сахаров.** Моносахариды, как и некоторые дисахариды, имеющие свободную карбонильную группу (мальтоза, лактоза), обладают способностью восстанавливать в щелочной среде металлы из окислов в закисную форму или в свободное состояние.

а) **Реакция Троммера.** Глюкоза в щелочной среде восстанавливает окись меди в закись, а сама окисляется до глюконовой кислоты:



**Ход работы.** В 4 пробирки вносят по 10 капель последовательно в каждую 1% растворы глюкозы, мальтозы, сахарозы и крахмала, а затем добавляют по 10 капель 10% раствора гидроксида натрия и по 1 капле 5% раствора сульфата меди и осторожно нагревают до кипения. Выпадает красный осадок ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ) в пробирках №1 и №2.

#### б) Проба Гайнеса

Принцип метода заключается в способности глюкозы восстанавливать при нагревании в щелочной среде гидрат окиси меди в закись меди красного цвета.

**Ход работы.** К 3-4 мл реактива Гайнеса прибавляют 8-12 капель мочи. Нагревают верхнюю часть смеси. Наблюдают переход бледно-голубого цвета в желтый, а затем в красный.

### Определение содержания глюкозы в крови о-толуидиновым методом

**Реактивы.** Трихлоруксусная кислота, 30 г/л раствор; о-толуидиновый реактив\*; глюкоза, основной стандартный 27,8 мМ раствор, свежеприготовленный.

**Оборудование.** Штатив с пробирками; пипетки вместимостью 0,1, 1 и 5 мл; водяная баня; центрифуга с центрифужными весами; ФЭК.

**Материал.** Кровь, взятая из пальца.

Метод основан на способности глюкозы при нагревании с о-толуидином в растворе уксусной кислоты давать зеленое окрашивание, интенсивность которого пропорциональна концентрации глюкозы.

**Ход определения.** В центрифужную пробирку отмеряют 0,9 мл раствора трихлоруксусной кислоты. Из пальца обследуемого берут микропипеткой 0,1 мл крови и выдувают в пробирку с трихлоруксусной кислотой. Смесь в пробирке перемешивают встряхиванием и центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин.

Отбирают 0,5 мл центрифугата в другую пробирку и добавляют в нее 2 мл о-толуидинового реактива. Пробирку помещают в кипящую водяную баню на 8 мин, после чего охлаждают под струей холодной воды.

Для постановки стандартной пробы вместо крови берут 0,1 мл разведенного в 5 раз стандартного раствора глюкозы, добавляют 0,9 мл раствора трихлоруксусной кислоты и с 0,5 мл полученной смеси проводят реакцию с о-толуидиновым реактивом.

Фотометрируют опытную и стандартные пробы на ФЭКе при 590-650 нм (красный светофильтр) в кювете с толщиной слоя 0,5 см в сравнении с дистиллированной водой.

Расчет. Содержание глюкозы в крови  $x$  (моль/л) рассчитывают по формуле

$$x = \frac{E_{\text{оп}} C_{\text{ст}}}{E_{\text{ст}}},$$

где  $E_{\text{оп}}$  – экстинкция опыта,

$E_{\text{ст}}$  – экстинкция стандарта;

$C_{\text{ст}}$  – концентрация глюкозы в стандартной пробе, равная 5,55 ммоль/л.

Оформление работы. Рассчитать концентрацию глюкозы в крови обследуемого и сделать вывод о причинах возможных изменений ее уровня.

Практическое значение работы. Методы, применяемые для определения глюкозы, не всегда дают истинное содержание ее в крови, поэтому существуют понятия – «истинная» глюкоза и сахар крови. Последний показатель включает всю сумму восстанавливающих углеводов и некоторые редуцирующие вещества неуглеводной природы (глутатион, креатин, мочевиная кислота). Поэтому содержание сахара в крови выше, чем показатель истинной глюкозы.

Среди методов, позволяющих определить концентрацию истинной глюкозы в биологическом материале, следует отметить о-толуидиновый и глюкозооксидазный.

В норме содержание сахара в крови составляет 0,8-1,2 г/л, а глюкозы – 2,8-4,0 ммоль/л. Увеличение уровня сахара в крови (гипергликемия) наблюдается при сахарном диабете, при избытке в организме глюкокортикоидов – гормонов коры надпочечников, при стрессовых состояниях, при употреблении с пищей большого количества углеводов и т.д. Низкое содержание сахара в крови (гипогликемия) имеет место при голодании, нарушении всасывания глюкозы в тонком кишечнике (малосорбция), при избытке инсулина в организме (гиперинсулинизм) и т.д.

### **Количественное определение содержания глюкозы в крови глюкозооксидазным методом**

Реактивы. 5%-ный раствор трихлоруксусной кислоты; натрий фосфат двузамещенный, 0,25 моль/л\*; раствор глюкозооксидазы\*; фенолфталин 0,5%; рабочий реактив\*.

Оборудование. Штатив с пробирками; пипетки вместимостью 0,1; 1,0; 2,0 мл; центрифуга с центрифужными весами; ФЭК.

Материал. Кровь, взятая из пальца.

Метод основан на способности глюкозооксидазы при определенном оптимуме рН действия катализировать распад глюкозы с образованием перекиси водорода. Образующаяся перекись водорода в присутствии ионов меди окисляет фенолфталин до фенолфталеина, который в нейтральной области бесцветен, а в щелочной области окрашен в красный цвет.

Ход определения. 0,03 мл крови выливают в 1,5 мл 5% раствора трихлоруксусной кислоты, перемешивают и центрифугируют. К 1 мл надосадочной жидкости добавляют 2 мл 0,25 моль/л фосфата натрия и 2 капли (приблизительно 0,1 мл) раствора глюкозооксидазы. Перемешивают и оставляют стоять при комнатной температуре на 1 час, затем добавляют 2 мл рабочего реактива и через 30 мин фотометрируют в кювете на 10 мм при длине волны 530 нм (зеленый светофильтр).

Одновременно ставят контрольную пробу, в которую берут 1 мл 5% раствора трихлоруксусной кислоты и далее проводят как и опытную пробу.

Расчет. Расчет проводят по калибровочному графику.

Оформление работы. По экстинкции рассчитывают содержание глюкозы в крови, сравнивают ее содержание с нормой и делают вывод о возможных отклонениях.

Практическое значение работы. (См. определение содержания глюкозы в крови орто-толуидиновым методом).

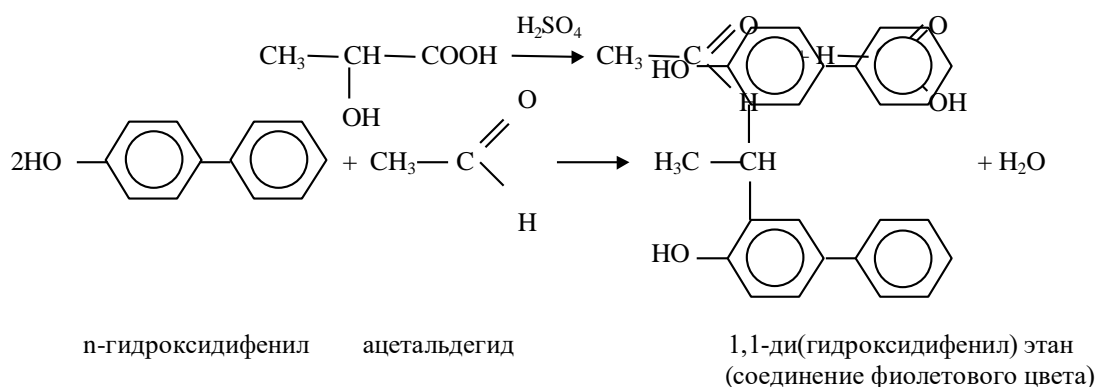
### **Определение содержания молочной кислоты в крови по Баркеру и Саммерсону**

**Реактивы.** Трихлоруксусная кислота, 20%-ный раствор; сульфат меди (II), 20%-ный и 4%-ный растворы; оксид кальция, порошок, навеска 0,5 г; серная кислота, конц.; п-гидроксифенил, свежеприготовленный щелочной раствор (50 мг п-гидроксифенила растворяют в 3 мл 3%-ного раствора гидроксида натрия).

**Оборудование.** Водяная баня с лабораторным термометром; штатив с пробирками; пипетки на 0,1 и 1 мл; стеклянные палочки; центрифуга с центрифужными весами; ФЭК.

**Материал.** Кровь, взятая из пальца.

Метод основан на способности молочной кислоты при нагревании с концентрированной серной кислотой переходить в ацетальдегид, дающий с п-гидроксифенилом характерную фиолетовую окраску, интенсивность которой пропорциональна концентрации молочной кислоты:



**Ход определения.** В центрифужную пробирку отмеривают 0,5 мл дистиллированной воды и вносят в нее 0,1 мл крови, взятой микропипеткой из пальца обследуемого. Микропипетку промывают той же водой.

К содержимому пробирки добавляют 1 мл раствора уксусной кислоты и помещают ее на 10 мин в лед (для лучшего осаждения белков), после чего центрифугируют 5 мин при 3000 об/мин.

Надосадочную жидкость сливают в чистую центрифужную пробирку, добавляют 0,5 мл 20%-ного раствора сульфата меди и 0,5 г порошка оксида кальция и тщательно перемешивают стеклянной палочкой. Появляется голубое окрашивание (если окрашивание зеленоватое, то проба дальнейшей обработке не подвергается). Смесь оставляют стоять на 30 мин, периодически помешивая стеклянной палочкой. Затем ее центрифугируют 5 мин при 100 об/мин.

Надосадочную жидкость сливают в чистую пробирку, приливают 1 каплю 4%-ного сульфата меди и осторожно настилают 3 мл концентрированной серной кислоты, погружив при этом пробирку в лед и непрерывно помешивая содержимое стеклянной палочкой. После этого пробирку помещают в кипящую водяную баню на 5 мин и затем охлаждают ее в водяной бане до  $20^\circ\text{C}$ .

К охлажденной смеси приливают 1 каплю (0,05 мл щелочного раствора п-гидроксифенила) и ставят пробирку в водяную баню при  $30^\circ\text{C}$  на 30 мин, время от времени взбалтывая содержимое. В пробирке за это время развивается голубое окрашивание. Пробирку помещают на 90 с (**точно!**) в бурно кипящую водяную баню. За это время голубая окраска переходит в фиолетовую. Затем смесь охлаждают и фотометрируют на ФЭКе при 540 нм (светофильтр зеленый) в кювете с толщиной слоя 1,0 см против воды.

**Расчет.** Содержание молочной кислоты  $x$  (ммоль/л) рассчитывают по формуле

$$x = \frac{c \cdot 1000}{0,1 \cdot 1000},$$

где  $c$  – количество молочной кислоты в пробе, найденное по калибровочному графику, ммоль;

0,1 – объем крови, взятый на исследование, мл;

1000 в числителе – коэффициент пересчета на 1 л крови;

1000 в знаменателе – коэффициент перевода микромолей в миллимоли.

Оформление работы. Рассчитать содержание молочной кислоты в крови обследуемого. В выводе указать на возможные сдвиги концентрации молочной кислоты и их причины.

Практическое значение работы. В норме содержание молочной кислоты в крови составляет 0,50-2,0 ммоль/л. Увеличение ее содержания может наблюдаться при усиленной мышечной работе, при заболеваниях, сопровождающихся развитием гипоксии (недостаточность сердечной деятельности, хронические бронхиты, анемия и т.д.).

#### **Определение содержания пировиноградной кислоты в крови по Фридеману и Хаугену**

Реактивы. Трихлоруксусная кислота, 5%-ный раствор; 2,4-динитрофенилгидразин (2,4-ДНФГ), 0,1%-ный раствор в 2 М растворе соляной кислоты; толуол; карбонат натрия, 10%-ный раствор; гидроксид натрия, 1,5 М раствор.

Оборудование. Пенициллиновые флакончики с полиэтиленовыми пробками; штатив с пробирками; пипетки вместимостью 1 и 5 мл; бюретка вместимостью 25 мл; пипетка с резиновой грушей; центрифуга с центрифужными весами; ФЭК.

Материал. Кровь.

Принцип метода см. работу 31.

Ход определения. В центрифужную пробирку вносят 1 мл крови, приливают 4 мл раствора трихлоруксусной кислоты, перемешивают встряхиванием и центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин.

В пенициллиновый флакон отбирают 1 мл центрифугата, прибавляют 2 мл воды и 1 мл раствора 2,4-ДНФГ, перемешивают встряхиванием, закрывают пробкой и ставят в темное место на 20 мин.

К содержимому флакона добавляют 5 мл толуола, закрывают флакон пробкой и встряхивают 3 мин. После расслоения фаз отсасывают пипеткой с резиновой грушей нижний слой и отбрасывают его.

К оставшемуся во флаконе слою толуола приливают 4 мл раствора карбоната натрия, закрывают флакон пробкой и встряхивают 3 мин. После расслоения жидкостей отбирают из нижнего слоя 3 мл в пробирку и добавляют в нее 3 мл раствора гидроксида натрия (появляется красно-бурое окрашивание).

Через 5 мин фотометрируют пробу на ФЭКе при 415 нм (светофильтр синий) в кювете с толщиной слоя 1 см против воды.

Расчет. Содержание пировиноградной кислоты  $x$  (ммоль/л) рассчитывают по формуле

$$x = \frac{c \cdot 1000 \cdot 3}{4 \cdot 1000},$$

где  $c$  – количество пировиноградной кислоты в пробе, найденное по калибровочному графику, мкмоль;

1000 в числителе – коэффициент пересчета на литр крови;

1000 в знаменателе – коэффициент пересчета мкмоль в ммоль;

4 – объем добавленного раствора карбоната натрия, мл;

3 – объем раствора карбоната натрия, отобранного для проведения реакции, мл.

Оформление работы. По полученному значению экстинкции рассчитать содержание пировиноградной кислоты в крови и сделать вывод о причине возможных его изменений.

Практическое значение работы. В норме содержание пирувата в крови составляет 0,1-0,13 ммоль/л. Его уровень повышается при недостатке в организме тиамина (витамина В<sub>1</sub>), а также в результате действия ингибиторов пируватоксидантного комплекса (арсенат, люизит и др.).

#### **Лабораторная работа № 4.**

##### **Определение липопротеидов в сыворотке крови**

##### **4.1. Определение содержания $\beta$ - и пре- $\beta$ -липопротеидов**

##### **сыворотки крови турбидиметрическим методом по Бурштейну и Самай**

Реактивы. Хлорид кальция, 0,025 М раствор; гепарин, содержащий 1000 единиц в 1 мл.

Оборудование. Микропипетки; ФЭК.

Материал. Сыворотка крови.

Метод основан на способности гепарина образовывать с  $\beta$ - и пре- $\beta$ -липопротеидами сыворотки крови комплекс, который под действием хлорида кальция выпадает в осадок. Степень помутнения раствора пропорциональна содержанию этих липопротеидов в сыворотке крови.

Ход определения. В контрольную и опытную кюветы ФЭКа с толщиной слоя 0,5 см наливают по 2 мл хлорида кальция. Устанавливают шкалу прибора на нулевую отметку при 720 нм (красный светофильтр).

В опытную кювету приливают микропипеткой 0,2 мл сыворотки, несколько раз промывая пипетку. Отмечают исходное значение экстинкции ( $E_1$ ). Затем добавляют микропипеткой 0,04 мл гепарина, несколько раз промывая ее, и перемешивают содержимое кюветы. Ровно через 4 мин (по секундомеру) вновь измеряют экстинкцию ( $E_2$ ).

Расчет. Содержание  $\beta$ - и пре- $\beta$ -липопротеидов  $x$  (г/л) в сыворотке крови рассчитывают по формуле

$$x = (E_2 - E_1)11,65 ,$$

где 11,65 – эмпирический коэффициент пересчета содержания  $\beta$ - и пре- $\beta$ -липопротеидов на г/л.

Оформление работы. По полученным значениям экстинкции рассчитать содержание определяемых липопротеидов в сыворотке крови и сделать вывод о возможных их изменениях.

Практическое значение работы. В норме содержание липопротеидов в сыворотке крови составляет 3,6-6,5 г/л. Наиболее часто наблюдается увеличение содержания  $\beta$ -липопротеидов в сыворотке крови. Повышение уровня липопротеидов тесно связано с повышением содержания холестерина в крови; им наиболее богаты  $\beta$ -липопротеиды. Повышение  $\beta$ - и пре- $\beta$ -липопротеидов имеет место при заболеваниях, связанных с нарушением липидного обмена (атеросклероз, сахарный диабет и др.). Концентрация  $\beta$ - и пре- $\beta$ -липопротеидов в сыворотке крови имеет значение не только для выявления нарушений липидного обмена, но и как показатель функции печени (гепатиты).

#### 4.2. Определение содержания холестерина в сыворотке крови по методу Илька

Реактивы. Реактив Илька\*.

Оборудование. Пипетка для отмеривания концентрированных кислот; термостат, отрегулированный на 37°C; микропипетки; штатив с пробирками; ФЭК.

Материал. Сыворотка крови.

Метод основан на реакции Либермана-Бурхарда (см. работу 18, б). Интенсивность изумрудно-зеленой окраски пропорциональна содержанию холестерина.

Ход определения. В пробирку вносят 2,1 мл реактива Илька и приливают 0,1 мл негеомолизованной сыворотки крови, которую добавляют медленно, так чтобы она стекла по стенке пробирки. Пробирку энергично встряхивают 10-12 раз и помещают в термостат на 20 мин при 37°C. Фотометрируют на ФЭКе при 630-690 нм (красный светофильтр) в кювете с толщиной слоя 0,5 см против реактива Илька.

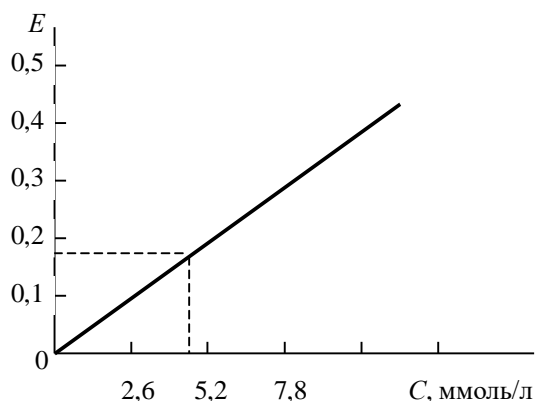


Рис. 7. Калибровочный график для определения содержания холестерина в сыворотке крови методом Илька.

Примечание. При проведении реакции нужно пользоваться абсолютно чистыми и сухими пробирками и пипетками. Соотношение компонентов реактива Илька рассчитано так, что белки сыворотки крови не выпадают в осадок. Появление мути может быть вызвано лишь наличием воды в реактиве или посуде.

Расчет. Содержание холестерина определяют по калибровочному графику (рис. 7).

Оформление работы. Рассчитать содержание холестерина в исследуемой сыворотке крови и по результатам сделать вывод о возможных нарушениях в обмене холестерина.

Практическое значение работы. Содержание холестерина в сыворотке крови у здоровых людей, определенное методом Ильяка, составляет 3,0-6,2 ммоль/л. Повышенная концентрация холестерина в сыворотке крови (гиперхолестеринемия) наблюдается при атеросклерозе, сахарном диабете, врожденных нарушениях обмена, заболеваниях печени и т.д.

#### 4.3. Определение содержания общих фосфолипидов в сыворотке крови

Метод основан на определении концентрации органического фосфата, освободившегося при кислотном гидролизе. Измерение содержания неорганического фосфата проводится реакцией с молибдатом аммония, принцип которой см. работу 11.

Реактивы. Трихлоруксусная кислота, 0,6 М раствор; реактив молибдата аммония\* ; хлорная кислота, конц.; восстанавливающий реактив\*.

Оборудование. Фильтровальная бумага; центрифуга с центрифужными весами; штатив с пробирками; пипетки для забора концентрированных кислот; пипетки вместимостью 0,1; 1 и 5 мл; песчаная баня; ФЭК.

Материал. Сыворотка крови.

Ход определения. В опытную пробирку вносят 0,2 мл сыворотки и 2,8 мл дистиллированной воды, в контрольную – 3 мл дистиллированной воды. Добавляют в обе пробирки по 3 мл раствора трихлоруксусной кислоты и встряхивают для перемешивания содержимого.

Центрифугируют опытную пробу 15 мин при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость сливают, пробирку переворачивают на фильтровальную бумагу до полного стекания жидкости. Затем в обе пробирки приливают по 1 мл концентрированной хлорной кислоты (*специальной пипеткой, осторожно!*), помещают в каждую из них по две стеклянные бусинки и встряхивают их содержимое. Пробы ставят на гидролиз в песчаную баню при 180°С на 20-30 мин (до обесцвечивания раствора).

Пробирки охлаждают на воздухе до комнатной температуры, прибавляют по 3 мл дистиллированной воды, по 1 мл реактива молибдата аммония и по 1 мл свежеприготовленного восстанавливающего реактива. Тщательно перемешивают содержимое пробирок и оставляют на 10 мин при комнатной температуре.

Фотометрируют опытную пробу против контрольной на ФЭКе при 630 нм (красный светофильтр) в кювете с толщиной слоя 0,5 см.

Расчет. Содержание общих фосфолипидов  $x$  (г/л) в сыворотке крови рассчитывают по формуле

$$x = \frac{m5000 \cdot 25}{10},$$

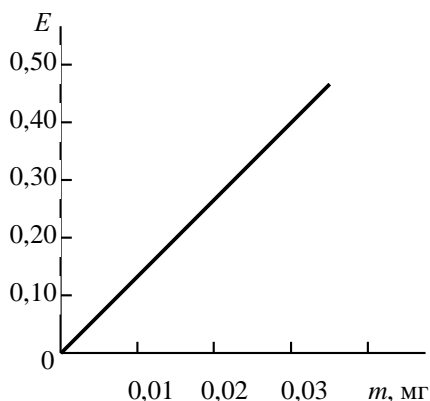


Рис. 8. Калибровочный график для определения содержания фосфолипидов в сыворотке крови (по неорганическому фосфору)

где  $m$  – масса неорганического фосфата в пробе, найденная по калибровочному графику (рис. 8), мг; 5000 – коэффициент пересчета на литр сыворотки крови; 10 – коэффициент пересчета миллиграммов в граммы; 25 – коэффициент пересчета (липидный фосфор составляет 4% относительной молекулярной массы фосфолипидов).

Для пересчета липидного фосфора на ммоль/л необходимо полученные результаты умножить на коэффициент 0,323.

Оформление работы. По полученному значению экстинкции рассчитать содержание общих фосфолипидов и липидного фосфора в сыворотке крови. Сделать вывод относительно полученных данных.

Практическое значение работы. Фосфолипиды сыворотки (плазмы) крови входят в состав



липопротеидов, обуславливая вместе с белком полярные свойства этих смешанных макромолекул и их растворимость. В норме содержание общих фосфолипидов составляет 1,5-3,6 г/л, или 2,0-3,5 ммоль/л липидного фосфора. Важным показателем является индекс фосфолипиды/холестерин, который в физиологических условиях равен 1-1,5. Этот индекс снижается при атеросклерозе, гипертонической болезни, заболеваниях печени. Повышение концентрации фосфолипидов в сыворотке крови (гиперфосфолипидемия) наблюдается при сахарном диабете, гипотиреозе, при поражении почек и т.д. Пониженный уровень их встречается при тяжелых формах острого гепатита, жировом перерождении печени, тиреотоксикозе.

## Лабораторная работа № 5

### Качественные (цветные) реакции на функциональные группы белков и аминокислот

Реактивы. Биуретовый реактив\* (содержит NaOH и ионы  $\text{Cu}^{2+}$ )<sup>1</sup>, нингидрин, 0,5%-ный водный раствор; азотная кислота, конц.; гидроксид натрия, 20%-ный раствор; реактив Миллона\*; уксусная кислота, ледяная; серная кислота, конц.; ацетат свинца, 5%-ный раствор; нитропруссид натрия, 5%-ный раствор.

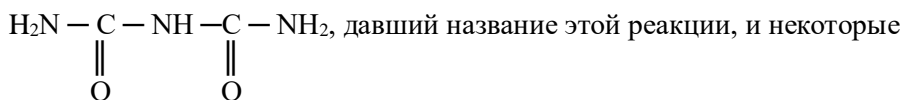
Оборудование. Штатив с простыми пробирками; капельницы; пипетки вместимостью 1 мл; водяная баня.

#### Материалы для исследования.

1. Раствор яичного белка (белок одного куриного яйца отделяют от желтка, растворяют в 20-кратном объеме дистиллированной воды, фильтруют через несколько слоев марли и хранят в холодильнике).
2. Неразбавленный свежий яичный белок.
3. 1%-ные растворы глицина, глицилглицина,  $\alpha$ -аланина,  $\beta$ -аланина.
4. 0,1%-ные растворы фенилаланина, тирозина, триптофана, гистидина, цистеина гидрохлорида, метионина.

а. Биуретовая реакция на пептидную группу (реакция Пиотровского). Метод основан на способности пептидной группы белков и полипептидов образовывать в щелочной среде с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  комплексное соединение фиолетового цвета с красным или синим оттенком в зависимости от числа пептидных связей в белке.

Биуретовая реакция положительна с белками и пептидами, имеющими не менее двух пептидных связей ( $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$ ). С ди- и трипептидами она неустойчива. Биуретовую реакцию дают небелковые вещества, содержащие не менее двух пептидных групп, например, производное мочевины – биурет



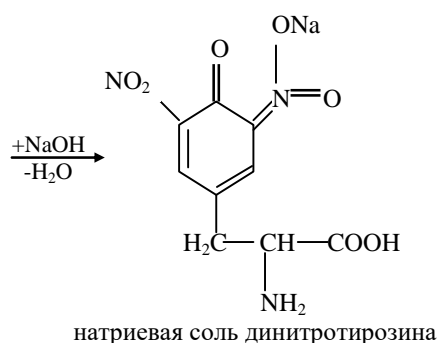
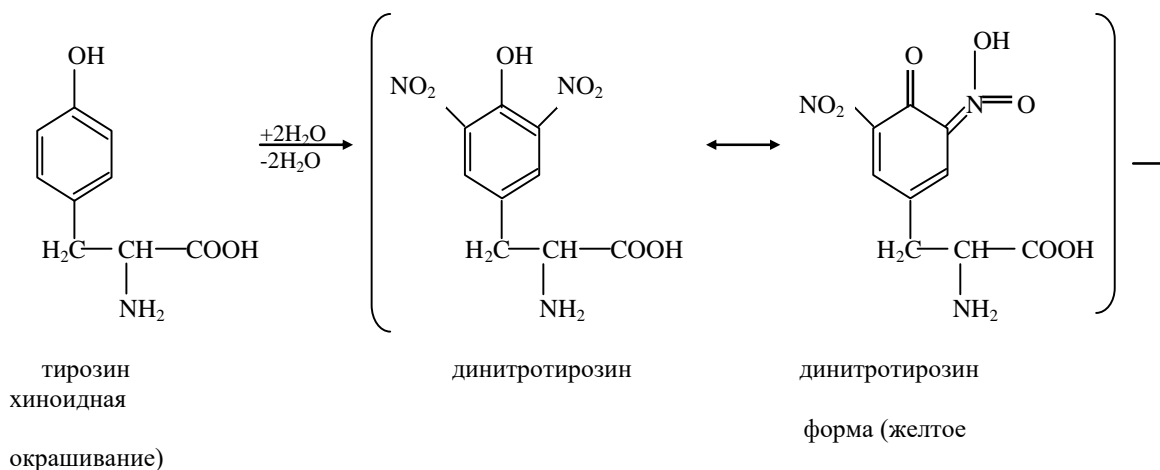
другие. В сильнощелочной среде пептидные группы полипептидов переходят в енольную форму, в которой и взаимодействуют с ионом  $\text{Cu}^{2+}$ , образуя окрашенный биуретовый комплекс примерно следующего строения:



Добавляют в каждую пробирку по 2 капли раствора нингидрина, нагревают до кипения и через 1-3 мин наблюдают появление окрашивания.

**в. Ксантопротеиновая реакция на ароматическое кольцо циклических аминокислот (реакция Мульдера).** Метод основан на способности аминокислот и аминокислотных остатков полипептидов, содержащих ароматическое кольцо, образовывать при взаимодействии с концентрированной азотной кислотой динитропроизводные соединения желтого цвета. В щелочной среде они переходят в хиноидные структуры, имеющие оранжевое окрашивание.

Ксантопротеиновая реакция характерна для фенилаланина, тирозина и триптофана, имеющих ароматическое (бензольное) кольцо. Эти аминокислоты или содержащие их белки при нагревании с концентрированной азотной кислотой дают нитросоединения желтого цвета.



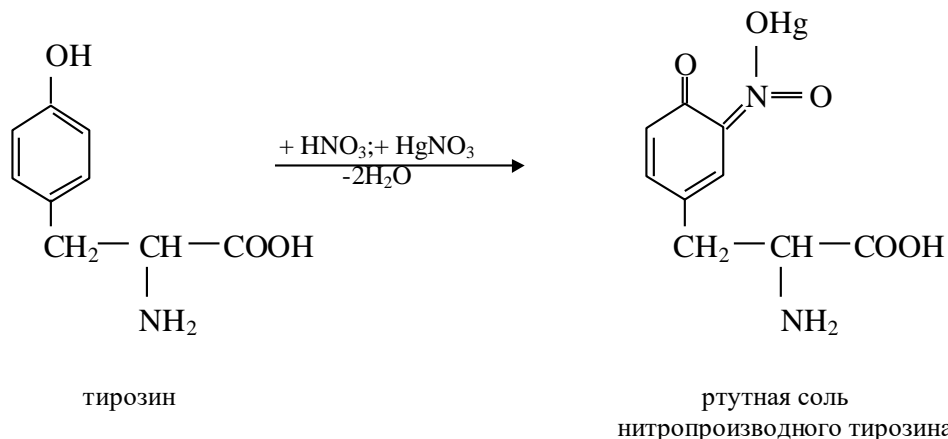
Например, в реакции с тирозином образуется динитротирозин; добавление гидроксида натрия приводит к образованию натриевой соли хиноидной структуры динитротирозина: *Ксантопротеиновая реакция положительна со многими ароматическими соединениями (бензол, фенол и др.).*

**Ход определения.** 1. В одну пробирку вносят 5 капель раствора яичного белка, в другую – фенилаланина, в третью – тирозина и в четвертую – гистидина.

В каждую пробирку добавляют по 3 капли концентрированной азотной кислоты, нагревают до кипения (*осторожно! В защитных очках!*) и наблюдают за появлением окрашивания.

Содержимое пробирок охлаждают под струей водопроводной воды, затем в каждую по каплям добавляют раствор гидроксида натрия, пока не начнется переход окраски.

**г. Реакция Миллона на тирозин.** Метод основан на способности тирозина (как свободного, так и входящего в состав белка) при нагревании с реактивом Миллона образовывать ртутную соль нитротирозина, окрашенную в пурпурно-красный цвет

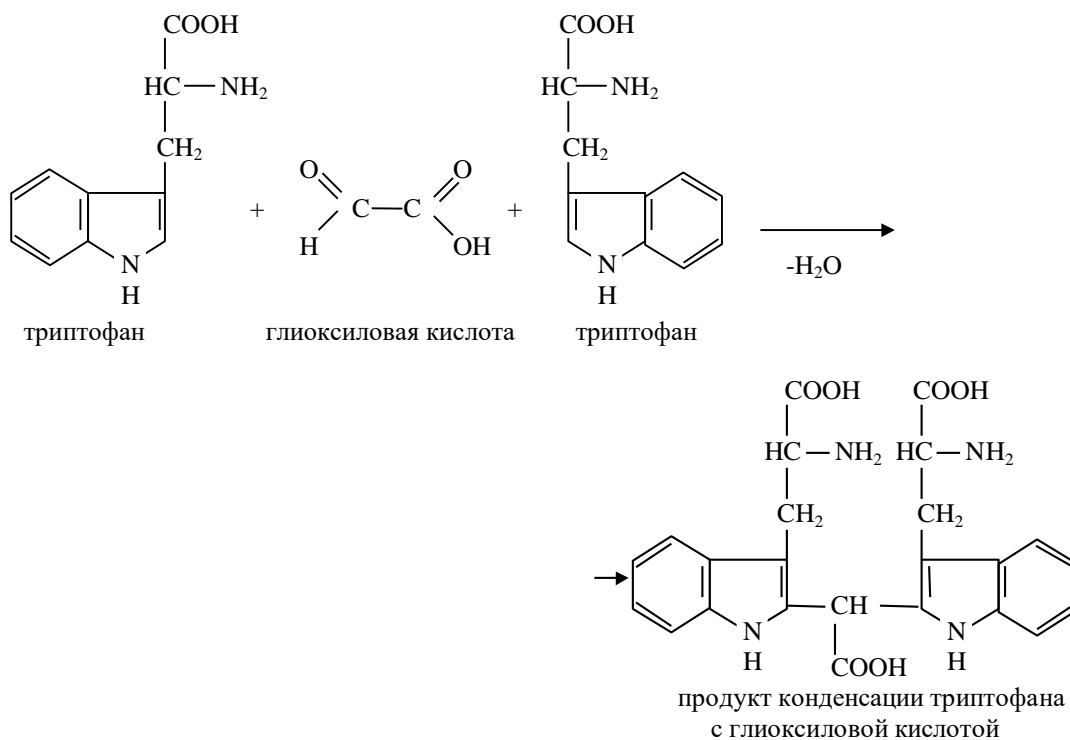


Эта реакция положительна также для фенольных соединений.

**Ход определения.** В одну пробирку вносят 5 капель раствора яичного белка, в другую – тирозина и в третью – фенилаланина. В каждую из них добавляют по 3 капли реактива Миллона и осторожно нагревают на водяной бане (не выше 50°C), наблюдая за появлением окрашивания.

**д. Реакция Адамкевича на триптофан.** Метод основан на способности триптофана в кислой среде реагировать с глиоксиловой кислотой с образованием соединения, окрашенного в красно-фиолетовый цвет.

При нагревании две молекулы триптофана взаимодействуют с глиоксиловой кислотой с образованием окрашенного соединения:



Для проведения реакции используют ледяную уксусную кислоту, в которой как примесь содержится глиоксиловая кислота. В качестве водоотнимающего средства в реакции используется концентрированная серная кислота.

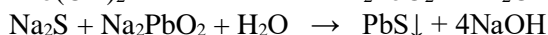
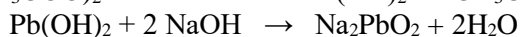
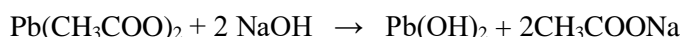
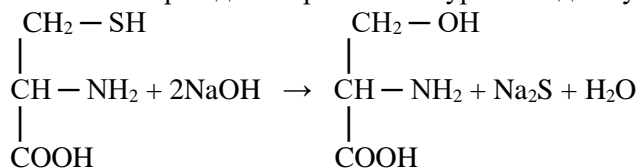
**Ход определения.** В одну пробирку вносят 2 капли неразбавленного свежего яичного белка, а в другую – раствор триптофана.

Добавляют в каждую из них по 10 капель ледяной уксусной кислоты и осторожно нагревают до растворения выпавшего осадка белка в первой пробирке, после чего содержимое ее охлаждают.

Очень осторожно, по стенке, наклонив пробирку, подслаивают в каждую из пипетки около 1 мл концентрированной серной кислоты, следя за тем, чтобы жидкости не смешались. На границе двух слоев возникает характерное окрашенное кольцо, которое постепенно распространяется на

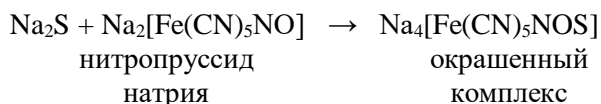
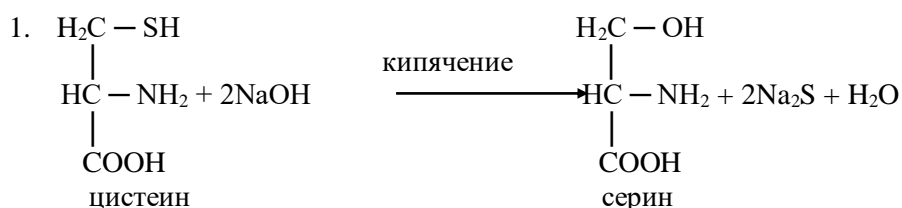
весь раствор.

**е. Реакция Фоля на аминокислоты, содержащие слабосвязанную серу (цистеин, цистин).** Метод основан на способности белков, в состав которых входят серусодержащие аминокислоты (цистеин, цистин), в щелочной среде при нагревании образовывать сульфид натрия, который с плюмбитом натрия дает черный или бурый осадок сульфида свинца:



**Ход определения.** В три пробирки наливают по 10 капель раствора ацетата свинца и по каплям в каждую из них прибавляют раствор гидроксида натрия до растворения первоначально образующегося осадка. В одну пробирку добавляют 5 капель раствора яичного белка, в другую – цистеина, в третью – метионина, смеси кипятят 1-2 мин и наблюдают за изменением их цвета и выпадением осадка.

**ж. Нитропруссидная реакция на серусодержащие аминокислоты.** Метод основан на способности сульфида натрия, образующегося щелочном гидролизе серусодержащих аминокислот, давать с нитропруссидом натрия окрашенное комплексное соединение красно-фиолетового цвета:



**Ход определения.** В одну пробирку вносят 5 капель неразбавленного свежего яичного белка, в другую – раствор цистеина, в третью – метионина. Добавляют в каждую пробирку по 10 капель раствора гидроксида натрия, кипятят 3 мин и затем охлаждают их содержимое.

В каждую пробирку прибавляют 2-3 капли раствора нитропруссиды натрия и наблюдают за появлением окрашивания.

**Оформление работы.** После каждой реакции сделать вывод о ее специфичности для исследуемого вещества и присутствии соответствующих функциональных групп в яичном белке. Результаты оформить в виде таблицы, отмечая знаками «плюс» или «минус» результат реакции.

№№ п/п	Исследуемый материал	9. Реакция					
		Биуретовая	Нингидриновая	Ксантопротеиновая	Фоля	Миллона	Адамкевича

**Практическое значение работы.** Качественные реактивы (или, как их часто называют, цветные реакции) используются в клинико-биохимических лабораториях, фармацевтической практике и биохимических исследованиях для обнаружения присутствия белка и аминокислот в биологических средах, качественного анализа белковых лекарственных средств, препаратов

гидролизатов белков и аминокислот, пептидов и белков на хроматограммах и электрофореграммах. Многие качественные реакции положены в основу методов количественного определения белков и аминокислот.

## **Часть 2. Качественный анализ некоторых белковых препаратов**

Реактивы и оборудование те же, что и в работе 1.

Материалы.

1. Аминопептид или другой гидролизат белков – препарат для парентерального питания.
2. Желатиноль (препарат из пищевого желатина) или желатин, 1%-ный раствор.

Метод анализа основан на использовании качественных реакций, рассмотренных в предыдущей работе, для выявления присутствия отдельных аминокислот в составе белковых препаратов.

Ход определения. С белковыми препаратами проводят качественные реакции – биуретовую, нингидриновую, ксантопротеиновую, Миллона, Фоля, Адамкевича и нитропруссидную. Для проведения каждой реакции используют по 5 капель гидролизата белков и препарата желатина.

Оформление работы. Полученные данные оформить в виде таблицы, приведенной в работе 1.

В выводе показать наличие, согласно проведенному анализу, отдельных аминокислот и сравнительную полноценность исследуемых белковых препаратов.

Практическое значение работы. Состав аминокислот определяет не только свойства белка, но и его питательную и лекарственную ценность. Биологически полноценными считаются белки, содержащие все незаменимые аминокислоты. Поэтому представляет интерес наличие именно этих аминокислот в белковых гидролизатах. Гидролизаты белков различной природы используются в медицине как лекарственные препараты для парентерального обмена. В лечебных целях применяются различные белки плазмы крови, желатина и др.

В практике контроль качества и количественный анализ таких лекарственных средств, как гидролизаты белков и препаратов, содержащих смеси аминокислот или отдельные аминокислоты, основываются на качественном и количественном анализе конкретных аминокислот. Так, одним из основных показателей качества гидролизатов белков является содержание триптофана, которое составляет в аминокептиде и в фибриносоле около 0,5 г/л, а в растворах гидролизина и гидролизата казеина не менее 0,15 г/л.

При гидролизе нуклеопротеиды и нуклеиновые кислоты распадаются на составные части. Обнаружение и методы количественного определения нуклеиновых кислот и их мономеров (нуклеотидов) в биологическом материале и препаратах основаны на особенностях химической природы этих соединений.

### **Лабораторная работа №6**

#### **Исследование химической природы нуклеиновых кислот**

ДНК и РНК, имея сходство в строении, несколько отличаются по составным компонентам: в ДНК содержится тимин, а в РНК – урацил. Кроме того, углеводная часть в ДНК представлена дезоксирибозой, а в РНК – рибозой. Поэтому по специфическим реакциям на эти моносахариды можно выявить соответствующие нуклеиновые кислоты и нуклеотиды.

#### **Качественные реакции на компоненты нуклеиновых кислот**

Реактивы. Нитрат серебра, 2%-ный аммиачный раствор\*; раствор аммиака, конц.; аскорбиновая кислота, 1%-ный раствор; молибдат аммония, раствор в азотной кислоте\*; орциновый реактив\*; дифениламинный реактив\*.

Оборудование. Глазные пипетки; пипетки вместимостью 1 мл; штатив с пробирками; водяная баня.

Материал.

1. Гидролизат дезоксирибонуклеопротеида
2. Лекарственные препараты нуклеотидной природы: фосфаден (аденозинмонофосфат), 2%-ный раствор в ампулах, и аденозинтрифосфат натрия, 1%-ный раствор в ампулах.

**а. Проба на пуриновые основания.** Метод основан на способности пуриновых оснований с аммиачным раствором нитрата серебра образовывать осадок серебряных солей пуриновых оснований (аденина, гуанина), окрашенных в светло-коричневый цвет, по уравнению

Ход определения. В пробирку вносят 10 капель гидролизата, помещают в него кусочек лакмусовой бумаги и приливают по каплям примерно 10 капель концентрированного раствора аммиака до щелочной реакции по лакмусу. Добавляют 10 капель аммиачного раствора нитрата серебра. При стоянии образуется осадок с характерной окраской.

**б. Дифениламиновая проба на пентозы. Качественная реакция на ДНК (реакция Дише).**

Метод основан на способности дезоксирибозы, входящей в ДНК дезоксирибонуклеопротеида, образовывать соединение синего цвета с дифениламином при нагревании в среде, содержащей смесь ледяной уксусной и концентрированной серной кислот. С рибозой РНК аналогичная реакция дает зеленое окрашивание.

Ход определения. К  $\frac{1}{4}$  части осадка дезоксирибонуклеопротеида приливают 1 мл 0,4%-ного раствора гидроксида натрия (до растворения). Добавляют 0,5 мл дифениламинового реактива. Содержимое пробирки перемешивают и ставят на кипящую водяную баню на 15-20 мин.

Аналогичную реакцию выполняют в другой пробирке с 1 мл раствора РНК. Отмечают характерное окрашивание в пробах.

**в. Молибденовая проба на фосфорную кислоту.** В другую пробирку вносят 10 капель гидролизата и нейтрализуют его, прибавляя по каплям концентрированную азотную кислоту до слабой реакции (по лакмусовой бумаге, кусочек которой заранее помещают в пробирку). Затем добавляют 10 капель раствора молибдата аммония, перемешивают содержимое встряхиванием и наливают 10 капель раствора аскорбиновой кислоты. Вновь перемешивают и оставляют стоять пробы до развития специфического окрашивания.

**г. Качественные реакции на лекарственные препараты нуклеотидной природы.** Метод основан на обнаружении рибозы в препаратах нуклеотидной природы с помощью дифениламиновой реакции и пробы с орциновым реактивом. Последняя состоит в том, что фурфурол, образующийся из рибозы при нагревании в среде с соляной кислотой, дает с орцином окрашенное соединение зеленого цвета.

Ход определения. В две пробирки добавляют по 5 капель соответственно раствора фосфадена и аденозинтрифосфата натрия. К ним приливают по 10 капель дифениламинового реактива, нагревают 10 мин на кипящей водяной бане. Отмечают результат реакции.

В две другие пробирки вносят по 5 капель тех же веществ и добавляют по 5 капель орцинового реактива. Нагревают в течение 20 мин на кипящей водяной бане. Отмечают результат реакции.

Оформление работы. По результатам работы сделать вывод о возможности использования реакции для обнаружения компонентов нуклеиновых кислот и нуклеотидов и их применения в практике. Данные оформить в виде таблицы.

Материал	Выявляемый компонент	Реакция	Результат реакции
----------	----------------------	---------	-------------------

Практическое значение работы. Реакции на компоненты нуклеиновых кислот и нуклеотиды могут применяться для их идентификации и количественного анализа в биохимических исследованиях.

### **Лабораторная работа № 7 Исследование минерального состава мочи**

**Цель работы:** научиться определять минеральные вещества в моче на основе качественных реакций на катионы металлов и анионы кислот.

**Реактивы и оборудование:** дистиллированная вода, индикатор, нитрат ртути, 2 н. азотная кислоты, 1%-ного раствор нитрата серебра, 10%-ный раствор азотной кислоты, 10%-ный раствор соляной кислоты, 5%-ный раствор хлорида бария, молибденовый реактив.

Значение воды и минеральных солей огромно. Все процессы, протекающие в организме, идут в водной среде. Без воды нет жизни. Минеральные вещества участвуют в построении всех органов и тканей, обеспечивают поддержание осмотического давления, активируют многие ферментные системы и выполняют еще большое число разнообразных функций. Содержание воды и минеральных солей в крови постоянно, поэтому их определение имеет важное значение для характеристики состояния организма.

#### **Открытие хлоридов**

**Количественное определение хлоридов в моче.** Количество хлоридов в моче определяют количеством миллилитров нитрата ртути, пошедшим на титрование.

**Ход работы.** В сахарный стаканчик приливают 1,8 мл дистиллированной воды, 0,2 мл мочи, 4 капли индикатора, перемешивают и раствор титруют нитратом ртути до появления сине-фиолетового окрашивания. В качестве контроля используют стандартный раствор хлора, к 2 мл которого добавляют 4 капли индикатора и раствор оттитровывают нитратом ртути (2 г нитрата ртути растворяют в 200 мл дистиллированной воды и добавляют 20 мл 2н азотной кислоты, доводят общий объем до 1 л)

Расчет:

$$\text{хлор(мэкв / л)} = \frac{0,02 \times A \times 5 \times 1000}{B} = \frac{A \times 100}{B},$$

где 0,02 – миллиэквиваленты хлора в 2 мл стандартного раствора; 5x1000 – коэффициент пересчета на 1 л; А – количество раствора нитрата ртути, пошедшее на титрование опыта (мочи); Б – количество миллилитров раствора нитрата ртути, пошедшее на титрование контроля (стандартный раствор хлора). В норме хлора в моче 170-210 мэкв/л.

**Открытие хлоридов в моче.** С мочой хлоридов за сутки выделяется около 15 г из расчета на хлорид натрия. Реакция основана на образовании белого осадка хлорида серебра, нерастворимого в азотной кислоте.

**Ход работы.** К 10 каплям мочи добавляют 2 капли 1%-ного раствора нитрата серебра и 3 капли 10%-ного раствора азотной кислоты. Выпадает белый осадок.

#### **Открытие сульфатов**

В организме сера принимает участие во многих процессах обмена, в том числе и в синтезе некоторых гормонов (инсулина, окситоцина), в обезвреживании токсических продуктов (фенола, крезола и др.)

**Ход работы.** К 10 каплям мочи добавляют 5 капель 10%-ного раствора соляной кислоты и 5 капель 5%-ного раствора хлорида бария. Выпадает белый осадок.

#### **Открытие фосфатов**

Значение фосфатов для организма трудно переоценить. Он является одной из составных частей костной и зубной ткани, обнаруживается в составе почти всех органов и тканей, поддерживает осмотическое давление, а его соли, особенно АТФ, представляют собой основной аккумулятор энергии в организме, обеспечивающий активирование глюкозы, жирных кислот, аминокислот, процессы синтеза, избирательную проницаемость клеточных мембран.

В основе определения фосфатов лежит их способность образовывать желтый осадок с молибденовым реактивом.

**Ход работы.** В пробирку наливают 20 капель молибденового реактива, нагревают почти до кипения и добавляют несколько капель мочи. Выпадает желтый кристаллический осадок фосфорных солей молибдата аммония.

#### **Контрольные вопросы:**

- 1 Дайте определение гомеостаза. Какими показателями характеризуется гомеостазис?
- 2 Какое значение имеет вода для организма? Что такое вне- и внутриклеточная вода? Каков ее состав?
- 3 Какие органы принимают участие в регуляции водного обмена? Как регулируется водный обмен?
- 4 Какова функция антидиуретического гормона и альдостерона в обмене воды?
- 5 Каково значение минеральных веществ для организма?
- 6 Какова суточная потребность в калии, кальции, фосфоре, железе?
- 7 Укажите на значение калия, натрия, кальция, фосфора и микроэлементов.
- 8 Какие функции выполняют в организме кобальт, марганец, медь, йод?
- 9 В организме снижена выработка вазопрессина. Как это будет влиять на величину диуреза?
- 10 В организме повышен синтез альдостерона. Как при этом будет изменяться диурез?



## Лабораторная работа № 8

### 10. Качественные реакции на витамины

Реактивы. Хлороформ; серная кислота, конц.; сульфаниловая кислота, 1%-ный раствор; нитрит натрия, 5%-ный раствор, свежеприготовленный; карбонат натрия, 10%-ный раствор; азотная кислота, конц.; диэтилдитиокарбамат натрия, 2%-ный спиртовой раствор; гидроксид натрия, 4%-ный спиртовой раствор; гидросульфит натрия, порошок; хлорид железа (III), кристаллический; тиомочевина, кристаллическая.

Оборудование. Штатив с пробирками; скальпель; весы аптечные с разновесами; беззольные фильтры; флуороскоп.

#### Материал.

1. Рыбий жир.
2. Токоферол, 0,1%-ный спиртовой раствор.
3. Витамин К, насыщенный раствор в 70%-ном этаноле.
4. Тиамин, порошок.
5. Рибофлавин, 0,002%-ный раствор.
6. Рибофлавинмононуклеотид, 0,1%-ный раствор в ампулах, из которого готовят 0,002%-ный раствор.
7. Флавионат, лекарственный препарат в ампулах, содержащий ФАД, 0,002%-ный раствор.
8. Чай сухой.
9. Витамин В<sub>12</sub>, раствор в ампулах.

**а. Проба Друммонда на ретинол (витамин А).** Метод основан на способности концентрированной серной кислоты отнимать воду от ретинола с образованием окрашенных продуктов.

Ход определения. В пробирку вносят 2 капли рыбьего жира, 5 капель хлороформа и 1-2 капли концентрированной серной кислоты. Появляется голубое окрашивание, переходящее в буро-красное.

**б. Обнаружение кальциферола (витамин Д).** Метод основан на взаимодействии кальциферола с гидрохлоридом анилина с образованием окрашенных продуктов.

Ход определения. В сухую пробирку помещают 10 капель анилинового реактива и прибавляют 5 капель рыбьего жира. Содержимое пробирки осторожно при постоянном перемешивании нагревают до кипения и кипятят в течение 30 с. В присутствии витамина Д желтая эмульсия приобретает вначале грязно-зеленое, а затем буро-красное или красное окрашивание.

**в. Качественная реакция на токоферол (витамин Е).** Метод основан на образовании соединений хиноидной структуры, окрашивающихся в красный цвет, при действии сильных окислителей (концентрированной азотной кислоты) на токоферол.

Ход определения. В сухую пробирку вносят 5 капель спиртового раствора токоферола и добавляют 10 капель концентрированной азотной кислоты. Встряхивают. Наблюдают за развитием красного окрашивания.

**г. Качественная реакция на нафтохинон (витамин К).** Метод основан на взаимодействии диэтилдитиокарбамата с витамином К в щелочной среде с образованием комплекса голубого цвета.

Ход определения. В пробирку вносят 4 капли спиртового раствора диэтилдитиокарбамата натрия и 4 капли раствора гидроксида натрия. Встряхивают и наблюдают за развитием окраски.

**д. Обнаружение тиамина (витамин В<sub>1</sub>).** Метод основан на способности тиамина образовывать с диазофенилсульфоновой кислотой комплекс оранжево-красного цвета в щелочной среде.

Ход определения. В пробирку вносят 5 капель раствора сульфаниловой кислоты и прибавляют 5 капель раствора нитрита натрия. К полученному диазореактиву добавляют на кончике скальпеля порошок тиамина и 5 капель раствора карбоната натрия. Встряхивают. Появляется оранжево-красное окрашивание.

**е. Обнаружение рибофлавина (витамин В<sub>2</sub> и флавиновых коферментов).** Метод основан на способности окисленных форм рибофлавина и флавиновых коферментов (ФМН и ФАД) давать

в ультрафиолетовом свете желто-зеленую флуоресценцию, интенсивность которой зависит от их концентрации. Восстановленные формы флавинов не флуоресцируют.

Ход определения. В одну пробирку вносят 10 капель раствора рибофлавина, в другую – рибофлавинмононуклеотида, в третью – флавината, приливают в каждую из них по 5 мл воды и перемешивают встряхиванием. Ставят пробирки в штатив флуороскопа и сравнивают интенсивность флуоресценции трех проб.

Прибавляют в каждую пробирку на кончике скальпеля порошок гидросульфита натрия (восстановитель) и наблюдают за гашением флуоресценции.

**ж. Качественная реакция на рутин (витамин Р).** Метод основан на взаимодействии рутина с хлоридом железа (III) с образованием комплексного соединения зеленого цвета.

Ход определения. На аптечных весах берут навеску 100 мг чая, добавляют 15 мл дистиллированной воды и кипятят в течение 3 мин. Дают остыть, отбирают в пробирку 1 мл жидкости и добавляют несколько кристалликов хлорида железа (III). Перемешивают и разводят в 2-3 раза дистиллированной водой. Развивается зеленое окрашивание.

**з. Качественная реакция на цианкобаламин.** Метод основан на способности кобальта, входящего в состав витамина В<sub>12</sub>, при высокой температуре взаимодействовать с тиомочевинной с образованием комплекса зеленого цвета.

Ход определения. На беззольный фильтр наносят 2-3 капли 10%-ного раствора тиомочевинны, высушивают на газовой горелке, после чего наносят 1-2 капли раствора витамина В<sub>12</sub> и снова высушивают. Образуется зеленое кольцо.

Оформление работы. Все результаты качественных реакций на витамины оформить в виде таблицы.

№ опыта	Материал	Исследуемый витамин	Реакция	Наблюдаемая окраска
---------	----------	---------------------	---------	---------------------

Практическое значение работы. Качественные реакции на витамины позволяют обнаружить их наличие в лекарственных препаратах и после экстракции в пищевых продуктах и лекарственных растениях. Принцип, положенный в основу качественных реакций на витамины, используется при разработке количественного определения их в различных природных объектах и лекарствах.

## **Лабораторная работа № 9** **Выявление гликолиза в мышечной ткани**

Для оценки вклада гликолиза в энергетику клеток измеряют скорость этого процесса при оптимальных условиях. С этой целью добавляют в среду, содержащую исследуемый материал (клетки, срезы или кусочки тканей, гомогенат ткани), один из субстратов гликолиза (гликогенолиза), чаще всего глюкозу, гликоген, фруктозобисфосфат и др., необходимые кофакторы и создают анаэробные условия. Обязательным компонентом при изучении скорости гликолиза является неорганический фосфат, который расходуется в этом процессе на образование АТФ из АДФ. Индикаторами гликолиза служат скорость убыли глюкозы или накопления молочной кислоты, а также потребление  $\Phi_n$  при анаэробном распаде углеводов в тканях.

Реактивы. Фосфатный буфер, 0,1 М раствор с рН 8,0<sup>\*</sup>; глюкоза, 10 г/л раствор, свежеприготовленный; трихлоруксусная кислота, 100 г/л раствор; сульфат меди (II), 100 г/л раствор; серная кислота, конц.; гваякол, 1,0 г/л раствор в 70%-ном этаноле; о-толуидиновый реактив<sup>\*</sup>; фторид натрия, 3 М раствор; вазелиновое масло; оксид кальция, порошок, навески по 0,25 г в бумажных пакетиках.

Оборудование. Водяная баня с лабораторным термометром; штатив с пробирками; пипетки вместимостью 1 и 2 мл; глазные пипетки; воронки со складчатыми бумажными фильтрами; стеклянные палочки; аптечные весы с разновесами.

Материал. Мышечная ткань (свежая) забитого животного.

Метод основан на выявлении убыли глюкозы и накопления молочной кислоты в среде под действием ферментов гликолиза мышечной ткани в присутствии и в отсутствие фторида натрия, являющегося ингибитором гликолиза. Глюкоза обнаруживается по реакции с о-толуидином, в результате чего образуется окрашенное соединение зеленого цвета при нагревании в среде с уксусной кислотой. Молочная кислота при нагревании с концентрированной серной кислотой

превращается в ацетальдегид, дающий с гваяколом характерное красное окрашивание.

Ход определения. В три пробирки отмеривают по 2 мл фосфатного буфера и по 1 мл раствора глюкозы. Затем в первую пробу добавляют 1 мл раствора трихлоруксусной кислоты, а во вторую – 0,2 мл раствора фторида натрия.

Мышечную ткань мелко измельчают ножницами и вносят во все пробирки по 1 г мышечной кашицы, содержимое тщательно перемешивают стеклянной палочкой и приливают 10 капель вазелинового масла (для защиты от кислорода воздуха). Пробирки выдерживают на водяной бане при 37°C в течение 30 мин. После инкубации во вторую и третью пробы добавляют по 1 мл раствора трихлоруксусной кислоты и перемешивают.

Содержимое всех пробирок фильтруют через бумажный фильтр в чистые пробирки. С фильтратом проводят реакции на глюкозу и молочную кислоту.

Для проведения реакции на глюкозу берут по 0,1 мл фильтрата, переносят его в чистые пробирки и добавляют в них по 0,4 мл воды и по 2,0 мл о-толуидинового реактива. Помещают пробирки в водяную кипящую баню на 8 мин, после чего охлаждают под струей холодной воды. Сравнивают интенсивность окраски исследуемых проб.

Для проведения реакции на молочную кислоту к оставшемуся фильтрату в обеих пробах добавляют по 5 капель раствора сульфата меди и по 0,25 г оксида кальция (для осаждения углеводов, которые мешают обнаружению молочной кислоты). Пробы оставляют стоять 10 мин при комнатной температуре, периодически встряхивая их. Затем содержимое пробирок фильтруют через бумажный фильтр в две чистые пробирки, помещенные в лед или снег. Отбирают по 10 капель фильтрата и осторожно добавляют в каждую из них по 30 капель концентрированной серной кислоты. Все пробирки помещают на 5 мин в кипящую водяную баню (для превращения молочной кислоты в ацетальдегид). Затем пробирки охлаждают и добавляют по 2 капли спиртового раствора гваякола. Через 20 мин сравнивают интенсивность окрашивания в пробах.

Оформление работы. Результаты оформить в виде таблицы.

Исследуемая проба	Субстрат	Ингибитор	Реакция на глюкозу	на	Реакция на молочную кислоту
-------------------	----------	-----------	--------------------	----	-----------------------------

Сделать вывод о наличии гликолиза в мышечной ткани и о методических подходах к его изучению.

Практическое значение работы. При анаэробном распаде углеводов образуется две молекулы АТФ на одну молекулу расщепленной глюкозы, что является важным дополнительным источником образования энергии. В эритроцитах гликолиз является единственным способом производства энергии. В анаэробных условиях, когда организм испытывает недостаток кислорода, этот путь образования энергии является основным для сохранения жизнедеятельности тканей. В эксперименте и клинике определение скорости гликолиза в клетках крови и биоптатах широко используется для оценки образования энергии анаэробным путем. Кроме того, этот метод позволяет изучить механизм действия различных лекарственных препаратов и ядов, которые могут оказывать отрицательное действие, блокируя одну из стадий ферментативного процесса.

### **Определение активности креатинфосфокиназы в сыворотке крови по Эннору и Розенбергу**

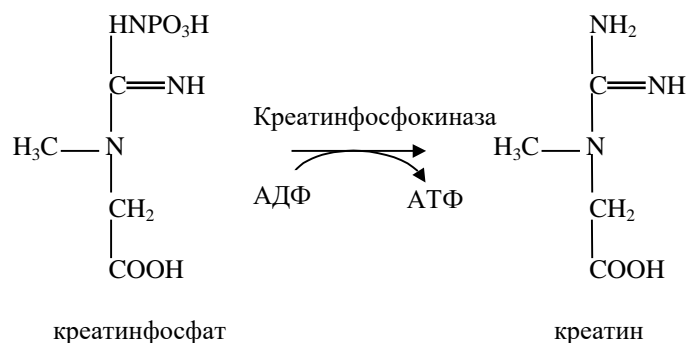
Реактивы. Креатинфосфат, 0,006 М раствор; аденозиндифосфат динатриевая соль, 6,0 г/л раствор; трис-буфер, 0,1 М раствор с рН 7,2, содержащий 0,1 моль/л хлорида магния; сульфат цинка, 50 г/л раствор; гидроксид бария, 50 г/л раствор; щелочной реактив, содержащий 160 г/л карбоната натрия и 60 г/л гидроксида натрия; диацетил, рабочий раствор; α-нафтол, 10 г/л раствор; креатин, стандартный раствор концентрации 0,1 ммоль/л.

Примечание. Все перечисленные реактивы, кроме трис-буфера, готовят перед употреблением.

Оборудование. Штатив с пробирками; стеклянные палочки; пипетки вместимостью 1 мл; водяная баня с лабораторным термометром; центрифуга лабораторная с центрифужными весами.

Материал. Сыворотка крови.

Метод основан на определении креатина, образующегося из креатинфосфата под действием креатинфосфокиназы, об активности которой судят по количеству выявляемого креатина.



Креатин образует с диацетилом и  $\alpha$ -нафтолом комплексное соединение, интенсивность розовато-желтой окраски которого пропорциональна концентрации креатина.

Ход определения. В две пробирки последовательно вносят следующие реактивы (объемы растворов указаны в миллилитрах):

Реактив	Опытная пробирка	Контрольная пробирка
Трис-буфер	0,2	0,2
Дистиллированная вода	0,2	0,3
Креатинфосфат	0,1	0,1
Сыворотка крови	0,1	-

Обе пробирки помещают на 3 мин в водяную баню при 37°C, не вынимая из бани, прибавляют в них по 0,2 мл раствора АДФ (запускают креатинкиназную реакцию). Отмечают время начала инкубации.

Через 30 мин реакцию останавливают, последовательно добавляя в обе пробы по 0,2 мл гидроксида бария и сульфата цинка. Содержимое пробирок охлаждают и оставляют стоять 10 мин (для осаждения белка). Затем осадок отделяют центрифугированием при 3000 об/мин в течение 5-10 мин.

Отбирают по 0,5 мл надосадочной жидкости в две чистые пробирки и приливают в них по 3 мл дистиллированной воды, по 1 мл раствора  $\alpha$ -нафтола и по 0,5 мл рабочего раствора диацетила. Пробы тщательно перемешивают стеклянной палочкой и помещают на 20 мин в темное место для развития окрашивания.

Перед фотометрией готовят стандартную пробу и контроль стандарта. Для этого в одну пробирку (стандартная проба) вносят 0,5 мл раствора креатина, 3 мл дистиллированной воды, 1 мл  $\alpha$ -нафтола и 0,5 мл рабочего раствора диацетила, а в другую (контроль стандарта) – те же реактивы, только вместо раствора креатина добавляют 0,5 мл дистиллированной воды. Обе пробирки выдерживают в темноте 20 мин.

Измеряют экстинкцию опытной пробы против контрольной и стандартной против контроля стандарта на ФЭКе при 520-540 нм (светофильтр зеленый) в кювете с толщиной слоя 1,0 см.

Расчет. Активность креатинфосфокиназы рассчитывают по формуле

$$x = \frac{0,00005 E_{\text{оп}} 1,2 \cdot 2 \cdot 10000}{E_{\text{ст}} 0,5} ,$$

где  $x$  – активность креатинфосфокиназы, ммоль/(ч·л);

0,00005 – содержание креатина в стандартной пробе, ммоль;

$E_{\text{оп}}$  – экстинкция опытной пробы против контроля;

$E_{\text{ст}}$  – экстинкция стандартной пробы против контроля стандарта;

2 – коэффициент пересчета на час инкубации;

1,2 – объем проб до центрифугирования;

0,5 – объем надосадочной жидкости, взятой на исследование;

10000 – коэффициент пересчета на литр сыворотки крови.

После сокращения формула приобретает следующий вид:

$$x = \frac{2,4E_{оп}}{E_{ст}}$$

Оформление работы. Рассчитать активность креатинфосфокиназы в сыворотке крови и по полученным данным сделать вывод о возможных изменениях активности фермента и причинах этих отклонений.

Практическое значение работы. Больше всего креатинфосфокиназы в мышечной (скелетная мышца и сердце) и нервной тканях, в которых она участвует в переносе энергии. В остальных тканях и органах ее активность в 100-1000 раз ниже. Поэтому при повреждении мышечной и нервной тканей или при заболеваниях, вызывающих повышение их проницаемости, имеет место «утечка» фермента из тканей и повышение его количества в крови. В норме активность креатинфосфокиназы в сыворотке крови составляет 0,30-0,70 ммоль/(ч·л). В клинической практике определение активности этого фермента используется при диагностике инфаркта миокарда (причем повышение активности его наблюдается через 3 ч после начала некротического процесса и достигает максимума через 24 ч), а также при дистрофии скелетных мышц, поражении нервной ткани.

### **Лабораторная работа №10** **Количественное определение креатина и креатинина** **по методу Брауна**

Реактивы. Пикриновая кислота, насыщенный раствор\*; соляная кислота, 0,1 моль/л; основной калибровочный раствор креатинина\*; 12,5% раствор едкого натрия.

Оборудование. Штатив с пробирками; пипетки на 0,2; 1,0; 2,0 и 5,0 мл; ФЭК; водяная баня.

Материал. Исследуемая моча.

Принцип метода. Основан на способности креатинина в щелочной среде с пикриновой кислотой образовывать комплекс оранжевого цвета, интенсивность которого пропорциональна концентрации креатинина. Определение креатина проводится после перевода его в креатинин при нагревании мочи в солянокислой среде.

Ход определения. В три меченные пробирки внести по 0,2 мл концентрированной соляной кислоты (*осторожно, только пипеткой с резиновой грушей!*). В 1-ю и 2-ю пробирки добавить по 0,2 мл исследуемой мочи, предварительно разведенной в 5 раз: 1 пробирка служит для определения креатинина, 2 – креатина, 3 – контрольная. Вторую пробирку нагреть в течение 5 минут на бурно кипящей водяной бане, после чего охладить под струей водопроводной воды. Во все пробирки внести дистиллированную воду в следующих количествах: первая пробирка – 2,0 мл, вторая – 2,0 мл, третья – 2,2 мл и в каждую добавить по 0,6 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты и по 1,0 мл 12,5% раствора гидроксида натрия, тщательно перемешивают. Оставляют стоять на 10 минут при комнатной температуре, после чего во все три пробирки добавляют по 6,0 мл дистиллированной воды. Оптическую плотность исследуемых растворов определяли на ФЭК с длиной волны 507 нм в кювете на 10 мм против контрольной пробы (третья пробирка). Количество определялось по калибровочному графику.

Расчет. Находят содержание свободного креатинина в первой пробирке по калибровочному графику, а затем, используя нижеприведенную формулу, проводят расчет:

$$x = \frac{a \cdot 5 \cdot 1000 \cdot 5}{1000 \cdot 1000},$$

где x – количество креатинина в г на 1 л мочи;

a – количество креатинина в мкг в 0,2 мл разведенной мочи, взятой для анализа;

5 – разведение мочи;

5 – для перевода количества креатинина с 0,2 мл мочи на 1 мл;

1000 – перерасчет на 1 л, числитель;

1000 – для перевода мкг в мг, знаменатель;

1000 – для перевода мг креатинина в г, знаменатель.

Расчет креатина – вторая пробирка содержит сумму свободного креатинина и креатинина, переведенного из креатина при нагревании в солянокислой среде. Из количества креатинина,

полученного при определении суммы креатин-креатинин, вычитают количество параллельно исследуемого свободного креатинина и полученную разность умножают на 1,16 – коэффициент перевода креатинина в креатин.

Построение калибровочного графика: из рабочего калибровочного раствора креатинина готовят разведение, как указано ниже:

№№ пробы	Рабочий калибр. р-р креатинина, мл	Раствор пикриновой кислоты, мл	2,5 моль/л раствора NaOH, мл	Дистиллированная вода, мл	Концентр. креатинина в пробе, ммоль/л
1	0,4	3,0	0,2	До объема 10 мл	40
2	0,8	3,0	0,2		80
3	1,6	3,0	0,2		160
4	2,4	3,0	0,2		240
5	3,2	3,0	0,2		320

**Оформление работы.** Рассчитать содержание креатина и креатинина в исследуемой пробе и в выводах дать оценку полученным результатам, сравнивая с нормой.

**Практическое значение работы.** Креатинин, наряду с мочевиной и солями аммония являются нормальными продуктами азотистого обмена и на его долю приходится около 2,5-7% всего азота мочи. Креатинина в норме выделяется с мочой: 4,4-17,7 ммоль/сутки или 0,5-2,0 г/сутки. В норме моча взрослых людей креатина не содержит. У детей имеет место физиологическая креатинурия, поэтому в моче он обнаруживается в небольших количествах. Появление креатина в моче взрослого человека связано с нарушением обмена креатина и наиболее часто встречается при поражении мышечной ткани (мышечная дистрофия, мышечная атрофия, миастения, миозит, миотония), Е-авитаминозе, при тонических судорогах, усиленном распаде тканевых белков. При этом содержание креатинина в моче понижается.

### Определение кетоновых тел и глюкозы в моче

К кетоновым (ацетоновым) телам относятся ацетон, ацетоуксусная и β-гидроксиацетил-β-кетопропановая кислоты.

**Реактивы.** Нитропруссид натрия, 10%-ный раствор свежеприготовленный; уксусная кислота, конц.; гидроксид натрия, 10%-ный раствор; хлорид железа (III), 10%-ный раствор.

**Оборудование.** Глазные пипетки; штатив с пробирками; набор «Глюкотест».

**Материал.** Моча, нормальная и патологическая.

**а. Проба Легалья на ацетон и ацетоуксусную кислоту мочи.** Метод основан на способности ацетона и ацетоуксусной кислоты в щелочной среде образовывать с нитропруссидом натрия комплексы оранжево-красного цвета, а при подкислении раствора – соединений вишнево-красного цвета.

**Ход определения.** В одну пробирку вносят 10 капель нормальной, в другую – 10 капель патологической мочи и добавляют в обе пробы по 2 капли раствора нитропруссид натрия и по 4 капли раствора гидроксида натрия. Появляется оранжево-красное окрашивание.

Вносят в обе пробирки по 10 капель концентрированной уксусной кислоты, при этом возникает вишнево-красное окрашивание.

**Примечание.** Креатинин мочи с нитропруссидом натрия также дает оранжево-красное окрашивание, но при добавлении концентрированной уксусной кислоты жидкость окрашивается в желтый цвет.

**б. Проба Герхарда на ацетоуксусную кислоту мочи.** Метод основан на взаимодействии железа с енольной формой ацетоуксусной кислоты с образованием комплекса красно-фиолетового цвета.

**Ход определения.** В одну пробирку вносят 20 капель нормальной, а в другую – 20 капель патологической мочи и прибавляют по 5 капель раствора хлорида железа (III) в обе пробы. Развивается красно-фиолетовое окрашивание.

#### **в. Экспресс-тест на ацетон мочи.**

**Ход определения.** На каждую из таблеток наносят по 2 капли нормальной и патологической мочи. Через 2 мин сравнивают окраску таблеток с цветной шкалой, приложенной

к набору. При отсутствии ацетона окраска не развивается.

**г. Определение глюкозы в моче с помощью набора «Глюкотест».** Метод основан на визуальной оценке изменения цвета красителя (о-толидин), которым пропитана полоска бумаги «Глюкотест»; по цветной шкале устанавливают примерное содержание глюкозы в моче.

**Ход определения.** Одну полоску бумаги «Глюкотест» смачивают нормальной, а другую – патологической мочой. Сравнивают через несколько минут окраску полосок с цветной шкалой, имеющейся в комплекте. Содержание глюкозы в моче определяют по наиболее совпадающему со шкалой цвету полоски.

**Оформление работы.** Результаты занести в таблицу.

Исследуемая моча	Название пробы	Выявляемое вещество	Результат
------------------	----------------	---------------------	-----------

Сделать вывод о присутствии ацетоновых тел и глюкозы в образцах нормальной и патологической мочи и указать на вероятные их причины.

**Практическое значение работы.** В норме пробы на ацетоновые тела и глюкозу в моче отрицательны.

Одновременное выделение ацетоновых тел и глюкозы с мочой наблюдается наиболее часто при сахарном диабете, реже при действии глюкокортикоидов (стероидный диабет), соматотропина и кортикотропина. Глюкозурия без ацетонурии имеет место при употреблении большого количества углеводов с пищей, а ацетонурия без глюкозурии – при голодании.

### **Лабораторная работа № 12** **Количественное определение мочевины** **в сыворотке крови и моче**

**Реактивы.** Цветной реактив\*; мочевины, стандартный раствор 1 г/л, или 16,65 ммоль/л; набор «Уреатест».

**Оборудование.** Штатив с пробирками; пипетки вместимостью 0,1, 2 и 5 мл; алюминиевая фольга; водяная баня; ФЭК.

**Материал.**

1. Сыворотка крови.
2. Моча, собранная за сутки, профильтрованная и разведенная перед анализом водой в 25 раз.

**а. Определение содержания мочевины в сыворотке крови.** Метод основан на способности мочевины в присутствии тиосемикарбазида и солей железа в сильнокислой среде образовывать с диацетилмонооксимом соединение красного цвета, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию мочевины в исследуемой жидкости.

**Ход определения.** В опытную пробирку отмеривают 0,1 мл разведенной в 10 раз сыворотки крови, в стандартную – такой же объем стандартного раствора мочевины и в контрольную – 0,1 мл дистиллированной воды. Добавляют во все пробирки по 2 мл цветного реактива и тщательно перемешивают их содержимое встряхиванием.

Все пробирки закрывают крышечкой из алюминиевой фольги и нагревают в кипящей водяной бане в течение 10 мин (**точно!**). Затем охлаждают их под струей холодной воды.

Измеряют экстинкцию стандартной и опытной проб против контрольной на ФЭКе при 540-560 нм (светофильтр зеленый) в кювете с толщиной слоя 0,5 см.

**Примечание.** Окраска неустойчива, поэтому измерение необходимо провести в течение 15 мин.

**Расчет.** Содержание мочевины  $x$  (ммоль/л) в сыворотке крови рассчитывают по формуле

$$x = \frac{E_{оп} \cdot 16,65 \cdot 10}{E_{ст}}$$

где  $E_{оп}$  – экстинкция опытной пробы против контрольной;

$E_{ст}$  – экстинкция стандартной пробы против контрольной;

16,65 – концентрация мочевины в стандартной пробе, ммоль;

Азот мочевины (в ммоль/л) рассчитывают, разделив полученное значение содержания мочевины в сыворотке на 2,14 (число, выражающее отношение молекулярной массы азота мочевины к массе всей молекулы мочевины).

**б. Определение содержания мочевины в моче.** Принцип метода тот же, что и в предыдущей работе.

Ход определения. Для анализа используют 0,1 мл разведенной мочи и 0,1 мл стандартного раствора мочевины и обрабатывают эти пробы так же, как и сыворотку крови.

Расчет проводят по формуле

$$x = \frac{E_{\text{оп}} V 25 \cdot 1,665}{E_{\text{ст}} 0,1 \cdot 1000},$$

где x – количество мочевины, ммоль/сут;

V – объем суточной мочи;

1,665 – содержание мочевины в 0,1 мл стандартной пробы, мкмоль;

$E_{\text{оп}}$  – экстинкция опыта;

$E_{\text{ст}}$  – экстинкция стандарта;

0,1 – объем мочи, взятый на исследование, мл;

1000 – коэффициент пересчета мкмоль в ммоль.

**в. Определение содержания мочевины в сыворотке крови экспресс-методом с помощью набора «Уреатест».** Метод основан на способности уреазы разлагать мочевины с образованием аммиака, который окрашивает полоску реактивной хроматографической бумаги в голубой цвет. Высота окрашенной зоны пропорциональна концентрации мочевины, которую рассчитывают по калибровочному графику.

Ход определения. Сыворотку крови разводят водой в отношении 1:1. На пропитанный ферментом конец бумажной полоски в 3 мм от красной парафиновой полосы наносят специальной пипеткой 0,03 мл разведенной сыворотки крови. Полоску тотчас помещают в чистую сухую пробирку, герметически закрывают ее пробкой и ставят в термостат при 37°C. Через 20 минут полоску извлекают, измеряют высоту окрашенной в голубой цвет зоны.

Расчет. По калибровочному графику, входящему в набор «Уреатест», находят концентрацию мочевины в сыворотке крови.

Оформление работы. Сделать расчет содержания мочевины и азота мочевины в исследуемой сыворотке и моче. В выводе отметить возможные изменения в азотном обмене.

Практическое значение работы. В норме содержание мочевины в сыворотке крови человека составляет 3,0-7,0 ммоль/л, а азота мочевины – 1,2-3,7 ммоль/л. Содержание мочевины в сыворотке крови значительно колеблется в зависимости от приема белков с пищей. Повышение уровня мочевины в крови (азотемия) отмечается при заболеваниях почек (когда нарушена их выделительная функция), при усиленном распаде белков, избыточном белковом питании, а также в случае обезвоживания организма (в данном случае имеет место относительная, а не абсолютная форма азотемии). Снижение уровня мочевины в крови и выделения ее с мочой (в сутки в норме выделяется 333-582,8 ммоль/сут) наблюдается при заболевании печени (паренхиматозная желтуха, дистрофия печени, цирроз), что связано с нарушением мочевинообразовательной функции.

## 11. КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ПО ДИСЦИПЛИНЕ (ВОПРОСЫ К ЭКЗАМЕНУ)

№ задания	Формулировка вопроса
Модуль 1. Строение, свойства и превращения важнейших химических соединений, входящих в состав организма человека	
1.	Биологические функции белков.
2.	Строение и классификация аминокислот
3.	Типы химических связей в молекуле белка. Пространственное строение белковой молекулы.
4.	Классификация белков.



5.	Строение ферментов. Стадии ферментативного катализа.
6.	Специфичность ферментов.
7.	Кинетика ферментативного катализа.
8.	Ингибиторы и активаторы ферментов.
9.	Классификация и индексация ферментов
10.	Регуляция скорости ферментативных реакций.
11.	Общая характеристика обмена веществ. Пищеварение и метаболизм.
12.	Строение и биологическая роль АТФ.
13.	Ферменты тканевого дыхания.
14.	Схема дыхательной цепи. Синтез АТФ в процессе тканевого дыхания.
15.	Анаэробное окисление.
16.	Микросомальное окисление.
17.	Свободнорадикальное окисление.
18.	Строение и биологическая роль глюкозы.
19.	Строение и биологическая роль гликогена.
20.	Переваривание и всасывание углеводов в пищеварительном тракте.
21.	Синтез и распад гликогена в печени.
22.	Общая характеристика ГДФ-пути распада углеводов.
23.	Превращение глюкозы и гликогена в пируват.
24.	Окислительное декарбоксилирование пирувата.
25.	Цикл трикарбоновых кислот.
26.	Итоговое уравнение и биологическая роль гликолиза.
27.	ГМФ-путь распада углеводов, его биологическая роль.
28.	Регуляция обмена углеводов.
29.	Строение и биологическая роль жиров.
30.	Общие закономерности строения жирных кислот.
31.	Общая характеристика липидов.
32.	Переваривание и всасывание жиров в пищеварительном тракте.
33.	Окисление жирных кислот.
34.	Образование и использование кетоновых тел.
35.	Синтез жирных кислот и жира.
36.	Строение и биологическая роль мононуклеотидов.
37.	Строение и биологическая роль ДНК.
38.	Строение и биологическая роль РНК.
39.	Распад нуклеиновых кислот. Судьба азотистых оснований
40.	Синтез мононуклеотидов.
41.	Синтез ДНК и РНК.
42.	Переваривание и всасывание белков в пищеварительном тракте.
43.	Внутриклеточный протеолиз.
44.	Синтез белка.
45.	Общие пути распада аминокислот.
46.	Обезвреживание аммиака.
47.	Биологическая роль витаминов. Основные причины гиповитаминозов.
48.	Витамины В <sub>1</sub> , В <sub>2</sub> , В <sub>6</sub> и РР. Витамин С
49.	Общие механизмы действия гормонов.
50.	Гормоны гипоталамуса и гипофиза.
51.	Гормоны щитовидной и паращитовидных желез.
52.	Гормоны поджелудочной железы.
53.	Гормоны надпочечников.
54.	Половые гормоны.

55.	Общая характеристика и биологические функции крови.
56.	Химический состав плазмы крови.
57.	Участие эритроцитов в переносе кислорода и углекислого газа.
58.	Участие лейкоцитов в обеспечении иммунитета.
59.	Общая характеристика свертывания крови.
60.	Кислотно-щелочной баланс крови.
61.	Общая характеристика почек. Строение нефрона, этапы образования мочи.
62.	Физико-химические свойства мочи. Химический состав мочи. Патологические компоненты мочи.
Модуль 2. Биохимические основы мышечной деятельности	
63.	Общая характеристика мышечных клеток.
64.	Химический состав саркоплазмы.
65.	Строение и химический состав миофибрилл.
66.	Механизм мышечного сокращения и расслабления.
67.	Количественные критерии путей ресинтеза АТФ.
68.	Аэробный ресинтез АТФ.
69.	Гликолитический ресинтез АТФ.
70.	Креатинфосфатная реакция.
71.	Аденилаткиназная реакция.
72.	Соотношение между путями ресинтеза АТФ при работе разного характера. Зоны относительной мощности работы.
73.	Особенности регуляции обмена веществ при выполнении мышечной работы.
74.	Биохимические сдвиги в мышцах и во внутренних органах мри мышечной работе.
75.	Биохимические сдвиги в крови и в моче при мышечной работе.
76.	Молекулярные механизмы утомления.
77.	Срочное и текущее восстановление. Алактатный и лактатный кислородный долг.
78.	Отставленное восстановление. Суперкомпенсация.
79.	Генотипическая и фенотипическая адаптация.
80.	Срочная и долговременная адаптация. Тренировочный эффект.
81.	Биологические принципы спортивной тренировки.
82.	Основные факторы, лимитирующие спортивную работоспособность. Компоненты работоспособности.
83.	Структурно-функциональные основы компонентов работоспособности.
84.	Биохимические основы скоростных и силовых качеств.
85.	Биохимическое обоснование спортивно-педагогических методов развития компонентов работоспособности.
86.	Биохимическое обоснование использования в спортивной практике фармакологических средств.
87.	Биохимическая характеристика основных классов лекарственных средств, применяемых спортсменами.
88.	Общая характеристика допингов.
89.	Биохимические основы питания. Особенности питания спортсменов.
90.	Задачи и методы биохимического контроля в спорте. Общая направленность биохимических сдвигов после стандартной и максимальной физических нагрузок.
91.	Объекты биохимических исследований при тестировании спортсменов.