

547(075.8)
3-532

А. А. ЗЕМЛЯНУХИН

МАЛЫЙ ПРАКТИКУМ ПО БИОХИМИИ

Допущено Министерством высшего и среднего специального образования РСФСР в качестве учебного пособия для студентов биологических специальностей высших учебных заведений



ВОРОНЕЖ
ИЗДАТЕЛЬСТВО ВОРОНЕЖСКОГО УНИВЕРСИТЕТА
1985

39901

39901

547(075.8) Землянухин А.А.
3-532 Малый практикум
по биохимии. - Воронеж,
Оддч.

39901

УДК 577.1 (076.5)

Землянухин А. А. **Малый практикум по биохимии:** Учеб. пособие. — Воронеж: Изд-во ВГУ, 1985. — 128 с.

Учебное пособие содержит лабораторные работы, охватывающие все основные разделы программы общего курса биохимии: белки и продукты белкового обмена, нуклеопротеиды и нуклеиновые кислоты, углеводы, липиды, ферменты, витамины. Для каждой работы дан перечень оборудования, реактивов и материалов, описана методика выполнения работы. В приложении приведены рецепты приготовления буферных растворов и некоторых реактивов.

Книга предназначена для студентов биологических факультетов университетов, педагогических, сельскохозяйственных и технологических институтов.

Библ. ссылок 12, табл. 24, ил. 4.

Печатается по постановлению Редакционно-издательского совета Воронежского университета

Научный редактор: д-р биол. наук проф. Н. А. Жеребцов

Рецензенты:

кафедра физиологии и биохимии растений
Уральского университета,
д-р мед. наук проф. М. И. Кузьман

ИБ № 1093

Александр Алексеевич Землянухин
МАЛЫЙ ПРАКТИКУМ ПО БИОХИМИИ
Учебное пособие

Редактор Д. П. Викторов. Обложка А. Е. Смирнова
Художественный редактор Л. А. Клочков
Технический редактор Ю. А. Фосс
Корректоры Г. И. Старухина, Н. Н. Масленникова

Сдано в набор 03.12.84. Подп. в печ. 21.01.85. ЛЕ00014. Форм. бум. 60 x 84/16. Бумага типографская № 3. Литературная гарнитура. Высокая печать. Усл. п. л. 7,4. Усл. кр.-отт. 7,6. Уч.-изд. л. 7,1. Тираж 3400. Заказ 1951. Цена 20 к.

Издательство Воронежского университета. Воронеж, ул. Ф. Энгельса, 8
Типография издательства ВГУ. Воронеж, ул. Пушкинская, 3

3 2007000000-084
М174(03)-85 33-85

© Издательство
Воронежского университета, 1985

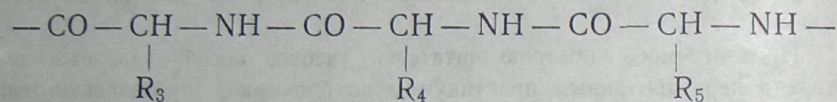
ПРЕДИСЛОВИЕ

Методы биохимических исследований постоянно совершенствуются, что находит отражение в прогрессе фундаментальных общетеоретических разделов биологической химии. Это, в свою очередь, вынуждает осуществлять перестройку методики проведения лабораторных занятий по курсу биохимии.

Предлагаемое вниманию читателей учебное пособие является значительно переработанным практикумом по биохимии, опубликованным автором в 1975 г. За истекшее время лаборатории вузов, в которых читается курс биохимии, пополнились сложной аппаратурой, лабораторной посудой, новыми реактивами, что позволило включить в лабораторный практикум более сложные работы. Так, например, в практику лабораторных работ широко вошли методы хроматографии на бумаге, тонкослойной хроматографии, газовой хроматографии, электрофореза, полярографические, спектрофотометрические и другие методы. Знакомство студентов с этими методами позволит глубже понять теоретический материал, который они изучают на лекциях и при самостоятельном чтении биохимической литературы. В то же время приобретенные навыки работы по биохимии позволяют выпускникам работать в различных биохимических лабораториях на производстве. Усложнение некоторых лабораторных работ, естественно, потребует больше времени на их выполнение, что может быть обеспечено включением в расписание 3—4-часовых занятий. В других случаях лаборанты накануне могут подготовить некоторые начальные этапы сложной работы.

В качестве объектов исследования мы рекомендуем использовать микроорганизмы, ткани животных и растений. В связи с этим при описании некоторых методов мы подчеркиваем специфику проведения работы с определенными объектами. В ряде случаев приведено несколько методов для определения содержания веществ или соответствующих процессов, что дает возможность выбора при проведении лабораторных занятий.

Белки — макромолекулы, состоящие из одной или нескольких полипептидных цепей. Каждая полипептидная цепь построена из большого количества аминокислотных остатков, соединенных пептидной ковалентной связью — CO — NH —. Линейная полипептидная цепь имеет следующую структуру:



где R — радикалы аминокислот.

Молекулы белка могут обладать четырьмя уровнями структурной организации. Последовательность расположения аминокислотных остатков в полипептидной цепи образует первичную структуру белка. Полипептидная цепь обычно содержит 100—200 аминокислотных остатков.

Под вторичной структурой понимают спирализацию полипептидной цепи, образуемую наличием водородных связей между водородом амидной группы и кислородом карбонильной группы пептидных связей. При этом образуется так называемая α -спираль, которая очень стабильна. Спирализация, однако, не захватывает всю молекулу белка. Так, например, в глобулярных белках спирализация составляет меньше 50%. Полной спирализации мешает ряд факторов, и прежде всего наличие остатков аминокислот пролина и оксипролина. Наряду с α -спиралью в белках обнаружена складчатая β -структура.

Свертывание цепи в более компактное образование (глобулу) создает третичную структуру. В основе образования третичной структуры лежат главным образом «слабые взаимодействия», к которым относятся силы Ван-дер-Ваальса, водородные связи, ионные связи и гидрофобные взаимодействия, а также сильные ковалентные связи типа дисульфидной.

Ассоциирование нескольких глобул (чаще всего 2—4)

создает четвертичную структуру. В основе сил, стабилизирующих четвертичную структуру, лежат слабые взаимодействия. К таким структурам относятся молекулы гемоглобина, инсулина, глутаматдегидрогеназы, альдолазы и др.

Наконец, молекулы белка могут быть связаны с мембранами, а ферменты могут образовывать мультиферментные комплексы (например, пируватдегидрогеназа). Удерживаются эти структуры также слабыми связями или взаимодействиями.

Для ряда белков расшифрована не только первичная структура, но и структуры высшего порядка (рибонуклеаза, миоглобин, цитохром *c*, лизоцим и др.).

Белки являются основными компонентами всех живых клеток. Важнейшие проявления жизни — питание, раздражимость, рост и размножение, движение и др. — вытекают из свойств белковых веществ. Белки подразделяются на простые (протеины) и сложные (протеиды), содержащие кроме белковой части небелковые компоненты. К протеидам относятся такие соединения, как гемоглобин, нуклеопротеиды, многие ферменты и др. В состав белков входит до 22 аминокислот.

Работа 1

Цветные реакции на белки

Оборудование и реактивы: набор пробирок в штативе; держалки для пробирок; мерные пипетки на 1—5 мл; резиновая груша; спиртовки. Концентрированные азотная и соляная кислоты; 10%-ный раствор NaOH; 1%-ный раствор медного купороса; 5%-ный раствор уксуснокислого свинца; реактив Миллона (растворяют под тягой 80 г ртути в 114 мл концентрированной HCl при постоянном подогревании на водяной бане, к раствору приливают двойной объем воды, перемешивают, дают отстояться и сливают жидкость с отстоявшегося осадка); 0,1%-ный ацетоновый раствор нингидрина; концентрированный раствор аммиака.

Материалы: раствор белка куриного яйца (растворяют 1 мл яичного белка в 10 мл дистиллированной воды); 0,1%-ный раствор аминокислоты.

Ход работы

1. Биуретовая реакция. Обусловлена наличием пептидных связей в молекуле белка, благодаря которым в щелочной среде с солями меди белок образует цветную комплексную соль.

К 1 мл раствора белка добавляют 1 мл 10%-ного раствора NaOH и 1—2 капли 1%-ного раствора CuSO₄. Появляется фиолетовое окрашивание. Эту реакцию могут давать поли-

олигопептиды, но с другими оттенками окраски (красно-фиолетовая и др.).

2. Ксантопротеиновая реакция. Основана на способности присутствующих в молекуле белка ароматических аминокислот (тирозина, триптофана и фенилаланина) образовывать с концентрированной азотной кислотой при подогревании желтоокрашенные нитросоединения.

К 1 мл раствора белка приливают под тягой 0,5 мл концентрированной HNO_3 (набирать пипеткой с резиновой грушей). Выпадает осадок, который при подогревании приобретает желтую окраску. Если после охлаждения в пробирку добавить 1 мл концентрированного раствора аммиака, то желтое окрашивание переходит в оранжевое вследствие превращения нитропроизводных циклических аминокислот в соли хиноидной структуры.

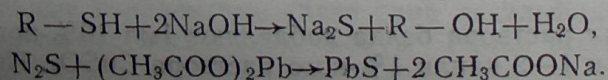
3. Реакция Миллона. Обусловлена наличием в молекуле белка аминокислоты тирозина.

К 1 мл раствора белка приливают 1 мл реактива Миллона. Появляется белый осадок, который при подогревании приобретает розово-красный цвет.

4. Реакция на триптофан. К 1 мл раствора белка (в разведении 1:10) приливают избыток концентрированной HCl (работать в вытяжном шкафу!) и нагревают, не доводя до кипения, чтобы не улетучился хлористый водород. Белок, выпавший при добавлении кислоты в осадок, при подогревании растворяется, и жидкость окрашивается в фиолетовый цвет. Эта реакция указывает на наличие в яичном белке не только триптофана, но и углеводов: триптофан реагирует с оксиметилфурфуролом, образующимся из моносахаридов, в результате чего возникает соединение фиолетово-красного цвета.

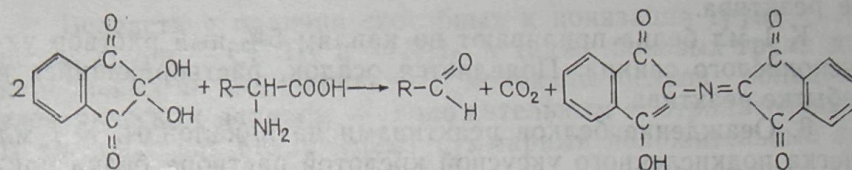
5. Реакция с уксуснокислым свинцом. Положительная реакция указывает на наличие в белковой молекуле атомов серы цистеина и цистина.

К 1 мл раствора белка добавляют двойной объем 10%-ного раствора NaOH , перемешивают, кипятят 2—3 мин, затем прибавляют 1—2 капли 5%-ного раствора уксуснокислого свинца и продолжают нагревать до выпадения черного осадка PbS . Реакция идет по следующим уравнениям:



6. Нингидриновая реакция. Указывает на присутствие в аминокислотах α -аминогрупп.

К 0,2—0,5 мл раствора аминокислоты прибавляют 2—3 капли 0,1%-ного ацетонового раствора нингидрина, кипятят 2 мин. Появляется сине-фиолетовое окрашивание вследствие взаимодействия двух молекул нингидрина с аминокислотой по уравнению



Работа 2 Осаждение белков

Белковые вещества по своей природе являются амфотерными электролитами. Дегидратация их частиц различными физико-химическими факторами приводит к коагуляции (выпадению в осадок). Реакции осаждения нередко используют для выделения и разделения белковых веществ на отдельные фракции.

Оборудование и реактивы: набор пробирок в штативе; электроплитка; спиртовки; держалки для пробирок; резиновая груша; пипетки на 1—5 мл; воронки; бумажные фильтры. 1%-ный раствор уксусной кислоты; 5%-ные растворы медного купороса и уксуснокислого свинца; насыщенные растворы пикриновой кислоты и сульфата аммония; кристаллический сульфат аммония; 1%-ный раствор таннина; 20%-ный раствор сульфосалициловой кислоты (растворяют при нагревании 13 г салициловой кислоты в 20 мл концентрированной H_2SO_4 и после охлаждения приливают 67 мл дистиллированной воды); 5%-ный раствор вольфрамата натрия; концентрированная азотная кислота; 0,4 н. раствор серной кислоты; 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты.

Материалы: белок куриного яйца, плазма крови, разведенные водой 1:10.

Ход работы

1. Осаждение белков кипячением. В пробирку наливают 1 мл раствора белка и нагревают до кипения. Происходит денатурация белка. Более полное осаждение белка достигается слабым подкислением его уксусной кислотой или добавлением других электролитов: к 1 мл раствора белка добавляют

... (faint text at the top of the page)

3. Классификация растений. Основана на способе их размножения и делится на высшие и низшие растения (группы, классы, отряды, семейства, роды, виды). Классификация растений основана на их строении, развитии, географическом распространении.

4. 1-й раздел. Высшие растения. Высшие растения делятся на высшие споровые и высшие цветковые растения. Высшие споровые растения делятся на мхи, плауны и папоротники. Высшие цветковые растения делятся на двудольные и однодольные растения. Высшие растения имеют сложное строение, развитую корневую систему, стебель, листья, цветки, плоды.

5. Растения. Растения делятся на высшие и низшие растения. Высшие растения делятся на высшие споровые и высшие цветковые растения.

6. 1-й раздел. Высшие растения. Высшие растения делятся на высшие споровые и высшие цветковые растения.

7. Растения на территории. Растения на территории делятся на высшие и низшие растения. Высшие растения делятся на высшие споровые и высшие цветковые растения. Низшие растения делятся на мхи, плауны и папоротники. Растения на территории имеют сложное строение, развитую корневую систему, стебель, листья, цветки, плоды.

8. Растения в зависимости от среды. Растения в зависимости от среды делятся на наземные и водные растения. Наземные растения делятся на высшие и низшие растения. Водные растения делятся на высшие и низшие растения.

9. 1-й раздел. Высшие растения. Высшие растения делятся на высшие споровые и высшие цветковые растения. Высшие споровые растения делятся на мхи, плауны и папоротники. Высшие цветковые растения делятся на двудольные и однодольные растения.

$$C_2H_6 + 7O_2 \rightarrow 2CO_2 + 6H_2O$$

$$C_2H_4 + 3O_2 \rightarrow 2CO_2 + 2H_2O$$

10. Пятиуглеродистый углеводород. Пятиуглеродистый углеводород имеет формулу C_5H_{12} .

11. C_2H_4 и C_2H_2 в растворе. C_2H_4 и C_2H_2 в растворе образуют гидраты. C_2H_4 гидрат имеет формулу $C_2H_4 \cdot nH_2O$, а C_2H_2 гидрат имеет формулу $C_2H_2 \cdot nH_2O$.



Рисунок 1
Пятиуглеродистый углеводород

12. Высшие растения. Высшие растения делятся на высшие споровые и высшие цветковые растения. Высшие споровые растения делятся на мхи, плауны и папоротники. Высшие цветковые растения делятся на двудольные и однодольные растения.

13. Высшие растения. Высшие растения делятся на высшие споровые и высшие цветковые растения. Высшие споровые растения делятся на мхи, плауны и папоротники. Высшие цветковые растения делятся на двудольные и однодольные растения.

Рисунок 2
Пятиуглеродистый углеводород

14. Высшие растения. Высшие растения делятся на высшие споровые и высшие цветковые растения. Высшие споровые растения делятся на мхи, плауны и папоротники. Высшие цветковые растения делятся на двудольные и однодольные растения.

олигопептиды, но с другими оттенками окраски (красно-фиолетовая и др.).

2. Ксантопротеиновая реакция. Основана на способности присутствующих в молекуле белка ароматических аминокислот (тирозина, триптофана и фенилаланина) образовывать с концентрированной азотной кислотой при подогревании желтоокрашенные нитросоединения.

К 1 мл раствора белка приливают под тягой 0,5 мл концентрированной HNO_3 (набирать пипеткой с резиновой грушей). Выпадает осадок, который при подогревании приобретает желтую окраску. Если после охлаждения в пробирку добавить 1 мл концентрированного раствора аммиака, то желтое окрашивание переходит в оранжевое вследствие превращения нитропроизводных циклических аминокислот в соли хиноидной структуры.

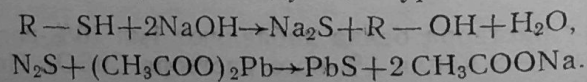
3. Реакция Миллона. Обусловлена наличием в молекуле белка аминокислоты тирозина.

К 1 мл раствора белка приливают 1 мл реактива Миллона. Появляется белый осадок, который при подогревании приобретает розово-красный цвет.

4. Реакция на триптофан. К 1 мл раствора белка (в разведении 1:10) приливают избыток концентрированной HCl (работать в вытяжном шкафу!) и нагревают, не доводя до кипения, чтобы не улетучился хлористый водород. Белок, выпавший при добавлении кислоты в осадок, при подогревании растворяется, и жидкость окрашивается в фиолетовый цвет. Эта реакция указывает на наличие в яичном белке не только триптофана, но и углеводов: триптофан реагирует с оксиметилфурфуролом, образующимся из моносахаридов, в результате чего возникает соединение фиолетово-красного цвета.

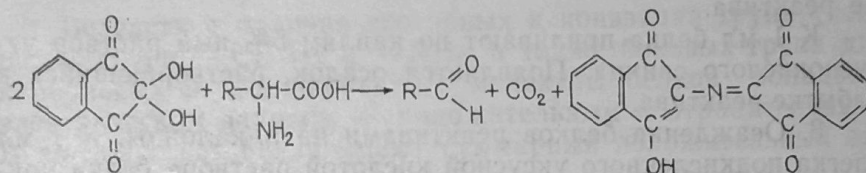
5. Реакция с уксуснокислым свинцом. Положительная реакция указывает на наличие в белковой молекуле атомов серы цистеина и цистина.

К 1 мл раствора белка добавляют двойной объем 10%-ного раствора NaOH , перемешивают, кипятят 2—3 мин, затем прибавляют 1—2 капли 5%-ного раствора уксуснокислого свинца и продолжают нагревать до выпадения черного осадка PbS . Реакция идет по следующим уравнениям:



6. Нингидриновая реакция. Указывает на присутствие в аминокислотах α -аминогрупп.

К 0,2—0,5 мл раствора аминокислоты прибавляют 2—3 капли 0,1%-ного ацетонового раствора нингидрина, кипятят 2 мин. Появляется сине-фиолетовое окрашивание вследствие взаимодействия двух молекул нингидрина с аминокислотой по уравнению



Работа 2 Осаждение белков

Белковые вещества по своей природе являются амфотерными электролитами. Дегидратация их частиц различными физико-химическими факторами приводит к коагуляции (выпадению в осадок). Реакции осаждения нередко используют для выделения и разделения белковых веществ на отдельные фракции.

Оборудование и реактивы: набор пробирок в штативе; электроплитка; спиртовки; держалки для пробирок; резиновая груша; пипетки на 1—5 мл; воронки; бумажные фильтры. 1%-ный раствор уксусной кислоты; 5%-ные растворы медного купороса и уксуснокислого свинца; насыщенные растворы пикриновой кислоты и сульфата аммония; кристаллический сульфат аммония; 1%-ный раствор таннина; 20%-ный раствор сульфосалициловой кислоты (растворяют при нагревании 13 г салициловой кислоты в 20 мл концентрированной H_2SO_4 и после охлаждения приливают 67 мл дистиллированной воды); 5%-ный раствор вольфрамата натрия; концентрированная азотная кислота; 0,4 н. раствор серной кислоты; 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты.

Материалы: белок куриного яйца, плазма крови, разведенные водой 1:10.

Ход работы

1. Осаждение белков кипячением. В пробирку наливают 1 мл раствора белка и нагревают до кипения. Происходит денатурация белка. Более полное осаждение белка достигается слабым подкислением его уксусной кислотой или добавлением других электролитов: к 1 мл раствора белка добавляют

1—2 капли 1%-ного раствора уксусной кислоты и нагревают. Выпадает осадок белка. Явление денатурации (потеря нативных свойств) вызывается глубокими нарушениями структуры белка.

2. Осаждение белков солями тяжелых металлов. Белки с тяжелыми металлами образуют соли, нерастворимые в воде. К 1 мл раствора белка приливают по каплям 5%-ный раствор CuSO_4 . Появляется осадок, растворяющийся в избытке реактива.

К 1 мл белка приливают по каплям 5%-ный раствор уксуснокислого свинца. Появляется осадок, растворяющийся в избытке реактива.

3. Осаждение белков реактивами на алкалоиды. К 1 мл слегка подкисленного уксусной кислотой раствора белка приливают 3—5 капель насыщенного раствора пикриновой кислоты. Выпадает осадок белка.

К 1 мл раствора белка, подкисленного 1—2 каплями раствора уксусной кислоты, приливают 3—5 капель раствора таннина. Выпадает осадок белка.

4. Осаждение белка кислотами. К 1—2 мл концентрированной HNO_3 (кислоту ртом не набирать! работать под тягой!) осторожно, по стенкам (в наклонном положении пробирки) приливают пипеткой 0,5—1 мл раствора белка. На границе двух соприкасающихся жидкостей образуется белое кольцо свернувшегося белка.

К 1 мл раствора белка добавляют несколько капель 20%-ного раствора сульфосалициловой кислоты, перемешивают. Выпадает осадок белка.

К 1 мл раствора белка приливают 1 мл 10%-ной трихлоруксусной кислоты. Выпадает осадок белка белого цвета.

5. Осаждение белков сульфатом аммония. К 2 мл раствора белка приливают 2 мл насыщенного раствора сульфата аммония и перемешивают. Выпадает осадок глобулинов. Через 5 мин осадок отфильтровывают или центрифугируют и к фильтрату добавляют растертый в порошок сульфат аммония до полного насыщения. Выпадает осадок альбумина. Полноту осаждения белков проверяют биуретовой реакцией.

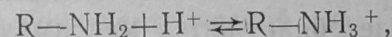
6. Осаждение белков вольфрамом натрия. К 1—2 мл раствора белка прибавляют 3—5 капель 5%-ного раствора вольфрамата натрия и 3—5 капель 0,4 н. раствора серной кислоты. Выпадает осадок белков. Полноту осаждения белков проверяют биуретовой реакцией.

Последние две реакции, а также осаждение трихлоруксусной кислотой часто используют в биохимической практике для удаления белковых веществ и для определения их содержания в биологическом материале.

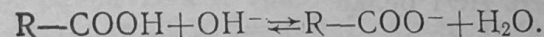
Работа 3

Определение изоэлектрической точки белков

Вследствие наличия способных к ионизации групп (концевых групп — COOH и — NH_2 , а также боковых групп дикарбоновых и диаминокислот) молекулы белков обладают электрическим зарядом — положительным и отрицательным. В кислой среде белки имеют суммарный положительный заряд:



в щелочной среде — отрицательный:



При определенном значении рН среды величина положительных и отрицательных зарядов становится одинаковой, и суммарный заряд белка оказывается равным нулю. Значение рН, при котором белок имеет минимальный электрический заряд, называют изоэлектрической точкой (ИЭТ). В этом состоянии белки наименее устойчивы и легко выпадают в осадок, имеют наименьшее значение вязкости, растворимости, степени гидратации и электропроводности, не способны передвигаться к электрическим полюсам. Каждый белок имеет свое значение ИЭТ: казеин — 4,6—4,7, сывороточный глобулин — 5,4, протамины — 10—12 и т. д. Существует целый ряд способов определения ИЭТ белков.

Оборудование и реактивы: пробирки; пипетки на 1, 5, 10 мл; карандаш по стеклу; 0,1 и 0,01 н. растворы уксусной кислоты.

Материалы: 0,2%-ный раствор казеина* или 0,5%-ный раствор желатина (растворяют 0,2 г казеина или 0,5 г желатина при подогревании в 10 мл 1 н. раствора уксуснокислого натрия и доводят водой до 100 мл).

Ход работы

В каждую из 8 пронумерованных пробирок по нижеприведенной схеме (табл. 1) вносят соответствующие растворы.

* Получение казеина см. в приложении.

Таблица 1

Прибавле- но, мл	Номера пробирок							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Воды	8,4	7,75	8,75	8,5	8,0	7,0	5,0	1,0
0,01 н. раствора CH ₃ COOH	0,6	1,25	—	—	—	—	—	—
0,1 н. раствора CH ₃ COOH	—	—	0,25	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0
Раствора белка	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
pH	5,9	5,6	5,3	5,0	4,7	4,4	4,1	3,8

В той пробирке, где обнаружится максимальное помутнение среды (визуально или нефелометрически), pH раствора будет соответствовать ИЭТ белка.

Работа 4

Электрофорез белков на бумаге

Белки — амфотерные электролиты. Если смесь белков поместить в электрическое поле, отрицательно заряженные белки будут передвигаться к аноду, положительно заряженные — к катоду. Нейтральные белки останутся на месте. На этом принципе разработан ряд методов электрофоретического разделения белков, ферментов, аминокислот и других веществ, обладающих зарядом; величина и знак заряда зависят от природы белка, pH и ионной силы используемого буферного раствора. В качестве адсорбента применяют хроматографическую бумагу, силикагель, агар, крахмал и т. п. Рассматриваемым методом можно получить до 9 фракций белков, содержащихся в сыворотке крови.

Оборудование и реактивы: ФЭК, СФ или денситометр; камера для электрофореза со стабилизатором и выпрямителем; холодильник; сушильный шкаф; весы; ножницы; деревянная рама; хроматографическая бумага; линейка; карандаш; вазелиновое масло; фильтровальная бумага; кнопки; карандаш по стеклу; кюветы; пробирки; микропипетки; пипетки на 10 мл. 0,05 М трис-HCl-буфер, pH 8,9*; проявитель (растворяют в воде 0,1 г бромфенолового синего, 50 г ZnSO₄·7H₂O и 50 мл ледяной уксусной

* Приготовление буферных растворов см. в приложении.

кислоты и доводят водой до 1 л); 2%-ный раствор уксусной кислоты (20 мл ледяной уксусной кислоты, воды до 1 л); 0,01 н. раствор NaOH.
Материал: сыворотка крови.

Ход работы

На полосках хроматографической бумаги размером 3 × 26 см делают простым карандашом отметки на расстоянии 7 см от каждого конца. Бумажные полоски смачивают буферным раствором, немного подсушивают на фильтровальной бумаге и закладывают в камеру для электрофореза. В электродные кюветы наливают буферный раствор, отделения кювет соединяют полосками фильтровальной бумаги. После этого на место отметки на каждой полоске наносят из микропипетки 0,01 мл сыворотки в виде тонкой полосы, не доходящей до края с каждой стороны на 2 мм. Крышку камеры закрывают и включают электрический ток. Электрофорез проводят при градиенте потенциала 4—6 В/см. Например, если длина бумаги равна 26 см, градиент потенциала 5 В/см, то напряжение составит 26 × 5 = 130 В. Сила тока должна соответствовать 0,1—0,3 мА на каждый сантиметр бумажной полосы. Работу проводят при 4° С в холодильнике или в холодной камере. Продолжительность электрофореза составляет 18—24 ч. По окончании электрофореза бумажные полоски вынимают из прибора (концы полосок по 7 см с каждой стороны отрезают), закрепляют на деревянной раме и помещают на 15 мин в сушильный шкаф при 100° С. Высушенные полоски кладут в сухие кюветы, заливают раствором проявителя (бромфеноловый синий) и оставляют на 8—20 ч.

Избыток краски удаляют путем промывания бумажных полосок 2%-ным раствором уксусной кислоты до тех пор, пока их фон не станет белым. Затем полоски вывешивают на раме и сушат при комнатной температуре. После высушивания на электрофореграммах обнаруживаются 5 окрашенных полос различных фракций белков: первая слева интенсивно окрашенная полоса — альбуминов, вторая, наименее окрашенная, — α₁-глобулинов, третья — α₂-глобулинов, четвертая — β-глобулинов и, наконец, пятая (крайняя справа) — γ-глобулина.

Количественное определение каждой фракции белков проводят с использованием денситометра или путем извлечения краски из бумаги и определения ее количества. В последнем случае разрезают электрофореграммы на участки, соответствующие отдельным фракциям. Каждый участок измельча-

ют и помещают в отдельные пробирки, в которые приливают по 10 мл элюирующего раствора 0,01 н. NaOH. Для определения фона вырезают полоску бумаги шириной 2 см из участка, свободного от белка, и также заливают элюирующим раствором. Элюцию проводят в течение 30 мин, изредка встряхивая пробирки. Окрашенный раствор колориметрируют на ФЭКе против элюирующего раствора или на СФ при длине волны 595 нм. Для выяснения истинной оптической плотности каждой фракции (D_a) из полученных цифровых значений оптической плотности вычитают величину оптической плотности фона с учетом ширины фракций на бумаге по формуле

$$D_a = D_1 - \frac{D_0 l_1}{l_2},$$

где D_1 — измеренная оптическая плотность; D_0 — оптическая плотность фона; l_1 — ширина полоски фракции, см; l_2 — ширина полоски фона, см.

Величины истинной оптической плотности всех фракций складывают, сумму принимают за 100% и затем вычисляют процентное содержание каждой фракции белков по формуле

$$B = \frac{D_a \cdot 100}{\Sigma D},$$

где D_a — оптическая плотность анализируемой фракции; ΣD — сумма оптических плотностей всех фракций.

Зная абсолютное содержание общего белка сыворотки (в данном объеме), легко вычислить и абсолютное содержание каждой фракции по формуле

$$x = \frac{AB}{100},$$

где A — абсолютное содержание белка, %; B — относительное содержание данной фракции, %.

Содержание каждой фракции электрофореграммы можно рассчитать с помощью денситометра. Для этой цели бумажную полоску пропитывают вазелиновым маслом, избыток которого удаляют путем закладки электрофореграммы между листами фильтровальной бумаги. Затем помещают электрофореграмму в денситометр и записывают кривую. Площадь бумаги, ограниченную кривой, вырезают и взвешивают, разрезают ее на отдельные участки, соответствующие отдельным

фракциям белка, и также взвешивают. Принимая массу площади электрофореграммы за 100%, рассчитывают процентное содержание каждой фракции белка. В последнее время нашло широкое применение для указанных выше целей сочетание различного рода денситометров с цифropечатающими блоками, выдающими сразу площади пиков, соответствующих окрашенным зонам белков на электрофореграмме.

Работа 5

Определение белка по Лоури

Метод основан на образовании комплексного окрашенного соединения в результате взаимодействия белка со щелочным раствором сульфата меди (биуретовая реакция), вольфраматом и молибдатом натрия (реакция Фолина на тирозиновые и цистеиновые радикалы).

Оборудование и реактивы: СФ; центрифуга; весы; пипетки на 1—5 мл; фарфоровые ступки; пробирки; спиртовка; стеклянные палочки.

Реактив А: 2%-ный раствор Na_2CO_3 в 0,1 н. растворе NaOH; **реактив В:** 0,5%-ный раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1%-ном растворе цитрата натрия или виннокислого натрия-калия. Перед употреблением смешивают 1 мл реактива В с 50 мл реактива А (реактив В); 2,5%-ный и 10%-ный растворы ТХУ кислоты; 1 н. раствор NaOH; жидкий азот; 96%-ный спирт или 85%-ный ацетон.

Реактив Фолина — Чокальтеу: в колбу объемом 1 л помещают 50 г вольфрамата натрия, 12,5 г молибдата натрия и 350 мл дистиллированной воды; затем при охлаждении раствора добавляют 25 мл 85%-ного раствора ортофосфорной кислоты и 50 мл концентрированной HCl, осторожно кипятят с обратным холодильником в течение 10 ч, после чего добавляют 75 г сульфата лития, 25 мл воды, 2—3 капли брома и снова прогревают под тягой 15 мин без обратного холодильника для удаления избытка брома. Раствор должен быть прозрачным (в противном случае его фильтруют), ярко-желтого цвета и не иметь зеленоватого оттенка (в последнем случае к раствору прибавляют еще несколько капель брома и вновь кипятят). После охлаждения объем раствора в мерной колбе доводят водой до 500 мл. Концентрация данного раствора по кислоте должна быть 1 н. Обычно для достижения такой нормальности приходится разбавлять его 0,1 н. раствором NaOH примерно вдвое (количество добавляемой щелочи находят путем титрования небольшого объема раствора Фолина 0,1 н. раствором NaOH). Стандартный раствор бычьего сывороточного альбумина (10 мг в 100 мл воды).

Материалы: листья растений; ткани животных; дрожжи.

Ход работы

1. Приготовление раствора белка. 0,5 г листьев растений или тканей животных помещают в фарфоровую ступку, зали-

вают жидким азотом. Замороженную ткань растирают в порошок, прибавляют 2 мл кипящей дистиллированной воды и снова растирают до гомогенной массы. Содержимое количественно переносят 3 мл воды в центрифужные пробирки, добавляют 5 мл 10%-ного раствора ТХУ кислоты, перемешивают и центрифугируют 5 мин при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость сливают, а осадок дважды промывают 2—3 мл 2,5%-ного раствора ТХУ кислоты при центрифугировании. К осадку приливают 2 мл 1 н. раствора NaOH, перемешивают стеклянной палочкой и оставляют стоять на 30 мин. Затем раствор белка разбавляют в 10 раз водой, центрифугируют или фильтруют и используют надосадочную жидкость или фильтрат для определения белка.

Микробные клетки, органоиды растений и животных подвергают гомогенизации, вносят определенный объем раствора (0,5 мл) в центрифужную пробирку, прибавляют равный объем 10%-ного раствора ТХУ кислоты и далее поступают, как это описано выше для тканей растений и животных. Сильно разбавленные водные взвеси водорослей, грибов и других биологических объектов предварительно концентрируют на роторном испарителе, фильтрованием или центрифугированием.

Если осадок белка содержит пигменты, то его предварительно обрабатывают несколько раз спиртом или 85%-ным ацетоном и центрифугируют.

Концентрированные растворы белка (плазма крови, белок яйца) разбавляют водой.

2. Определение белка. К 0,1—0,2 мл исследуемого раствора, содержащего от 5 до 100 мкг белка, добавляют 1 мл реактива В (при определении разведенных растворов белка объемом реактива В увеличивают до 5 мл). Раствор перемешивают и оставляют стоять при комнатной температуре 10 мин. К полученной смеси добавляют быстро из пипетки 0,1 мл реактива Фолина. В присутствии белка желтая окраска переходит в синюю. Раствор перемешивают и через 30 мин фотометрируют на СФ при длине волны 750 нм.

Рассчитывают количество белка по калибровочному графику, составленному для чистого бычьего сывороточного альбумина. Для этого в несколько пробирок вносят определенное количество (от 0,1 до 1 мл) водного раствора, содержащего 10—100 мкг белка, добавляют воды до объема 1 мл, приливают 1 мл раствора В, перемешивают и через 10 мин в

каждую пробирку добавляют по 0,1 мл реактива Фолина, снова перемешивают и через 30 мин фотометрируют.

Работа 6

Определение содержания белка по биуретовой реакции

Оборудование и реактивы: ФЭК; градуированные пипетки на 1 и 5 мл; карандаш по стеклу; пробирки. Биуретовый реактив: растворяют в 250 мл воды 0,75 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 3 г виннокислого натрия-калия ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), затем при энергичном помешивании добавляют 150 мл 10%-ного раствора NaOH, свободного от Na_2CO_3 , и 1 г KI для предотвращения самопроизвольного восстановления; объем раствора доводят водой до 1 л.

Материалы: 1%-ный водный раствор яичного альбумина; плазма крови в разведении 1 : 200.

Ход работы

К 1 мл исследуемого раствора, содержащего 1—10 мг белка, прибавляют 4 мл биуретового реактива, перемешивают и оставляют стоять 30 мин при комнатной температуре. По истечении указанного времени колориметрируют при длине волны 540 нм против воды. Содержание белка рассчитывают по калибровочной кривой, составленной для альбумина: в серию пробирок вливают 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 и 1,0 мл 1%-ного водного раствора яичного альбумина, содержащего от 1 до 10 мг белка, доводят объем раствора дистиллированной водой до 1 мл, перемешивают, добавляют в каждую пробирку по 4 мл биуретового реактива, перемешивают и через 30 мин колориметрируют.

Работа 7

Определение содержания белка на фильтровальной бумаге с использованием кумасси бриллиантового голубого или амидо-черного

Метод основан на учете связанного с белками красителя кумасси бриллиантового голубого R-250 или амидо-черного 10 В.

Оборудование и реактивы: СФ или ФЭК; термостат; фен; пинцет; ножницы; цилиндры диаметром 2,5 см; пипетки; микропипетки; пробирки; хроматографическая бумага ватман № 1; линейка; карандаш по стеклу; простой карандаш. 10%-ный раствор ТХУ кислоты; смесь диэтилового эфира и этилового спирта 1 : 1; раствор красителя: 1) 0,2 г краски кумасси растворяют в 58 мл дистиллированной воды, добавляют 35 мл 95%-но-

го этилового спирта и 7 мл ледяной уксусной кислоты, нагревают до 60°С, затем фильтруют через бумажный фильтр; 2) реагент амидо-черный состоит из 0,6 г амидо-черного 10 В, 37, 65 г лимонной кислоты, 1,136 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ и бидистиллята до 1 л; после перемешивания смесь оставляют на 10 мин при комнатной температуре, затем центрифугируют 15 мин при 6000 об/мин; 7%-ный раствор уксусной кислоты; элюирующая смесь: метанол — вода — концентрированный раствор аммиака в соотношении 64 : 34 : 1; 0,1%-ный раствор бычьего сывороточного альбумина.

Материалы: плазма крови; отжатый клеточный сок растений.

Ход работы

На полоски хроматографической бумаги шириной 2 см, разделенные карандашом на 1,5-сантиметровые отрезки, наносят в виде пятен растворы от 0,05 до 0,2 мл (содержащие 1—50 мкг белка), сушат в токе теплого воздуха, фиксируют белок погружением полосок в цилиндры с 10%-ным раствором ТХУ кислоты на 5 мин, промывают полоски смесью диэтиловый эфир — этанол (1 : 1) и высушивают. Затем полоски бумаги погружают на 15 мин при 30°С в раствор красителя (кумасси или амидо-черного), избыток последнего удаляют погружением полосок на 15—30 мин в 7%-ный раствор уксусной кислоты, высушивают. Полоски разрезают на очерченные прямоугольники (2 × 1,5 см), измельчают и помещают в отдельные пронумерованные пробирки, содержащие 1,5 мл элюирующей смеси. Через 15 мин элюат колориметрируют или фотометрируют в кюветах шириной 5 мм при 590—610 нм против контрольного раствора (элюция полоски, не содержащей белка). Содержание белка рассчитывают по калибровочному графику, составленному для бычьего сывороточного альбумина или какого-либо другого белка (концентрация белка от 0,1 до 1 мг в 1 мл).

Работа 8

Разделение смеси аминокислот методом радиальной хроматографии на бумаге

Метод разделения и качественного обнаружения аминокислот (хроматография) основан на различии адсорбционных свойств и растворимости аминокислот в системе органического растворителя / вода при их продвижении на фильтровальной бумаге. Смесь веществ, нанесенная на бумагу, при движении через нее растворителя разделяется на составные части. Разделенные аминокислоты выявляют раствором нингидрина.

16

Оборудование и реактивы: весы технические; сушильный шкаф; чашки Петри (две нижние или две верхние крышки); стаканчики высотой ниже или на уровне высоты стенки нижней половины чашки; фильтры беззольные или вырезанные из хроматографической бумаги диаметром на 0,5—1 см больше диаметра чашки; капилляры или микропипетки для нанесения раствора аминокислот на бумагу; линейка; пульверизаторы с пробирками; гомогенизатор или фарфоровые ступки; пипетки на 1 и 2 мл; стеклянные стаканчики на 5 мл; делительная воронка; стекловата; фильтровальная бумага; кварцевый песок или толченое стекло; шило. Растворитель: н-бутанол — ледяная уксусная кислота — вода в соотношении 4 : 1 : 5 (смесь готовят перед употреблением); 80%-ный этанол; 0,4%-ный раствор нингидрина в ацетоне или в водонасыщенном н-бутаноле; набор 0,1%-ных растворов аминокислот и их смесей в 80%-ном спирте (аспарагиновой и глутаминовой кислот, аланина, валина, лейцина).

Материалы: ткани животных; плазма крови; яблоки, лук, морковь.

Ход работы

Навеску тканей растений или животных (0,2—0,5 г) гомогенизируют в гомогенизаторе или растирают в фарфоровой ступке с кварцевым песком или толченым стеклом с 2 мл 80%-ного спирта. Из кашицы набирают пипеткой (обратной стороной, в которую вставлен фитиль из стекловаты) жидкость и переносят в чистый стаканчик. Аналогично получают спиртовую вытяжку аминокислот из плазмы крови: к 0,1—0,2 мл плазмы прибавляют 1 мл 80%-ного спирта, перемешивают и далее поступают, как в случае получения вытяжки из тканей растений или животных.

Круглый бумажный фильтр разделяют карандашом на 6 секторов, нумеруют; в центре делают малый круг диаметром 2 см. На середину хорды первого сектора вносят капилляром или микропипеткой 0,01 мл раствора одной аминокислоты — свидетеля, второго — смесь двух, третьего — трех и далее — четырех и пяти аминокислот. В шестой сектор вносят 0,01 мл анализируемой жидкости.

После нанесения растворов аминокислот-свидетелей и исследуемой вытяжки фильтр подсушивают на воздухе, центр фильтра прокалывают шилом, вставляют фитиль из свернутой полоски фильтровальной бумаги.

Наливают в делительную воронку смесь н-бутанол — ледяная уксусная кислота — вода в соотношении 4 : 1 : 5; хорошо взбалтывают и после отстаивания отбрасывают нижний водный слой, а верхний бутанольный наливают в стаканчик, который ставят в чашку Петри (можно налить растворитель и непосредственно в чашку), устанавливают фильтр и покрывают сверху второй половиной чашки (рис. 1). Разделение

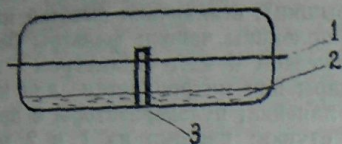


Рис. 1. Радиальная хроматография аминокислот на фильтровальной бумаге в чашках Петри: 1 — фильтровальная бумага; 2 — растворитель; 3 — фитиль из фильтровальной бумаги

длится 1,5—2 ч, после чего фильтр снимают, высушивают (под тягой), опрыскивают раствором нингидрина и подсушивают (лучше в сушильном шкафу при 100° С в течение 5 мин).

На секторах хроматографической бумаги обнаруживаются пятна (небольшие полосы) аминокислот, которые идентифицируют с пятнами свидетелей. По интенсивности окраски и по площади пятен можно судить о количестве аминокислот, присутствующих в изучаемых объектах.

Работа 9

Определение содержания аргинина в биологическом материале

Метод основан на реакции Сакагути, заключающейся в образовании окрашенного комплексного соединения аргинина и α -нафтола. Данный метод позволяет определять содержание как свободного аргинина, так и связанного в белках.

Оборудование и реактивы: ФЭК или СФ; центрифуга; весы; пробирки; пипетки на 1, 2 и 5 мл; фарфоровые ступки; кварцевый песок или толченое стекло; стеклянные палочки. 0,1%-ный спиртовой раствор α -нафтола (0,1 г α -нафтола в 100 мл 50%-ного этанола); 10%-ный раствор КОН; 5%-ный раствор мочевины; раствор КВгО (0,64 мл Вг₂ растворяют под тягой в 100 мл 5%-ного раствора КОН); 80%-ный этанол; стандартный раствор аргинина 1 мМ (17,4 мг в 100 мл 80%-ного этанола).

Материалы: проростки растений; плазма крови; раствор яичного белка (1:10).

Ход работы

1 г проростков растирают с кварцевым песком или толченым стеклом и 5 мл 80%-ного этанола, центрифугируют 5 мин при 3000 об/мин. К 1 мл супернатанта или раствора яичного белка или плазмы крови прибавляют 1 мл спиртового раствора α -нафтола и 1 мл 10%-ного раствора КОН, перемешивают и добавляют 1 мл 5%-ного раствора мочевины. После перемешивания при непрерывном встряхивании быстро приливают 2 мл раствора КВгО. Смесь оставляют на 20 мин. Оптическую плотность измеряют при 520 нм против

контроля, в котором экстракт или раствор белка заменен 1 мл воды. Концентрацию аргинина рассчитывают по калибровочному графику, построенному с использованием стандартного раствора, содержащего 1 мкмоль аргинина в 1 мл.

Работа 10

Качественные реакции на промежуточные и конечные продукты азотистого обмена

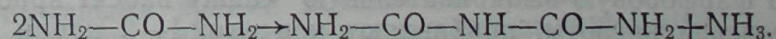
При внутритканевом превращении белковых веществ образуются различные промежуточные и конечные продукты. При распаде аминокислот образуется аммиак, который не накапливается в организме, а превращается в более сложные вещества, главным образом в амиды. В процессе азотистого обмена в животном организме образуются мочевины, мочевая кислота, креатин, креатинин и ряд других продуктов. В растениях (некоторые грибы, соя) в качестве промежуточного продукта обмена также образуется мочевины. При прорастании семян растений, особенно бобовых, накапливается значительное количество аспарагина и глутамина. Углеродный скелет аминокислот при энергетическом обмене окисляется до углекислоты и воды.

Оборудование и реактивы: пробирки; фарфоровые чашки; пипетки на 1—5 мл; электроплитка; держалки для пробирок. 10%-ный раствор NaOH; 1%-ный раствор CuSO₄; концентрированная HNO₃; 25%-ный раствор аммиака; гипобромид натрия (1,5 мл брома растворяют под тягой в 300 мл 30%-ного раствора NaOH); насыщенный раствор нитропруссиды натрия; 5%-ный раствор уксусной кислоты; насыщенный раствор пикриновой кислоты.

Материалы: мочевины кристаллическая и 5%-ный раствор; мочевая кислота кристаллическая; 1%-ные растворы креатина и креатинина или свежая моча.

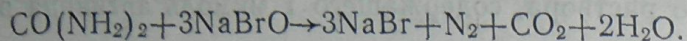
Ход работы

1. Биуретовая реакция на мочевины. Несколько кристаллов мочевины нагревают в сухой пробирке. Кристаллы плавятся и затвердевают. При этом выделяется аммиак и образуется биурет:



После охлаждения наливают в пробирку 1 мл воды и производят биуретовую реакцию: добавляют 1 мл 10%-ного раствора NaOH и 1—2 капли 1%-ного раствора CuSO₄. Развивается сине-фиолетовая окраска.

2. Реакция мочевины с гипобромидом натрия. Мочевина под влиянием гипобромидов натрия разлагается с выделением свободных N_2 и CO_2 :



К 2—3 мл 5%-ного раствора мочевины в пробирке приливают 0,5 мл раствора гипобромидов. Выделяется свободный азот в виде пузырьков газа.

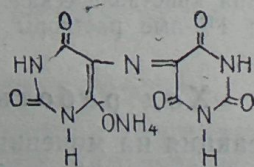
3. Реакция на креатин с нитропруссидом натрия. Креатин в щелочной среде под действием нитропруссидов натрия образует окрашенный в красный цвет изонитрозокреатинин.

К 2—3 мл раствора креатина или мочи приливают 1 мл раствора нитропруссидов натрия и несколько капель 10%-ного раствора щелочи. Появляется красное окрашивание, которое исчезает от разбавления раствора уксусной кислотой. Окраска исчезает также при его стоянии.

4. Реакция на креатинин с пикриновой кислотой. Креатинин в присутствии пикриновой кислоты образует окрашенный продукт — пикрат креатинина.

К 2—3 мл раствора креатинина или мочи добавляют несколько капель 10%-ного раствора щелочи и 1 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты. Появляется оранжевое окрашивание.

5. Мурексидная реакция на мочевую кислоту. Мочевая кислота реагирует с азотной кислотой в присутствии аммиака, образуя сложный продукт темно-красного цвета — мурексид.



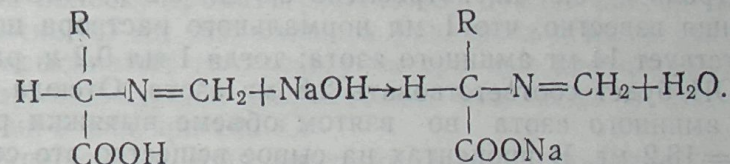
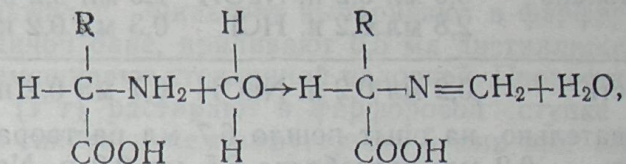
МУРЕКСИД

В фарфоровую выпаривательную чашку вносят кристаллы мочевой кислоты, прибавляют подтягой 1—2 капли концентрированной азотной кислоты и осторожно нагревают. К образующемуся красному осадку прибавляют одну каплю 25%-ного раствора аммиака. Появляется пурпурно-красное окрашивание.

Работа 11

Определение содержания аминного азота формальным титрованием

В процессе расщепления белков кислотами или ферментами образуются аминокислоты, которые содержат свободные аминогруппы и карбоксильные группы. Чтобы определить количество аминогрупп, их блокируют формальдегидом, а оставшиеся свободные карбоксильные группы оттитровывают щелочью:



По количеству пошедшей на титрование щелочи определяют количество $-COOH$ -групп. В среднем число карбоксильных групп в аминокислотах белков равно числу аминогрупп.

Оборудование и реактивы: технические весы; электроплитка; воронки; пипетки на 20 и 10 мл; фарфоровые ступки; конические колбы на 100 мл; бумажные фильтры; стеклянные палочки; ножницы; бюретки; мерные колбы на 50 мл; толченое стекло. 0,2 н. раствор NaOH; 0,2 н. раствор HCl; формальная смесь (50 мл 30—40%-ного формалина + 1 мл 0,1%-ного спиртового раствора фенолфталеина, смесь доводят 0,2 н. раствором NaOH до слабо-розового окрашивания).

Материалы: темновые и световые проростки бобовых растений; непропорошенные семена тех же растений.

Ход работы

Растирают в ступке 5 г проростков или семян с 5—10 мл дистиллированной воды и с толченым стеклом. Содержимое ступки количественно переносят в мерную колбу на 50 мл, промывными водами доводят до метки, перемешивают и фильтруют; в фильтрате определяют аминный азот.

Для опыта берут 20 мл фильтрата, приливают 10 мл формальной смеси и из бюретки 0,2 н. раствор щелочи до появ-

ления яркого окрашивания. Избыток щелочи оттитровывают 0,2 н. раствором HCl до бледно-розовой окраски.

Одновременно проводят контрольное титрование. Для этого к 20 мл прокипяченной и охлажденной воды приливают 10 мл формольной смеси и избыток 0,2 н. раствора щелочи из бюретки. Затем соляной кислотой раствор доводят до слабо-розовой окраски.

Расчет производят следующим образом:

	Контроль	Опыт
Прибавлено	3,0 мл 0,2 н. NaOH 2,8 мл 0,2 н. HCl	7,0 мл 0,2 н. NaOH 0,3 мл 0,2 н. HCl
Разность	0,2 мл 0,2 н. NaOH	6,7 мл 0,2 н. NaOH

Следовательно, на опыт пошло 6,7 мл раствора щелочи, на контроль — 0,2 мл, потреблено 6,5 мл 0,2 н. NaOH. Из уравнения известно, что 1 мл нормального раствора щелочи соответствует 14 мг аминного азота; тогда 1 мл 0,2 н. раствора NaOH будет соответствовать 2,8 мг азота. Отсюда количество аминного азота во взятом объеме вытяжки равно: $6,5 \cdot 2,8 = 18,2$ мг. В процентах на сырое вещество это составляет

$$\frac{18,2 \cdot 50 \cdot 100}{20 \cdot 5 \cdot 1000} = 0,91\%$$

где 50 мл — общий объем вытяжки; 20 мл — объем вытяжки, взятой для титрования; 5 г — навеска материала.

Каждая бригада студентов исследует один объект, а затем данные, полученные всей группой, записываются на доске.

Работа 12

Определение содержания аминного азота с нингидриновым реактивом

Метод основан на способности нингидрина вступать в реакцию с аминогруппами аминокислот с образованием окрашенного соединения.

Оборудование и реактивы: ФЭК; весы; водяная баня; сушильный шкаф; центрифуга; ножницы; линейка; хроматографическая бумага; пипетки на 1—5 мл; пульверизатор; микропипетки; пробирки; ступки фарфоровые; воронки; фильтры бумажные; спиртовки; стеклянные палочки;

фарфоровые чашки. 96%-ный этиловый спирт; раствор нингидрина (0,4 г нингидрина растворяют в 100 мл ацетона или водонасыщенного н-бутанола); 0,5%-ный раствор хлористого кадмия в 40%-ном этаноле или насыщенный раствор медного купороса в 75%-ном этаноле; 0,01 М раствор глицина (75 мг в 100 мл воды).

Материалы: 5—10-дневные проростки бобовых растений; сыворотка крови.

Ход работы

В пробирку приливают 1 мл сыворотки крови, добавляют 2 мл 96%-ного спирта, подогревают до кипения, охлаждают и фильтруют. Фильтрат выпаривают в фарфоровой чашке на водяной бане, приливают 0,5 мл дистиллированной воды и перемешивают стеклянной палочкой. Проростки бобовых растений (1 г) растирают в фарфоровой ступке с 1 мл 96%-ного спирта и центрифугируют 5 мин при 1000 об/мин.

На полоску хроматографической бумаги наносят из микропипетки 0,1 мл безбелкового фильтрата и после высушивания опрыскивают из пульверизатора или протягивают через раствор нингидрина, высушивают, помещают в сушильный шкаф на 5 мин при 100° С.

Окрашенную зону вырезают в виде квадрата 2 × 2 см, разрезают на полоски, помещают в пробирку и заливают 4 мл раствора CdCl₂ или CuSO₄, изредка перемешивают. Через 30 мин окрашенный раствор колориметрируют на ФЭКе с зеленым светофильтром при 510 нм против контроля в кювете шириной 5 мм (в контрольной кювете элюат с той же площади хроматографической бумаги, опрыснутой проявителем и не содержащей смеси аминокислот).

Содержание аминного азота рассчитывают по калибровочной кривой, построенной для 0,01 М водного раствора глицина. Для этого на полоски хроматографической бумаги наносят в нескольких местах 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 мл раствора глицина, содержащие соответственно 7, 14, 35, 70 мкг N, просушивают, опрыскивают раствором нингидрина и далее поступают, как в случае с исследуемой вытяжкой аминокислот.

Работа 13

Колориметрическое определение аминного азота с п-бензохиноном

Метод основан на колориметрии комплекса α-аминокислот с п-бензохиноном.

Оборудование и реактивы: ФЭК или СФ; центрифуга; технические весы; ножницы; фильтровальная бумага; карандаш по стеклу; кварцевый песок или толченное стекло; фарфоровые ступки; воронки; пробирки; пипетки градуированные на 1 и 5 мл; делительная воронка. 62,5 мМ раствор серной кислоты (в мерную колбу на 1 л налить 300—400 мл воды, внести 3,3 мл концентрированной H_2SO_4 , перемешать и после охлаждения довести водой до метки); 5%-ный раствор вольфрамата натрия; 0,5 М фосфатный буфер, рН 6,5; 0,15 М раствор п-бензохинона в диметилсульфоксиде (1,62 г в 100 мл); эфир; 0,01 М раствор глицина (75 г в 100 мл).

Материалы: 3—5-дневные проростки бобовых растений; гепаризованная плазма; раствор яичного белка (1 : 10).

Ход работы

3 г проростков измельчают ножницами, растирают с кварцевым песком или толченым стеклом и 5 мл воды, фильтруют. Наливают в центрифужную пробирку 0,5 мл исследуемой жидкости (вытяжки из проростков, плазмы или раствора яичного белка), прибавляют 1,5 мл 62,5 мМ раствора серной кислоты и 0,5 мл 5%-ного раствора вольфрамата натрия, перемешивают и центрифугируют 5 мин при 3000 об/мин. Вносят в делительную воронку 1 мл надосадочной жидкости, прибавляют 0,2 мл фосфатного буфера, рН 6,5 и 0,6 мл 0,15 М раствора п-бензохинона в диметилсульфоксиде, взбалтывают и через 30 мин извлекают избыток бензохинона, дважды добавляя по 5 мл эфира и перемешивая (нижний водный слой сливают в пробирку, а верхний эфирный отбрасывают).

Определяют оптическую плотность водного слоя на СФ при 492 нм или ФЭКе при 500 нм против контроля из реактивов. Окраска устойчива в течение 1 ч. Рассчитывают аминный азот по калибровочной кривой, составленной для глицина: наливают в четыре пробирки 0,05; 0,1; 0,25 и 0,5 мл 0,01 М раствора глицина (что соответствует 7, 14, 35 и 70 мкг N), доводят объем дистиллированной водой до 1 мл и проводят определение аминного азота по вышеописанной методике.

Работа 14

Определение содержания общего азота по Кьельдалю

Метод основан на минерализации органических веществ серной кислотой с последующей отгонкой и количественным учетом минерализованного азота в форме $(NH_4)_2SO_4$.

Оборудование и реактивы: аналитические весы; электроплитки; штатив Бунзена; колбы Кьельдаля на 100 мл; аппарат для отгонки аммиака

(микрокьельдаль); пипетки на 1, 10 и 20 мл; мерные колбы на 100 мл; бюретки; воронки; стакан химический на 200 мл; спиртовки; мерный цилиндр; пробирки длиной 15 см; стеклянные втулки; асбест. Концентрированная серная кислота; медный купорос кристаллический или смесь селена, сульфата калия и сульфата ртути 1 : 100 : 10; пергидроль (30%-ный раствор H_2O_2); 50%-ный раствор NaOH; 0,025 н. раствор H_2SO_4 ; 0,025 н. раствор NaOH; красная лакмусовая бумага; раствор метилового красного*.

Материалы: сухой растительный материал; ткани животных; сухие дрожжи.

Ход работы

На аналитических весах отвечивают в длинной пробирке 0,5—0,8 г растертого исследуемого материала, переносят в колбу Кьельдаля (пробирку вновь взвешивают, по разности массы пробирки с материалом и без него определяют массу навески). Материал в колбе заливают 10—15 мл концентрированной серной кислоты (набирают мерным цилиндром), добавляют в качестве катализатора 0,1—0,2 г медного купороса или 3—5 г смеси селена с сульфатом ртути и сульфатом калия. После перемешивания содержимого колбы добавляют в нее по каплям 0,5 мл пергидроля (30%-ного раствора H_2O_2), закрывают стеклянной втулкой и осторожно (подложив асбест) нагревают в наклонном положении под тягой, постепенно усиливая озоление. Через каждые 2—4 ч к содержимому колбы добавляют несколько капель пергидроля. После сжигания материала, о чем судят по отсутствию пожелтения жидкости после 20-минутного сильного нагревания, колбу охлаждают, приливают осторожно при помешивании 20—30 мл воды и количественно переносят содержимое в мерную колбу на 100 мл, охлаждают, доводят водой до метки и перемешивают.

Отгон аммиака проводят в специальном приборе (рис. 2). В колбу Кьельдаля наливают 20 мл минерализованной смеси, соединяют ее с парообразователем и доводят воду до кипения. Затем в колбу Кьельдаля наливают через воронку 20 мл 50%-ного раствора едкого натра. Открывают кран парообразователя и отгоняют аммиак в стакан с 20 мл 0,25 н. раствора титрованной серной кислоты, в который предварительно добавляют 2—3 капли раствора индикатора метилового красного (конец форштосса должен быть погружен в кислоту). Окончание отгона ускоряется, если отгонную колбу подогревать на спиртовке или газовой горелке. Чтобы опре-

* Приготовление индикатора см. в приложении.

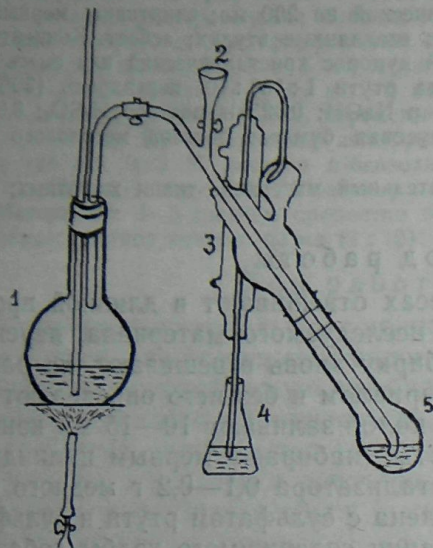


Рис. 2. Общий вид прибора для отгона аммиака: 1 — парообразователь; 2 — воронка; 3 — холодильник; 4 — колба с титрованным раствором H_2SO_4 для связывания аммиака; 5 — колба Кьельдаля с озоленной смесью

делить завершение отгона аммиака, следует поднять холодильник, обмыть трубку дистиллированной водой и уловить на красную лакмусовую бумажку каплю стекающей жидкости. Если лакмусовая бумажка посинеет, отгон следует продолжить, а лакмусовую бумажку бросить в стакан. По окончании отгона избыток серной кислоты в приемнике оттитровывают 0,025 н. раствором $NaOH$ до появления желтой окраски и производят расчет количества азота. Предварительно проводят все описанные операции в контрольном варианте — с одними реактивами.

Количество азота (x) в процентах равно:

$$x = \frac{0,35AB \cdot 100}{V_1 m \cdot 1000},$$

где 0,35 — число миллиграммов азота, которому соответствует 1 мл 0,025 н. раствора щелочи; A — разность между объемами щелочи, пошедшими на титрование контрольного и испытуемого раствора (с поправкой на титр), мл; B — общий объем минерализованной смеси в мерной колбе, мл; V_1 — объем минерализованной смеси, взятой для отгона, мл; m — навеска материала, г.

Определение общего азота методом Несслера

Оборудование и реактивы: аналитические весы; ФЭК; песчаная баня; жаростойкие пробирки; пробирки 1×15 см; воронки; мерные колбы на 50 мл; пипетки на 2 и 5 мл; бюретки; колбы конические на 50—100 мл; стеклянные втулки; резиновая груша. Реактив Несслера* (в мерной колбе на 500 мл растворяют 40 г $NaOH$ в 300 мл воды; отдельно растирают в ступке 15 г HgI и 10 г KI с 3—4 мл воды, переносят полученную смесь в мерную колбу, в которой заготовлена щелочь, перемешивают, доводят объем водой до метки; оставляют в темноте на 1—2 суток, после чего фильтруют через стеклянный фильтр в темную склянку); концентрированная серная кислота; пергидроль; 0,5 н. раствор $NaOH$; бромтимоловый синий; стандартный раствор $(NH_4)_2SO_4$ — 472 мг/л (1 мл раствора содержит 100 мкг азота).

Материалы: сухие измельченные листья; мука; высушенные ткани животных.

Ход работы

Отвешивают на аналитических весах 50—70 мг материала в узкой длинной пробирке. Надевают на нее жаростойкую пробирку, осторожно переворачивают, высыпая материал на дно жаростойкой пробирки, вынимают узкую пробирку и повторно взвешивают. По разности двух взвешиваний определяют массу навески.

Наливают в жаростойкую пробирку (по стенке) 2 мл концентрированной H_2SO_4 , добавляют несколько капель пергидроля, закрывают пробирку стеклянной втулкой и нагревают в вытяжном шкафу на песчаной бане в наклонном положении. Периодически добавляют по 2—3 капли пергидроля. Озоление считают законченным, если после 15-минутного сильного нагревания содержимое пробирок остается бесцветным. Параллельно ставят контрольную пробирку с 2 мл H_2SO_4 (без материала).

Озоленную смесь количественно переносят в мерную колбу на 50 мл, доводят водой до метки и перемешивают. 5 мл смеси вносят в коническую колбу, добавляют 15 капель индикатора бромтимолового синего и титруют 0,5 н. раствором $NaOH$ до перехода зеленой окраски в синюю.

Для определения аммонийного азота в мерную колбу на 50 мл вносят 5 мл озоленной смеси, добавляют столько же раствора $NaOH$, сколько пошло на титрование (без внесения индикатора). Наливают воды до $2/3$ объема колбы, переме-

* Можно использовать имеющийся в продаже готовый реактив.

шивают, добавляют 2 мл реактива Несслера, доводят водой до метки и еще раз перемешивают. Через 15 мин колориметрируют на ФЭКе с синим светофильтром против контроля.

Содержание азота рассчитывают по калибровочной кривой, построенной с сульфатом аммония.

Работа 16

Микрометод определения общего азота

Оборудование и реактивы: ФЭК; аналитические весы; песчаная баня; жаростойкие пробирки; стеклянные втулки; мерные пробирки; пипетки градуированные на 1 и 5 мл; мерные колбы на 50 мл. Селеновый реактив (2 г селена кипятят с 250 мл концентрированной H_2SO_4 до полного обесцвечивания жидкости и после охлаждения смешивают с 250 мл насыщенного раствора K_2SO_4); реактив Несслера (см. работу 15); стандартный раствор $(NH_4)_2SO_4$ (472 мг/л).

Материалы: сухой измельченный материал растений или тканей животных; кровь; клеточный сок растений.

Ход работы

5—10 мг сухой навески или 0,1—1 мл испытуемой жидкости вносят в жаростойкую пробирку, добавляют 0,2 мл селенового реактива, закрывают стеклянной втулкой и сжигают на песчаной бане при температуре 120—130° С в течение 30—60 мин.

После сжигания пробу количественно переносят в мерную пробирку. При содержании азота менее 10 мкг прибавляют воды до 2 мл, вносят 6 мл реактива Несслера и через 30 мин колориметрируют при 420 нм. При большем содержании общего азота объем доводят водой до 10—50 мл, перемешивают, отбирают 2—3 мл, доводят водой до 4 мл, добавляют 2 мл реактива Несслера и через 10 мин колориметрируют на ФЭКе с синим или фиолетовым светофильтром. Окраска сохраняется постоянной при комнатной температуре в темноте в течение 2 ч.

Одновременно с опытными ставят пробы по развитию окраски со стандартными растворами $(NH_4)_2SO_4$.

Работа 17

Определение содержания мочевины в крови с помощью уреазы

Метод основан на способности фермента уреазы разлагать мочевины на CO_2 и аммиак. Последний с гипохлоритом

образует хлорамины, который с фенолом или его производными дает индофенол сине-зеленого цвета. Катализатором этой реакции служит нитропруссид.

Оборудование и реактивы: ФЭК; водяная баня или термостат; градуированные пипетки на 1 и 5 мл; пробирки; микропипетки. Салицилово-нитропруссидный реактив (растворяют 3 г салициловокислого натрия и 60 мг нитропруссиды натрия $Na_2[Fe(CN)_5NO]$ в 100 мл бидистиллята; срок хранения при комнатной температуре 1 месяц); рабочий раствор гипохлорита натрия (62,5 мл 1 н. NaOH смешивают с 4,2 мл 5%-ного раствора NaClO и доводят объем бидистиллятом до 100 мл; срок хранения 2 м-ца); калибровочный раствор мочевины, содержащий 20 мг % азота (428 мг мочевины растворяют в 1 л 0,2%-ного раствора бензойной кислоты); буферный 27 мМ раствор ЭДТА, pH 6,5 (1 г ЭДТА·2H₂O растворяют в 90 мл бидистиллированной воды, доводят pH раствором NaOH до 6,5, а затем доливают водой до 100 мл); раствор уреазы (50 мг уреазы растирают в 5 мл ЭДТА буфера, pH 6,5, объем доводят бидистиллятом до 50 мл).

Материал: сыворотка или плазма крови.

Ход работы

В пробирку вносят 0,1 мл раствора уреазы (1 мг/мл), выдерживают в термостате или водяной бане при 37° С в течение 10 мин, добавляют 0,02 мл сыворотки или плазмы крови, инкубируют 30 мин при комнатной температуре, приливают 2,5 мл салицилат-нитропруссиды и 2,5 мл рабочего раствора гипохлорита натрия, перемешивают, выдерживают еще 30 мин при 37° С и колориметрируют против контроля на реактивы при 540—580 нм. Окраска устойчива в течение 1,5 ч.

Рассчитывают по калибровочной кривой, составленной для чистой мочевины.

Работа 18

Определение аммиака в крови с помощью фенольно-нитропруссидного реактива

Метод основан на колориметрическом измерении голубой окраски, возникающей благодаря образованию комплексной соли индофенолового синего.

Оборудование и реактивы: центрифуга; СФ или ФЭК; термостат; пипетки на 1 мл; пробирки. Раствор серной кислоты (1,1 мл концентрированной H_2SO_4 в 200 мл воды); 3%-ный раствор вольфрамата натрия; фенольно-нитропруссидный реактив (10 мл 5%-ного раствора фенола + 0,2 мл 1%-ного раствора нитропруссиды натрия); щелочной раствор гипохлорита (10 мл 3%-ного раствора NaOH + 0,2 мл 1%-ного раствора NaClO); стандартный раствор $(NH_4)_2SO_4$ 0,472 г/л (1 мл этого раствора содержит 100 мкг N).

Материал: плазма крови.

Ход работы

К 0,5 мл плазмы прибавляют 1 мл раствора H_2SO_4 , 1 мл 3%-ного раствора вольфрамата натрия, перемешивают и центрифугируют 5 мин при 5000 об/мин. К 1 мл супернатанта добавляют 1 мл свежего фенольно-нитропруссидного реактива и 1 мл щелочного раствора гипохлорита натрия, перемешивают и инкубируют при $37^\circ C$ в течение 30 мин. Окрашенный раствор колориметрируют при длине волны 625 нм против контроля на реактивы. Содержание аммиака находят по градуировочной кривой, составленной для $(NH_4)_2SO_4$.

Работа 19

Определение содержания аммиака в биологических объектах в чашках Конвея с помощью индофенольной реакции

Оборудование и реактивы: СФ или ФЭК; термостат; весы; чашки Конвея; пробирки с пробками; градуированные пипетки на 1 мл; фарфоровая ступка; прибор для отжатия сока растений; вазелин. Фенольно-нитропруссидный реактив (6,2 г фенола и 32 мг нитропруссидна натрия в 1 л дистиллированной воды); гипохлоридный реактив (3 г NaOH в 4 мл 1 н. раствора NaClO в 0,1 н. NaOH, дополненные водой до 1 л); 0,01 н. H_2SO_4 ; насыщенный раствор K_2CO_3 ; стандартный раствор $(NH_4)_2SO_4$ (0,472 г/л).

Материалы: свежая кровь; овощи; фрукты.

Ход работы

Во внутреннюю камеру чашки Конвея (рис. 3) вносят 0,7 мл 0,01 н. H_2SO_4 , во внешнюю чашку по каплям вносят

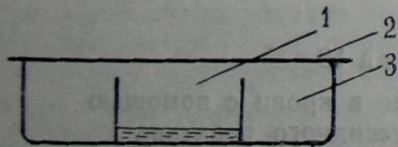


Рис. 3. Чашка Конвея для определения аммиака диффузионным методом: 1 — внутренняя камера; 2 — крышка; 3 — внешняя камера

1 мл насыщенного раствора K_2CO_3 и (с другой стороны чашки) 0,5 мл свежезятой крови, отжатого сока растений или свежерастертой в воде кашицы растений (1:1). Исследуемый материал до закрывания чашки не должен соприкасаться с углекислым калием. Затем чашку закрывают крышкой, смазанной вазелином. Путем покачивания смешивают исследуемый материал с раствором K_2CO_3 и ставят в термостат при $37^\circ C$ (или при комнатной температуре) на 20 мин. По истечении указанного срока берут из внутренней камеры

0,5 мл раствора в пробирку, прибавляют 1 мл фенольно-нитропруссидного реактива и 1 мл гипохлоритного реактива, перемешивают, закрывают пробкой и оставляют на 30 мин при $37^\circ C$. Развившуюся синюю окраску измеряют на СФ или ФЭКе при 645 нм в 5 мм кюветах.

Содержание аммиака находят по калибровочной кривой, составленной для раствора сульфата аммония (в интервале от 50 до 400 мкг азота в 100 мл).

Работа 20

Определение аммиака в крови и в свежем растительном материале в чашках Конвея

Метод основан на вытеснении аммиака в щелочном растворе и связывании его серной кислотой, концентрацию которой определяют титрованием раствором щелочи.

Оборудование и реактивы: весы; термостат; центрифуга; чашки Конвея; градуированные пипетки на 1, 2 и 5 мл; ступка фарфоровая; воронки; фильтры бумажные; колбы конические; микробюретки; вазелин. Насыщенный раствор K_2CO_3 ; 0,05 н. раствор H_2SO_4 ; 0,005 н. раствор NaOH; метиловый красный.

Материалы: свежие растения; кровь.

Ход работы

Во внутреннюю камеру чашки Конвея наливают 2 мл титрованного 0,05 н. раствора серной кислоты, во внешнюю — 1 мл насыщенного раствора K_2CO_3 и закрывают крышкой, смазанной вазелином. Затем, несколько приоткрыв крышку (сдвинув ее), вносят во внешнюю камеру 0,5 мл свежей крови или 2,5—5 мл вытяжки из растений (фильтрат или безбелковый центрифугат) и быстро закрывают крышку; покачивая чашку, смешивают исследуемую жидкость с раствором K_2CO_3 . Чашку помещают в термостат при $37^\circ C$. Через 20 мин избыток неизрасходованной H_2SO_4 во внутренней камере титруют из микробюретки 0,005 н. раствором NaOH до перехода окраски по метиловому красному из розовой в желтую.

По разности количества щелочи, пошедшей на титрование 2 мл 0,05 н. раствора H_2SO_4 (контроль) и такого же объема серной кислоты, прореагировавшей с аммиаком, с учетом поправки на титр щелочи (зная, что 1 мл 0,05 н. H_2SO_4 связывает 0,85 мг NH_3), рассчитывают количество аммиачного азота на 1 г навески растений или 1 мл крови.

НУКЛЕОПРОТЕИДЫ, НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ И ПРОДУКТЫ ИХ ОБМЕНА

Нуклеопротейды — сложные белки, состоящие из нуклеиновых кислот и простых белков (гистонов, протаминов и др.).

Нуклеиновые кислоты — высокомолекулярные биополимеры клеток всех живых организмов, выполняющие важнейшие функции в молекулярных механизмах хранения и передачи генетической информации.

Нуклеиновые кислоты (ДНК и три типа РНК) построены из большого числа мононуклеотидов, которые в свою очередь состоят из пуриновых или пиримидиновых оснований, D-рибозы или 2-дезоксид-рибозы и фосфорной кислоты. В составе мононуклеотидов встречаются в основном два пуриновых основания — аденин и гуанин и три пиримидиновых — урацил, тимин и цитозин. Мононуклеотиды выполняют в клетке и другие важные функции, участвуя в обмене веществ и энергии.

Работа 21

Кислотный гидролиз нуклеопротейдов дрожжей и изучение свойств ДНК и РНК

Оборудование и реактивы: весы технические; весы торсионные; электроплитка; водяная баня; центрифуга; лакмусовая бумага; колба на 100 мл с обратным холодильником; пробирки; пипетки на 1 и 20 мл. Концентрированная и 10%-ная H_2SO_4 ; 10% - и 0,4% -ные растворы NaOH; концентрированный раствор аммиака; 1%-ный раствор $AgNO_3$; бидистиллированная вода; раствор дифениламина (1 г дифениламина растворяют в 50 мл ледяной уксусной кислоты, добавляют 2,75 мл концентрированной H_2SO_4 и доводят ледяной уксусной кислотой до 100 мл); молибденовый реактив (18,75 г молибдата аммония растворяют в 250 мл 32%-ного раствора HNO_3); 1%-ный раствор $CuSO_4$; 1%-ный спиртовой раствор тимола.

Материалы: дрожжи сухие; препараты ДНК и РНК.

Ход работы

1. Гидролиз нуклеопротейдов. В коническую колбу на 100 мл вносят 1 г сухих дрожжей, добавляют 20 мл 10%-ного раствора H_2SO_4 и 20 мл бидистиллированной воды. Колбу соединяют с обратным холодильником, нагревают до кипения и кипятят в течение 1 ч, охлаждают и центрифугируют 5 мин при 5000 об/мин.

2. Биуретовая реакция на белки. В пробирку вносят 5 капель гидролизата, нейтрализуют по лакмусу 10%-ным раствором NaOH, прибавляют 1 каплю 1%-ного раствора медного купороса. Жидкость окрашивается в розовый цвет.

3. Качественные реакции на пентозы:

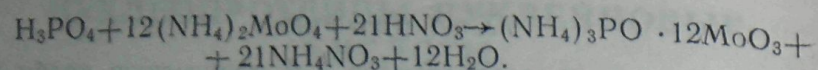
а) к 0,5 мл нейтрализованного щелочью гидролизата добавляют 2 капли 1%-ного спиртового раствора тимола, перемешивают и осторожно подслаивают равный объем концентрированной серной кислоты. На дне пробирки образуется красное окрашивание в результате конденсации тимола с фурфуролом, получившимся из пентозы;

б) к 5—10 мг продажного препарата ДНК прибавляют 1 мл 0,4%-ного раствора NaOH, перемешивают. Из полученного раствора отбирают 0,3—0,5 мл, переносят в пробирку, приливают 0,3—0,5 мл раствора дифениламина и ставят на кипящую водяную баню на 10 мин. Жидкость приобретает синий цвет вследствие взаимодействия дезоксирибозы, образовавшейся в результате гидролиза ДНК, с дифениламином;

в) к 10 мг продажного препарата РНК прибавляют 1 мл 0,4%-ного раствора NaOH, перемешивают. К 0,5 мл щелочного раствора РНК добавляют 0,5 мл раствора дифениламина и ставят пробирку на кипящую водяную баню на 15 мин. Развивается зеленая окраска жидкости вследствие взаимодействия рибозы с дифениламином.

4. Серебряная проба на пуриновые основания. К 1 мл гидролизата дрожжей приливают 2 капли концентрированного раствора аммиака и 5 капель 1%-ного раствора азотно-кислого серебра. Через 3—5 мин выпадает бурый осадок серебряных соединений пуриновых оснований.

5. Молибденовая проба на фосфорную кислоту. К 1 мл гидролизата дрожжей прибавляют 5 капель молибденового реактива и осторожно кипятят несколько минут. Развивается лимонно-желтая окраска жидкости вследствие образования фосфорномолибденовокислого аммония по реакции



Работа 22

Определение нуклеозидфосфатов методом тонкослойной хроматографии

Оборудование и реактивы: СФ; хроматоскоп; весы; рефрижераторная центрифуга; камера для тонкослойной хроматографии; пластинки Silufol uv 254; ножницы; фарфоровые ступки; пробирки; микропипетки; градуированные пипетки на 1 и 2 мл; мерный цилиндр на 100 мл; препаровальная игла. Пропанол; 25%-ный раствор аммиака; жидкий азот; 5%-ный раствор ТХУ кислоты; 0,1 н. HCl; стандартные 0,01 М растворы АТФ, АДФ, АМФ.

Материалы: проростки; ткани животных.

Ход работы

Навеску (0,5—1 г) растительной или животной ткани измельчают ножницами на холоду, заливают жидким азотом и растирают в ступке. Затем к растертому порошку приливают 1 мл 5%-ной ТХУ кислоты, перемешивают и центрифугируют 5 мин при 5000 об/мин при 0—4° С. Надосадочную жидкость сливают в пробирку, к осадку приливают еще 1 мл 5%-ной ТХУ кислоты, перемешивают и центрифугируют. Супернатанты объединяют и используют для хроматографии. На пластинки Silufol uv 254 в нижней части, отступив 2 см, наносят в виде полосы 0,03—0,05 мл надосадочной жидкости. После подсыхания ставят в сосуд для восходящей хроматографии. В качестве растворителя используют систему н-пропанол — 25%-ный аммиак — вода (60 : 30 : 10). Время разделения около 2 ч. Затем вынимают хроматографические пластинки, высушивают на воздухе и просматривают в хроматоскопе (светофильтр УФС-1).

Нуклеотиды располагаются в порядке снизу вверх: АТФ, АДФ, АМФ. Зоны, в которых обнаруживаются нуклеотиды, обводят препаровальной иглой, соскабливают в пробирки и экстрагируют 1,8 мл 0,1 н. HCl, интенсивно встряхивают и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость фотометрируют в кювете шириной 3 мм при длине волны 257 нм против контроля. Контролем служит соскобленный с пластинки сорбент из зоны, не содержащей нуклеотидов; с ним поступают в дальнейшем так же, как с зонами, в которых обнаружены нуклеотиды.

Содержание нуклеотидов рассчитывают по калибровочным графикам, составленным для каждого нуклеотида по формуле

$$C = \frac{D_{257}V}{KAn}$$

где D — оптическая плотность; V — общий объем экстракта, мл; K — коэффициент экстинкции (равный для АМФ, АДФ и АТФ соответственно $14,6 \cdot 10^3$, $15,0 \cdot 10^3$, $14,7 \cdot 10^3$); A — объем нанесенного экстракта, мл; n — навеска, г.

Работа 23

Определение азота и фосфора в биологическом материале

Оборудование и реактивы: ФЭК или СФ; торзионные весы; электроплитка; асбестовая сетка; штатив Бунзена; жаростойкие пробирки (16 × 160 мм); микропипетки; градуированные пипетки на 1, 3 и 5 мл; мерные пробирки на 10 мл с пробками; воронки. 72%-ный раствор хлорной кислоты. Растворы для определения азота: а) фенольно-нитропруссидный реактив (к 10 мл 5%-ного раствора фенола добавляют 0,2 мл 1%-ного раствора нитропруссид натрия); б) щелочной раствор гипохлорита (к 10 мл 3%-ного раствора NaOH прибавляют 0,2 мл 1%-ного раствора NaClO, содержащего 4—6% активного хлора); в) 0,1 н. раствор NaOH. Растворы для определения фосфора: а) 40,5 мМ раствор молибдата аммония (10,2 г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ в 1 л 1 н. H_2SO_4); б) восстановительная смесь (2,5 г $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ растворяют в 60—70 мл воды, прибавляют раствор 0,2 г мегола (п-метиламинофенола) в 10 мл воды, доводят водой до 100 мл, фильтруют); в) сульфитно-карбонатный раствор (7 г Na_2SO_3 и 74,2 г Na_2CO_3 растворяют в 100 мл воды). Стандартные растворы: 1) KH_2PO_4 (растворяют 0,1756 г в 1 л воды; 25 мл этого раствора доводят водой до 1 л, получают рабочий раствор, 1 мл которого содержит 1 мкг фосфора); 2) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (растворяют 0,472 г в 1 л; разбавляя 1 мл этого раствора до 100 мл, получают раствор, содержащий 1 мкг азота в 1 мл).

Материалы: сыворотка крови; сухой растительный материал.

Ход работы

5—10 мг растертого сухого материала или 0,05—0,1 мл сыворотки крови вносят в жаростойкую пробирку, осторожно добавляют 3 мл 72%-ной HClO_4 и нагревают под тягой в наклонном положении на электроплитке, покрытой асбестом, в течение 20 мин. Пробирку охлаждают, содержимое переносят в мерную пробирку на 10 мл, доводят водой до метки, перемешивают.

А. Определение общего азота. Образовавшийся в резуль-

тате минерализации NH_4^+ учитывают по интенсивности окраски индофенольной сини, возникающей в реакции с фенолом и гипохлоритом. К 3 мл образца приливают 3 мл 0,1 н. NaOH , 1 мл фенольно-нитропруссидного реактива и 1 мл щелочного реактива гипохлорита, перемешивают. Окрашенный раствор колориметрируют через 15 мин при 625 нм против контроля (реактивы). Содержание азота находят по градуировочному графику, составленному для $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Б. Определение фосфора в виде фосфомолибденовой сини с применением в качестве восстановителя метола (п-метиламинофенола). К 3 мл образца приливают 0,5 мл раствора молибдата аммония и 1 мл восстановительной смеси. Перемешивают и через 10 мин прибавляют 2,5 мл сульфитно-карбонатного раствора, вновь перемешивают и колориметрируют в кювете шириной 1 см при 578 нм против контроля (реактивы). Рассчитывают содержание фосфора по калибровочному графику, составленному для KH_2PO_4 .

Работа 24

Определение содержания неорганического фосфора в присутствии лабильных органических фосфатов

Метод позволяет определять содержание неорганического фосфора в присутствии таких лабильных фосфатов, как АТФ, глюкозо-1-фосфат, фруктозо-1,6-дифосфат, креатинфосфат и др. Метод основан на способности ортофосфата в присутствии метаванадата аммония образовывать фосфомолибдатванадиевый комплекс.

Оборудование и реактивы: СФ, весы; ступки; воронки; пробирки; градуированные пипетки на 1 и 5 мл; резиновая груша; бумажные фильтры; толченое стекло. Реактив А — 10 н. HCl ; реактив Б — 0,234%-ный раствор метаванадата аммония (2,34 г NH_4VO_3 растворяют в 500 мл горячей воды, добавляют под тягой 28 мл концентрированной HCl и после охлаждения доводят до 1 л дистиллированной водой); реактив В — 3,53%-ный раствор молибдата аммония (35,3 г $(\text{NH}_4)_3\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ растворяют в теплой воде и доводят до 1 л); реактив Г (аммоний-метаванадатмолибдатный реактив): прибавляют к 150—300 мл воды 14 мл реактива А и 10 мл реактива Б и перемешивают; затем к этому раствору добавляют 20 мл реактива В, перемешивают, объем доводят дистиллированной водой до 1 л; н. бутанол; этиловый спирт; 5%-ный раствор ТХУ кислоты; стандартный раствор KH_2PO_4 (0,1756 г/л).

Материал: свежие растения.

Ход работы

Навеску растительного материала (0,5—1 г) растирают с толченым стеклом и 5 мл воды или 5%-ной ТХУ кислоты, фильтруют.

Наливают в пробирку 1,5 мл водной вытяжки или определенное количество кислоторастворимой вытяжки, разведенное водой до 1,5 мл, добавляют 3 мл н. бутанола (набирать пипеткой с резиновой грушей) и 1,5 мл реактива Г. Пробирки тотчас начинают встряхивать в течение 6—10 с и оставляют на 10 мин для разделения слоев. Бутанольный слой колориметрируют против воды (или ТХУ кислоты) при длине волны 310 нм. Если бутанольный слой мутный, его осветляют путем добавления 0,05 мл этанола. Окраска бутанольной фазы стабильна в течение 26 ч при комнатной температуре.

Контроль подвергают тем же операциям, что и опытные образцы. Содержание ортофосфата рассчитывают по калибровочной кривой.

Углеводы — широко распространенные в живых организмах органические вещества. Особенно их много в растениях. Все углеводы подразделяются на моносахариды, олигосахариды и полисахариды.

Среди моносахаридов наиболее распространены гексозы (глюкоза, фруктоза, галактоза, манноза) и пентозы (рибоза, дезоксирибоза, арабиноза, ксилоза и др.).

Олигосахариды — низкополимерные углеводы, содержащие несколько остатков моносахаридов. Это — дисахариды, трисахариды и т. д. К ним относятся сахароза, лактоза, мальтоза и др.

Полисахариды — высокомолекулярные углеводы, состоящие из большого количества моносахаридов. К ним относятся крахмал, гликоген, целлюлоза, пектиновые вещества и др.

Работа 25

Общие свойства моносахаридов

Все моносахариды (а также те дисахариды, которые имеют свободную карбонильную группу) являются редуцирующими сахарами, т. е. способны, окисляясь в щелочной среде, восстанавливать многие вещества, в том числе соли оксидов меди, серебра, висмута и др.

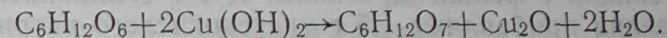
Оборудование и реактивы: технические весы; водяная баня; микроскоп; предметные и покровные стекла; набор пробирок; стеклянные палочки; спиртовки; держалки для пробирок; градуированные пипетки на 1 и 5 мл. 10%- и 2%-ные растворы NaOH; 2%-ный раствор CuSO₄; реактив Фелинга, состоящий из двух растворов: а) 346 г сегнетовой соли KNaC₄H₄O₆·4H₂O, 103,2 г NaOH, воды — до 1 л; б) CuSO₄·5H₂O — 69,28 г, воды — до 1 л; оба раствора хранят отдельно, смешивают в равных количествах перед употреблением; реактив Ниляндера (2 г основного азотнокислого висмута, 4 г сегнетовой соли и 100 мл 10%-ного раствора NaOH нагревают на кипящей водяной бане, охлаждают и отфильтровывают от нерастворившегося осадка); 2%-ный раствор AgNO₃; 25%-ный раствор аммиака; 1%-ный раствор пикриновой кислоты; соляно-

кислый фенилгидразин; уксуснокислый натрий; реактив Гейнеса: а) растворяют 13,3 г кристаллического сульфата меди в 400 мл дистиллированной воды; б) растворяют 50 г КОН в 400 мл воды; в) разводят 15 г чистого глицерина до 200 мл водой; смешивают первый и второй растворы и тотчас же приливают третий (реактив устойчив при хранении в темноте); реактив Бенедикта: а) 173 г лимоннокислого натрия и 90 г карбоната натрия (безводного) растворяют при нагревании в 600 мл дистиллированной воды, фильтруют, доводят дистиллированной водой до 850 мл; б) растворяют 17,3 г сульфата меди в 100 мл воды и доводят до 150 мл; раствор «а» медленно, при помешивании, приливают к раствору «б».

Материал: 1%-ный раствор глюкозы или водная вытяжка из растений (ягод, фруктов), содержащих значительное количество моносахаридов.

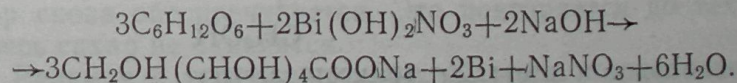
Ход работы

1. Реакция Троммера. В пробирку к 1 мл раствора глюкозы или растительной вытяжки приливают 0,5 мл 10%-ного раствора NaOH и затем осторожно по каплям 2%-ный раствор CuSO₄ до появления не исчезающей при взбалтывании голубой мути гидрата окиси меди. Затем жидкость нагревают (вначале в верхней части пробирки, а затем и в нижней) до начала кипения. Выпадает красный осадок закиси меди по уравнению



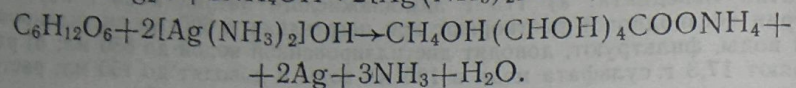
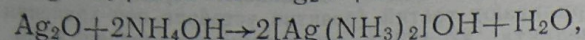
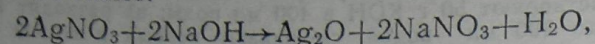
2. Реакция Фелинга. К 1 мл испытуемой жидкости (или раствора глюкозы) приливают 1 мл реактива Фелинга, перемешивают и нагревают до кипения. Выпадает красный осадок закиси меди. Сегнетова соль в данной реакции обеспечивает удержание в растворе гидрата окиси меди.

3. Реакция Ниляндера. К 1—2 мл испытуемой жидкости приливают 0,1—1 мл реактива Ниляндера и кипятят 2—5 мин. Выпадает черный осадок металлического висмута, и вся жидкость темнеет:

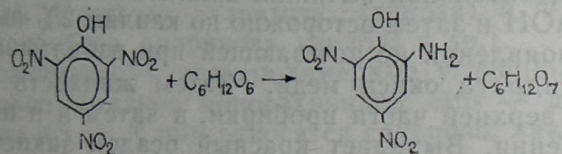


4. Реакция с AgNO₃. К 1 мл 2%-ного раствора нитрата серебра приливают 0,5 мл 2%-ного раствора NaOH. Выпавший осадок окиси серебра растворяют в аммиаке, прибавляя последний по каплям (во избежание образования избытка). Затем в пробирку приливают 1 мл испытуемого раствора и нагревают на спиртовке или водяной бане. На стенках пробирки появляется серебряное зеркало — осадок металлического серебра (положительный результат во многом зависит

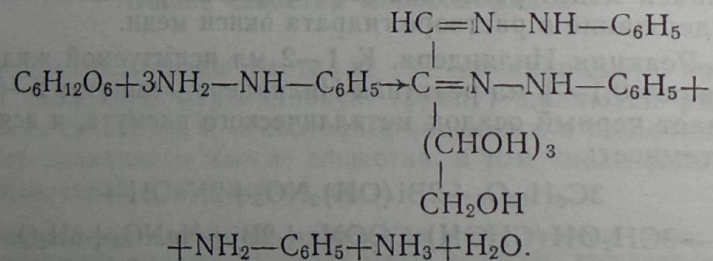
от чистоты внутренних стенок пробирки). Реакция протекает по следующей схеме:



5. Реакция с пикриновой кислотой. К 1—2 мл раствора глюкозы приливают 0,5 мл 10%-ного раствора NaOH, 1 мл раствора пикриновой кислоты и нагревают. Раствор приобретает темно-красное окрашивание вследствие превращения пикриновой кислоты (тринитрофенол) в пикраминовую:



6. Реакция с фенилгидразином. К 1 г солянокислого фенилгидразина прибавляют 1,5 г уксуснокислого натрия, перемешивают, приливают 2—3 мл раствора глюкозы, взбалтывают и ставят на кипящую водяную баню на 30—40 мин. Затем дают жидкости в пробирке охладиться. В результате реакции образуются кристаллы озона:



Под микроскопом они имеют форму желтых игл, собранных в пучки и снопы.

7. Реакция Гайнеса. К 1—2 мл реактива Гайнеса прибавляют 2—3 капли раствора глюкозы и нагревают до кипения. Выпадает красный осадок закиси меди (глицерин в растворе связывает избыток гидрата окиси меди, предотвращая образование осадка окиси меди, затемняющего реакцию).

8. Реакция Бенедикта. Реакция сходна с реакцией Гай-

неса, с той лишь разницей, что для связывания избытка гидрата окиси меди добавляют лимоннокислый натрий. В пробирке смешивают 1,5 мл реактива Бенедикта с 3 каплями раствора глюкозы и ставят на 2 мин в кипящую водяную баню. Образуется красный, желтый или зеленый осадок в зависимости от концентрации глюкозы. При зеленой окраске без наличия осадка проба отрицательна. Проба положительна, если концентрация глюкозы выше 0,05%; при 0,5—1% окраска желто-зеленая, при 1% — желтая, свыше 2% — красная.

Работа 26

Цветные реакции на сахара

Оборудование и реактивы: пипетки на 1 и 2 мл; пробирки; спиртовки; держалки для пробирок. Раствор метиленовой сини (1 : 1000); раствор индигокармина (1 : 1000); резорцин; анилин; флороглюцин; реактив Фелинга (см. работу 25); концентрированная HCl; 25%- и 20%-ные растворы HCl; 20%-ный раствор Na₂CO₃.

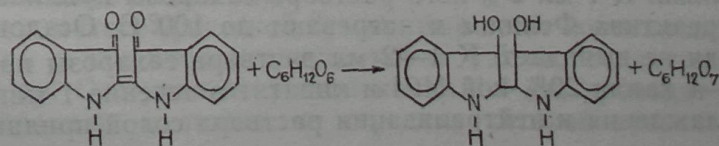
Материалы: 5%-ные растворы глюкозы, фруктозы (раствор фруктозы можно заменить 5%-ным раствором меда), мальтозы, лактозы, целлобиозы, сахарозы, рибозы, ксилозы; древесные опилки.

Ход работы

1. Реакция с метиленовой синью. Метод основан на способности глюкозы восстанавливать (обесцвечивать) метиленовую синь.

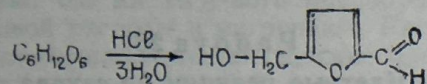
В пробирку наливают 1 мл раствора глюкозы, 2—3 капли раствора соды, 3—4 капли раствора метиленовой сини и нагревают. Происходит обесцвечивание краски. Если же после обесцвечивания пробирку несколько раз встряхнуть, то вновь появляется синее окрашивание, так как метиленовая синь окисляется за счет кислорода воздуха. При стоянии раствор снова обесцвечивается. Это повторяется до тех пор, пока весь сахар не окислится.

2. Реакция с индигокармином. К 1 мл подщелоченного содой раствора глюкозы приливают 2—3 капли раствора индигокармина и кипятят. Синий цвет краски переходит в желтый:



Если жидкость охладить и взболтать, голубая окраска восстанавливается, как и в случае с метиленовой синью.

3. Реакция на фруктозу. К 1 мл раствора фруктозы, меда или водного экстракта яблок добавляют равное количество 25%-ного раствора HCl и несколько кристалликов резорцина, смесь кипятят 20—30 с. В присутствии фруктозы появляется красное окрашивание. Принцип реакции основан на способности фруктозы при нагревании с крепкой HCl терять три молекулы воды и превращаться в оксиметилфурфурол:



Оксиметилфурфурол с резорцином дает вещество, окрашивающее раствор в красный цвет. Такая же реакция происходит с раствором сахарозы вследствие присутствия в ее молекуле фруктозы. Опыт с сахарозой проводится аналогично опыту с фруктозой.

4. Реакции на пентозы. Реакция с анилином (опыт проводят в вытяжном шкафу). В пробирку помещают немного опилок, заливают концентрированной HCl так, чтобы уровень кислоты был немного выше опилок, и кипятят 10 мин; к горячей жидкости приливают 3—4 капли анилина, спуская его по стенке пробирки. Появляется ярко-красное окрашивание. Сущность реакции: происходит гидролиз содержащихся в древесине пентозанов (компонентов гемицеллюлоз), последние с HCl дают фурфурол, который с анилином образует окрашенный в красный цвет продукт. Аналогичный опыт можно поставить с чистым раствором пентозы.

Реакция с флороглюцином. К 1 мл раствора пентозы приливают равное количество концентрированной HCl и несколько миллиграммов флороглюцина (1, 3, 5-триоксибензола). Появляется красное окрашивание. Пентоза под действием HCl превращается в фурфурол, который с флороглюцином дает продукт красного цвета.

5. Реакция Фелинга с раствором сахарозы до и после гидролиза. К 1 мл 2%-ного раствора сахарозы приливают 2—4 мл реактива Фелинга и нагревают до 100° С. Осадок закиси меди не выпадает. К 1—2 мл раствора сахарозы приливают 2—4 капли 20%-ной HCl и кипятят в течение 1 мин. После охлаждения и нейтрализации раствора содой приливают к

нему 2 мл реактива Фелинга и нагревают до 100° С. Выпадает красный осадок закиси меди. Напишите уравнение реакции гидролиза сахарозы.

6. Реакции с другими дисахаридами. К 1 мл растворов мальтозы, лактозы и целлобиозы приливают по 2 мл реактива Фелинга и нагревают. Выпадение красного осадка закиси меди указывает на то, что эти дисахариды содержат свободные полуацетальные гидроксилы.

Работа 27

Определение сахаров методом восходящей хроматографии на бумаге

Метод основан на разделении смеси сахаров на хроматографической бумаге при их продвижении с фронтом растворителя с последующим обнаружением сахаров соответствующими проявителями.

Оборудование и реактивы: весы; центрифуга; сушильный шкаф; пробирки длиной 18—20 см и диаметром 2 см с резиновыми пробками; хроматографическая бумага; булавки; микропипетки; фарфоровые ступки; ножницы; линейка; простой карандаш; градуированные пипетки на 1—5 мл; толченое стекло; пульверизатор; стаканы химические; делительная воронка. Катионит КУ-2, анионит АВ-17 (или другие иониты); растворитель n-бутанол — ледяная уксусная кислота — вода в соотношении 4:1:5 (смесь готовят перед употреблением); универсальный проявитель на сахара (смешивают 2%-ный спиртовой раствор дифениламина с 4%-ным спиртовым раствором свежеперегнанного анилина и концентрированной ортофосфорной кислотой в соотношении 5:5:1); 0,5%-ные растворы глюкозы, фруктозы, сахарозы и их смесь.

Материалы: проростки; плазма крови.

Ход работы

Проростки (1 г) растирают с толченым стеклом и 3 мл воды, добавляют 0,5 г катионита КУ-2 и 0,5 г анионита АВ-17, перемешивают и центрифугируют или фильтруют. Аналогично поступают с кровью: 0,5 мл плазмы крови разбавляют 1 мл воды, добавляют сорбенты, перемешивают и центрифугируют. В центрифугате после прибавления сорбентов остаются сахара (удалены аминокислоты, органические кислоты и другие заряженные вещества).

Из хроматографической бумаги вырезают полоски длиной 17—18 см и шириной с одного конца 1,5 см, с другого — 1,7—1,8 см. Отступая от узкого конца 1,5 см, проводят простым карандашом линию, на середину которой наносят из

микропипетки 5—10 мкл 0,5%-ного раствора одного из сахаров или их смеси, содержащих 25—50 мкг сахара. На другую полоску бумаги наносят микропипеткой центрифугат из растений или плазмы крови. Чтобы нанести нужное количество сахара (25—50 мкг), необходимо наносить два или три раза, подсушивая бумагу каждый раз после нанесения (предварительно желательна рассчитать необходимый объем жидкости для нанесения на бумагу). После подсушивания бумажных полосок каждую из них со стороны широкого конца отгибают на 0,5 см, прокалывают в этом месте булавкой и подвешивают к пробке. Наливают в делительную воронку смесь бутанол — уксусная кислота — вода, тщательно взбалтывают и после отстаивания отбрасывают нижний (водный) слой, а верхний используют в качестве растворителя, наливая в пробирки по 2—3 мл. Пробку с бумажной полоской помещают в пробирку с растворителем так, чтобы она плотно закрыла пробирку, а нижний конец полоски погрузился в растворитель на глубину 0,5 см (рис. 4).

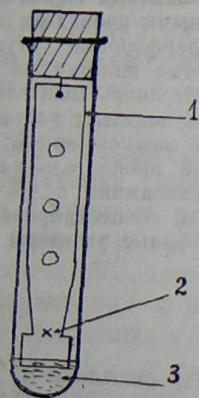


Рис. 4. Восходящая хроматография сахаров в пробирке: 1 — полоска хроматографической бумаги; 2 — место нанесения образца; 3 — растворитель

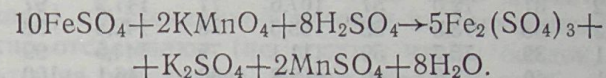
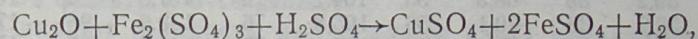
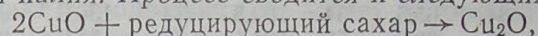
Пропускают растворитель один или два раза на всю длину полоски (перед вторым пропусканием полоску вначале высушивают под тягой). После второго пропускания полоски снова просушивают и опрыскивают проявителем на сахара. Затем полоски помещают в сушильный шкаф на 3—5 мин при температуре 95—100° С. На фильтровальной бумаге обнаруживаются коричневые пятна сахаров. Сравнивают опытные полоски, на которые был нанесен центрифугат из растений или плазмы крови, с полосками, на которые были нанесены известные сахара. На контрольных полосках сахара рас-

полагаются (снизу вверх) в таком порядке: сахароза, глюкоза, фруктоза.

Работа 28

Количественное определение редуцирующих сахаров по Бертрану

Метод основан на восстановлении щелочного раствора окиси меди в закись и учете последней путем воздействия на нее раствором сульфата окисного (трехвалентного) железа, сильно подкисленного серной кислотой. Количество восстановленного при этом железа определяется титрованием перманганатом калия. Процесс сводится к следующим реакциям:



Из этих уравнений следует, что 1 мл 0,1 н. раствора перманганата калия соответствует 6,35 мг меди. Зная количество миллилитров раствора KMnO_4 , пошедших на титрование сульфата железа, находят, какому количеству миллиграммов меди оно соответствует, и по табл. 2 определяют количество сахара в исследуемом растворе.

Оборудование и реактивы: весы технические; водяная баня; электроплитка; асбестовая сетка; масляный насос; штатив Бунзена; скальпель; кварцевый песок или толченое стекло; бумажные фильтры; порошоквидный асбест; песочные часы на 3 мин; термометр; индикаторная бумага; фарфоровые ступки; колбы конические на 150 мл; колбы мерные на 50 и 100 мл; часовые стекла; воронки; колбы Бунзена с резиновыми пробками, в которые вставлены стеклянные фильтры № 2 или № 3; бюретки; пипетки объемные на 5, 10 и 20 мл; стеклянные палочки с резиновыми наконечниками. Раствор медного купороса (40 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ растворить в 1 л воды и профильтровать) — реактив А; щелочной раствор сегнетовой соли (150 г NaOH растворить в воде, добавить 20 г сегнетовой соли и довести водой до 1 л) — реактив Б; раствор сульфата окисного железа (50 г $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ растворить в 400—500 мл воды, добавить 110 мл концентрированной H_2SO_4 и довести водой до 1 л); 15%-ный раствор ZnSO_4 ; 10%-ный раствор желтой кровяной соли; 0,1 н. раствор KMnO_4 (готовят из фиксанала или, при его отсутствии, растворяют 5 г в 1 л горячей воды, кипятят 30 мин и после охлаждения переливают в темную склянку; через 2 дня определяют титр по щавелевой кислоте); CaCO_3 ; 17%-ная HCl ; насыщенный раствор Na_2CO_3 ; толуол в капельнице.

Материалы: проростки злаков; лук; морковь; яблоки.

Таблица

Миллиграммы глюкозы, соответствующие миллиграммам меди (по Бертрану)

Глюкоза	Медь	Глюкоза	Медь	Глюкоза	Медь	Глюкоза	Медь	Глюкоза	Медь
10	20,4	30	59,1	50	95,4	70	129,8	90	162,0
11	22,4	31	60,9	51	97,1	71	131,4	91	163,6
12	24,3	32	62,8	52	98,9	72	133,1	92	165,2
13	26,3	33	64,6	53	100,6	73	134,7	93	166,7
14	28,3	34	65,5	54	102,3	74	136,3	94	168,3
15	30,2	35	68,3	55	104,1	75	137,9	95	169,9
16	32,2	36	70,1	56	105,8	76	139,6	96	171,5
17	34,2	37	72,0	57	107,6	77	141,2	97	173,1
18	36,2	38	73,8	58	109,3	78	142,8	98	174,6
19	38,1	39	75,7	59	111,1	79	144,5	99	176,2
20	40,1	40	77,5	60	112,8	80	146,1	100	177,8
21	42,0	41	79,3	61	114,5	81	147,7		
22	43,9	42	81,1	62	116,1	82	149,3		
23	45,8	43	82,9	63	117,9	83	150,9		
24	47,7	44	84,7	64	119,6	84	152,5		
25	49,6	45	86,4	65	121,3	85	154,0		
26	51,5	46	88,2	66	123,0	86	155,6		
27	53,4	47	90,0	67	124,7	87	157,2		
28	55,3	48	91,8	68	126,4	88	158,8		
29	57,2	49	93,6	69	128,1	89	160,4		

Ход работы

1. Приготовление вытяжки сахаров. Отвешивают 5—10 сырого или 0,2—0,3 г сухого растительного материала, тщательно растирают в фарфоровой ступке с 1—2 г кварцевой песка и 0,2—0,3 г CaCO_3 (для нейтрализации кислот, которые могут вызвать гидролиз сахарозы) и количественно переносят в коническую колбу на 150 мл с 50 мл воды. Затем колбу ставят на 30 мин на водяную баню при температуре 70—80° С. Из охлажденной смеси удаляют белки и другие коллоидные вещества, мешающие определению сахаров, путем добавления в колбу 5 мл 15%-ного раствора ZnSO_4 и 5 мл 10%-ной желтой кровяной соли. Смесь перемешивают, фильтруют через бумажный складчатый фильтр в мерную колбу на 100 мл и промывными водами доводят до 100 мл.

На этом можно прервать работу, добавив в вытяжку несколько капель толуола и закрыв колбу пробкой.

2. Определение в вытяжке сахара. В коническую колбу вливают 20 мл вытяжки, добавляют по 20 мл реактивов А и Б, ставят полученную смесь на электроплитку (на асбест), нагревают до кипения и кипятят 3 мин. Выпадает красный осадок закиси меди. Жидкость над осадком должна иметь синий цвет; если она бесцветна, нужно взять меньшее количество вытяжки — 10 или 15 мл, доведя объем до 20 мл добавлением дистиллированной воды.

Колбу Бунзена со стеклянным фильтром закрепляют при помощи лапок штатива и присоединяют к масляному насосу. Покрывают фильтр слоем асбеста толщиной 1—1,5 мм, для чего разводят порошковидный асбест в горячей воде, выливают на фильтр и отсасывают.

Сливают жидкость над осадком Cu_2O декантацией (не взбалтывая) по стеклянной палочке на стеклянный фильтр и осторожно отсасывают (не досуха, чтобы осадок, попавший на фильтр, не окислялся). Затем осадок в колбе и на фильтре несколько раз промывают горячей дистиллированной водой до полного обесцвечивания промывных вод, стекающих с фильтра.

Колбу отделяют от фильтра, тщательно ее промывают вначале водопроводной водой, а затем дистиллированной, вставляют пробку с фильтром. Осадок в колбе и на фильтре растворяют сернокислым железом в серной кислоте, добавляя его каждый раз небольшими порциями и отсасывая насосом. После растворения осадка колбу и фильтр промывают холодной дистиллированной водой до отсутствия кислой реакции в промывных водах. Содержимое колбы титруют раствором перманганата калия до слабо-розового окрашивания.

Производят расчет сахара на сырое вещество. Сравнивают содержание редуцирующих сахаров в различном растительном материале и в разных частях растений. Содержание глюкозы в процентах рассчитывают по формуле

$$x = \frac{nv \cdot 100}{v_1 m \cdot 1000},$$

где p — количество глюкозы во взятой вытяжке, мг; v — объем всей вытяжки, мл; v_1 — объем взятой для определения вытяжки, мл; m — навеска, г.

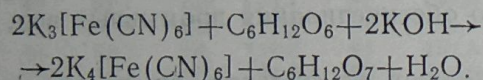
3. Определение сахарозы. К 20 мл вытяжки добавляют

5 мл 17%-ной HCl, нагревают на водяной бане при 70°С 8 мин. После охлаждения нейтрализуют насыщенным раствором Na₂CO₃ до pH 6,5 по индикаторной бумаге (или до прекращения выделения пузырьков CO₂), переносят в мерную колбу на 50 мл, доводят водой до метки, перемешивают. Если жидкость получилась мутной, фильтруют в сухую посуду. Затем определяют редуцирующие сахара по Бертрану. Разность между содержанием сахаров после гидролиза и до гидролиза, умноженная на коэффициент 0,95, дает содержание сахарозы в растительном материале.

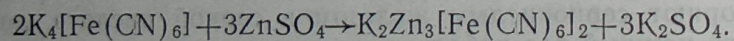
Работа 29

Микрометод определения содержания глюкозы в растениях и крови по Хагедорн — Иенсену

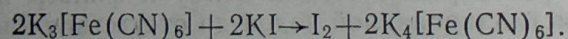
Метод основан на способности глюкозы (и других редуцирующих сахаров) восстанавливать в щелочном растворе железосинеродистый калий в железистосинеродистый по уравнению



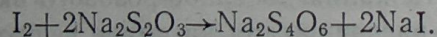
Образующуюся K₄[Fe(CN)₆] переводят в осадок сульфатом цинка:



Избыток K₃[Fe(CN)₆] восстанавливают иодатом калия:



Образующийся иод оттитровывают тиосульфатом:



Из приведенных уравнений следует, что между количеством сахара и количеством израсходованного на титрование тиосульфата имеется обратная зависимость (табл. 3).

Данный метод был предложен для определения содержания глюкозы в крови (у здорового человека этот показатель составляет 70—110 мг %); нередко его используют и для анализа вытяжек из растительного материала.

Оборудование и реактивы: центрифуга; водяная баня; пробирки; микробюретка; конические колбы на 50 мл; микропипетки; песочные часы на

Таблица 3

Миллиграммы глюкозы, соответствующие миллиграмм 0,005 н. раствора тиосульфата при определении сахара по Хагедорн — Иенсену

Тиосульфат, мл	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
0,0	0,385	0,382	0,379	0,374	0,373	0,370	0,367	0,364	0,361	0,358
0,1	0,355	0,352	0,350	0,348	0,345	0,343	0,341	0,338	0,336	0,333
0,2	0,331	0,329	0,327	0,325	0,323	0,321	0,318	0,316	0,314	0,312
0,3	0,310	0,308	0,306	0,304	0,302	0,300	0,298	0,296	0,294	0,292
0,4	0,290	0,288	0,286	0,284	0,282	0,280	0,278	0,276	0,274	0,272
0,5	0,270	0,268	0,266	0,264	0,262	0,260	0,259	0,257	0,255	0,253
0,6	0,251	0,249	0,247	0,245	0,243	0,241	0,240	0,238	0,236	0,234
0,7	0,232	0,230	0,228	0,226	0,224	0,222	0,221	0,219	0,217	0,215
0,8	0,213	0,211	0,209	0,208	0,206	0,204	0,202	0,200	0,199	0,197
0,9	0,195	0,193	0,191	0,190	0,188	0,186	0,184	0,182	0,181	0,179
1,0	0,177	0,175	0,173	0,172	0,170	0,168	0,166	0,164	0,163	0,161
1,1	0,159	0,157	0,155	0,154	0,152	0,150	0,148	0,146	0,145	0,143
1,2	0,141	0,139	0,138	0,136	0,134	0,132	0,131	0,129	0,127	0,125
1,3	0,124	0,122	0,120	0,119	0,117	0,115	0,113	0,111	0,110	0,108
1,4	0,106	0,104	0,102	0,101	0,099	0,097	0,095	0,092	0,092	0,090
1,5	0,088	0,086	0,084	0,083	0,081	0,079	0,077	0,075	0,074	0,072
1,6	0,070	0,068	0,066	0,065	0,063	0,061	0,059	0,057	0,056	0,054
1,7	0,052	0,050	0,048	0,047	0,045	0,043	0,041	0,039	0,038	0,036
1,8	0,034	0,032	0,031	0,029	0,027	0,025	0,024	0,022	0,020	0,019
1,9	0,017	0,015	0,014	0,012	0,010	0,008	0,007	0,005	0,003	0,002

3 мин; воронка; вата; пипетки на 1—5 мл. 0,1 н. раствор NaOH; 0,45%-ный раствор $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 3%-ная уксусная кислота. Реактив А: 0,005 н. раствор красной кровяной соли (1,65 г $K_3[Fe(CN)_6]$ и 10,6 г безводного Na_2CO_3 растворяют в мерной колбе на 1 л и доводят водой до метки; раствор хранят в темноте); реактив Б: в мерной колбе на 100 мл растворяют 10 г $ZnSO_4$ и 25 г NaCl и доводят водой до метки; реактив В: 5%-ный раствор KI (перед употреблением смешивают в равных объемах реактивы Б и В — реактив Г); 1%-ный раствор крахмала (разводят 1 г крахмала в 5 мл холодной воды, выливают в 95 мл кипящей воды и кипятят 1—2 мин); 0,005 н. раствор тиосульфата (растворяют 0,79 г безводного $Na_2S_2O_3$ в 1 л кипяченой дистиллированной воды; титр определяют 0,005 н. раствором иодноватокислого калия).

Материалы: кровь; проростки злаков.

Ход работы

В две пробирки вносят по 5 мл 0,45%-ного раствора сульфата цинка и по 1 мл 0,1 н. раствора NaOH. В одну пробирку добавляют из микропипетки 0,1 мл крови или растительной вытяжки* и перемешивают, в другую — 0,1 мл воды (контроль). Обе пробирки помещают на кипящую водяную баню на 3 мин и содержимое пробирок центрифугируют или фильтруют через вату в конические колбы на 50 мл. Пробирки и осадок на фильтре дважды промывают горячей дистиллированной водой по 3 мл. Прибавляют по 2 мл реактива А и ставят на кипящую водяную баню на 15 мин. После охлаждения прибавляют по 3 мл реактива Г, по 2 мл 3%-ной уксусной кислоты, по 2 капли раствора крахмала и на белом фоне титруют из микробюретки тиосульфатом до исчезновения синего окрашивания. В табл. 3 находят количество (в мг) глюкозы для контроля и опыта, по разности между ними определяют содержание глюкозы в 0,1 мл крови.

Пример расчета. Пусть в контрольном варианте пошло на титрование 1,92 мл раствора тиосульфата, в опыте — 1,46. Количество глюкозы по таблице — 0,014 и 0,095 мг соответственно. Разница составит 0,081 мг глюкозы в 0,1 мл крови, а в 100 мл — 81 мг. Аналогично рассчитывают содержание глюкозы в растительной вытяжке.

* Приготовление вытяжки см. в работе 28; содержание глюкозы в 0,1 мл не должно превышать 0,385 мг.

Работа 30

Количественное определение моносахаридов в растениях и крови антроновым методом

Метод основан на способности глюкозы (и других моносахаридов) в присутствии концентрированной серной кислоты превращаться в производное фурфурола, которое конденсируется с антроном, образуя сине-зеленое красящее вещество.

Оборудование и реактивы: ФЭК; весы технические; центрифуга; фен; термометр; водяная баня; пробирки; ступки фарфоровые; скальпель; пипетки на 1, 2 и 10 мл; кварцевый песок; стеклянные палочки; конические колбы на 100 мл; воронки; мерные колбы на 25, 50 и 100 мл; бумажные фильтры; фарфоровые чашки. Антроновый реактив (растворяют 0,05 г антрона, перекристаллизованного из смеси бензол-петролейный эфир 3:1, и 1 г тиомочевины в 100 мл 66%-ного (по объему) раствора серной кислоты; для улучшения растворения антрона смесь подогревают и после охлаждения фильтруют через стеклянный фильтр; раствор может храниться на холоду в течение двух недель); 0,1 н. раствор NaOH; 2,5%-ный раствор ТХУ кислоты; 80%-ный этанол; стандартный 0,1%-ный раствор глюкозы.

Материалы: проростки злаков; кровь.

Ход работы

1. Получение безбелкового фильтрата растений. Навеску сырого растительного материала (1—2 г) тщательно растирают в фарфоровой ступке с кварцевым песком до однородной массы, количественно переносят десятикратным объемом 80%-ного этанола в коническую колбу и ставят на водяную баню на 30 мин при 80°С. Смесь фильтруют в мерную колбу на 50—100 мл, стараясь не перенести осадок. К осадку приливают еще 10—20 мл 80%-ного этанола, экстрагируют на горячей (80°С) водяной бане в течение 30 мин и сливают в ту же мерную колбу. Эту операцию повторяют еще раз, перенося на фильтр вместе с жидкостью и осадок. Затем колбу и фильтр промывают малыми порциями горячего спирта, которым доводят объем мерной колбы до метки. Перемешивают экстракт, 10—25 мл которого переносят затем в выпаривательную чашку и на водяной бане при 60—80°С с применением фена выпаривают полностью. Содержимое чашки количественно переносят теплой дистиллированной водой в мерную колбу на 25—50 мл, доводят до метки, перемешивают и используют для определения сахаров.

2. Получение безбелкового фильтрата крови. К 0,05—0,1 мл крови приливают 0,5 мл 0,1 н. раствора NaOH, 2 мл 2,5%-ного раствора ТХУ кислоты и фильтруют или центрифугируют 5—10 мин при 3000 об/мин.

3. Определение сахара. В пробирку вносят 1 мл безбелкового фильтрата, содержащего 25—50 мкг глюкозы, и 10 мл антронового реактива, тщательно перемешивают стеклянной палочкой и ставят на кипящую водяную баню на 10 мин. Затем пробирку переносят в холодную водяную баню и через 15 мин колориметрируют против контроля (реактивы) при длине волны 620 нм (красный светофильтр) в 1 см кювете. Окраска стабильна в течение 4 ч. Содержание моносахаридов рассчитывают по калибровочной кривой, составленной для 0,1%-ного раствора глюкозы.

Работа 31

Количественное определение сахара в крови с о-толуидином

Метод основан на способности глюкозы при нагревании с о-толуидином в растворе уксусной кислоты образовывать синне-зеленый комплекс.

Оборудование и реактивы: ФЭК; водяная баня; центрифуга; пробирки; градуированные пипетки на 1 и 5 мл; микропипетки. 3%-ный раствор ТХУ кислоты; о-толуидиновый реактив (в 940 мл ледяной уксусной кислоты растворяют 1,5 г тиомочевны и 60 мл продажного раствора о-толуидина; смесь хранится до 2 м-цев); стандартный 0,1%-ный раствор глюкозы.

Материал: кровь.

Ход работы

В пробирку с 0,9 мл раствора ТХУ кислоты вносят из микропипетки 0,1 мл крови, перемешивают и центрифугируют. К 0,5 мл центрифугата добавляют 4,5 мл о-толуидинового реактива и ставят в кипящую водяную баню на 10 мин, затем охлаждают водопроводной водой (появляется зеленая окраска) и сразу колориметрируют при длине волны 590—650 нм (оранжевый или красный светофильтр) в кювете с толщиной слоя 1 см против контроля на реактивы. Содержание глюкозы рассчитывают по калибровочной кривой, составленной для чистой глюкозы.

Содержание глюкозы в крови можно определить модифицированным о-толуидиновым методом, не удаляя белки. Для этого готовят следующий реактив: 1 г тиомочевны растворяют в 250 мл ледяной уксусной кислоты, добавляют 50 мл о-толуидина и доводят объем до 1 л пропиленгликолем, затем добавляют 0,5 г сульфамовой кислоты и перемешивают в течение 2 ч до полного ее растворения (реактив может храниться в холодильнике в течение 6 м-цев).

Ход определения: в пробирку вносят микропипеткой 20 мкл плазмы или сыворотки, приливают 3 мл реактива и ставят на 10 мин в кипящую водяную баню, затем пробу охлаждают и колориметрируют при 590 нм. Окраска устойчива в течение часа. Содержание глюкозы рассчитывают по калибровочной кривой, составленной для ее раствора.

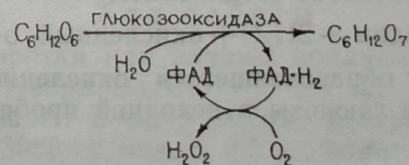
Следующая модификация определения глюкозы в крови без применения ледяной уксусной кислоты. Реактив для определения готовят следующим образом: к 0,25 г тиомочевны прибавляют 5 мл о-толуидина, 5 г гликолевой кислоты, 10 мл дистиллированной воды и 70 мл пропиленгликоля, перемешивают.

Ход определения: в пробирку вносят 20 мкл сыворотки крови, прибавляют 3 мл реактива, перемешивают и ставят пробирку в кипящую водяную баню на 10 мин, затем охлаждают и через 15 мин колориметрируют при 640 нм против контроля на реактивы. Содержание глюкозы рассчитывают по калибровочной кривой, составленной для чистой глюкозы (в границах 60—400 мг%).

Работа 32

Определение содержания глюкозы в биологическом материале с помощью фермента глюкозооксидазы с использованием желтой кровяной соли

Метод основан на окислении глюкозы ферментом глюкозооксидазой (КФ 1.1.3.4) до D-глюконо-δ-лактона и H₂O₂:



Образовавшийся пероксид водорода при участии пероксидазы окисляет желтую кровяную соль $K_4[Fe(CN)_6]$ до красной $K_3[Fe(CN)_6]$. Последняя имеет максимум поглощения в видимой области спектра (415 нм).

Оборудование и реактивы: СФ или ФЭК; центрифуга; весы; фарфоровые ступки; воронки; бумажные фильтры; пробирки; микропипетки; градуированные пипетки на 1 и 5 мл; толченое стекло. Рабочий реактив: в 60 мл 0,4 М фосфатного буфера (рН 7,5) растворяют 10 мг препарата глюкозооксидазы и 6 мг препарата пероксидазы; доводят объем в мерной колбе до 100 мл свежеприготовленным 0,1%-ным раствором желтой кровяной соли $K_4[Fe(CN)_6]$ (раствор может храниться в темной склянке в течение нескольких суток); стандартный 0,1%-ный раствор глюкозы, приготовленный на 0,027%-ной бензойной кислоте (0,27 г/л), который устойчив до одного года.

Материалы: плазма крови; 5—7-дневные проростки гороха, кукурузы.

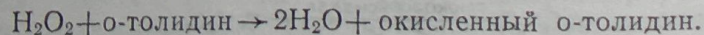
Ход работы

1 г проростков растирают с толченым стеклом и 5 мл дистиллированной воды, приливают еще 45 мл воды и фильтруют через бумажный фильтр или центрифугируют. К 0,05—0,1 мл исследуемого раствора (плазмы крови или вытяжки из растений), содержащего от 10 до 150 мкг глюкозы, прибавляют 3 мл рабочего реактива и оставляют на 30 мин при комнатной температуре. Появляется лимонно-желтая окраска, оптическую плотность которой измеряют на СФ или ФЭКе при 415 нм против контроля (0,1 мл воды и 3 мл рабочего реактива). Количество глюкозы рассчитывают по калибровочной кривой, которую строят, используя растворы, содержащие от 10 до 300 мкг глюкозы в 1 мл.

Работа 33

Определение сахара в крови с помощью фермента глюкозооксидазы с использованием о-толидина

Метод основан на способности глюкозооксидазы (КФ 1.1.3.4) окислять глюкозу в присутствии кислорода воздуха до D-глюконо-δ-лактона и пероксида водорода, который при участии пероксидазы окисляет донор водорода — ортотолидин в окрашенное соединение:



По количеству образовавшегося окисленного о-толидина судят о количестве глюкозы в исходной пробе крови.

Оборудование и реактивы: центрифуга; ФЭК; пробирки; пипетки на 1, 2 и 5 мл. 0,9%-ный раствор NaCl; 5%-ный раствор $ZnSO_4$; 0,3 н. раствор NaOH; ферментный реактив (в мерную колбу на 100 мл вносят 80 мл 0,25 н. ацетатного буфера, рН 4,8, прибавляют 2 мг глюкозооксидазы, 1 мг пероксидазы и 1 мл 1%-ного спиртового раствора о-толидина, доводят объем ацетатным буфером до метки); стандартный 0,1%-ный раствор глюкозы.

Материал: кровь.

Ход работы

В пробирку наливают 1,1 мл 0,9%-ного раствора хлорида натрия, добавляют 0,1 мл крови, перемешивают и приливают 0,4 мл 5%-ного раствора сульфата цинка и 0,4 мл 0,3 н. раствора NaOH. Смесь перемешивают и центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин. К 1 мл центрифугата приливают 3 мл ферментного реактива, перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 15 мин. Колориметрируют при длине волны 590—650 нм в кюветах с толщиной слоя 5 мм против контроля (реактивы). Содержание глюкозы в крови рассчитывают по калибровочной кривой, составленной для чистой глюкозы.

Работа 34

Спектрофотометрический метод определения содержания глюкозы в крови с помощью гексокиназы

Метод основан на фосфорилировании глюкозы за счет АТФ под действием гексокиназы (КФ 2.7.1.1); образовавшийся при этом глюкозо-6-фосфат окисляется дегидрогеназой с образованием восстановленного НАДФ·Н₂.

Оборудование и реактивы: СФ; термостат; центрифуга; пробирки; пипетки на 1 мл. 0,5 н. раствор $Ba(OH)_2$; 0,5 н. раствор $ZnSO_4$; глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа; 0,2 М раствор $MgCl_2$; рабочий реактив: к 4 мл 0,25 М трис-НСl-буфера (рН 8,0) прибавляют 1 мл 0,01 М раствора АТФ (5,07 г/л), 1 мл 0,001 М раствора НАДФ (743 мг/л) и 1 мл раствора гексокиназы (20 ед/мл); 10 мг%-ный раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА); стандартный 0,1%-ный раствор глюкозы.

Материал: сыворотка или плазма крови.

Ход работы

К 1 мл сыворотки или плазмы приливают 0,3 мл воды, 0,7 мл 0,5 н. раствора $Ba(OH)_2$ и 0,5 мл 0,5 н. раствора $ZnSO_4$, перемешивают и через 10 мин центрифугируют в течение 5 мин при 3000 об/мин. К 0,7 мл надосадочной жидкос-

ти приливают 1 мл рабочего реактива, 1 мл раствора БСА, 1 мл раствора глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (1 ед/мл) и 1 мл 0,2 М раствора $MgCl_2$. После инкубации пробы в термостате в течение 15 мин при $37^\circ C$ содержание НАДФ·Н₂ определяют спектрофотометрически при длине волны 340 нм. Содержание глюкозы рассчитывают в мг% по калибровочной кривой, составленной для чистой глюкозы.

Работа 35

Определение содержания D-ксилозы в растениях

Метод основан на превращении D-ксилозы при нагревании в кислой среде в фурфурол, образующий с п-броманилином окрашенный продукт реакции.

Оборудование и реактивы: СФ или ФЭК; центрифуга; весы; водяная баня; термометр; кварцевый песок или толченое стекло; фарфоровые ступки; пробирки; микропипетки; пипетки на 1 и 5 мл; стеклянные палочки; карандаши по стеклу. Раствор п-броманилина (2 г п-броманилина растворяют в 100 мл насыщенного раствора тиомочевины в 3%-ной уксусной кислоте); 5%-ный раствор ТХУ кислоты; стандартный раствор D-ксилозы (20 мг в 100 мл воды).

Материалы: листья; семена льна, ржи.

Ход работы

Навеску (100—200 мг) тщательно растертого растительного материала (содержащую 1—10 мг D-ксилозы) вносят в пробирку, добавляют 5 мл 5%-ного раствора ТХУ кислоты, перемешивают, ставят на водяную баню на 30 мин при $80^\circ C$, затем быстро охлаждают и центрифугируют 5 мин при 3000 об/мин. В три пробирки наливают по 1 мл раствора п-броманилина. В пробирку № 1 добавляют 0,1 мл исследуемого образца, в пробирку № 2 — 0,1 мл 5%-ного раствора ТХУ кислоты (контроль), в пробирку № 3 — 0,1 мл стандартного раствора D-ксилозы. Все пробирки нагревают 10 мин в водяной бане при $70^\circ C$, оставляют на 1 ч в темноте и определяют оптическую плотность на СФ или ФЭКе против воды при 546 нм.

Содержание D-ксилозы (мг/г) рассчитывают по формуле

$$x = \frac{(A - A_1)v \cdot 0,2}{(A_2 - A_1)n},$$

где A — оптическая плотность образца; A_1 — оптическая плотность контроля; A_2 — оптическая плотность стандартно-

го раствора; v — разведение; 0,2 — содержание ксилозы в стандартном растворе, мг/мл; n — навеска, г.

Содержание D-ксилозы можно также рассчитать по калибровочному графику, составленному для ее растворов от 20 до 100 мкг/мл.

Работа 36

Определение содержания фруктозы в крови

Метод основан на превращении фруктозы при нагревании с кислотой в 5-оксиметилфурфурол, образующий с резорцином окрашенный продукт конденсации.

Оборудование и реактивы: СФ или ФЭК; центрифуга; водяная баня; пробирки с воздушным обратным холодильником; градуированные пипетки на 1 и 5 мл; микропипетки; термометр; резиновая груша; карандаш по стеклу. 10 н. раствор HCl; 0,1%-ный раствор резорцина в 95%-ном спирте; 1,05 н. раствор $HClO_4$; стандартный раствор фруктозы (0,2 г фруктозы в 100 мл насыщенного раствора бензойной кислоты).

Материал: кровь или плазма.

Ход работы

В центрифужную пробирку вносят 0,05—0,1 мл плазмы или цельной крови, добавляют пипеткой с резиновой грушей 2,5 мл 1,05 н. $HClO_4$, перемешивают, оставляют стоять на 15 мин и центрифугируют 5 мин при 5000 об/мин. Берут три пробирки, нумеруют их. В пробирку № 1 вносят 1 мл супернатанта, в пробирку № 2 — 1 мл смеси из 0,05 мл стандартного раствора фруктозы и 2,5 мл 1,05 н. раствора $HClO_4$, в пробирку № 3 (контроль) вливают 1 мл смеси из 0,05 мл воды и 2,5 мл 1,05 н. раствора $HClO_4$.

Приливают во все пробирки по 1 мл 0,1%-ного спиртового раствора резорцина и 3 мл 10 н. раствора HCl, закрывают пробками с воздушным обратным холодильником и ставят на 8 мин на водяную баню при $80^\circ C$, быстро охлаждают под водопроводным краном и через 5 мин измеряют оптическую плотность пробирок № 1 и 2 при 490—510 нм в кювете шириной 1 см против контроля (пробирка № 3).

Содержание фруктозы в крови рассчитывают по формуле

$$x = \frac{D_1 v_1 \cdot 2}{D_2 v_2},$$

где D_1 — оптическая плотность опытного образца; D_2 — то

же стандартного раствора; v_1 — разбавление; v_2 — объем крови или плазмы; 2 — содержание фруктозы в стандартном растворе, мг/мл.

Работа 37

Определение содержания гликогена в печени и крахмала в листьях растений

Метод основан на гидролизе полисахаридов, нанесенных на фильтровальную бумагу, грибной глюкоамилазой (КФ 3.2.1.3) и последующем определении глюкозы о-толуидиновым методом.

Оборудование и реактивы: ФЭК; центрифуга; холодильник; весы; термостат; скальпель; пинцет; ножницы; водяная баня; хроматографическая бумага; линейка; фарфоровые ступки; градуированные пипетки на 1 и 5 мл; микропипетки; пробирки; стеклянные бюксы. Жидкий азот; спиртовой раствор ТХУ кислоты (в 100 мл 66%-ного раствора этилового спирта растворяют 10 г ТХУ кислоты; хранят перед работой в холодильнике при 0°); 10%-ный водный раствор ТХУ кислоты; 66%-ный этиловый спирт; ацетон; 0,1 М ацетатный буфер, pH 4,75; раствор в ацетатном буфере грибной глюкоамилазы, содержащей 80 ед. в 1 мл; о-толуидиновый реактив (в 94 мл ледяной уксусной кислоты растворяют 0,15 г тиомочевны и 6 мл продажного раствора о-толуидина; раствор хранится в течение 2 м-цев).

Материалы: печень; листья растений (перед началом работы растения выдерживают на ярком свете в течение двух часов).

Ход работы

0,5 г печени или зеленых листьев растирают с жидким азотом. Сухой порошок вносят в пробирку, приливают 1 мл дистиллированной воды и ставят в кипящую водяную баню на 15 мин; 0,1 мл пробы наносят микропипеткой на хроматографическую бумагу размером 2×2 см. После подсыхания на воздухе бумагу погружают при помощи пинцета на 10 мин в бюкс с ледяным (0°) спиртовым раствором ТХУ кислоты, вынимают и вторично погружают на 10 мин в 10 мл 66%-ного спирта. Затем фильтровальную бумагу с зафиксированной пробой выдерживают 5 мин в закрытом бюксе с ацетоном, сушат 10 мин теплым воздухом и погружают в 1 мл 0,1 М ацетатного буфера, pH 4,75, добавляют 0,05 мл раствора глюкоамилазы, перемешивают и ставят в термостат на 30 мин при 50°С. По окончании гидролиза сливают раствор в центрифужную пробирку, вносят 0,45 мл 10%-ного водного раствора ТХУ кислоты, перемешивают и центрифугируют.

К 0,5 мл центрифугата добавляют 4,5 мл о-толуидинового реактива и ставят на кипящую водяную баню на 10 мин, затем охлаждают под водопроводным краном и колориметрируют с красным светофильтром на ФЭКе в кювете шириной 1 см против контроля на реактивы (в пробирку наливают 0,35 мл ацетатного буфера, 0,5 мл 10%-ного водного раствора ТХУ кислоты и 4,5 мл о-толуидинового реактива).

Количество глюкозы рассчитывают по калибровочной кривой, составленной для чистой глюкозы (см. работу 31). Содержание крахмала или гликогена (%) вычисляют по формуле

$$x = \frac{A \cdot 60 \cdot 0,9}{10},$$

где А — количество глюкозы, определенное по калибровочному графику, мг; 60 — разведение; 0,9 — коэффициент пересчета содержания глюкозы на крахмал; 10 — коэффициент пересчета содержания полисахарида, %.

ЛИПИДЫ

К липидам относятся природные органические соединения, нерастворимые в воде и растворимые в органических растворителях (хлороформе, эфире, бензоле и др.).

Липиды выполняют в организме важнейшие биологические функции: они входят в состав клеточных мембран, служат энергетическим материалом, выполняют защитную роль. Некоторые из этих веществ выполняют функции светочувствительных пигментов, гормонов и т. д.

Липиды подразделяются на следующие группы:

I. Жирные кислоты.

II. Глицеринсодержащие липиды.

А. Нейтральные жиры:

- 1) моно-, ди- и триглицериды;
- 2) простые эфиры глицерина;
- 3) гликозилглицериды.

Б. Фосфоглицериды:

- 1) фосфатиды;
- 2) дифосфатидилглицериды и фосфоинозитиды.

III. Липиды, не содержащие глицерин.

А. Сфинголипиды:

- 1) церамиды;
- 2) сфингомиелины;
- 3) гликофинголипиды.

Б. Алифатические спирты и воска.

В. Терпены.

Г. Стероиды.

IV. Липиды, связанные с веществами других классов.

А. Липопротеины.

Б. Протеолипиды.

В. Фосфатидопептиды.

Г. Липоаминокислоты.

Д. Липополисахариды.

В природе свободные жирные кислоты встречаются редко, чаще всего они входят в классы перечисленных выше липидов. Среди жирных кислот преобладающими являются монокарбоновые, содержащие четное (реже нечетное) число атомов углерода, насыщенные или ненасыщенные (с одной или несколькими двойными связями).

Нейтральные жиры — наиболее распространенная в природе группа липидов, а среди них — триацилглицериды. Фосфоглицериды представляют собой производные L-глицеро-3-фосфата; в основе их классификации лежит тип связи между углеводородной частью молекулы и глицерином, а также природа полярных групп (помимо фосфата) в молекуле. Фосфоглицериды составляют до 50% всех липидов биологических мембран.

Сфинголипиды содержат длинноцепочечное алифатическое основание — сфингозин или дигидросфингозин. В восках содержатся высокомолекулярные алифатические первичные спирты — цетиловый и мирициловый. Терпены построены из структур, углеродный скелет которых является производным изопрена (C_5H_8). К ним относятся фитол, сквален, каротин, ретинол (витамин A_1) и др. Стероиды содержат частично или полностью насыщенные производные фенантрена (например, холестерин); представителями стероидов являются холестерин, 7-дегидрохолестерин, целый ряд гормонов и др.

Большая группа липидов представлена сложными соединениями, участвующими в образовании мембран и других биологически активных структур.

Работа 38

Физико-химические свойства жиров

Оборудование и реактивы: пипетки; пробирки; скальпель; спиртовки; держалки для пробирок. 1%-ный раствор Na_2CO_3 ; эфир; ацетон; бензин; кристаллическая соль $KHSO_4$; бромная вода.

Материал: растительное масло.

Ход работы

1. Растворение жира. В пробирку вносят 0,5 мл масла, добавляют 2—3 мл бензина, перемешивают. Жир растворяется. Жир также хорошо растворяется в эфире, ацетоне, бензоле и других органических растворителях. Для растворения жира в спирте прибегают к подогреванию.

2. Получение эмульсии жира. К 2—3 мл воды прилива-

ют 0,5 мл масла, 3—5 капель 1%-ного раствора Na_2CO_3 и взбалтывают. Образуется стойкая эмульсия за счет частичного образования мыла, являющегося хорошим эмульгатором. Лучшими эмульгаторами являются желчные кислоты.

3. Акролеиновая проба. Реакция основана на отщеплении от глицерина под влиянием водоотнимающих веществ двух молекул воды с образованием непредельного альдегида акролеина ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{COH}$), имеющего специфический запах.

В пробирку вливают 0,5—1 г масла, прибавляют на кончике скальпеля сухой соли KHSO_4 и нагревают на пламени горелки до появления специфического запаха акролеина.

4. Определение непредельности жира. В свободных и связанных с глицерином жирных кислотах некоторых жиров, в особенности растительных масел, имеются ненасыщенные связи, благодаря которым жиры способны присоединять галлоиды.

В пробирку вносят 0,5—1 г масла, приливают 0,5—1 мл бромной воды и тщательно взбалтывают. Происходит обесцвечивание бромной воды.

Работа 39

Качественные реакции на кетоновые тела, фосфатиды и стериды

К кетоновым телам относятся β -оксимасляная кислота, ацетоуксусная кислота и ацетон. Эти вещества представляют собой в животном организме продукты обмена высших жирных кислот, причем первые два соединения (кислоты) являются нормальными продуктами метаболизма, а ацетон накапливается при некоторых расстройствах углеводного обмена (диабет). При патологических условиях в организме могут накапливаться в больших количествах и первые два соединения. Фосфатиды представляют собой сложные эфиры глицерина и жирных кислот, но в отличие от жиров содержат еще в своей молекуле азотистое основание и фосфорную кислоту.

Оборудование и реактивы: водяная баня; центрифуга; пробирки; стаканы; пипетки на 1, 2 и 10 мл; воронки; бумажные фильтры. 25%-ный раствор аммиака; 3%-ный раствор H_2O_2 ; 10%-ный раствор нитропруссид натрия; 10%-ный раствор хлорного железа; 0,1%-ный раствор β -оксимасляной кислоты; 0,1%-ный раствор ацетоуксусной кислоты; ацетон; этило-

вый спирт; 1%-ный раствор холестерина в хлороформе; 80%-ный раствор уксусной кислоты; концентрированная серная кислота; уксусный ангидрид.

Материал: куриный желток.

Ход работы

1. Реакция на β -оксимасляную кислоту. К 0,5 мл раствора β -оксимасляной кислоты в пробирке прибавляют 1 мл 3%-ного раствора H_2O_2 , нагревают на кипящей водяной бане 1 мин и охлаждают. Затем прибавляют 10 капель 10%-ного раствора нитропруссид натрия, встряхивают и наслаивают 2 мл 25%-ного раствора аммиака. Появляется кольцо пурпурного цвета, указывающее на наличие в растворе β -оксимасляной кислоты.

2. Реакция на ацетоуксусную кислоту. В пробирку приливают 0,5 мл раствора ацетоуксусной кислоты, прибавляют по каплям 10%-ный раствор хлорного железа. Жидкость окрашивается в красный цвет.

3. Реакция на ацетон. В пробирку вносят 2—3 капли ацетона, добавляют 1 мл 80%-ного раствора уксусной кислоты и 0,5 мл 10%-ного раствора нитропруссид натрия, встряхивают и наслаивают 2 мл 25%-ного раствора аммиака. Появляется кольцо фиолетового цвета.

4. Реакция на лецитин. К небольшому количеству куриного желтка (0,1—0,2 г) в стакане приливают 15 мл горячего спирта, хорошо перемешивают и центрифугируют или фильтруют (дважды). В пробирку наливают 2—3 мл ацетона и несколько капель прозрачного фильтрата. Появляется муть вследствие нерастворимости лецитина в ацетоне.

5. Реакция на холестерин. В пробирку вносят 5 капель хлороформенного раствора холестерина, добавляют 2 капли уксусного ангидрида, 1 каплю концентрированной серной кислоты и встряхивают. Раствор приобретает красно-фиолетовое окрашивание, переходящее в зеленое. Реакция обусловлена образованием из холестерина непредельных углеводородов с сопряженными двойными связями, дающих различные окрашенные производные с серной кислотой и уксусным ангидридом.

Работа 40

Определение кислотного числа жира

Кислотным числом называется количество миллиграммов КОН, необходимое для нейтрализации свободных жирных кислот, содержащихся в 1 г масла.

Оборудование и реактивы: аналитические весы; конические колбы на 100 мл; бюретки; мерный цилиндр на 50 мл. Смесь эфира и спирта (1:1); 0,1 н. спиртовой раствор КОН; раствор фенолфталеина.

Материал: растительное масло.

Ход работы

Отвешивают в колбу 3—5 г масла, растворяют его в смеси спирт — эфир (10—15 мл), добавляют 2—3 капли раствора фенолфталеина и титруют 0,1 н. спиртовым раствором гидроксида калия до слабо-розового окрашивания, не исчезающего в течение 0,5 мин. Опыт проводят в двух повторностях и затем находят среднее значение кислотного числа (к. ч.) по формуле

$$\text{к. ч.} = \frac{AK \cdot 5,6}{B},$$

где А — количество 0,1 н. раствора КОН, пошедшее на титрование взятой навески, мл; К — поправка к титру КОН; В — навеска масла, г; 5,6 — коэффициент для пересчета (1 мл 0,1 н. раствора содержит 5,6 мг КОН).

Работа 41

Определение числа омыления и эфирного числа

Числом омыления называется количество миллиграммов КОН, необходимое для нейтрализации всех жирных кислот, содержащихся в 1 г жира, — как свободных, так и входящих в состав триглицеридов. Эфирным числом называется количество миллиграммов КОН, необходимое для нейтрализации жирных кислот, которые отщепляются при омылении триглицеридов, содержащихся в 1 г жира.

Оборудование и реактивы: аналитические весы; водяная баня; колбы на 100 мл с обратным холодильником (можно заменить стеклянной трубкой диаметром 5—8 мм и длиной 50—60 см, вставленной в резиновую пробку); пипетки на 1, 10 и 20 мл; бюретка. 0,5 н. спиртовой раствор КОН; раствор фенолфталеина; титрованный 0,5 н. раствор HCl.

Материал: подсолнечное масло.

Ход работы

1. Определение числа омыления. Отвешивают в колбу на аналитических весах 1 г масла (опыт), вливают 20 мл спиртового раствора КОН, соединяют с обратным холодильником и ставят на кипящую водяную баню на 40—50 мин. Колбу

отделяют от холодильника, охлаждают, добавляют 2 капли раствора фенолфталеина, 10 мл воды, перемешивают и титруют из бюретки 0,5 н. раствором HCl до исчезновения окраски. То же самое проделывают с контрольной колбой, в которой масло заменено 1 мл воды. По разности титрования контрольной и опытной колб рассчитывают число омыления:

$$x = \frac{(v_1 - v_2) \cdot 28}{n},$$

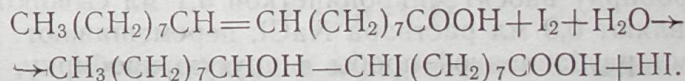
где v_1 — количество миллилитров 0,5 н. раствора HCl, пошедшее на контрольное титрование; v_2 — то же на опытное титрование; n — навеска масла, г; 28 — количество миллиграммов КОН, содержащихся в 1 мл 0,5 н. раствора.

2. Определение эфирного числа. Эфирное число жира рассчитывают путем вычитания из числа омыления величины кислотного числа.

Работа 42

Определение иодного числа жира

Иодным числом называется количество граммов иода, связываемое 100 г жира. Иодное число характеризует ненасыщенность жиров. Например, олеиновая кислота вступает в реакцию с иодом по следующему уравнению:



Избыток иода, который вводится в опыт, оттитровывается раствором тиосульфата натрия.

Оборудование и реактивы: аналитические весы; конические колбы на 100 мл с пробками; бюретка; градуированные пипетки на 1 и 10 мл. 96%-ный этиловый спирт; хлороформ; 0,2 н. спиртовой раствор иода (25,38 г/л); 0,1 н. раствор тиосульфата натрия (24,82 г $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1 л); 1%-ный раствор крахмала.

Материал: растительное масло.

Ход работы

Берут две конические колбы, в одну отвешивают на аналитических весах 0,1 г растительного масла (опыт), в другую наливают 0,1 мл воды (контроль). Затем в обе колбы добавляют по 10 мл спирта или хлороформа, по 10 мл спиртового раствора иода, закрывают пробкой, тщательно перемешивают

и через 10 мин титруют не вошедший в реакцию иод 0,1 н. раствором тиосульфата, вначале до слабо-желтой окраски, а затем добавляют 0,5 мл раствора крахмала и титруют до исчезновения синей окраски. По разности между контрольным и опытным титрованием рассчитывают количество связанного жира мода.

$$\text{Иодное число} = \frac{(v_1 - v_2) \cdot 0,0127 \cdot 100}{n},$$

где v_1 — количество миллилитров тиосульфата, пошедшее на титрование контрольного варианта; v_2 — то же опытного; 0,0127 — титр тиосульфата по иоду; n — навеска, г.

Работа 43

Колориметрический метод определения общего содержания жиров в сыворотке крови

Оборудование и реактивы: СФ или ФЭК; водяная баня; пробирки; микропипетки; градуированные пипетки на 1 и 2 мл; объемная пипетка на 1 мл с резиновой грушей. Серная кислота концентрированная; 0,9%-ный раствор NaCl; цветной реактив (4 г п-диметиламинобензальдегида, 40 мл 85%-ной H_3PO_4 , воды до 100 мл).

Материал: сыворотка крови.

Ход работы

В пробирку вносят микропипеткой 0,1 мл сыворотки крови, добавляют 0,9 мл раствора NaCl, перемешивают. Переносят 0,1 мл разбавленной пробы в другую пробирку, прибавляют 1 мл концентрированной H_2SO_4 (пипеткой с резиновой грушей), перемешивают, ставят на 20 мин в кипящую водяную баню и охлаждают под струей воды. Затем к смеси прибавляют 2 мл цветного реактива и колориметрируют окрашенный раствор при 540 нм против контроля на реактивы.

Содержание жиров в пробе рассчитывают по калибровочному графику, составленному с нейтральным жиром.

Работа 44

Определение триглицеридов в сыворотке крови

Метод основан на омылении триглицеридов, окислении свободного глицерина с помощью $HI O_4$ до формальдегида (НСОН) и спектрофотометрического определения последнего по реакции с фенолгидразином в кислой среде.

Оборудование и реактивы: СФ; центрифуга; водяная баня; градуированные пипетки на 1—2 мл; пробирки; термометр; стеклянные палочки. Спиртовой раствор KOH (40 г/л); раствор $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (37 г/л); 2 н. раствор H_2SO_4 ; раствор $NaIO_4$ (22,5 г/л); раствор хлоргидрата фенолгидразина (40 г/л); 5 н. раствор HCl; стандартный 0,1%-ный раствор глицерина.

Материал: сыворотка крови.

Ход работы

В 10-миллилитровую центрифужную пробирку вносят 0,1 мл сыворотки и 0,5 мл спиртового раствора щелочи и инкубируют в водяной бане 30 мин при 60° С. Затем прибавляют 1 мл раствора сульфата магния и 3 мл дистиллированной воды, перемешивают и центрифугируют. К 1 мл надосадочной жидкости приливают 1 мл 2 н. раствора H_2SO_4 и 0,2 мл раствора $NaIO_4$, перемешивают и выдерживают 10 мин в темноте. Затем прибавляют 0,5 мл раствора хлоргидрата фенолгидразина, выдерживают 10 мин в темноте, вводят 2 мл 5 н. HCl и через 15 мин колориметрируют окрашенный раствор при 530 нм относительно контроля (в контроле вместо надосадочной жидкости берут 1 мл воды; все последующие операции те же, что и в опыте). Содержание триглицеридов рассчитывают по калибровочному графику, построенному с использованием 0,1%-ного раствора глицерина.

Работа 45

Количественное определение свободных жирных кислот в сыворотке крови

Метод основан на способности медных солей жирных кислот образовывать с диэтилдитиокарбаматом натрия окрашенные комплексы, интенсивность окраски которых пропорциональна концентрации свободных жирных кислот.

Оборудование и реактивы: ФЭК; центрифуга; шприц; пробирки с притертыми пробками; градуированные пипетки на 1 и 5 мл; стеклянные палочки; карандаш по стеклу; резиновая груша. Хлороформ; 0,001 М раствор пальмитиновой кислоты в хлороформе (25,4 мг в 100 мл); медный реактив (10 объемов 6,45%-ного раствора $Cu(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, 9 объемов 1 М раствора триэаноламина и 1 объем 1 н. раствора уксусной кислоты); 0,1%-ный раствор диэтилдитиокарбамата натрия в перегнанном н-бутаноле.

Материал: сыворотка крови.

Ход работы

Берут три пробирки с притертыми пробками и нумеруют их. В пробирку № 1 (опыт) вносят 0,5 мл сыворотки крови и 5 мл хлороформа*, в пробирку № 2 (стандарт) — 1 мл раствора пальмитиновой кислоты в хлороформе и 4,5 мл хлороформа, в пробирку № 3 (контроль) — 5 мл хлороформа. Затем во все пробирки добавляют по 2,5 мл медного реактива, пробирки закрывают пробками и встряхивают в течение 2—3 мин.

Содержимое пробирок переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 15 мин. Смесь в пробирках разделяется на 3 слоя: хлороформ, белок, вода. Верхнюю водную фазу, содержащую избыток медного реактива, удаляют шприцем, белковую пленку сдвигают стеклянной палочкой на стенки пробирок, хлороформенный слой с экстрагированными в нем жирными кислотами переносят в сухие пронумерованные пробирки, куда добавляют по 0,5 мл 0,1%-ного раствора диэтилдитиокарбамата натрия в бутаноле и перемешивают.

Опытную и стандартную пробы колориметрируют на ФЭКе с синим светофильтром в кюветах толщиной 5 мм против контрольной смеси.

Содержание свободных жирных кислот (мг-экв/мл) рассчитывают по формуле

$$x = \frac{D_{\text{пр}} \cdot 2}{D_{\text{ст}}},$$

где D — оптическая плотность.

Работа 46

Тонкослойная хроматография свободных жирных кислот из растений и крови

Оборудование и реактивы: камеры для тонкослойной хроматографии; пластинки 9×12 см с силикагелем G (или другой марки)**; толщиной слоя 250 мкм, активированные при 110°C в течение 1 ч; центрифуга; весы; планиметр; градуированные пипетки на 1 и 5 мл; пробирки с пробками; резиновая груша; камера с парами иода (в склянку с притертой крышкой вносят кристаллы иода). Хлороформ; 0,1 М фосфатный буфер,

* Хлороформ и приготовленные на нем растворы набирают пипеткой с резиновой грушей.

** Приготовление пластинок см. в приложении.

pH 6; растворитель (петролейный эфир — диэтиловый эфир — ледяная уксусная кислота в соотношении 82:18:1); стандартные 0,01%-ные растворы жирных кислот в хлороформе (олеиновой, линолевой, пальмитиновой).

Материалы: плазма крови; пшеничная мука.

Ход работы

0,2 мл плазмы крови или 0,2 г пшеничной муки вносят в центрифужную пробирку, вливают 5 мл хлороформа, добавляют 1 мл 0,1 М фосфатного буфера, pH 6, встряхивают 10 мин и отделяют хлороформенный слой центрифугированием в течение 3—5 мин при 3000 об/мин.

На пластинки с силикагелем, отступив от нижнего края на 2 см, наносят 0,2—0,5 мл хлороформенного экстракта полоской длиной 2 см и, отступив на 1 см, наносят по 0,2 мл стандартных растворов жирных кислот. Затем пластинки помещают в камеру с растворителем, погружая нижним краем на 0,5 см. Когда растворитель дойдет до верхнего края пластинки, последнюю вынимают, сушат под тягой и помещают в камеру с парами иода на 20 мин. Ненасыщенные жирные кислоты окрашиваются в темно-коричневый цвет на желтом или белом фоне. Насыщенные жирные кислоты слабо окрашиваются парами иода, причем на воздухе коричневые пятна обесцвечиваются через несколько минут.

Проявленные участки жирных кислот обводят карандашом, определяют площадь участков, например планиметром, сравнивают с площадями стандартных растворов и рассчитывают содержание жирных кислот. Такой расчет носит количественный характер, так как во многих случаях зависимость площади пятен от содержания веществ не является линейной.

Большинство химических реакций в живых организмах протекает с участием ферментов. Ферменты являются чрезвычайно сильными биологическими катализаторами, ускоряющими течение самых разнообразных химических процессов. По своей природе ферменты — специфические белки, простые или сложные. Все ферменты подразделяются по типам катализируемых реакций на 6 классов: 1) оксидоредуктазы; 2) трансферазы; 3) гидролазы; 4) лиазы; 5) изомеразы; 6) лигазы (синтетазы). Каждый из названных классов, в свою очередь, делится на подклассы и подподклассы.

В настоящее время выделено и изучено огромное количество ферментов, многие из которых получены в кристаллической форме. Активность одних ферментов (простых) определяется только структурой самого белка, других (сложных) — присутствием кофакторов, прочно связанных с белковой молекулой (простетических групп) или слабо связанных (коферментов).

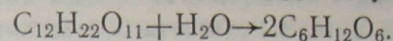
Активность ферментов зависит от природы и концентрации субстрата, рН среды, температуры и других условий. Замечательной особенностью ферментов является специфичность их действия.

Работа 47

Влияние температуры на активность β-фруктофуранозидазы (КФ 3.2.1.26; сахараза, инвертаза)

На активность ферментов оказывает влияние температура: низкая температура снижает активность, а повышение температуры от минимальной до оптимальной увеличивает активность ферментов. Высокие температуры (для большинства ферментов выше 60°С) ингибируют (денатурируют) ферменты.

β-фруктофуранозидаза вызывает гидролитическое расщепление сахарозы на глюкозу и фруктозу по уравнению



Фермент катализирует также фруктотрансферазные реакции. β-фруктофуранозидазу обычно получают из дрожжей и плесневых грибов.

Оборудование и реактивы: электроплитка; весы; фарфоровые ступки; держалки для пробирок; водяная баня; снег или толченый лед; термометр; воронки; стеклянные палочки; карандаши по стеклу; колбы на 100—200 мл; спиртовки; бумажные фильтры; кварцевый песок или толченое стекло; пипетки на 1, 5 и 10 мл; набор пробирок. 1%-ный раствор сахарозы; фелингова жидкость (см. работу 25); 0,1 М фосфатный буфер, рН 7,0.

Материал: прессованные или пивные дрожжи.

Ход работы

1. Выделение фермента. 2 г прессованных или высушенных на воздухе пивных дрожжей растирают в течение 20 мин с кварцевым песком или толченым стеклом и 5 мл фосфатного буфера, затем добавляют 20 мл буфера, нагретого до 60°С, и через 30 мин фильтруют через складчатый бумажный фильтр. Фильтрат должен быть прозрачным, для чего первые порции мутного фильтрата снова выливают в воронку для фильтрования. Фильтрование можно заменить центрифугированием — 10 мин при 3000 об/мин.

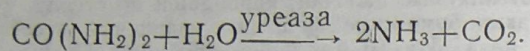
2. Определение активности β-фруктофуранозидазы. Наливают в четыре пронумерованные пробирки по 1 мл вытяжки. Пробирку № 1 ставят в сосуд со снегом или толченым льдом, пробирку № 2 оставляют при комнатной температуре, пробирку № 3 ставят в водяную баню, нагретую до +35°С, пробирку № 4 тщательно кипятят. Добавляют во все пробирки по 5 мл раствора сахарозы и перемешивают, после чего пробирку № 1 немедленно погружают в снег или лед, пробирку № 3 ставят в водяную баню при 35°. По истечении 15 мин во все пробирки приливают по 5 мл фелинговой жидкости и нагревают в кипящей водяной бане. Выпадает красный осадок Cu_2O , по количеству которого судят о влиянии температуры на активность β-фруктофуранозидазы.

Количество инвертированного сахара можно определить методом Бертрана или каким-либо другим методом (см. выше).

Работа 48

Специфичность действия уреазы (КФ 3.5.1.5.)

Специфичность — одно из замечательных свойств ферментов, обеспечивающее возможность координации сложных внутриклеточных процессов. Степень специфичности весьма разнообразна. Уреаза обладает абсолютной специфичностью, т. е. действует только на один субстрат — мочевину, разлагая ее на аммиак и диоксид углерода:



Ацетамид ($\text{NH}_2\text{—CO—CH}_3$), несмотря на гомологичное с мочевиной строение, не разлагается уреазой.

Активная уреазы содержится в семенах сои.

Оборудование и реактивы: пробирки с пробками; пипетки на 5 мл; красная лакмусовая бумага; карандаши по стеклу. 2%-ный раствор мочевины; 2%-ный раствор ацетамида; фенолфталеин.

Материал: соевая мука.

Ход работы

В одну пробирку (№ 1) наливают 5 мл 2%-ного раствора мочевины, в другую (№ 2) — столько же 2%-ного раствора ацетамида; в каждую из них добавляют по 1 г соевой муки, перемешивают и закрывают пробками. В пробирки подвешивают смоченную водой лакмусовую бумажку. Через несколько минут можно обнаружить в пробирке № 1 по запаху или посинению лакмусовой бумажки выделение аммиака; в пробирке № 2 реакция отрицательна. Если затем добавить в обе пробирки по 2—3 капли фенолфталеина, то в пробирке № 1 раствор покраснеет, указывая на подщелачивание среды аммиаком.

Работа 49

Влияние рН среды на активность амилазы (КФ 3.2.1.1, α -амилаза; КФ 3.2.1.2, β -амилаза)

Для большинства ферментов имеется определенное значение рН, при котором их активность максимальна. Понижение или повышение значения рН от оптимальной точки для таких ферментов понижает их активность. Таким образом, влияние рН на активность фермента может выступать в качестве регулятора ферментативной активности внутри клетки.

В качестве примера рассмотрим влияние рН среды на солодовую амилазу. Солод — измельченные проросшие зерна ячменя, в клетках которых содержатся активные α - и β -амилазы. Эти ферменты различаются между собой по характеру действия на компоненты крахмала — амилозу и амилопектин. β -амилаза расщепляет амилозу нацело, превращая ее на 100% в мальтозу, а амилопектин расщепляется лишь наполовину. Декстрины, образующиеся при действии β -амилазы на амилопектин, гидролизуются α -амилазой с образованием декстринов с меньшей молекулярной массой и не дающих окрашивания с иодом. При одновременном действии обеих амилаз крахмал гидролизует на 95%. Метод основан на учете скорости образования продуктов гидролиза в результате действия амилаз на крахмал (в нашем случае в интервале рН от 5,6 до 7,8 исследуется действие в основном β -амилазы, поскольку α -амилаза имеет оптимум рН 4,5).

Оборудование и реактивы: технические весы; водяная баня; электроплитка; термометр; стаканы; пробирки; градуированные пипетки на 1, 5 и 10 мл; мерный цилиндр; воронки; колбы; предметные стекла; бумажные фильтры; стеклянные палочки; карандаши по стеклу. 0,2 М раствор $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,1 М раствор лимонной кислоты; 0,5%-ный крахмальный клейстер (0,5 г крахмала размешивают с 5 мл холодной воды, вливают в 95 мл кипящей воды и кипятят 1—2 мин); глицерин; раствор иода в иодиде калия (растворяют 2 г KI в 5 мл воды, затем вносят 1 г иода, после растворения которого доливают водой до 300 мл).

Материал: солод.

Ход работы

Приготовление ферментной вытяжки: 5 г солода заливают 50 мл смеси глицерин — вода (2:1), нагретой до 40° С, настаивают в течение 30 мин, помешивая палочкой, фильтруют и используют фильтрат в качестве препарата амилазы.

Готовят в трех стаканчиках по 10 мл фосфатно-цитратных буферных смесей с рН 5,6; 6,8; 7,8*. Берут три пронумерованные пробирки и вливают по 1 мл буферной смеси: в пробирку № 1 — с рН 5,6, в пробирку № 2 — с рН 6,8 и в пробирку № 3 — с рН 7,8. Затем в каждую пробирку вносят по 1 мл 0,5%-ного раствора крахмала и по 1 мл раствора амилазы, перемешивают и ставят в водяную баню при температуре 37° С. Через каждые 2—3 мин проводят капельную пробу с раствором иода, для чего из всех пробирок берут по одной капле инкубационной смеси, наносят на предметное

* Приготовление см. в приложении.

стекло (на белом фоне) и добавляют по капле раствора иода. По мере гидролиза крахмала синяя окраска будет постепенно изменяться до фиолетовой, фиолетово-красной, красно-бурой и желтой, свидетельствующей о завершении гидролиза крахмала. Отмечают, какое значение рН среды для действия амилазы будет оптимальным.

Работа 50

Влияние активаторов и ингибиторов на активность α -амилазы слюны (КФ 3.2.1.1)

Большое влияние на активность ферментов оказывают активаторы и ингибиторы — ионы металлов или органические вещества, иногда довольно сложного состава. В роли активаторов ферментов часто выступают различные микроэлементы и водорастворимые витамины — незаменимые факторы питания.

Металлы в роли активаторов в одних случаях могут прочно связываться с ферментами, в других — входить в его органическую структуру, составляя так называемые истинные металлоэнзимы.

Среди веществ, вызывающих торможение какого-либо фермента, большое значение имеют специфические ингибиторы, которые по характеру своего действия подразделяются на обратимые и необратимые. В свою очередь ингибиторы, вызывающие обратимое торможение, разделяют на конкурентные (конкурирующие с субстратом за активный центр фермента) и неконкурентные. Так, например, малонат является конкурентным ингибитором сукцинатдегидрогеназы, ЭДТА и ионы тяжелых металлов (Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ag^+ и др.) — неконкурентные ингибиторы; иодацетамид, диизопрропилфторфосфат (ДФФ) — необратимые ингибиторы. В качестве специфических ингибиторов выступают такие соединения, как антибиотики, гербициды, инсектициды и др.

Оборудование и реактивы: стаканы; пробирки; пипетки на 1 мл; воронки; бумажные фильтры; карандаши по стеклу; стеклянные палочки; предметные стекла. 1%-ный раствор NaCl , 1%-ный раствор CuSO_4 ; раствор иода в иодиде калия (приготовление см. в работе 49); 0,5%-ный раствор крахмала.

Ход работы

Получение ферментного препарата амилазы слюны: ополаскивают рот водой, затем набирают 10—20 мл дистиллиро-

ванной воды, выдерживают во рту 2—3 мин, сливают в стакан и фильтруют через бумажный фильтр.

В три пронумерованные пробирки приливают по 1 мл раствора амилазы слюны. В пробирку № 1 добавляют 2 капли 1%-ного раствора хлорида натрия, в пробирку № 2 — две капли 1%-ного раствора сульфата меди. Затем в каждую пробирку приливают по 0,5 мл 0,5%-ного раствора крахмала, перемешивают и ставят пробирки в штатив при комнатной температуре. Через каждые 2—3 мин из каждой пробирки берут пробы по 1—2 капли на предметные стекла, добавляют по 1 капле раствора иода в иодиде калия и устанавливают степень гидролиза крахмала в разных вариантах опыта.

Работа 51

Влияние малоната на активность сукцинатдегидрогеназы (КФ 1.3.99.1)

Сукцинатдегидрогеназа, коферментом которой является ФАД, катализирует окисление янтарной кислоты до fumarовой, перенося два атома водорода на какой-либо акцептор.

Метод основан на использовании в качестве акцептора водорода метиленовой сини, которая восстанавливается, переходя в бесцветную лейкоформу.

Оборудование и реактивы: водяная баня или термостат; термометр; фарфоровые ступки; пробирки; градуированные пипетки на 1 и 5 мл; карандаши по стеклу. 2%-ный раствор сукцината натрия; 0,05%-ный раствор малоната натрия; 0,2%-ный раствор метиленовой сини; вазелиновое масло.

Материалы: дрожжи; проростки пшеницы, ячменя, кукурузы.

Ход работы

В четыре пронумерованные пробирки наливают по 3,5 мл растертой водной взвеси дрожжей или растертых в ступке проростков (1:1). В первые три пробирки добавляют по 0,5 мл 2%-ного раствора сукцината натрия, затем вносят во вторую 0,5, а в третью 1,0 мл 0,05%-ного раствора малоната натрия. Общий объем смеси всех пробирок доводят дистиллированной водой до 5 мл. Затем в каждую пробирку вносят по 3 капли 0,2%-ного раствора метиленовой сини, содержимое пробирок перемешивают, прибавляют несколько капель вазелинового масла (для предотвращения контакта с

воздухом) и ставят все пробирки в водяную баню или термостат при 37°С. Через 5—10 мин отмечают степень обесцвечивания метиленовой сини и записывают результаты в табл. 4.

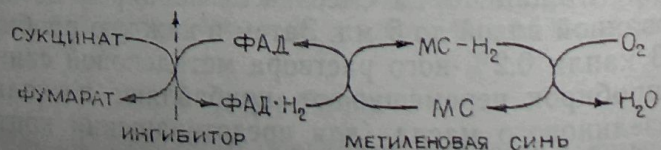
Таблица 4

№ пробирок	Водные взвеси растений, мл	2%-ный раствор сукцината, мл	0,05%-ный раствор малоната, мл	Вода, мл	Результаты наблюдений
1	3,5	0,5	—	1,0	
2	3,5	0,5	0,5	0,5	
3	3,5	0,5	1,0	—	
4	3,5	—	—	1,5	

В пробирке № 1 за счет деятельности сукцинатдегидрогеназы янтарная кислота окисляется, при этом восстанавливается метиленовая синь, которая из окрашенного состояния переходит в неокрашенное. В пробирке № 2 наряду с субстратом присутствует конкурентный ингибитор — малонат, но в недостаточной концентрации, чтобы вызвать сильное подавление активности фермента. В пробирке № 3 содержание ингибитора в два раза больше, чем в пробирке № 2, что вызывает более отчетливое ингибирование фермента. В пробирке № 4 (контроль) не был внесен субстрат окисления — сукцинат натрия (небольшое количество субстрата в исследуемой ткани имеется, но оно недостаточно, чтобы за наблюдаемое время опыта вызвать обесцвечивание краски).

Если теперь содержимое пробирки № 1 несколько раз встряхнуть, то окраска метиленовой сини восстанавливается за счет окисления ее кислородом воздуха.

Схема реакции окисления сукцината ферментом:



КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ

В большинстве случаев о количестве фермента судят по его активности. В настоящее время широко применяются спектрофотометрические, колориметрические, манометрические и другие методы определения активности ферментов.

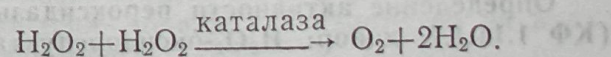
За единицу (Е) фермента принимают то количество его, которое катализирует превращение одного микромоля субстрата за 1 мин при оптимальных условиях. Если в молекуле субстрата фермент атакует более одной связи, то Е выражают в микроэквивалентах затронутых реакцией групп. Удельная активность ферментного препарата выражается числом единиц Е на 1 мг белка, концентрация фермента в растворе — числом единиц Е на 1 мл.

КЛАСС I. ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ

Работа 52

Определение активности каталазы (КФ 1.11.1.6; H₂O₂:H₂O₂-оксидоредуктаза)

Каталаза осуществляет превращение пероксида водорода в H₂O и O₂ по уравнению



Метод основан на учете оставшегося после действия каталазы пероксида водорода титрованием раствором перманганата.

Оборудование и реактивы: весы технические; термостат; мерные колбы на 50 мл; бюретки; колбы конические на 100 мл; пипетки на 5 и 20 мл; воронки; бумажные фильтры; фарфоровые ступки; кварцевый песок или толченое стекло; карандаш по стеклу; стеклянные палочки. 1%-ный раствор пероксида водорода; 0,1 н. раствор KMnO₄; 0,1 М фосфатный буфер, рН 6,8; 2 н. раствор H₂SO₄.

Материалы: листья; проростки.

Ход работы

Растирают в ступке 5 г растительного материала с кварцевым песком и 5 мл фосфатного буфера. Содержимое ступки количественно переносят в мерную колбу буферным раствором, доводя объем до 50 мл. Смесь перемешивают и ставят в термостат при 37°С на 15 мин, по истечении которых смесь фильтруют. В две конические колбы вносят по 20 мл

воздухом) и ставят все пробирки в водяную баню или термостат при 37° С. Через 5—10 мин отмечают степень обесцвечивания метиленовой сини и записывают результаты в табл. 4.

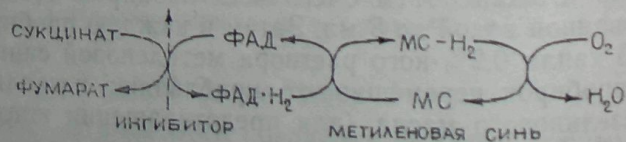
Таблица 4

№ пробирок	Водные взвеси растений, мл	2%-ный раствор сукцината, мл	0,05%-ный раствор малоната, мл	Вода, мл	Результаты наблюдений
1	3,5	0,5	—	1,0	
2	3,5	0,5	0,5	0,5	
3	3,5	0,5	1,0	—	
4	3,5	—	—	1,5	

В пробирке № 1 за счет деятельности сукцинатдегидрогеназы янтарная кислота окисляется, при этом восстанавливается метиленовая синь, которая из окрашенного состояния переходит в неокрашенное. В пробирке № 2 наряду с субстратом присутствует конкурентный ингибитор — малонат, но в недостаточной концентрации, чтобы вызвать сильное подавление активности фермента. В пробирке № 3 содержание ингибитора в два раза больше, чем в пробирке № 2, что вызывает более отчетливое ингибирование фермента. В пробирке № 4 (контроль) не был внесен субстрат окисления — сукцинат натрия (небольшое количество субстрата в исследуемой ткани имеется, но оно недостаточно, чтобы за наблюдаемое время опыта вызвать обесцвечивание краски).

Если теперь содержимое пробирки № 1 несколько раз встряхнуть, то окраска метиленовой сини восстанавливается за счет окисления ее кислородом воздуха.

Схема реакции окисления сукцината ферментом:



КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ

В большинстве случаев о количестве фермента судят по его активности. В настоящее время широко применяются спектрофотометрические, колориметрические, манометрические и другие методы определения активности ферментов.

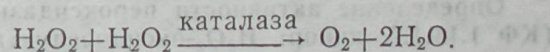
За единицу (Е) фермента принимают то количество его, которое катализирует превращение одного микромоля субстрата за 1 мин при оптимальных условиях. Если в молекуле субстрата фермент атакует более одной связи, то Е выражают в микроэквивалентах затронутых реакцией групп. Удельная активность ферментного препарата выражается числом единиц Е на 1 мг белка, концентрация фермента в растворе — числом единиц Е на 1 мл.

КЛАСС I. ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ

Работа 52

Определение активности каталазы (КФ 1.11.1.6; H₂O₂:H₂O₂-оксидоредуктаза)

Каталаза осуществляет превращение пероксида водорода в H₂O и O₂ по уравнению



Метод основан на учете оставшегося после действия каталазы пероксида водорода титрованием раствором перманганата.

Оборудование и реактивы: весы технические; термостат; мерные колбы на 50 мл; бюретки; колбы конические на 100 мл; пипетки на 5 и 20 мл; воронки; бумажные фильтры; фарфоровые ступки; кварцевый песок или толченое стекло; карандаш по стеклу; стеклянные палочки. 1%-ный раствор пероксида водорода; 0,1 н. раствор KMnO₄; 0,1 М фосфатный буфер, рН 6,8; 2 н. раствор H₂SO₄.

Материалы: листья; проростки.

Ход работы

Растирают в ступке 5 г растительного материала с кварцевым песком и 5 мл фосфатного буфера. Содержимое ступки количественно переносят в мерную колбу буферным раствором, доводя объем до 50 мл. Смесь перемешивают и ставят в термостат при 37° С на 15 мин, по истечении которых смесь фильтруют. В две конические колбы вносят по 20 мл

фильтрата. В одну колбу (контроль) вливают 5 мл 2 н. раствора H_2SO_4 для инактивации фермента, затем в обе колбы приливают по 20 мл воды и по 3 мл 1%-ного раствора H_2O_2 , перемешивают, отметив время, и оставляют в термостате при $37^\circ C$ на 15 мин. По истечении указанного времени в опытную колбу добавляют 5 мл 2 н. раствора H_2SO_4 , перемешивают и титруют содержимое обеих колб 0,1 н. раствором перманганата калия до слабо-розовой окраски, не исчезающей в течение 30 с.

Активность каталазы рассчитывают по формуле

$$v = \frac{(B-A)KC}{nC_1t},$$

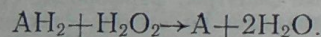
где А и В — количество перманганата калия, пошедшее на титрование соответственно опытной и контрольной проб, мл; К — поправка к титру 0,1 н. раствора перманганата калия; С — объем смеси, мл; C_1 — объем, взятый для определения, мл; п — навеска растительного материала, г; t — время, ч.

Результаты расчета сводят в соответствующую таблицу и делают вывод об активности каталазы различных растений и их органов.

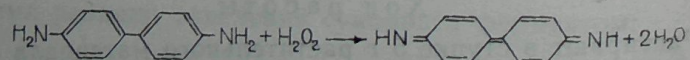
Работа 53

Определение активности пероксидазы (КФ 1.11.1.7; донор: H_2O_2 -оксидоредуктаза) по окислению бензидина

Пероксидазы — гемопроteidные ферменты, широко распространенные в растениях, но встречающиеся и в животных тканях. Пероксидаза катализирует следующую типичную реакцию:



Метод основан на способности пероксидазы катализировать окисление бензидина в п-хинондиимин:



Хинондиимин конденсируется со второй молекулой бензидина с образованием окрашенного соединения (бензидинового синего).

Оборудование и реактивы: ФЭК; весы; секундомер; фильтры бумажные; фарфоровые ступки; кварцевый песок или толченое стекло; стеклянные палочки; воронки; колбы; пипетки на 1, 2 и 10 мл. Раствор бензидина (в мерную колбу на 100 мл вливают 60—70 мл дистиллированной воды, прибавляют 1,15 мл ледяной уксусной кислоты и 92 мг бензидина основного; раствор подогревают до $50-60^\circ C$ на водяной бане при постоянном помешивании; через 10—15 мин после полного растворения бензидина добавляют 2,72 г уксуснокислого натрия, колбу охлаждают и доливают до метки; раствор может храниться в темном месте две недели); 3%-ный раствор пероксида водорода; 0,2 М ацетатный буфер, рН 4,7.

Материалы: корни хрена; семена; мука.

Ход работы

0,5—1 г растительной ткани растирают с кварцевым песком или толченым стеклом и 3 мл ацетатного буфера, рН 4,7, затем добавляют еще 7 мл буфера и фильтруют. В две кюветы шириной 1 см наливают по 2 мл раствора бензидина и 1 мл ферментной вытяжки. Смесь осторожно перемешивают и ставят в гнезда ФЭКа с красным светофильтром. Устанавливают нулевую точку, а затем правый барабан ставят на отметку 0,125. В левую кювету вливают 2 мл воды, в правую — 2 мл раствора H_2O_2 и сразу начинают отсчет времени по секундомеру, который останавливают, когда стрелка гальванометра достигнет нуля.

Пероксидазную активность фермента определяют по времени установления шкалы гальванометра на нуль и рассчитывают по формуле

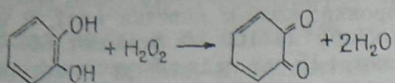
$$v = \frac{DAB}{A_1nt},$$

где D — значение шкалы правого барабана, равное 0,125; А — общий объем вытяжки, мл; В — объем разбавленной смеси в кювете, мл; A_1 — объем вытяжки, взятой для определения, мл; п — навеска, г; t — время, с.

Работа 54

Определение активности пероксидазы (КФ 1.11.1.7) с использованием в качестве субстрата пирокатехина

Метод основан на учете неразложившейся перекиси водорода при использовании в качестве субстрата окисления пирокатехина, который превращается в соответствующий о-бензохинон:



Оборудование и реактивы: весы технические; термостат; центрифуга; скальпель; пипетки на 1, 2, 5 и 10 мл; фарфоровые ступки; бюретки; конические колбы на 100 мл; кварцевый песок или толченное стекло; карандаш по стеклу. Фосфатный буфер 0,1 М, pH 5,6; 1 М раствор пирокатехина по стеклу. Фосфатный буфер 0,1 М, pH 5,6; 1 М раствор пирокатехина (11 г в 100 мл); 0,01 н. раствор H_2O_2 ; 20%-ный раствор H_2SO_4 ; 0,01 н. раствор тиосульфата натрия (2,48 г $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1 л); 30%-ный раствор KI; 1%-ный раствор крахмала.

Материалы: листья; корни хрена, редьки.

Ход работы

Получение ферментной вытяжки: 1 г растительного материала растирают в ступке с кварцевым песком или толченым стеклом и 5 мл фосфатного буфера, pH 5,6 и центрифугируют 5 мин при 4000 об/мин.

К 10 мл 0,01 н. H_2O_2 приливают 5 мл фосфатного буфера, pH 5,6, добавляют 2 мл 1 М раствора пирокатехина и 1 мл ферментной вытяжки, отмечают время и ставят колбу в термостат при 25° С. Через 5 мин фермент инактивируют добавлением 5 мл 20%-ного раствора H_2SO_4 . В контрольную колбу вносят те же растворы, но серную кислоту прибавляют перед внесением ферментной вытяжки. Затем в обе колбы приливают 5 мл 30%-ного раствора KI и оттитровывают выделяющийся иод в присутствии крахмала 0,01 н. раствором тиосульфата натрия до обесцвечивания. Вычисляют разность между результатами титрования контроля и опыта.

Активность фермента (x) рассчитывают в мкмольях H_2O_2 , разложившихся за 1 мин на 1 г навески, учитывая, что 1 мл точно 0,01 н. раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ соответствует 20 мкмольам H_2O_2 :

$$x = \frac{(A_1 - A_2) \cdot 20v}{v_1 n t}$$

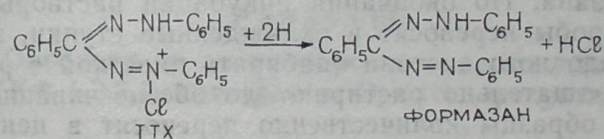
где A_1 и A_2 — количество миллилитров раствора тиосульфата, пошедших на титрование контроля и опыта; v — общий объем ферментной вытяжки, мл; v_1 — объем вытяжки, взятой для определения, мл; n — навеска, г; t — время, мин.

Работа 55

Определение активности растительных дегидрогеназ тетразолиевым методом

В живых клетках встречается большое разнообразие дегидрогеназ, осуществляющих окисление различных субстратов путем отщепления двух атомов водорода. Восстановленные дегидрогеназы, в свою очередь, сами могут служить донорами водорода в окислительно-восстановительных реакциях.

Метод основан на способности лейкоформы 2, 3, 5-трифенилтетразолийхлорида (ТТХ) восстанавливаться под действием растительных дегидрогеназ в формазан, окрашенный в красный цвет:



Формазан может быть определен колориметрически после извлечения из ткани ацетоном, изопропанолом или этанолом.

Метод позволяет определить как общую дегидрогеназную активность, так и активность специфических дегидрогеназ, например цикла трикарбоновых кислот. В этом случае одновременно с ТТХ вносят соответствующий субстрат и по увеличению скорости восстановления ТТХ (по сравнению с бессубстратной пробой) судят об активности специфической дегидрогеназы.

Оборудование и реактивы: аналитические весы; центрифуга; ФЭК; термостат; вакуумный насос; фарфоровые ступки; стеклянные бюксы; ножницы; карандаш по стеклу; кюветы со льдом; вакуум-экссикатор; мерные пробирки на 10 мл с притертыми пробками; пробирки; пипетки на 1, 2 и 5 мл; стеклянные палочки; резиновая груша. 1/15 М фосфатный буфер, pH 7,6; 0,25%-ный раствор ТТХ в 1/15 М фосфатном буфере, pH 7,6; ацетон; 0,02 М растворы калиевых и натриевых солей органических кислот (цитрата, изоцитрата, сукцината, малата и др.); аскорбиновая кислота.

Материалы: колеоптили злаков; 10–15-дневные растения кукурузы, подсолнечника.

Ход работы

В пять пронумерованных бюксов вносят одинаковые навески (0,1–0,3 г) дисков, или отрезков листьев, или колеоп-

тилей. Затем в 1-й и 2-й бюксы добавляют по 1 мл 0,02 М раствора субстрата (сукцината, изоцитрата и т. д.), в 3-й и 4-й — по 1 мл дистиллированной воды (проба предназначена для определения активности дегидрогеназ без экзогенных субстратов) и во все четыре бюкса вносят по 2 мл 0,25%-ного раствора ТТХ; в 5-й бюкс приливают 3 мл фосфатного буфера, рН 7,6. Растворы следует применять холодными, бюксы должны находиться в кювете со льдом.

Открытые бюксы помещают в вакуум-эксикатор и производят инфльтрацию (разрежение до 10 мм рт. ст., эвакуация воздуха из межклетников 15—20 мин, инфльтрация путем медленного впуска воздуха в эксикатор 3—5 мин). После инфльтрации бюксы закрывают крышками и инкубируют пробы в термостате при 37° С в течение 1,5—2 ч. Окрашивание тканей в красный цвет свидетельствует об образовании формазана. По окончании инкубации растворы быстро сливают, пробы переносят в охлажденные ступки, заливают 3—4 мл холодного ацетона (набирать пипеткой с резиновой грушей) и тщательно растирают до обесцвечивания ткани. Растертые образцы количественно переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют со скоростью 5—7 тыс. об/мин в течение 3—5 мин. Надосадочную жидкость сливают в мерную пробирку с притертой пробкой. Ступку ополаскивают ацетоном, повторяют центрифугирование и также сливают надосадочную жидкость в мерную пробирку, объем жидкости доводят ацетоном до 10 мл, закрывают пробкой и перемешивают.

Оптическую плотность жидкости измеряют на ФЭКе против контроля (вытяжка из 5-й пробирки) с синим светофильтром (если контрольная вытяжка бесцветная) или с зеленым (если контрольная вытяжка зеленая). Можно колориметрировать контрольные и опытные образцы отдельно против воды, и тогда из результатов колориметрирования опытного образца вычитают результаты, полученные при колориметрировании контрольного.

Активность дегидрогеназ выражают в микрограммах ТТХ на 1 г сырой навески за 1 ч действия фермента. Активность специфической дегидрогеназы (v) вычисляют по формуле

$$v = \frac{A \cdot 60}{mt},$$

где A — разность между количеством ТТХ, восстановленного навеской в присутствии субстрата и восстановленного такой

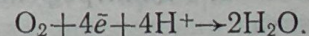
же навеской в отсутствие субстрата, мкг; m — навеска, г; t — время, мин.

С целью перевода единиц экстинкции в микрограммы ТТХ используют в качестве стандартного раствора 0,25%-ный раствор ТТХ в 1/15 М растворе фосфатного буфера, рН 7,6. Соответствующим разбавлением готовят ряд растворов убывающей концентрации; по 2 мл каждого раствора, содержащего от 25 до 200 мкг ТТХ, вносят в мерные пробирки. В каждую пробирку добавляют 50 мг аскорбиновой кислоты и 1 мл фосфатного буфера. Содержимое пробирок нагревают до кипения и оставляют в темноте на 20 мин, после чего объем доводят до 10 мл ацетоном, взбалтывают, колориметрируют. На основе полученных данных строят калибровочную кривую.

Работа 56

Определение активности цитохромоксидазы (КФ 1.9.3.1; цитохром c : O_2 -оксидоредуктаза)

Функция цитохромоксидазы состоит в восстановлении молекулы кислорода до воды по уравнению.



Донором электронов служит восстановленный цитохром c .

Оборудование и реактивы: СФ; весы; рефрижераторная центрифуга; мерные колбы на 50 мл; фарфоровые ступки; воронки; градуированные пипетки на 2 мл. Феррицианид калия ($K_3[Fe(CN)_6]$); восстановленный цитохром c : раствор цитохрома c концентрации $1,58 \cdot 10^{-7}$ мол/мл (2,054 мг/мл) разбавляют фосфатным буфером (рН 7,4) в отношении 3:17 и затем восстанавливают двадцатью миллиграммами гидросульфата натрия, полную восстановления определяют на спектрофотометре (максимум поглощения восстановленного цитохрома c при 550 нм); 0,15 М фосфатный буфер, рН 7,4.

Материалы: свежие растения; мышечная ткань.

Ход работы

Навеску свежего растительного материала или мышечной ткани (0,2—0,3 г) тщательно растирают с небольшим количеством фосфатного буфера (рН 7,4), переносят в мерную колбу на 50 мл и доводят фосфатным буфером до метки. Вытяжку центрифугируют с охлаждением в течение 15 мин при 3000 об/мин. Вносят в кювету спектрофотометра 1,5 мл центрифугата, добавляют 1,5 мл раствора цитохрома c и фо-

тометрируют при длине волны 550 нм. Второй отсчет показаний спектрофотометра производят через 10 мин. Затем для полного окисления цитохрома *c* в кювету бросают кристаллик $K_3[Fe(CN)_6]$ и снова фотометрируют при длине волны 550 нм.

Активность цитохромоксидазы (в условных единицах) определяют по уменьшению логарифма молярной концентрации восстановленного цитохрома *c* в единицу времени по формуле

$$v = \frac{\lg(D_1 - D_3) - \lg(D_2 - D_3)}{t_2 - t_1},$$

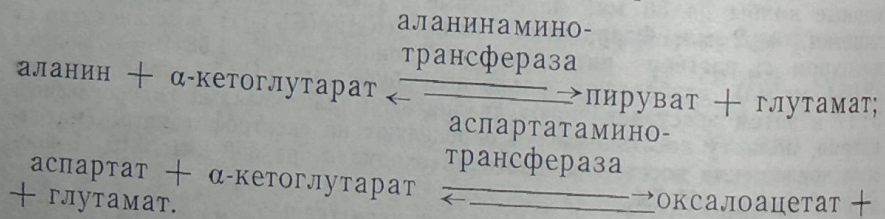
где D_1 и D_2 — оптическая плотность исследуемого раствора соответственно в первую и последнюю минуты опыта; D_3 — оптическая плотность раствора после добавления $K_3[Fe(CN)_6]$; $t_2 - t_1$ — интервал времени между началом и концом отсчета, мин.

КЛАСС 2. ТРАНСФЕРАЗЫ

Работа 57

Определение активности аланин- и аспаргатаминотрансфераз (КФ 2.6.1.2 и КФ 2.6.1.1) с использованием 2, 4-динитрофенилгидразина

Метод основан на учете образующихся в процессе реакций трансаминирования пирувата и оксалоацетата, дающих окрашенные озазоны с 2,4-динитрофенилгидразином:



Оборудование и реактивы: СФ; центрифуга; термостат; весы; градуированные пипетки на 1 и 5 мл; фарфоровые ступки; кювета со льдом; мерные пробирки на 10 мл; пробирки; карандаши по стеклу. 0,1 М фосфатный буфер, рН 7,4; 0,4 н. раствор NaOH. Субстратный реактив для определения аланинаминотрансферазы (А): в мерную колбу на 100 мл вносят 29,2 мг α -кетоглутаровой кислоты и 1,78 г D, L-аланина, приливают 5 мл 0,2%-ного раствора NaOH, перемешивают до растворения, доливают 0,1 М фосфатным буфером, рН 7,4 до метки и добавляют 1 каплю хлороформа. Субстратный реактив для определения аспаргатаминотрансферазы (Б): в мерную колбу на 100 мл вносят 29,2 мг α -кетоглутаровой

кислоты и 2,66 г D, L-аспарагиновой кислоты, добавляют 5 мл 0,2%-ного раствора NaOH и доливают до метки 0,1 М фосфатным буфером, рН 7,4. Раствор 2,4-ДНФГ: в мерную колбу на 100 мл вносят 0,1 г 2,4-динитрофенилгидразина, приливают 20 мл разбавленной (1:4) соляной кислоты, нагревают на кипящей водяной бане до растворения реактива; после остывания раствора его объем доводят водой до 100 мл; в случае образования осадка на следующий день раствор фильтруют. (Растворы А, Б и 2,4-ДНФГ могут храниться в холодильнике в течение 1 м-ца). Раствор анилинцитрата: растворяют 5 г цитрата натрия в 5 мл дистиллированной воды, затем приливают 5 мл анилина; раствор хранят в темноте.

Материалы: свежие растения; ткани животных.

Ход работы

Получение ферментной вытяжки из растений и тканей животных. Растирают 0,2—0,5 г растительной или животной ткани на холоду с 5 мл 0,1 М фосфатного буфера, рН 7,4, центрифугируют при 5000 об/мин в течение 5 мин, надосадочную жидкость сливают в мерную пробирку. К осадку приливают еще 4 мл фосфатного буфера, перемешивают и центрифугируют. Центрифугаты объединяют, доводят объем до 10 мл и перемешивают.

Берут четыре пробирки и нумеруют их. В первые две вносят по 0,2 мл ферментной вытяжки, в 3-ю и 4-ю (контроль) — по 0,2 мл воды. В пробирки № 1 и 3 добавляют по 1 мл раствора А (для определения активности аланинаминотрансферазы), в пробирки № 2 и 4 — по 1 мл раствора Б (для определения аспаргатаминотрансферазы) и ставят в термостат при 37° С на 30 мин пробирки № 1 и 3 и на 1 ч — пробирки № 2 и 4. Затем во все четыре пробирки приливают по 1 мл раствора 2,4-ДНФГ и инкубируют при комнатной температуре в течение 20 мин, после чего добавляют по 10 мл 0,4 н. раствора NaOH, перемешивают и через 5 мин определяют оптическую плотность растворов из пробирок № 1 и 2 при 546 нм в кювете шириной 1 см против соответствующего контроля (пробирки № 3 и 4).

Активность аспаргат- и аланинаминотрансфераз рассчитывают по калибровочным кривым, составленным для α -кетоглутарата и оксалоацетата или по табл. 5. За единицу фермента (Е) принимают такое его количество, которое образует в указанных выше условиях 1 мкг оксалоацетата или 1 мкг пирувата (для аспаргат- и аланинаминотрансфераз соответственно).

Пример: Оптическая плотность при определении аспаргатаминотрансферазы составила 0,100, что соответствует

Калибровочная таблица для определения активности аспарат- и аланинаминотрансфераз (длина волны 546 нм, кювета — 1 см)

Таблица 5

Аспаратаминотрансфераза		Аланинаминотрансфераза	
Оптическая плотность	Активность, мЕ/мл	Оптическая плотность	Активность, мЕ/мл
0,020	4	0,025	2
0,040	8	0,050	5
0,060	11	0,075	9
0,080	16	0,100	12
0,100	19	0,125	16
0,120	24	0,150	20
0,140	28	0,175	24
0,160	34	0,200	29
0,180	40	0,225	34
0,200	48	0,250	39
0,220	57	0,275	45
0,240	67	0,300	52
0,260	80	0,325	59
		0,350	68
		0,375	77

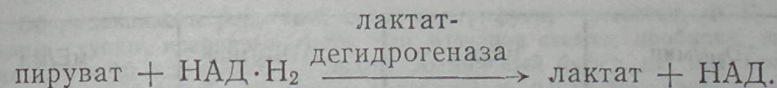
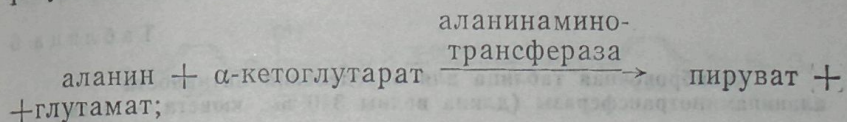
19 мЕ/мл (см. табл. 5). Учитывая разбавление и навеску, находим, что активность составит 1000 мЕ или 1 Е на 1 г сухой массы. Определив содержание белка в ферментной вытяжке, рассчитывают удельную активность фермента на 1 мг белка.

Модификация. Активность аспаратаминотрансферазы можно определить путем декарбоксилирования образующегося в этой ферментативной реакции оксалоацетата до пирувата и учета последнего с помощью ДНФ-гидразина. Для этого в центрифужную пробирку вносят 0,5 мл раствора Б и 0,5 мл ферментной вытяжки, перемешивают; через 20 мин добавляют 3 капли раствора анилинцитрата, снова перемешивают и через 20 мин приливают 0,5 мл раствора ДНФГ, перемешивают и центрифугируют. Далее повторяют все операции, как в случае с определением активности аланинаминотрансферазы. В контроле вместо субстратного раствора берут дистиллированную воду. Активность фермента рассчитывают по табл. 5.

Работа 58

Определение активности аланинаминотрансферазы (КФ 2.6.1.2) с использованием лактатдегидрогеназы

Метод основан на учете уменьшения концентрации НАД·Н₂ по изменению оптической плотности при 340 нм в результате следующих реакций:



Оборудование и реактивы: СФ; рефрижераторная центрифуга; термостат; секундомер; весы; фарфоровая ступка; толченное стекло; градуированные пипетки на 1 и 5 мл; микропипетки; пробирки; кювета со льдом. 0,1 М фосфатный буфер, рН 7,4; 80 мМ раствор D, L-аланина в 0,1 М фосфатном буфере, рН 7,4; 12 мМ раствор НАД·Н₂ (8 мг/мл); лактатдегидрогеназа (0,25 мг/мл); 0,25 М раствор α-кетоглутарата.

Материалы: проростки; ткани животных.

Ход работы

Приготовление ферментной вытяжки: растирают на холоду в ступке 0,2—1,0 г ткани растений или животных с толченым стеклом и десятикратным объемом фосфатного буфера, рН 7,4, центрифугируют 30 мин при 4000 об/мин. В пробирку вносят 3 мл раствора аланина в фосфатном буфере (рН 7,4), добавляют 0,05 мл раствора НАД·Н₂, 0,05 мл лактатдегидрогеназы (0,25 мг/мл) и 0,5 мл ферментной вытяжки, содержащей около 10 мкг белка, перемешивают и инкубируют 5 мин при 25° С. Затем добавляют 0,1 мл 0,25 М раствора α-кетоглутарата, перемешивают и фотометрируют при 340 нм в кювете шириной 1 см. Отсчитывают в течение 5 мин изменение оптической плотности за каждую минуту и находят среднюю ΔD/мин. Активность фермента рассчитывают в микромолях превращенного субстрата за 1 мин в 1 мл (или на 1 мг белка) по формуле

$$\text{мЕ/мл} = \frac{1190 \cdot \Delta D_{340} / \text{мин}}{v}$$

где v — объем ферментной вытяжки.

Например, пусть $\Delta D_{340}/\text{мин}$ составляет 0,050, тогда
 $\text{мЕ/мл} = 1190 \cdot 0,050 \cdot 2 = 119,0$.

Определив содержание белка во взятой для анализа ферментной вытяжке, рассчитывают удельную активность фермента.

Активность аланинаминотрансферазы можно рассчитать также по табл. 6.

Таблица 6

Калибровочная таблица для определения активности аланинаминотрансферазы (длина волны 340 нм, кювета — 1 см)

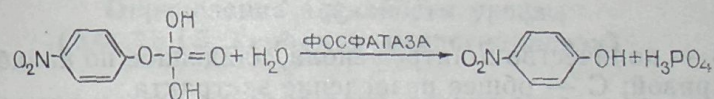
$\Delta D_{340}/\text{мин}$	мЕ/мл	$\Delta D_{340}/\text{мин}$	мЕ/мл
0,001	2	0,038	85
0,002	4	0,040	90
0,003	7	0,042	94
0,004	9	0,044	99
0,005	11	0,046	103
0,006	13	0,048	108
0,007	16	0,050	112
0,008	18	0,052	117
0,009	20	0,054	121
0,010	22	0,056	126
0,012	27	0,058	130
0,014	31	0,060	135
0,016	36	0,062	139
0,018	40	0,064	143
0,020	45	0,066	148
0,022	49	0,068	152
0,024	54	0,070	157
0,026	58	0,072	161
0,028	63	0,074	166
0,030	67	0,076	170
0,032	72	0,078	175
0,034	76	0,080	179
0,036	81		

КЛАСС 3. ГИДРОЛАЗЫ

Работа 59

Определение активности щелочной (КФ 3.1.3.1) и кислой фосфатаз в плазме крови и растениях

Метод основан на цветной реакции превращения пара-нитрофенил-фосфата в п-нитрофенол под влиянием фермента



Оборудование и реактивы: весы; центрифуга; термостат; ФЭК; фарфоровые ступки; кварцевый песок или толченое стекло; пробирки; пипетки на 1, 5 и 10 мл; кювета со льдом. Аммиачный буфер, pH 10,1 (смешивают 1 н. раствор гидроксида аммония с 1 н. раствором хлорида аммония в соотношении 4:1); цитратный буфер, pH 4,95 (растворяют 31 г безводной лимонной кислоты в 307 мл 1 н. раствора NaOH, объем доводят до 500 мл дистиллированной водой, лишенной CO₂). Субстратно-буферный раствор: готовят 0,45%-ный раствор пара-нитрофенилфосфата натрия в 0,001 н. HCl и прибавляют к нему при определении активности щелочной фосфатазы 1 мл аммиачного буфера на каждые 9 мл субстрата (в случае кислой фосфатазы — 1 мл цитратного буфера); хранят в склянке из темного стекла 4—6 дней в холодильнике. 0,1%-ный раствор MgCl₂; 0,1 н. раствор NaOH; стандартный раствор п-нитрофенола: 14 мг п-нитрофенола растворяют в 10 мл 0,1 н. раствора Na₂CO₃ (1 мл содержит 10 мкмоль п-нитрофенола).

Материалы: плазма крови; этиолированные проростки; дрожжи.

Ход работы

Приготовление ферментной вытяжки: 0,5 г растительного материала тщательно растирают на холоду с 10 мл соответствующего буфера и центрифугируют 10 мин при 5000 об/мин. Плазма крови разбавляется соответствующим буфером в отношении 1:10.

В дальнейшем все растворы предварительно доводят до 37° С. К 1 мл субстратно-буферного раствора добавляют 1 мл ферментной вытяжки и 0,5 мл раствора MgCl₂, ставят в термостат при 37° С на 30 мин. После инкубации пробирки помещают в ледяную баню. К охлажденным смесям приливают 5 мл 0,1 н. раствора NaOH, перемешивают. Через 5 мин колориметрируют на ФЭКе с синим светофильтром против контроля (1 мл субстратно-буферного раствора + 1 мл дистиллированной воды + 0,5 мл раствора MgCl₂).

По калибровочной кривой находят количество п-нитрофе-

нола. Для построения калибровочной кривой готовят серию разведений паранитрофенола на 0,1 н. растворе углекислого натрия: 0,005; 0,010; 0,025; 0,05; 0,1 мкмоль в 1 мл раствора. Активность фермента (v), выраженную количеством микромолей п-нитрофенола, образовавшегося за 1 мин на 1 г растительного материала или 1 мл сыворотки, рассчитывают по формуле

$$v = \frac{BC \cdot 2}{30},$$

где B — количество п-нитрофенола, найденное по калибровочной кривой; C — общее разведение экстракта.

Работа 60

Определение активности кислой фосфатазы (КФ 3.1.3.2.) с использованием α -нафтилфосфата

Метод основан на определении α -нафтола, образующегося при гидролизе α -нафтилфосфата, при помощи реакции с нитроанизидином.

Оборудование и реактивы: СФ; центрифуга; термостат; весы; фарфоровые ступки; пипетки на 1 и 5 мл; кварцевый песок или толченое стекло; карандаши по стеклу; колбы на 50 и 100 мл; пробирки; стеклянные палочки. 0,07 М цитратный буфер, рН 5,2; $2,7 \cdot 10^{-3}$ М раствор α -нафтилфосфата в 0,07 М цитратном буфере, рН 5,2 (60,5 мг в 100 мл); 0,02%-ный раствор 5-нитро-п-анизидаина в 0,1 н. HCl; 0,1 н. раствор NaOH. Стандартный 1 мМ раствор α -нафтола (14,4 мг в 100 мл).

Материалы: листья; проростки; сыворотка или плазма крови.

Ход работы

Растирают 0,5 г растительного материала (листья, проростки) с 5 мл 0,07 М цитратного буфера (рН 5,2) и кварцевым песком или толченым стеклом, переносят в центрифужную пробирку, споласкивают еще 5 мл буфера, перемешивают и центрифугируют 5 мин при 5000 об/мин. 0,2 мл сыворотки или плазмы крови или 0,5 мл центрифугата растительной ткани наливают в пробирку и инкубируют при 37° С с 1 мл раствора α -нафтилфосфата в цитратном буфере, рН 5,2. Через 30 мин добавляют 1 мл 0,02%-ного раствора 5-нитро-п-анизидаина, перемешивают, приливают 5 мл 0,1 н. раствора NaOH и центрифугируют. Супернатант фотометрируют при 590 нм против контро-

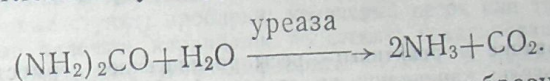
ля, в котором раствор 5-нитро-п-анизидаина добавляют к ферменту до инкубации.

Рассчитывают активность фермента в мкмольях α -нафтола, образовавшегося за 1 мин на 1 г растительной ткани или 1 мл крови, используя калибровочную кривую, построенную с растворами α -нафтола.

Работа 61

Определение активности уреазы (КФ 3.5.1.5; карбамид-амидогидролаза)

Фермент уреазы катализирует расщепление мочевины на аммиак и углекислоту по уравнению



Предлагаемый метод основан на учете образующегося в процессе реакции аммиака.

Оборудование и реактивы: термостат; электроплитка; колбы на 50 мл; пипетки на 1 и 5 мл; бюретки; карандаши по стеклу. Препарат уреазы (8 г соевой муки заливают 46 мл дистиллированной воды, прибавляют 2 мл 0,1 н. раствора HCl и несколько капель толуола, перемешивают, закрывают пробкой и оставляют на ночь, затем фильтруют или центрифугируют, объем фильтрата доводят промывными водами до 50 мл); 2%-ный раствор мочевины в фосфатном буфере, рН 7; 0,1 н. раствор HCl; 0,2%-ный раствор метилового красного в этаноле; 0,1%-ный раствор HgCl₂.

Ход работы

В две колбы на 50 мл вносят по 5 мл препарата уреазы. В одной из колб фермент инактивируют путем нагревания до кипения. Наливают в обе колбы по 5 мл раствора мочевины и перемешивают. Ставят обе колбы на 1 ч в термостат при 37° С, после чего добавляют по 1 мл 0,1%-ного раствора HgCl₂, несколько капель раствора метилового красного и титруют выделившийся аммиак 0,1 н. раствором HCl, 1 мл которого соответствует 1,4 мг азота.

Расчет активности уреазы (v) производят по формуле

$$v = \frac{(A - B) T \cdot 5 \cdot 1,4 \cdot 1,25}{t},$$

где A и B — количество 0,1 н. раствора HCl, пошедшее на титрование соответственно опытной пробы и контрольной, мл;

T — поправка к титру раствора HCl; t — время, в течение которого действовал фермент, мин; 1,25 — коэффициент для пересчета количества фермента на 1 г навески муки. За единицу активности уреазы принимают такое количество фермента, которое за 5 мин при 37° C и pH 7 образует из мочевины 1 мг азота аммиака.

Работа 62

Определение активности липазы (КФ 3.1.1.3; гидролаза эфиров глицерина)

Метод основан на учете образующейся жирной кислоты в результате расщепления жира на глицерин и жирные кислоты.

Оборудование и реактивы: весы технические; термостат; электроплитка; скальпель; карандаши по стеклу; фарфоровые ступки; бюретки; пипетки на 1 и 10 мл; колбы на 100 мл с пробками; мерный цилиндр. 0,5 M ацетатный буфер, pH 4,7; толуол; раствор тимолфталеина*; 0,1 н. раствор NaOH; смесь спирт-эфир (1:1); подсолнечное масло.

Материал: семена клещевины.

Ход работы

В две конические колбы помещают навески 2,5 г растертых в ступке семян клещевины, наливают по 10 мл ацетатного буфера и по 1 мл растительного масла. Одну колбу для инактивации фермента кипятят 2—3 мин (контроль) и охлаждают. В обе колбы добавляют по несколько капель толуола, перемешивают, закрывают пробками и ставят в термостат при 37° C на сутки или более. По истечении указанного срока в обе колбы приливают по 50 мл смеси спирт — эфир (1:1), тщательно перемешивают и после отстаивания титруют 0,1 н. раствором NaOH с тимолфталеином.

Активность липазы v выражают в миллилитрах 0,1 н. раствора щелочи, пошедшего на нейтрализацию жирных кислот, образовавшихся за 24 ч на 10 г растительного материала по формуле

$$v = \frac{(A-B)T \cdot 10}{mt}$$

где A и B — количество 0,1 н. раствора NaOH, пошедшего на титрование соответственно опытного и контрольного об-

* Приготовление см. в приложении.

разцов, мл; T — поправка к титру щелочи; m — навеска семян, г; t — экспозиция, сут.

КЛАСС 4. ЛИАЗЫ

Работа 63

Определение активности альдолазы (КФ 4.1.2.13; фруктозо-бис-фосфат-альдолаза)

Метод основан на учете количества образовавшихся из фруктозо-1,6-дифосфата триозофосфатов, дающих с 2,4-динитрофенилгидразином окрашенные гидразоны.

Оборудование и реактивы: СФ или ФЭК; центрифуга; термостат; весы; фарфоровые ступки; пробирки; кварцевый песок или толченое стекло; стеклянные палочки; карандаши по стеклу; градуированные пипетки на 1 и 5 мл. Раствор фруктозодифосфата (ФДФ): в мерной колбе на 25 мл растворяют 0,2 г фруктозодифосфата натрия в дистиллированной воде*; подщелачивают 3%-ным раствором NaOH до pH 7,4 (с индикатором бромтимоловым синим капля раствора дает зеленое окрашивание); объем колбы доводят водой до 25 мл, приливают 2—3 капли толуола, закрывают пробкой и ставят в холодильник (можно хранить не более двух недель); 0,5%-ный раствор NaHCO₃; 0,56 M раствор гидразинсульфата: в коническую колбу на 100 мл вносят 7,3 г гидразинсульфата, приливают 50 мл дистиллированной воды и ставят на 1 ч на кипящую водяную баню (до растворения), затем в горячий раствор приливают 12 мл 6 н. раствора NaOH (до pH 7,4) и переносят в мерную колбу на 100 мл, после охлаждения промывными водами доводят до метки, перемешивают; мутный раствор фильтруют. Перед работой готовят субстратную смесь в следующем соотношении: 1 мл раствора NaHCO₃, 0,5 мл воды, 0,25 мл раствора гидразинсульфата и 0,25 мл раствора ФДФ. 0,1 M фосфатный буфер, pH 7,4; 0,1%-ный раствор 2,4-динитрофенилгидразина в 2 н. HCl; 10%-ный раствор ТХУ кислоты; 3%-ный раствор NaOH.

Материалы: дрожжи; проростки; листья.

Ход работы

Получение ферментной вытяжки: растирают 1 г листьев, проростков или дрожжей с 3 мл фосфатного буфера, pH 7,4, центрифугируют.

В две пробирки наливают по 0,2 мл ферментной вытяжки. В пробирку № 1 (опыт) прибавляют 0,2 мл субстратной смеси и ставят обе пробирки в термостат при 37° C на 30 мин.

* При отсутствии натриевой соли можно использовать ФДФ бария, для чего растворяют 270 мг соли в 3,5 мл 1 н. HCl, приливают 1 мл 14%-ного раствора сульфата натрия и центрифугируют. В надосадочной жидкости проверяют полноту осаждения бария путем добавления 1 капли раствора Na₂SO₄ и сливают в мерную колбу на 25 мл.

Затем в контрольную пробирку (№ 2) добавляют 0,2 мл смеси, а в обе пробирки — по 0,4 мл раствора ТХУ и по 0,8 мл 3%-ного раствора NaOH. Пробирки оставляют на 10 мин при комнатной температуре. Для развития цветной реакции к обеим пробиркам приливают по 0,6 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина, перемешивают и оставляют на 30 мин при комнатной температуре, после чего в обе пробирки добавляют по 4,8 мл 3%-ного раствора NaOH, перемешивают и через 20 мин колориметрируют при 536 нм (зеленый светофильтр) в 1 см кюветах против воды. Активность альдолазы рассчитывают в условных единицах по формуле

$$A = (A_{\text{оп}} - A_{\text{контр}}) \cdot 100,$$

где $A_{\text{оп}}$ — оптическая плотность опытного раствора; $A_{\text{контр}}$ — оптическая плотность контрольного раствора.

Можно составить калибровочный график для чистых триозофосфатов.

Работа 64

Определение активности изоцитратлиазы (КФ 4.1.3.1; трео-D-изоцитрат-глиоксилат-лиаза)

Изоцитратлиаза катализирует взаимное превращение изоцитрата в глиоксилат и сукцинат.

Метод основан на учете поглощающего при 324 нм комплекса, образующегося в результате взаимодействия фенолгидразина, присутствующего в среде определения, и глиоксилата, возникающего в ходе ферментативной реакции.

Оборудование и реактивы: СФ; весы; центрифуга; фарфоровые ступки; градуированные пипетки на 1 и 5 мл; микропипетки; воронки; пробирки; марля; кювета со льдом. Среда выделения: в 50 мл воды вносят трис-оксиметиламинометан (трис) — 0,605 г, $MgCl_2$ — 2,03 г, дитиотрейтол — 77 мг; оттитровывают 0,1 н. HCl до pH 7,5 и доливают водой до 100 мл. Среда колориметрирования: в 50 мл воды вносят трис — 0,605 г, $MgCl_2$ — 0,1015 г, дитиотрейтол — 77 мг, фенолгидразин солянокислый — 58 мг, изоцитрат калия — 92 мг; оттитровывают 0,1 н. HCl до pH 7,4 и доводят водой до 100 мл (оба раствора готовят перед употреблением).

Материалы: семена 3—5-дневных проростков подсолнечника, тыквы, конопля или других масличных растений.

Ход работы

1 г проростков растирают на холоду с 1 мл среды выделения, добавляют ее еще 9 мл, перемешивают, фильтруют

через 4 слоя марли и центрифугируют 5 мин при 6—8 тыс. об/мин. В кювету СФ вносят 3 мл среды колориметрирования, добавляют 0,02—0,03 мл супернатанта, перемешивают и фотометрируют при 324 нм против контроля (кювета со средой колориметрирования, в которую не добавляют супернатант). Через 15 мин делают второй отсчет на СФ и определяют прирост оптической плотности.

Активность фермента на 1 г сырой массы рассчитывают по формуле

$$A = \frac{0,18 \cdot \Delta D \cdot v_1}{v_2 m t},$$

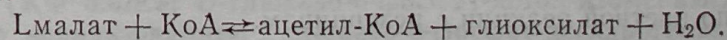
где ΔD — прирост оптической плотности при 324 нм за 15 мин; v_1 — объем всей вытяжки, мл; v_2 — объем образца, вносимого в кювету, мл; m — масса навески, г; t — время, мин.

Для определения удельной активности фермента определяют в пробе содержание белка по Лоури и рассчитывают количество ферментных единиц на 1 мг белка.

Работа 65

Определение активности малат-синтазы (КФ 4.1.3.2; L-малат-глиоксилат-лиаза)

Малат-синтаза обнаружена у организмов, в которых функционирует глиоксилатный цикл (микроорганизмов, водорослей, высших растений). Малат-синтаза катализирует реакцию



Метод основан на учете убыли ацетил-КоА в ходе обратной реакции.

Оборудование и реактивы: СФ; центрифуга; весы; скальпель; пипетки; пробирки; кюветы со льдом; фарфоровые ступки; кварцевый песок или толченое стекло. 0,2 и 0,05 М трис-HCl-буфер, pH 8,0; 0,02 М раствор $MgCl_2$; 0,5 мМ раствор ацетил-КоА (0,448 мг в 100 мл); 0,5 мМ раствор глиоксилата калия (5,6 мг в 100 мл).

Материалы: проростки подсолнечника, конопля, кукурузы и др.

Ход работы

Навеску (1—3 г) растительного материала тщательно растирают при 0—5° С с 5 мл 0,2 М трис-HCl-буфера, pH 8,0, центрифугируют при 5000 об/мин в течение 7 мин. В кювету СФ вносят 2,6 мл 0,05 М трис-HCl-буфера, pH 8,0, 0,1 мл

раствора $MgCl_2$, 0,1 мл раствора ацетил-КоА и 0,1 мл центрифугата. Реакция начинается с добавления 0,1 мл раствора глюксилата калия (отсчет проводят через 5 мин от начала реакции). Увеличение концентрации КоА наблюдают на СФ при 232 нм при 25° С против контроля, содержащего все компоненты, кроме ацетил-КоА. Удельная активность выражается числом молей ацетил-КоА, исчезающего в 1 мин на 1 мг белка, по формуле

$$E = \frac{0,0735 \cdot \Delta D \cdot v_1}{v_2 t C},$$

где ΔD — прирост оптической плотности; v_1 — общий объем центрифугата, мл; v_2 — объем пробы, взятой для определения фермента, мл; C — количество миллиграммов белка в пробе; t — время, мин.

КЛАСС 5. ИЗОМЕРАЗЫ

Работа 66

Определение активности глюкозо-6-фосфат-изомеразы (КФ 5.3.1.9; D-глюкозо-6-фосфат-кетол-изомераза) при помощи цветной реакции Селиванова

Глюкозо-6-фосфат-изомераза катализирует взаимное превращение глюкозо-6-фосфата во фруктозо-6-фосфат.

Метод основан на учете образующегося фруктозо-6-фосфата по цветной реакции с резорцином.

Оборудование и реактивы: СФ; центрифуга; весы; водяная баня; термометр; пробирки; фарфоровые ступки; толченое стекло; пипетки на 1—5 мл; карандаш по стеклу. 0,1%-ный раствор резорцина в 95%-ном спирте; 30%-ный раствор HCl (плотность 1,15); 0,05 М трис- HCl -буфер, рН 8,5; 0,01 М раствор глюкозо-6-фосфата на 0,05 М трис- HCl -буфере, рН 8,5; стандартный 0,5 мМ раствор фруктозы или фруктозо-6-фосфата (0,5 мкмоль в 1 мл).

Материал: сухие дрожжи.

Ход работы

Получение ферментного препарата: растирают 0,5 г сухих дрожжей с толченым стеклом в 5 мл 0,05 М трис- HCl -буфера (рН 8,5) и центрифугируют 5 мин при 4000 об/мин. Используется надосадочная жидкость.

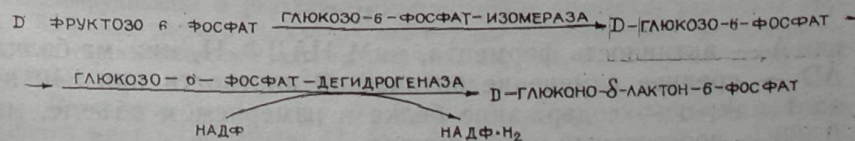
В четыре пронумерованные пробирки вносят по 0,4 мл ферментной вытяжки; в две первые пробирки добавляют по 3 мл 30%-ного раствора HCl (контроль); затем во все пробирки прибавляют по 0,1 мл раствора глюкозо-6-фосфата, перемешивают и ставят в водяную баню при 30° С. Через 5 мин в пробирки № 3 и 4 приливают по 3 мл раствора 30%-ной HCl и добавляют во все пробирки по 1 мл раствора резорцина, перемешивают и ставят в водяную баню при 80° С на 8 мин. Пробирки охлаждают в холодной воде и центрифугируют 5 мин при 5000 об/мин. Супернатант, окрашенный в розовый цвет, фотометрируют при длине волны 413 нм.

Рассчитывают удельную активность фермента. Содержание фруктозо-6-фосфата определяют по калибровочной кривой, построенной для фруктозо-6-фосфата или фруктозы (интенсивность окраски с фруктозо-6-фосфатом составляет 60,5% от интенсивности окраски с фруктозой). Для построения калибровочного графика используют раствор фруктозо-6-фосфата или фруктозы, содержащий 0,5 мкмоль в 1 мл. В серию пробирок вносят от 0,1 до 1 мл раствора фруктозы или фруктозо-6-фосфата, доводят объем водой до 1 мл, приливают по 1 мл раствора резорцина и 3 мл 30%-ной HCl , перемешивают и ставят на водяную баню при 80° С на 8 мин, затем охлаждают и фотометрируют.

Работа 67

Определение активности глюкозо-6-фосфат-изомеразы (КФ 5.3.1.9; D-глюкозо-6-фосфат-кетол-изомераза) с использованием глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы

Метод основан на сопряженном действии двух ферментов — глюкозо-6-фосфат-изомеразы и глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (КФ 1.1.1.49). Реакцию, катализируемую глюкозо-6-фосфат-изомеразой, проводят в обратном направлении, т. е. путем превращения фруктозо-6-фосфата в глюкозо-6-фосфат.



На 1 моль вступившего в реакцию фруктозо-6-фосфата образуется 1 моль восстановленного НАДФ, количество которого определяют спектрофотометрически при 340 нм.

Оборудование и реактивы: СФ-26; рефрижераторная центрифуга; весы; секундомер; колонки стеклянные 5×1 см, заполненные сефадексом G-25; штатив Бунзена; кювета со льдом; кварцевый песок; марля; химические стаканы; градуированные пипетки на 1 и 5 мл; фарфоровые ступки; стеклянные палочки. 0,1 М трис-НСl-буфер, рН 8,0; 30 мМ раствор β -меркаптоэтанола в 0,1 М трис-НСl-буфере, рН 8 (2,35 г/л); 2,5 мМ раствор НАДФ (1,86 мг/мл); 60 мМ раствор натриевой соли фруктозо-6-фосфата (бариевую соль переводят в натриевую с помощью Na_2SO_4); 50 мМ раствор MgCl_2 ; глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа 40 Е/мл.

Материалы: листья растений; ткани животных.

Ход работы

Навеску материала (2 г) растирают в охлажденной ступке с кварцевым песком и 5 мл трис-НСl-буфера, рН 8,0. Содержимое ступки отжимают через 4 слоя марли и центрифугируют при 15000 об/мин в течение 30 мин при $2-4^\circ\text{C}$. 1 мл центрифугата наносят на колонку с сефадексом G-25, предварительно уравновешенную трис-НСl-буфером, рН 8,0, содержащим 30 мМ β -меркаптоэтанола. Вытесняют фермент буфером того же состава, собирают фракцию 3—6 мл элюата и используют его для определения активности глюкозо-6-фосфат-изомеразы. В спектрофотометрическую кювету вносят 2,5 мл трис-НСl-буфера, рН 8,0, 0,1 мл раствора НАДФ, 0,1 мл раствора фруктозо-6-фосфата, 0,1 мл раствора MgCl_2 и 0,1 мл раствора глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы. Реакцию начинают добавлением 0,1 мл элюата. В контрольную кювету помещают те же компоненты, что и в опытную, за исключением НАДФ и глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы, вместо которых добавляют 0,2 мл воды. Измерение оптической плотности проводят при 340 нм в течение 5 мин с интервалами в 1 мин. Белок в элюате измеряют по Лоури.

Активность глюкозо-6-фосфат-изомеразы рассчитывают по формуле

$$A = \frac{\Delta D \cdot 0,483}{p}$$

где A — активность фермента, мкМ НАДФ \cdot Н₂/мин \cdot мг белка; ΔD — среднее изменение оптической плотности при 340 нм за 1 мин; p — содержание белка в измеряемом объеме, мг; 0,483 — пересчетный коэффициент.

Витамины — физиологически активные вещества, принимающие разнообразное участие в обмене веществ живых организмов непосредственно или в составе сложных ферментов в виде коферментов и простетических групп. Как правило, витамины не вырабатываются в организме человека. Поэтому недостаток или отсутствие витаминов в пище приводит к различным заболеваниям.

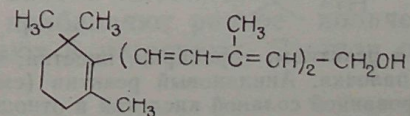
Витамины — органические вещества, обладающие разнообразным строением молекул и различными физико-химическими свойствами. Все витамины подразделяются на две большие группы: жирорастворимые (А, D, Е, К) и водорастворимые (витамины группы В, аскорбиновая кислота).

ЖИРОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ

Работа 68

Качественные реакции на витамин А (ретинол)

Провитамин А является каротин ($\text{C}_{40}\text{H}_{56}$), при распаде которого образуются две молекулы витамина А



Оборудование и реактивы: пипетки; сухие пробирки; резиновая груша. 33%-ный раствор треххлористой сурьмы в хлороформе; концентрированная серная кислота; ледяная уксусная кислота, насыщенная сульфатом двухвалентного железа; уксусный ангидрид.

Материалы: рыбий жир или масляный раствор витамина А; раствор рыбьего жира в хлороформе (1 : 5).

Ход работы

1. Реакция с треххлористой сурьмой. В сухую пробирку вносят 2—3 капли свежего рыбьего жира или масляного раствора витамина А и добавляют 1 мл раствора треххлористой сурьмы в хлороформе, перемешивают. Появляется синее окрашивание. В связи с тем, что развитию окраски мешает присутствие воды, рекомендуется в реакционную смесь добавить несколько капель уксусного ангидрида.

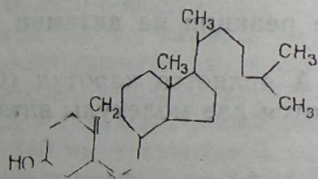
2. Реакция с H_2SO_4 . В сухую пробирку вносят 5 капель раствора рыбьего жира в хлороформе и 1 каплю концентрированной H_2SO_4 . Развивается красно-фиолетовое окрашивание.

3. Реакция с сульфатом железа. В пробирку вносят 1—2 капли рыбьего жира или масляного раствора витамина А, добавляют 5—10 капель ледяной уксусной кислоты, насыщенной сульфатом железа. Появляется голубое окрашивание, переходящее в розово-красное.

Работа 69

Качественные реакции на витамин D

Выделено несколько близких по химической природе витаминов D, являющихся производными циклопентанопергидрофенантрена (D_1 , D_2 и D_3). В продуктах (рыбий жир, коровье масло) чаще всего встречается витамин D_3 .



Оборудование и реактивы: пробирки; пипетки; часовые стекла; спиртовки; стеклянные палочки. Анилиновый реактив (смешивают под тягой анилин с концентрированной соляной кислотой в отношении 15:1); 1%-ный раствор брома в хлороформе.

Материал: раствор рыбьего жира в хлороформе (1:60) или масляный раствор витамина D_2 (эргокальциферола).

Ход работы

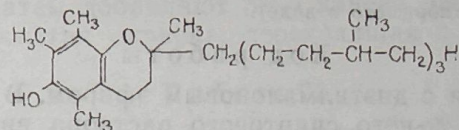
1. В сухую пробирку вносят 5 капель раствора рыбьего жира в хлороформе и добавляют 1 каплю анилинового реактива. При нагревании развивается красная окраска.

2. На сухое часовое стекло вносят 1—2 капли рыбьего жира или масляного раствора витамина D_2 , добавляют (под тягой) 2—3 капли 1%-ного раствора брома в хлороформе, размешивают. Появляется зеленовато-голубое окрашивание.

Работа 70

Качественные реакции на витамин Е (токоферол)

Обнаружено несколько близких друг другу по химической структуре токоферолов — α , β , γ , δ .



α -ТОКОФЕРОЛ

Оборудование и реактивы: пробирки; пипетки; спиртовки. 0,1%-ный раствор α -токоферола в 96%-ном спирте; азотная кислота концентрированная; 0,2%-ный спиртовой раствор хлорного железа (0,2 г $FeCl_3$ в 100 мл абсолютного этилового спирта).

Ход работы

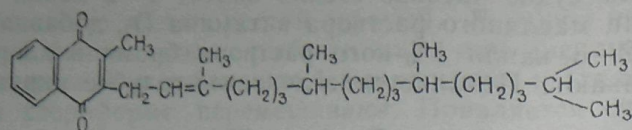
1. В сухую пробирку вносят 3 капли α -токоферола в спирте, прибавляют под тягой (осторожно, по стенке пробирки) 6 капель концентрированной азотной кислоты, пробирку слегка встряхивают. Образующаяся эмульсия после встряхивания расслаивается, причем верхний маслянистый слой окрашивается в красный цвет. Реакция обусловлена окислением α -токоферола до окрашенного продукта, имеющего хиноидную структуру.

2. В пробирку вносят несколько капель спиртового раствора α -токоферола, прибавляют равное количество раствора $FeCl_3$, перемешивают и нагревают. Раствор окрашивается в красный цвет.

Работа 71

Качественные реакции на витамин К

По химической структуре витамин К относится к группе нафтохинонов. Витамин K_1 , выделенный из листьев люцерны, капусты, крапивы и других растений, является 2-метил-3-фитил-1,4-нафтохиноном. Витамин K_2 выделен из рыбной муки.



ВИТАМИН К₁

Оборудование и реактивы: пробирки; пипетки. 1%-ный спиртовой раствор диэтилмалонового эфира; 1%-ный раствор КОН; 0,025%-ный раствор цистеина; 10%-ный раствор NaOH.

Материал: 0,1%-ный спиртовой раствор викасола (производного витамина К₁, растворимого в воде).

Ход работы

1. Реакция с диэтилмалоновым эфиром. В пробирку вносят 2—3 мл 1%-ного спиртового раствора викасола, добавляют 0,5 мл раствора диэтилмалонового эфира и 0,1 мл раствора гидроксида калия. При наличии витамина К появляется фиолетово-красное окрашивание.

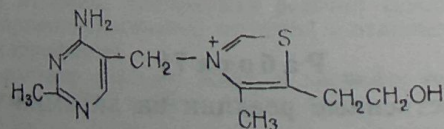
2. Реакция с цистеином. В пробирку вносят 0,5 мл 0,1%-ного спиртового раствора викасола, добавляют 2—3 капли 0,025%-ного раствора цистеина и 1 каплю 10%-ного раствора NaOH. Жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет.

ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ

Работа 72

Качественная реакция на витамин В₁

Витамин В₁ (тиамин) является предшественником тиаминпирофосфата, выполняющего функцию кофермента ферментов, катализирующих декарбоксилирование кетокислот.



ВИТАМИН В₁

Оборудование и реактивы: пробирки; пипетки. 0,01%-ный раствор тиаминпирофосфата, подкисленный соляной кислотой до pH 3—4 (или 0,01%-ный раствор тиаминхлорида); 10%-ный раствор Na₂CO₃. Диазореактив (ос-

новной раствор) готовят растворением 0,9 г сульфаниловой кислоты в 9 мл концентрированной HCl с последующим разбавлением дистиллированной водой до 100 мл; перед определением готовят рабочий раствор: в мерную колбу на 50 мл, помещенную в сосуд со льдом, вносят 1,5 мл основного раствора, добавляют 1,5 мл свежеприготовленного 5%-ного раствора нитрита натрия, через 5 мин добавляют при помешивании еще 6 мл раствора нитрита натрия и доводят дистиллированной водой, охлажденной на льду, до метки; реактив готов через 15 мин (может храниться в холодильнике в течение суток).

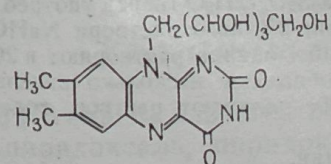
Ход работы

В пробирку вносят 1,5 мл раствора Na₂CO₃ и 1 мл диазореактива, затем добавляют 3—5 капель раствора тиамин. Появляется желтая окраска, переходящая в розовую.

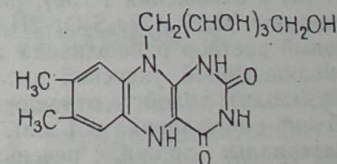
Работа 73

Качественная реакция на витамин В₂ (рибофлавин)

Рибофлавин — диметилированное производное изоаллоказина, к которому присоединен спирт рибитол.



ОКИСЛЕННАЯ ФОРМА



ВОССТАНОВЛЕННАЯ ФОРМА

Рибофлавин входит в состав флавиновых нуклеотидов — ФМН и ФАД, являющихся коферментами многих дегидрогеназ. В окисленной форме рибофлавин окрашен в желтый цвет, а в восстановленной — бесцветный.

Оборудование и реактивы: пробирки; пипетки. 0,025%-ный раствор витамина В₂; соляная кислота концентрированная; цинк металлический.

Ход работы

В пробирку вносят 1 мл раствора витамина В₂, добавляют (под тягой) 5 капель концентрированной соляной кислоты и несколько кусочков металлического цинка. Жидкость постепенно окрашивается в розовый цвет, а затем обесцвечивается. Реакция обусловлена восстановлением рибофлавина. При взбалтывании бесцветного раствора лейкофлавина последний вновь окисляется кислородом воздуха в рибофла-

вин. В слабокислой или нейтральной среде рибофлавин обладает желто-зеленой флуоресценцией.

Работа 74

Количественное определение содержания витамина В₂

Метод основан на учете интенсивности флуоресценции рибофлавина. В работе используется ферментный препарат фосфатазы для высвобождения связанного рибофлавина.

Оборудование и реактивы: флуорометр; весы; водяная баня; термостат; фарфоровые ступки; градуированные пробирки на 10 мл; мерные колбы на 100 мл; градуированные пипетки на 1, 5 и 10 мл; колбы конические; воронки; фильтры бумажные; толченое стекло; стеклянные палочки; карандаш по стеклу. Ферментный препарат фосфатазы: выращивают гриб *Aspergillus niger* или *Penicillium notatum*, затем мицелий гриба подсушивают при 45°С; высушенный гриб экстрагируют 2,5 М раствором ацетата натрия, рН 4,4—5 (на 100 мг мицелия 10 мл раствора) в течение 2—3 ч и фильтруют; 4%-ный раствор $KMnO_4$; 3%-ный раствор H_2O_2 ; 0,1 н. раствор H_2SO_4 ; рабочий раствор $SnCl_2$ (1 г $SnCl_2$ в 25 мл концентрированной HCl); раствор хранят в темноте, перед определением разбавляют водой в отношении 1 : 50), раствор $Na_2S_2O_4 \cdot 2H_2O$ (перед употреблением растворяют 0,25 г $Na_2S_2O_4 \cdot 2H_2O$ в 10 мл 2%-ного раствора $NaHCO_3$); образцовый раствор рибофлавина (10 мг рибофлавина растворяют в 200 мл воды, подкисленной уксусной кислотой, добавляют несколько капель толуола, разводят водой в отношении 1 : 100; получают раствор, содержащий 0,5 мкг рибофлавина в 1 мл).

Материалы: дрожжи; печень; проростки.

Ход работы

Навеску материала (5 г) растирают в ступке с толченым стеклом и 10 мл 0,1 н. раствора H_2SO_4 , переносят в мерную колбу на 100 мл, доводят объем содержимого кислотой до 75 мл и на кипящей водяной бане нагревают при помешивании в течение 45 мин. Затем колбу охлаждают, добавляют 5 мл ферментного препарата, выдерживают при 45°С в течение 40 мин, доводят объем до 100 мл и фильтруют.

В две градуированные пробирки вливают по 8 мл фильтрата. В одну пробирку добавляют 0,5 мл образцового раствора, содержащего 0,25 мкг рибофлавина. В обе пробирки приливают по каплям 4%-ный раствор $KMnO_4$ до появления слабо-розового окрашивания (примерно 1 мл). Через 10 мин удаляют избыток перманганата 3%-ным раствором H_2O_2 , добавляя его по каплям. Объем полученных растворов доводят водой до 10 мл и измеряют интенсивность флуоресценции. По окончании флуориметрии в обе пробирки вносят по 0,2 мл

раствора $SnCl_2$ и 0,1 мл раствора $Na_2S_2O_4$ для тушения флуоресценции витамина В₂ и измеряют флуоресценцию смеси.

Содержание рибофлавина (в мкг) на 1 г исследуемого материала определяют по формуле

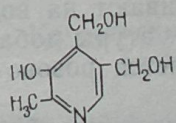
$$x = \frac{(A-B) \cdot 0,5 \cdot v v_2}{(A_1-B_1) v_1 n}$$

где А — показание флуорометра для опытного раствора; В — показание флуорометра для опытного раствора после тушения флуоресценции рибофлавина; А₁ — показание флуорометра для образцового раствора рибофлавина; В₁ — показание флуорометра для образцового раствора рибофлавина после тушения флуоресценции; 0,5 — количество микрограммов рибофлавина в 1 мл образцового раствора; v — объем экстракта перед измерением флуоресценции (10 мл); v₁ — объем вытяжки, взятой для анализа, мл; v₂ — объем всей вытяжки, мл; n — навеска материала, г.

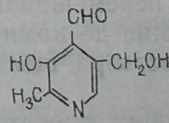
Работа 75

Качественная реакция на витамин В₆

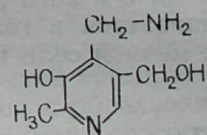
Витамин В₆ известен под четырьмя названиями: пиридоксин, пиридоксаль, пиридоксамин и пиридоксальфосфат. Последний является коферментом трансаминаз и ряда других ферментов.



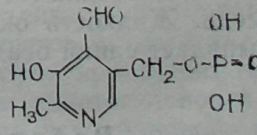
ПИРИДОКСИН



ПИРИДОКСАЛЬ



ПИРИДОКСАМИН



ПИРИДОКСАЛЬФОСФАТ

Оборудование и реактивы: пробирки; пипетки. 5%-ный раствор витамина В₆; 5%-ный раствор хлорного железа ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$).

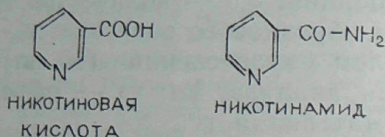
Ход работы

В пробирку вносят 0,5 мл раствора витамина В₆, добавляют 1 каплю раствора хлорного железа, перемешивают. Жидкость окрашивается в красный цвет. Реакция основана на образовании комплексного соединения типа фенолята железа.

Работа 76

Качественные реакции на витамин РР (никотиновая кислота, амид никотиновой кислоты)

Основная функция никотиновой кислоты (ниацина), а также никотиамида — участие в образовании НАД и НАДФ.



Оборудование и реактивы: водяная баня; чашки фарфоровые; пипетки; спиртовки; палочки стеклянные; пробирки. Никотиновая кислота (в порошке); 1%-ный спиртовой раствор 2,4-динитрохлорбензола; 0,1%-ный раствор NaOH в этаноле; 10%-ный раствор уксусной кислоты; 5%-ный раствор уксуснокислой меди.

Ход работы

1. В фарфоровую чашку вносят 5—10 мг никотиновой кислоты, добавляют 1 мл спиртового раствора 2,4-динитрохлорбензола, перемешивают и выпаривают на водяной бане. После остывания до комнатной температуры добавляют 3 мл спиртового раствора щелочи. Появляется розово-фиолетовая окраска.

2. В пробирку вносят 5—10 мг никотиновой кислоты, добавляют 1—2 мл 10%-ного раствора уксусной кислоты, нагревают до кипения и добавляют 1—2 мл 5%-ного раствора уксуснокислой меди. Жидкость окрашивается в голубой цвет; при стоянии выпадает синий осадок медной соли никотиновой кислоты.

Работа 77

Качественная реакция на витамин В₁₂ (кобаламин)

Витамин В₁₂ — кобальтсодержащий витамин. Центральной структурой является порфириноподобная корриновая

кольцевая система, включающая четыре пиррольных кольца. Кобальт находится в положении, которое в геме занимает железо. 5'-дезоксиаденозильное производное витамина В₁₂ является коферментом для превращения ряда соединений во внутриклеточных процессах. У млекопитающих в настоящее время известны две реакции, в которых участвует В₁₂-кофермент: метилирование гомоцистеина и превращение метилмалонил-КоА в сукцинил-КоА.

Оборудование и реактивы: электроплитка; песчаная баня; резиновая груша; пинцет; жаростойкие пробирки; пипетки на 1 мл; беззольные фильтры. Витамин В₁₂ (в ампулах); 10%-ный раствор тиомочевины; серная кислота концентрированная.

Ход работы

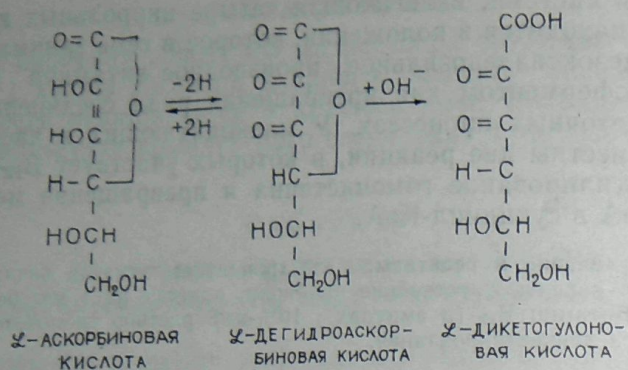
В жаростойкую пробирку вносят содержимое одной ампулы витамина В₁₂, добавляют 0,5 мл концентрированной серной кислоты и озоляют на песчаной бане в вытяжном шкафу до обесцвечивания. После охлаждения осторожно вливают 1 мл дистиллированной воды, перемешивают.

На беззольный фильтр наносят 2—3 капли раствора тиомочевины и высушивают над электроплиткой или над пламенем спиртовки. Затем на это же место на фильтре наносят 1—2 капли минерализата витамина и снова нагревают. По краю пятна появляется зеленое окрашивание, указывающее на наличие кобальта.

Работа 78

Качественные реакции на витамин С (аскорбиновая кислота)

Наиболее характерными химическими свойствами аскорбиновой кислоты являются ее кислотность, обусловленная енольным водородом при С-3, и легкое окисление до дегидроаскорбиновой кислоты, катализируемое ионами металлов и аскорбатоксидазой. Дегидроаскорбиновая кислота нестабильна в щелочной среде, в которой происходит гидролиз лактонного кольца с образованием дикетогулоновой кислоты. Восстанавливающая способность аскорбиновой кислоты является основой большинства количественных аналитических методов ее определения.



Оборудование и реактивы: весы технические; скальпель; пробирки; пипетки; ступка фарфоровая; воронки стеклянные; толченое стекло; фильтры бумажные; стеклянные палочки; колбы конические на 100 мл, 0,1%-ный раствор иода в иодиде калия (приготовление см. в работе 49); свежеприготовленный насыщенный раствор $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$; 2%-ный раствор хлорного железа; свежеприготовленный 0,01%-ный раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола; 10%-ный раствор HCl .

Материалы: клубни картофеля; капуста.

Ход работы

Растирают измельченные клубни картофеля или листья капусты (5—10 г) в фарфоровой ступке с толченым стеклом, приливают 10 мл воды, перемешивают и фильтруют.

1. В две пробирки вносят по 1 мл дистиллированной воды и по 2 капли 0,1%-ного раствора иода в иодиде калия. В одну пробирку добавляют 1 мл дистиллированной воды, в другую — 1 мл фильтрата растительных тканей. Во второй пробирке раствор иода обесцвечивается вследствие окисления аскорбиновой кислоты в дегидроаскорбиновую и восстановления молекулярного иода до иодоводородной кислоты.

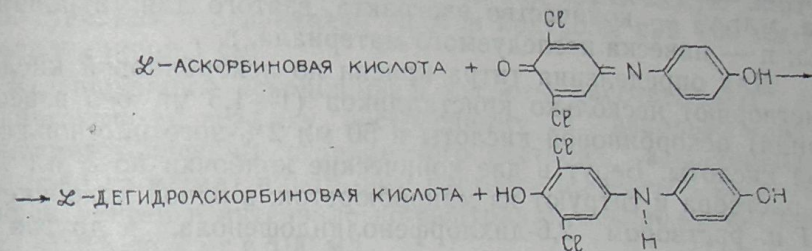
2. К 1—2 мл картофельного или капустного сока добавляют 1 каплю свежеприготовленного насыщенного раствора $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, а затем 1 каплю раствора FeCl_3 и 5 капель раствора HCl . В присутствии аскорбиновой кислоты происходит восстановление $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ в $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, который с трехвалентным железом образует окрашенный в голубой цвет $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$. В контроле вместо сока берут дистиллированную воду (появляется буроватое окрашивание).

3. К 1—2 мл сока добавляют осторожно по каплям свежеприготовленный 0,01%-ный раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола. Происходит обесцвечивание красителя.

Работа 79

Количественное определение содержания аскорбиновой кислоты в растениях

Метод основан на способности аскорбиновой кислоты в кислой среде восстанавливать 2,6-дихлорфенолиндофенол до лейкоформы и окисляться в дегидроформу по уравнению

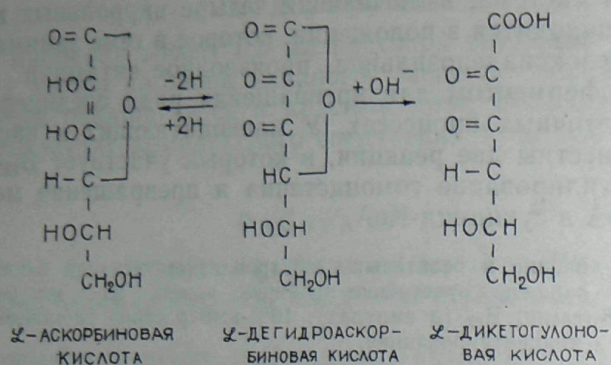


Оборудование и реактивы: весы; нож из нержавеющей стали; конические колбы на 50 мл; мерные колбы на 50 мл; воронки; пипетки на 5—10 мл; фильтры бумажные; микробюретки; фарфоровые ступки; толченое стекло. 1%-ный раствор HCl ; 1%-ный раствор щавелевой кислоты; 1%-ный раствор крахмала; 0,001 н. раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола (0,25 г натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола растворяют в 700 мл воды, перемешивают и добавляют 300 мл 0,1 М фосфатного буфера, pH 7,0); 0,001 н. раствор KIO_3 (растворяют 0,3568 г иодата калия в 1 л воды; полученный 0,01 н. раствор разбавляют в 10 раз); аскорбиновая кислота; иодид калия; 2%-ный раствор H_2SO_4 .

Материалы: капуста; хвоя; клубни картофеля.

Ход работы

Навеску (1—5 г) растительного материала, измельченного ножом из нержавеющей стали, тщательно растирают в фарфоровой ступке с 1—3 г толченого стекла и 5 мл 1%-ного раствора HCl . По мере растирания прибавляют еще 15 мл соляной кислоты и всю смесь переносят в мерную колбу на 50 мл. Остаток в ступке смывают в ту же колбу раствором щавелевой кислоты, доводя объем смеси до метки. Содержимое колбы перемешивают и фильтруют. 5—10 мл фильтрата переносят в конические колбочки и титруют из микробюретки 0,001 н. раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до розового окрашивания, не исчезающего в течение 30 с. Одновременно проводят контрольное титрование смеси реактивов. Число миллилитров раствора краски, пошедших на контрольное титрование, вычитают из числа миллилитров, пошедших на титрование вытяжки.



Оборудование и реактивы: весы технические; скальпель; пробирки; пипетки; ступка фарфоровая; воронки стеклянные; толченое стекло; фильтры бумажные; стеклянные палочки; колбы конические на 100 мл. 0,1%-ный раствор иода в иодиде калия (приготовление см. в работе 49); свежеприготовленный насыщенный раствор $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$; 2%-ный раствор хлорного железа; свежеприготовленный 0,01%-ный раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола; 10%-ный раствор HCl .

Материалы: клубни картофеля; капуста.

Ход работы

Растирают измельченные клубни картофеля или листья капусты (5—10 г) в фарфоровой ступке с толченым стеклом, приливают 10 мл воды, перемешивают и фильтруют.

1. В две пробирки вносят по 1 мл дистиллированной воды и по 2 капли 0,1%-ного раствора иода в иодиде калия. В одну пробирку добавляют 1 мл дистиллированной воды, в другую — 1 мл фильтрата растительных тканей. Во второй пробирке раствор иода обесцвечивается вследствие окисления аскорбиновой кислоты в дегидроаскорбиновую и восстановления молекулярного иода до иодоводородной кислоты.

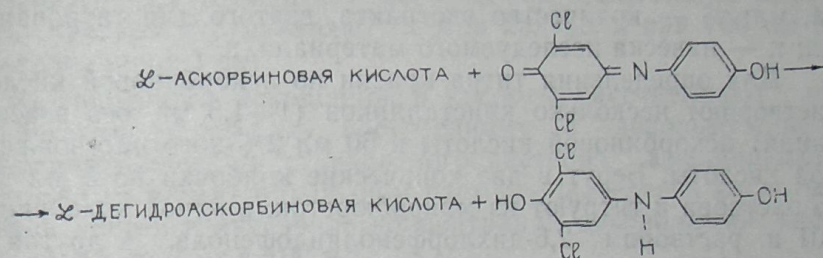
2. К 1—2 мл картофельного или капустного сока добавляют 1 каплю свежеприготовленного насыщенного раствора $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, а затем 1 каплю раствора FeCl_3 и 5 капель раствора HCl . В присутствии аскорбиновой кислоты происходит восстановление $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ в $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, который с трехвалентным железом образует окрашенный в голубой цвет $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$. В контроле вместо сока берут дистиллированную воду (появляется буроватое окрашивание).

3. К 1—2 мл сока добавляют осторожно по каплям свежеприготовленный 0,01%-ный раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола. Происходит обесцвечивание красителя.

Работа 79

Количественное определение содержания аскорбиновой кислоты в растениях

Метод основан на способности аскорбиновой кислоты в кислой среде восстанавливать 2,6-дихлорфенолиндофенол до лейкоформы и окисляться в дегидроформу по уравнению



Оборудование и реактивы: весы; нож из нержавеющей стали; конические колбы на 50 мл; мерные колбы на 50 мл; воронки; пипетки на 5—10 мл; фильтры бумажные; микробюретки; фарфоровые ступки; толченое стекло. 1%-ный раствор HCl ; 1%-ный раствор щавелевой кислоты; 1%-ный раствор крахмала; 0,001 н. раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола (0,25 г натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола растворяют в 700 мл воды, перемешивают и добавляют 300 мл 0,1 М фосфатного буфера, pH 7,0); 0,001 н. раствор KIO_3 (растворяют 0,3568 г иодата калия в 1 л воды; полученный 0,01 н. раствор разбавляют в 10 раз); аскорбиновая кислота; иодид калия; 2%-ный раствор H_2SO_4 .

Материалы: капуста; хвоя; клубни картофеля.

Ход работы

Навеску (1—5 г) растительного материала, измельченного ножом из нержавеющей стали, тщательно растирают в фарфоровой ступке с 1—3 г толченого стекла и 5 мл 1%-ного раствора HCl . По мере растирания прибавляют еще 15 мл соляной кислоты и всю смесь переносят в мерную колбу на 50 мл. Остаток в ступке смывают в ту же колбу раствором щавелевой кислоты, доводя объем смеси до метки. Содержимое колбы перемешивают и фильтруют. 5—10 мл фильтрата переносят в конические колбочки и титруют из микробюретки 0,001 н. раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до розового окрашивания, не исчезающего в течение 30 с. Одновременно проводят контрольное титрование смеси реактивов. Число миллилитров раствора краски, пошедших на контрольное титрование, вычитают из числа миллилитров, пошедших на титрование вытяжки.

Расчет содержания аскорбиновой кислоты (мг на 100 г материала) производят по формуле

$$x = \frac{(A-B)Tv_1 \cdot 100}{v_2 n}$$

где А — количество краски, пошедшей на титрование вытяжки, мл; В — то же на контрольное титрование; Т — титр краски по аскорбиновой кислоте, мг; v_1 — общий объем экстракта, мл; v_2 — количество экстракта, взятого для титрования, мл; n — навеска исследуемого материала, г.

Для определения титра краски по аскорбиновой кислоте растворяют несколько кристалликов (1—1,5 мг, без взвешивания) аскорбиновой кислоты в 50 мл 2%-ного раствора серной кислоты. Берут в две конические колбочки по 5 мл этого раствора и титруют из микробюреток: в одной колбочке — 0,001 н. раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола, в другой — точно 0,001 н. раствором иодата калия, предварительно добавив в колбочку несколько кристалликов иодида калия и 5 капель 1%-ного раствора крахмала. Расчет титра краски Т (мг) производят по формуле

$$T = \frac{0,088 \cdot a}{b}$$

где а — количество точно 0,001 н. раствора иодата калия, мл; b — количество раствора краски, мл; 0,088 означает, что 1 мл 0,001 н. раствора иодата калия соответствует 0,088 мг аскорбиновой кислоты. В результате расчета устанавливают, какому количеству миллиграммов аскорбиновой кислоты соответствует 1 мл данного раствора краски.

Работа 80

Колориметрический метод определения аскорбиновой кислоты в плазме крови

Метод основан на учете интенсивности окраски продукта, образованного в результате взаимодействия аскорбиновой кислоты и фосфорно-вольфрамовой кислоты.

Оборудование и реактивы: ФЭК; центрифуга; пробирки; пипетки на 2 мл. Раствор фосфорно-вольфрамовой кислоты (в 30 мл воды при нагревании на водяной бане растворяют 20 г $\text{NaWO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 10 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; в 15 мл воды растворяют 5 мл концентрированной H_2SO_4 ; затем второй раствор медленно вливают в теплый раствор вольфрамата

и смесь кипятят с обратным холодильником в течение 2 ч); аскорбиновая кислота; 0,5%-ный раствор щавелевой кислоты.

Материал: плазма крови.

Ход работы

В центрифужную пробирку вносят 2 мл плазмы, затем медленно прибавляют 2 мл раствора фосфорно-вольфрамовой кислоты, перемешивают, смесь оставляют на 30 мин и центрифугируют 15 мин при 3000 об/мин. Оптическую плотность супернатанта измеряют против контроля при 700 нм в кювете шириной 1 см.

Концентрацию аскорбиновой кислоты рассчитывают по калибровочному графику, построенному с использованием свежеприготовленного стандартного раствора аскорбиновой кислоты (0,5 мг/мл) в 0,5%-ном растворе щавелевой кислоты. График линеен в интервале концентраций аскорбиновой кислоты от 0,5 до 2 мг в 100 мл.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ БУФЕРНЫХ РАСТВОРОВ

Таблица 1

Фосфатно-цитратный буфер

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, относит. мол. масса 178,05; лимонная кислота ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$), относит. мол. масса 210,14.

рН	0,2 М раствор Na_2HPO_4 , мл	0,1 М раствор лимонной кислоты, мл	рН	0,2 М раствор Na_2HPO_4 , мл	0,1 М раствор лимонной кислоты, мл
2,2	0,40	19,60	5,2	10,72	9,28
2,4	1,24	18,76	5,4	11,15	8,85
2,6	2,18	17,82	5,6	11,60	8,40
2,8	3,17	16,83	5,8	12,09	7,91
3,0	4,11	15,89	6,0	12,63	7,37
3,2	4,94	15,06	6,2	13,22	6,78
3,4	5,70	14,30	6,4	13,85	6,15
3,6	6,44	13,56	6,6	14,55	5,45
3,8	7,10	12,90	6,8	15,45	4,55
4,0	7,71	12,29	7,0	16,47	3,53
4,2	8,28	11,72	7,2	17,39	2,61
4,4	8,82	11,18	7,4	18,17	1,83
4,6	9,35	10,65	7,6	18,73	1,27
4,8	9,86	10,14	7,8	19,15	0,85
5,0	10,30	9,70	8,0	19,45	0,55

Таблица 2

Фосфатный буфер 0,1 М

Двузамещенный фосфат натрия ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), относит. мол. масса 178,05; однозамещенный фосфат натрия ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), относит. мол. масса 138. Объем раствора доводят дистиллированной водой до 200 мл.

рН	0,2 М раствор Na_2HPO_4 , мл	0,2 М раствор NaH_2PO_4 , мл	рН	0,2 М раствор Na_2HPO_4 , мл	0,2 М раствор NaH_2PO_4 , мл
5,8	8,0	92,0	7,0	61,0	39,0
6,0	12,3	87,7	7,2	72,0	28,0
6,2	18,5	81,5	7,4	81,0	19,0
6,4	26,5	73,5	7,6	87,0	13,0
6,6	37,5	62,5	7,8	91,5	8,5
6,8	49,0	51,0	8,0	94,7	5,3

Таблица 3

Цитратный буфер 0,1 М

Лимонная кислота ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$), относит. мол. масса 210,14; трехзамещенный цитрат натрия ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), относит. мол. масса 294,12.

рН	0,1 М раствор лимонной кислоты, мл	0,1 М раствор трехзамещенного цитрата натрия, мл	рН	0,1 М раствор лимонной кислоты, мл	0,1 М раствор трехзамещенного цитрата натрия, мл
3,0	16,4	3,6	4,8	8,0	12,0
3,2	15,5	4,5	5,0	7,0	13,0
3,4	14,6	5,4	5,2	6,1	13,9
3,6	13,7	6,3	5,4	5,1	14,9
3,8	12,7	7,3	5,6	4,2	15,8
4,0	11,8	8,2	5,8	3,2	16,8
4,2	10,8	9,2	6,0	2,3	17,3
4,4	9,9	10,1	6,2	1,6	18,4
4,6	8,9	11,1			

Таблица 4

Боратный буфер 0,2 М

Бура ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), относит. мол. масса 381,43; борная кислота, относит. мол. масса 61,84.

pH	0,05 М раствор буры, мл	0,2 М раствор борной кислоты, мл	pH	0,05 М раствор буры, мл	0,2 М раствор борной кислоты, мл
7,4	1,0	9,0	8,2	3,5	6,5
7,6	1,5	8,5	8,4	4,5	5,5
7,8	2,0	8,0	8,7	6,0	4,0
8,0	3,0	7,0	9,0	8,0	2,0

Таблица 5

Глициновый буфер 0,05 М

Глицин, относит. мол. масса 75,07. Объем раствора доводят дистиллированной водой до 200 мл.

pH	0,2 М раствор глицина, мл	0,2 М раствор NaOH, мл	pH	0,2 М раствор глицина, мл	0,2 М раствор NaOH, мл
8,6	50	4,0	9,6	50	22,4
8,8	50	6,0	9,8	50	27,2
9,0	50	8,8	10,0	50	32,0
9,2	50	12,0	10,4	50	38,6
9,4	50	16,8	10,6	50	45,5

Таблица 6

Глицин-HCl-буфер 0,05 М

Глицин, относит. мол. масса 75,07. Объем раствора доводят дистиллированной водой до 200 мл.

pH	0,2 М раствор глицина, мл	0,2 М раствор HCl, мл	pH	0,2 М раствор глицина, мл	0,2 М раствор HCl, мл
2,2	50	44,0	3,0	50	11,4
2,4	50	32,4	3,2	50	8,2
2,6	50	24,2	3,4	50	6,4
2,8	50	16,8	3,6	50	5,0

Таблица 7

Вероналовый (диэтилбарбитуратный) буфер
Натрий-диэтилбарбитурат, относит. мол. масса 206,2.

pH	0,04 М раствор натрий-барбитурага, мл	0,2 М раствор HCl, мл	pH	0,04 М раствор натрий-барбитурага, мл	0,2 М раствор HCl, мл
6,8	100	18,4	8,4	100	5,21
7,0	100	17,8	8,6	100	3,82
7,2	100	16,7	8,8	100	2,52
7,4	100	15,3	9,0	100	1,65
7,6	100	13,4	9,2	100	1,13
7,8	100	11,47	9,4	100	0,70
8,0	100	9,39	9,6	100	0,35
8,2	100	7,21			

Таблица 8

Трис HCl-буфер 0,05 М

Трис, относит. мол. масса 121,14. Объем раствора доводят дистиллированной водой до 100 мл.

pH при температуре		0,2 М раствор трис, мл	0,1 М раствор HCl, мл	pH при температуре		0,2 М раствор трис, мл	0,1 М раствор HCl, мл
23° С	37° С			23° С	37° С		
9,10	8,95	25	5,0	8,05	7,90	25	27,5
8,92	8,78	25	7,5	7,96	7,92	25	30,0
8,74	8,60	25	10,0	7,84	7,73	25	32,5
8,62	8,48	25	12,5	7,77	7,63	25	35,0
8,50	8,37	25	15,0	7,66	7,52	25	37,5
8,40	8,27	25	17,5	7,54	7,40	25	40,0
8,32	8,18	25	20,0	7,36	7,22	25	42,5
8,23	8,10	25	22,5	7,20	7,05	25	45,0
8,14	8,00	25	25,0				

Таблица 9

Ацетатный буфер 0,2 М

Ацетат натрия ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), относит. мол. масса 136,09.

рН	0,2 М раствор ацетата нат- рия, мл	0,2 М раствор уксусной кис- лоты, мл	рН	0,2 М раствор ацетата нат- рия, мл	0,2 М раствор уксусной кис- лоты, мл
3,8	1,20	8,80	5,2	7,00	3,00
4,0	1,80	8,20	5,4	7,90	2,10
4,2	2,65	7,35	5,6	8,60	1,40
4,4	3,70	6,30	5,8	9,10	0,90
4,6	4,90	5,10			

Таблица 10

Сукцинатный буфер 0,05 М

Янтарная кислота, относит. мол. масса 118,09. Объем раствора доводят дистиллированной водой до 100 мл.

рН	0,2 М раствор янтарной кислоты, мл	0,2 М раствор NaOH , мл	рН	0,2 М раствор янтарной кислоты, мл	0,2 М раствор NaOH , мл
4,0	25	10,0	5,4	25	34,2
4,2	25	13,3	5,6	25	37,5
4,4	25	16,7	5,8	25	40,7
4,6	25	20,0	6,0	25	43,5
4,8	25	23,5			
5,0	25	26,7			

Таблица 11

Определение содержания этилового спирта в массовых и объемных процентах по плотности раствора (при 15,5° С)

Плотность раствора	Содержание спирта		Плотность раствора	Содержание спирта		Плотность раствора	Содержание спирта	
	массовый %	объемный %		массовый %	объемный %		массовый %	объемный %
0,9999	0,05	0,07	0,9709	20,58	25,17	0,9419	38,83	46,08
0,9989	0,58	0,73	0,9699	21,38	26,13	0,9409	39,35	46,64
0,9979	1,12	1,42	0,9689	22,15	27,04	0,9399	39,85	47,18
0,9969	1,75	2,20	0,9679	22,92	29,95	0,9389	40,35	47,72
0,9959	2,33	2,93	0,9669	23,69	28,89	0,9379	40,85	48,26
0,9949	2,89	3,62	0,9659	24,46	29,76	0,9369	41,05	48,80
0,9939	3,47	4,34	0,9649	25,21	30,65	0,9359	41,34	49,34
0,9929	4,06	5,08	0,9639	25,93	31,48	0,9349	42,33	49,86
0,9919	4,69	5,86	0,9629	26,60	32,27	0,9339	42,81	50,37
0,9909	5,31	6,63	0,9619	27,29	33,06	0,9329	43,29	50,37
0,9899	5,94	7,40	0,9609	28,00	33,89	0,9319	43,76	51,38
0,9889	6,64	8,27	0,9599	28,62	34,61	0,9309	44,23	51,87
0,9879	7,33	9,13	0,9589	29,27	35,35	0,9299	44,68	52,34
0,9869	8,00	9,95	0,9579	29,90	36,12	0,9280	45,55	53,24
0,9859	8,71	10,82	0,9569	30,79	36,76	0,9190	49,64	57,45
0,9849	9,43	11,70	0,9559	31,06	37,41	0,9090	54,00	61,84
0,9839	10,15	12,58	0,9549	31,69	38,11	0,8990	58,50	66,25
0,9829	10,92	13,52	0,9539	32,31	38,82	0,8890	62,82	70,35
0,9819	11,69	14,46	0,9529	32,14	39,54	0,8790	67,13	74,33
0,9809	12,46	15,40	0,9519	33,53	40,20	0,8690	71,25	78,00
0,9799	13,23	16,33	0,9509	34,10	40,84	0,8590	75,59	81,80
0,9789	14,00	17,26	0,9499	34,57	41,37	0,8490	79,72	85,26
0,9779	14,90	18,36	0,9489	35,05	41,90	0,8390	83,69	88,46
0,9769	15,75	19,30	0,9479	35,55	42,45	0,8290	87,58	91,46
0,9759	16,54	20,33	0,9469	36,06	43,01	0,8190	91,36	94,29
0,9739	17,33	21,27	0,9459	36,61	43,63	0,8090	94,97	96,78
0,9749	18,15	22,27	0,9449	37,17	44,24	0,7990	98,34	98,89
0,9729	18,32	23,19	0,9439	37,72	44,86	0,7939	99,97	99,46
0,9719	19,75	24,18	0,9429	38,28	45,47	0,7938	100,0	100,0

Таблица 12

Разбавление этилового спирта водой при 15,6° С
(количество миллилитров воды, которое нужно добавить к 100 мл исходного раствора)

Требуемая концентрация, % по объему	Исходная концентрация спирта, % по объему								
	90	85	80	75	70	65	60	55	50
85	6,56								
80	13,79	6,83							
75	21,89	14,83	7,20						
70	31,05	23,14	15,35	7,64					
65	41,53	33,03	24,66	16,37	8,15				
60	53,65	44,48	35,44	21,47	17,58	8,76			
55	67,87	57,90	48,07	38,32	28,63	19,02	9,74		
50	84,71	73,90	63,04	52,43	41,47	31,25	20,47	10,35	
45	105,34	93,30	81,38	69,54	57,78	46,09	34,46	20,90	11,41
40	130,80	117,34	104,01	90,76	77,58	64,48	51,43	38,46	25,55
35	163,28	148,01	132,88	117,82	102,84	87,93	73,08	58,31	43,59
30	206,22	188,57	171,05	153,61	136,04	118,94	101,71	84,54	67,45
25	266,12	245,15	224,30	203,53	182,83	162,21	141,65	121,16	100,73
20	355,80	329,84	304,01	278,26	252,58	226,98	201,43	175,96	150,55
15	505,27	471,00	436,85	402,81	368,83	334,91	301,07	267,29	233,64
10	804,54	753,65	702,89	652,21	601,60	551,96	500,59	450,19	399,85

Пример: чтобы получить 70%-ный спирт из 90%-ного, следует к 100 мл 90%-ного спирта добавить 31,05 мл воды.

Таблица 13

Разбавление концентрированных кислот
(плотность H₂SO₄ — 1,84, HCl — 1,19, HNO₃ — 1,42)

H ₂ SO ₄		HCl		HNO ₃	
Требуемая плотность	Миллилитров кислоты, добавляемой к 100 мл воды	Требуемая плотность	Миллилитров кислоты, добавляемой к 100 мл воды	Требуемая плотность	Миллилитров кислоты, добавляемой к 100 мл воды
1,15	15	1,04	24	1,10	23
1,20	21	1,06	41	1,15	39
1,25	28	1,08	65	1,20	61
1,30	36	1,10	99	1,25	94
1,35	46	1,12	151	1,30	150
1,40	57	1,14	250	1,35	281
1,45	70				
1,50	85				
1,55	104				
1,60	128				

Таблица 14

Плотность растворов NH₃ при 20° С

Плотность	Содержание NH ₃ в 1 л раствора, г	Плотность	Содержание NH ₃ в 1 л раствора, г
0,994	9,94	0,936	149,8
0,990	19,79	0,930	167,3
0,981	39,24	0,923	184,6
0,973	58,38	0,916	201,6
0,965	77,21	0,910	218,4
0,958	95,75	0,904	235,0
0,950	114,0	0,898	251,4
0,943	132,0	0,892	267,6

Таблица 15

Индикаторы

Название индикатора	Интервал pH	Окраска	Способ приготовления
Тимоловый синий	1,2—2,8	Красная — желтая	1) 0,1% в 20%-ном спирте 2) 100 мг + 4,3 мл 0,05 н. раствора NaOH + вода до 100 мл
Метиловый оранжевый	3,1—4,4	Красная — оранжево-желтая	0,1% в воде
Бромфеноловый синий	3,0—4,6	Желтая — синяя	1) 0,1% в 20%-ном спирте 2) 100 мг + 3 мл 0,05 н. раствора NaOH + вода до 100 мл
Метиловый красный	4,2—6,2	Красная — желтая	0,1% в 20%-ном спирте
Бромтимоловый синий	6,0—7,6	Желтая — синяя	1) 0,05% в 20%-ном спирте 2) 100 мг + 3,2 мл 0,05 н. раствора NaOH + вода до 100 мл
Феноловый красный	6,4—8,0	Желтая — красная	1) 0,1% в 20%-ном спирте 2) 100 мг + 5,7 мл 0,05 н. раствора NaOH + вода до 100 мл
Фенолфталеин	8,2—10,0	Бесцветная — малиново-красная	0,1% в 20%-ном спирте
Тимолфталеин	9,3—10,5	Бесцветная — синяя	0,1% в 90%-ном спирте

Свойства сефадексов

Сефадекс типа G	Диаметр частиц, мкм	Миллилитры воды, необходимые для набухания 1 г сефадекса	Объем 1 г сефадекса после набухания, мл.	Предел фракционирования (относит. мол. масса)	
				пептидов и глобулярных белков	декстранов
10	40—120	1,0	2—3	700	700
15	40—120	1,5	2,5—3,5	1500	1500
25 грубый	100—300	2,5	4—6	1000—5000	100—5000
25 средний	50—150	2,5	4—6	1500—30000	
25 тонкий	20—80	2,5	4—6		
25 очень тонкий	10—40	2,5	4—6		
50 грубый	100—300	5,0	9—11	1500—30000	500—10000
50 средний	50—150	5,0	9—11		
50 тонкий	20—80	5,0	9—11		
50 очень тонкий	10—40	5,0	9—11		
75	40—120	7,5	12—15	3000—80000	1000—50000
75 очень тонкий	10—40	7,5	12—15	3000—70000	
100	40—120	10,0	15—20	4000—150000	1000—150000
100 очень тонкий	10—40	10,0	15—20	4000—100000	
150	40—120	15,0	20—30	5000—300000	1000—150000
150 очень тонкий	10—40	15,0	18—22	5000—150000	
200	40—120	20,0	30—40	5000—600000	1000—200000
200 очень тонкий	10—40	20,0	20—25	5000—250000	

Заполнение колонки сефадексом. Готовят рассчитанное количество смеси сефадекса с водой или буферным раствором в стакане, куда добавляют антисептик азид натрия из расчета 20 мг на 100 мл смеси, перемешивают и оставляют на 5 дней. Затем из смеси удаляют пузырьки воздуха, перемешивают и заполняют колонку, регулируя краном вытекание жидкости.

Таблица 17

Соотношение между числом меш и размером отверстий сита

Меш	Диаметр отверстий, мм
20—50	0,84—0,297
50—110	0,297—0,149
100—200	0,149—0,074
200—400	0,074—0,038

Таблица 18

Охлаждающие смеси

Вещество	% вещества в смеси со льдом	Температура смеси, °С	Вещество	Температура смеси, °С
NH_4Cl	20	—15,5	Твердая углекислота	—78,8
NH_4NO_3	16	—14	Твердая углекислота с этанолом	от —72 до —115
NaCl	24	—21		
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	55	—40		
Спирт этиловый	50	—24	Твердая углекислота с ацетоном	—80
			Жидкий азот	—196
			Жидкий азот с ацетоном	до —150

ПОЛУЧЕНИЕ КАЗЕИНА ИЗ МОЛОКА

Снятое коровье молоко разбавляют 4-кратным объемом воды, добавляют уксусной кислоты до 0,1—0,75% содержания ее в смеси. Выпавший осадок (казеин) отфильтровывают через полотно и путем многократного растирания с водой удаляют из него сахар и другие сопутствующие вещества. После этого осадок растирают в небольшом количестве 5%-ного раствора аммиака или 0,1 н. раствора NaOH и фильтруют. Из прозрачного фильтрата казеин снова осаждают уксусной кислотой. Операцию осаждения и растворения повторяют трижды, затем казеин отмывают от следов уксусной кислоты спиртом и эфиром и, наконец, в аппарате Сокслета освобождают от жира. Сушат казеин в вакуум-эксикаторе.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПЛАСТИНОК
ДЛЯ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

К 8 г силикагеля марки G или КСК добавляют 0,4 г гипса и 24 мл воды. После тщательного перемешивания 3 мл суспензии равномерно, путем покачивания наносят на чистую сухую стеклянную пластинку размером 6×9 см, расположенную горизонтально на столе (или 5 мл для пластинки 9×12 см). Затем пластинки высушивают на воздухе в течение ночи. Перед использованием пластинок для хроматографического анализа их активируют нагреванием в сушильном шкафу при 110°C в течение 1 ч.

ПЕРЕКРИСТАЛЛИЗАЦИЯ НИНГИДРИНА
(ПО ГАМИЛЬТОНУ И ОРТИЦУ)

50 г нингидрина растворяют при нагревании в 50 мл 2%-ного раствора HCl , добавляют 5 г промытого кислотой нейтрального древесного угля и кипятят на небольшом огне в течение 10 мин. Раствор фильтруют горячим через стеклянный фильтр № 2 или № 3, оставляют на 2—3 ч при комнатной температуре и на ночь ставят в холодильник. Затем снова фильтруют через стеклянный фильтр, осадок промывают 2—3 раза охлажденным 1%-ным раствором HCl и сушат в вакуум-эксикаторе над твердым KOH в течение 24 ч. Выход — 94%. Нингидрин хранят в темной склянке.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Ахрем А. А., Кузнецова А. И. Тонкослойная хроматография. М., 1964.
- Бейли Дж. Методы химии белков. М., 1965.
- Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М., 1982, т. 1.
- Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. М., 1980.
- Кужман М. И. Медицинская биохимия. Воронеж, 1978.
- Кушманова О. Д., Ивченко Г. М. Руководство к практическим занятиям по биологической химии. М., 1974.
- Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам / Под ред. О. Микеш. М., 1982, т. 1.
- Малый практикум по биохимии / Под ред. В. В. Юркевича. М., 1979.
- Методы практической биохимии / Под ред. Б. Уильямса и К. Уилсон. М., 1978.
- Методы биохимического анализа растений / Под ред. В. В. Полевого и Г. Б. Максимова. Л., 1978.
- Шапиро Д. К. Практикум по биологической химии. Минск, 1972.
- Филиппович Ю. Б., Егорова Т. А., Севостьянова Г. А. Практикум по биохимии. М., 1982.

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие	3
<i>Белки и продукты белкового обмена</i>	4
Работа 1. Цветные реакции на белки	5
Работа 2. Осаждение белков	7
Работа 3. Определение изоэлектрической точки белков	9
Работа 4. Электрофорез белков на бумаге	10
Работа 5. Определение белка по Лоури	13
Работа 6. Определение содержания белка по биуретовой реакции	15
Работа 7. Определение содержания белка на фильтровальной бумаге с использованием кумасси бриллиантового голубого или амидо-черного	15
Работа 8. Разделение смеси аминокислот методом радиальной хроматографии на бумаге	16
Работа 9. Определение содержания аргинина в биологическом материале	18
Работа 10. Качественные реакции на промежуточные и конечные продукты азотистого обмена	19
Работа 11. Определение содержания аминного азота формольным титрованием	21
Работа 12. Определение содержания аминного азота с нингидриновым реактивом	22
Работа 13. Колориметрическое определение аминного азота с п-бензохиноном	23
Работа 14. Определение содержания общего азота по Кьельдалю	24
Работа 15. Определение общего азота методом Несслера	27
Работа 16. Микрометод определения общего азота	28
Работа 17. Определение содержания мочевины в крови с помощью уреазы	28
Работа 18. Определение аммиака в крови с помощью фенольно-нитропруссидного реактива	29
Работа 19. Определение содержания аммиака в биологических объектах в чашках Конвея с помощью индофенольной реакции	30
Работа 20. Определение аммиака в крови и в свежем растительном материале в чашках Конвея	31
<i>Нуклеопротеиды, нуклеиновые кислоты и продукты их обмена</i>	32
Работа 21. Кислотный гидролиз нуклеопротеидов дрожжей и изучение свойств ДНК и РНК	32

Работа 22. Определение нуклеозидфосфатов методом тонкослойной хроматографии	34
Работа 23. Определение азота и фосфора в биологическом материале	35
Работа 24. Определение содержания неорганического фосфора в присутствии лабильных органических фосфатов	36
Углеводы	38
Работа 25. Общие свойства моносахаридов	38
Работа 26. Цветные реакции на сахара	41
Работа 27. Определение сахаров методом восходящей хроматографии на бумаге	43
Работа 28. Количественное определение редуцирующих сахаров по Бертрану	45
Работа 29. Микрометод определения содержания глюкозы в растениях и крови по Хагедорн — Иенсену	48
Работа 30. Количественное определение моносахаридов в растениях и крови антроновым методом	51
Работа 31. Количественное определение сахара в крови с о-толуидином	52
Работа 32. Определение содержания глюкозы в биологическом материале с помощью фермента глюкозооксидазы с использованием желтой кровяной соли	53
Работа 33. Определение сахара в крови с помощью фермента глюкозооксидазы с использованием о-толуидина	54
Работа 34. Спектрофотометрический метод определения содержания глюкозы в крови с помощью гексокиназы	55
Работа 35. Определение содержания D-ксилозы в растениях	56
Работа 36. Определение содержания фруктозы в крови	57
Работа 37. Определение содержания гликогена в печени и крахмала в листьях растений	58
Липиды	60
Работа 38. Физико-химические свойства жиров	61
Работа 39. Качественные реакции на кетоновые тела, фосфатиды и стериды	62
Работа 40. Определение кислотного числа жира	63
Работа 41. Определение числа омыления и эфирного числа	64
Работа 42. Определение иодного числа жира	65
Работа 43. Колориметрический метод определения общего содержания жиров в сыворотке крови	66
Работа 44. Определение триглицеридов в сыворотке крови	66
Работа 45. Количественное определение свободных жирных кислот в сыворотке крови	67
Работа 46. Тонкослойная хроматография свободных жирных кислот из растений и крови	68

Ферменты

Работа 47. Влияние температуры на активность β -фруктофуранозидазы	70
Работа 48. Специфичность действия уреазы	70
Работа 49. Влияние pH среды на активность амилазы	72
Работа 50. Влияние активаторов и ингибиторов на активность α -амилазы слюны	74
Работа 51. Влияние малоната на активность сукцинатдегидрогеназы	75
Количественное определение ферментов	77
Класс 1. Оксидоредуктазы	77
Работа 52. Определение активности каталазы	77
Работа 53. Определение активности пероксидазы по окислению бензидина	78
Работа 54. Определение активности пероксидазы с использованием в качестве субстрата пирокатехина	79
Работа 55. Определение активности растительных дегидрогеназ тетразолиевым методом	81
Работа 56. Определение активности цитохромоксидазы	83
Класс 2. Трансферазы	84
Работа 57. Определение активности аланин- и аспартатаминотрансфераз с использованием 2,4-динитрофенилгидразина	84
Работа 58. Определение активности аланинаминотрансферазы с использованием лактатдегидрогеназы	87
Класс 3. Гидролазы	89
Работа 59. Определение активности щелочной и кислой фосфатаз в плазме крови и растениях	89
Работа 60. Определение активности кислой фосфатазы с использованием α -нафтилфосфата	90
Работа 61. Определение активности уреазы	91
Работа 62. Определение активности липазы	92
Класс 4. Лиазы	93
Работа 63. Определение активности альдолазы	94
Работа 64. Определение активности изоцитратлиазы	95
Работа 65. Определение активности малат-синтазы	96
Класс 5. Изомеразы	96
Работа 66. Определение активности глюкозо-6-фосфатизомеразы при помощи цветной реакции Селиванова	96
Работа 67. Определение активности глюкозо-6-фосфатизомеразы с использованием глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы	97
Витамины	99
Жирорастворимые витамины	99
Работа 68. Качественные реакции на витамин А (ретинол)	99
Работа 69. Качественные реакции на витамин D	100
Работа 70. Качественные реакции на витамин Е (токоферол)	101

Работа 22. Определение нуклеозидфосфатов методом тонкослойной хроматографии	34
Работа 23. Определение азота и фосфора в биологическом материале	35
Работа 24. Определение содержания неорганического фосфора в присутствии лабильных органических фосфатов	36

Углеводы

Работа 25. Общие свойства моносахаридов	38
Работа 26. Цветные реакции на сахара	41
Работа 27. Определение сахаров методом восходящей хроматографии на бумаге	43
Работа 28. Количественное определение редуцирующих сахаров по Бертрану	45
Работа 29. Микрометод определения содержания глюкозы в растениях и крови по Хагедорн — Иенсену	48
Работа 30. Количественное определение моносахаридов в растениях и крови антроновым методом	51
Работа 31. Количественное определение сахара в крови с о-толуидином	52
Работа 32. Определение содержания глюкозы в биологическом материале с помощью фермента глюкозооксидазы с использованием желтой кровяной соли	53
Работа 33. Определение сахара в крови с помощью фермента глюкозооксидазы с использованием о-толидина	54
Работа 34. Спектрофотометрический метод определения содержания глюкозы в крови с помощью гексокиназы	55
Работа 35. Определение содержания D-ксилозы в растениях	56
Работа 36. Определение содержания фруктозы в крови	57
Работа 37. Определение содержания гликогена в печени и крахмала в листьях растений	58

Липиды

Работа 38. Физико-химические свойства жиров	61
Работа 39. Качественные реакции на кетоновые тела, фосфатиды и стериды	62
Работа 40. Определение кислотного числа жира	63
Работа 41. Определение числа омыления и эфирного числа	64
Работа 42. Определение иодного числа жира	65
Работа 43. Колориметрический метод определения общего содержания жиров в сыворотке крови	66
Работа 44. Определение триглицеридов в сыворотке крови	66
Работа 45. Количественное определение свободных жирных кислот в сыворотке крови	67
Работа 46. Тонкослойная хроматография свободных жирных кислот из растений и крови	68

Ферменты

Работа 47. Влияние температуры на активность β -фруктофуранозидазы	70
Работа 48. Специфичность действия уреазы	70
Работа 49. Влияние pH среды на активность амилазы	72
Работа 50. Влияние активаторов и ингибиторов на активность α -амилазы слюны	74
Работа 51. Влияние малоната на активность сукцинатдегидрогеназы	75
Количественное определение ферментов	77
Класс 1. Оксидоредуктазы	77
Работа 52. Определение активности каталазы	77
Работа 53. Определение активности пероксидазы по окислению бензидина	78
Работа 54. Определение активности пероксидазы с использованием в качестве субстрата пирокатехина	79
Работа 55. Определение активности растительных дегидрогеназ тетразолиевым методом	81
Работа 56. Определение активности цитохромоксидазы	83
Класс 2. Трансферазы	84
Работа 57. Определение активности аланин- и аспартатаминотрансфераз с использованием 2,4-динитрофенилгидразина	84
Работа 58. Определение активности аланинаминотрансферазы с использованием лактатдегидрогеназы	87
Класс 3. Гидролазы	89
Работа 59. Определение активности щелочной и кислой фосфатаз в плазме крови и растениях	89
Работа 60. Определение активности кислой фосфатазы с использованием α -нафтилфосфата	90
Работа 61. Определение активности уреазы	91
Работа 62. Определение активности липазы	92
Класс 4. Лиазы	93
Работа 63. Определение активности альдолазы	93
Работа 64. Определение активности изоцитратлиазы	94
Работа 65. Определение активности малат-синтазы	95
Класс 5. Изомеразы	96
Работа 66. Определение активности глюкозо-6-фосфатизомеразы при помощи цветной реакции Селиванова	96
Работа 67. Определение активности глюкозо-6-фосфатизомеразы с использованием глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы	97

Витамины

Жирорастворимые витамины	99
Работа 68. Качественные реакции на витамин А (ретинол)	99
Работа 69. Качественные реакции на витамин D	100
Работа 70. Качественные реакции на витамин Е (токоферол)	101

Работа 22. Определение нуклеозидфосфатов методом тонкослойной хроматографии	34
Работа 23. Определение азота и фосфора в биологическом материале	35
Работа 24. Определение содержания неорганического фосфора в присутствии лабильных органических фосфатов	36
<i>Углеводы</i>	38
Работа 25. Общие свойства моносахаридов	38
Работа 26. Цветные реакции на сахара	41
Работа 27. Определение сахаров методом восходящей хроматографии на бумаге	43
Работа 28. Количественное определение редуцирующих сахаров по Бертрану	45
Работа 29. Микрометод определения содержания глюкозы в растениях и крови по Хагедорн — Иенсену	48
Работа 30. Количественное определение моносахаридов в растениях и крови антроновым методом	51
Работа 31. Количественное определение сахара в крови с о-толуидином	52
Работа 32. Определение содержания глюкозы в биологическом материале с помощью фермента глюкозооксидазы с использованием желтой кровяной соли	53
Работа 33. Определение сахара в крови с помощью фермента глюкозооксидазы с использованием о-толуидина	54
Работа 34. Спектрофотометрический метод определения содержания глюкозы в крови с помощью гексокиназы	55
Работа 35. Определение содержания D-ксилозы в растениях	56
Работа 36. Определение содержания фруктозы в крови	57
Работа 37. Определение содержания гликогена в печени и крахмала в листьях растений	58
<i>Липиды</i>	60
Работа 38. Физико-химические свойства жиров	61
Работа 39. Качественные реакции на кетоновые тела, фосфатиды и стериды	62
Работа 40. Определение кислотного числа жира	63
Работа 41. Определение числа омыления и эфирного числа	64
Работа 42. Определение иодного числа жира	65
Работа 43. Колориметрический метод определения общего содержания жиров в сыворотке крови	66
Работа 44. Определение триглицеридов в сыворотке крови	66
Работа 45. Количественное определение свободных жирных кислот в сыворотке крови	67
Работа 46. Тонкослойная хроматография свободных жирных кислот из растений и крови	68

<i>Ферменты</i>	70
Работа 47. Влияние температуры на активность β -фруктофуранозидазы	70
Работа 48. Специфичность действия уреазы	72
Работа 49. Влияние pH среды на активность амилазы	72
Работа 50. Влияние активаторов и ингибиторов на активность α -амилазы слюны	74
Работа 51. Влияние малоната на активность сукцинатдегидрогеназы	75
Количественное определение ферментов	77
Класс 1. Оксидоредуктазы	77
Работа 52. Определение активности каталазы	77
Работа 53. Определение активности пероксидазы по окислению бензидина	78
Работа 54. Определение активности пероксидазы с использованием в качестве субстрата пирокатехина	79
Работа 55. Определение активности растительных дегидрогеназ тетразолиевым методом	81
Работа 56. Определение активности цитохромоксидазы	83
Класс 2. Трансферазы	84
Работа 57. Определение активности аланин- и аспартатаминотрансфераз с использованием 2,4-динитрофенилгидразина	84
Работа 58. Определение активности аланинаминотрансферазы с использованием лактатдегидрогеназы	87
Класс 3. Гидролазы	89
Работа 59. Определение активности щелочной и кислой фосфатаз в плазме крови и растениях	89
Работа 60. Определение активности кислой фосфатазы с использованием α -нафтилфосфата	90
Работа 61. Определение активности уреазы	91
Работа 62. Определение активности липазы	92
Класс 4. Лиазы	93
Работа 63. Определение активности альдолазы	93
Работа 64. Определение активности изоцитратлиазы	94
Работа 65. Определение активности малат-синтазы	95
Класс 5. Изомеразы	96
Работа 66. Определение активности глюкозо-6-фосфатизомеразы при помощи цветной реакции Селливанова	96
Работа 67. Определение активности глюкозо-6-фосфатизомеразы с использованием глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы	97
<i>Витамины</i>	99
Жирорастворимые витамины	99
Работа 68. Качественные реакции на витамин А (ретинол)	99
Работа 69. Качественные реакции на витамин D	100
Работа 70. Качественные реакции на витамин E (токоферол)	101

Работа 71. Качественные реакции на витамин К	101
Водорастворимые витамины	102
Работа 72. Качественная реакция на витамин В ₁	102
Работа 73. Качественная реакция на витамин В ₂ (рибофлавин)	103
Работа 74. Количественное определение содержания витамина В ₂	104
Работа 75. Качественная реакция на витамин В ₆	105
Работа 76. Качественные реакции на витамин РР (никотиновая кислота, амид никотиновой кислоты)	106
Работа 77. Качественная реакция на витамин В ₁₂ (кобаламин)	106
Работа 78. Качественные реакции на витамин С (аскорбиновая кислота)	107
Работа 79. Количественное определение содержания аскорбиновой кислоты в растениях	109
Работа 80. Колориметрический метод определения аскорбиновой кислоты в плазме крови	110
Приложение	112
Приготовление буферных растворов	112
Таблица 1. Фосфатно-цитратный буфер	112
Таблица 2. Фосфатный буфер	113
Таблица 3. Цитратный буфер	113
Таблица 4. Боратный буфер	114
Таблица 5. Глициновый буфер	114
Таблица 6. Глицин-НСI-буфер	114
Таблица 7. Вероналовый (диэтилбарбитуратный) буфер	115
Таблица 8. Трис-НСI-буфер	115
Таблица 9. Ацетатный буфер	116
Таблица 10. Сукцинатный буфер	116
Таблица 11. Определение содержания этилового спирта в массовых и объемных процентах по плотности раствора	117
Таблица 12. Разбавление этилового спирта водой	118
Таблица 13. Разбавление концентрированных кислот	119
Таблица 14. Плотность растворов NH ₃	119
Таблица 15. Индикаторы	120
Таблица 16. Свойства сефадексов	121
Таблица 17. Соотношение между числом меш и размером отверстий сита	122
Таблица 18. Охлаждающие смеси	122
Получение казеина из молока	123
Приготовление пластинок для тонкослойной хроматографии	123
Перекристаллизация нингидрина	123
Рекомендуемая литература	124