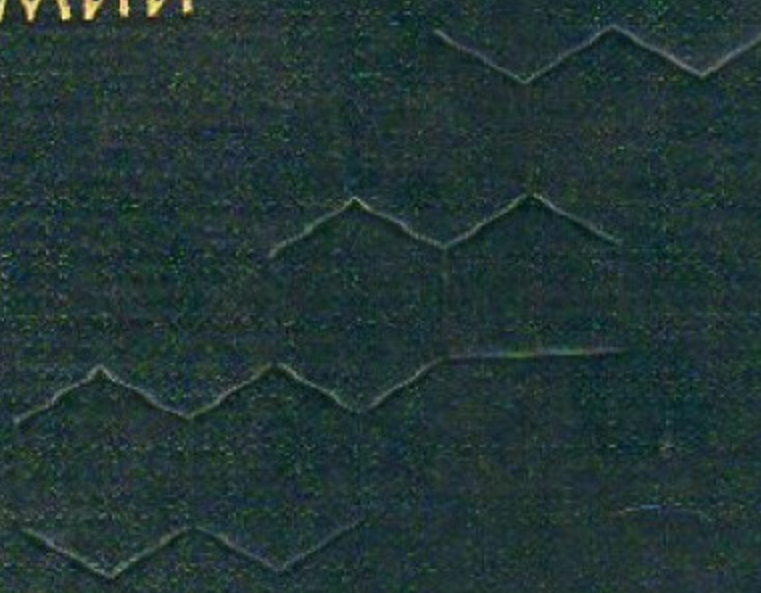


В. И. Добрынина
Е. Я. Свешникова

Руководство
к практическим занятиям
по биологической
химии



Проф. В. И. ДОБРЫНИНА и доцент Е. А. СВЕШНИКОВА

РУКОВОДСТВО К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ

СОСТАВЛЕНО С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДОВ
ПОЛУМИКРОАНАЛИЗА

Д о п у щ е н о
Управлением кадров и учебных заведений
Министерства здравоохранения СССР
в качестве учебного пособия для студентов
фармацевтических институтов



ГОСУДАРСТВЕННОЕ ИЗДАТЕЛЬСТВО МЕДИЦИНСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ
М Е Д Г И З — 1958 — М О С К В А

ПРЕДИСЛОВИЕ

Руководство к практическим занятиям по биохимии для студентов фармацевтических институтов составлено с применением методов полумикроанализа. Применение этих методов уменьшает расходование реактивов в 10 раз и значительно экономит время, что дает возможность увеличить количество практических работ на каждом занятии.

Практикум состоит из четырех разделов: I — белки, витамины, гормоны и ферменты, II — обмен веществ в животном организме, III — химия тканей, IV — обмен веществ в растениях.

Первый раздел состоит из 7 тем и охватывает 7 четырехчасовых занятий. Раздел является общим для биохимии животных и биохимии растений.

Второй раздел охватывает 4 темы и рассчитан на 6 четырехчасовых занятий, из которых 2 темы — «Обмен углеводов» и «Обмен белковых веществ» — включают каждая по 2 занятия. Этот раздел знакомит с методами изучения обмена веществ и содержит много работ по количественному микроанализу.

Третий раздел посвящен изучению «Химии тканей». Он состоит из 3 тем и рассчитан на 2 четырехчасовых занятия. Две темы — «Химия мышечной ткани» и «Химия нервной ткани» — могут быть проработаны на одном занятии при условии, что каждый учащийся производит разделение белковых фракций либо мышечной, либо нервной ткани.

Четвертый раздел «Обмен веществ в растениях» состоит из 6 сравнительно небольших по объему тем и рассчитан на 3 четырехчасовых занятия. Темы этого раздела включены в руководство к практическим занятиям по биохимии впервые и представляют специфику практикума для фармацевтических институтов. В фармацевтических институтах нет кафедры биохимии растений, а между тем провизору, имеющему дело с лекарственным растительным сырьем и антибиотиками, необходимо иметь представление об обмене веществ у высших и низших растений.

В практикуме дано 20 работ по количественному микроанализу биологического материала, которые основаны на методах количественного анализа: ацидиметрии, оксидиметрии, йодометрии, методе осаждения, газометрическом и колориметрическом методах. Методы количественного анализа описаны очень детально с тем, чтобы без указаний педагога студент мог вспомнить и применить важнейшие приемы количественного анализа и приобрести навыки в работе. Перед каждой темой дано небольшое теоретическое вступление. Оно дает целевую установку каждому занятию и связывает теоретический курс с выполняемой работой.

Результаты работ рекомендуется записывать в форме таблиц. Они помогают систематизировать материал, упрощают запись и экономят время, в особенности если подготовка таблиц производится заранее.

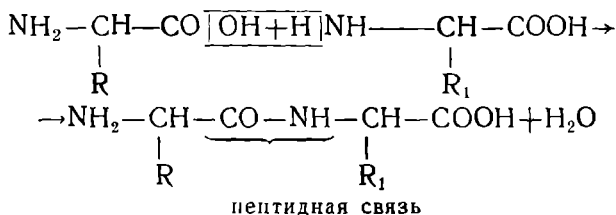
Авторы приносят благодарность ассистенту кафедры кандидату фармацевтических наук А. С. Булатовой за участие в составлении некоторых глав четвертого раздела: обмен углеводов, обмен жиров и обмен азотистых веществ в растениях.

Авторы будут благодарны всем, кто пришлет свои критические замечания по поводу настоящего практикума.

1. ХИМИЧЕСКАЯ ПРИРОДА БЕЛКА

По химической природе белки представляют собой высокомолекулярные органические соединения, построенные из сотен или тысяч аминокислотных остатков.

По современным данным, в природных белках встречается примерно около 30 различных α -аминокислот. Строение белковых веществ полностью не изучено, но известно, что аминокислоты в молекуле белка соединены между собой так называемой пептидной связью, которая возникает за счет отнятия молекулы воды от карбоксильной группы одной аминокислоты и аминогруппы другой аминокислоты:



Молекула белка состоит из большого количества полипептидных цепей, связанных между собой главным образом водородными связями. Кроме водородных связей, в молекуле белка между полипептидными цепочками возникают и другие связи (например, эфирные, дисульфидные и др.), образованные за счет фенольных, спиртовых, сульфгидрильных и других групп, имеющих в полипептидных цепочках.

Разнообразие существующих в природе белков зависит от особенностей аминокислотного состава, характера связей между аминокислотами, порядка их сочетания.

При взаимодействии белка с отдельными химическими веществами возникают окрашенные продукты реакции. Образование их обусловлено наличием в молекуле белка той или иной аминокислоты или химической группировки. Поэтому так называемые «цветные реакции на белки» часто используют для установления белковой природы вещества, изуче-

ния аминокислотного состава различных природных белков и количественного определения в белке той или иной аминокислоты. При знакомстве с цветными реакциями на белки следует главное внимание обратить на химическую структуру тех аминокислот, наличие которых в белке обуславливает данную реакцию.

Результаты практической работы рекомендуется записывать в виде таблицы, которая помогает систематизировать материал и делает его более наглядным.

Цветные реакции на белки

№ п/п	Наименование реакции	Материал исследования	Употребляемые реактивы	Наблюдаемое окрашивание	Чем обусловлена реакция

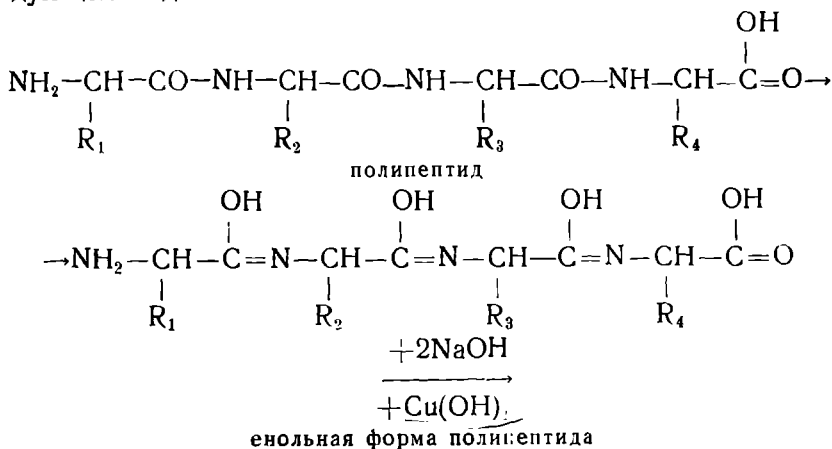
Выводы:

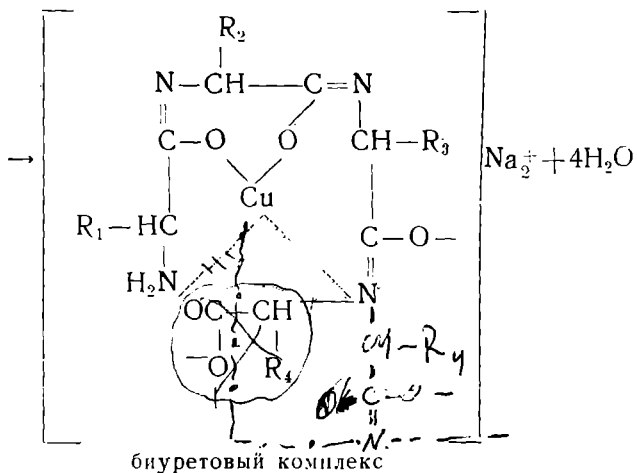
Примечание. В графе «Чем обусловлена реакция» рекомендуется приводить формулы тех аминокислот, присутствие которых в белках обуславливает данную реакцию. О ходе химического процесса и о конечных продуктах реакции следует писать словами.

Работа № 1

× Биуретовая реакция (Пиотровского)

При добавлении к щелочному раствору белка сернокислой меди жидкость приобретает красно-фиолетовое или сине-фиолетовое окрашивание. Реакция обусловлена присутствием в белке пептидных связей, которые с ионами меди образуют окрашенные солеобразные комплексные соединения. Схематично реакция может быть представлена в следующем виде:





Окраска биуретового комплекса зависит от количества медной соли в растворе и от структуры вещества, с которым координирован ион меди.

Продукты распада белка — пептоны и полипептиды — дают биуретовую реакцию с красным оттенком¹.

Ход работы. В 2 пробирки наливают: в одну — 5 капель 1% раствора яичного белка, в другую — 5 капель 1% раствора пшеничного (или соевого) белка. В обе пробирки прибавляют по 5 капель 10% раствора едкого натра и по 1 капле 1% раствора сернокислой меди. В обеих пробирках появляется устойчивое красно-фиолетовое (или сине-фиолетовое) окрашивание.

При малой концентрации белка в растворе биуретовую реакцию производят следующим образом. В пробирку наливают 20 капель 10% раствора едкого натра, добавляют 1—2 капли 1% раствора сернокислой меди и перемешивают.

Затем набирают в пипетку разбавленный раствор белка и осторожно спускают его по стенке пробирки так, чтобы он наслаивался сверху и не смешивался со щелочным раствором сернокислой меди.

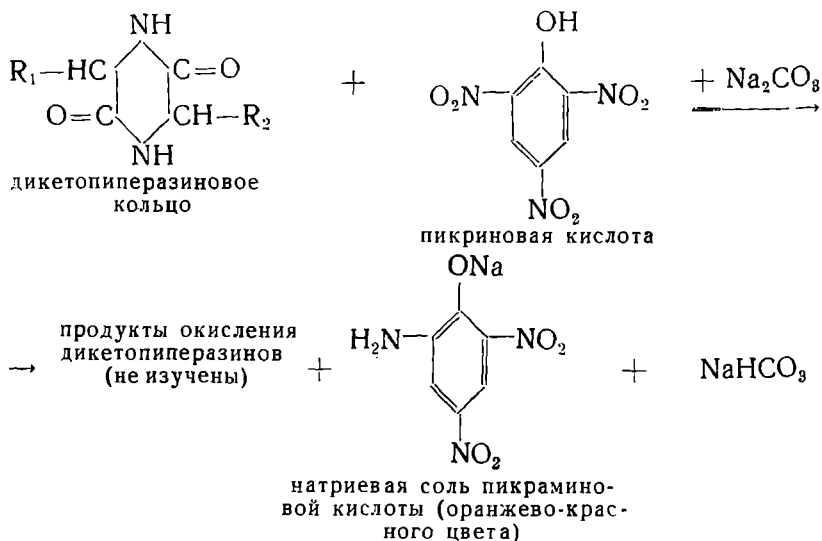
На границе двух слоев жидкости образуется фиолетовое кольцо.

¹ Биуретовую реакцию дают также биурет $\text{NH}_2\text{—CO—NH—CO—NH}_2$, некоторые аминокислоты (гистидин, серин, треонин) и другие соединения при условии достаточно большой концентрации их в растворе.

Дикетопиперазиновая реакция с пикриновой кислотой

Если к раствору белка добавить пикриновую кислоту и углекислый натрий, то при нагревании жидкость окрашивается в оранжево-красный цвет.

Реакция обусловлена наличием в белке дикетопиперазиновых колец, которые, окисляясь, восстанавливают пикриновую кислоту в пикраминовую. Последняя в щелочной среде образует соль оранжево-красного цвета.



Следует иметь в виду, что дикетопиперазиновая реакция не является строго специфичной для белка, так как восстановление пикриновой кислоты может произойти при наличии в растворе других легкоокисляющихся веществ, например глюкозы, аскорбиновой кислоты и др.

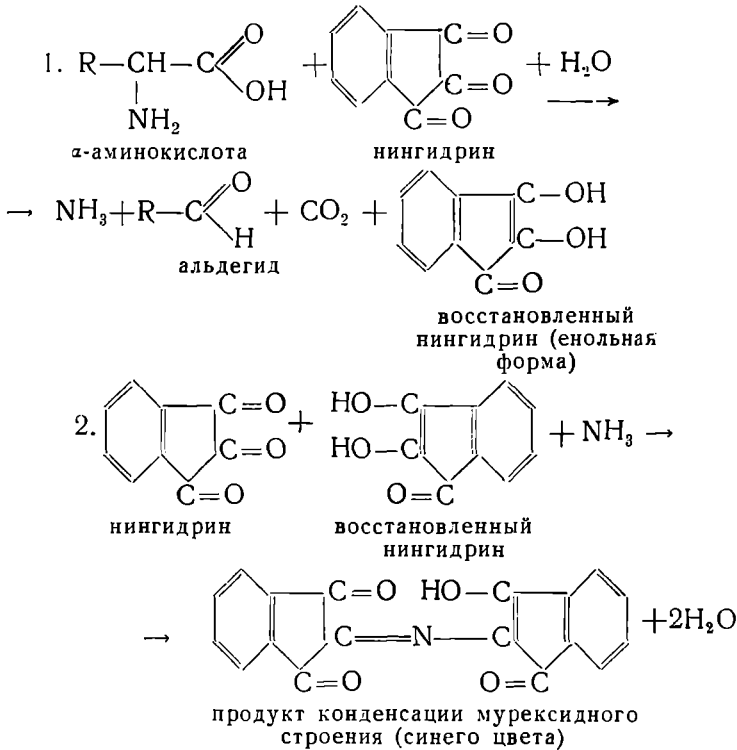
Ход работы. В 2 пробирки наливают: в одну — 5 капель 1% раствора яичного белка, в другую — 5 капель 1% раствора пшеничного белка (или соевого). В каждую пробирку прибавляют по 1—2 капли 10% раствора пикриновой кислоты и приблизительно около 0,2 г порошка углекислого натрия¹. При медленном нагревании лимонно-желтый цвет жидкости переходит в оранжево-красный вследствие образования пикраминовой кислоты.

¹ Количество порошка по объему приблизительно равно количеству жидкости в пробирке.

Нингидриновая реакция на α-аминокислоты

Раствор белка при нагревании с разбавленным раствором нингидрина окрашивается в синий цвет.

Реакция обусловлена наличием в белке остатков α-аминокислот. При взаимодействии с нингидрином α-аминокислоты окисляются и распадаются с образованием аммиака, альдегида и угольной кислоты. Нингидрин восстанавливается и конденсируется с другой частицей нингидрина и аммиаком. В результате образуется сложное соединение мурексидного строения, окрашенное в синий цвет. Реакция может быть представлена в следующем виде:



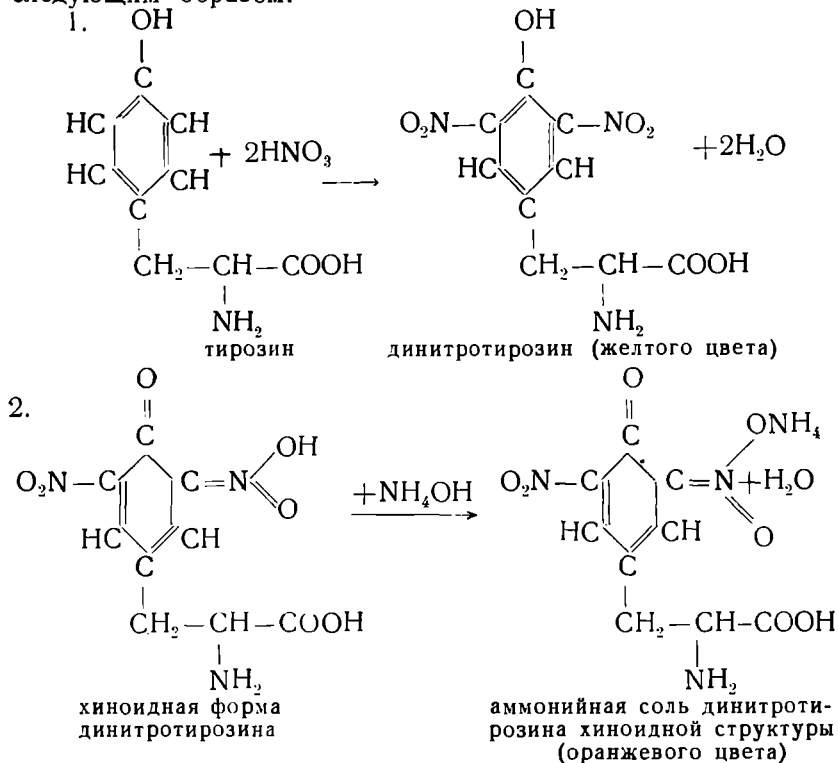
Ход работы. В 2 пробирки наливают: в одну — 5 капель 1% раствора яичного белка, в другую — 5 капель 1% раствора пшеничного (или соевого) белка. В каждую пробирку наливают по 2—3 капли 0,1% раствора нингидрина и кипятят; через 1—2 минуты появляется розовое, красное, а затем синее окрашивание. При стоянии интенсивность окраски увеличивается.

**Ксантопротеиновая реакция
на циклические аминокислоты**

При нагревании растворов большинства белков с концентрированной азотной кислотой жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет, переходящий при подщелачивании в оранжевый.

Реакция обусловлена присутствием в белке циклических аминокислот — фенилаланина, тирозина и триптофана, которые при взаимодействии с концентрированной азотной кислотой образуют нитропроизводные желтого цвета (реакция нитрования)¹. Последние при добавлении щелочи превращаются в соли хиноидной структуры, окрашенные в оранжевый цвет. Белки, в которых циклические аминокислоты отсутствуют, не дают ксантопротеиновой реакции. К таким белкам относятся: желатин, клупеин, сальмин и др.

Реакция нитрования тирозина может быть изображена следующим образом:



¹ Ксантопротеиновую реакцию можно наблюдать на коже, ногтях, шерсти и т. п. при попадании на них концентрированной азотной кислоты (желтое окрашивание).

Аналогично протекает реакция нитрования триптофана и фенилаланина (последний нитруется труднее).

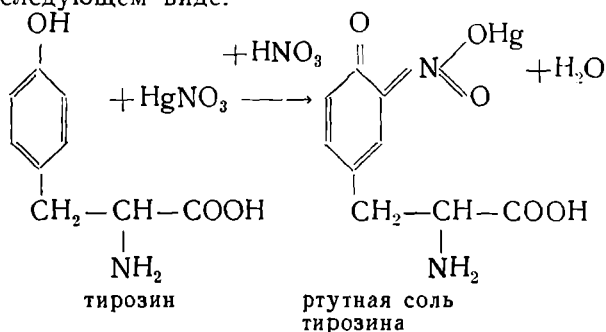
Ход работы. В 3 пробирки наливают: в первую — 5 капель 1% раствора яичного белка, во вторую — 5 капель 1% раствора пшеничного (или соевого) белка, в третью — 5 капель 1% раствора желатина. Во все пробирки добавляют по 2—3 капли концентрированной азотной кислоты и нагревают. В первой и второй пробирках жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет; в третьей получается едва заметное бледно-желтое окрашивание¹. После охлаждения в каждую пробирку добавляют по 10 капель концентрированного раствора аммиака или 30% раствора едкого натра. Окраска жидкости переходит в оранжевую.

Работа № 5

Реакция на тирозин (Миллона)

При нагревании растворов большинства белков с реактивом Миллона (состоящим из смеси азотнокислых и азотистокислых солей закиси ртути, растворенных в концентрированной азотной кислоте) образуется осадок белка, окрашенный в красный цвет².

Реакция обусловлена присутствием в белке циклической аминокислоты тирозина, которая при взаимодействии с реактивом Миллона дает ртутную соль своего нитропроизводного, окрашенную в красный цвет. Белки, не содержащие тирозина (желатин, клупеин, сальмин и др.), не дают реакцию Миллона. Если реакцию Миллона производят с раствором тирозина или с растворами полипептидов, содержащих тирозин, то осадок не образуется, но жидкость равномерно окрашивается в красный цвет. Эту реакцию широко используют для количественного определения тирозина в гидролизатах белка и для определения некоторых производных тирозина, дающих эту реакцию. Реакция может быть изображена в следующем виде:



¹ Желатин не содержит циклических аминокислот; бледно-желтое окрашивание обусловлено незначительной примесью других белков.

² См. осаждение белка солями тяжелых металлов, стр. 34.

Реакция Миллона не является строго специфичной для тирозина. Ее дают фенолы, полифенолы, а также алкалоиды, имеющие фенольную группировку. Однако все эти вещества отсутствуют в молекуле белка.

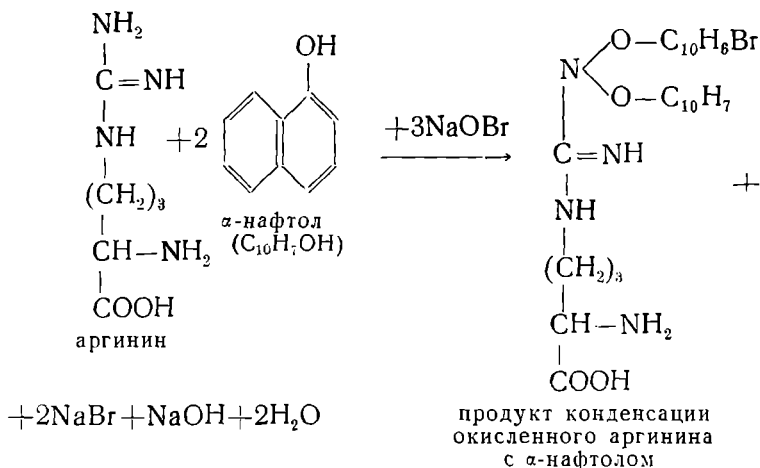
Ход работы. В 3 пробирки наливают: в первую — 5 капель 1% раствора яичного белка, во вторую — 5 капель 1% раствора пшеничного (или соевого) белка, в третью — 5 капель 1% раствора желатина. Во все пробирки прибавляют по 1—2 капли реактива Миллона и осторожно нагревают. В первых двух пробирках осадок белка приобретает красное окрашивание, в пробе с желатиной осадок растворяется и жидкость остается бесцветной.

Работа № 6

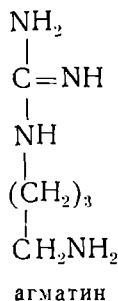
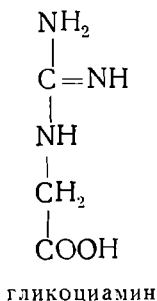
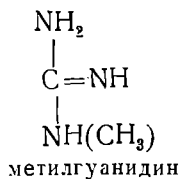
Реакция на аргинин (Сакагучи)

При добавлении к раствору белка щелочи, гипобромита и α -нафтола жидкость окрашивается в красный цвет.

Реакция обусловлена присутствием в белке аминокислоты аргинина, имеющей в своем составе гуанидиновую группировку. В результате реакции образуется сложное соединение красного цвета, представляющее собой продукт конденсации окисленного аргинина с α -нафтолом. Гипобромит играет роль окислителя и участвует, по-видимому, в образовании промежуточного бромамидного соединения аргинина.



Реакция Сакагучи не является строго специфичной для аргинина. Ее дают и другие монозамещенные гуанидина, как, например, метилгуанидин, гликоциамин, агматин и др.



Однако все эти вещества отсутствуют в молекуле белка и не мешают определению в белке аргинина.

Ход работы. В 2 пробирки наливают: в первую — 5 капель 1% раствора яичного белка, во вторую — 5 капель 1% раствора пшеничного (или соевого) белка и добавляют в каждую по 5 капель 10% раствора едкого натра, по 3 капли 0,1% спиртового раствора α -нафтола и по каплям (1—3—5) 2% раствора гипобромита натрия. Жидкость в обеих пробирках окрашивается в красный цвет.

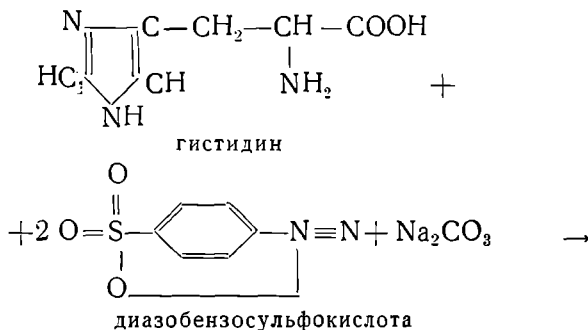
Присутствие аммиака и избыток гипобромита мешают реакции.

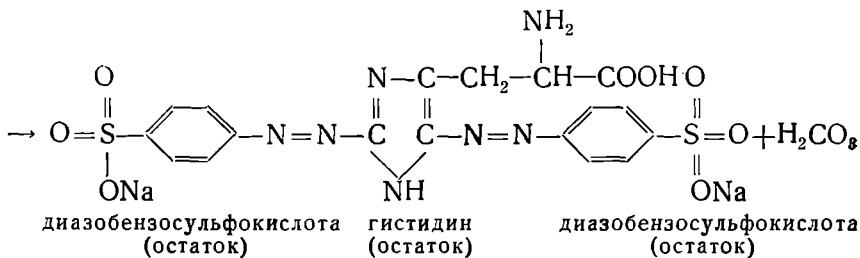
Работа № 7

Диазореакция на гистидин и тирозин (Паули)

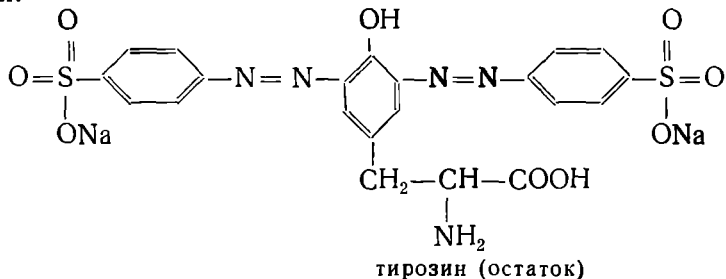
При добавлении диазореактива к щелочному раствору белка жидкость приобретает оранжево-красное окрашивание.

Реакция обусловлена присутствием в белке аминокислот гистидина и тирозина (либо одной из них), которые, реагируя с диазобензосульфокислотой, образуют азокраситель красного цвета. Реакция может быть представлена в следующем виде:



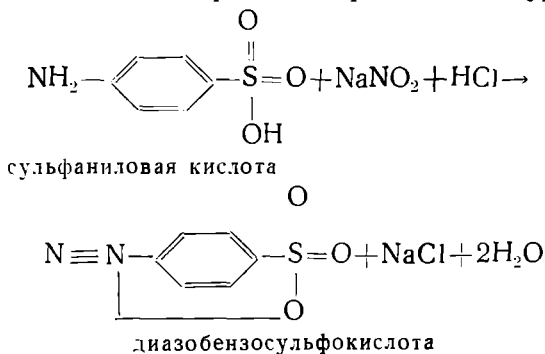


С тирозином образуется азокраситель следующего строения:



Интенсивность получаемой окраски зависит от количества гистидина и тирозина. Реакция Паули не является строго специфичной для гистидина и тирозина; ее дают вещества, имеющие в своей структуре фенольное, имидазольное, пиррольное или триазоловое кольцо, как, например, адреналин, тиамин, карнозин, желчные пигменты, гистамин и другие вещества. Все они отсутствуют в белке и не мешают реакции.

Диазобензосульфокислота — очень неустойчивое соединение и при стоянии разрушается, поэтому диазотирование сульфаниловой кислоты лучше производить *ex tempore* и на холоду. Реакция диазотирования протекает по уравнению¹:



¹ Сульфаниловая кислота растворяется в 2% растворе соляной кислоты.

Ход работы. 1. В 2 пробирки наливают по 3 капли 1% раствора сульфаниловой кислоты в 2% соляной кислоте, по 3 капли 5% раствора азотистокислого натрия и перемешивают. К полученному диазореактиву добавляют: в одну пробирку 5 капель 1% раствора яичного белка, в другую — 5 капель пшеничного (или соевого) белка и в каждую по 3—5 капель 10% раствора углекислого натрия; жидкость в обеих пробирках окрашивается в красный цвет. Если реакцию производить с раствором желатина, то окраска получается меньшей интенсивности, так как в желатине нет тирозина и мало гистидина.

2. Описанная выше реакция может быть выполнена иным путем. К небольшому количеству диазореактива (приготовление см. выше) добавляют 5 капель 10% раствора соды и по стенке пробирки осторожно настилают раствор белка. На границе двух жидкостей появляется красное кольцо. При смешивании вся жидкость окрашивается в оранжевый или красный цвет.

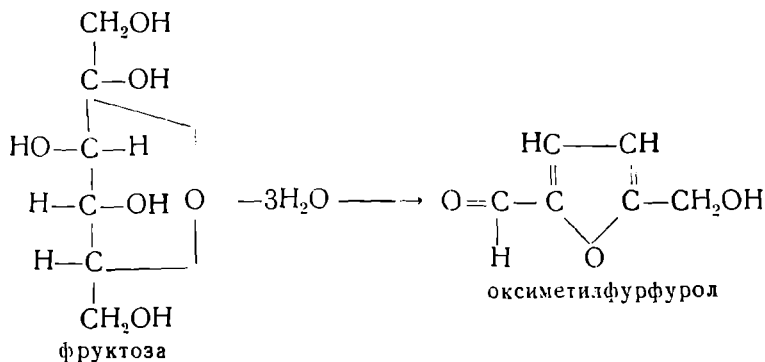
Работа № 8

Реакции на триптофан Адамкевича и Шульца-Распайля

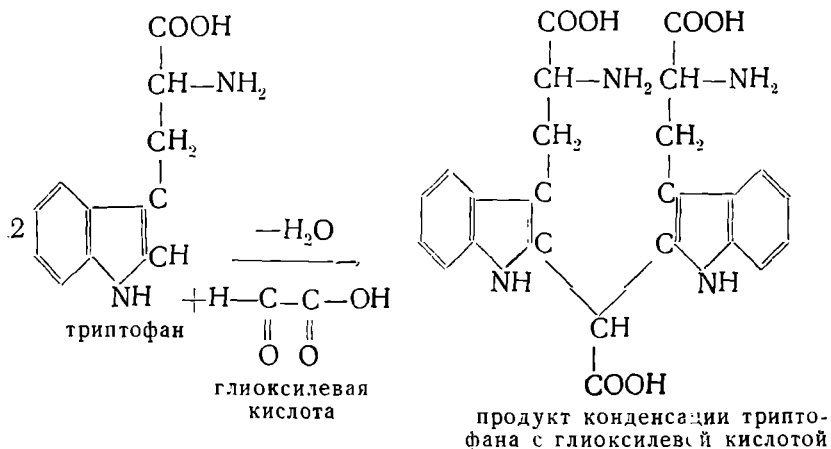
Если к раствору белка добавить концентрированную уксусную кислоту или тростниковый сахар, а затем осторожно по стенке пробирки спускать из пипетки концентрированную серную кислоту, то на границе двух жидкостей образуется красно-фиолетовое кольцо.

Реакция обусловлена наличием в белке триптофана, который, реагируя с глиоксиловой кислотой, присутствующей в виде примеси в концентрированной уксусной кислоте, или с оксиметилфурфуролом, образующимся из фруктозы¹,

¹ Образование оксиметилфурфуrolа из фруктозы происходит по следующему уравнению:



дает окрашенные продукты конденсации¹. Концентрированная серная кислота принимает участие в реакции в качестве водоотнимающего вещества. Ход превращений триптофана может быть представлен в следующем виде:



Интенсивность получаемой окраски зависит от количества триптофана. Содержание триптофана в яичном и соевом белке в 2 раза больше, чем в пшеничном; в желатине триптофана нет.

Ход работы: 1. В 3 пробирки наливают: в первую — 5 капель 1% раствора яичного белка, во вторую — 5 капель 1% раствора пшеничного (или соевого) белка и в третью — 5 капель 1% раствора желатина. В каждую пробирку добавляют по 5 капель концентрированной уксусной кислоты, слегка нагревают и затем подслаивают равным объемом концентрированной серной кислоты. В первых двух пробирках с растворами яичного и пшеничного белка на границе двух слоев жидкости появляется красно-фиолетовое кольцо, постепенно распространяющееся на всю жидкость. При нагревании в кипящей водяной бане окраска развивается быстрее. В пробирке с раствором желатина реакция получается отрицательной.

2. В 3 пробирки наливают: в первую — 5 капель 1% раствора яичного белка, во вторую — 5 капель 1% раствора пшеничного (или соевого) белка, в третью — 5 капель 1% раствора желатина. В каждую пробирку добавляют по 1 капле 10% раствора сахарозы, перемешивают и подслаивают.

¹ Реакцию с глиоксильевой кислотой дают и некоторые другие соединения, имеющие кольцо индола.

вают равными объемами концентрированной серной кислоты¹. В пробах с растворами яичного и пшеничного белка на границе двух жидкостей образуется красно-фиолетовое кольцо. В кипящей водяной бане окраска развивается быстрее. В пробе с раствором желатина окрашивания не наблюдается (в желатине нет триптофана).

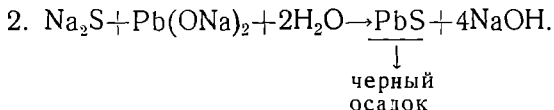
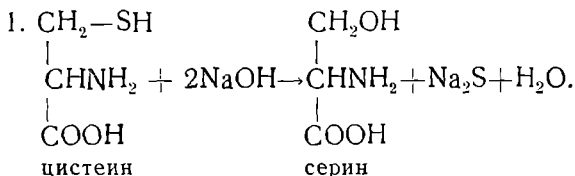
Работа № 9

Реакция Фоля на серусодержащие аминокислоты

При нагревании растворов белка со щелочью и плюмбитом жидкость окрашивается в бурый или черный цвет.

Реакция обусловлена присутствием в белке серусодержащих аминокислот цистина, цистеина и метионина, которые под влиянием щелочи разрушаются с образованием сернистого натрия; последний с плюмбитом образует черный осадок сернистого свинца.

Реакция протекает по следующему уравнению:



Интенсивность окраски зависит от количества серусодержащих аминокислот в белке и от концентрации белка в растворе.

Ход работы. В 3 пробирки наливают: в первую — 5 капель 1% раствора яичного белка, во вторую — 5 капель 1% раствора пшеничного (или соевого) белка, в третью — 5 капель 1% раствора желатина. В каждую пробирку добавляют по 5 капель 30% раствора едкого натра и по 1 капле 5% раствора уксуснокислого свинца. При длительном нагревании жидкость в первых двух пробирках бурет и выпадает черный осадок сернистого свинца, в пробирке с раствором желатина осадка и окрашивания не образуется (желатин почти не содержит серусодержащих аминокислот).

¹ В реакции вместо фруктозы можно употреблять сахарозу, состоящую из фруктозы и глюкозы.

Нитропруссидная реакция на серусодержащие аминокислоты

Если раствор белка прокипятить со щелочью и после охлаждения добавить свежеприготовленный раствор нитропруссид натрия, жидкость окрашивается в красный цвет.

Реакция обусловлена присутствием в белке серусодержащих аминокислот, которые при кипячении со щелочью разрушаются с образованием сернистого натрия. Нитропруссид натрия при взаимодействии с сернистым натрием превращается в окрашенное соединение (химизм реакции детально не установлен). Белки, не содержащие цистина, цистеина и метионина или содержащие их в небольшом количестве, нитропруссидной реакции не дают.

Ход работы. В 3 пробирки наливают: в первую — 5 капель 1% раствора яичного белка, во вторую — 5 капель 1% раствора пшеничного (или соевого) белка, в третью — 5 капель 1% раствора желатина. В каждую пробирку добавляют по 5 капель 10—30% раствора щелочи и кипятят несколько минут. После охлаждения добавляют по 1—3 капли 5% раствора нитропруссид натрия. В пробе с яичным и пшеничным белком получается красное окрашивание, исчезающее при стоянии. В пробе с раствором желатина жидкость окрашивается в желтый цвет (цвет реактива в воде).

Работа № 11

Хроматографический метод определения аминокислот

Метод распределительной хроматографии на бумаге является одной из модификаций хроматографического метода, предложенного русским ученым М. С. Цветом в 1903 г.

С помощью распределительной хроматографии легко осуществляется разделение аминокислот и определение их в смеси. Метод заключается в том, что каплю смеси аминокислот, например гидролизата белка, наносят на полоску фильтровальной бумаги, конец которой опускают в подходящий органический растворитель. Растворитель насасывается полоской фильтровальной бумаги и увлекает за собой нанесенные на бумагу аминокислоты. Скорость перемещения аминокислот на бумаге зависит от химического строения аминокислот и от их способности растворяться в подвижном и неподвижном растворителе. В качестве подвижного растворителя употребляют, например, водонасыщенный фенол (или н. бутиловый спирт, амиловый спирт и др.). Неподвиж-

ным растворителем является вода, пары которой, имеющиеся в воздухе, насыщают фильтровальную бумагу. Внешне бумага остается сухой. Чем меньше растворимость аминокислот в воде и чем больше их растворимость в феноле, тем быстрее они движутся вслед за фронтом органического растворителя.

Положение аминокислот на бумаге можно обнаружить при помощи цветной реакции с нингидрином. Реакцию производят путем опрыскивания из пульверизатора высушенной полоски бумаги 0,1—0,2% спиртовым раствором нингидрина и последующим нагреванием ее в сушильном шкафу. Отдельные аминокислоты обнаруживаются в виде пятен, окрашенных в голубой, фиолетовый или оранжевый цвет (в зависимости от химической структуры аминокислоты). Скорость перемещения отдельных аминокислот может быть выражена посредством коэффициента распределения (R_F).

Коэффициентом распределения называется отношение расстояния (в миллиметрах) от места нанесения аминокислоты до середины ее пятна (a) к расстоянию (в миллиметрах) от места нанесения аминокислоты до фронта растворителя (b) (рис. 1).

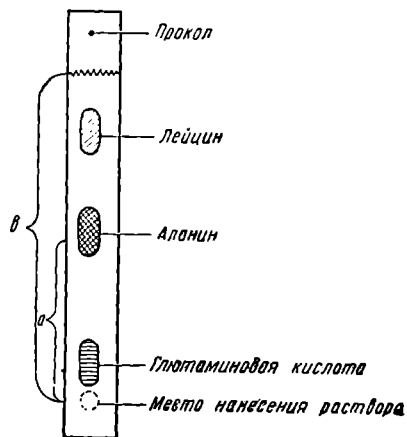


Рис. 1. Хроматограмма аминокислот.

$$R_F = \frac{a}{b}.$$

Коэффициент распределения является характерной величиной для каждой аминокислоты и постоянен при данных условиях опыта (растворитель, температура, сорт бумаги и др.).

Ход работы. Вырезают полоску фильтровальной бумаги¹ длиной 12—15 см, шириной 1,5 см. Через верхний конец полоски протягивают нитку длиной 15—20 см и завязывают ее узелком. На нижнем конце полоски на расстоянии 1 см

¹ Фильтровальная бумага для хроматографирования должна быть ровной, достаточно плотной и чистой. Если бумага хорошая, то после обработки нингидрином пятна аминокислот получаются круглыми или слегка овальными. На непригодной бумаге аминокислоты проявляются в виде сильно вытянутых пятен.

от края наносят карандашом кружок диаметром 3—4 мм. В середину кружка при помощи капилляра наносят маленькую каплю исследуемого раствора смеси аминокислот (на-

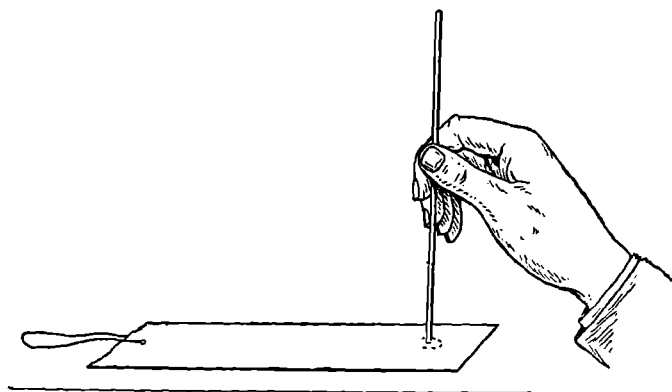


Рис. 2. Нанесение раствора аминокислот на хроматограмму.

пример, смесь глутаминовой кислоты, аланина и лейцина (рис. 2). Место, где была нанесена капля раствора, слегка подсушивают на воздухе.

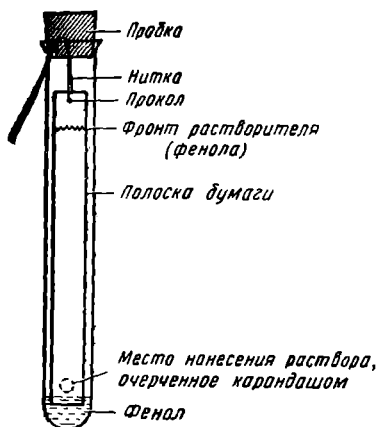


Рис. 3. Упрощенный прибор для распределительной хроматографии.

чении указанного времени полосу вынимают из пробирки (за нитку) и подвешивают в вертикальном положении на 10—15 минут в сушильном шкафу, нагретом до 50—100°

После испарения фенола (т. е. через 10—15 минут) бумажную полосу вынимают из сушильного шкафа, подве-

На дно пробирки длиной 18—20 см, диаметром 2—2,5 см осторожно, не смачивая стенок, наливают из пипетки 15—20 капель фенола, насыщенного водой. Приготовленную бумажную полосу, придерживая за нитку, опускают в пробирку с водонасыщенным фенолом так, чтобы она погрузилась в жидкость на 2—3 мм (рис. 3) и висела вертикально (не касаясь стенок). Пробирку закрывают пробкой, ставят в штатив и помещают в термостат при температуре 35—40° на 1½—2 часа. За это время фронт растворителя поднимается на 10—12 см. По исте-

шивают на штатив, опрыскивают из пульверизатора (рис. 4) 0,1—0,2% раствором нингидрина и вновь помещают в сушильный шкаф при температуре 100—110° на 5—6 минут. В результате нагревания в местах, где присутствуют аминокислоты, появляются синие или фиолетовые пятна.

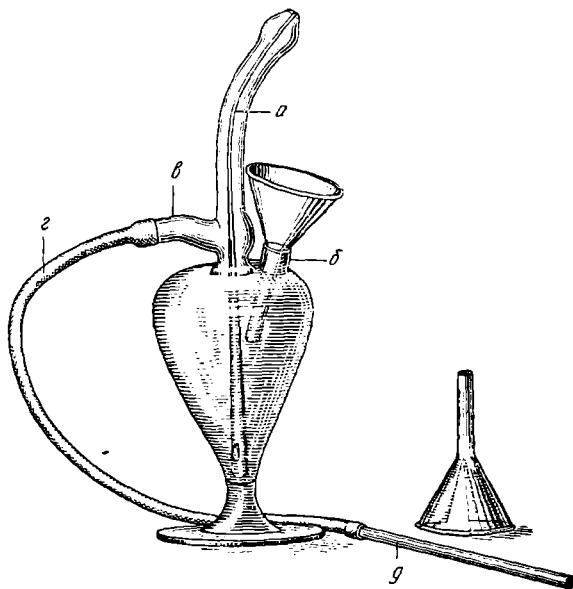


Рис. 4. Пульверизатор стеклянный.

a — капиллярная трубка с расширением внизу; *b* — отверстие для наливания и выливания жидкости (при работе пульверизатора закрывается пальцем); *z* — трубка для вдувания воздуха в пульверизатор; *z* — каучуковая трубка; *d* — стеклянный наконечник.

Бумажную полоску кладут на стеклянную пластинку (20×10 см) и при помощи линейки измеряют расстояния (см. рис. 1): 1) от места нанесения капли раствора до середины каждого пятна (*a*); 2) от места нанесения капли раствора до фронта растворителя (*z*). Вычисляют коэффициент распределения для глютаминовой кислоты (первое пятно), аланина (второе пятно) и лейцина (третье пятно)¹;

Контрольные вопросы

1. Что такое белок?
2. Как связаны между собой аминокислоты в молекуле белка?
3. Напишите, по какому принципу классифицируются аминокислоты.

¹ Расположение пятен отдельных аминокислот на общей хроматограмме устанавливают по контрольным хроматограммам, полученным для каждой аминокислоты в отдельности.

4. Напишите формулу полипептида, состоящего из аланина, аргинина, триптофана и цистеина, и назовите его.

5. Напишите формулу дикетопиперазина, состоящего из лизина и аланина, и свяжите его амидиновой связью с полипептидной цепочкой, состоящей из метионина и гликокола.

6. Чем обусловлены цветные реакции на белки?

2. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВЫХ ВЕЩЕСТВ

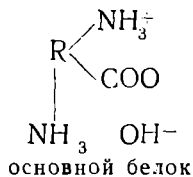
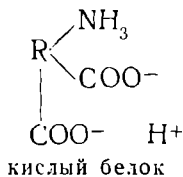
Белки встречаются в организме человека и животных в различных физических состояниях. В крови, молоке и других биологических жидкостях белок находится в растворенном состоянии; в клеточных элементах органов и тканей — в полужидком и, наконец, в опорных и покровных тканях (кости, копыта, рога, волосы) — в полутвердом или твердом состоянии.

Молекулярный вес различных белков широко варьирует в пределах от 17 000 до нескольких миллионов.

Белки при растворении в воде образуют коллоидные растворы. Величина коллоидных частиц белка варьирует в пределах от 0,1 до 0,001 мк (1 мк = 0,001 мм). Частицы белка неспособны проникать через полупроницаемые перепонки (например, животные или растительные), т. е. не диализируются. Это дает возможность использовать метод диализа для отделения белка от посторонних низкомолекулярных примесей.

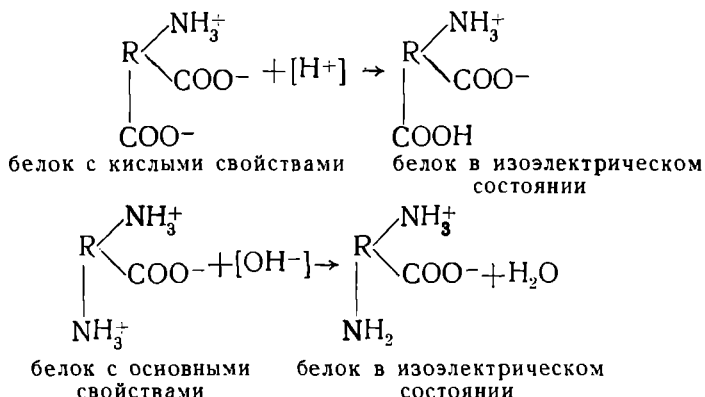
Белковые растворы обычно опалесцируют, т. е. в проходящем свете они кажутся прозрачными, часто желтоватыми, а в отраженном свете — мутными, часто голубоватыми.

В водных растворах белки обладают свойствами слабых кислот или слабых оснований в зависимости от преобладания в молекуле белка дикарбоновых (глутаминовая, аспарагиновая) или диаминокислот (лизин, аргинин). Белки кислого характера (альбумины, глобулины) в водном растворе несут отрицательный заряд; белки основного характера (протамины, гистоны) — положительный.



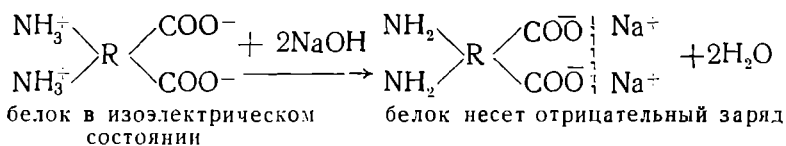
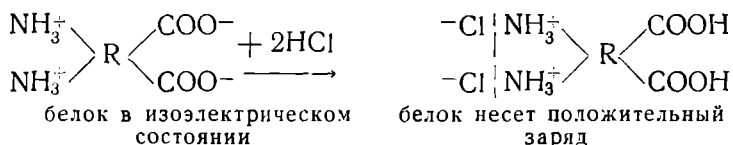
Наличие заряда на частице белка стабилизирует его в растворе. Изменяя концентрацию ионов водорода в среде (добавлением кислоты или щелочи), можно уменьшить диссоциацию белковых частиц и превратить их в электро-

нейтральные амфионы, т. е. достичь изоэлектрического состояния белка:



Концентрация ионов водорода, при которой белок находится в изоэлектрическом состоянии, называется изоэлектрической точкой белка и выражается водородным показателем (рН). Изоэлектрическая точка характеризует химическую природу каждого белка. При рН, близком к изоэлектрической точке, растворимость, набухание и вязкость белка становятся минимальными, и наоборот, осаждаемость, агглютинация и комплексообразование — максимальными.

При добавлении избытка кислоты белок приобретает положительный заряд, при избытке щелочи — отрицательный.



Белки под влиянием нагревания или воздействия органических растворителей, кислот или щелочей претерпевают глубокие изменения, называемые денатурацией, в результате которых теряется способность белка растворяться в обычных для них растворителях (вода, солевые растворы и др.). Иначе говоря, белки при денатурации теряют свои гидрофильные свойства и приобретают гидрофобные. Такой вид денатурации называется необратимой денатурацией в отли-

ние от обратимой, при которой изменения в молекуле белка бывают неглубокими и белок при определенных условиях может вновь приобретать свои нативные (т. е. натуральные) свойства.

Работа № 12

Растворимость белка

При разведении водой яичного белка, сыворотки крови, мышечной плазмы и других биологических жидкостей, содержащих альбумины и глобулины, первые переходят в раствор, а вторые выпадают в осадок. Если в воде присутствуют в небольших концентрациях соли щелочных металлов (NaCl , KCl , NH_4Cl , Na_2SO_4 и др.), то в раствор переходят обе белковые фракции: альбумины и глобулины.

Для извлечения растительных белков пользуются различными растворителями в зависимости от характера белковых фракций в исследуемом материале. Белки пшеничной, ржаной и ячменной муки хорошо растворяются в 0,2% растворе NaOH и лучше в водно-спиртовом растворе едкого натра (0,2% NaOH в 50—60% этиловом спирте). В раствор переходят альбумин, глобулин, проламин и глютелин. Результаты работы фиксируют в форме таблицы. Растворимость обозначают знаком (+), нерастворимость — знаком (—).

Растворимость белка

Название белка	H_2O	5% NaCl	0,2% NaOH

Выводы

Ход работы. 1. К 2 каплям яичного белка добавляют 20 капель воды, перемешивают и оставляют на 3—5 минут. Яичный альбумин растворяется, яичный глобулин выпадает в виде небольшого осадка. Раствор фильтруют через складчатый фильтр, предварительно смоченный водой. Фильтрат используют для реакций осаждения.

2. К 2 каплям яичного белка добавляют 20 капель 5% раствора хлористого натрия, получают солевой раствор яичного белка, содержащий альбумин и глобулин. Солевой раствор белка используют для диализа.

3. 200 мг пшеничной муки (или соевой) растирают в фарфоровой ступке с 5 мл 0,2% раствора NaOH (0,1 н. раствор, разведенный водой 1 л). В раствор переходит альбумин, глобулин и глютелин. Содержимое ступки переносят в пробирку и после отстаивания верхний мутноватый слой употребляют для цветных реакций, реакций осаждения и для диализа.

Диализ

Диализом называется особый вид разделения веществ с помощью мембран, неспособных пропускать сквозь свои поры высокомолекулярные коллоидные частицы.

Диализ является удобным методом очистки коллоидных растворов от низкомолекулярных веществ. При диализе коллоидный раствор помещают в коллодиевый или целлофановый мешочек и погружают в дистиллированную или водопроводную воду. Молекулы солей, сахара и других низкомолекулярных веществ легко диффундируют через мембраны, а вещества коллоидной природы остаются в мешочке. По мере удаления соли из коллодиевого мешочка глобулины теряют способность растворяться и выпадают в осадок, альбумины же остаются в растворе.

Ход работы. 1. Приготовление коллодиевого мешочка. В чистую сухую пробирку (диаметром 2,5—3 см, длиной 4—5 см) наливают доверху коллодий и затем выливают его обратно в склянку. То количество коллодия, которое осталось на стенках, достаточно для приготовления коллодиевого мешочка. Пробирку прокатывают между ладонями, меняя ее положение так, чтобы слой коллодия не стекал на дно, а равномерно распределялся по стенкам и дну пробирки. В руках пробирка согревается, эфир и спирт испаряются и коллодий высыхает. Через 5—10 минут в эту пробирку наливают воду. Когда коллодиевый мешочек отслоится от стенки пробирки, пинцетом осторожно отделяют его от края пробирки и зынимают. Для проверки целостности в коллодиевый мешочек наливают дистиллированную воду.

2. Диализирование солевого раствора белка. В коллодиевый мешочек (диализатор) наливают на $\frac{1}{3}$ объема солевой раствор яичного белка (получение см. стр. 24). Мешочек у верхнего края зажимают между двумя стеклянными палочками, скрепленными резиновыми колечками (как указано на рис. 5), и погружают в стакан с дистиллированной водой на 1—2 часа¹.

Через 1—2 часа с небольшими порциями диализата (наружная жидкость) и диализуемой жидкостью (содержимое мешочка) проделывают реакции на хлориды и на белок и убеждаются в том, что минеральные соли проди-

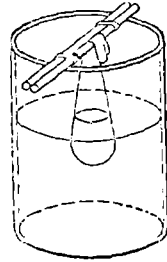


Рис. 5.
Простейший диализатор.

¹ Резиновые колечки нарезают из каучуковой трубки или используют продажные, применяемые в аптечной упаковке.

фундировали во внешний сосуд, а белок остался в мешочке.

3. Проба на хлориды в диализате. К 10 каплям диализата прибавляют 1 каплю 10% раствора азотной кислоты и 1 каплю 1% раствора азотнокислого серебра. Выпадает осадок хлористого серебра.

4. Проба на белок в диализате (биуретовая). К 10 каплям диализата прибавляют 5 капель 10% раствора едкого натра и 1 каплю 1% раствора медного купороса. Получается синее окрашивание, свидетельствующее об отсутствии белка в диализате.

5. Проба на белок в диализируемой жидкости (биуретовая). К 10 каплям содержимого коллодиевого мешочка (диализируемая жидкость) прибавляют 5 капель 10% раствора едкого натра и 1 каплю 1% раствора медного купороса. Получается красно-фиолетовое окрашивание, свидетельствующее о наличии белка в диализируемой жидкости.

Работа № 14

Определение изоэлектрической точки белка

При смешивании раствора белка с буферной смесью, рН которой соответствует изоэлектрической точке белка, частицы белка теряют свой заряд, становятся электронейтральными и, следовательно, неустойчивыми в растворе. Добавление водоотнимающих средств, например спирта, ацетона, вызывает дегидратацию белковых частиц и способствует выпадению белка в осадок.

Некоторые белки, как, например, казеин, осаждаются в изоэлектрической точке без добавления водоотнимающих веществ.

Ход работы. 1. Определение изоэлектрической точки яичного альбумина или желатина. В 6 пробирок наливают 0,2 М раствор двузамещенного фосфорнокислого натрия и 0,1 М раствор лимонной кислоты или 0,2 М раствор уксуснокислого натрия и 0,2 М раствор уксусной кислоты в количествах, указанных в таблицах (см. ниже). В каждую пробирку к 1 мл заготовленной буферной смеси приливают по 0,5 мл 1% раствора желатина или яичного альбумина и по 2 мл этилового спирта. Содержимое пробирок перемешивают и оставляют на 5 минут¹. Через 5 минут отмечают, в какой пробирке и при каком рН произошло наибольшее помутнение раствора. Отсутствие мутноты отмечают знаком (—), наличие и степень мутности —

¹ Вместо спирта можно употреблять 0,1% раствор таннина в количестве 1 мл.

Одним или двумя знаками (+). Работу фиксируют в одной из таблиц в зависимости от применяемого буфера.

Определение изоэлектрической точки желатина

№ пробирки	Количество 0,2 М раствора Na_2HPO_4 (в мл)	Количество 0,1 М раствора лимонной кислоты (в мл)	pH смеси	Добавлено 1% раствора желатина или яичного альбумина (в мл)	Добавлено спирта этилового (в мл)	Степень мутности
1	0,25	0,75	3,2	0,5	2	
2	0,34	0,66	3,7	0,5	2	
3	0,41	0,59	4,2	0,5	2	
4	0,48	0,52	4,7	0,5	2	
5	0,54	0,46	5,2	0,5	2	
6	0,66	0,34	5,7	0,5	2	

Выводы:

Определение изоэлектрической точки желатина

№ пробирки	Количество 0,2 М раствора CH_3COONa (в мл)	Количество 0,2 М раствора CH_3COOH (в мл)	pH смеси	Добавлено 1% раствора желатина или яичного альбумина (в мл)	Добавлено 0,1% раствора танина (мл)	Степень мутности
1	0,1	0,9	3,8	0,5	1	
2	0,2	0,8	4,15	0,5	1	
3	0,5	0,5	4,75	0,5	1	
4	0,8	0,2	5,35	0,5	1	
5	0,9	0,1	5,70	0,5	1	

Выводы:

2. Определение изоэлектрической точки казеина. В 7 пробирок наливают 0,1 н. раствор уксусной кислоты и дистиллированную воду в количествах, указанных в таблице (см. таблицу). В каждую пробирку прибавляют по 0,2 мл 0,4% раствора казеина в 0,2 М растворе уксуснокислого натрия. При смешивании уксусонатриевого раствора казеина с уксусной кислотой в каждой пробирке устанавливается определенный pH. Во всех пробирках, кроме крайних, появляется муть, постепенно оседающая на

¹ pH буферного раствора вычислен по формуле $\text{pH} = \text{pK} + \lg \frac{\text{соль}}{\text{кислота}}$, где pK — показатель константы диссоциации уксусной кислоты равен 4,75 (находят по справочнику). Например, для определения pH раствора в 4-й пробирке уравнение примет следующий вид:

$$\text{pH} = 4,75 + \lg \frac{0,8}{0,2} = 4,75 + \lg 4 = 4,75 + 0,602 = 5,35.$$

дно. Наибольшее количество осадка наблюдается в той пробирке, рН которой соответствует изоэлектрической точке казеина.

Определение изоэлектрической точки казеина

№ пробирки	Количество 0,2 М раствора CH_3COOH (в мл)	Количество воды (в мл)	Количество 0,4% раствора казеина в 0,2 М растворе CH_3COONa (в мл)	рН смеси	Степень мутности
1	1,6	0,4	0,2	3,8	
2	0,8	1,2	0,2	4,1	
3	0,4	1,6	0,2	4,4	
4	0,2	1,8	0,2	4,7	
5	0,1	1,9	0,2	5,0	
6	0,06	1,94	0,2	5,3	
7	0,03	1,97	0,2	5,6	

Выводы:

Работа № 15

Разделение белковых фракций методом высаливания

Высаливанием называется реакция осаждения белков из их растворов большими концентрациями солей щелочных металлов NaCl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и др. Реакция высаливания обусловлена дегидратацией коллоидных частиц белка с одновременной нейтрализацией заряда. При высаливании белок обычно почти не теряет присущих ему физико-химических и биологических свойств. Он вновь растворяется в воде и проявляет почти с той же активностью ферментативные, антигенные, иммунные и другие биологические свойства, т. е. остается почти нативным (натуральным). Осаждение белка методом высаливания применяют для разделения белковых фракций при получении очищенных ферментных и гормональных препаратов, а также для получения белков в кристаллическом состоянии.

Более высокомолекулярные глобулины легче высаливаются, чем альбумины. Глобулины выпадают из раствора при полунасыщении серноокислым аммонием, т. е. при прибавлении к раствору белка равного объема насыщенного раствора соли.

Альбумины выпадают из растворов при добавлении кристаллического серноокислого аммония до полного насыщения, т. е. до прекращения растворения соли.

При разделении белковых фракций методом высаливания с помощью других солей, например NaCl , NH_4Cl , Na_2SO_4

или $MgSO_4$, для выделения глобулинов требуется полное насыщение солью, а для выделения альбумина, помимо насыщения, необходимо подкисление раствора уксусной кислотой. Высаливание белка является процессом обратимым. При уменьшении концентрации соли (что достигается путем разведения водой или с помощью диализа) белок снова переходит в раствор.

Ход работы. К 10 каплям солевого раствора яичного белка приливают равный объем насыщенного раствора сернокислого аммония (полунасыщение). Выпадает осадок яичного глобулина¹. Через 5 минут осадок отфильтровывают и к фильтрату добавляют мелкоистолченный порошок сернокислого аммония до прекращения растворения соли, т. е. до полного насыщения. Образуется осадок яичного альбумина, который всплывает наверх вследствие высокого удельного веса жидкости. Результаты работы фиксируют в таблице.

Осаждение белков высаливанием

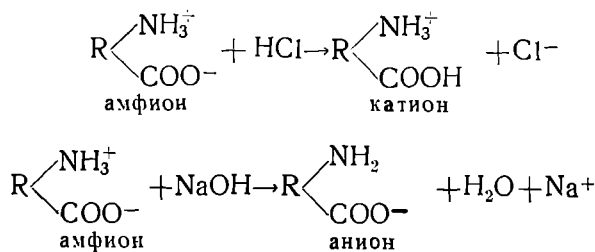
Наименование белка	Употребляемые соли	Степень насыщения	Реакция среды

Выводы:

Работа № 16

Осаждение белка при кипячении

При кипячении нейтральных или слабокислых растворов белка последний денатурируется и выпадает в осадок. Осаждение бывает полнее в присутствии электролитов. В сильно кислых и щелочных растворах белок не выпадает в осадок при кипячении, так как положительные и отрицательные заряды на частицах денатурированного белка удерживают его в растворе.



¹ Содержание глобулина в яичном белке значительно меньше, чем альбумина.

Ход работы. В 5 пробирок наливают по 10 капель 1% раствора яичного (или пшеничного) белка. В первой пробирке раствор белка нагревают до кипения. Жидкость мутнеет (частицы денатурированного белка несут заряд и удерживаются во взвешенном состоянии). Во второй пробирке раствор белка нагревают до кипения и прибавляют 1 каплю 1% раствора уксусной кислоты. При стоянии выпадает осадок белка (частицы белка теряют заряд и приближаются к изоэлектрическому состоянию). В третью пробирку добавляют 1 каплю 10% раствора уксусной кислоты. При кипячении жидкости осадка не образуется (в кислой среде частицы белка приобретают положительный заряд, т. е. перезаряжаются). В четвертую пробирку добавляют 1 каплю 10% раствора уксусной кислоты и 1 каплю насыщенного раствора хлористого натрия. При кипячении выпадает осадок белка (ионы Na^+ и Cl^- образуют двойной электрический слой и нейтрализуют положительный заряд на частице белка). В пятую пробирку добавляют 1 каплю 10% раствора едкого натра. При кипячении жидкости свертывания белка не происходит (в щелочной среде отрицательный заряд на частицах белка увеличивается).

Результаты работы фиксируют в таблице.

Осаждение белка при кипячении

Нейтральная среда	Слабокислая среда (1% CH_3COOH)	Кислая среда (10% CH_3COOH)	Кислая среда + электролит (10% $\text{CH}_3\text{COOH} + \text{NaCl}$)	Щелочная среда (10% NaOH)

Выводы:

Работа № 17

Осаждение белка органическими растворителями

При добавлении к раствору белка больших количеств спирта или ацетона выпадает осадок белка в виде мути или хлопьев.

Реакция обусловлена обезвоживанием коллоидных частиц белка. Осаждение наступает только из нейтральных или слабокислых растворов и лучше в присутствии электролитов, например хлористого натрия. Кратковременное воздействие органических растворителей при низкой температуре от 0 до -15° сохраняет белок в нативном состоянии, длительное воздействие приводит к денатурации белка.

Ход работы. К 5 каплям 1% раствора яичного, пшеничного или соевого белка прибавляют 20—25 капель 96° эти-

лового спирта или ацетона. Раствор мутнеет. Добавляют 1 каплю насыщенного раствора хлористого натрия. При стоянии выпадает осадок белка. Результаты работы по осаждению белка различными реактивами фиксируют в следующей таблице.

Реакции осаждения белка

№ п.п	Название группы веществ, осаждающих белки	Употребляемые реактивы	Характер и цвет осадка	Чем обусловлена реакция и ее особенности
1	Органические растворители			
2	Концентрированные минеральные кислоты			
3	Органические кислоты			
4	Алкалоидные реактивы			
5	Соли тяжелых металлов			

Выводы:

Работа № 18

Осаждение белка концентрированными минеральными кислотами

Белок при взаимодействии с концентрированными минеральными кислотами денатурируется и выпадает в осадок вследствие дегидратации и нейтрализации зарядов коллоидных частиц. При длительном воздействии серная и соляная кислоты производят частичный гидролиз белка и осадок постепенно растворяется. В азотной кислоте растворение осадка белка происходит значительно медленнее. Реакция осаждения белка концентрированной азотной кислотой получила широкое применение в лабораторной практике для открытия белка в биологических жидкостях (проба Геллера).

Ход работы. В пробирку наливают 5 капель концентрированной азотной кислоты и, наклонив ее под углом 45°, осторожно, по стенке пробирки, спускают из пипетки равный объем 1% раствора какого-либо белка. На границе двух слоев жидкости образуется осадок белка в виде тонкой пленки.

То же можно проделать, взяв вместо азотной кислоты концентрированную серную или соляную кислоту.

**Количественное определение белка
по Робертсу-Стольникову**

Метод относится к числу пороговых и основан на наблюдении, что растворы, содержащие 0,0033% белка, при насливании на концентрированную азотную кислоту в конце второй минуты образуют на поверхности раздела жидкостей едва заметную белковую пленочку. При меньших концентрациях белка в растворах осаждения белка не происходит. Пользуясь различными разведениями исследуемой жидкости, устанавливают максимальное разведение, при котором белок может быть обнаружен при насливании на концентрированную азотную кислоту. Зная степень разведения, при которой концентрация белка равна 0,0033%, вычисляют концентрацию белка в неразведенной жидкости.

Ход работы. В пробирку наливают 10 капель концентрированной азотной кислоты и, слегка наклонив ее, по стенке из пипетки спускают равный объем исследуемой жидкости или профильтрованной мочи. На границе двух жидкостей при наличии белка получается белая пленка или осадок в виде кольца. Толщина слоя белка и быстрота появления осадка зависят от количества белка. Если осадок появился сразу, делают разведение исследуемой жидкости в 5, 10 и более раз. Для этого в 5 пробирок наливают дистиллированную воду: в первую — 4 мл, во вторую — 1 мл, в третью — 2 мл, в четвертую — 3 мл и в пятую — 4 мл. В первую пробирку добавляют 1 мл исследуемой жидкости, содержимое пробирки перемешивают и разведенную в 5 раз жидкость переносят по 1 мл во все остальные пробирки, начиная со второй. Получают разведение исследуемой жидкости в 5, 10, 15, 20 и 25 раз. С каждой порцией разведенного раствора белка проделывают реакцию насливания на азотную кислоту и определяют, при каком разведении появляется едва заметная пленочка белка между второй и третьей минутой. Умножая величину 0,0033% на разведение раствора белка, получают процентное содержание белка. *Пример.* Едва заметная пленочка появилась при реакции исследуемой жидкости, разведенной в 15 раз. Следовательно, содержание белка равно $0,0033 \times 15 = 0,0495\%$, или округленно 0,05%.

Работа № 20

**Осаждение белка
некоторыми органическими кислотами**

При добавлении к раствору белка трихлоруксусной или сульфосалициловой кислоты белок выпадает в осадок. Реакции осаждения белка органическими кислотами получи-

ли широкое практическое применение. Так, трихлоруксусная кислота применяется в микрохимических количественных анализах для получения безбелковых фильтратов; сульфосалициловая кислота широко используется в клинических лабораториях для обнаружения белка в моче, экссудатах и других биологических жидкостях (чувствительность реакции 0,0015%).

✓ Следует иметь в виду, что трихлоруксусная кислота осаждает только белки и не осаждает высокомолекулярные продукты распада белка — пептоны. Сульфосалициловая кислота осаждает не только белки, но и высокомолекулярные пептоны и полипептиды.

Ход работы. К 5 каплям 1% раствора белка добавляют 1—2 капли 10% раствора сульфосалициловой кислоты. Выпадает осадок белка. То же проделывают с 10% раствором трихлоруксусной кислоты.

Работа № 21

Осаждение белка алкалоидными реактивами

При добавлении к раствору белка растворов так называемых алкалоидных реактивов (пикриновой кислоты, танина, железосинеродистой кислоты и некоторых других веществ¹) белок выпадает в осадок. Реакция обусловлена наличием в белке азотистых гетероциклических группировок, аналогичных тем, которые находятся в молекулах алкалоидов (пирольные, индольные, имидазольные и др.). Слабое подкисление раствора уксусной кислотой способствует появлению положительного заряда на частице белка² и облегчает взаимодействие белка с отрицательно заряженными ионами осадителя. Сильные минеральные кислоты, применяемые при гидролизе белка, подавляют диссоциацию органических кислот и препятствуют осаждению белка алкалоидными реактивами.

Ход работы. В 3 пробирки наливают по 5 капель 1% раствора яичного (пшеничного или соевого) белка. В первую прибавляют 2—3 капли 10% раствора пикриновой кислоты и 1—2 капли 1% уксусной кислоты. Выпадает осадок белка, окрашенный в желтый цвет. Во вторую пробирку прибавляют 1—2 капли насыщенного раствора танина и 1—2 кап-

¹ К алкалоидным реактивам относятся: танин, фосфорновольфрамовая и фосфорномолибденовая кислоты, растворы йодной ртути в йодистом калии, раствор йодистого висмута в йодистом калии, железистосинеродистая кислота и др.

² Белки, обладающие основным характером, т. е. несущие положительный заряд, как, например, протамины и гистоны, хорошо осаждаются алкалоидными реактивами в нейтральной среде без подкисления.

ли 1% уксусной кислоты. Выпадает осадок белка, окрашенный в серый цвет. В третью пробирку приливают 1 каплю 10% уксусной кислоты и 2—3 капли 5% раствора железисто-синеродистого калия. Выпадает осадок белка.

Работа № 22

Осаждение белка солями тяжелых металлов

Белки при взаимодействии с солями тяжелых металлов (Cu, Fe, Pb, Zn, Ag и др.) образуют нерастворимые в воде комплексные соединения¹. При добавлении избытка соли осадок белка растворяется. Это явление носит название адсорбционной пептизации и обусловлено адсорбцией ионов тяжелого металла на поверхности коллоидных частиц и появлением положительного заряда на частицах белка.

Ход работы. 1. К 5 каплям 1% раствора яичного (пшеничного или соевого) белка прибавляют 1 каплю 5% раствора хлорного железа, или 5% раствора уксуснокислого свинца, или 7% раствора серноокислой меди. Выпадает осадок белка. К другой такой же порции раствора белка прибавляют вначале 1 каплю раствора соли тяжелого металла, а затем — еще 5—10 капель и наблюдают за растворением осадка (пептизация).

2. К 5 каплям 1% раствора белка прибавляют 1 каплю 5% раствора азотнокислого серебра. Выпадает осадок белка, который не растворяется в избытке реактива (отличие от других солей тяжелых металлов). При очень малых концентрациях белка осаждение солями тяжелых металлов может не произойти, так как ионы металла могут оказаться в избытке и произвести пептизацию.

Контрольные вопросы

1. В каких пределах варьирует молекулярный вес белков?
2. Напишите формулу полипептида, в состав которого входят аспарагиновая и глютаминовая кислоты, цистеин и тирозин. Напишите его название. Подчеркните пунктиром свободные аминные, карбоксильные, фенольные и сульфгидрильные группы и укажите, какой преобладающий заряд несет молекула этого полипептида в водном растворе.
3. От чего зависит заряд белка в водном растворе? Назовите белки основного и кислого характера.
4. Что такое изоэлектрическая точка белка?
5. Чем обусловлены реакции осаждения белка?
6. Что такое денатурация белка?
7. Что такое диализ и для каких целей его применяют?

¹ Способность белка прочно связывать ионы тяжелого металла послужила основанием для применения яиц и молока в качестве противоядия при отравлениях солями ртути, меди, свинца и др. Вслед за дачей белка производят промывание желудка и таким путем предотвращают возможность всасывания ядовитых продуктов.

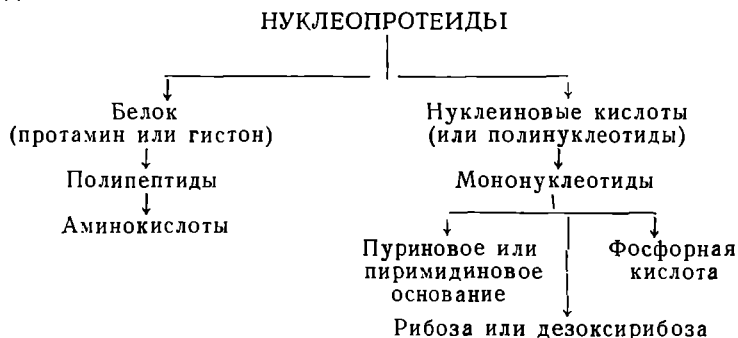
3. СЛОЖНЫЕ БЕЛКИ

Сложными белками называются белки, которые, кроме белковой части, содержат небелковый компонент, называемый протетической группой¹. В зависимости от химической природы протетической группы сложные белки делятся на нуклеопротеиды, хромопротеиды, фосфопротеиды, гликопротеиды и липопротеиды.

НУКЛЕОПРОТЕИДЫ

Нуклеопротеиды встречаются главным образом в ядрах клеток и в небольшом количестве в цитоплазме². Наиболее богаты нуклеопротеидами органы, содержащие много ядерной субстанции, как, например, зубная железа, панкреатическая железа, селезенка, печень, почки и др. Из растительных объектов особенно богаты нуклеопротеидами дрожжи. Нуклеопротеиды растворяются в разбавленных щелочах и легко осаждаются при подкислении.

При частичном гидролизе нуклеопротеиды распадаются на белок преимущественно основного характера (протамин или гистон) и нуклеиновые кислоты. Схема полного распада нуклеопротеидов может быть представлена в следующем виде:

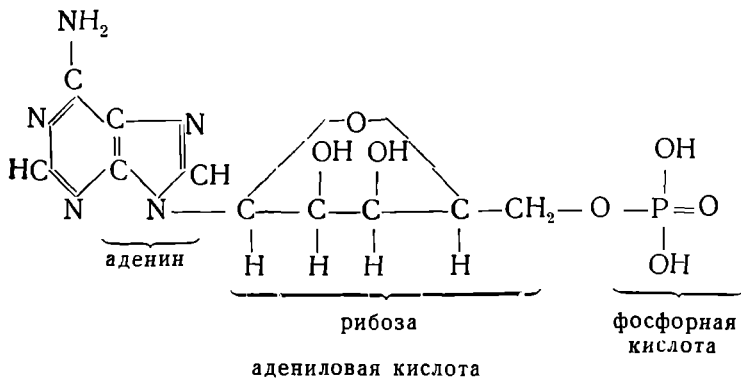


Основной характер протаминов и гистонов обусловлен присутствием в них большого количества диаминокислот: аргинина, гистидина и лизина. Кислотные свойства нуклеиновых кислот зависят от диссоциации имеющихся в них остатков фосфорной кислоты. Нуклеиновые кислоты, называемые также полинуклеотидами, представляют собой высокомолекулярные соединения, построенные из большого количества мононуклеотидов. Мононуклеотиды при гидролизе распадаются на пуриновое или пиримидиновое основание, углевод (рибозу или дезоксирибозу) и фосфорную кислоту.

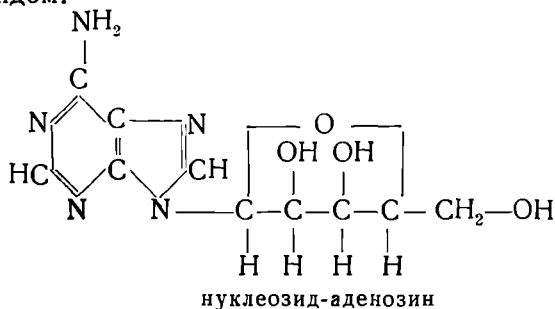
¹ Prostheo (греч.) — присоединяю.

² Nucleus (лат.) — ядро.

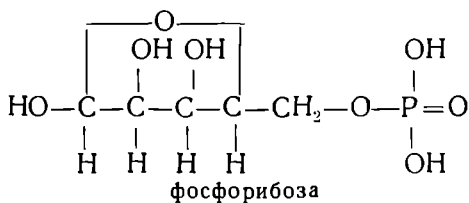
Примером такого мононуклеотида может служить адениловая кислота:



При отщеплении от мононуклеотида фосфорной кислоты образуется двухкомпонентное соединение, называемое нуклеозидом:



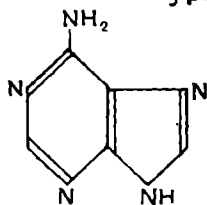
Отщепление пуринового или пиримидинового основания приводит к образованию фосфорибозы или фосфодезоксирибозы:



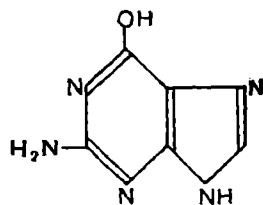
Дезоксирибоза отличается от рибозы отсутствием гидроксильной группы у 2-го углеродного атома.

Мононуклеотиды носят разные названия в зависимости от входящего в их состав пуринового или пиримидинового основания, например адениловая кислота (аденин), гуаниловая (гуанин), цитидиловая (цитозин) и др.

пуриновые основания

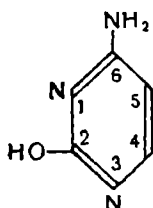


аденин
(6-аминопурин)

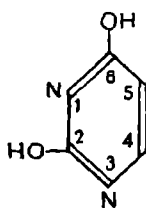


гуанин
(2-амино-6-оксипурин)

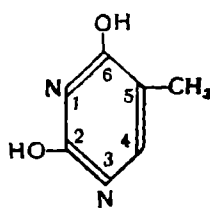
пиримидиновые основания



цитозин
(2-окси, 6-амино-
пиримидин)



урацил
(2,6-диокси-
пиримидин)



тимин
(2,6-диокси,5-метил-
пиримидин)

Нуклеиновые кислоты, полученные из различных тканей, отличаются не только входящими в их состав пуриновыми и пиримидиновыми основаниями и углеводными группировками, но и местом присоединения остатка фосфорной кислоты (у 3-го, 2-го или 5-го углеродного атома).

Результаты практических работ по теме «Сложные белки» следует фиксировать в форме таблицы.

Качественные реакции на сложные белки и продукты их гидролиза

Наименование группы сложных белков	Наименование простетической группы	Химическая структура компонентов простетической группы	Употребляемые реактивы	Продукты реакции	Чем обусловлена реакция

Выводы:

Выделение дезоксирибонуклеопротеида из ткани селезенки или зубной железы и открытие дезоксирибонуклеиновой кислоты

Дезоксирибонуклеопротеиды содержатся преимущественно в ядрах клеток, в то время как рибонуклеопротеиды преобладают в цитоплазме. Дезоксирибонуклеопротеиды хорошо растворяются в щелочных и солевых растворах и выпадают в осадок при нейтрализации щелочных растворов и при разведении водой солевых растворов. При нагревании раствора дезоксирибонуклеопротеида с дифениламиновым реактивом (стр. 305) жидкость постепенно приобретает синее окрашивание. Реакция обусловлена гидролизом дезоксирибонуклеопротеида и освобождением дезоксирибозы, которая и дает с дифениламином синее окрашивание. При взаимодействии с дифениламином рибозы рибонуклеиновой кислоты образуются продукты реакции, окрашенные в зеленый цвет.

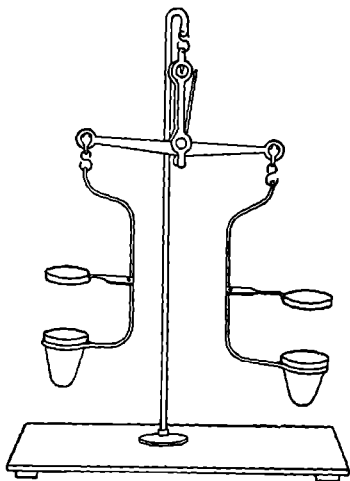


Рис. 6. Центрифужные весы.

Ход работы. 0,5 г ткани селезенки растирают в фарфоровой ступке со 100 мг стеклянного порошка, постепенно подливая небольшими порциями 15 мл 5% раствора хлористого натрия. Растирание продолжают в течение 10—15 минут. Содержимое ступки переносят в центрифужные пробирки, уравновешивают их на центрифужных весах (рис. 6) и центрифугируют 10—15 минут. В стакан емкостью 100—150 мл наливают 80—90 мл дистиллированной воды и медленно, при помешивании деревянной палочкой, вливают в воду полученный центрифугат. Нерастворимый в воде дезоксирибонуклеопротеид выпадает в осадок и наматывается в виде нитей на деревянную палочку. Нити дезоксирибонуклеопротеида осторожно вынимают вместе с палочкой, переносят в чистую пробирку и растворяют в 1—2 мл 0,4% растворе едкого натра. К 5—10 каплям раствора дезоксирибонуклеопротеида добавляют равный объем дифениламинового реактива, перемешивают и ставят в кипящую водяную баню на 5—10 минут. Жидкость постепенно приобретает синее окрашивание.

Гидролиз нуклеопротеидов дрожжей

Для изучения химического состава нуклеопротеидов удобно пользоваться дрожжевыми клетками. При непродолжительном гидролизе дрожжевой массы нуклеопротеиды распадаются на полипептиды, пуриновые и пиримидиновые основания, рибозу и дезоксирибозу и фосфорную кислоту. Продукты гидролиза могут быть обнаружены в гидролизате специфическими для каждого вещества реакциями.

Ход работы. В большой широкой пробирке (15 см \times 1,5 см) 500 мг пекарских дрожжей или 100 мг сухих дрожжей заливают 4 мл 10% раствора серной кислоты. Пробирку закрывают пробкой, в которую вставлена в качестве холодильника стеклянная трубка длиной 25—30 см, и ставят на асбестовую сетку на слабый огонь (рис. 7).

Через 1—1½ часа после начала кипения нагревание жидкости прекращают, дают ей остыть и фильтруют. В фильтрате открывают продукты гидролиза нуклеопротеидов: полипептиды, пуриновые основания, рибозу и фосфорную кислоту.

а) Биуретовая проба на полипептиды. К 5 каплям гидролизата добавляют

10 капель 10% раствора едкого натра и 1 каплю 1% раствора медного купороса. Жидкость окрашивается в розовый цвет.

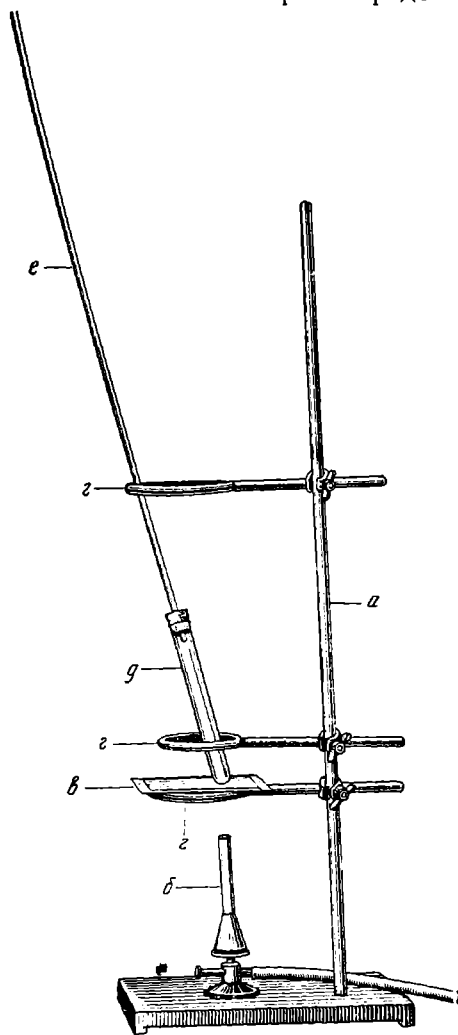


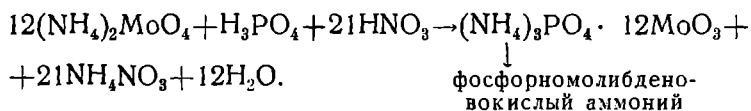
Рис. 7. Приборчик для гидролиза.

a — железный штатив; *б* — газовая горелка; *в* — асбестовая сетка; *г* — железное кольцо; *д* — пробирка для гидролиза; *е* — трубка-холодильник.

б) Серебряная проба на пуриновые основания. 10 капель гидролизата нейтрализуют 1 каплей концентрированного аммиака и добавляют 5 капель 1% раствора азотнокислого серебра. При стоянии через 3—5 минут выпадает небольшой рыхлый осадок серебряных соединений, пуриновых оснований (аденина, гуанина), окрашенный в бурый цвет.

в) Проба Троммера на рибозу и дезоксирибозу. К 5 каплям гидролизата добавляют 10 капель 30% раствора едкого натра и 5—10 капель 7% раствора серноокислой меди до появления не исчезающей мути гидроокиси меди. Жидкость перемешивают и верхний слой ее нагревают до начала кипения. Выпадает красный осадок закиси меди (или желтый осадок гидрата закиси меди) вследствие окисления рибозы и восстановления гидрата окиси меди до закиси (см. стр. 138, работа № 90).

г) Молибденовая проба на фосфорную кислоту. К 10 каплям молибденового реактива (раствор молибденовокислого аммония в азотной кислоте) добавляют 5 капель гидролизата и кипятят несколько минут на голом огне. В присутствии фосфорной кислоты жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет. При охлаждении выпадает желтый кристаллический осадок комплексного соединения фосфорномолибденовокислого аммония.



ХРОМОПРОТЕИДЫ

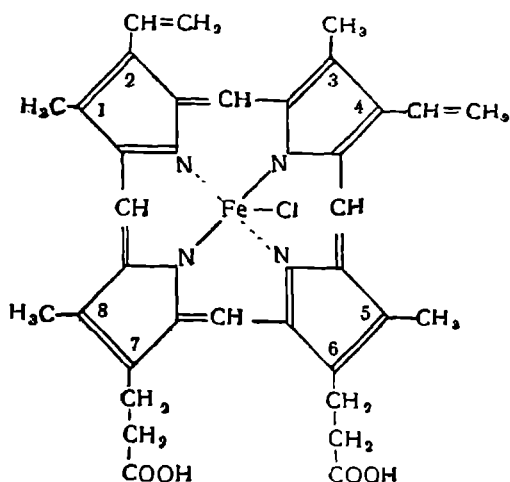
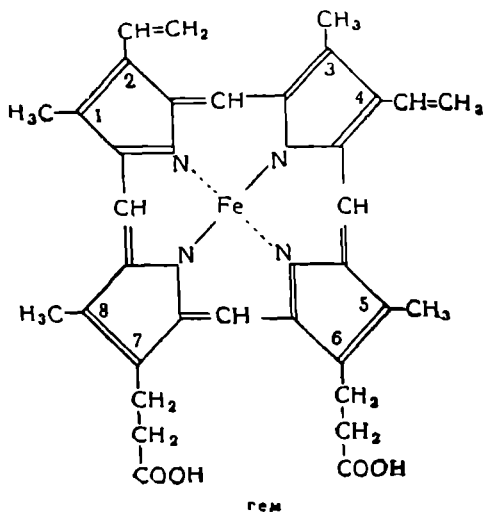
Хромопротеидами называются сложные белки, у которых простетической группой является какое-либо окрашенное соединение небелкового характера, как, например, гем, каротиноиды, флавины и др.¹

Хромопротеиды широко распространены в животном и растительном мире и играют важную роль в окислительно-восстановительных процессах организма. Особенно распространенными являются хромопротеиды геминовой природы; к ним относятся гемоглобин крови, миоглобин или миохром мышечной ткани, некоторые ферменты растительного и животного происхождения, как, например, каталаза, пероксидаза, цитохромы и др.

Гемоглобин состоит из белка глобина и пигментной части — гема. Видовая специфичность гемоглобина человека и различных животных обусловлена особенностями в структуре глобинов. Строение гема одинаково во всех сложных

¹ Chromos — краска.

белках геминовой природы. По химической природе гем представляет собой соединение протопорфирина с двухвалентным железом. Протопорфирином называется такое производное порфина, у которого водороды пиррольных колец в 1-м, 3-м, 5-м и 8-м положениях замещены метильными группами, во 2-м и 4-м — винильными, в 6-м и 7-м — остатками пропионовой кислоты. При окислении гем превращается в гематин или гемин. У гематина третья валентность железа связана с гидроксильной группой, у гемина — с хлором.



Гваяковая и бензидиновая пробы на геминовую группировку гемоглобина

При добавлении к разбавленному раствору крови раствора гваяковой смолы и перекиси водорода жидкость окрашивается в синий или зеленый цвет.

Реакция обусловлена способностью гемоглобина катализировать окисление гваяковой смоляной кислоты перекисью водорода в озонид гваяковой кислоты синего цвета.



Рис. 8. Кристаллы гемина.

Аналогично протекает реакция, если вместо гваяковой смоляной кислоты взять раствор бензидина. Бензидин окисляется перекисью водорода в парахинондимид, и жидкость приобретает синюю окраску. При стоянии окраска жидкости переходит в красную.

Обе реакции очень чувствительные и служат для обнаружения минимальных количеств крови в биологических объектах.

Ход работы. 1. К 5 каплям разбавленного едва окрашенного раствора крови прибавляют 1—2 капли све-

жеприготовленного 1% спиртового раствора гваяковой смолы и 1—2 капли 3% раствора перекиси водорода. Жидкость окрашивается в зеленый или синий цвет.

2. К 5 каплям разбавленной крови добавляют 1—2 капли 0,2% спиртового раствора бензидина¹ и 1—2 капли 3% раствора перекиси водорода. Жидкость окрашивается в синий цвет.

Работа № 26

Получение кристаллов гемина из гемоглобина

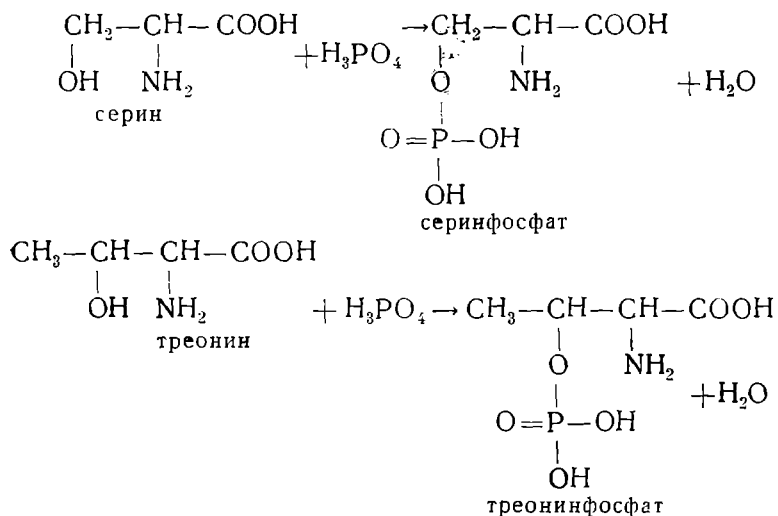
Ход работы. Каплю свежей крови, взятой из пальца или уха кролика, помещают на предметное стекло и дают ей высохнуть на воздухе. К подсушенной крови прибавляют 2—3 капли ледяной уксусной кислоты и стеклянной палочкой тщательно перемешивают сухую кровь с уксусной кислотой. Смесь накрывают покровным стеклом и осторожно

¹ Можно пользоваться 1% раствором бензидина в ледяной уксусной кислоте.

нагревают до появления пузырьков, т. е. до начала кипения. Предметное стекло следует держать высоко над пламенем горелки, чтобы избежать быстрого выкипания жидкости. По охлаждению препарат рассматривают под микроскопом. Кристаллы гемина, образовавшиеся при разрушении гемоглобина, имеют вид мельчайших ромбоидальных табличек, окрашенных в бурый цвет, иногда сложенных в виде звездочек, чаще разбросанных в виде палочек. Если обнаружить кристаллы не удастся, то следует приподнять покровное стекло, добавить 2-3 капли ледяной уксусной кислоты, продолжить нагревание и по охлаждении исследовать под микроскопом (рис. 8).

ФОСФОПРОТЕИДЫ

Фосфопротеидами называются белки, которые содержат большое количество фосфорной кислоты (0,5—0,9%), связанной, как полагают, с молекулами оксиаминокислот по типу сложных эфиров.



Фосфопротеиды нерастворимы в воде, но растворяются в разбавленных щелочах, осаждаются при подкислении или при полунасыщении сернистым аммонием. К фосфопротеидам относится казеин молока, вителлин яичного желтка, ихтулин рыбьей икры и некоторые другие белки.

Работа № 27

Выделение казеина из молока

В молоке казеин содержится в виде растворимой кальциевой соли. При подкислении кальциевая соль разлагается и казеин выпадает в осадок в свободном виде. Избыток

кислоты мешает осаждению, так как при рН ниже изоэлектрической точки (изоэлектрическая точка казеина = 4,7) молекулы белка перезаряжаются и казеин вновь переходит в раствор.

Ход работы. Молоко (2 мл) разбавляют равным объемом дистиллированной воды и осаждают казеин добавлением 2 капель 10% раствора уксусной кислоты. Казеин выделяется в виде хлопьевидного осадка, который отфильтровывают и промывают на фильтре дистиллированной водой (2—3 раза). Небольшие порции осадка снимают с фильтра стеклянной лопаточкой и употребляют для цветных реакций на белки (биуретовая, Миллона, Адамкевича и др.).

Работа № 28

Гидролиз казеина и открытие в гидролизате фосфорной кислоты

Ход работы. 100 мг порошка казеина растворяют в пробирке в 3 мл 10% раствора едкого натрия или калия. Пробирку закрывают пробкой со стеклянной трубкой в качестве холодильника, закрепляют ее на асбестовой сетке металлической лапкой или кольцами и нагревают (см. рис. 7). Через час после начала кипения жидкости гидролиз прекращают, жидкости дают остыть и нейтрализуют ее концентрированной азотной кислотой (12—15 капель) до слабокислой реакции на лакмус. При нейтрализации выпадает осадок высокомолекулярных продуктов неполного гидролиза белка (альбумозы и пептоны). После отстаивания жидкость фильтруют и с фильтратом продельвают молибденовую пробу на фосфорную кислоту (см. стр. 40). Выпадает небольшой кристаллический осадок фосфорномолибденовокислого аммония (лимонно-желтого цвета).

ГЛЮКОПРОТЕИДЫ

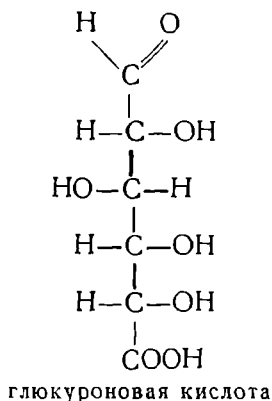
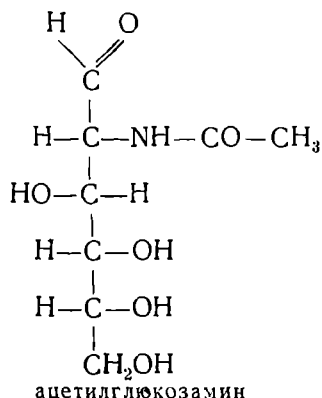
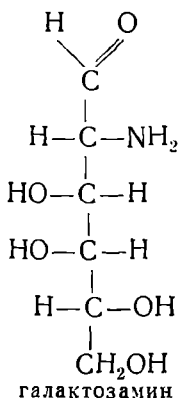
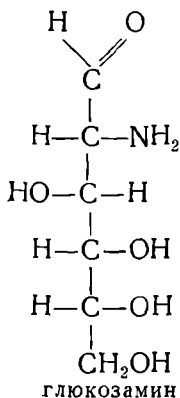
По химической природе глюкопротеиды представляют собой сложные белки, состоящие из белкового компонента и полисахарида. При гидролизе они распадаются на аминокислоты, гексозы, гексозамины и глюкуроновые кислоты.

Глюкопротеиды содержатся почти во всех тканях и жидкостях организма и носят общие названия муцинов и мукоидов. Муцины встречаются в секретах слизистых желез. Мукоиды входят в состав костной (оссеомукоид), хрящевой (хондромукоид), соединительной (тендомукоид) и других тканей.

Глюкопротеиды нерастворимы в воде, хорошо растворяются в щелочах и осаждаются при подкислении. Растворы глюкопротеидов не свертываются при кипячении.

Протетические группы некоторых гликопротеидов известны под названием мукополисахаридов. К мукополисахаридам относится гиалуроновая кислота, хондроитинсерная кислота и гепарин. Гиалуроновая кислота входит в состав соединительной ткани, встречается в роговице глаза и в стекловидном теле. Хондроитинсерная кислота содержится в хрящевой и соединительной ткани; гепарин — в ткани печени. Мукополисахариды могут встречаться в тканях в свободном состоянии.

При гидролизе мукополисахариды распадаются на глюкозамин или галактозамин, ацетилглюкозамин или ацетилгалактозамин, глюкуроновую и серную кислоты.



Работа № 29

Выделение муцина из слюны

Ход работы. В пробирку собирают около 2 мл слюны и по каплям (4—5 капель) прибавляют концентрированную

уксусную кислоту. Выделяется осадок муцина, трудно растворимый в избытке уксусной кислоты. Сгусток вынимают стеклянной палочкой, помещают в чистую пробирку и протравливают с ним реакцию Подобедова.

Работа № 30

Нафтоловая проба на углеводную группировку муцина (реакция Подобедова)

Если к сгустку муцина добавить спиртовой раствор α -нафтола и смесь подслоить концентрированной серной кислотой, то на границе двух слоев жидкости появляется фиолетовое кольцо.

Реакция обусловлена присутствием в муцине углеводной простетической группы. При действии концентрированной серной кислотой из глюкозы образуется оксиметилфурфурол¹; последний, конденсируясь с α -нафтолом, превращается в окрашенное соединение.

Ход работы. К сгустку муцина добавляют 1—2 капли 1% алкогольного раствора α -нафтола, перемешивают и по стенке осторожно спускают равный объем концентрированной серной кислоты. На границе двух слоев жидкости постепенно появляется фиолетово-красное кольцо, хорошо заметное на белом фоне. Если вместо α -нафтола взять 1% раствор тимола, образуется красное кольцо, более отчетливое.

Контрольные вопросы

1. В чем отличие сложных белков от простых?
2. Что такое нуклеопротеиды и из каких компонентов они состоят?
3. В чем отличие отдельных мононуклеотидов? Напишите реакцию гидролиза мононуклеотида (формулами).
4. Что такое нуклеиновая кислота и как она построена? Напишите схему строения нуклеиновой кислоты.
5. Какие белки входят в состав нуклеопротеидов и какова особенность их аминокислотного состава?
6. К какой группе сложных белков относится гемоглобин и из каких компонентов он состоит? Напишите простетическую группу гемоглобина и расскажите, как она построена (кольца, связи, боковые группировки и т. п.).
7. В чем отличие гемоглобина от оксигемоглобина, метгемоглобина, карбгемоглобина и карбоксигемоглобина?
8. Что такое глюкوپротеиды и из каких компонентов они состоят? Назовите, какие секреты и ткани содержат большое количество глюкوپротеидов?
9. К какой группе сложных белков относится казеин молока и как связаны в казеине белковый компонент и простетическая группа?
10. Какие белки относятся к группе липопротеидов?

¹ Образование оксиметилфурфурола см. сноску на стр. 15.

4. ВИТАМИНЫ

Витаминами называются органические вещества разнообразной химической природы, которые поступают в организм с пищей и в малых дозах оказывают значительное влияние на обмен веществ и жизнедеятельность организма. Витамины образуются почти исключительно в растениях. Человек и животные получают их с пищей в готовом виде или в виде провитаминов, из которых в организме образуются витамины.

При отсутствии в пище витаминов человек и животные подвергаются тяжелым заболеваниям, носящим общее название авитаминозы. К ним относятся цинга, рахит, куриная слепота, пеллагра, бери-бери и др. Недостаток витаминов в пище вызывает явления гиповитаминоза, которые характеризуются рядом признаков, общих для всех гиповитаминозов: слабость, недомогание, остановка роста и т. п. и обычно с трудом распознаются.

Витамины необходимы также для нормального роста и развития высших растений и микроорганизмов. Некоторые ткани высших зеленых растений, как, например, корни, камбиальная ткань, а также выделенные из семян и растущие в темноте зародыши растения, не способны к синтезу витаминов и нуждаются в притоке их извне. Добавление к питательной среде тиамина и пиридоксина стимулирует рост изолированных корешков многих растений.

Витамины разделяются на водорастворимые и жирорастворимые. К числу водорастворимых витаминов относятся: тиамин, рибофлавин, пиридоксин, кобальамин, никотинамид, аскорбиновая кислота и др. (прежде обозначавшиеся латинскими буквами В₁, В₂, В₆, В₁₂, РР, С и др.). К числу жирорастворимых относятся ретинол, эргокальциферол, холекальциферол, филохиноны и токоферолы (витамины А, D, К, Е). В настоящее время открыто более 20 различных витаминов. Витамины нужны человеку и животным в очень незначительных количествах, исчисляемых миллиграммами или даже гаммами (эргокальциферол, кобальамин). Установлено, что некоторые водорастворимые витамины входят в состав простетических групп ферментов. Механизм участия жирорастворимых витаминов в процессе обмена веществ изучен еще недостаточно.

Хорошими источниками витаминов являются обычные продукты питания: печень, почки, яйца, мясо, молоко, масло, хлеб, крупы, овощи и фрукты. Рациональное использование их вполне удовлетворяет нужды организма. Потребность организма в витаминах меняется в связи с режимом питания и сильно возрастает при некоторых физиологических и патологических состояниях, например при беременности,

кормлении ребенка, при инфекционных заболеваниях и др. Избыточное употребление витаминов приводит к явлениям гипervитаминоза.

Присутствие витаминов в пищевых продуктах, в лекарственных травах и других веществах может быть обнаружено при помощи качественных цветных реакций на витамины. При изучении качественных реакций на витамины результаты исследования удобно заносить в следующую таблицу:

Качественные реакции на витамины

Исследуемый материал	Наименование витамина	Химическая структура витамина	Употребляемые реактивы	Получаемое окрашивание	Чем обусловлена реакция
----------------------	-----------------------	-------------------------------	------------------------	------------------------	-------------------------

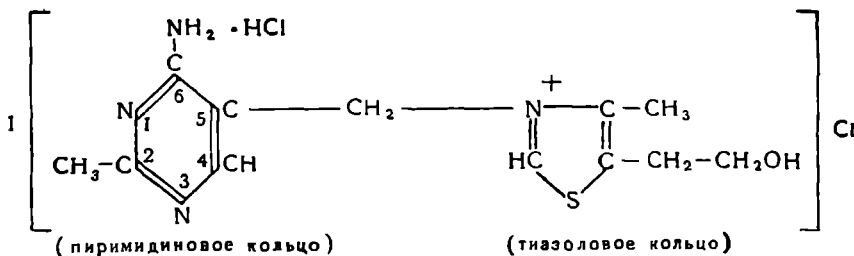
Выводы (отметить специфические реакции для каждого витамина).

ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ

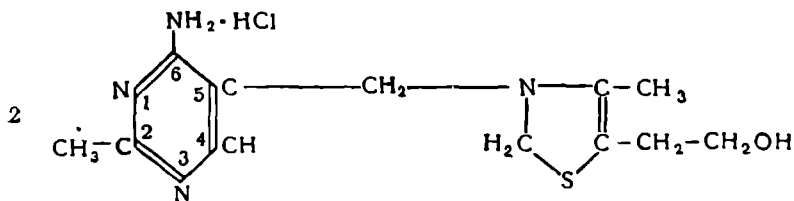
ТИАМИН (ВИТАМИН В₁, АНЕИРИН)

Отсутствие в пище тиамина (витамин В₁) вызывает заболевание, которое носит название бери-бери.

Химическая природа. В тиамине имеется два гетероциклических кольца: пиримидиновое и тиазоловое. В связи с присутствием в молекуле аминогруппы и серы этот витамин получил название тиамина. Тиамин встречается в окисленной и в восстановленной форме.



тиамин (окисленная форма)



тиамин (восстановленная форма)

Тиамин получен в кристаллическом состоянии в виде бесцветных игл солянокислого тиамина. Он хорошо растворим в воде, хуже — в этиловом спирте и совсем нерастворим в эфире и хлороформе. Тиамин устойчив к нагреванию только в сильно кислой среде; в нейтральной и щелочной среде он быстро разрушается еще до начала кипения.

Работа № 31

Диазореакция на тиамин

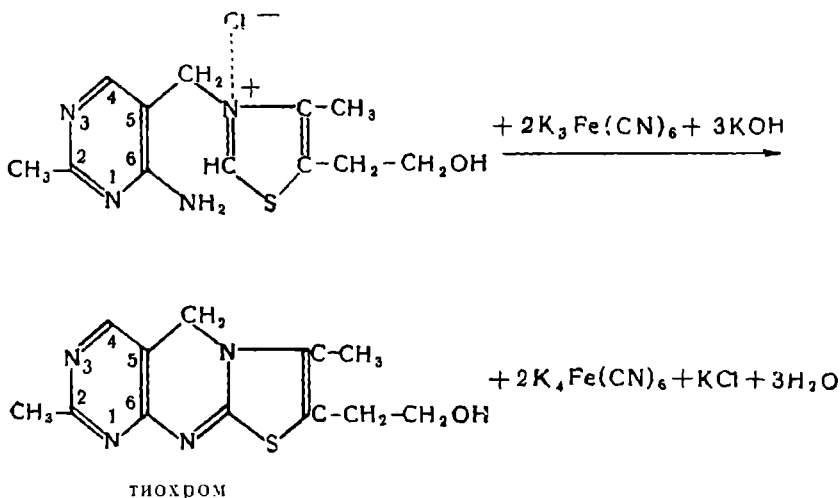
Раствор тиамина при добавлении к нему диазореактива и щелочи окрашивается в оранжевый или красный цвет вследствие образования сложного соединения тиамина с диазобензосульфокислотой (стр. 13).

Ход работы. К 5 каплям 1% раствора сульфаниловой кислоты прибавляют 5 капель 5% раствора азотистокислого натрия. Получают диазореактив. К диазореактиву прибавляют небольшое количество порошка тиамина (на кончике стеклянной палочки) и 5—7 капель 10% раствора соды. Жидкость окрашивается в оранжевый или красный цвет. Если раствор соды спускают осторожно по стенке наклоненной пробирки, то на границе двух жидкостей образуется красное кольцо.

Работа № 32

Реакция окисления тиамина в тиохром

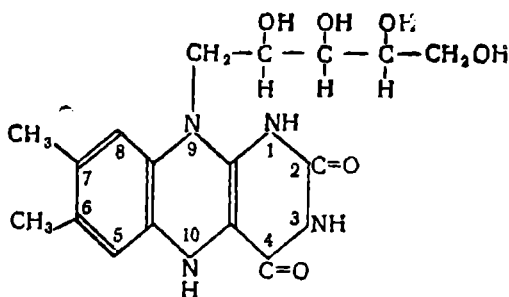
При действии железосинеродистого калия тиамин окисляется с образованием желтого пигмента тиохрома. Реакция протекает следующим образом:



Ход работы. К 1 капле 5% раствора тиамина (или к 1—2 мг порошка) добавляют 5—10 капель 10% раствора едкого натра и 1—2 капли 5% раствора железосинеродистого калия и перемешивают. При нагревании жидкость окрашивается в желтый цвет вследствие превращения тиамина в тиохром. При освещении растворов тиохрома ультрафиолетовыми лучами видна голубая флуоресценция.

РИБОФЛАВИН¹ (ВИТАМИН В₂, ЛАКТОФЛАВИН)

Отсутствие в пище рибофлавина вызывает задержку роста (у детей) и поражение слизистой оболочки и кожи в области губ, носа, глаз и ушей, воспаление роговицы глаза и помутнение хрусталика (катаракта). В углах рта образуются трещины, постоянно мокнущие и покрывающиеся корочкой. Роговица глаза прорастает мелкими кровеносными сосудами и изъязвляется.



рибофлавин (лейкоформа)

Рибофлавин является производным изоаллоксазина и может быть назван 6,7-диметил-9-рибитил-изоаллоксазином.

Рибофлавин растворяется в воде, этиловом спирте и не растворяется в некоторых органических растворителях: ацетоне, эфире, хлороформе и др. Растворы рибофлавина обладают резко выраженной желто-зеленой флуоресценцией, которая наиболее отчетлива в слабокислой или нейтральной среде. Рибофлавин довольно устойчив к нагреванию. Нагревание при 120° в течение нескольких часов не уничтожает его биологической активности. Кристаллизуется в виде игольчатых желто-оранжевых кристаллов.

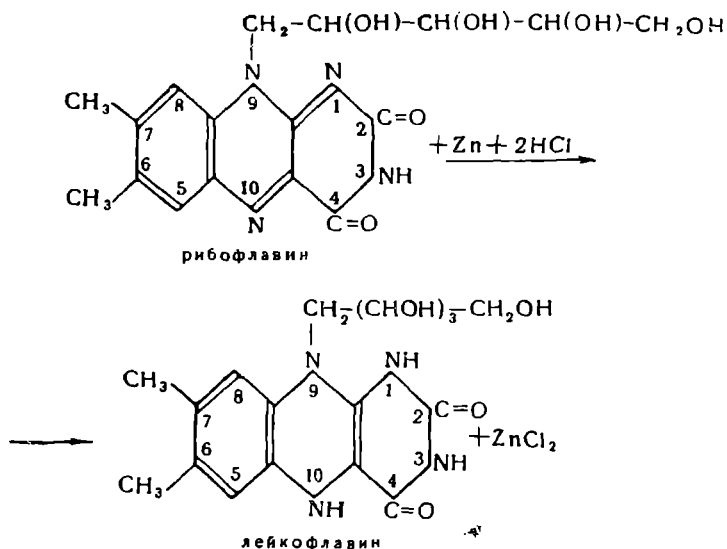
Действие ультрафиолетовых лучей на растворы рибофлавина вызывает инактивацию его.

¹ Flavus — желтый.

Реакция восстановления рибофлавина

Если к раствору рибофлавина добавить концентрированную соляную кислоту и металлический цинк, то происходит бурное выделение водорода и желтая окраска жидкости сначала переходит в красную, а затем обесцвечивается.

Реакция обусловлена восстановлением рибофлавина сначала в родофлавин (промежуточное соединение) красного цвета, а затем в бесцветный лейкофлавин. Реакция может быть представлена в следующем виде:



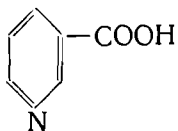
Ход работы. В пробирку наливают 10 капель взвеси рибофлавина в воде (0,025%), добавляют 5 капель концентрированной соляной кислоты и опускают зернышко металлического цинка. Начинается бурное выделение пузырьков водорода, и жидкость постепенно окрашивается в розовый или красный цвет, затем окраска жидкости начинает бледнеть, и жидкость обесцвечивается.

НИКОТИНАМИД (ВИТАМИН РР, ПРОТИВОПЕЛЛАГРИЧЕСКИЙ)

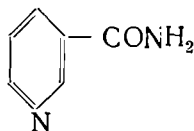
Отсутствие в пище никотинамида вызывает заболевание, называемое пеллагрой (pellagra — шершавая кожа), которое характеризуется воспалением кожи (дерматит), слизистой оболочки рта (стоматит) и языка (глоссит). Пеллагра

распространена в странах, где почти единственным, основным продуктом питания является кукуруза.

По химической природе никотинамид представляет собой амид никотиновой кислоты и относится к соединениям пиридинового ряда. Витаминной активностью обладает и сама никотиновая кислота.



никотиновая кислота



амид никотиновой кислоты

Никотиновая кислота плохо растворима в воде и хорошо растворяется в спирте, эфире и глицерине, устойчива к нагреванию и автоклавированию.

— Работа № 34

✦

Проба с медью на никотиновую кислоту

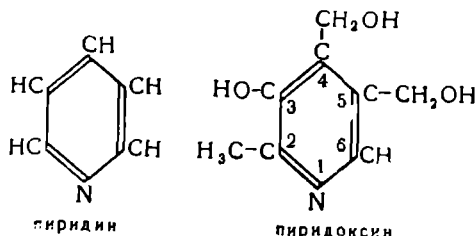
При нагревании никотиновой кислоты с раствором уксуснокислой меди образуется синий осадок медной соли никотиновой кислоты.

Ход работы. 5—10 мг никотиновой кислоты растворяют при нагревании в 10—20 каплях 10% раствора уксусной кислоты. К нагретому до кипения раствору добавляют равный объем 5% раствора уксуснокислой меди. Жидкость становится мутной, окрашивается в голубой цвет, а при стоянии выпадает осадок синего цвета. ✦

ПИРИДОКСИН (ВИТАМИН В₆, АДЕРМИН)

Отсутствие в пище пиридоксина вызывает заболевание кожи — дерматит, не излечивающийся никотиновой кислотой, но поддающийся быстрому излечению пиридоксином.

Пиридоксин является производным пиридина (2-метил-3-гидрокси-4,5-дигидрооксиметилпиридин).



пиридин

пиридоксин

Пиридоксин хорошо растворим в воде и спирте; не разрушается при действии кислот и щелочей, при кипячении

и автоклавировании; легко распадается под влиянием света в слабокислой среде ($\text{pH} = 6,8$); в сильно кислой среде ($\text{pH} = 1$) он остается без изменения. Окислители (перекись водорода и перманганат) разрушают пиридоксин уже при комнатной температуре. С кислотами пиридоксин образует соли.

Работа № 35

Феррихлоридная проба на пиридоксин

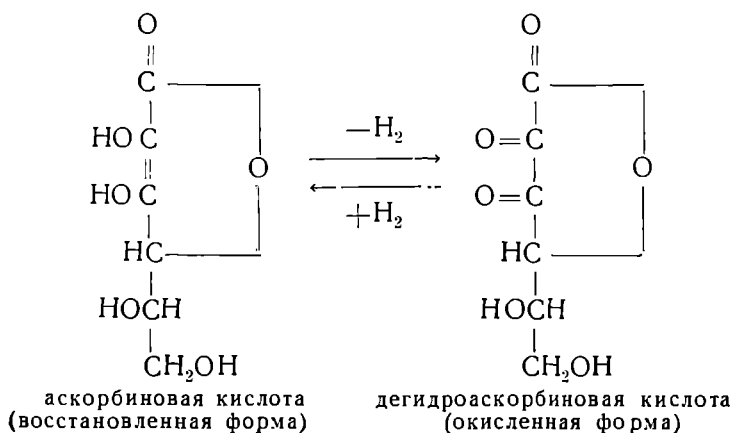
При добавлении к раствору пиридоксина раствора хлорного железа жидкость окрашивается в красный цвет вследствие образования комплексного соединения типа фенолята железа.

Ход работы. К 5 каплям 5% водного раствора пиридоксина прибавляют 1 каплю 5% раствора хлорного железа и встряхивают; жидкость приобретает красную окраску.

АСКОРБИНОВАЯ КИСЛОТА (ВИТАМИН С, АНТИЦИНГОТНЫЙ)

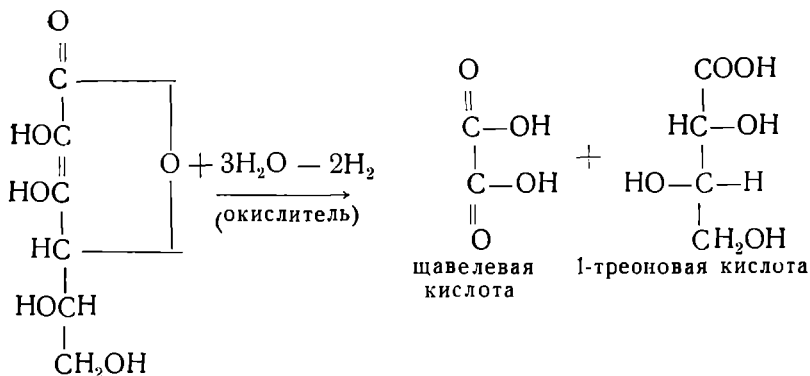
Отсутствие в пище аскорбиновой кислоты вызывает заболевание, известное под названием цинги или скорбута. Начальные формы авитаминоза характеризуются мышечной слабостью, вялостью, апатией, быстрой утомляемостью, сонливостью, головокружением. При развитии болезни появляются кровоточивость десен, легкое образование синяков, симптомы недостаточности сердечной деятельности, пониженная сопротивляемость к инфекциям.

Аскорбиновая кислота представляет собой ненасыщенное соединение типа лактона с двумя енольными и двумя спиртовыми гидроксильными группами. Присутствие енольных групп с диссоциирующими ионами водорода обуславливает кислый



характер вещества, отчего витамин получил второе название — аскорбиновая кислота. Наиболее характерной особенностью аскорбиновой кислоты является ее способность легко окисляться и восстанавливаться.

Аскорбиновая кислота представляет собой бесцветные кристаллы, хорошо растворимые в воде. Она быстро разрушается в присутствии окислителей с образованием щавелевой и треоновой кислот, особенно при нагревании в нейтральной или щелочной среде. В кислой среде аскорбиновая кислота более устойчива.



Работа № 36

Восстановление феррицианида калия аскорбиновой кислотой

При добавлении вытяжки из шиповника, содержащей аскорбиновую кислоту, к смеси растворов железосинеродистого калия $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ и хлорного железа FeCl_3 бурая жидкость окрашивается в синий цвет.

Реакция обусловлена окислением аскорбиновой кислоты и восстановлением железосинеродистого калия $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ в железистосинеродистый $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$; последний с хлорным железом образует берлинскую лазурь.

Ход работы. В 2 пробирках смешивают 1 каплю 5% раствора железосинеродистого калия с 1 каплей 1% раствора хлорного железа. В одну из пробирок к зеленовато-бурой жидкости добавляют 5—10 капель 1% вытяжки из шиповника¹; в другую — столько же дистиллированной воды. Жидкость в первой пробирке приобретает зеленовато-синюю окраску, и выпадает синий осадок берлинской лазури. При

¹ См. работу № 39.

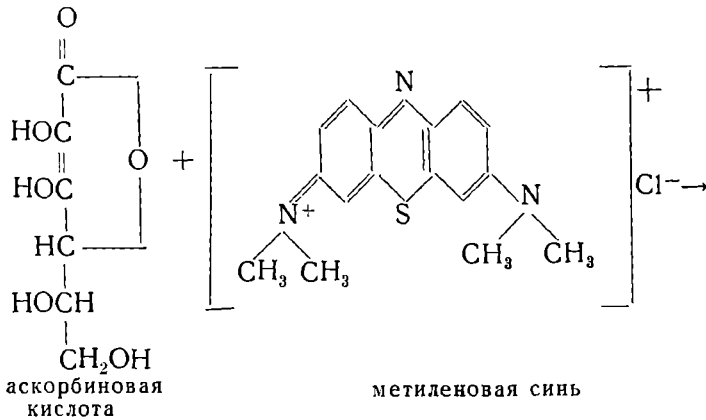
осторожном наслаивании дистиллированной воды осадок на дне пробирки становится более отчетливым. Во второй пробирке зеленовато-бурая окраска жидкости остается без изменения.

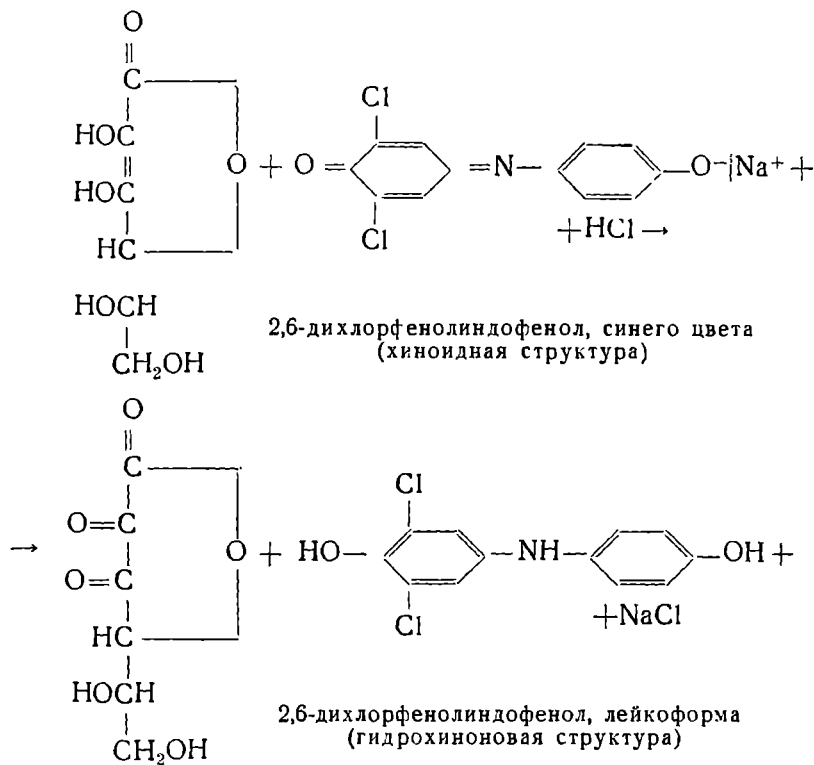
Работа № 37

Восстановление метиленовой сини и 2,6-дихлорфенолиндофенола аскорбиновой кислотой

При добавлении вытяжки из шиповника, содержащей аскорбиновую кислоту, к раствору метиленовой сини или к раствору 2,6-дихлорфенолиндофенола жидкость обесцвечивается.

Реакция обусловлена окислением аскорбиновой кислоты в дегидроаскорбиновую и восстановлением краски в лейко-соединение.





Ход работы. 1. В 2 пробирки наливают по 1 капле 0,01% раствора метиленовой сини и по 1 капле 10% раствора соды. В одну из пробирок добавляют 5 капель 1% вытяжки из шиповника, в другую — столько же воды и одновременно нагревают над пламенем горелки. В пробирке с вытяжкой из шиповника жидкость обесцвечивается.

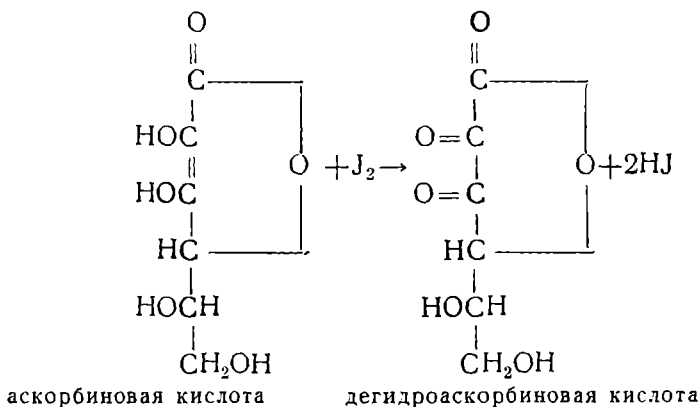
2. В 2 пробирки наливают по 10 капель 0,01% раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола. В первую пробирку добавляют 1 каплю 2% раствора соляной кислоты. Жидкость принимает красную окраску. В обе пробирки к синей и красной жидкости добавляют по каплям вытяжку из шиповника (5—10 капель). В том и другом случае жидкость обесцвечивается вследствие восстановления 2,6-дихлорфенолиндофенола за счет окисления аскорбиновой кислоты (стр. 58).

Работа № 38

Иодная проба на аскорбиновую кислоту

При добавлении вытяжки из шиповника, содержащей аскорбиновую кислоту, к раствору йода в йодистом калии раствор йода обесцвечивается.

Реакция обусловлена окислением аскорбиновой кислоты в дегидроаскорбиновую и восстановлением молекулярного йода с образованием йодистоводородной кислоты¹.



Ход работы. В 2 пробирки наливают по 10 капель дистиллированной воды и по 1—2 капли 0,1% раствора йода в растворе йодистого калия. В одну пробирку прибавляют 10 капель дистиллированной воды, в другую — 10 капель вытяжки из шиповника. В пробирке с вытяжкой из шиповника раствор йода обесцвечивается.

Работа № 39

Количественное определение аскорбиновой кислоты с 2,6-дихлорфенолиндофенолом по методу Тильманса

Количественное определение аскорбиновой кислоты основано на ее способности окисляться 2,6-дихлорфенолиндофенолом в дегидроаскорбиновую кислоту (см. качественные реакции). Определение производят путем титрования исследуемой жидкости 0,001 н. раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола в условиях, предохраняющих аскорбиновую кислоту от разрушения (кислая среда). При точных анализах пользуются модифицированным методом, который устраняет возможность участия в реакции других легко окисляющихся веществ типа глутатиона, цистеина, креатинина и др.

Ход работы. 1. Приготовление вытяжки из шиповника или хвои. Шиповник или хвою в количестве 0,5 г отвешивают на ~~ровных~~ весах и тщательно измельчают в фарфоровой ступке с 2 мл 2% раствора соляной кислоты. К растертой массе добавляют 10 мл 2% раствора соляной

¹ Реакция используется для количественного йодометрического определения аскорбиновой кислоты.

кислоты, перемешивают и осторожно, без потерь (по палочке, через воронку) переносят содержимое ступки в мерную колбочку емкостью 50 мл. Ступку и пестик обмывают 2% раствором соляной кислоты и промывную жидкость присоединяют к общей порции вытяжки. Объем жидкости в мерной колбочке доводят дистиллированной водой до метки, колбочку закрывают пробкой и содержимое ее несколько раз перемешивают. Небольшую порцию вытяжки фильтруют через бумажный фильтр и фильтрат употребляют для титрования.

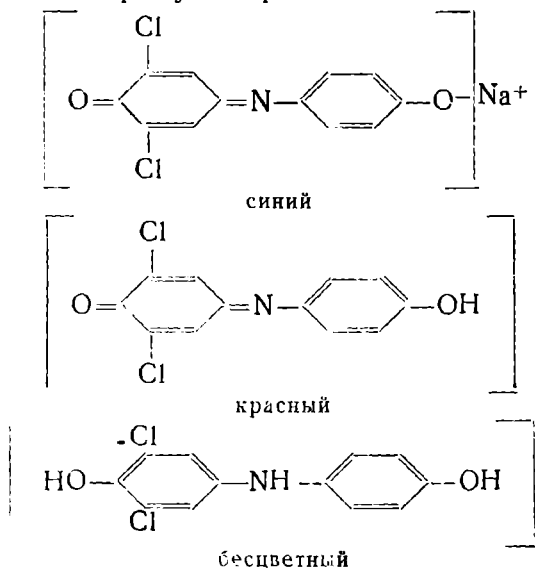
2. Титрование. В 2 эрленмейровские колбочки емкостью 25 мл отмеривают точной пипеткой по 1 мл исследуемой жидкости¹ и в каждую добавляют по 4 мл 2% раствора соляной кислоты. Содержимое колбочек титруют 0,001 н. раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления розового окрашивания, не исчезающего в течение 30 секунд². Если результаты титрования параллельных проб не совпадают, производят повторное титрование новых двух порций вытяжки.

3 Расчет. Молекулярный вес аскорбиновой кислоты = 176 г. Грамм-эквивалент = $\frac{M}{2} = 88$ г.

1 мл 0,001 н. раствора содержит 0,088 мг аскорбиновой кислоты.

¹ Вытяжку из хвои употребляют в количестве 5 мл и соляной кислоты не добавляют.

² 2,6-дихлорфенолиндофенол в щелочной среде имеет синюю окраску, в кислой—красную, а при восстановлении обесцвечивается:



а) Определяют количество аскорбиновой кислоты в 1 мл исследуемой жидкости, исходя из титра 2,6-дихлорфенолиндофенола и его количества, израсходованного на титрование. Например, если на титрование 1 мл вытяжки из шиповника израсходовано 1,35 мл 0,001 н. раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, то в 1 мл вытяжки содержится $0,088 \text{ мг} \times 1,35 = 0,1188 \text{ мг}$ аскорбиновой кислоты.

б) Определяют количество аскорбиновой кислоты в 100 мл вытяжки или сока, т. е. процентное содержание в растворе. Например, если в 1 мл вытяжки содержится 0,1188 мг аскорбиновой кислоты, то в 100 мл будет содержаться 11,88 мг.

в) Для шиповника и хвои вычисляют содержание витамина в 100 г продукта. Например, если 100 мл вытяжки, соответствующие 1 г шиповника¹, содержат 11,88 мг витамина, то 100 г шиповника будут содержать 1188 мг витамина.

Результаты анализа фиксируют в таблице.

Количественное определение аскорбиновой кислоты

Название материала, взятого для исследования	Навеска (в г.)	Общий объем вытяжки (в мл)	Количество вытяжки, взятой для титрования (в мл)	Сколько 0,001 н. раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола пошло на титрование (в мл)	Количество аскорбиновой кислоты (в мг)		
					в пробе, взятой для титрования	в 100 мл вытяжки	в 100 г сухого продукта

Выводы:

ЖИРОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ

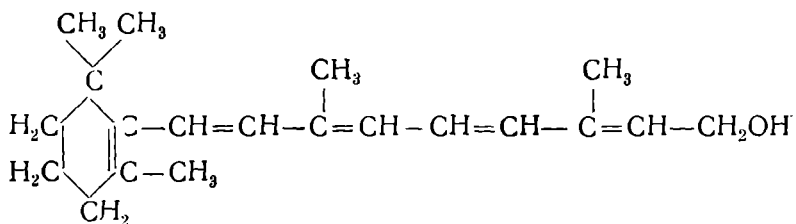
РЕТИНОЛ

(ВИТАМИН А, АНТИКСЕРОФТАЛЬМИЧЕСКИЙ)

Специфическим признаком ретинол-авитаминоза у детей является поражение роговой оболочки глаза, приводящее к ксерофтальмии (сухость роговицы глаз) и в тяжелых случаях заболевания — к кератомалиции (изъязвление роговой оболочки глаза). У взрослых авитаминоз проявляется в потере способности видеть в сумерках, отчего заболевание получило название «куриная слепота», или гемералопия. При недостатке ретинола наблюдается пониженная сопротивляемость организма инфекционным заболеваниям, повышенная утомляемость и задержка роста.

¹ 0,5 г шиповника и хвои в ходе работы извлекали 50 мл раствора соляной кислоты.

Ретинол является производным каротина. Он имеет эмпирическую формулу $C_{20}H_{30}O$, содержит β -иононовое кольцо и боковую цепь, состоящую из 11 углеродных атомов. Ретинол можно рассматривать как полимер изопрена, построенный из 4 его остатков, причем 2 остатка в цикле содержат меньше двойных связей, чем 2 остатка в боковой цепи.



ретинол (витамин А)

Ретинол представляет собой светло-желтую вязкую массу или бледно-желтое кристаллическое вещество. Он нерастворим в воде, но хорошо растворяется в жирах и жирорастворителях; легко окисляется кислородом воздуха, особенно при нагревании; в отсутствие кислорода — термостабилен. Растворы витамина в масле более устойчивы к окислению.

Работа № 40

Реакция на ретинол с треххлористой сурьмой¹

Рыбий жир, содержащий ретинол, при добавлении хлороформного раствора треххлористой сурьмы приобретает синюю окраску². Химизм реакции неизвестен.

Ход работы. В сухую пробирку вносят одну каплю свежего рыбьего жира и добавляют 2—3 капли 33% хлороформного раствора треххлористой сурьмы; при смешивании содержимое пробирки окрашивается в синий цвет. Реакцию с треххлористой сурьмой используют для количественного определения ретинола колориметрическим методом.

¹ Треххлористая сурьма может быть заменена треххлористым мышьяком. В присутствии следов воды реактив разрушается.

² Для открытия ретинола следует употреблять только свежий рыбий жир. Несвежий или прокипяченный рыбий жир содержит кальциферол и не содержит ретинола. При кипячении ретинол разрушается, а кальциферол сохраняется. При взаимодействии с хлороформным раствором треххлористой сурьмы прокипяченный рыбий жир приобретает желтую окраску в отличие от непрокипяченного.

Реакция на ретинол с концентрированной серной кислотой

Хлороформный раствор рыбьего жира, содержащий ретинол, при добавлении концентрированной серной кислоты приобретает красное окрашивание, переходящее в красно-бурое.

Ход работы. В сухую пробирку вносят 1 каплю рыбьего жира и 5 капель хлороформа, перемешивают и добавляют 1 каплю концентрированной серной кислоты. Жидкость окрашивается в красный цвет.

КАЛЬЦИФЕРОЛ (ВИТАМИН D, АНТИРАХИТИЧЕСКИЙ)

Недостаток кальциферола вызывает у детей заболевание, известное под названием рахита, а у взрослых — явления остеопороза (хрупкость) и остеомаляции (размягчение костей). Важнейшим признаком рахита является нарушение процесса костеобразования вследствие уменьшения содержания в костях солей кальция и фосфора и понижение мышечного тонуса (слабость, вялость).

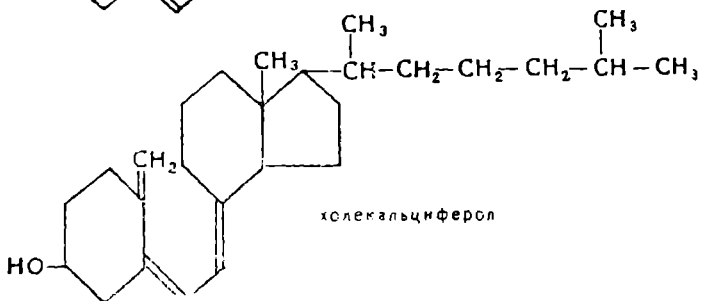
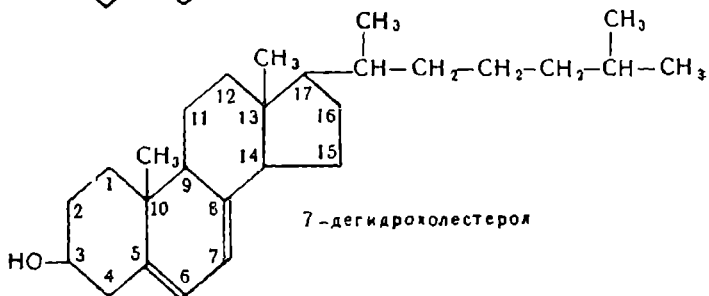
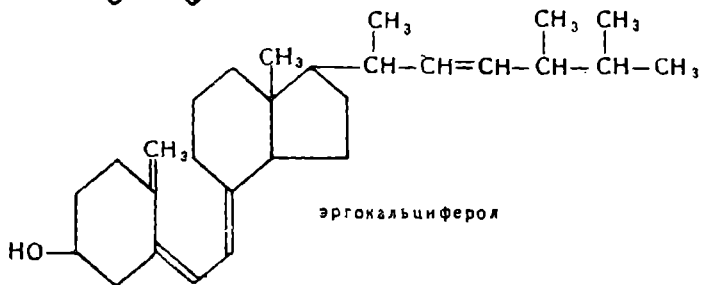
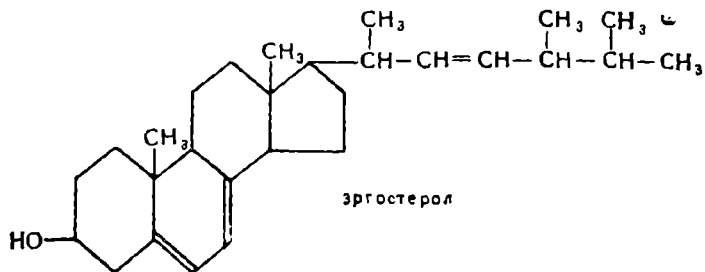
Кальциферол относится к классу стеролов и является производным циклопентанпергидрофенантрена. Витаминовой активностью обладают несколько стеролов, близких по своей химической структуре, поэтому название «кальциферол» имеет собирательное значение.

Витамин, полученный при облучении ультрафиолетовыми лучами провитамина эргостерола (встречается в растениях), носит название эргокальциферола, а витамин, полученный при облучении 7-дегидрохолестерола (содержащегося в подковой клетчатке), называется холекальциферолом.

Эргокальциферол (витамин D₂) отличается от холекальциферола (витамин D₃) наличием в боковой цепи двойной связи и дополнительной метильной группы.

Эргокальциферол и холекальциферол выделены в виде бесцветных кристаллов и имеют различную точку плавления: эргокальциферол — 115—117°, холекальциферол — 82—83°. При нагревании без доступа воздуха до 115° эргокальциферол не теряет биологической активности, но дальнейшее нагревание разрушает и инактивирует его. В масляных растворах, защищенных от действия света, эргокальциферол сохраняется в течение нескольких лет.

Витамины из группы кальциферолов растворяются в жирах, спирте, эфире, хлороформе и других органических растворителях и нерастворимы в воде и глицерине.



Работа № 42

Бромхлороформная проба на кальциферолы

Рыбий жир, содержащий холекальциферол, при добавлении раствора брома в хлороформе приобретает зеленовато-голубоватое окрашивание. Химизм реакции неизвестен.

Ход работы. В сухую пробирку вносят 1—3 капли рыбьего жира и 2—4 капли раствора брома в хлороформе (1:60). Жидкость постепенно приобретает зеленовато-голубое окрашивание.

Работа № 43

Анилиновая проба на кальциферол

При нагревании рыбьего жира, содержащего холекальциферол, со смесью анилина и концентрированной соляной кислоты, раствор приобретает красную окраску. Химизм реакции неизвестен.

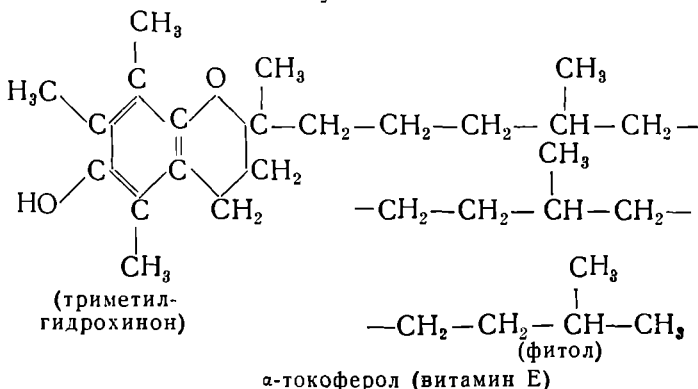
Ход работы. В сухую пробирку вносят 1 каплю рыбьего жира и 5 капель хлороформа, перемешивают и добавляют 1 каплю анилинового реактива (15 частей анилина + 1 часть концентрированной HCl). При нагревании желтая эмульсия принимает красную окраску.

ТОКОФЕРОЛ

(ВИТАМИН Е, АНТИСТЕРИЛЬНЫЙ)

При недостатке токоферола у животных возникает бесплодие. Бесплодие самок характеризуется смертью и рассасыванием плода; у самцов наблюдается прогрессирующая дегенерация зародышевого эпителия семенников. Характерным симптомом авитаминоза Е является мышечная слабость и параличи, особенно задних конечностей.

Токоферол можно рассматривать как продукт соединения триметилгидрохинона со спиртом фитолом¹, из которых витамин может быть получен синтетически:



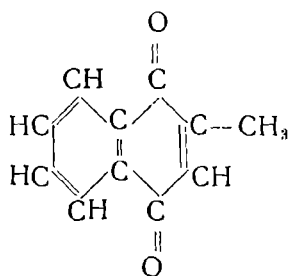
Токоферол (или витамин Е) — маслообразное вещество, растворимое в маслах и органических растворителях: спир-

¹ Фитол имеет в цепи 20 углеродных атомов; входит в состав хлорофилла и филлохинона.

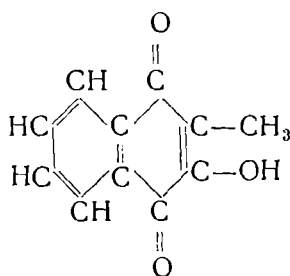
Филлохинон представляет собой желтоватое густое масло, кристаллизующееся в виде бесцветных пластинок при температуре -20° . Нерастворим в воде; растворяется в органических растворителях — эфире, спирте, бензоле и др. Оптически неактивен. Термостабилен. Инактивируется при действии ультрафиолетовых лучей. Устойчив к действию кислот и разрушается щелочами.

Искусственно синтезированные аналоги филлохинона — викасол¹, метинон, фтиокол² и др. обладают высокой антигеморрагической активностью.

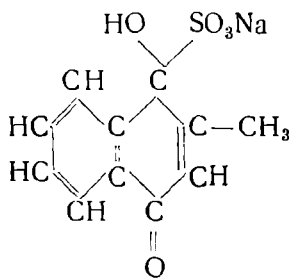
Викасол имеет большое преимущество перед естественными витаминами благодаря способности хорошо растворяться в воде и применяется с лечебной целью при кровотечениях.



метинон



фтиокол



викасол

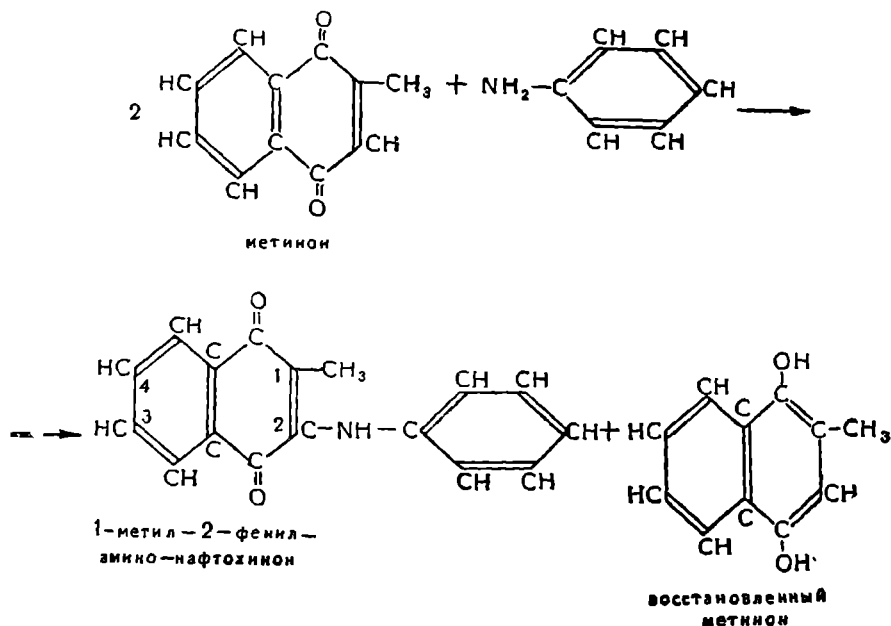
Все вещества, обладающие биологической активностью филлохинона, имеют 1,4-нафтохиноновое кольцо с метильной группой во 2-м положении и отличаются друг от друга только строением боковой цепи и замещающими радикалами в 3-м положении хиноидного кольца.

¹ Акад. А. В. Палладин осуществил синтез викасола в 1943—1944 гг.

² Фтиокол в виде пигмента был впервые выделен из *Mycobacterium tuberculosis*, а затем синтезирован в 1933 г.

Реакция на метинон и викасол

1. Спиртовой раствор метинона в присутствии анилина окрашивается в красный цвет. Реакция обусловлена образованием 1-метил-2-фениламино-нафтохинона и протекает по следующему уравнению:



Ход работы. К 5 каплям 0,25% спиртового раствора метинона добавляют 2 капли анилина и встряхивают. Жидкость окрашивается в красный цвет.

2. При добавлении к раствору викасала цистеина и щелочи жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет, переходящий при стоянии в оранжевый. Химизм реакции неизвестен.

Ход работы. К 5 каплям 0,05% раствора викасала добавляют 5 капель 0,025% раствора цистеина и 1 каплю 10% раствора едкого натра. Жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет.

Контрольные вопросы

1. Что такое витамины?
2. Когда и кем были открыты витамины?
3. Кто дал витаминам это название и по какому признаку?
4. Как классифицируются витамины?
5. Что такое авитаминозы и гиповитаминозы и каковы причины их появления?

6. Каковы специфические признаки авитаминозов, вызванных отсутствием в пище ретинола и кальциферола? Какова химическая природа этих витаминов, какие вещества являются их провитаминами?

7. Какова связь между ретинолом, зрительным пурпуром и куриной слепотой?

8. Чем обусловлены кровоизлияния при недостатке филлохинона и какова причина кровоизлияния при недостатке аскорбиновой кислоты и цитрина?

9. Какие витамины относятся к группе водорастворимых витаминов?

10. Каковы специфические признаки авитаминозов, вызванных отсутствием в пище тиамина, рибофлавина, никотинамида, пиридоксина? Какова химическая природа этих витаминов, в состав каких ферментов входит каждый из названных выше витаминов?

5. ГОРМОНЫ

Гормонами называются специфические вещества различного химического состава, вырабатываемые железами внутренней секреции (эндокринными железами). К железам, вырабатывающим гормоны, относятся щитовидная, паращитовидная, зобная, поджелудочная, половые железы, надпочечники, гипофиз, эпифиз и др. Гормоны поступают непосредственно в кровь или лимфу и распространяются по кровеносным и лимфатическим сосудам в ближайшие и отдаленные части организма. Они могут ускорять или замедлять физиологическую деятельность органов и тканей и являются регуляторами процесса обмена веществ в организме. Поступая в кровеносное русло в ничтожно малых количествах, гормоны обладают значительной силой действия.

Координация деятельности всех желез внутренней секреции осуществляется центральной нервной системой. Это доказано многочисленными опытами И. П. Павлова и его сотрудников.

Гормоны можно подразделить на две основные группы: гормоны белковой природы и гормоны стерина природы. К гормонам белковой природы относятся гормоны щитовидной железы, гормон паращитовидной железы, гормоны передней и задней доли гипофиза. К гормонам стерина природы относятся гормоны коркового слоя надпочечников, гормоны мужских и женских половых желез.

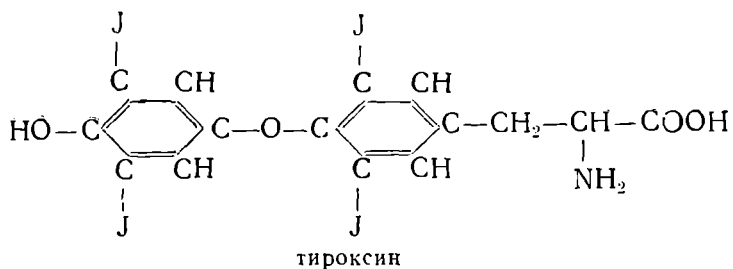
В растительных организмах также имеются вещества, которые обладают сильным физиологическим действием и называются фитогормонами.

ГОРМОНЫ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

При недостаточной деятельности щитовидной железы (гипотиреоз) понижается обмен веществ и появляется слизистый отек. Если нарушение деятельности щитовидной железы возникает в раннем детском возрасте, то развивается

заболевание, известное под названием кретинизма. Признаком этого заболевания является отсталость в физическом и психическом развитии. При повышенной деятельности щитовидной железы (гипертиреоз) обмен веществ усиливается. Внешними признаками гипертиреоза являются: увеличение щитовидной железы, резкое исхудание, а при базедовой болезни — экзофтальм (пучеглазие) и недостаточность сердечной деятельности.

Из щитовидной железы было выделено особое белковое вещество со свойствами глобулина (тиреоглобулин), в котором содержится от 0,2 до 0,9% йода. Кендаль (1919) выделил из щитовидной железы кристаллическое вещество, содержащее 65% йода и назвал его тироксином. В щитовидной железе из общего содержания йода на долю тироксина приходится 15—16%, а на долю тиреоглобулина 33—34%. Химическое строение тироксина установлено. В организме гормон тироксин образуется из аминокислоты тирозина.



Работа № 46

Открытие йода в щитовидной железе

При сплавлении измельченной и высушенной ткани щитовидной железы животных с карбонатом натрия или калия образуется йодистый калий, из которого йод может быть вытеснен йодноватым калием. Выделившийся йод можно открыть при помощи крахмала.

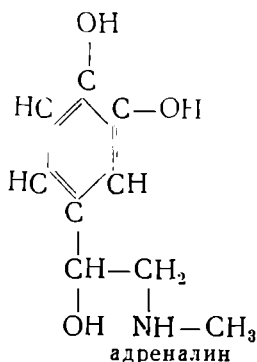
1. $5\text{KJ} + \text{KJO}_3 + 6\text{HCl} \rightarrow 3\text{J}_2 + 6\text{KCl} + 3\text{H}_2\text{O}$.
2. $\text{J}_2 + \text{крахмал} \rightarrow \text{синее окрашивание}$.

Ход работы. В ступку помещают 100—200 мг измельченной и высушенной ткани щитовидной железы и тщательно растирают с 500 мг кристаллического углекислого натрия ($\text{Na}_2\text{CO}_3 + 10\text{H}_2\text{O}$). Растертую массу переносят в тигель, который ставят на асбестовую сетку и нагревают на слабом огне, не допуская обугливания. При сплавлении содержимое тигля сначала делается слегка влажным, прилипает к стек-

лянной палочке и к стенкам тигля. Сплавление прекращают, когда сплав станет порошкообразным, почувствуется своеобразный запах и появится едва заметный дымок. Содержимое тигля после охлаждения извлекают 2 мл горячей воды и фильтруют. К фильтрату добавляют 3—5 капель концентрированной H_2SO_4 , 1 каплю 1% раствора крахмала и 1—2 капли 0,1% раствора KJO_3 . Выделившийся йод окрашивает жидкость в синий цвет.

ГОРМОН МОЗГОВОГО СЛОЯ НАДПОЧЕЧНИКА — АДРЕНАЛИН

Более 100 лет назад французский ученый Броун-Секар установил, что удаление надпочечных желез приводит к гибели животных. При введении экстракта, полученного из мозгового слоя надпочечника, наблюдалось повышение кровяного давления. Японский ученый Такаmine выделил из надпочечника кристаллическое вещество, которое назвал адреналином. По химической природе адреналин оказался производным пирокатехина. Позднее был осуществлен синтез адреналина и установлена его химическая структура. Рациональное название адреналина — метиламиноэтанолпирокатехин.



Химические свойства адреналина обусловлены наличием в его структуре пирокатехинового кольца. Адреналин легко окисляется даже в присутствии кислорода воздуха с образованием продукта, близкого к галахрому (см. стр. 87, 88), называемого адренохромом и окрашенного в красный цвет. Дальнейшее превращение адренохрома приводит к образованию темных пигментов.

С хлорным железом адреналин образует соединения типа фенолята зеленого цвета. При взаимодействии адреналина с диазореактивом образуются комплексы, окрашенные в красный цвет, подобные тем, которые известны для гистидина и тирозина (см. стр. 13, 14).

Работа № 47

Реакция на адреналин с йодатом калия

Ход работы. В пробирку вносят 2—3 капли раствора адреналина (1 1000), 2 капли 10% раствора KJO_3 и 2 капли 10% раствора уксусной кислоты. Жидкость слегка нагревают. Появляется красно-фиолетовое окрашивание.

Работа № 48

Реакция на адреналин с хлорным железом

Ход работы. В пробирку вносят 3 капли раствора адреналина (1 1000) и 1 каплю 1% раствора хлорного железа. Жидкость в пробирке принимает яркое изумрудно-зеленое окрашивание, постепенно переходящее в желтоватое. Если к изумрудно-зеленому раствору прибавить 1 каплю концентрированного раствора аммиака, то окраска быстро переходит в зеленую, красную и затем в коричневую.

Работа № 49

Диазореакция на адреналин

Ход работы. В пробирку помещают 3 капли 1% раствора сульфаниловой кислоты, 3 капли 5% раствора азотистокислого натрия, 5 капель раствора адреналина (1 1000) и 3 капли 10% раствора углекислого натрия. Жидкость окрашивается в красный цвет.

Работа № 50

Количественное определение адреналина по методу Фолина

Метод основан на колориметрическом определении интенсивности синего окрашивания, которое образуется при взаимодействии адреналина с реактивом Фолина. Окраску испытуемого раствора сравнивают с окраской стандартного раствора адреналина, обработанного тем же способом.

Реактив Фолина состоит из солей фосфорновольфрамовой и фосфорномолибденовой кислот. Эти соли при взаимодействии с фенолами и полифенолами восстанавливаются с образованием более низких окислов, комплексы которых окрашены в синий цвет.

Ход работы. В 2 чистые сухие пронумерованные пробирки точно отмеривают пипеткой в первую — 1 мл стандартного раствора адреналина, во вторую — 1 мл испытуемого раствора. В каждую пробирку добавляют по 4 мл 10% раст-

вора углекислого натрия и по 0,5 мл реактива Фолина. Содержимое пробирок встряхивают. Жидкость постепенно окрашивается в синий цвет, достигающий наибольшей интенсивности через 3—5 минут. По истечении этого срока окраску испытуемой жидкости сравнивают в колориметре со стандартным раствором адреналина.

Для приготовления стандартного раствора адреналина в мерную колбу емкостью 25 мл отмеривают точно 1 мл продажного раствора адреналина 1 1000 и доводят до метки водой. 1 мл стандартного раствора содержит 0,04 мг адреналина.

Расчет. На основании данных колориметрии (среднее из 5—6 отсчетов) определяют процентное содержание адреналина в испытуемой жидкости, зная, что концентрация растворов обратно пропорциональна высоте столба жидкости

$$\frac{C}{C_1} = \frac{h_1}{b}$$

Пример. Столб жидкости стандартного раствора 30,0 мм. Столб жидкости испытуемого раствора 41,4 мм. Концентрация стандартного раствора = 0,04 мг в 1 мл.

$$x = \frac{0,04 \cdot 30}{41,4} = 0,029 \text{ мг.}$$

Следовательно, в нашем примере в 1 мл испытуемого раствора содержится 0,029 мг адреналина, что соответствует 2,9 мг%.

ГОРМОН ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ — ИНСУЛИН

В поджелудочной железе образуется гормон, известный под названием инсулина. Он вырабатывается клетками Лангерганса, расположенными в виде островков (*insula* — остров), отчего и получил свое название.

Впервые на роль поджелудочной железы как железы внутренней секреции обратили внимание Меринг и Минковский (1889). Удаление поджелудочной железы приводило к возникновению сахарной болезни, характеризующейся тем, что в крови и моче появляется много сахара и ацетоновых тел. Последние способствуют возникновению коматозного состояния, ведущего к смерти.

По своей химической природе инсулин является белком, имеющим молекулярный вес 11 620. Так как инсулин — белковое тело, то в кишечнике под влиянием протеолитических ферментов он расщепляется и теряет свою активность, а потому его вводят в кровь или подкожно. Инсулин дает характерные реакции на белок: биуретовую, реакцию Фоля, Миллона и др.

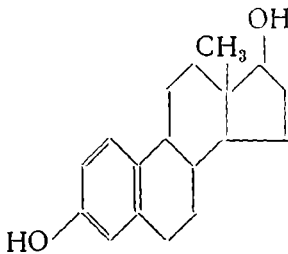
Цветные реакции на инсулин

Ход работы. Для качественных цветных реакций употребляют продажный раствор инсулина в ампулах и берут по 5 капель для каждой реакции. Прodelьвают биуретовую реакцию (см. стр. 6, 7), реакцию Фoля (см. стр. 17) и реакцию Миллона (см. стр. 11, 12).

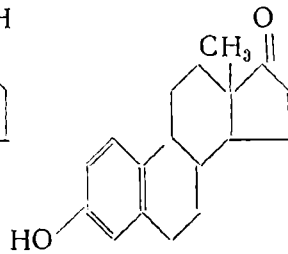
ГОРМОНЫ ПОЛОВЫХ ЖЕЛЕЗ

Половые железы (мужские и женские) выделяют гормоны стеринавой природы, которые играют важную роль в обмене веществ и способствуют возникновению вторичных половых признаков. Гормоны женских половых желез — фолликулин, эстрадиол и др.; гормоны мужских половых желез — тестостерон и андростерон.

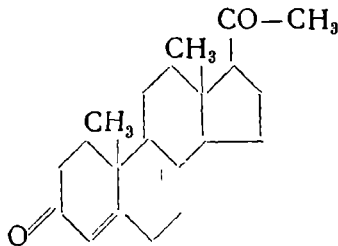
В 1935 г. Бутенандт установил химическую природу трех гормонов — эстрадиола, тестостерона и прогестерона. Все они являются производными стеринаов, а потому плохо растворимы в воде. Из эндокринных желез они извлекаются хлороформом. Хорошо растворимы в маслах.

Женские половые гормоны

эстрадиол (выделен из яичников)

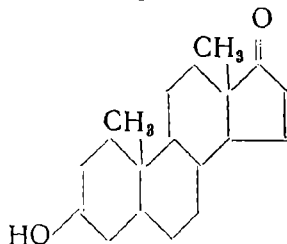


эстрон (фолликулин; выделен из мочи беременных)

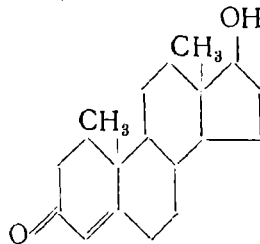


прогестерон (лютеостерон; гормон желтого тела)

Мужские половые гормоны



андростерон (выделен из мочи самцов)



тестостерон (выделен из семенников)

В настоящее время половые гормоны применяются в виде соединений с бензойной и пропионовой кислотами, так как действие таких соединений в несколько раз сильнее естественных гормонов. Выделяются половые гормоны с мочой в виде парных соединений с глюкуроновой кислотой.

Получены и синтетические половые гормоны, которые носят название стилибенов (производные дифенила).

Работа № 52

Реакция на фолликулин (эстрон) с концентрированной серной кислотой

Ход работы. В пробирку наливают 20—30 капель спиртового раствора фолликулина и помещают ее в кипящую водяную баню на 5—10 минут для удаления спирта. К оставшемуся в пробирке фолликулину добавляют 20 капель концентрированной серной кислоты и пробирку вновь помещают в кипящую водяную баню на 5—10 минут. Жидкость в пробирке окрашивается в соломенно-желтый цвет, переходящий при нагревании в оранжевый, и имеет зеленую флуоресценцию.

При изучении химической структуры и свойств гормонов: результаты работы следует фиксировать в форме таблицы..

Качественные реакции на гормоны

Название железы внутренней секреции	Название гормона	Химическое строение гормона	Употребляемые реактивы	Получаемое окрашивание и химизм реакции

Контрольные вопросы

1. Какие вещества называются гормонами?
2. Какими методами изучают действие гормонов?

3. Какие гормоны вырабатываются щитовидной и парашитовидной железами?
4. Какие гормоны образуются в передней доле гипофиза?
5. Как называются гормоны задней доли гипофиза и какую роль они играют в жизни организма?
6. Химическая природа инсулина и его действие в организме?
7. Строение и свойства адреналина и его роль в обмене веществ?
8. В чем сходство и отличие между гормонами и витаминами?

6. ФЕРМЕНТЫ

Ферментами называются соединения белковой природы, которые образуются в животных и растительных клетках и являются катализаторами всех биохимических процессов, протекающих в организме.

Все ферменты относятся к простым или сложным белкам. В простетическую группу некоторых ферментов¹, построенных по типу сложных белков, входят витамины. Так, например, в состав простетической группы желтого дыхательного фермента входит рибофлавин, в состав простетической группы фермента декарбоксилазы — тиамин и т. д.

Физико-химические свойства ферментов обусловлены их белковой природой. Ферменты не диализируют сквозь полупроницаемые перепонки, способны высаливаться и дают характерные для белка цветные реакции и реакции осаждения. При высаливании или непродолжительном воздействии спирта, эфира и ацетона ферменты не теряют каталитических свойств, что позволяет выделять ферментные препараты для практических целей (пепсин, трипсин, амилаза, липаза и др.).

Ферменты, которые удалось выделить в кристаллическом состоянии, обладают очень высокой каталитической активностью. Растворы кристаллических ферментов способны проявлять каталитические свойства при таких незначительных концентрациях фермента, при которых белковая природа фермента не может быть обнаружена обычными химическими реакциями на белок.

Ферменты являются биологическими катализаторами и, несмотря на большое сходство их с неорганическими катализаторами, имеют ряд существенных отличий, обусловленных их белковой природой. Ферменты термолабильны, действие их строго специфично, активность сильно изменяется в зависимости от рН среды, присутствия электролитов и других веществ, активирующих или парализующих действие ферментов.

Проферменты, или зимогены. Проферментами, или зимогенами, называется неактивная форма фермента,

¹ Простетической группой называется небелковый компонент сложного белка, см. стр. 35, 37.

предшествующая образованию активной формы. Механизм превращения неактивной формы в активную различен. Ферменты, у которых активная группа связана парализатором (ингибитором), активируется при отщеплении его (например, неактивные пепсиноген или трипсиноген превращаются в активные пепсин и трипсин после отщепления от каждого из них ингибитора полипептидной природы). Ферменты, у которых неактивной является окисленная форма, активируется при действии восстановителей (например, катепсин и аргиназа активируются цистеином, глутатионом, аскорбиновой кислотой и другими восстановителями). Существуют и другие пути активирования; амилаза, например, активируется хлористым натрием, липаза — желчными кислотами и т. п.

Коферменты и апоферменты. Ферменты, построенные по типу сложных белков, отличаются различной прочностью связи между простетической группой и белковым компонентом. У некоторых ферментов простетическая группа свободно диссоциирует от белкового компонента и может быть отделена от него при помощи диализа. Простетическая группа таких ферментов носит название кофермента, белковый компонент называется апоферментом, а весь активный комплекс — холоферментом. Существует и другая номенклатура, по которой простетическая группа называется агонем (агон — действующий), белковая часть — фероном (ферон — несущий), а соединение, состоящее из обоих компонентов, — симплексом. Однако эта терминология менее удачна, так как здесь каталитическая активность приписывается только простетической группе — агону, в действительности же каталитической активностью обладает белковая часть фермента. Некоторые окислительно-восстановительные ферменты имеют один и тот же кофермент и различаются своими апоферментами. Кофермент может диссоциировать от одного апофермента и присоединяться к другому. Кофермент, будучи связан с тем или иным апоферментом, взаимодействует только с определенным специфическим для данного апофермента субстратом.

А. ГИДРОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ (ГИДРОЛАЗЫ)

К классу гидролаз относятся все ферменты пищеварительного тракта и все внутриклеточные ферменты, катализирующие гидролитический распад белков, жиров и углеводов. Внутриклеточные гидролитические ферменты осуществляют, по-видимому, одновременно как распад, так и синтез всех указанных выше сложных веществ. Обратимость действия гидролитических ферментов доказана на примере липаз. Гидролитические ферменты носят названия

по тем субстратам, на которые они действуют, причем в названии субстрата окончание слова заменяется окончанием «аза». Например, фермент, катализирующий расщепление сахарозы, называется сахараза, мальтозы — мальтаза, крахмала (amylum) — амилаза и т. д. В работе используются ферменты из группы карбогидраз с тем, чтобы внимание фиксировалось на изучении свойств ферментов и не отвлеклось на знакомство с разнообразными субстратами и продуктами их распада.

Детальные сведения о характере действия отдельных представителей из класса гидролаз даны в разделах, посвященных изучению обмена жиров, углеводов и белков.

Работа № 53

Получение сахаразы из дрожжей по способу А. Н. Лебедева

Многие ферменты сравнительно легко могут быть извлечены из клеток водой, слабыми растворами нейтральных солей, кислот и щелочей, водными растворами спирта, ацетона, глицерина и др. При этом в раствор, кроме фермента, переходят различные белковые и другие сопутствующие вещества, которые затрудняют получение ферментов в чистом виде и требуют длительной дальнейшей обработки. Некоторые ферменты, как, например, сахараза, прочно связаны с элементами клеточной структуры и могут быть извлечены в раствор только после автолитического расщепления или механического разрушения клеток. В этом случае необходимо прибегать к высушиванию материала, растиранию с песком или стеклом, замораживанию жидким воздухом и к другим способам.

Ход работы. Свежие дрожжи размазывают тонким слоем на стекле и высушивают на воздухе. Сухие дрожжи соскабливают со стекла и растирают в ступке в мелкий порошок. Дрожжевой порошок в количестве 0,5 г растирают с 2 мл воды, жидкость фильтруют через маленький складчатый фильтр и употребляют как раствор фермента сахаразы (см. работу № 56). Полученная вытяжка носит название мацерационного¹ сока Лебедева.

Работа № 54

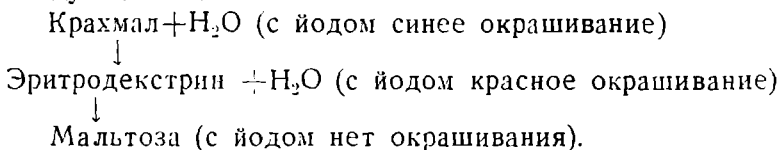
Действие амилазы на крахмал

Если к раствору крахмала прибавить незначительное количество слюны, содержащей фермент амилазу, и через определенные промежутки времени к отдельным пробам добавлять раствор йода, то жидкость окрашивается

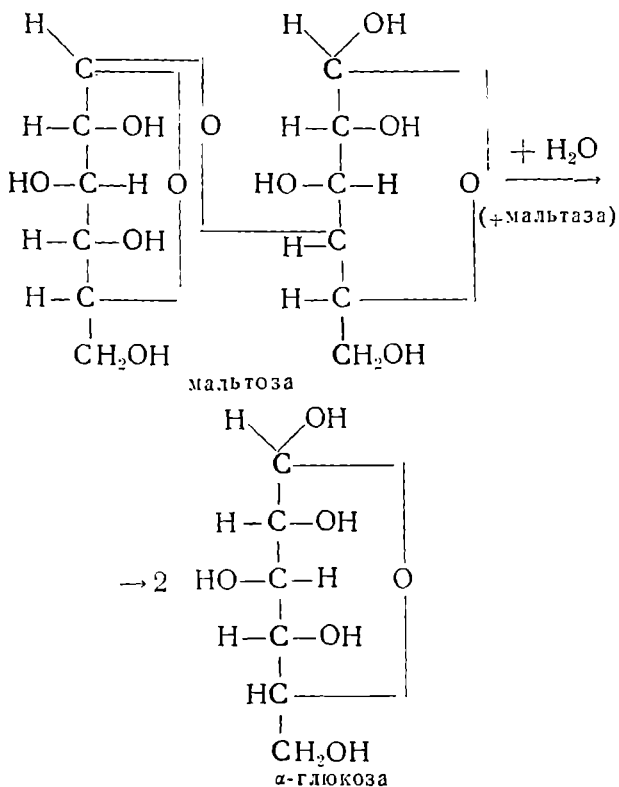
¹ Т. е. размоченного.

сначала в синий, а затем в фиолетовый, красный, оранжевый и желтый цвет¹. Изменение окраски в последовательно взятых порциях смеси обусловлено гидролитическим расщеплением крахмала амилазой слюны с образованием промежуточных продуктов распада — декстринов. Некоторые декстрины окрашиваются йодом в красный цвет.

Схема расщепления крахмала может быть представлена в следующем виде:



В слюне, кроме амилазы, присутствует фермент мальтаза, расщепляющий мальтозу на две молекулы глюкозы. Продукты гидролиза крахмала — мальтоза и глюкоза — могут быть обнаружены реакциями Троммера, Фелинга, Ниландера и др. (см. стр. 138, 139).



¹ Раствор йода в воде имеет желтый цвет.

Мальтоза и глюкоза обладают восстанавливающей способностью, так как имеют свободный полуацетальный гидроксил.

Ход работы. В 9 пробирок наливают по 2—3 мл дистиллированной воды и по 1 капле 0,1% раствора йода. В десятую пробирку наливают 5 мл 0,5% раствора крахмала, прибавляют 5 капель слюны, отмечают время, быстро перемешивают и 1—2 капли смеси переносят пипеткой в первую пробирку с раствором йода. Жидкость в пробирке окрашивается в синий цвет. Через каждые 1—5 секунд¹ из десятой пробирки берут капельные пробы во вторую, третью пробирки с раствором йода и отмечают получаемое окрашивание. Когда капля взятой пробы не изменит желтого цвета раствора йода, гидролиз считают законченным и записывают время его окончания. С жидкостью, оставшейся в десятой пробирке, проделявают реакцию Троммера или Фелинга (см. стр. 139, 140). Результаты анализа записывают в виде таблицы:

Действие амилазы на крахмал

Номера пробирок	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Окраска жидкости при смешивании с раствором йода									
Название продукта реакции									

Выводы:

Работа № 55

Термолабильность ферментов

Свойство ферментов разрушаться при кипячении является характерной особенностью, отличающей ферменты от других катализаторов, и называется термолабильностью ферментов. После непродолжительного кипячения ферменты теряют способность проявлять каталитическое действие. Потеря каталитической активности при кипячении обусловлена денатурацией фермента. При непродолжительном нагревании некоторые ферменты подвергаются обратимой денатурации (И. П. Павлов), т. е. при постепенном охлаждении снова переходят в активное состояние. Сухие препараты ферментов выдерживают нагревание до 100° без заметной потери активности. При низких температурах ферменты хорошо сохраняются. Повышение и понижение температуры сильно изменяют скорость ферментативной реакции.

¹ В зависимости от активности фермента.

Ход работы. В 2 пробирки наливают по 5 капель слюны и по 20 капель дистиллированной воды; получают слюну, разведенную в 5 раз. В одной пробирке раствор слюны кипятят в течение 2—3 минут и охлаждают под струей водопроводной воды, в другой — оставляют без кипячения. В обе пробирки добавляют по 10 капель 0,5% раствора крахмала, жидкость в пробирках перемешивают и оставляют при комнатной температуре. Через 5 минут содержимое каждой пробирки делят на две части. С одной частью прodelывают реакцию с йодом на крахмал, с другой — пробу Троммера или Фелинга на сахар (мальтоза, глюкоза; см. стр. 139, 140). В пробирке, где фермент разрушен кипячением, расщепление крахмала не происходит. Результаты работы записывают в форме таблицы.

Термоллабильность ферментов

Материал исследования	Субстрат	Контрольные реакции ¹		Чем обусловлена реакция
		на крахмал с йодом	на сахар реакция Фелинга	
Свежая слюна	Крахмал			
Прокипяченная слюна	»			

Выводы:

¹ В графе 3 и 4 следует писать «положительная», «отрицательная»

Работа № 56

Влияние температуры на скорость ферментативного катализа

Скорость ферментативной реакции закономерно увеличивается примерно вдвое с повышением температуры на каждые 10° С 45—50° начинается денатурация фермента от нагревания. Постепенное разрушение фермента приводит к тому, что скорость основного химического процесса, катализируемого ферментом, замедляется и, наконец, прекращается. Наивысшая температура, при которой сохраняются нативные свойства ферментов и действие ферментов может продолжаться длительный период времени, называется оптимальной температурой. Для большинства ферментов оптимальная температура находится в пределах 40—45°. Если опыт продолжается немногие секунды или минуты, то температурный оптимум может лежать в пределах более высоких значений (50—60°).

Ход работы. В 4 пронумерованные пробирки наливают по 10 капель 0,5% раствора крахмала и ставят первую про-

бирку в лед, вторую — в штатив при комнатной температуре (15—16°), третью — в водяную баню при температуре 45° и четвертую — при температуре 75°. В 4 другие пробирки наливают по 2—3 мл дистиллированной воды и по 1 капле 0,1% раствора йода. Через 5 минут в пробирки с крахмалом добавляют по 10 капель слюны, разведенной в 10 раз, перемешивают и оставляют стоять при температуре 0, 15, 45 и 75°. После пятиминутного действия фермента на субстрат из каждой опытной пробы отбирают по 1—2 капли жидкости в заготовленные пробирки с йодом. В случае, если во всех пробирках жидкость окрашивается в синий цвет, реакцию с йодом повторяют через следующие 5 минут во вновь заготовленных пробирках.

Различная окраска при реакции с йодом, а следовательно, различная степень гидролиза крахмала обусловлены различной скоростью ферментативного катализа при разных температурных условиях опыта. Максимальная скорость ферментативной реакции наблюдается при t 45°, а минимальная — при t 0° и 75°.

В работе важно уловить нужный момент для йодной пробы, так как при более длительном гидролизе полное расщепление крахмала может произойти и при более низкой температуре опыта. Результаты работы фиксируют в таблице.

Влияние температуры на действие фермента

	0°	15°	45°	
Окраска исследуемого раствора при реакции с йодом				
Название окрашенного продукта				

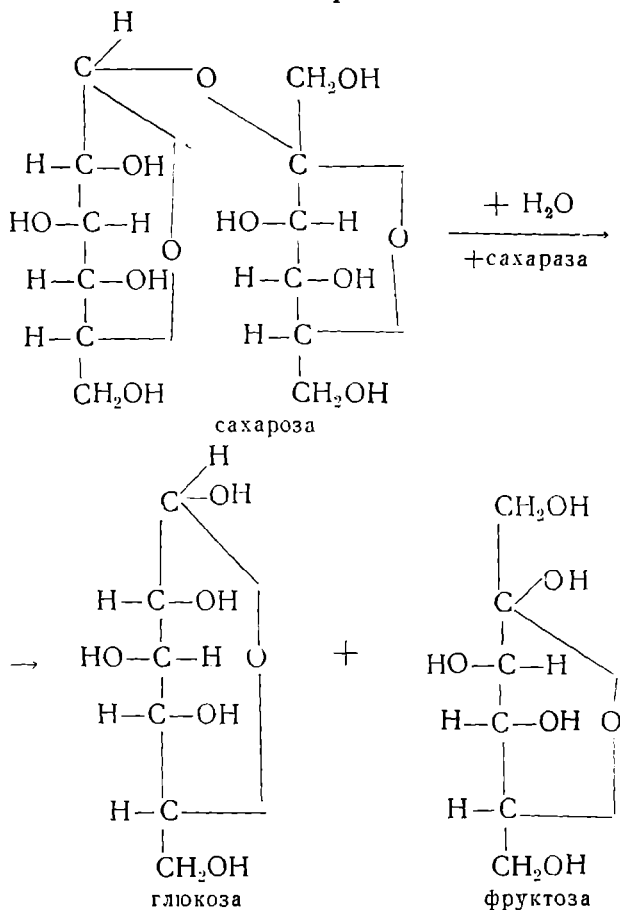
Выводы:

Работа № 57

Специфичность ферментов

Специфичностью называется способность ферментов ускорять отдельные химические реакции только между строго определенными веществами. Специфичность проявляется в том, что каждый фермент действует только на определенный субстрат. Так, например, амилаза расщепляет полисахарид крахмал и не действует на дисахариды мальтозу и сахарозу. Сахараза расщепляет сахарозу и не расщепляет ни крахмал, ни другие дисахариды.

Уравнение реакции гидролитического расщепления сахарозы:



Ход работы. В 2 пробирки наливают по 10 капель 0,5% раствора крахмала и добавляют в первую пробирку 5 капель разведенной в 5 раз слюны (амилаза), во вторую — 5 капель вытяжки из дрожжей¹ (сахараза), перемешивают и оставляют при комнатной температуре (или ставят в баню при температуре 38—40°). В 2 другие пробирки наливают по 10 капель 0,5% раствора сахарозы (свекловичного сахара) и в первую пробирку добавляют 5 капель вытяжки из дрожжей, во вторую — 5 капель разведенной в 5 раз слюны и оставляют при тех же условиях. Через 5 минут в первые две пробирки с крахмалом добавляют по одной капле 0,1%

¹ Получение вытяжки см. работу № 53.

раствора йода и отмечают окрашивание. С содержимым двух других пробирок (опыт с сахарозой) прodelьвают реакции Троммера или Фелинга (стр. 139, 140). Действие ферментов обнаруживается либо по исчезновению субстрата, либо по появлению продуктов расщепления (мальтоза, глюкоза, фруктоза). Следует иметь в виду, что сахароза не имеет свободных полуацетальных гидроксильных групп и реакции восстановления не дает, в то время как продукты ее гидролиза — глюкоза и фруктоза — обладают восстанавливающей способностью. Результаты работы фиксируют в таблице.

Специфичность ферментов

№ опыта	Фермент	Субстрат	Контрольные реакции ¹	
			реакция с йодом на присутствие исходного субстрата	реакция Фелинга на присутствие продуктов расщепления
1	Амилаза (слюны)	Крахмал		
2	Сахараза (дрожжей)	Крахмал		
3	Сахараза (дрожжей)	Сахароза		
4	Амилаза (слюны)	Сахароза		

Выводы:

¹ В графе 4 и 5 пишут слова «положительная», «отрицательная».

Работа № 58

Влияние pH среды на активность амилазы ✓

Активность ферментов проявляется в пределах довольно узкой зоны pH, называемой оптимумом pH. Влияние pH среды на активность фермента обусловлено, по-видимому, тем, что из всех возможных ионных форм, в виде которых существует фермент, каталитической активностью обладает только одна форма, которая преобладает в оптимуме pH. Это справедливо только для тех случаев, когда сам субстрат не диссоциирует (крахмал, сахароза и др.). В случае, когда фермент действует на диссоциирующие субстраты (белковые вещества), изменение pH среды влияет одновременно на ионизацию и фермента, и субстрата и при замене одного субстрата другим характер кривой меняется. Оптимум pH для действия амилазы слюны равен 6,8.

Ход работы. В 7 пробирок наливают растворы 0,2 М двузамещенного фосфорнокислого натрия и 0,1 М лимонной кислоты в количествах, указанных в таблице. Получают буферные растворы с pH от 5,6 до 8,0.

В каждую пробирку добавляют по 10 капель 0,5% раствора крахмала и по 10 капель слюны, разведенной в 100 раз

Влияние pH среды на активность амилазы слюны

№ проб	Количество мл 0,2 М раствора Na ₂ НРО ₄	Количество мл 0,1 М раствора лимонной кислоты	pH смеси	Количество 0,5% раствора крахмала	Количество разведенной 1 : 100 слюны (амилаза)	Окрашивание (реакция с йодом)
1	0,58	0,42	5,6	10 капель	10 капель	
2	0,63	0,37	6,0	10	10	
3	0,69	0,31	6,4	10	10	
4	0,77	0,23	6,8	10	10	
5	0,87	0,13	7,2	10	10	
6	0,94	0,06	7,6	10	10	
7	0,97	0,03	8,0	10	10	

Выводы:

(1 100). Содержимое пробирок перемешивают и оставляют при комнатной температуре (или в бане при температуре 38°, если фермент недостаточно активен). Через 5 минут из четвертой пробирки, в которой pH среды предполагается оптимальным для амилазы, берут капельную пробу для реакции с йодом¹. Если получают синее окрашивание, пробу повторяют через следующие 5 минут. Когда в капельной пробе будет получено красное или желтое окрашивание, во все пробирки добавляют по одной капле 0,1% раствора йода, содержимое пробирок перемешивают и наблюдают окраску. Оптимум pH для действия амилазы определяют по той пробирке, в которой произошло более глубокое расщепление крахмала (при реакции с раствором йода получается красная или желтая окраска). Результаты работы фиксируют в таблице (см. выше).

Работа № 59

Влияние активаторов и парализаторов на действие амилазы

Активаторами и парализаторами называются вещества, которые способны ускорять или тормозить действие ферментов. Механизм действия активаторов и парализаторов не всегда ясен. В некоторых случаях в отсутствии активатора действие фермента совершенно не проявляется. Например, амилаза после диализа полностью теряет способность расщеплять крахмал и вновь ее приобретает после добавления хлористого натрия.

Активаторами и парализаторами часто пользуются в биохимических исследованиях для изучения действия отдельных ферментов, имеющих в тканях. Прибавлением различных

¹ Для реакции заготавливают пробирку с 2—3 мл дистиллированной воды и с 1 каплей 0,1% раствора йода.

ядов удается заблокировать активные центры одних ферментов, не изменяя при этом действия других. Если к отдельным порциям переваривающей смеси, содержащей крахмал и амилазу, прибавить к одной раствор хлористого натрия, к другой — воду и к третьей — раствор сернокислой меди, то через некоторое время при добавлении йода жидкость в пробе с NaCl окрасится в желтый цвет, в контрольной пробе с H₂O — в красный, а в пробе с CuSO₄ — в синий. Различная окраска жидкости обусловлена не одинаковой степенью гидролиза крахмала и свидетельствует об активизирующем влиянии хлористого натрия и парализующем влиянии медного купороса на действие амилазы.

Ход работы. В 3 пробирки наливают: в первую — 10 капель дистиллированной воды, во вторую — 8 капель H₂O + 2 капли 1% раствора NaCl, в третью — 8 капель H₂O + 2 капли 1% раствора CuSO₄. В каждую пробирку приливают по 10 капель слюны, разведенной 1:5, перемешивают, добавляют 5 капель 0,5% раствора крахмала, вновь перемешивают и оставляют при комнатной температуре. Через 5 минут в 3 пробирки с водой, подкрашенной каплей раствора йода, отливают по 2—3 капли содержимого каждой опытной пробирки. В первой пробирке жидкость окрашивается в фиолетовый или красный цвет, во второй — в красный или желтый, в третьей — в синий. Результаты работы фиксируют в таблице.

Влияние активаторов и парализаторов на действие амилазы¹

№ пробы	Фермент	Субстрат	Время действия фермента (в мин.)	Окраска жидкости после добавления йода в присутствии		
				H ₂ O	NaCl	CuSO ₄
1	Амилаза (слюна)	Крахмал	5			
2	То же		10			
3	» »		15			

Выводы:

¹ В графах 5, 6 и 7 записывают наблюдаемую окраску жидкости после добавления раствора йода — «синяя», «красная», «желтая».

Работа № 60

Количественное определение активности амилазы слюны по методу Вольгемута

Метод определения амилазной активности по Вольгемуту относится к «пороговым». Он основан на определении минимального «порогового» количества фермента, которое способно при определенных условиях опыта расщепить 1 мл

0,1% раствора крахмала. Это минимальное количество фермента принимают за единицу амилазной активности.

Амилазная активность слюны (амилокластическая сила слюны) выражается количеством миллилитров 0,1% раствора крахмала, которое может расщепить 1 мл неразведенной слюны при температуре 38° в течение 30 минут.

Ход работы. Заготавливают 2 ряда из 6 одинаковых пронумерованных пробирок. В каждую пробирку наливают из бюретки по 1 мл дистиллированной воды. В первую пробирку первого ряда добавляют из пипетки 1 мл слюны, разведенной в 10 раз¹. Содержимое первой пробирки перемешивают путем троекратного втягивания и выпускания жидкости из пипетки и 1 мл смеси переносят во вторую пробирку. Содержимое второй пробирки перемешивают тем же способом и 1 мл смеси переносят в третью пробирку и т. д.; из шестой пробирки 1 мл смеси выбрасывают. Таким же образом производят разведение слюны во втором ряду пробирок. В каждом ряду получают разведение фермента в 20, 40, 80 и т. д. раз.

Во все пробирки первого ряда добавляют по 1 мл воды, в пробирки второго ряда — по 1 мл 0,1% раствора хлористого натрия. Во все пробирки добавляют из бюретки по 2 мл 0,1% раствора крахмала (начиная с последних, где концентрация фермента наименьшая). Содержимое перемешивают и пробирки помещают в водяную баню при температуре 38° на 30 минут. Через 30 минут пробирки вынимают и доливают почти доверху водопроводной водой², добавляют по 1 капле 1% раствора йода и содержимое пробирок перемешивают. Жидкость в пробирках окрашивается в желтый, красный и синий цвет. Желтое окрашивание свидетельствует о полном расщеплении крахмала. В каждом ряду отмечают наибольшее разведение слюны, при котором произошло полное расщепление крахмала, и рассчитывают амилазную активность в отсутствие и в присутствии NaCl.

Амилокластическую силу слюны выражают количеством миллилитров 0,1% раствора крахмала, которое может расщепить 1 мл неразведенной слюны в данных условиях опыта, т. е. при температуре 38° в течение 30 минут. Например, в первом ряду третья пробирка окрашена в желтый цвет. Она содержит слюну в разведении 1/80. Это количество слюны способно расщепить 2 мл 0,1% раствора крахмала, а 1 мл слюны в тех же условиях расщепит:

$$x = \frac{2 \cdot 80}{1} = 160,$$

т. е. 160 мл крахмала. $A_{30}^{38^\circ} = 160$.

¹ Для разведения в 10 раз к 1 мл слюны добавляют 9 мл дистиллированной воды.

² Быстрое охлаждение прекращает ферментативный процесс.

Амилокластическая сила слюны в присутствии хлористого натрия выразится несколько большей величиной.

Контрольные вопросы

1. Что такое ферменты?
2. Какова химическая природа ферментов?
3. Каковы общие свойства ферментов?
4. Что такое апофермент и кофермент?
5. Что называется проферментом?
6. Какие вещества называются активаторами и парализаторами ферментов? Приведите пример.
7. Какие существуют способы выделения и очищения ферментов?
8. По какому принципу классифицируются ферменты?
9. Что такое гидролазы и на какие основные группы они подразделяются?
10. По каким признакам можно судить о действии фермента?
11. Какие существуют методы количественного определения ферментативной активности?

Б. ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТЫ

К группе окислительно-восстановительных ферментов относятся ферменты, катализирующие окисление органических веществ, образующихся в организме главным образом в результате гидролитического распада белков, жиров и углеводов.

Окисление представляет собой сложный химический процесс. В этом процессе участвует большое количество последовательно действующих ферментов, из которых каждый катализирует какую-то одну определенную реакцию.

Более детальные сведения о путях превращения отдельных органических соединений даны в разделах, посвященных изучению обмена веществ. В настоящем разделе рассматриваются только отдельные окислительно-восстановительные ферменты и ферментные системы. Окисление органических веществ, т. е. потеря ими электронов и протонов, всегда сопровождается восстановлением других веществ, к которым электроны и протоны присоединяются.

Вещества, отдающие электроны и протоны, т. е. окисляющиеся, называются донаторами водорода, вещества, принимающие их, т. е. восстанавливающиеся, — акцепторами. Ферменты, катализирующие перенос электронов и протонов (перенос водорода), оказываются специфичными как по отношению к водородному акцептору, так и по отношению к донаторам водорода.

В зависимости от того, какое вещество является первым акцептором водорода (т. е. электронов и протонов) — кислород, перекись водорода или какое-либо другое органическое вещество, окислительно-восстановительные ферменты подразделяются на три большие группы: оксидазы, перок-

сидазы и дегидразы. Каждая группа включает большое количество ферментов, действующих на различные субстраты. Названия ферментов происходят от названия окисляемого субстрата, к которому присоединяются слова «оксидаза», «пероксидаза» или «дегидраза», например, полифенолоксидаза, цитохромоксидаза, сукциндегидраза и т. д.

Присутствие окислительно-восстановительных ферментов в растительных и животных тканях и биологических жидкостях может быть обнаружено по их действию на соответствующие субстраты. При изучении действия окислительно-восстановительных ферментов результаты исследования удобно заносить в следующую таблицу:

Окислительно-восстановительные ферменты

Название фермента	Химическая природа простетической группы	Биологический материал, содержащий фермент	Окисляющееся вещество (донатор водорода)	Восстанавливаемое вещество (акцептор водорода)	Продукты реакции и окраска

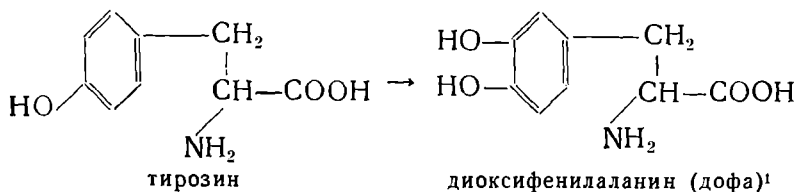
ОКСИДАЗЫ

Оксидазами называются ферменты, катализирующие реакции окисления органических веществ кислородом воздуха. По химической природе оксидазы являются металлопротеидами. В состав их простетической группы входит медь или железо. При окислении и восстановлении металлы простетических групп меняют свою валентность, отдавая электроны молекулярному кислороду и принимая их снова от окисляемого вещества. Наиболее изученными представителями этого класса соединений являются:

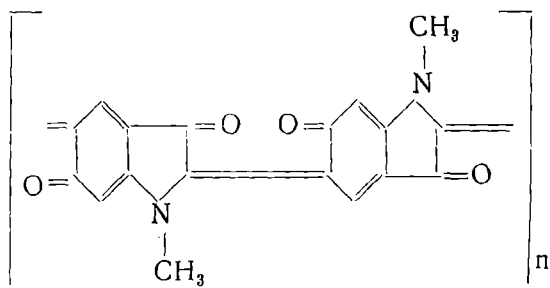
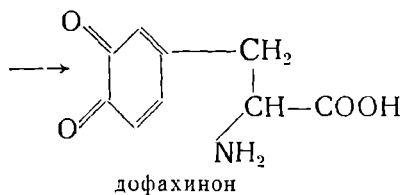
- 1) моно- и полифенолоксидазы;
- 2) цитохромоксидаза и др.

Тирозиназа

К группе фенолоксидаз относится тирозиназа. Она катализирует реакцию окисления тирозина и других производных фенола газообразным кислородом с образованием красного пигмента галахрома, который затем превращается в темный пигмент, родственный естественным меланинам.



¹ Диоксифенилаланин — сокращенно дофа.



Тирозиназа широко распространена в растительных клетках; она находится также в отдельных тканях и органах животных.

По химической природе тирозиназа является медьпротеидом, содержащим около 0,20—0,25% меди. В отличие от монофенолоксидаз тирозиназа катализирует окисление не только монофенолов, но и полифенолов, т. е. обладает групповой (относительной) специфичностью. В организме животных и человека фермент тирозиназа катализирует превращение адреналина в физиологически неактивный красный пигмент адренохром. Последний, конденсируясь, превращается в бурый пигмент меланин. Бронзовый цвет кожи при заболеваниях надпочечника (аддисонова болезнь) обусловлен образованием избыточного количества меланина.

Работа № 61

Получение тирозиназы из картофеля

Ход работы. Мелкоизмельченный картофель в количестве 0,5—1 г растирают в фарфоровой ступке с 3 мл дистиллированной воды и фильтруют через два слоя марли. Фильтрат содержит фермент тирозиназу.

**Окисление тирозина кислородом
в присутствии тирозиназы**

Если к раствору тирозина прибавить вытяжку из картофеля, содержащую фермент тирозиназу, и смесь для контакта с воздухом встряхивать, то жидкость через некоторое время постепенно окрашивается в розовый, бурый и, наконец, в черный цвет.

Реакция обусловлена окислением тирозина кислородом воздуха и протекает благодаря каталитическому действию тирозиназы. В процессе окисления из тирозина образуется красный пигмент галахром и затем темный пигмент меланин.

Ход работы. В две пробирки наливают по 1 мл вытяжки из картофеля (см. работу № 61), содержащей фермент тирозиназу. Содержимое одной пробирки кипятят 1—2 минуты и охлаждают в стакане с холодной водой. В обе пробирки добавляют по 5—10 капель 0,1% раствора тирозина¹, перемешивают и обе пробирки помещают в баню при температуре 40—45°. Каждые 5 минут пробирки вынимают и содержимое их сильно встряхивают. Жидкость в пробирке с активной вытяжкой постепенно принимает сначала розовую, затем бурую и черную окраску. В контрольной пробе с прокипяченной вытяжкой цвет жидкости не изменяется.

Аналогичную работу можно проделать, взяв вместо тирозина 0,1% раствор адреналина.

Работа № 63

**Окисление гваяковой кислоты кислородом
в присутствии тирозиназы**

Ход работы. На поверхность разреза сырого и вареного картофеля наносят по 1—2 капли свежеприготовленного 1% спиртового раствора гваяковой смолы. Через 1—2 минуты на поверхности сырого картофеля, особенно по краям околокожуры, появляется синее окрашивание. В параллельном опыте с вареным картофелем изменения окраски не наблюдается.

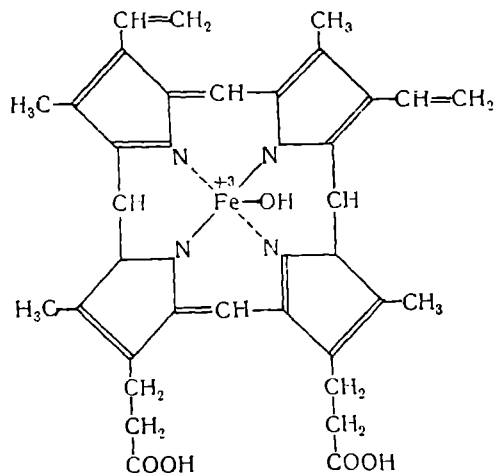
Реакция обусловлена образованием окрашенного в синий цвет продукта окисления — озонида гваяковой смоляной кислоты.

Цитохромоксидаза и цитохромы

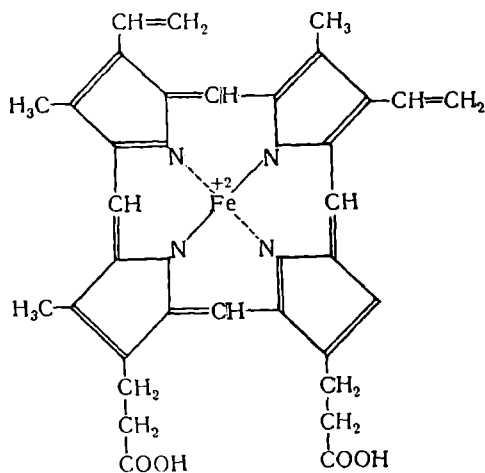
Цитохромоксидаза и цитохромы являются ферментами геминовой природы и имеют одинаковую простетическую

¹ 0,1 г тирозина растворяют при слабом нагревании в 100 мл 0,01 н. раствора соды.

группу, но различные белковые компоненты. Известен ряд цитохромов, из которых наиболее изучены три, обозначаемые латинскими буквами — а, в и с, и цитохромоксидаза, называемая также геминным дыхательным ферментом. Каталитические свойства геминных ферментов обусловлены присутствием в их молекуле железа, которое, принимая и отдавая электроны, попеременно окисляется и восстанавливается.



гем окисленный



гем восстановленный

В некоторых случаях переброска электронов от окисляемого вещества осуществляется последовательно с помощью трех цитохромов и заканчивается цитохромоксидазой, способной непосредственно реагировать с молекулярным кислородом и восстанавливать его. В присутствии цитохромов (а, в, с) и газообразного кислорода цитохромоксидаза катализирует окисление аминов и фенолов, например пара-фенилендиамина, гидрохинона, пирокатехина, адреналина и др.

Цитохромоксидаза находится во всех клетках растительного и животного организма. Фермент прочно связан с клеточной структурой и при извлечении ткани водой не переходит в водную вытяжку. Цитохромоксидаза очень чувствительна к действию синильной кислоты, сероводорода и к нагреванию (инактивируется при температуре 55—60°).

Работа № 64

Получение препарата, содержащего цитохром и цитохромоксидазу

Ход работы. 300 мг хорошо измельченной свежей мышечной ткани экстрагируют в фарфоровой ступке 20-кратным объемом дистиллированной воды. Ткань фильтруют через марлю и экстракцию повторяют еще 2 раза. Отмытая от редуцирующих веществ мышечная кашица содержит цитохром, цитохромоксидазу и некоторые другие ферменты, прочно связанные с клеточной структурой¹ (например, сукциндегидразу).

Работа № 65

Окисление реактива «нади»² кислородом воздуха в присутствии цитохрома и цитохромоксидазы

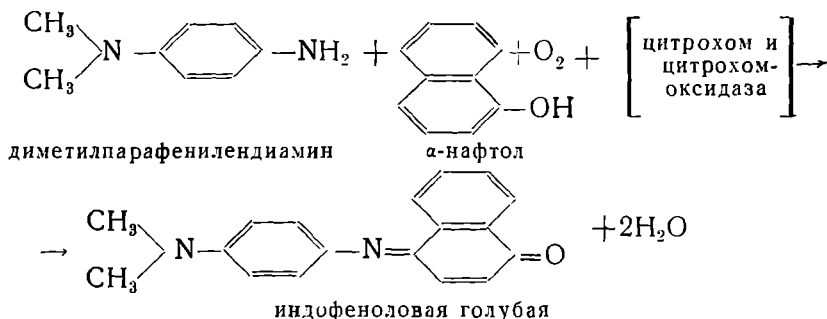
Если мышечную ткань, содержащую цитохром и цитохромоксидазу, смочить реактивом «нади», то в присутствии кислорода воздуха ткань окрашивается в синий цвет.

Реакция обусловлена окислением реактива «нади» кислородом воздуха благодаря каталитическому действию цитохрома и цитохромоксидазы. При окислении реактива «нади» образуется индофеноловая голубая — синего цвета.

¹ Для сохранения препарата к мышечной кашице прибавляют несколько капель толуола и помещают в холодильник.

² Название «нади» образовано из первых слогов двух слов нафтол и диамин, так как реактив состоит из α -нафтола и пара-фенилендиамина.

Реакция протекает по следующему уравнению:



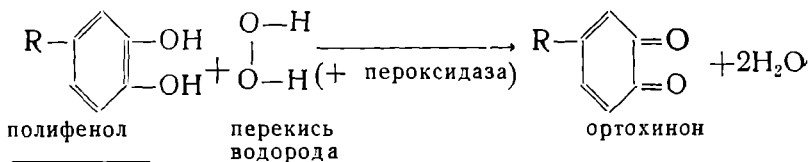
Ход работы. Часть промытой мышечной кашицы (около 50 мг) помещают на кусочек фильтровальной бумаги и добавляют 1—2 капли реактива «нади»¹. Через 3—5 минут появляется синее или зеленовато-синее окрашивание, обусловленное образованием индофеноловой голубой. Другую часть промытой мышечной ткани (около 50 мг) нагревают в кипящей водяной бане (в пробирке или тигле) в течение 5 минут, охлаждают и переносят на кусочек фильтровальной бумаги. При добавлении реактива «нади» окраска не появляется, так как фермент инактивирован при нагревании.

ПЕРОКСИДАЗЫ И КАТАЛАЗА

Пероксидазами называются ферменты, которые катализируют окисление некоторых фенолов, полифенолов и ароматических аминов перекисью водорода или органическими перекисями². Участвующая в реакции перекись водорода образуется в организме в результате действия аэробных дегидраз (см. ниже).

Органические перекиси возникают при окислении кислородом воздуха легко окисляющихся веществ, например терпенов, каротиноидов и непредельных жирных кислот.

Реакция окисления полифенола перекисью водорода может быть представлена следующим уравнением:

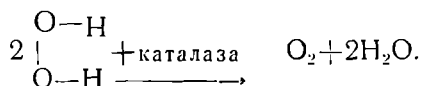


¹ Реактив «нади» нестойк, поэтому его готовят перед употреблением: смешивают 5 капель 1% водного раствора диметилпарафенилендиамина с 5 каплями 1% спиртового раствора α-нафтола.

² В присутствии перекиси водорода и пероксидазы быстро окисляются пирогаллол, гваякол, гидрохинон, пирокатехин, крезол, тирозин, адренилин, ортофенилендиамин, бензидин и др.

Пероксидазы широко распространены в растительных и животных тканях.

Каталаза обладает способностью разлагать перекись водорода на молекулярный кислород и воду:



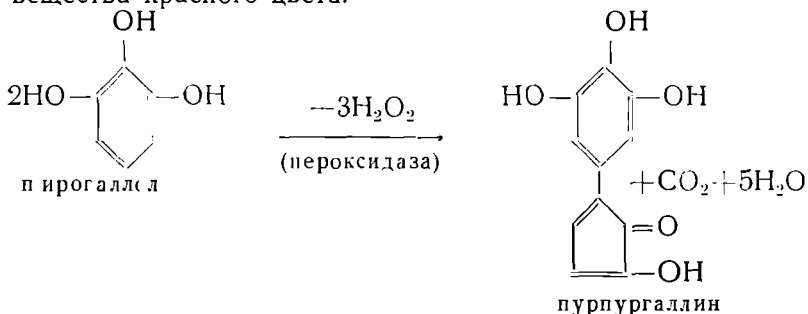
По химической природе пероксидаза и каталаза являются геминовыми ферментами и отличаются друг от друга и от цитохромов своими белковыми компонентами.

Работа № 66

Окисление пирогаллола перекисью водорода в присутствии пероксидазы

Если к раствору пирогаллола прибавить раствор перекиси водорода и вытяжку из хрена, содержащую фермент пероксидазу, то при стоянии образуется красный осадок.

Реакция обусловлена окислением пирогаллола перекисью водорода с образованием пурпургаллина — нерастворимого вещества красного цвета.



Ход работы. В пробирку наливают 2 мл вытяжки из хрена, кипятят и охлаждают. В 4 пронумерованные пробирки наливают по 20 капель 2% водного раствора пирогаллола и добавляют: в первую и четвертую — 20 капель свежей вытяжки из хрена, во вторую — 20 капель прокипяченной и охлажденной вытяжки, в третью — 20 капель дистиллированной воды. Затем в первую, вторую и третью пробирки добавляют по 2 капли 1% раствора перекиси водорода, взбалтывают и наблюдают за образованием красного осадка — пурпургаллина.

Осадок образуется только в той пробирке, где присутствуют оба субстрата (пирогаллол и перекись водорода) и активный фермент (пероксидаза).

Окисление гваяковой кислоты перекисью водорода в присутствии пероксидазы

Если к раствору гваяковой смолы добавить перекись водорода и вытяжку из хрена, содержащую фермент пероксидазу, жидкость окрашивается в синий цвет. Реакция обусловлена окислением гваяковой смоляной кислоты перекисью водорода под влиянием пероксидазы в озонид гваяковой кислоты синего цвета. Аналогичная реакция получается с разбавленной кровью (см. хромопротеиды, стр. 42). Общность реакций у пероксидазы и гемоглобина обусловлена одинаковым строением их простетических групп. Различие заключается в том, что пероксидаза после кипячения теряет свою каталитическую активность, а гемоглобин и после кипячения сохраняет ее.

Ход работы. В 2 пробирки наливают по 5 капель 1% спиртового раствора гваяковой смолы и по 5 капель 1% раствора перекиси водорода. В первую пробирку добавляют 5 капель свежей вытяжки из хрена, во вторую — столько же прокипяченной вытяжки. Содержимое пробирок перемешивают. В первой пробирке жидкость окрашивается в синий цвет, во второй — остается без изменения (фермент разрушен при кипячении).

Работа № 68

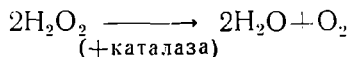
Разложение перекиси водорода каталазой крови

Ход работы. В пробирку наливают 10—20 капель 1% раствора перекиси водорода и добавляют 1 каплю крови. Происходит бурное выделение кислорода: жидкость вспенивается, и пена заполняет всю пробирку.

Работа № 69

Газометрический метод определения каталазной активности

Метод основан на измерении объема кислорода, образовавшегося в результате расщепления перекиси водорода под действием каталазы. Реакция протекает по следующему уравнению:



Прибор (рис. 9) состоит из сосуда *A*, внутри которого впаивают стаканчик, измерительной бюретки *B*, вспомогательной трубки и груши. Все части прибора соединены между собой каучуковыми трубками и представляют герметическую систему сообщающихся сосудов.

Сосуд *A* и измерительная бюретка *B* соединены при помощи тройника *B*, один конец которого посредством зажима позволяет разъединять и соединять газовое пространство прибора с атмосферным воздухом.

Ход работы. Навеску в 100 мг свежих зеленых листьев тщательно растирают в фарфоровой ступке с 10—20 мг углекислого кальция до получения однородной массы. Углекислый кальций применяют для нейтрализации органических кислот и для создания оптимальных условий среды для действия каталазы ($\text{pH} = 7,0$). В пробирку отмеривают 10 мл дистиллированной воды. Небольшую порцию воды (2—3 мл) добавляют в ступку и продолжают растирание. Полученную взвесь с помощью глазной пипетки количественно переносят в сосуд *A*. Ступку и пестик ополаскивают 2—3 раза небольшими порциями ранее отмеренной воды и промывные воды количественно переносят той же пипеткой в сосуд *A*. Сосуд закрывают пробкой и оставляют на 30 минут при комнатной температуре, время от времени осторожно перемешивая содержимое сосуда легкими вращательными движениями.

По истечении получаса во внутренний стаканчик сосуда *A* наливают 2 мл 3% нейтрализованного раствора перекиси водорода и сосуд плотно закрывают пробкой. В грушу наливают воду (водопроводную), открывают зажим на тройнике для сообщения прибора с атмосферным воздухом и, поднимая грушу, заполняют измерительную бюретку водой до нулевого деления. Когда жидкость во всех сосудах установится на одном уровне с нулевым делением измерительной бюретки, зажим закрывают.

Для проверки герметичности прибора грушу опускают, в бюретке создается пониженное давление и уровень воды опускается на 3—4 мл. Грушу вновь поднимают до тех пор, пока уровень воды в измерительной бюретке вновь установится на нулевом делении. Если прибор герметичный, то жидкость и в других сосудах устанавливается на том же уровне. В противном случае одинаковый уровень жидкости

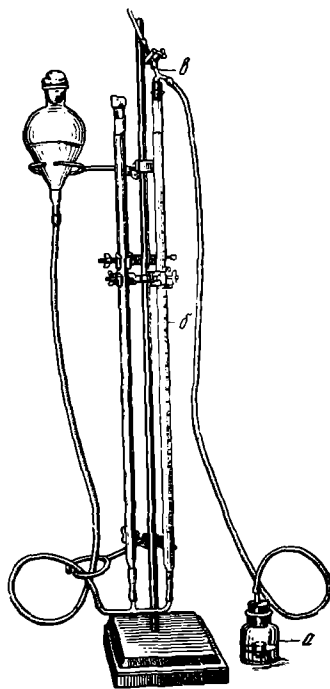


Рис. 9. Прибор для газометрического определения каталазной активности.

во всех сосудах устанавливается ниже или выше нулевого деления.

После того как проверена герметичность прибора, грушу закрепляют в кольце в нижней части прибора. Затем вращательными движениями сосудика, не нарушая герметичности прибора, перемешивают содержимое сосудика и внутреннего стаканчика (т. е. вытяжку из листьев и перекись водорода) и замечают время начала опыта. Через каждые 5 минут измеряют количество выделившегося кислорода. Для этого грушу поднимают так, чтобы мениски воды в измерительной бюретке, вспомогательной трубке и груше были на одном уровне. Результаты измерений записывают в таблице.

Определение каталазной активности

Время (в минутах)	Объем выделившегося O_2 (в мл)
5	
10	
15	

Выводы:

ДЕГИДРАЗЫ

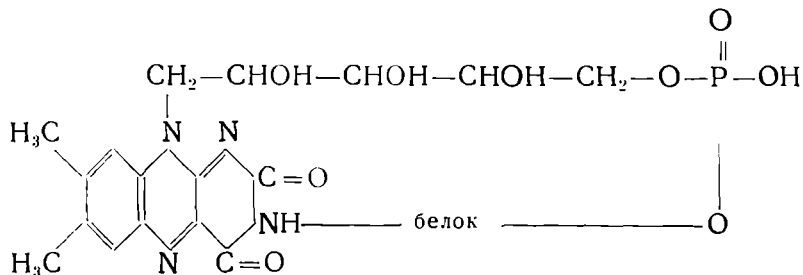
Дегидразами называются ферменты, катализирующие перенос водорода, т. е. электронов и протонов, с окисляемого субстрата на соответствующий акцептор. Акцептором водорода может быть либо кислород, либо какое-нибудь другое вещество, содержащееся в тканях. В условиях эксперимента для изучения действия дегидраз пользуются легко обесцвечивающимися при восстановлении красками (например, метиленовой синью). Дегидразы подразделяются на две большие группы: аэробные дегидразы и анаэробные дегидразы.

Аэробные дегидразы

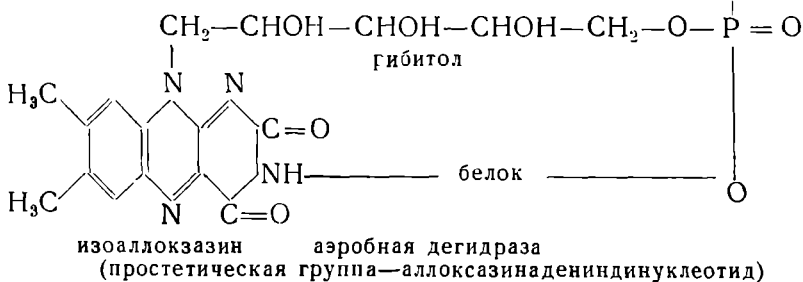
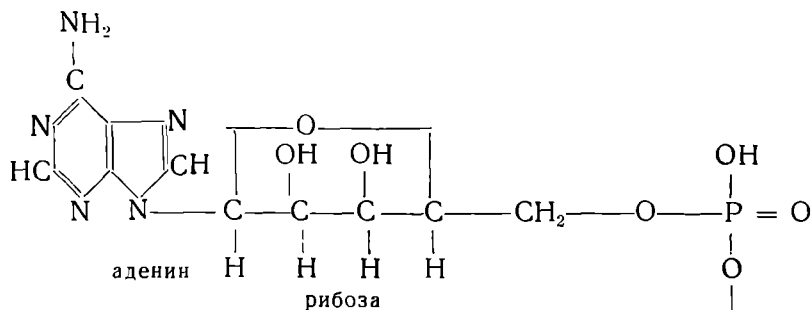
Аэробные дегидразы передают электроны и протоны от окисляемого субстрата или от восстановленной формы анаэробной дегидразы кислороду воздуха (или в экспериментальных условиях метиленовой сини). При определенных условиях аэробные дегидразы могут передавать электроны и протоны не только кислороду воздуха, но и полифенолоксидазной или цитохромной системам. В отличие от оксидаз, катализирующих окисление субстрата с образованием молекул воды, при действии аэробных дегидраз конечным продуктом реакции является перекись водорода. Разрушение перекиси водорода в организме осуществляется при участии геминных

ферментов — каталазы и пероксидазы. Если перекись водорода не удаляется из сферы реакции, то действие аэробных дегидраз прекращается.

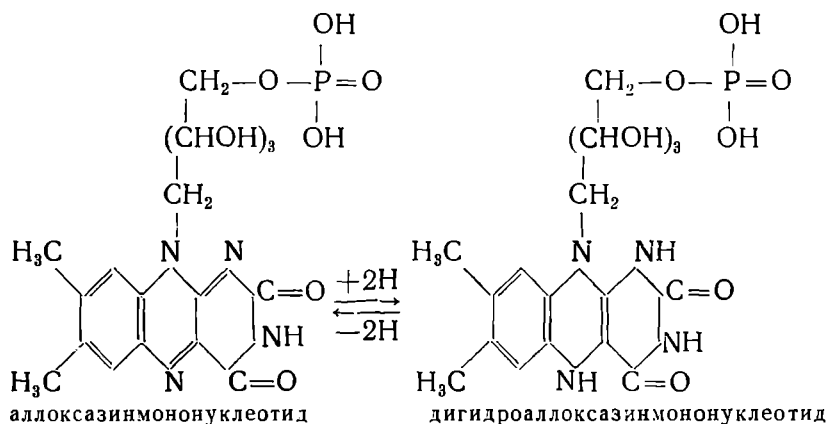
По химической природе аэробные дегидразы относятся к флавопротеидам и имеют в качестве простетической группы вещества, окрашенные в желтый цвет и построенные по типу аллоксазинмононуклеотида или аллоксазинадениндинуклеотида. Аллоксазинмононуклеотид состоит из изоаллоксазина, спирта рибитола и фосфорной кислоты и представляет собой фосфорилированный рибофлавин. Аллоксазин-адениндинуклеотид построен из двух мононуклеотидов: аллоксазинового и аденилового. Строение аэробных дегидраз может быть представлено в следующем виде:



аэробная дегидраза
(простетическая группа—аллоксазинмононуклеотид)



При восстановлении аллоксазиннуклеотиды превращаются в дигидроаллоксазиннуклеотиды. Реакция восстановления может быть изображена следующим образом:



Реакция окисления протекает в обратном направлении.

К аэробным дегидразам относятся ксантиндегидраза, d-аминокислотдегидраза, l-аминокислотдегидраза, глициндегидраза и др., а также желтый фермент и диафораза, являющиеся переносчиками электронов и протонов от анаэробных дегидраз к молекулярному кислороду.

В качестве примера аэробной дегидразы может быть приведена ксантиндегидраза, называемая также альдегиддегидразой.

Ксантиндегидраза

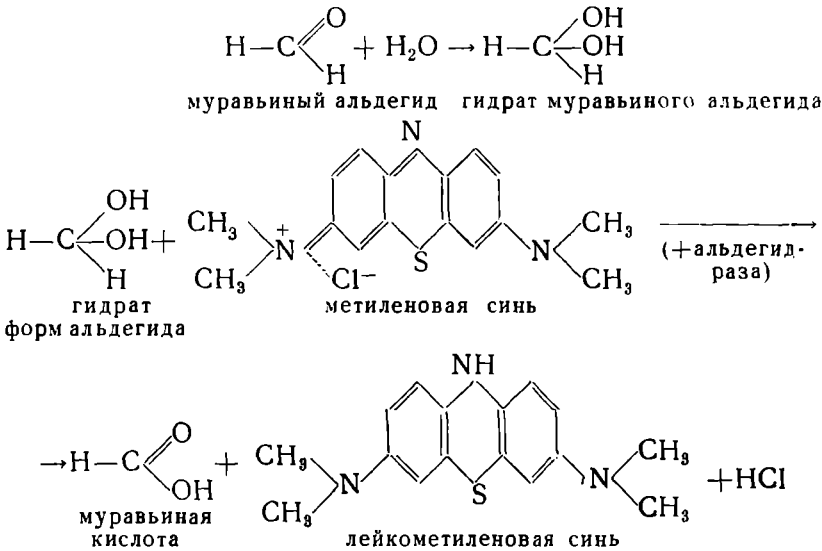
Ксантиндегидраза, или альдегиддегидраза, катализирует окисление гидратированной формы гипоксантина в ксантин и ксантина в мочевую кислоту. Она способна окислять не только указанные выше пурины, но и ароматические и алифатические альдегиды в соответствующие кислоты. Так, например, формальдегид окисляется молекулярным кислородом при участии ксантиндегидразы с образованием муравьиной кислоты и перекиси водорода. Ксантиндегидраза содержится в молоке, а также в растительных и животных тканях.

В анаэробных условиях ксантиндегидраза способна окислить субстраты за счет восстановления метиленовой сини и других красок, например индиго, индофенола и др. Оптимум активности ксантиндегидразы лежит в широком диапазоне pH (от 5,5 до 8,5).

**Окисление формальдегида метиленовой синью
в присутствии ксантиндегидразы (альдегидразы)
молока**

Если к свежему молоку, содержащему фермент ксантиндегидразу (альдегидразу), добавить формальдегид и метиленовую синь и смесь изолировать от доступа кислорода, то, спустя некоторое время, синее окрашивание исчезает.

Реакция обусловлена восстановлением метиленовой сини в лейкоформу за счет окисления формальдегида в муравьиную кислоту и происходит благодаря каталитическому действию фермента ксантиндегидразы:



Ход работы. В 2 пробирки наливают по 1 мл свежего молока, в третью — 1 мл прокипяченного и охлажденного молока. В первую и третью пробирки наливают по 1 капле смеси формальдегида и метиленовой сини, а во вторую — 1 каплю водного раствора метиленовой сини. Жидкость во всех трех пробирках покрывают слоем вазелинового масла (5 капель) и пробирки помещают в водяную баню при температуре 40°. Через некоторое время в первой пробирке жидкость обесцвечивается, во второй и третьей она остается окрашенной в синий цвет.

Анаэробные дегидразы

Анаэробные дегидразы в отличие от аэробных дегидраз неспособны реагировать непосредственно с молекулярным кислородом.

Анаэробные дегидразы передают отнятые от субстрата электроны и протоны молекулярному кислороду через систему промежуточных переносчиков флавиновой природы, полифенилоксидазную и цитохромную системы.

По химической природе анаэробные дегидразы относятся к пиридинпротеидам и флавинпротеидам. Пиридинпротеиды имеют в качестве простетической группы пиридинадениндинуклеотиды. Пиридиновый нуклеотид состоит из амида никотиновой кислоты (витамина РР), рибозы и остатка фосфорной кислоты; адениловый нуклеотид — из аденина, рибозы и одного или двух остатков фосфорной кислоты. Простетическая группа анаэробных дегидраз, содержащая 2 остатка фосфорной кислоты, называется дифосфопиридиннуклеотидом (ДПН), а содержащая 3 остатка фосфорной кислоты — трифосфопиридиннуклеотидом (ТПН).

Дегидразы, имеющие в качестве простетической группы дифосфопиридиннуклеотид и трифосфопиридиннуклеотид, отличаются друг от друга белковыми компонентами, обуславливающими специфичность их действия. Они легко диссоциируют на белковый компонент — апофермент и простетическую группу — кофермент. Кофермент дегидразы сокращенно называется кодегидразой (или козимазой).

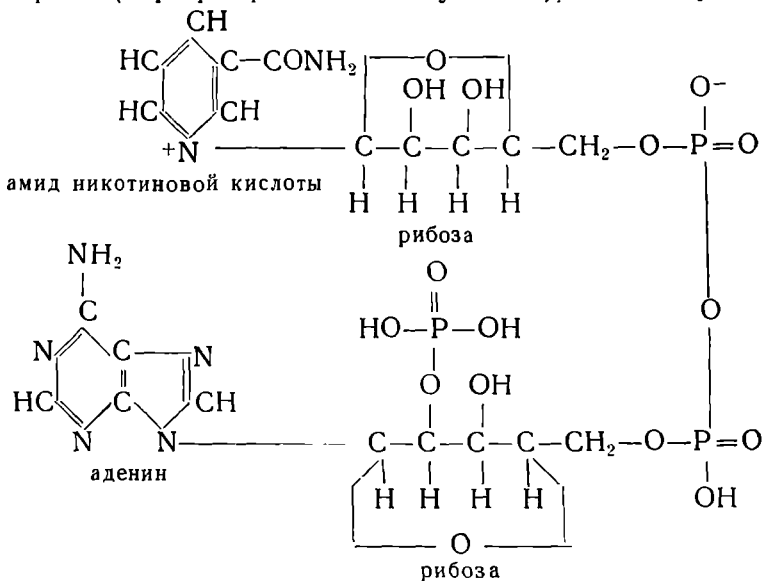
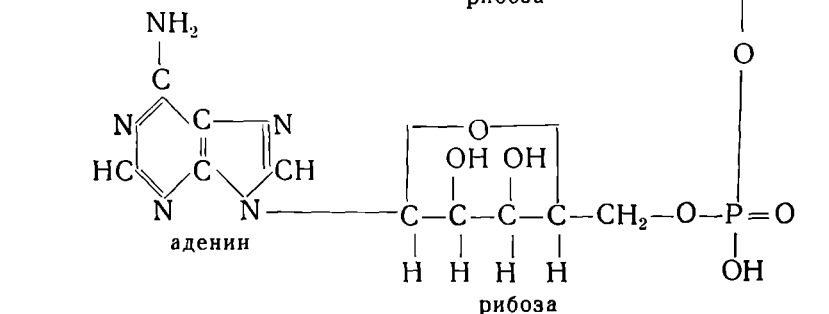
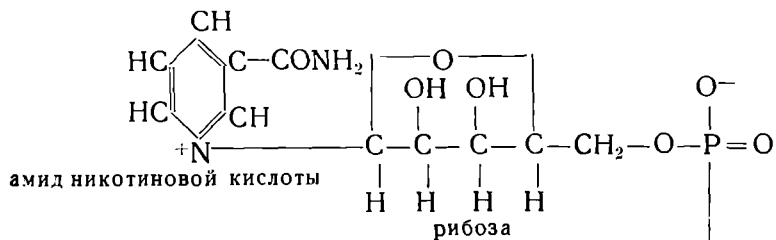
Дифосфопиридиннуклеотид получил название кодегидразы первой (К₀₁), трифосфопиридиннуклеотид — кодегидразы второй (К₀₂).

При восстановлении пиридиннуклеотиды принимают 2 электрона и 2 протона и превращаются в дигидропиридиннуклеотиды, а при окислении теряют их.

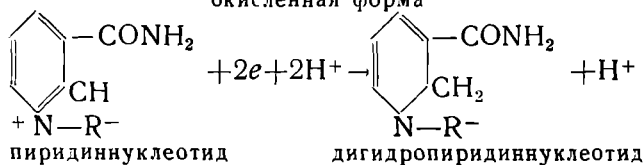
Способность кодегидраз к обратимому гидрированию и дегидрированию связана с возможностью обратимого восстановления и окисления пиридинового ядра в амиде никотиновой кислоты.

К анаэробным дегидразам, кроме ферментов, построенных по типу пиридинпротеидов, относятся некоторые ферменты флавиновой природы (например, цитохромредуктаза и др.).

Анаэробные дегидразы флавиновой природы, так же как и некоторые анаэробные дегидразы, химическая природа которых еще не установлена (например, сукциндегидраза и др.), способны катализировать окисление специфических для них субстратов в присутствии цитохромной системы или других легко окисляющихся веществ.



кодегидраза II (трифосфопиридинадениндинуклеотид) окисленная форма



Сукциндегидраза

Сукциндегидраза катализирует реакцию окисления (дегидрирования) янтарной кислоты в fumarовую. Она широко распространена в природе. В животных тканях она прочно связана с клеточными структурами. Активность сукциндегидразы обусловлена наличием в ее молекуле большого количества сульфгидрильных групп.

Работа № 71

Окисление янтарной кислоты метиленовой синью в присутствии сукциндегидразы

Если к мышечной каше, отмытой от водорастворимых веществ и содержащей сукциндегидразу, добавить янтарную кислоту и метиленовую синь и из сосуда удалить воздух, то жидкость в сосуде постепенно обесцвечивается.

Реакция обусловлена окислением янтарной кислоты и восстановлением метиленовой сини (изображаемой в реакции буквами М. С.) и протекает благодаря каталитическому действию сукциндегидразы. Янтарная кислота при окислении превращается в fumarовую, метиленовая синь восстанавливается в лейкоформу, т. е. обесцвечивается:

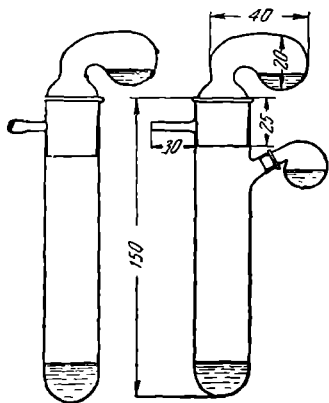
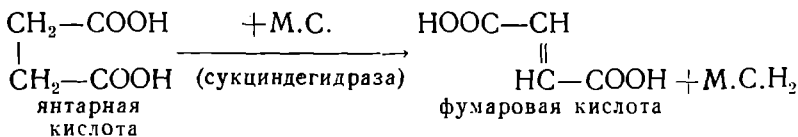


Рис. 10. Пробирка Тунберга.

Ход работы. Для работы пользуются специальными пробирками Тунберга (рис. 10) с отводными трубками для отсасывания воздуха, в которых пробками служат небольшие сосудики с пришлифованным горлышком. Горлышко хорошо смазывают смесью вазелина и воска. Используют две пробирки: в одну помещают 0,1 г промытой мышечной кашицы (приготовление см. № 64 стр. 91), в другую — 0,1 г мышечной кашицы, предварительно прокипяченной с 1—2 мл дистиллированной воды и охлажденной. В обе пробирки наливают по 1 мл фосфатного буфера (pH = 6,8) и по 2 мл 0,1 н. нейтрализованного рас-

створа янтарной кислоты. В боковые сосудики наливают по 1 капле 0,05% раствора метиленовой сини. Пробирки пооче-

редно присоединяют к водоструйному насосу или насосу Камовского (рис. 11) и откачивают воздух в течение минуты, согревая пробирку в руке. Жидкость закипает, и с парами воды удаляются остатки растворенного в жидкости воздуха.

После эвакуации воздуха пробирки закрывают поворачиванием пробки и метиленовую синь смешивают с содержащимся в сосудике. Пробирки помещают в водяную баню при температуре 37° и замечают время начала и окончания

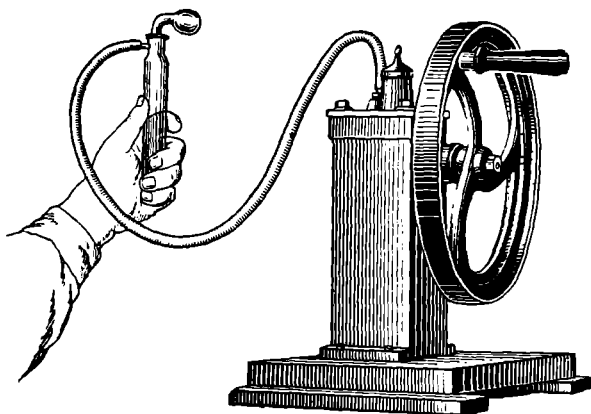


Рис. 11. Насос Камовского.

опыта. Опыт считают оконченным, когда в первой пробирке жидкость приобретает едва заметную голубую окраску. Во второй, контрольной, пробирке изменения окраски не происходит.

По окончании опыта впускают в пробирки воздух и убеждаются в том, что жидкость снова приобретает синее окрашивание вследствие окисления лейкоформы метиленовой сини кислородом воздуха.

Контрольные вопросы

1. Какие ферменты относятся к группе окислительно-восстановительных и как они подразделяются?
2. Какие процессы катализируются десмолазами, феразами, изомеразами?
3. На чем основано деление ферментов на однокомпонентные и двухкомпонентные?
4. Что называется простетической группой ферментов? Что такое профермент?
5. Какова химическая природа пиридиновых, флавиновых и геминных ферментов и какую роль они играют в процессе биологического окисления.

6. Какие вы знаете ферменты геминовой природы?
 7. Какова химическая природа оксидаз?
 8. Какова химическая природа аэробных и анаэробных дегидраз?
 9. В чем отличие анаэробных дегидраз от оксидаз?
 10. В чем сущность современной теории биологического окисления?
 11. Какие основные положения теории Баха и теории В. И. Палладина?
 12. Какова связь между ферментами и витаминами?
-

РАЗДЕЛ II
**ОБМЕН ВЕЩЕСТВ
В ЖИВОТНОМ ОРГАНИЗМЕ**

Организм животного в процессе жизнедеятельности всегда находится в весьма сложных взаимоотношениях с окружающей средой. Для своего существования организм непрерывно требует поступления из окружающей среды кислорода, воды и разнообразных пищевых веществ и выделяет в окружающую среду вещества, резко отличающиеся по своему составу от веществ, принятых с пищей.

В процессе жизнедеятельности пищевые вещества подвергаются химическим изменениям и используются организмом в качестве энергетического и строительного материала.

Для удобства изучения обмена веществ его искусственно расчленяют на четыре раздела: 1) обмен липидов, 2) обмен углеводов, 3) обмен белковых веществ и 4) обмен минеральных веществ.

1. ОБМЕН ЛИПИДОВ

ПРЕВРАЩЕНИЯ ЖИРОВ И ЛИПОИДОВ В ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОМ ТРАКТЕ

В желудке жиры и липоиды не подвергаются значительному изменению, так как под влиянием имеющегося в желудке фермента липазы расщепляются только эмульгированные жиры (например, жир молока). Гидролитическое расщепление жиров и жироподобных веществ происходит в кишечнике под влиянием липазы и других ферментов, вырабатываемых поджелудочной железой. Липаза поджелудочной железы выделяется в малоактивной форме и активируется желчью.

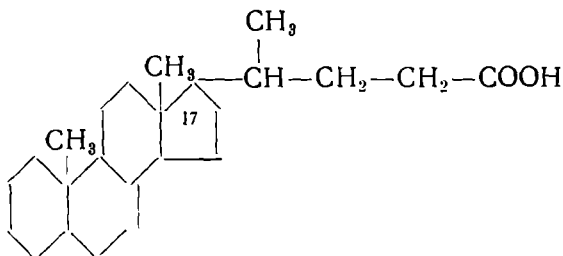
Механизм активирования липазы желчью не вполне выяснен; по-видимому, главная роль в этом процессе принадлежит желчным кислотам, которые, способствуя эмульгированию жира, подготавливают субстрат к воздействию фермента.

ви и используется тканями в качестве энергетического и пластического материала. Жиры и жироподобные соединения входят в состав оболочки клеток и находятся в протоплазме в виде липопротеиновых комплексов.

ЖЕЛЧНЫЕ КИСЛОТЫ

Холевая и дезоксихолевая кислоты близки по строению к холестерину и являются производными холановой кислоты.

Желчные кислоты образуются в печени и выделяются с желчью в свободном виде и в виде парных соединений с гликоколом или таурином¹. В желчи человека содержатся главным образом щелочные соли гликохолевой, гликодезоксихолевой, таурохолевой и тауродезоксихолевой кислот. Желчные кислоты являются поверхностно активными веществами и принимают участие в эмульгировании и всасывании жиров.



холановая кислота

Работа № 72

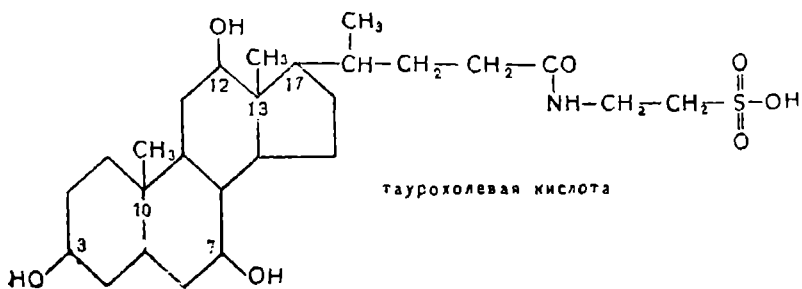
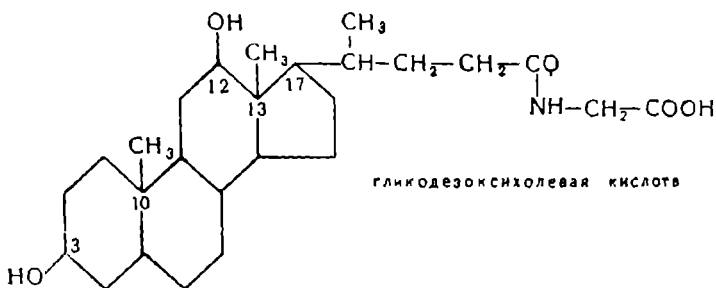
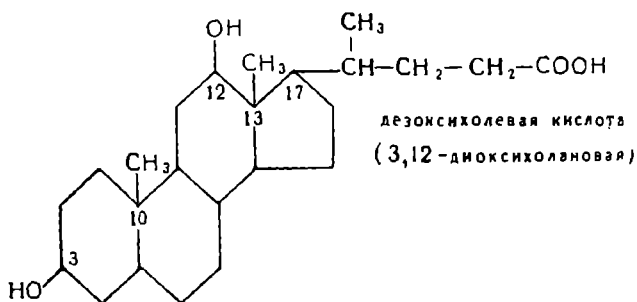
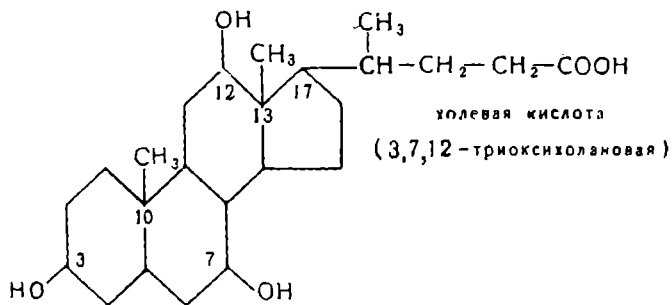
Эмульгирование жира

При взбалтывании жира с раствором желчи, белка, мыла или соды образуется стойкая эмульсия.

Образование эмульсии обусловлено тем, что в поверхностный водный слой, окружающий жировые капельки, устремляются поверхностноактивные частицы желчных кислот, белка, мыла, которые обволакивают капельки жира и препятствуют их слиянию. Эмульгирование жира содой обусловлено образованием мыла в результате взаимодействия углекислого натрия с присутствующими в жире свободными жирными кислотами.

Ход работы. В 5 пробирок наливают по 20 капель: в первую — дистиллированной воды, во вторую — желчи, разве-

¹ Гликокол и таурин связаны с желчными кислотами по типу пептидной связи.



денной вдвое, в третью — 1% раствора яичного белка, в четвертую — 1% раствора мыла, в пятую — 1% раствора углекислого натрия. В каждую пробирку добавляют по 2 капли растительного масла и тщательно взбалтывают. Во всех пробирках, кроме первой, образуется стойкая эмульсия. Результат работы фиксируют в таблице:

Эмульгирование жиров¹

	Вода	Желчь	Белок	Мыло	Сода
Растительное масло					

Выводы:

¹ Степень эмульгирования выражают знаками плюс и минус.

Работа № 73

Влияние желчи и мыла на поверхностное натяжение воды

Изменение поверхностного натяжения воды в присутствии желчи или мыла определяют сталагмометрическим или капельным методом.

Размер капли, образующейся на конце капиллярной трубки, зависит от поверхностного натяжения жидкости. Чем больше поверхностное натяжение, тем больше величина каждой капли и, следовательно, тем меньше общее количество капель, вытекающих из пипетки, называемой сталагмометром. Эта закономерность выражается уравнением:

$$\frac{v}{v_1} = \frac{n_1}{n},$$

где v — поверхностное натяжение воды при 20°, равное 73 дин/см, v_1 — поверхностное натяжение исследуемой жидкости, n — количество вытекающих капель дистиллированной воды при 20°, n_1 — количество вытекающих капель исследуемой жидкости.

Определив количество капель, вытекающих из сталагмометра в пробе с водой и в пробе с испытуемой жидкостью, и зная, что поверхностное натяжение воды при 20° v равно 73 дин/см, вычисляют поверхностное натяжение исследуемой жидкости, пользуясь вышеприведенным уравнением:

$$v_1 = \frac{v \cdot n}{n_1}.$$

Описание прибора: сталагмометр (рис. 12) представляет собой капиллярную трубку с расширением посредине и с двумя метками сверху и снизу (*a* и *б*). Нижний конец сталагмометра отшлифован.

Ход работы. В чистый сухой¹ сталагмометр набирают раствор желчи (или мыла) выше верхней метки и дают жидкости свободно стекать по каплям. Счет капель начинают с того момента, когда капля начнет доходить до верхней метки, и кончают, когда она дойдет до нижней метки сталагмометра. Определение производят не менее двух раз. Сталагмометр промывают водой и аналогичным образом два раза определяют количество капель в пробе с дистиллированной водой.

Поверхностное натяжение раствора желчи или мыла определяют согласно приведенному выше уравнению. Результаты работы и расчет фиксируют в таблице.

Определение поверхностного натяжения раствора желчи (мыла)

Количество капель, вытекающих из сталагмометра		Расчет по формуле
проба с дистиллированной водой	проба с раствором желчи (мыла)	
1	1	
2	2	
3	3	

Выводы:

Работа № 74

Действие липазы на жир молока

Если к молоку добавить вытяжку из панкреатической железы, содержащую фермент липазу, и смесь подщелочить содой в присутствии фенолфталеина до слабо розового окрашивания, то через некоторое время розовая окраска жидкости исчезает. Исчезновение окраски обусловлено образованием свободных жирных кислот в результате расщепления жира под действием липазы. Жирные кислоты нейтрализуют добавленную щелочь и вызывают обесцвечивание фенолфталеина.

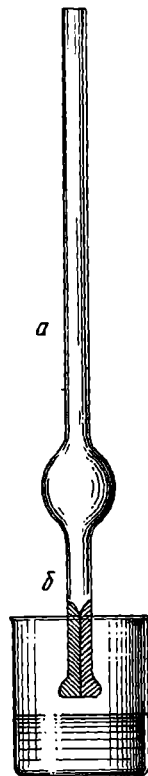


Рис. 12. Сталагмометр.

¹ Если пипетка влажная, ее следует предварительно ополоснуть исследуемым раствором желчи.

Ход работы. В 2 пробирки наливают по 20 капель прокипяченного молока, разведенного 1 л. В одну пробирку добавляют 2—3 капли вытяжки из панкреатической железы, в другую 2—3 капли той же вытяжки, но предварительно прокипяченной и охлажденной. В каждую пробирку добавляют по 1 капле фенолфталеина (0,5% спиртовой раствор) и по несколько капель 10% раствора углекислого натрия до появления слабо розового окрашивания одинаковой интенсивности. Обе пробирки помещают в водяную баню на 10—15 минут при температуре 38—40°. Жидкость в пробе с активной липазой обесцвечивается, в пробе с прокипяченной вытяжкой остается без изменения.

Результаты работы фиксируют в таблице.

Действие липазы на жиры

Фермент (исходный материал)	Субстрат (наименование продукта)	Окраска жидкости от фенолфталеина в присутствии Na_2CO_3	
		исходная	конечная

Выводы:

Работа № 75

Кинетика действия липазы

Скорость ферментативной реакции измеряется количеством субстрата, расщепившегося в единицу времени. На скорость ферментативной реакции оказывает влияние ряд факторов, как, например, концентрация фермента, концентрация субстрата, накопление продуктов расщепления, pH среды, присутствие активаторов и парализаторов, температура.

Для изучения кинетики действия липазы в отдельных порциях смеси жира с липазой определяют количество образовавшихся жирных кислот через различные от начала опыта промежутки времени. Результаты определения, выраженные в миллилитрах титрованного раствора щелочи, изображают графически. Ход кривой показывает, что гидролиз жира в первые 15 минут протекает быстро, затем замедляется и, наконец, прекращается. Такой ход процесса, по-видимому, обусловлен постепенным уменьшением количества субстрата и накоплением продуктов расщепления.

Ход работы. В стаканчик отмеривают пипеткой 10 мл кипяченого молока, разведенного дистиллированной водой (1:1), 1 мл вытяжки из поджелудочной железы, содержащей липазу, и 1 мл дистиллированной воды. Жидкость быстро перемешивают путем втягивания и выпускания ее из

*10% рр
исходный*

пипетки. Из стаканчика отбирают 2 мл смеси в заранее приготовленную колбу. В колбу добавляют 1—2 капли фенолфталеина и титруют 0,01 н. раствором едкого натра до слабо розовой окраски. Оставшуюся в стаканчике смесь помещают в баню при температуре 38—40° и через каждые 15 минут той же пипеткой отбирают из стаканчика, не вынимая его из бани, по 2 мл смеси и титруют 0,1 н. раствором едкого натра. Время титрования и количество израсходованной щелочи фиксируют в таблице. Результаты первого титрования¹, произведенного до начала действия липазы на жиры молока, вычитают из данных последующих титрований. На основании полученных результатов составляют график, где по оси абсцисс откладывают время в минутах, а по оси ординат — количество миллилитров 0,01 н. раствора щелочи, пошедшей на нейтрализацию жирных кислот, образовавшихся за данный отрезок времени. Результаты заносят в следующую таблицу.

Кинетика действия липазы

№ пробы	Время взятия проб для титрования	Количество 0,01 н. раствора NaOH (в мл)	
		израсходовано на титрование	нейтрализовано жирными кислотами
1			
2			
3			
4			
5			

Выводы:

Работа № 76

Выделение лецитина из яичного желтка

Яичный желток в количестве 0,5—1 г ($\frac{1}{6}$ часть яичного желтка) помещают в пробирку, добавляют 3—5 мл кипящего спирта и тщательно перемешивают содержимое пробирки стеклянной палочкой в течение 5—10 минут. По окончании извлечения жидкость фильтруют в сухую пробирку и с фильтратом проделявают реакции на лецитин.

Работа № 77

Получение эмульсии лецитина

К 5 каплям спиртового раствора лецитина добавляют 20—30 капель воды. Образуется эмульсия лецитина в воде.

¹ При первом титровании нейтрализуются органические кислоты — молочная и др., которые присутствовали в молоке до начала действия липазы. Для определения количества 0,01 н. раствора щелочи, нейтрализованной жирными кислотами, результат первого титрования вычитают из результата каждого последующего титрования.

Работа № 78
Осаждение лецитина

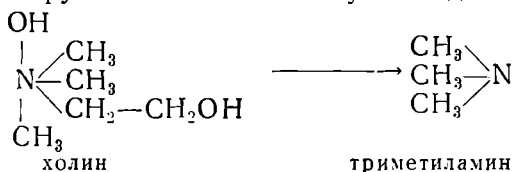
1. В сухой пробирке к 5 каплям спиртового раствора лецитина добавляют 1—2 капли насыщенного спиртового раствора хлористого кадмия. Выпадает нерастворимое кадмиевое соединение лецитина¹.

2. В сухой пробирке к 5 каплям раствора лецитина добавляют равный объем ацетона. При стоянии выпадает осадок лецитина в виде мути.

Работа № 79
Гидролиз лецитина

В широкую пробирку наливают несколько капель спиртового раствора лецитина (5—10) и добавляют равный или двойной объем 10% раствора едкого натра и кипятят 3—5 минут. В результате гидролиза лецитин распадается на составные части: глицерин, жирные кислоты, холин и фосфорную кислоту.

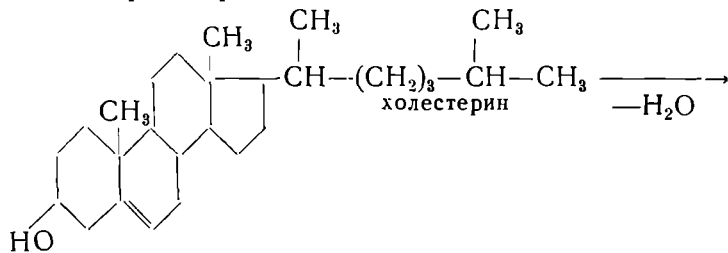
Холин при гидролизе лецитина превращается в триметиламин и обнаруживается по запаху селедочного рассола.



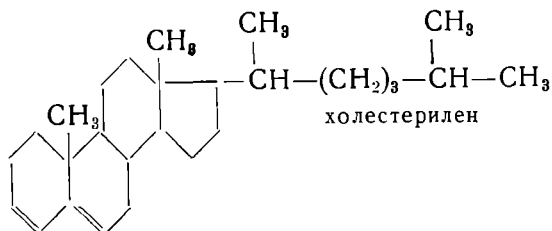
Работа № 80

Реакция на холестерин (реакция Сальковского)

При добавлении к хлороформному раствору холестерина или растительного масла концентрированной серной кислоты жидкость окрашивается в красный цвет. Реакция обусловлена образованием холестерилена — продукта дегидратации холестерина красного цвета.



¹ Соединение лецитина с CdCl₂ содержит четыре частицы CdCl₂ на три частицы лецитина; слабо растворимо в спирте.



Ход работы. В сухую пробирку наливают 10 капель 1% хлороформного раствора холестерина и добавляют равный объем концентрированной серной кислоты (осторожно по стенке пробирки). При легком встряхивании на границе двух слоев жидкости образуется оранжевое кольцо, которое при стоянии переходит в красное. Нижний слой серной кислоты приобретает зеленую флуоресценцию.

Работа № 81

Реакция на холестерин (реакция Либермана-Бурхардта)

При добавлении к хлороформному раствору холестерина или растительного масла уксусного ангидрида и концентрированной серной кислоты жидкость окрашивается последовательно в красный, синий и, наконец, зеленый цвет. Реакция обусловлена образованием сульфокислоты холестерилена зеленого цвета.

Ход работы. В сухую пробирку наливают 10 капель 1% хлороформного раствора холестерина, добавляют 3—5 капель уксусного ангидрида и 1—2 капли концентрированной серной кислоты. Содержимое пробирки осторожно встряхивают и помещают в баню при температуре 40° на 1—2 минуты или оставляют при комнатной температуре на 5—10 минут. В присутствии холестерина вначале появляется красное окрашивание, которое затем переходит в фиолетовое, синее и зеленое. При незначительном содержании холестерина в растворе сразу появляется зеленое окрашивание.

Реакция Либермана-Бурхардта нашла применение в методах количественного определения холестерина.

Работа № 82

Фурфуроловая реакция на желчные кислоты (реакция Петтенкофера)

Если к раствору желчи или желчных кислот добавить раствор сахарозы и смесь подслоить концентрированной серной кислотой, то на границе двух жидкостей появляется красное кольцо.

Реакция обусловлена образованием окрашенных продуктов конденсации желчных кислот с фурфуролом. Фурфурол образуется из сахарозы (вернее фруктозы) при действии концентрированной серной кислоты (см. стр. 15).

Ход работы. К 10 каплям разведенного (1:2) раствора желчи добавляют 1 каплю 5% раствора сахарозы и осторожно по стенке пробирки, наклоненной под углом 45°, спускают равный объем концентрированной серной кислоты. На границе двух слоев жидкости получается красное кольцо.

ПРЕВРАЩЕНИЯ ЖИРОВ В ОРГАНАХ И ТКАНЯХ

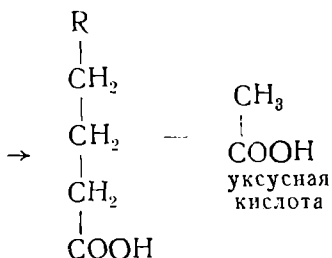
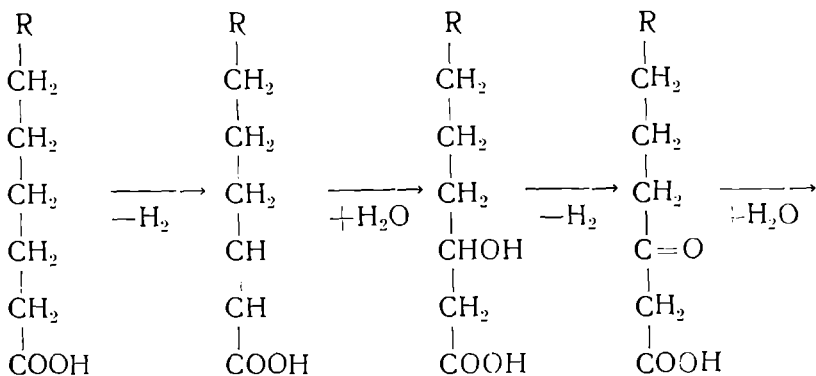
Первым этапом превращения в тканях нейтральных жиров является гидролитическое расщепление их на глицерин и высшие жирные кислоты при участии тканевых липаз. В дальнейшем глицерин и жирные кислоты окисляются в тканях до CO_2 и H_2O , а освобождающаяся при этом химическая энергия используется для выполнения самых различных физиологических функций и на поддержание температуры тела.

Изучение вопроса о промежуточных превращениях жирных кислот и глицерина до образования CO_2 и H_2O производилось различными путями: на здоровом неповрежденном животном, в экспериментах с изолированными органами и тканевыми кашицами и с применением меченых атомов. Кнопп впервые обратил внимание на то, что в состав природных жиров входят жирные кислоты с четным числом углеродных атомов. На основании проведенных экспериментов он предложил схему окисления жирных кислот, согласно которой всегда окисляется углерод, стоящий в β -положении по отношению к карбоксильной группе. Теория Кноппа получила название теории β -окисления и нашла подтверждение в новейших исследованиях, проводимых на переживающих органах и с применением меченых атомов.

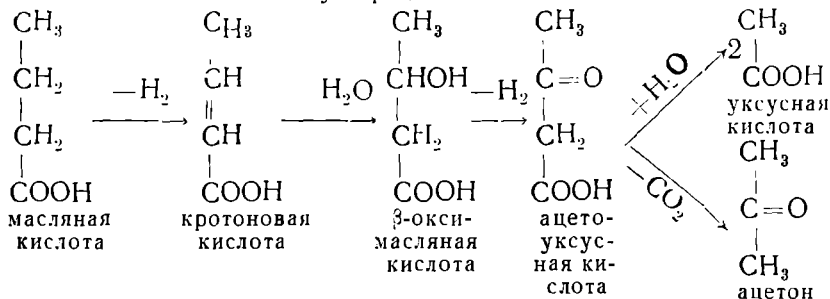
В процессе β -окисления от высокомолекулярной жирной кислоты отщепляются одна за другой частицы уксусной кислоты. Последним фрагментом жирной кислоты является масляная кислота, которая последовательно превращается в кротоновую, β -оксимасляную, ацетоуксусную кислоту и в конце концов распадается на две частицы уксусной кислоты. Незначительное количество ацетоуксусной кислоты превращается в ацетон.

Процесс β -окисления жирной кислоты может быть представлен в следующем виде¹:

¹ В настоящее время выделены ферменты, участвующие в процессе β -окисления жирных кислот, и установлено участие в этом процессе коэнзима ацетилирования, сокращенно называемого коэнзимом А.



жирная кислота с меньшим
числом углеродных атомов



В моче здоровых людей ацетоновые тела не обнаруживаются обычными химическими реакциями. При нарушении углеводного обмена, а также при голодании нарушается нормальное окисление жирных кислот и ацетоуксусная кислота в значительной своей части превращается в ацетон. Все недоокисленные продукты (β -оксимасляная, ацетоуксусная кислоты и ацетон) накапливаются в организме и поступают в кровь (ацетонемия), а из крови — в мочу (ацетонурия). Ацетоновые тела чаще всего встречаются в моче больных диабетом и могут выделяться с мочой при некоторых других заболеваниях (инфекционные болезни, хроническая анемия и др.).

Нитропруссидная проба на ацетон и ацетоуксусную кислоту

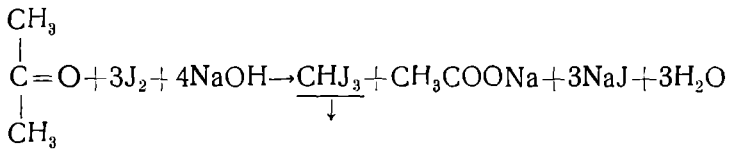
При добавлении нитропруссиды натрия и щелочи к моче, содержащей ацетон и ацетоуксусную кислоту, жидкость приобретает красное окрашивание, переходящее от добавления концентрированной уксусной кислоты в более интенсивное вишнево-красное и красно-фиолетовое. В отсутствие ацетона аналогичная реакция получается с креатинином мочи, но в этом случае при добавлении уксусной кислоты красное окрашивание не усиливается, а сразу исчезает.

Ход работы. 1. **Проба Легалья.** К 10 каплям мочи добавляют 1—2 капли свежеприготовленного 5% раствора нитропруссиды натрия и 3—4 капли 10% раствора едкого натра. Появляется оранжево-красное окрашивание. Добавляют 5—8 капель концентрированной уксусной кислоты. В присутствии ацетона и ацетоуксусной кислоты появляется вишнево-красное окрашивание.

2. **Проба Ланге.** К 10 каплям мочи прибавляют 2 капли концентрированной уксусной кислоты, 1—2 капли свежеприготовленного 5% раствора нитропруссиды натрия и перемешивают. Пробирку наклоняют под углом 45° и осторожно по стенке настилают равный объем концентрированного раствора аммиака. В присутствии ацетона и ацетоуксусной кислоты на границе образуется красно-фиолетовое или фиолетовое кольцо.

Йодоформная проба на ацетон (проба Либена)

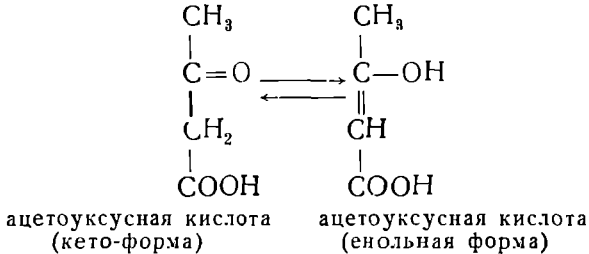
При добавлении раствора йода и щелочи к моче, содержащей ацетон, жидкость мутнеет, и при стоянии выпадает осадок йодоформа, обладающий характерным запахом:



Ход работы. К 10 каплям мочи добавляют 1—2 капли 10% раствора щелочи и по каплям 10% раствор йода в йодистом калии до появления слабо желтой окраски. В присутствии ацетона жидкость делается мутной и приобретает запах йодоформа. При наличии значительного количества ацетона выпадает желтый кристаллический осадок.

**Феррихлоридная проба на ацетоуксусную кислоту
(проба Герхардта)**

При добавлении хлорного железа к моче, содержащей ацетоуксусную кислоту, жидкость окрашивается в вишнево-красный цвет. Реакция обусловлена образованием комплексного соединения железа с енольной формой ацетоуксусной кислоты:



Ход работы. К 15—20 каплям мочи приливают 3—5 капель 5% раствора хлорного железа. В присутствии ацетоуксусной кислоты в количестве свыше 0,07% появляется красное окрашивание. Сходное окрашивание получается и в отсутствие ацетоуксусной кислоты в моче после приема внутрь некоторых лекарственных веществ: салициловой кислоты, антипирина и др. При стоянии и при кипячении в течение 2 минут в присутствии указанных выше лекарственных веществ окраска не исчезает.

Контрольные вопросы

1. Охарактеризуйте современные методы, при помощи которых изучается обмен веществ в животном организме.
2. Какие железы пищеварительного тракта выделяют ферменты, действующие на жиры и липоиды?
3. Напишите реакцию гидролиза жира и лецитина.
4. Какова роль желчи в переваривании и всасывании жиров?
5. Какова химическая природа желчных кислот (напишите структурные формулы гликохолевой и таурохолевой кислот)?
6. Чем отличается жир, синтезированный в стенке кишечника, от пищевого жира?
7. Каким путем транспортируется жир от стенки кишечника к тканям?
8. Какие ткани являются жировыми депо?
9. Какие ферменты производят гидролитическое расщепление жиров в органах и тканях?
10. Напишите процесс β -окисления на примере капроновой кислоты.
11. Какова судьба водорода, отщепленного дегидразами от жирных кислот в процессе β -окисления?
12. Какова судьба уксусной кислоты, образующейся при β -окислении жирных кислот?
13. Какие продукты неполного окисления жирных кислот могут накапливаться в крови и выделяться с мочой и в каких случаях это бывает?

14. Что такое ацетонурия?
15. Какую роль играют фосфатиды в обмене жиров?
16. Сколько калорий выделяется при сгорании в организме 1 г жира?
17. Какие железы внутренней секреции участвуют в регулировании жирового обмена?

2. ОБМЕН УГЛЕВОДОВ

ПРЕВРАЩЕНИЯ УГЛЕВОДОВ В ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОМ ТРАКТЕ

Углеводы поступают в организм человека главным образом с растительной пищей. Человек должен получать в сутки не менее 500 г углеводов, т. е. в 10 раз больше, чем жиров.

Гидролитическое расщепление углеводов — крахмала и гликогена — начинается во рту под влиянием ферментов амилазы и мальтазы, вырабатываемых слюнными железами. В желудке действие ферментов слюны практически прекращается, так как кислая реакция ($\text{pH} = 1,5\text{—}2,5$) желудочного сока создает неблагоприятные условия среды для действия амилазы.

В двенадцатиперстной кишке переваривание углеводов вновь возобновляется под действием ферментов панкреатического сока — амилазы и мальтазы. Сок поджелудочной железы имеет щелочную реакцию и нейтрализует попадающую из желудка соляную кислоту, а образующийся при этом хлористый натрий активизирует действие амилазы. Расщепление дисахаридов происходит в тонком кишечнике при участии ферментов мальтазы, сахаразы и лактазы, выделяемых слизистой оболочкой кишечника.

В результате последовательного воздействия пищеварительных ферментов принятые с пищей¹ углеводы расщепляются на моносахариды: глюкозу, фруктозу, галактозу и маннозу.

Клетчатка, поступающая в большом количестве с растительной пищей, не подвергается воздействию ферментов пищеварительного тракта и почти не усваивается. Часть клетчатки в результате воздействия микробной флоры (микробных ферментов) распадается с образованием органических кислот: уксусной, масляной, молочной, янтарной и др. Эти кислоты могут всосаться и быть использованы макроорганизмом в качестве питательных веществ.

Всасывание моносахаридов происходит с неодинаковой скоростью: глюкоза и галактоза всасываются быстрее, чем другие моносахариды. Быстрое всасывание глюкозы и га-

¹ К пищевым веществам, богатым углеводами, относятся хлеб, картофель, овощи, крупы, сахар, фрукты и др.

лактозы обусловлено превращением их в эпителии кишечной стенки в фосфорные эфиры. Образование фосфорных эфиров приводит к тому, что концентрация свободной глюкозы и галактозы в стенке кишечника всегда остается на низком уровне.

ГЛИКОГЕНООБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ФУНКЦИЯ ПЕЧЕНИ

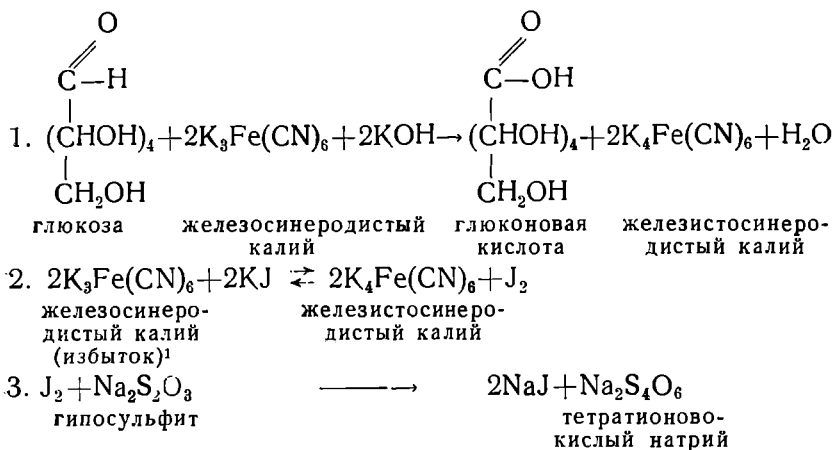
Всосавшиеся в кровь моносахариды попадают в кровеносную систему и по воротной вене приносятся в печень. Часть глюкозы проходит через печень и разносится кровью по всему организму, главная же масса откладывается в клетках печени в виде гликогена. Содержание гликогена в печени колеблется в зависимости от количества углеводов в пище. В печени человека может отложиться не более 150 г гликогена. Когда содержание сахара в крови понижается, гликоген печени превращается в глюкозу и переходит в кровь. Превращение гликогена в глюкозу осуществляется в печени путем фосфоролиза при участии ферментов фосфорилаз. При фосфоролизе гликоген распадается с образованием глюкозо-1-фосфата (эфир Кори) без предварительного превращения в декстрины и мальтозу. Глюкозо-1-фосфат под влиянием фосфатаз дефосфорилируется, и свободная глюкоза поступает в кровь. В печени, кроме фосфоролитического расщепления гликогена, существует и гидролитический путь распада при участии фермента амилазы.

Несмотря на постоянный расход глюкозы всеми клетками организма, содержание сахара в крови поддерживается на определенном постоянном уровне — от 80 до 120 мг%. Постоянство концентрации сахара в крови регулируется центральной нервной системой и осуществляется не только путем прямого воздействия на печень, но и через систему эндокринных желез, главным образом поджелудочной железы, гипофиза и надпочечников.

Работа № 86

Определение сахара в крови по методу Хагедорна-Иенсена

В безбелковом фильтрате крови глюкозу окисляют железосинеродистым калием. Избыток железосинеродистого калия, не вступивший в реакцию с глюкозой, восстанавливают йодистым калием. Свободный йод, выделившийся в количестве, эквивалентном избытку железосинеродистого калия, оттитровывают гипосульфитом. Количество сахара в крови вычисляют по данным титрования с помощью специальной таблицы.



Ход работы. 1. Приготовление гидроокси цинка для осаждения белка. В 4 пронумерованные пробирки наливают из бюретки по 5 мл 0,45% раствора сернокислого цинка и по 1 мл 0,1 N раствора едкого натра. Образуется студенистый осадок гидроокси цинка.

2. Взятие крови и осаждение белка. Кровь² набирают микропипеткой немного выше верхнего нулевого деления³. Пипетку переводят в горизонтальное положение⁴. Кончик пипетки тщательно обтирают кусочком фильтровальной бумаги и избыток взятой крови осторожно спускают на фильтровальную бумагу, слегка прикасаясь ею к отверстию пипетки. Если кровь спустилась ниже верхней метки, операцию взятия крови повторяют. Пипетку с кровью погружают до дна в пробирку с гидроокисью цинка, осторожно выдувают кровь и промывают пипетку 2—3 раза путем втягивания и выпускания жидкости. Таким же образом сухой пипеткой набирают кровь во вторую пробирку. В третью и четвертую пробирки крови не добавляют; они служат для контроля техники работы и чистоты употребляемых реактивов. По окончании взятия крови содержимое первых двух пробирок тщательно перемешивают, осторожно постукивая пальцем по дну пробирки (закрывать пробирку пальцем и опрокидывать нельзя!). Все четыре пробирки ставят в ки-

¹ В присутствии соли цинка железистосинеродистый калий выпадает в осадок в виде комплексной соли $\text{K}_2\text{Zn}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$.

² Для анализа пользуются оксалатной кровью кролика, взятой из ушной вены. Для предупреждения свертывания крови добавляют щавелевокислый натрий из расчета 0,1 г на 100 мл крови.

³ Если кровь перестанет втягиваться в пипетку, нужно выдуть обратно некоторое количество крови.

⁴ При горизонтальном положении микропипетки верхнее отверстие может быть открытым, кровь не выливается в силу капиллярности.

пящую баню на 3 минуты и по истечении этого времени вынимают и ставят в штатив. В первых двух пробирках на поверхности плавают бурые хлопья свернувшегося белка.

3. Подготовка к фильтрованию. В 4 воронки помещают небольшие кусочки ваты (вата заменяет фильтровальную бумагу) и горячей дистиллированной водой промывают вату для удаления веществ, мешающих определению. Промывание повторяют 2—3 раза. Воронки с отмытой ватой помещают в высокие пронумерованные стаканчики.

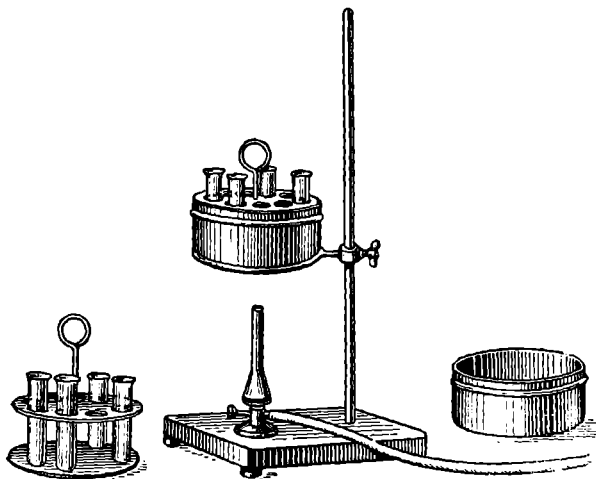


Рис. 13. Вставка для бани.

4. Фильтрование. Содержимое каждой пробирки переносят по палочке (количественно без потерь) через приготовленный ватный фильтр в соответствующий по номеру стаканчик. Пробирку и палочку промывают 1 мл дистиллированной воды и промывную воду переносят на тот же фильтр. Промывание повторяют 3 раза. Новую порцию промывной воды переносят на фильтр только после того, как профильтруется предыдущая. Этим достигается более полное вымывание остатков глюкозы с фильтра.

5. Окисление глюкозы железосинеродистым калием. К фильтрату в каждый стаканчик прибавляют из микробюретки (точно!) 2 мл 1/200 н. раствора железосинеродистого калия. Стаканчики (рис. 13) погружают в кипящую баню на 15 минут¹ для окисления глюкозы², после чего вынимают и охлаждают в холодной воде.

¹ Время 15 минут следует использовать для мытья и высушивания микропипеток и для мытья пробирок и воронок.

² Кроме глюкозы, окисляются и другие вещества, но их количество настолько мало, что этой ошибкой пренебрегают.

6. Определение избытка железосинеродистого калия. В стаканчики наливают из бюретки по 3 мл тройного раствора¹, содержащего йодистый калий, и по 2 мл 3% раствора уксусной кислоты. Жидкость приобретает желтую окраску вследствие появления свободного йода. Йод образуется в результате взаимодействия йодистого калия с избытком железосинеродистого калия. Выделившийся йод титруют 1/200 н. раствором гипосульфита в присутствии 1—2 капель 1% раствора крахмала. Титрование производят медленно, до обесцвечивания синей окраски жидкости. Чем больше сахара в крови, тем меньше будет избыток железосинеродистого калия, тем меньше выделится йода и тем меньше гипосульфита будет израсходовано на титрование. В контрольных пробах, где сахара нет, а возможно только присутствие других редуцирующих веществ, на титрование должно пойти около 2 мл раствора гипосульфита². Результаты титрования записывают в таблицу и туда же заносят результаты вычислений.

Содержание сахара в крови

№ пробы	Количество взятой крови	Количество гипосульфита, пошедшее на титрование	Количество сахара (найдено по таблице)		Содержание сахара в крови (в мг%)
			в пробе	среднее из двух определений	
1				}	
2					
3					
4					

Вычисление. Для вычисления содержания сахара в крови по данным титрования пользуются специальной таблицей, составленной Хагедорном на основании цифрового материала, полученного им в эксперименте с растворами сахара известной концентрации. В таблице в 1-й вертикальной колонке указано количество миллилитров гипосульфита, пошедшее на титрование, выраженное в целых и десятых долях миллилитра; в верхней горизонтальной колонке указаны сотые доли миллилитра. На пересечении горизонтальной и вертикальной линий находят число, соответствующее количеству сахара в пробе, выраженное в миллиграммах.

¹ Тройной раствор состоит из йодистого калия, сернокислого цинка и хлористого натрия. Сернокислый цинк добавляется для того, чтобы вывести из сферы реакции железосинеродистый калий в виде комплексной цинк-калиевой соли и тем самым предотвратить обратный ход реакции. Хлористый натрий как электролит способствует лучшему выпадению коллоидного осадка двойной цинк-калиевой соли.

² Количество, эквивалентное 2 мл железосинеродистого калия.

Содержание сахара в крови при

Гипосуль- фит (в мл)	0,00	0,01	0,02	0,03
0,0	0,385	0,382	0,379	0,376
0,1	0,355	0,352	0,350	0,348
0,2	0,331	0,329	0,327	0,325
0,3	0,310	0,308	0,306	0,304
0,4	0,290	0,288	0,286	0,284
0,5	0,270	0,268	0,266	0,264
0,6	0,251	0,249	0,247	0,245
0,7	0,232	0,230	0,228	0,226
0,8	0,213	0,211	0,209	0,208
0,9	0,195	0,193	0,191	0,190
1,0	0,177	0,175	0,173	0,172
1,1	0,159	0,157	0,155	0,154
1,2	0,141	0,139	0,138	0,136
1,3	0,124	0,122	0,120	0,119
1,4	0,106	0,104	0,102	0,101
1,5	0,88	0,086	0,084	0,083
1,6	0,070	0,068	0,066	0,065
1,7	0,052	0,050	0,048	0,047
1,8	0,034	0,032	0,031	0,029
1,9	0,017	0,015	0,014	0,012

определении по Хагедорну-Иенсену

0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
0,373	0,370	0,367	0,364	0,361	0,358
0,345	0,343	0,341	0,338	0,336	0,333
0,323	0,321	0,318	0,316	0,314	0,312
0,302	0,300	0,298	0,296	0,294	0,292
0,282	0,280	0,278	0,276	0,274	0,272
0,262	0,260	0,259	0,257	0,255	0,253
0,243	0,241	0,240	0,238	0,236	0,234
0,224	0,222	0,221	0,219	0,217	0,215
0,206	0,204	0,202	0,200	0,199	0,197
0,188	0,186	0,184	0,182	0,181	0,179
0,170	0,168	0,166	0,164	0,163	0,161
0,152	0,150	0,148	0,146	0,145	0,143
0,134	0,132	0,131	0,129	0,127	0,125
0,117	0,115	0,113	0,111	0,110	0,108
0,099	0,097	0,095	0,093	0,092	0,090
0,081	0,079	0,077	0,075	0,074	0,072
0,063	0,061	0,059	0,057	0,056	0,054
0,045	0,043	0,041	0,039	0,038	0,036
0,027	0,025	0,024	0,022	0,020	0,019
0,010	0,008	0,007	0,005	0,003	0,002

Из количества сахара, найденного в опытной пробе (среднее из двух определений), вычитают то количество «сахара» (редуцирующих веществ), которое обнаружено в контрольной пробе (среднее из двух определений). Для определения процентного содержания сахара в крови полученный результат умножают на 1000, если для анализа было взято 0,1 мл крови. В норме содержание сахара в крови кролика колеблется от 70 до 110 мг%.

ПРЕВРАЩЕНИЯ УГЛЕВОДОВ В МЫШЕЧНОЙ И ДРУГИХ ТКАНЯХ

Углеводы являются основным источником энергии в организме животных, растений и микробов. При сгорании 1 г углеводов до CO_2 и H_2O выделяется 4,1 больших калорий. Количество энергии, освобождающейся при распаде углеводов в том или ином организме, зависит от характера протекающих химических превращений.

Изучение процесса мышечного сокращения показало, что при работе изолированной мышцы в анаэробных условиях распадается гликоген и образуется эквивалентное количество молочной кислоты. Количество образовавшейся молочной кислоты строго пропорционально количеству проделанной работы и выделившейся теплоты.

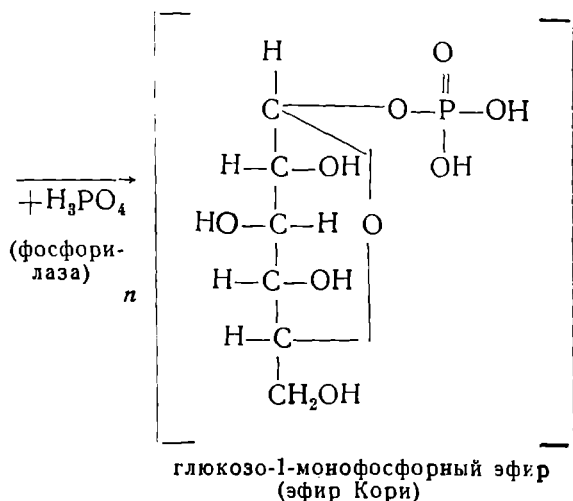
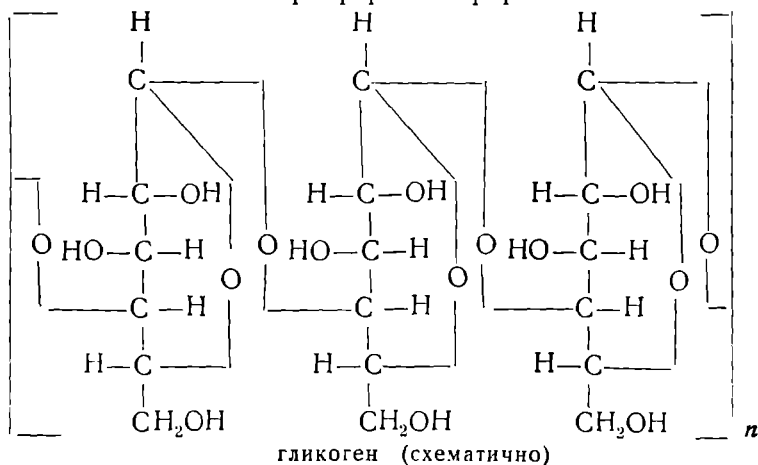
В период аэробного отдыха 80% образовавшейся молочной кислоты превращается в гликоген, а 20% ее окисляется до углекислоты и воды. Энергия, выделяющаяся при окислении молочной кислоты, используется в мышце для ресинтеза гликогена.

Биохимические превращения гликогена и глюкозы до стадии образования молочной кислоты детально изучали в опытах с мышечными экстрактами и с мышечными кашицами. Мышечные экстракты подвергали диализу, и белковые компоненты ферментов отделялись от коферментов. Диализованные мышечные экстракты не обладали ферментативной активностью и проявляли ее только после добавления диализата, содержащего коферменты и некоторые необходимые для процесса гликолиза органические и минеральные вещества, как, например, аденозинтрифосфорную кислоту, ионы магния, PO_4^- и др. Роль и значение каждого из присутствующих в диализате веществ изучали путем добавления к неактивному диализованному мышечному экстракту каждого компонента в отдельности и в сочетании с другими компонентами.

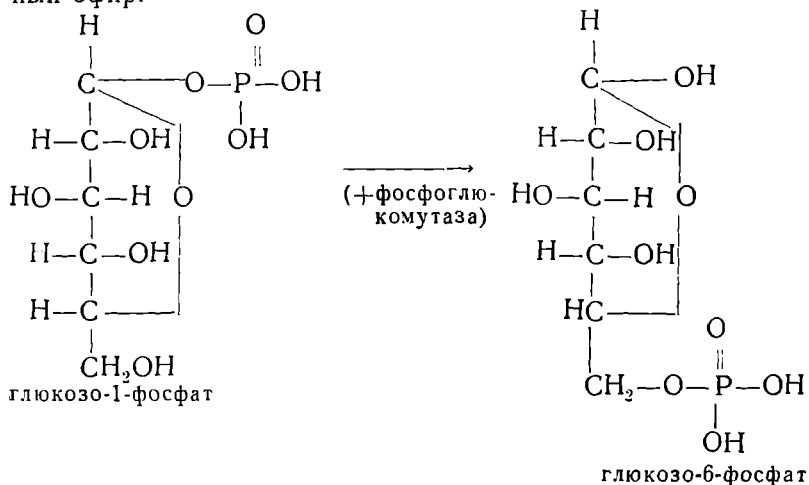
Для расшифровки отдельных этапов процесса промежуточного превращения углеводов большую роль сыграли опыты с применением парализаторов (ингибиторов) некоторых ферментных систем. Так, например, при введении в реак-

ционную смесь монойодуксусной кислоты ($\text{CH}_2\text{I}\text{COOH}$) тормозится действие триозофосфатдегидразы и процесс расщепления углеводов останавливается на стадии образования фосфотриоз (см. дальше). При добавлении фтористого натрия (NaF) тормозится действие фермента енолазы и в реакционной смеси накапливается фосфоглицериновая кислота.

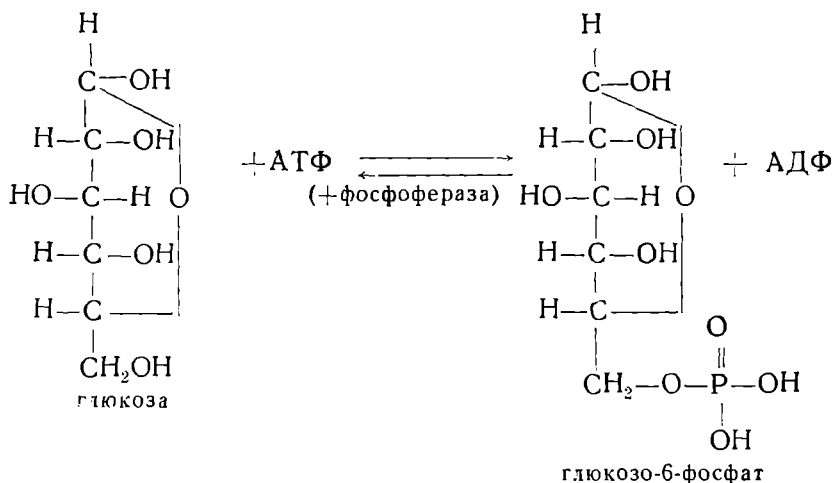
Многочисленные исследования, произведенные в области изучения процесса гликолиза, показали, что в организме анаэробный распад углеводов совершается через ряд промежуточных этапов следующим образом. Гликоген под влиянием фермента фосфорилазы распадается с образованием глюкозо-1-монофосфорного эфира.



Глюкозо-1-монофосфорный эфир под влиянием фермента фосфоглюкомутазы¹ превращается в глюкозо-6-монофосфорный эфир.



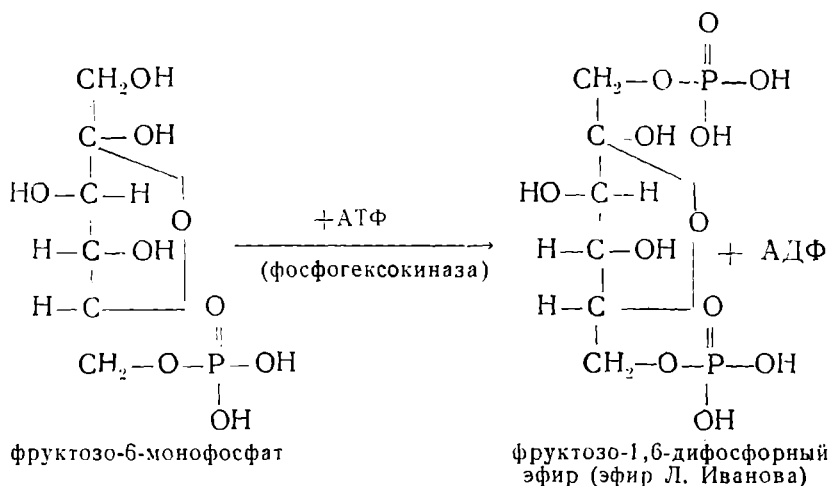
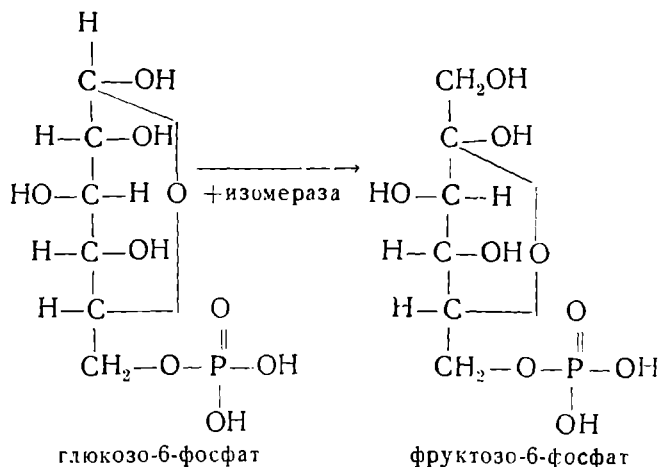
Если анаэробное превращение углевода начинается не с гликогена, а с глюкозы, то образование глюкозо-6-фосфата происходит при участии фермента фосфоферазы путем перифосфорилирования глюкозы с аденозинтрифосфорной кислотой.



Глюкозо-6-монофосфорный эфир под влиянием фермента изомеразы переходит во фруктозо-6-монофосфорный эфир.

¹ Фосфоглюкомутаза — фермент, катализирующий реакцию изомеризации, заключающуюся в изменении положения фосфорного радикала.

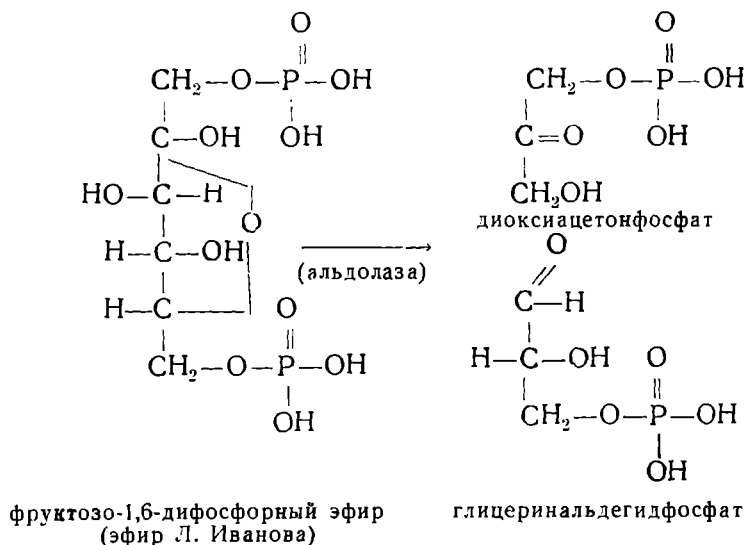
Из фруктозо-6-монофосфорного эфира путем перефосфорилирования с аденозинтрифосфорной кислотой (АТФ) образуется фруктозо-1,6-дифосфорный эфир.



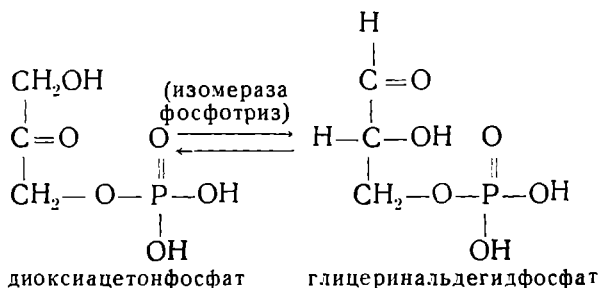
Процесс фосфорилирования глюкозы и фруктозо-6-фосфата сопровождается поглощением химической энергии, освобождаемой при разрыве макроэргической связи в молекуле АТФ.

Фруктозо-1,6-дифосфорный эфир (фруктозодифосфат) в результате внутримолекулярной перегруппировки электронов

под действием фермента альдолазы распадается на два триозофосфата¹: диоксиацетонфосфат и глицеринальдегидфосфат.

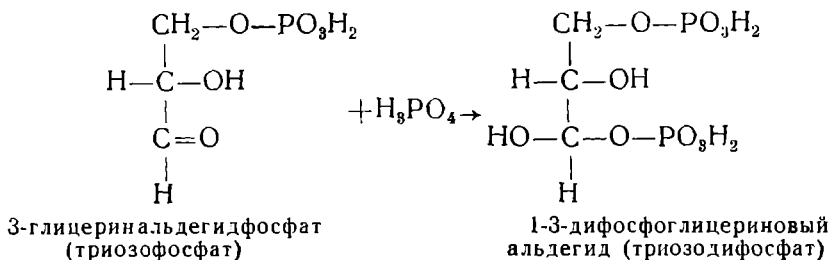


Оба триозофосфата способны к взаимному превращению под влиянием фермента изомеразы. Промежуточным этапом реакции является образование енольной формы триозофосфата:



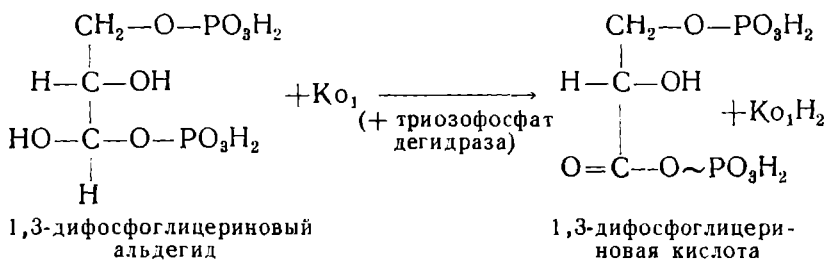
Глицеринальдегидфосфат (триозофосфат), присоединяя молекулу фосфорной кислоты, превращается в 1,3-дифосфоглицериновый альдегид:

¹ При добавлении к мышечному экстракту моноiodуксусной кислоты гликолиз останавливается на образовании двух триозофосфатов, так как моноiodуксусная кислота тормозит дальнейшее превращение их под влиянием триозофосфатдегидразы. Моноiodуксусная кислота блокирует сульфгидрильные группы триозофосфатдегидразы и таким образом инактивирует фермент.

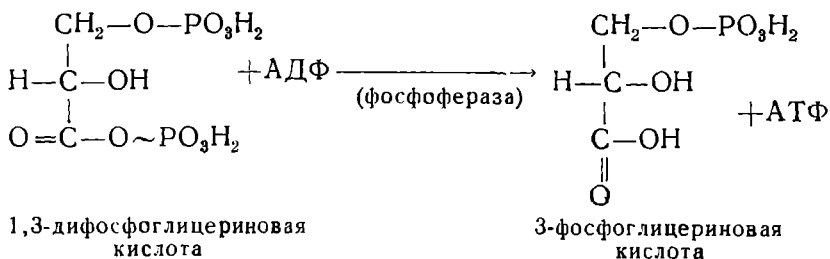


1-3-дифосфоглицериновый альдегид под влиянием фермента триозофосфатдегидразы и кодегидразы (K_01) (см. стр. 101) окисляется в 1,3-дифосфоглицериновую кислоту. Кодегидраза восстанавливается в дигидроформу (K_01H_2).

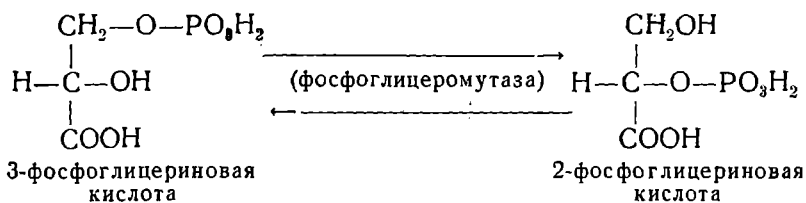
Энергия, образующаяся в процессе окисления, аккумулируется во вновь возникшей макроэргической карбонильнофосфатной связи 1,3-дифосфоглицериновой кислоты:



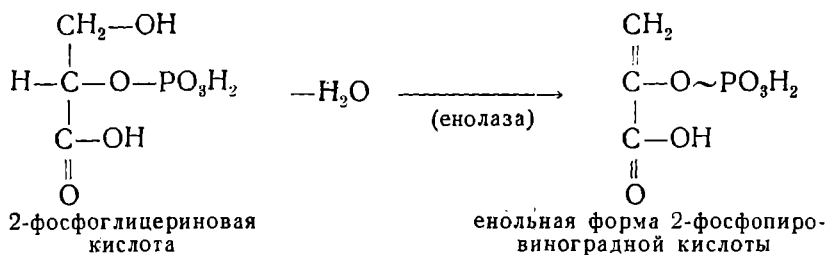
1,3-дифосфоглицериновая кислота при участии фосфоферазы вступает в реакцию с аденозиндифосфорной кислотой (АДФ). В результате реакции образуется аденозинтрифосфорная кислота. Энергия, аккумулированная в карбонильнофосфатной связи 1,3-дифосфоглицериновой кислоты, переходит к аденозинтрифосфорной кислоте.



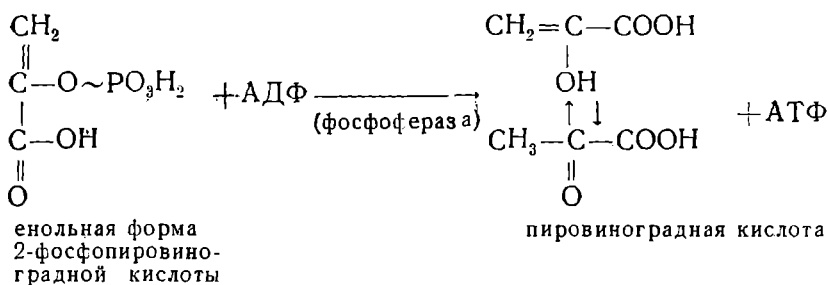
Под влиянием фермента фосфоглицеромутазы 3-фосфоглицериновая кислота превращается в 2-фосфоглицериновую кислоту:



2-фосфоглицериновая кислота, теряя молекулу воды, превращается в енольную форму 2-фосфопировиноградной кислоты. Фермент, катализирующий эту реакцию, носит название енолазы. Он проявляет активность только в присутствии ионов магния¹.



При образовании 2-фосфопировиноградной кислоты происходит перераспределение внутримолекулярной энергии и образуется макроэргическая карбонильнофосфатная связь. 2-фосфопировиноградная кислота вступает в реакцию перефосфорилирования с аденозиндифосфорной кислотой (АДФ). В результате реакции образуется пировиноградная кислота и аденозинтрифосфорная кислота (АТФ). Энергия, аккумулированная в карбонильно-фосфатной связи 2-фосфопировиноградной кислоты, передается вместе с фосфатным остатком образующейся из аденозиндифосфорной кислоты аденозинтрифосфорной кислоте.



¹ При добавлении фтористого натрия происходит связывание ионов магния в виде магнийфторфосфата, и гликолиз останавливается на стадии образования фосфоглицериновой кислоты. Одновременно в жидкости обнаруживается гексозодифосфат.

Пировиноградная кислота под влиянием фермента лактикодегидразы вступает в реакцию с восстановленной кодегидразой и превращается в молочную кислоту.

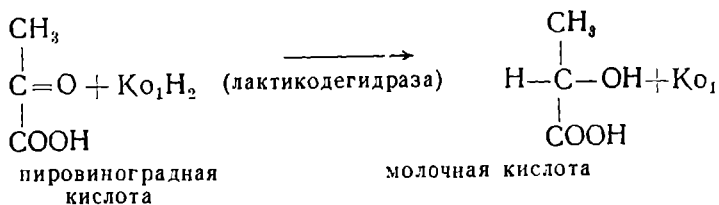
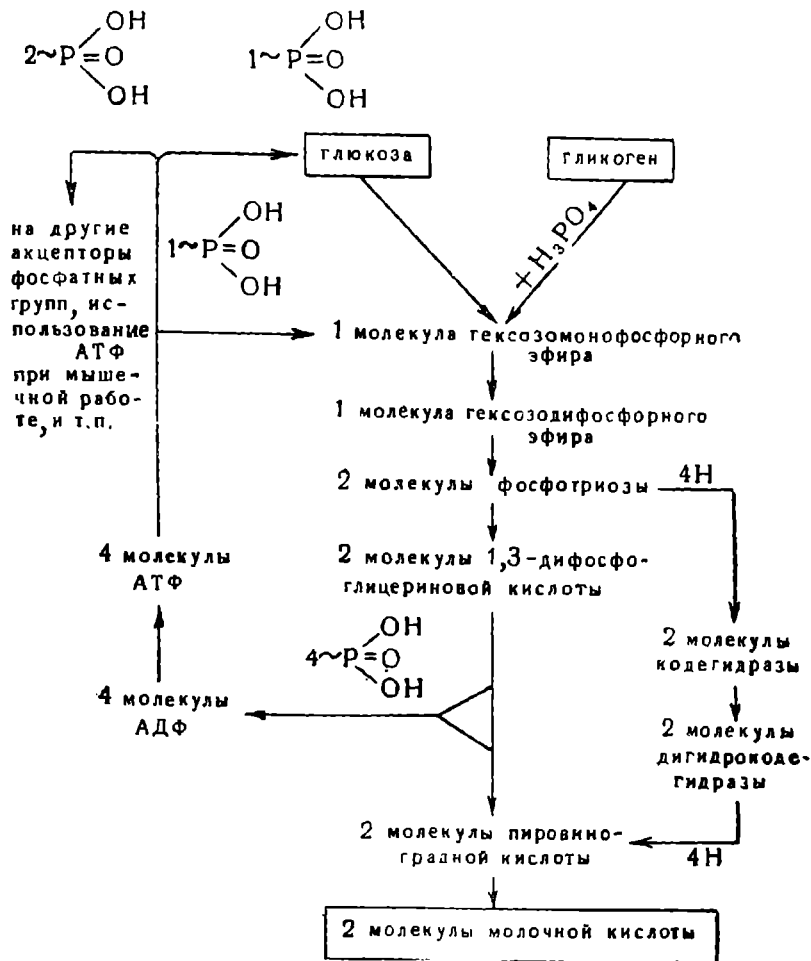
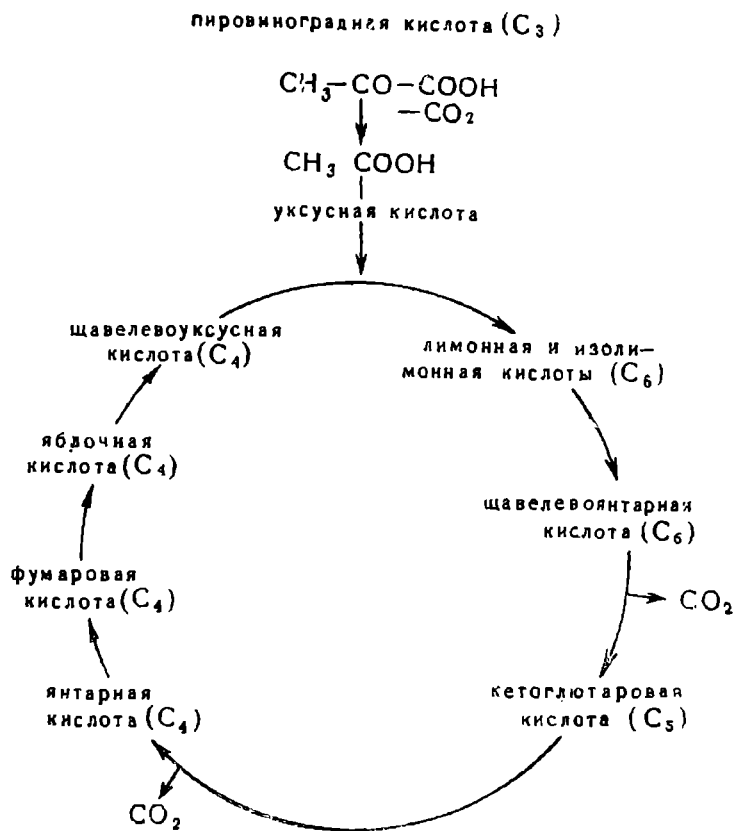


Схема анаэробного превращения углеводов



Расщепление углеводов с образованием молочной кислоты наблюдается при энергичной мышечной работе, когда приток кислорода не может полностью обеспечить окисление кодегидразы I. Образовавшаяся в мышце молочная кислота

Схема аэробного окисления пировиноградной кислоты



с током крови переносится в печень и там через ряд промежуточных реакций, обратных гликолитическим, превращается в гликоген. В аэробных условиях пировиноградная кислота окисляется при участии так называемого цикла трикарбоновых кислот.

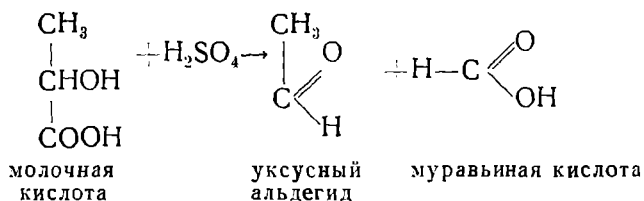
В этом цикле щавелевоуксусная кислота играет роль катализатора. Она может образоваться из янтарной, фумаровой, яблочной, а также из лимонной и α-кетоглутаровой кислот, и поэтому добавление к тканевой кашице этих дикарбоновых и трикарбоновых кислот стимулирует дыхание тканей. Так как пировиноградная и уксус-

ная кислоты являются промежуточными продуктами распада углеводов, жиров и белков, то описанный каталитический механизм может участвовать в окислении огромного количества разнообразных пищевых веществ и продуктов их межзоточных превращений.

Работа № 87

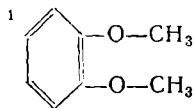
Анаэробный распад гликогена или крахмала до молочной кислоты (гликолиз)

Если к мышечной каше добавить раствор гликогена или крахмала и создать благоприятные условия среды, температуры и анаэробноза, то через некоторое время в смеси можно обнаружить молочную кислоту. Образование молочной кислоты обусловлено наличием в мышечной каше гликолитических ферментов, катализирующих расщепление крахмала через ряд промежуточных этапов до молочной кислоты (см. стр. 126). Для обнаружения молочной кислоты ее переводят в уксусный альдегид при помощи концентрированной серной кислоты:

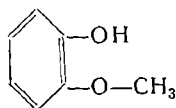


Уксусный альдегид открывают цветной реакцией с вератролом или гваяколом¹.

Ход работы. В 2 пробирки (контрольную и опытную) помещают по 0,5 г свежеприготовленной мышечной кашицы² и по 3 мл фосфатного буфера pH = 8,0. В первую (контрольную) пробирку добавляют 2 мл 5% раствора метафосфорной кислоты для разрушения ферментов мышечной ткани³ и 1 мл дистиллированной воды. Во вторую пробирку (опытную) добавляют 1 мл 0,5% раствора гликогена или крахмала. В обе пробирки наливают по 10 капель вазелинового масла для создания анаэробных условий. Пробирки поме-



вератрол (диметиловый эфир пирокатехина)



гваякол (монометиловый эфир пирокатехина)

² Мышечную кашецу готовят из свежего мяса.

³ Метафосфорная кислота осаждает и денатурирует белки.

щают в термостат при температуре 37° на 1 час. Через час их вынимают и во вторую (опытную) пробирку добавляют 2 мл 5% раствора метафосфорной кислоты для прекращения действия ферментов. Содержимое пробирок фильтруют через бумажный фильтр в 2 чистые пронумерованные пробирки. К полученным фильтратам добавляют по 0,5 г гидроксида кальция и по 1 мл полунасыщенного раствора сернокислой меди для осаждения углеводов, присутствующих в фильтратах, и в течение 15 минут время от времени взбалтывают. Выпавший осадок углеводов отфильтровывают и получают два прозрачных фильтрата: контрольный и опытный.

С фильтрами проводят реакцию на присутствие молочной кислоты. Для этого в 2 чистые пронумерованные пробирки отбирают: в первую — 10 капель фильтрата контрольной пробы, во вторую — 10 капель фильтрата опытной пробы. Пробирки помещают в ледяную воду и осторожно, по каплям, добавляют в каждую пробирку концентрированную серную кислоту (приблизительно 30—35 капель). Нельзя забывать, что сильное перегревание может привести к обугливанию молочной кислоты. Для ускорения процесса окисления молочной кислоты обе пробирки переносят в кипящую водяную баню на 4—5 минут и затем быстро охлаждают в ледяной воде. В каждую пробирку к охлажденным жидкостям добавляют по 3 капли 0,2% спиртового раствора вератрола или гваякола. Через некоторое время в опытной пробе, где под влиянием ферментов мышечной ткани произошел гликолиз, появляется красное окрашивание, в контрольной пробе, где ферменты разрушены, — розоватое. Появление слабой окраски в контрольной пробе обусловлено присутствием в самой мышечной каше следов молочной кислоты, образовавшейся до начала опыта.

РЕГУЛЯЦИЯ И НАРУШЕНИЯ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА

В норме импульсы, идущие от центральной нервной системы, поддерживают секрецию инсулина, адреналина и адренокортикотропного гормона на таком уровне, при котором содержание сахара в крови колеблется в довольно узких пределах — от 80 до 120 мг%. Инсулин способствует синтезу гликогена в печени и в мышцах, усиливает окислительный распад глюкозы в тканях и тем самым вызывает снижение содержания сахара в крови.

Гормон надпочечников адреналина по характеру действия является антагонистом инсулина. Адреналин способствует распаду гликогена в печени и мышцах и вызывает кратковременное повышение содержания сахара в крови (гипергликемия) и появление его в моче (глюкозурия). Такая адреналиновая гипергликемия и глюкозурия наблюдаются

при сильных психических возбуждениях, при волнениях, вызванных радостными или неприятными переживаниями, особенно у нервных людей. В этих случаях раздражение центральной нервной системы вызывает усиленное образование адреналина и приводит к избыточному поступлению его в кровь.

Кратковременное повышение содержания сахара в крови и выделение его с мочой может быть вызвано однократным выведением в организм больших количеств сахара, превышающих ассимиляционную способность печени (в среднем 150 г глюкозы) и после употребления большого количества фруктов. Такие формы глюкозурии носят название пищевой или «алиментарной глюкозурии». Стойкое повышение сахара в крови чаще всего бывает связано с нарушением функции поджелудочной железы и обусловлено поражением клеток островков Лангерганса, вырабатывающих инсулин. Заболевание носит название диабета, или сахарной болезни, и сопровождается нарушениями углеводного, жирового и белкового обмена. При диабете выведение сахара с мочой продолжается даже в том случае, когда углеводы полностью исключены из пищи. Образование сахара происходит за счет усиленного распада белковых веществ, жиров и других неуглеводных соединений, что приводит к сильному истощению организма. При диабете нарушается нормальный процесс окисления жирных кислот, и продукты неполного сгорания их (β -оксимасляная кислота, ацетоуксусная кислота и ацетон) поступают в кровь и выводятся с мочой, вызывая ацидоз и ацетонурию. При лечении инсулином у больных диабетом снижается концентрация сахара и ацетоновых тел в крови и уменьшается выделение их с мочой. Больные быстро поправляются и прибавляют в весе.

Работа № 88

Влияние инсулина на содержание сахара в крови

Подкожное введение инсулина¹ вызывает уменьшение содержания сахара в крови (гипогликемия).

Снижение концентрации сахара обусловлено повышением гликогенообразовательной функции печени и мышц и увеличением интенсивности окислительного распада глюкозы. За единицу инсулина принята специфическая биологическая активность 0,045 мг стандартного кристаллического препарата, приготовленного Лабораторией по государственному контролю органовпрепаратов в Москве. Это количество ин-

¹ Продажный препарат инсулина представляет собой раствор инсулина в воде, подкисленной соляной кислотой. Выпускается в ампулах, содержащих 5 мл раствора с биологической активностью 40 единиц в 1 мл (реже 20 единиц в 1 мл).

сулина в течение часа снижает содержание сахара в крови кролика весом 2 кг, предварительно голодавшего 24 часа, до 45 мг% и вызывает у него наступление судорог.

Ход работы. Определяют содержание сахара в крови кролика по методу Хагедорна-Иенсена до введения ему инсулина (см. стр. 121). Вычисляют дозу инсулина соответственно весу кролика из расчета 1,5 единицы¹ на 1 кг веса.

Введение инсулина кролику производят в стерильных условиях. Резиновый колпачок ампулы протирают спиртом, прокалывают его стерильной иглой от шприца, отбирают приблизительно 0,3 мл препарата инсулина и переносят его в стерильный бюкс. Двойную против рассчитанной дозы инсулина отмеривают микропипеткой в другой стерильный бюкс и разводят стерильным физиологическим раствором до объема 4 мл. Содержимое бюкса перемешивают, отбирают шприцем 2 мл и вводят кролику под кожу живота.

Замечают время введения инсулина. Через час берут повторно кровь из уха кролика и определяют содержание сахара в крови после введения инсулина. Во избежание инсулинового шока по окончании опыта кролику вводят подкожно 10 мл 40% стерильного раствора глюкозы и такой же раствор дают пить. Результаты анализа и выводы фиксируют в таблице (см. стр. 124).

Работа № 89

Влияние адреналина на содержание сахара в крови

При подкожном введении адреналина² содержание сахара в крови кролика увеличивается (гипергликемия). Повышение концентрации сахара в крови обусловлено усиленным распадом гликогена в печени и мышцах и сопровождается выделением сахара с мочой (глюкозурия). Частое применение адреналина с лечебной целью снижает запасы гликогена в организме.

Ход работы. Определяют содержание сахара в крови кролика до введения ему адреналина, пользуясь методом Хагедорна-Иенсена (см. стр. 121). Вычисляют дозу адреналина соответственно весу кролика из расчета 0,35 мл продажного препарата на 1 кг веса. Кролику вводят вычисленное количество адреналина подкожно в стерильных условиях. Замечают время введения адреналина.

¹ Такая большая доза инсулина дает возможность получить эффект через короткий промежуток времени (1 час) и может привести к гибели, если кролику своевременно (т. е. по окончании опыта) не ввести глюкозу.

² Продажный препарат представляет собой раствор хлористоводородной соли адреналина в разведении 1 1000. Выпускается для подкожных инъекций стерильным в ампулах емкостью 1 мл и для наружного употребления во флаконах.

Через полчаса взятие крови повторяют и определяют содержание сахара в крови после введения адреналина. Результаты анализа и выводы фиксируют в таблице (см. стр. 124).

ОТКРЫТИЕ САХАРА В МОЧЕ

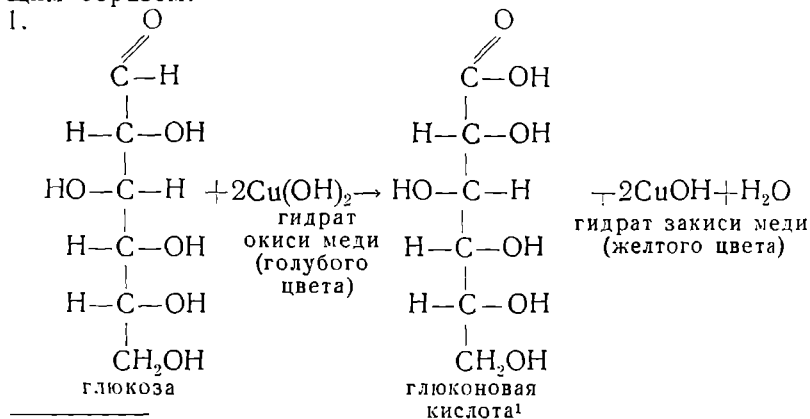
В моче здорового человека глюкоза присутствует в виде следов (не выше 0,04%) и не может быть обнаружена обычными химическими реакциями. Выделение сахара с мочой в количестве, превышающем норму, обусловлено либо повышением содержания сахара в крови, либо нарушением пропускной способности почек. Стойкое повышение сахара в крови наблюдается при нарушении гормональной регуляции и чаще всего при панкреатическом диабете. Содержание сахара в моче в тяжелых случаях диабета может достигать до 5—8%. Глюкозурия, обусловленная нарушением пропускной способности почек, называется почечной и наблюдается при введении в организм больших количеств алкоголя, опиума, адреналина, окиси углерода, хлороформа, фторидзина и других веществ. Для обнаружения сахара в моче пользуются пробами Троммера, Фелинга и Нилендера.

Работа № 90

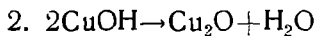
Проба Троммера на сахар

При нагревании исследуемой жидкости со щелочным раствором сернокислой меди в присутствии глюкозы образуется желтый или красный осадок.

Реакция обусловлена окислением глюкозы и восстановлением гидрата окиси меди в гидрат закиси или закись меди. Схематично реакция может быть изображена следующим образом:



¹ При окислении глюкозы образуются разнообразные продукты глубокого распада. В данном уравнении реакции условно показано образование одного из возможных начальных продуктов окисления.



закись меди
(красного цвета)

Следует иметь в виду, что в моче содержится много органических веществ (мочевая кислота, креатинин и др.), также способных восстанавливать в щелочной среде соли тяжелых металлов при длительном кипячении. В противоположность этому реакция восстановления тяжелых металлов в присутствии сахара происходит до начала кипения.

Ход работы. К 10 каплям мочи добавляют 3 капли 10% раствора едкого натра и по каплям 7% раствор сернистой меди до появления не исчезающей голубой мути¹.

Жидкость нагревают до начала кипения. В присутствии глюкозы выпадает желтый осадок гидрата закиси меди или красный осадок закиси меди.

Работа № 91

Проба Фелинга на сахар

Реакция Фелинга является модификацией реакции Троммера, в которой вместо гидроокиси меди употребляется алкоголь меди с сегнетовой солью². Химизм реакции тот же, что и в реакции Троммера.

Ход работы. К 3 каплям 7% раствора сернистой меди прибавляют 3 капли щелочного раствора сегнетовой соли. К полученному реактиву Фелинга добавляют 5—6 капель исследуемой мочи, жидкость перемешивают и нагревают до начала кипения. В присутствии глюкозы выпадает желтый осадок гидрата закиси меди или красный осадок закиси меди.

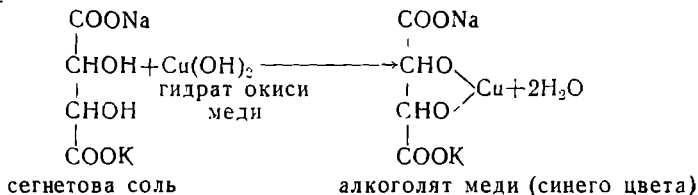
Работа № 92

Проба Ниллендера на сахар

При кипячении исследуемой жидкости с реактивом Ниллендера в присутствии сахара образуется черный осадок.

Реакция обусловлена окислением глюкозы и восстановлением гидроокиси висмута до металлического висмута чер-

¹ В присутствии глюкозы $\text{Cu}(\text{OH})_2$ растворяется с образованием алкоголя меди синего цвета. Муть появляется при небольшом избытке $\text{Cu}(\text{OH})_2$.



ного цвета. Наличие белка в исследуемой жидкости мешает реакции вследствие возможности образования сернистого висмута (также черного цвета). В этом случае жидкость необходимо предварительно прокипятить¹, осадок белка отфильтровать и реакцию проводить с фильтратом.

Ход работы. К 10 каплям мочи добавляют 3 капли реактива Ниллендера и смесь кипятят 2—3 минуты. В присутствии глюкозы жидкость бурет и образуется черный осадок металлического висмута.

Контрольные вопросы

1. Какие железы пищеварительного тракта выделяют ферменты, действующие на полисахариды и дисахариды?
2. Напишите уравнения гидролиза крахмала, сахарозы и мальтозы.
3. Почему в желудке прекращается расщепление крахмала амилазой слюны?
4. Каков механизм всасывания углеводов и какова сравнительная скорость всасывания отдельных гексоз и пентоз?
5. Какое максимальное количество гликогена может отложиться в печени человека?
6. Каково содержание сахара в крови в норме?
7. Какой процесс называется гликогенолизом и в чем его отличие от процесса гликолиза?
8. Напишите схему гликолиза и подпишите под формулами названия всех промежуточных продуктов гликолиза.
9. Что такое АТФ и АДФ? Какова химическая природа этих соединений и какова их роль в процессе гликолиза?
10. Почему процесс распада глюкозы до молочной кислоты называется анаэробным процессом?
11. Как распадается пировиноградная кислота в аэробных условиях? Напишите, как происходит окисление уксусной кислоты через цикл трикарбоновых кислот, и подпишите названия всех промежуточных продуктов превращения.
12. Сколько калорий выделяется при сгорании в организме 1 г углеводов?
13. Каков дыхательный коэффициент при сгорании углеводов?
14. Какие нарушения в обмене углеводов наблюдаются при сахарном диабете и каким путем удается их устранить?
15. Что такое глюкозурия и в каких случаях она бывает?
16. Какова роль гормонов поджелудочной железы и надпочечников в обмене углеводов?

3. ОБМЕН БЕЛКОВ

ПРЕВРАЩЕНИЯ БЕЛКОВ В ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОМ ТРАКТЕ

Переваривание белков начинается в желудке под влиянием фермента пепсина. Пепсин выделяется в виде профермента пепсиногена и активируется соляной кислотой².

¹ См. реакции осаждения белка при кипячении (стр. 29).

² Активирование соляной кислотой заключается в отщеплении от пепсиногена парализатора полипептидного строения, называемого ингибитором (inhibitio — торможение).

Соляная кислота создает оптимальные условия среды для действия пепсина ($\text{pH} = 1,5-2,5$) и вызывает набухание белка. Под действием пепсина простые и сложные белки расщепляются на высокомолекулярные обломки, называемые пептонами.

В двенадцатиперстной кишке и тонком кишечнике под действием ферментов поджелудочного и кишечного сока переваривание белков и пептонов продолжается. Поджелудочной железой выделяются проферменты трипсиноген и химотрипсиноген. Трипсиноген под действием фермента кишечного сока энтерокиназы¹ превращается в активный трипсин. Химотрипсиноген переходит в активное состояние под влиянием трипсина. Трипсин и химотрипсин катализируют расщепление различных пептидных связей в молекуле белка. Совместное или последовательное участие обоих ферментов приводит к более глубокому распаду белковой молекулы, чем участие каждого фермента в отдельности. Трипсин и химотрипсин расщепляют белки до полипептидов и проявляют свою наибольшую активность в нейтральной или слабощелочной среде² ($\text{pH} = 7,0-8,0$). Образовавшиеся полипептиды расщепляются полипептидазами³ панкреатического и кишечного сока на дипептиды и отдельные аминокислоты. Дипептидазы кишечного сока расщепляют каждый дипептид на две аминокислоты.

Аминокислоты всасываются в кровь и с кровью разносятся по тканям. Небольшая часть аминокислот в кишечнике подвергается действию микробной флоры. В результате гнилостного распада аминокислоты превращаются в ядовитые для организма продукты: индол, скатол, фенол, крезол, гирамин, гистамин, путресцин, кадаверин и др.

Работа № 93

Анализ желудочного сока

В состав желудочного сока входят: пепсин, соляная кислота, липаза, муцин, хлористый натрий, кислые фосфорнокислые соли и другие вещества. Соляная кислота обладает дезинфицирующим действием; в ее присутствии погибают многие бактерии. При пониженной концентрации или полном отсутствии соляной кислоты в желудке развиваются

¹ Энтерокиназа открыта Н. П. Шеповальниковым в лаборатории И. П. Павлова.

² Щелочной сок поджелудочной железы и желчь нейтрализуют соляную кислоту, поступающую из желудка, и реакция кишечного содержимого становится близкой к нейтральной ($\text{pH} = 6,5-7,0$).

³ Карбоксиполипептидаза расщепляет полипептид со стороны свободной карбоксильной группы, аминопептидаза — со стороны свободной аминогруппы.

гнилостные процессы и процессы брожения и накапливаются органические кислоты: молочная, масляная, уксусная и др.

При заболеваниях, связанных с нарушением секреторной деятельности желудка, общее количество отделяемого сока изменяется, нарушается нормальное соотношение содержащихся в нем веществ и падает ферментативная активность. Обычно желудочный сок начинает отделяться только после приема пищи.

При анализе желудочного сока¹ определяют общее количество его, цвет, запах, наличие слизи, реакцию среды, присутствие соляной кислоты, молочной кислоты, желчи и крови.

В желудочном соке определяют общую кислотность и свободную соляную кислоту, а иногда изучают переваривающую способность желудочного сока по методу Метта и др.

1. Определение реакции желудочного сока. 1 каплю профильтрованного желудочного сока наносят стеклянной палочкой на синюю лакмусовую бумажку². В присутствии кислореагирующих веществ лакмусовая бумажка приобретает красный цвет. При некоторых заболеваниях в желудочном соке могут полностью отсутствовать кислореагирующие вещества.

2. Проба на свободную соляную кислоту. Каплю профильтрованного желудочного сока наносят стеклянной палочкой на красную бумажку конго³; в присутствии свободной соляной кислоты бумажка приобретает синий цвет. Соляная кислота, выделяемая железами желудка, обуславливает кислотность желудочного сока в пределах значений $pH = 1,6-2,2$. В отсутствие соляной кислоты другие кислореагирующие вещества желудочного сока не изменяют красного цвета бумажки конго, так как слабо диссоциирующие органические кислоты и кислые фосфорнокислые соли, присутствующие в небольшой концентрации, создают в среде $pH = 4,0$ и выше.

3. Проба на молочную кислоту. К 20 каплям 1% раствора фенола добавляют 1—2 капли 1% раствора хлорного железа. Получается раствор фенолята железа, окрашенный в фиолетовый цвет. В пробирку с реактивом добавляют по каплям желудочный сок, содержащий молочную

¹ Анализ желудочного сока производят через 45 минут после пробного завтрака (35 г черствого белого хлеба и 400 мл воды). В желудочном содержимом соляная кислота желудочного сока разбавлена выпитой водой и частично (приблизительно на $\frac{1}{3}$) связана с белками пробного завтрака.

² Зона перехода лакмуса лежит при $pH = 4,4-6,4$; окраска красная — синяя.

³ Зона перехода конго лежит при $pH = 3,0-5,2$; окраска синяя — красная.

кислоту. В присутствии молочной кислоты¹ синяя окраска переходит в желто-зеленую от образования молочнокислого железа. При одновременном присутствии соляной кислоты жидкость обесцвечивается.

4. Определение общей кислотности желудочного сока. Общей кислотностью желудочного сока называется сумма всех кислореагирующих веществ, присутствующих в желудочном соке. Она выражается количеством миллилитров 0,1 н. щелочи, пошедшей на титрование 100 мл желудочного сока в присутствии индикатора фенолфталеина².

К кислореагирующим веществам желудочного сока относятся: свободная соляная кислота, связанная (с белками) соляная кислота, органические кислоты брожения, кислые фосфорнокислые соли.

В норме общая кислотность варьирует в пределах от 40 до 60³. В клинической практике принято производить титрование 5—10 мл желудочного сока 0,1 н. раствором щелочи.

Однако с целью экономии времени, реактивов и исследуемого материала с не меньшей точностью можно применять для этой цели полумикроанализ и титровать 1 мл желудочного сока 0,01 н. раствором щелочи.

Ход работы. В маленький стаканчик или колбочку объемом 5—10 мл отмеривают чистой пипеткой 1 мл профильтрованного желудочного сока, добавляют 1 каплю 0,5% спиртового раствора фенолфталеина и титруют 0,01 н. раствором щелочи из микробюретки до появления слабо розового окрашивания⁴, не исчезающего в течение 20—30 секунд. Титрование повторяют несколько раз. Результаты титрования вносят в таблицу и производят расчет. Расхождение в параллельных пробах не должно превышать 0,05 мл (ошибка не более 0,5%).

5. Определение свободной соляной кислоты в желудочном соке. При титровании желудочного сока раствором щелочи в присутствии индикатора диметиламиноазобензола⁵ нейтрализуется только свободная соляная кислота. Слабые кислоты (молочная, кислые фосфаты и свя-

¹ Реакция на молочную кислоту получается отчетливой при пониженном содержании соляной кислоты.

² Зона перехода фенолфталеина лежит при $pH = 8,3-10,0$; окраска бесцветная — красная.

³ При заболеваниях, связанных с нарушением секреции желудочного сока, общая кислотность может быть выше и ниже нормы.

⁴ При титровании жидкость перемешивают осторожно. При сильном взбалтывании может произойти обесцвечивание фенолфталеина за счет углекислоты воздуха.

⁵ Зона перехода диметиламиноазобензола лежит при $pH = 2,9-4,0$. Окраска красная — желтая.

званная соляная кислота) в присутствии сильной соляной кислоты (рН = 1,0—3,0) находятся в растворе в недиссоциированном состоянии и в реакцию со щелочью не вступают. При рН = 3,0, когда окраска диметиламиноазобензола изменяется от красной к оранжевой, почти вся свободная соляная кислота (99%) оттитрована. Свободную соляную кислоту принято выражать количеством миллилитров 0,1 н. раствора щелочи, пошедшей на титрование 100 мл желудочного сока. В норме количество «свободной соляной кислоты», выраженное в миллилитрах децинормальной щелочи, пошедшей на титрование 100 мл желудочного сока, равно 20—40. Концентрация свободной соляной кислоты может быть также выражена в процентах. Вычисление производят согласно уравнению¹.

$$x = \frac{3,65 A}{1000} \text{ (в процентах).}$$

Ход работы. В стаканчик или колбочку отмеривают 1 мл желудочного сока, добавляют 1 каплю 0,5% спиртового раствора диметиламиноазобензола и титруют 0,01 н. раствором щелочи из микробюретки до появления оранжевого окрашивания. Титруют несколько раз и из данных титрования берут среднее. Результат отдельных титрований записывают в таблицу, там же производят расчет.

Определение «общей кислотности» и «свободной соляной кислоты» в желудочном соке

№ пробы	Количество 0,01 н. раствора NaOH, пошедшего на титрование 1 мл желудочного сока (в мл)				Количество 0,01 н. раствора NaOH, потребное на нейтрализацию 100 мл желудочного сока (в мл)		Количество 0,1 н. раствора NaOH, потребное на нейтрализацию 100 мл желудочного сока (в мл)	
	с фенолфталеином		с диметиламиноазобензолом		с фенолфталеином	с диметиламиноазобензолом	с фенолфталеином (общая кислотность)	с диметиламин азобензолом (свободная HCl)
	в пробе	среднее	в пробе	среднее				
1								
2								
3								

Выводы:

Работа № 94

Действие желудочного сока на фибрин

При действии активного желудочного сока фибрин расщепляется до пептонов и жидкость приобретает способность давать биуретовую реакцию. После кипячения (разрушение

¹ А — количество 0,1 н. щелочи, пошедшей на титрование 100 мл желудочного сока с индикатором диметиламиноазобензолом.

фермента) или нейтрализации соляной кислоты желудочный сок теряет способность расщеплять фибрин, так как ни соляная кислота, ни пепсин порознь не производят расщепления белка.

Ход работы. В 3 пробирки наливают по 1 мл (20 капель) активного желудочного сока ¹.

Содержимое первой пробирки кипятят 2—3 минуты и охлаждают в стакане с холодной водой. Содержимое второй пробирки нейтрализуют раствором соды до слабо щелочной реакции на лакмус (1—2 капли 10% раствора NaHCO_3). Третью пробирку оставляют без изменения. Во все три пробирки добавляют по маленькому кусочку фибрина и ставят в водяную баню при температуре 38° . Через 15—30 минут пробирки вынимают и встряхивают, отмечают видимые изменения фибрина (растворение, набухание) и проделывают биуретовую реакцию (см. стр. 6). Положительная биуретовая реакция с красным оттенком получается только в той пробирке, где присутствуют пепсин, соляная кислота и фибрин. Результаты работы фиксируют в таблице.

Действие желудочного сока на фибрин

№ пробы	Субстрат	Фермент	Соляная кислота (0,2% раствор)	Видимые изменения	Биуретовая проба
1					
2					
3					

Выводы:

Работа № 95

Створаживание молока пепсином желудочного сока

Молоко при добавлении нейтрализованного желудочного сока створаживается. Створаживание молока обусловлено способностью пепсина превращать казеиноген молока в казеин, кальциевая соль которого нерастворима в воде.

Ход работы. К 5 каплям активного желудочного сока добавляют 20 капель дистиллированной воды и небольшое количество мелкоистолченного углекислого кальция до нейтральной реакции на лакмус; жидкость фильтруют. Часть этой жидкости (нейтрализованного желудочного сока) кипятят и охлаждают. В две пробирки наливают по 10 капель свежего молока. В одну пробирку добавляют 2 капли нейтрализованного желудочного сока, в другую — 2 капли прокипяченного нейтрализованного желудочного сока. Обе пробирки

¹ Желудочный сок может быть заменен 1% раствором пепсина в 0,5% соляной кислоте.

помещают в водяную баню при температуре 40° и следят за наступлением створаживания молока. Створаживание наступает только в той пробирке, в которой присутствует некипяченый фермент, субстрат и ионы кальция. Результаты работы фиксируют в таблице.

Створаживание молока желудочным соком

№ пробы	Субстрат	Фермент	Видимые изменения и чем они обусловлены
1			
2			

В ы в о д ы:

Работа № 96

Действие вытяжки из поджелудочной железы на фибрин

Поджелудочная железа выделяет свой секрет в двенадцатиперстную кишку в количестве от 0,5 до 1 л за сутки. Сок поджелудочной железы, полученный по методу И. П. Павлова, представляет прозрачную жидкость щелочной реакции ($pH = 7,3-8,7$) и содержит ферменты, действующие на углеводы (амилаза, мальтаза), жиры (липаза) и белки (трипсинаген, химотрипсинаген, протаминаза, полипептидаза и нуклеаза). В соке поджелудочной железы, кроме ферментов, содержатся белок, жир, лецитин, мыла и минеральные вещества, из которых наибольшее значение для действия ферментов имеет двууглекислый натрий $NaHCO_3$. Для изучения действия ферментов сок поджелудочной железы может быть заменен вытяжкой из поджелудочной железы. При действии вытяжки из поджелудочной железы на фибрин последний расщепляется на низкомолекулярные полипептиды, растворимые в воде. Если кусочки фибрина предварительно окрасить, то при гидролизе фибрина краска¹ переходит в раствор. После кипячения или подкисления вытяжка из поджелудочной железы теряет способность расщеплять фибрин и краска, химически связанная с белком, не переходит в раствор.

Ход работы. В 3 пробирки наливают приблизительно по 1 мл глицириновой вытяжки из панкреатической железы (слабо щелочная реакция на лакмус). Содержимое первой пробирки кипятят 2—3 минуты и охлаждают в стакане с холодной водой. Содержимое второй пробирки подкисляют 1% раствором уксусной кислоты до слабокислой реакции на лакмус. Третью пробирку оставляют без изменения. Во все пробирки опускают примерно по 100 мг окрашенного фибрина. Пробирки с фибрином погружают в водяную баню

¹ Кармин, генцианвиолет, дифенилрозаналин и др.

при температуре 38—40° на 10—15 минут. Жидкость окрашивается только в той пробирке, где ферменты активны и где реакция среды близка к оптимальной. Результаты работы фиксируют в таблице.

Действие вытяжки из поджелудочной железы на фибрин

№ пробы	Субстрат	Ферменты	Реакция среды	Видимые изменения	Окраска жидкости
1					
2					
3					

В ы в о д ы:

КОНЕЧНЫЕ ПРОДУКТЫ АЗОТИСТОГО ОБМЕНА

Конечными продуктами азотистого обмена называются азотистые вещества, образующиеся в клетках организма в результате их жизнедеятельности и выделяющиеся главным образом с мочой. Такими веществами являются: мочевина, мочевая кислота, креатинин, гиппуровая кислота, некоторые аминокислоты, индикан, аммонийные соли и др. Общее количество азота, выделяемого за сутки, равно 10—18 г, из них на долю мочевины падает около 80—90%.

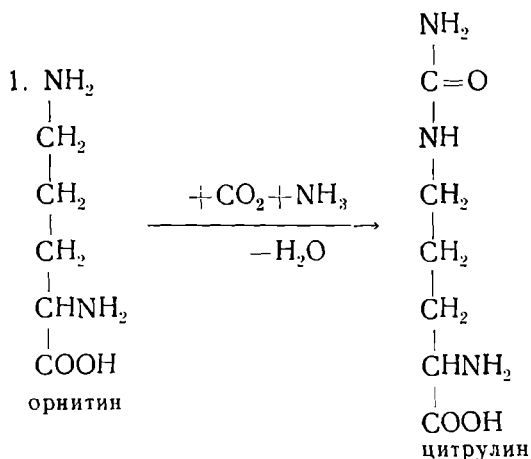
СИНТЕЗ МОЧЕВИНЫ В ОРГАНИЗМЕ

Аммиак, отщепляющийся при дезаминировании аминокислот, является очень ядовитым веществом и выделяется из организма главным образом в форме мочевины (некоторая часть его выделяется в форме аммонийных солей). Синтез мочевины осуществляется в печени. Работами И. П. Павлова и М. В. Ненцкого установлено, что если перевязать печеночную артерию и при помощи фистулы Экка-Павлова отделить систему воротной вены от печени, то в крови и в моче содержание мочевины резко уменьшается и, наоборот, увеличивается выделение аммонийных солей. В дальнейших работах было установлено, что если через переживающую печень пропускать растворы, содержащие аммонийные соли, то в отекающей жидкости обнаруживается мочевина.

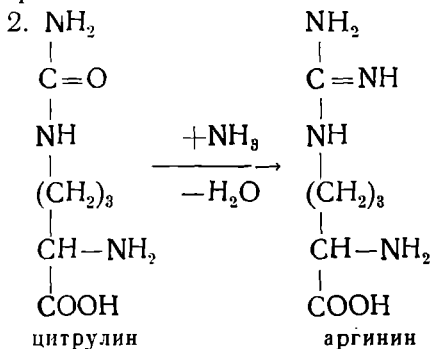
М. В. Ненцкий представлял синтез мочевины непосредственно из аммиака и угольной кислоты. Однако его теория была вскоре оставлена, так как многочисленные попытки доказать образование мочевины этим путем не увенчались успехом. В то же время было известно, что при автолизе печеночной ткани в ней накапливается мочевина. Поиски фермента, катализирующего этот процесс, привели к выделению аргиназы из ткани печени. При действии аргиназы на

аргинин он распадается на орнитин и мочевины. Эти наблюдения позволили считать, что аргиназа участвует в образовании по крайней мере некоторой доли мочевины.

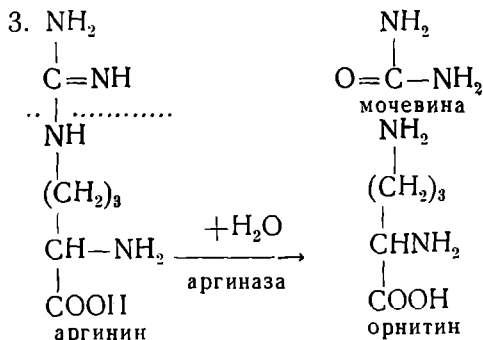
Механизм синтеза мочевины в печени сравнительно недавно был выяснен Кребсом. Кребс, применив методику тканевых срезов, показал, что если к срезам печени добавить какую-либо аминокислоту, то аммиак, освобождающийся при дезаминировании, полностью превращается в мочевины. В случаях, когда к срезам печени добавлялся аргинин или орнитин, количество образовавшейся мочевины было значительно больше того, что соответствовало теоретическим расчетам. На основании своих наблюдений Кребс создал теорию орнитинового цикла, которая заключается в том, что орнитин участвует в процессе синтеза мочевины как катализатор. Синтез мочевины по Кребсу может быть представлен в виде следующей схемы. Орнитин присоединяет к себе аммиак и углекислоту и превращается в цитрулин:



Цитрулин, присоединяя вторую молекулу аммиака, превращается в аргинин:



Аргинин под действием фермента аргиназы распадается на мочевину и орнитин:



Свободный орнитин вновь присоединяет аммиак и угольную кислоту и путем тех же превращений образуется новая молекула мочевины. Синтез мочевины при наличии орнитина не происходит, если в среде отсутствуют легко окисляющиеся вещества (например, глюкоза или молочная кислота) и нарушена целостность клеточной структуры. Это объясняется тем, что синтез мочевины является эндотермическим процессом и нуждается в доставке энергии извне за счет сопряженных реакций окисления. Нарушение целостности клеточной структуры вызывает, по-видимому, инактивацию ферментов и утрату кофакторов, необходимых для осуществления основных и сопряженных реакций. Современные исследования, проведенные с мечеными атомами, подтверждают правильность теории Кребса.

Работа № 97

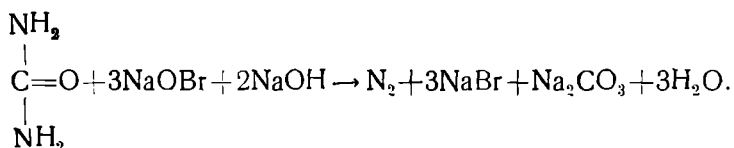
Количественное определение мочевины по способу Бородина

Мочевина является одним из основных конечных продуктов белкового обмена. Выделение мочевины и аммиака из организма свидетельствует об интенсивности белкового обмена и увеличивается при пище, богатой белками, и, наоборот, уменьшается при безбелковой диете. В норме взрослый здоровый человек выделяет в сутки 25—35 г мочевины (содержание мочевины в моче около 2%).

Метод определения мочевины по Бородину является общепринятым и широко используется в клиниках и научно-исследовательских лабораториях.

Мочевина разрушается щелочным раствором бромноватистого натрия с образованием свободного молекулярного азота. Газообразный азот собирается в градуированной части специального прибора. По объему выделившегося газа

определяют количество мочевины в исследуемой жидкости. Реакция протекает по следующему уравнению:



Щелочной раствор бромноватистого натрия готовится путем растворения жидкого брома в 30% растворе едкой

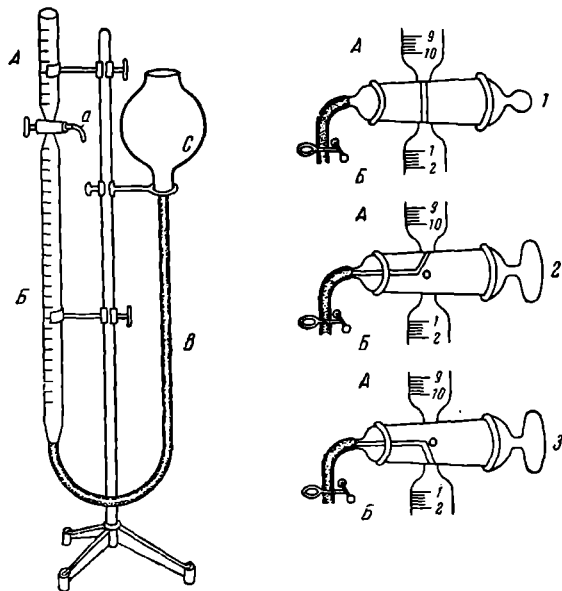
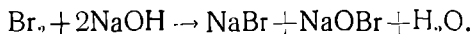


Рис. 14. Прибор Бородина.

щелочи. Бром растворяется и вступает в химическое взаимодействие со щелочью. Образуется бромистый натрий и бромноватистый натрий:



Кроме мочевины, бромноватистой щелочью разрушаются и другие азотистые вещества, такие, как креатинин, мочевая кислота, аммонийные соли и др., однако их количество в моче настолько мало по сравнению с мочевиной, что этой ошибкой метода можно пренебречь.

Прибор (рис. 14) состоит из градуированной трубки, разделенной на две части А и В трехходовым краном, и широкого сосуда С, соединенного с трубкой В при помощи кау-

чуковой трубки *В*. Каучуковая трубка длиной, равной длине трубки *А* и *Б*, должна быть прочно укреплена на концах сосудов *Б* и *С*, иначе она может соскочить под давлением столба жидкости.

Перед началом работы с прибором необходимо ознакомиться с трехходовым краном и научиться им пользоваться, так как неправильный поворот его во время работы может испортить все определение. Кроме обычного канала, который соединяет сосуды *А* и *Б*, в кране имеется еще другой изогнутый канал *а*, при помощи которого можно соединить сосуд *А* и сосуд *Б* с наружным воздухом. Так как обычно во время работы по этому изогнутому каналу приходится выпускать жидкость из сосуда *А*, на конец крана надевается каучуковая трубка с зажимом. Прибор прикрепляется лапками к обычному штативу, причем сосуд *С* помещается внизу и в случае необходимости во время работы поднимается кверху.

Ход работы. Прежде чем приступить к определению мочевины, прибор Бородина заполняется насыщенным раствором поваренной соли, который вследствие своего высокого удельного веса не смешивается с реагирующими веществами и служит барьером для образующегося газа. Заполнение прибора производят следующим образом. Установив сообщение между трубками *А* и *Б*, наливают раствор соли в приподнятый сосуд *С* до тех пор, пока он не заполнит сосуда *Б* и не покажется над краном в сосуде *А*. После этого поворотом крана разобщают сосуды *А* и *Б* и жидкость выпускают из сосуда *А* наружу. Сдавливая каучуковую трубку по направлению от *Б* к *С*, проверяют, не остались ли в ней пузырьки воздуха. Жидкость в сосуде *С* не должна занимать больше $\frac{1}{3}$ объема. Материалом для исследования служит свежая профильтрованная моча, разведенная дистиллированной водой в 5 раз (10 мл мочи + 40 мл воды)¹.

Разведенной мочой ополаскивают несколько раз сосуд *А* для удаления оставшейся на стенках поваренной соли и заполняют сосуд *А* до нулевого верхнего деления. Отметив уровень стояния мочи, осторожно спускают 5 мл мочи из сосуда *А* в сосуд *Б*. Вследствие значительной разницы в удельном весе мочи и раствора поваренной соли моча в сосуде *Б* не смешивается с раствором соли. Мочу, оставшуюся в сосуде *А*, выпускают через кран наружу, сосуд *А* ополаскивают несколько раз дистиллированной водой и наливают в него 5 мл бромноватистой щелочи. Маленькими порциями при быстром повороте крана спу-

¹ При высоком удельном весе (выше нормы) мочу разводят в 10 раз. Удельный вес мочи определяют при помощи урометра. В норме удельный вес мочи равен 1,010—1,025.

скают бромноватистую щелочь в сосуд *Б*, где тотчас же начинается реакция, сопровождающаяся выделением газообразного азота. Если кран не закрывают быстрым движением, пузырьки газа проскакивают из сосуда *Б* в сосуд *А* и теряются. Пузырьки газа, осевшие на стенках прибора, заставляют подняться вверх. Для этого приводят в движение столб жидкости, постукивая ладонью по каучуковой трубке *В*, лежащей на столе.

О конце реакции узнают по прекращению выделения газа при добавлении новых порций бромноватистой щелочи. Сосуд *С* поднимают вверх так, чтобы жидкости в двух сообщающихся сосудах были на одинаковом уровне,¹ и замечают по делениям трубки *Б* объем, занимаемый газом. Затем сосуд *С* помещают на прежнее место, спускают новую порцию бромноватистой щелочи и по прошествии нескольких минут снова отмечают занимаемый газом объем. Если объем газа после прибавления новой порции реактива не увеличился, реакцию можно считать законченной. Оставшуюся в сосуде *А* бромноватистую щелочь (она представляет ценность) выливают через боковой кран в отдельную склянку с надписью «слив бромноватистой щелочи». Поворотом крана соединяют сосуд *А* с сосудом *Б* и выливают всю жидкость из прибора через сосуд *С*. Промывают прибор водой, подкисленной 10% раствором соляной кислоты, ополаскивают водопроводной, а затем дистиллированной водой и приступают к повторному определению. Если расхождение в параллельных определениях не превышает 2%, результаты можно считать достоверными.

Запись полученных данных и вычисление. В дневнике работ записывают данные измерения объема образовавшегося газа. Когда последние две цифры записи совпадут, приступают к вычислениям. Записывают температуру жидкости и атмосферное давление. Для вычисления пользуются специальной таблицей. В ней указано, какое количество миллиграммов мочевины эквивалентно 1 мл газообразного азота, собранного над водой при различных условиях температуры и давления.

В верхнем горизонтальном столбце находят число, выражающее величину атмосферного давления во время опыта (показания барометра). В левом вертикальном столбце находят число, выражающее температуру жидкости во время опыта, т. е. показания термометра, опущенного в сосуд *С*. На скрещивании вертикального и горизонтального столбцов находят число, выражающее количество миллиграммов мочевины, соответствующее 1 мл газообразного

¹ При этом давление газа в трубке *Б* и давление паров, насыщающих это газовое пространство, будут равны атмосферному.

**Количество миллиграммов мочевины, эквивалентное 1 мл азота, собранного над водой
при давлении P и температуре t°**

$t^\circ \backslash P$	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748
12°	2,443	2,446	2,449	2,453	2,456	2,459	2,463	2,466	2,470	2,473	2,476	2,480	2,483	2,486
13°	2,431	2,435	2,438	2,441	2,445	2,448	2,451	2,455	2,458	2,461	2,465	2,468	2,472	2,475
14°	2,420	2,423	2,426	2,430	2,433	2,437	2,440	2,443	2,447	2,450	2,453	2,457	2,460	2,463
15	2,408	2,412	2,415	2,418	2,422	2,425	2,428	2,432	2,435	2,438	2,442	2,445	2,448	2,452
16°	2,397	2,400	2,403	2,407	2,410	2,413	2,417	2,420	2,423	2,427	2,430	2,433	2,437	2,440
17°	2,385	2,388	2,391	2,395	2,398	2,402	2,405	2,408	2,412	2,415	2,418	2,422	2,425	2,428
18°	2,373	2,377	2,380	2,383	2,387	2,390	2,393	2,397	2,400	2,403	2,406	2,410	2,413	2,416
19°	2,362	2,365	2,368	2,371	2,375	2,378	2,381	2,385	2,388	2,391	2,394	2,398	2,401	2,404
20°	2,350	2,353	2,356	2,360	2,363	2,366	2,369	2,373	2,376	2,379	2,383	2,386	2,389	2,392
21°	2,338	2,341	2,344	2,347	2,351	2,354	2,357	2,360	2,364	2,367	2,370	2,374	2,377	2,380
22°	2,325	2,329	2,332	2,335	2,338	2,342	2,345	2,348	2,352	2,355	2,358	2,361	2,365	2,368
23°	2,318	2,316	2,320	2,323	2,326	2,329	2,333	2,336	2,339	2,342	2,346	2,349	2,352	2,355
24°	2,301	2,304	2,307	2,311	2,314	2,317	2,320	2,323	2,327	2,330	2,333	2,336	2,340	2,343

$t^{\circ} \backslash P$	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762
12°	2,490	2,493	2,496	2,500	2,503	2,507	2,510	2,513	2,517	2,521	2,523	2,527	2,530	2,533
13°	2,478	2,482	2,485	2,488	2,492	2,495	2,498	2,502	2,505	2,509	2,512	2,515	2,519	2,522
14°	2,467	2,470	2,473	2,477	2,480	2,483	2,487	2,490	2,493	2,497	2,500	2,504	2,507	2,510
15°	2,455	2,458	2,462	2,467	2,468	2,471	2,475	2,478	2,482	2,485	2,488	2,492	2,495	2,498
16°	2,443	2,447	2,450	2,453	2,457	2,460	2,463	2,467	2,470	2,473	2,477	2,480	2,483	2,486
17°	2,431	2,435	2,438	2,441	2,445	2,448	2,451	2,455	2,458	2,461	2,465	2,468	2,471	2,474
18°	2,420	2,423	2,426	2,430	2,433	2,436	2,439	2,443	2,446	2,449	2,453	2,456	2,459	2,462
19°	2,408	2,411	2,414	2,417	2,421	2,424	2,427	2,431	2,434	2,437	2,440	2,444	2,447	2,450
20°	2,396	2,399	2,402	2,405	2,409	2,412	2,415	2,419	2,422	2,425	2,428	2,432	2,435	2,438
21°	2,383	2,387	2,390	2,393	2,396	2,400	2,403	2,406	2,409	2,413	2,416	2,419	2,423	2,426
22°	2,371	2,374	2,378	2,381	2,384	2,387	2,391	2,394	2,397	2,400	2,404	2,407	2,410	2,413
23°	2,359	2,362	2,365	2,368	2,371	2,375	2,378	2,381	2,384	2,387	2,391	2,394	2,397	2,401
24°	2,346	2,349	2,352	2,356	2,359	2,362	2,365	2,369	2,372	2,375	2,378	2,382	2,385	2,388

$t^{\circ} \backslash P$	763	764	765	766	767	768	769	770	771		773	774	775	776
12°	2,537	2,540	2,543	2,547	2,550	2,554	2,557	2,561	2,564	2,567	2,571	2,574	2,577	2,581
13°	2,525	2,529	2,532	2,535	2,539	2,542	2,545	2,549	2,552	2,556	2,559	2,562	2,566	2,569
14°	2,514	2,517	2,520	2,524	2,527	2,530	2,534	2,537	2,540	2,544	2,547	2,550	2,554	2,557
15°	2,502	2,505	2,508	2,512	2,515	2,518	2,522	2,525	2,528	2,532	2,535	2,538	2,542	2,545
16°	2,490	2,493	2,496	2,500	2,503	2,506	2,510	2,513	2,516	2,520	2,523	2,526	2,530	2,533
17°	2,478	2,481	2,484	2,488	2,491	2,494	2,498	2,501	2,504	2,508	2,511	2,514	2,518	2,521
18°	2,466	2,469	2,472	2,476	2,479	2,482	2,485	2,489	2,492	2,495	2,499	2,502	2,505	2,509
19°	2,454	2,457	2,460	2,464	2,467	2,471	2,473	2,477	2,480	2,483	2,486	2,490	2,493	2,496
20°	2,441	2,445	2,448	2,451	2,454	2,458	2,461	2,464	2,468	2,471	2,474	2,477	2,481	2,484
21°	2,429	2,432	2,436	2,439	2,442	2,445	2,449	2,452	2,455	2,458	2,462	2,465	2,468	2,471
22°	2,417	2,420	2,423	2,426	2,430	2,433	2,436	2,439	2,443	2,446	2,449	2,452	2,456	2,459
23°	2,404	2,407	2,410	2,414	2,417	2,420	2,423	2,427	2,430	2,433	2,436	2,440	2,443	2,446
24°	2,391	2,394	2,398	2,401	2,404	2,407	2,411	2,414	2,417	2,420	2,423	2,426	2,430	2,433

азота, собранного над водой при данных условиях опыта. Рассчитывают, какому количеству мочевины эквивалентно общее количество азота, собранного в приборе Бородина. Определяют содержание мочевины в 100 мл мочи (т. е. процентное содержание) и в 1500 мл мочи (т. е. приблизительно суточное количество), учитывая разведение и общее количество взятой для анализа разведенной мочи. Для определения суточного выделения мочевины собирают мочу за сутки, измеряют объем, анализируют небольшую порцию и результат анализа пересчитывают на суточное количество мочи.

Содержание мочевины в моче

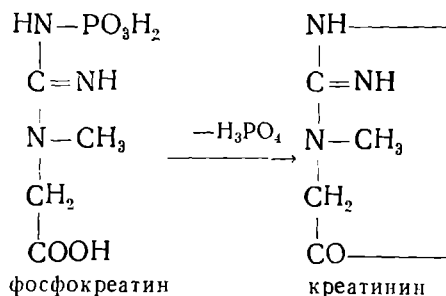
Количество мочи взято для анализа (неразведенной)	Объем выделившегося азота	Условия опыта		Количество мочевины (в мг), эквивалентное 1 мл азота (по таблице)	Содержание мочевины (в г) в суточной порции мочи
		температура	атмосферное давление		

Выводы:

Работа № 98

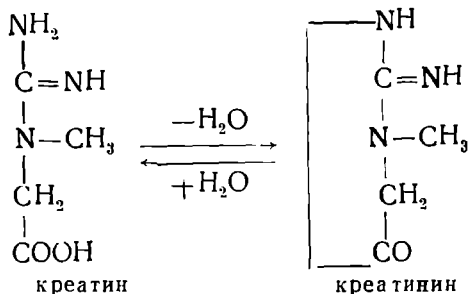
Открытие креатинина в моче

Креатинин образуется из креатина¹ или фосфокреатина путем отщепления фосфорной кислоты и выделяется с мочой в количестве около 2 г в сутки.



Между содержанием в мышце фосфокреатина и количеством выделяемого креатинина имеется прямая зависимость. В некоторых случаях при беременности, в послеродовом периоде, при диабете, кахексии, голодании и др., кроме креатинина, с мочой выделяется и креатин. Креатин и креатинин *in vitro* в водно-щелочном растворе легко переходят друг в друга.

¹ См. Мышечная ткань, стр. 196, 197.



Наиболее характерными реакциями для креатинина являются реакция образования нитрозокреатинина и реакция образования хорошо растворимой соли пикрата креатинина, окрашенной в красный цвет.

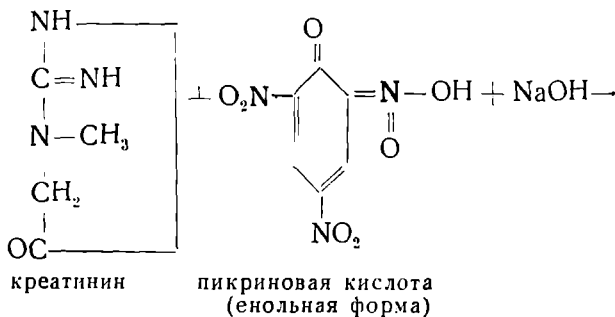
1. **Нитропруссидная реакция (реакция Вейля).** При добавлении нитропруссиды натрия к щелочному раствору креатинина жидкость приобретает красную окраску, быстро исчезающую¹, особенно после добавления уксусной кислоты.

Реакция обусловлена образованием нестойкого нитрозокреатинина.

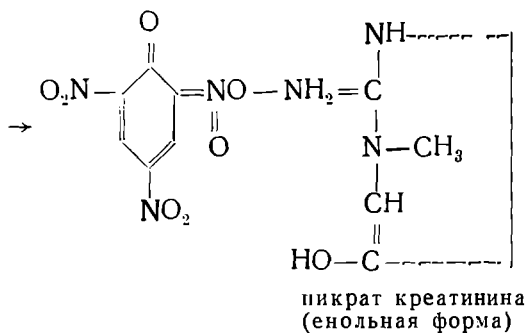
Ход работы. К 10 каплям мочи прибавляют 1 каплю 5% свежеприготовленного раствора нитропруссиды натрия и 1 каплю 10% раствора едкого натра. Моча окрашивается в красный цвет, быстро переходящий в желтый.

2. **Реакция с пикриновой кислотой (реакция Яффе).** При добавлении пикриновой кислоты к щелочному раствору креатинина жидкость окрашивается в оранжево-красный цвет.

Реакция обусловлена образованием пикрата креатинина. Интенсивность окраски усиливается при стоянии в течение нескольких минут и сохраняется долгое время.



¹ Отличие от ацетона (см. стр. 118).



Ход работы. К 10 каплям мочи добавляют 5 капель 10% раствора пикриновой кислоты и столько же 10% раствора едкого натра. Моча окрашивается в оранжево-красный цвет от образования пикрата креатинина.

Работа № 99

Количественное определение креатинина в моче по методу Фолина

Метод определения креатинина относится к числу колориметрических и основан на цветной реакции креатинина с пикриновой кислотой (см. стр. 157). В качестве стандарта вместо раствора креатинина употребляют 0,5 н. раствор двуххромовокислого калия. Эмпирически установлено, что раствор креатинина в концентрации 1 мг в 1 мл, обработанный пикриновой кислотой и установленный в колориметре на высоте 8,1 мм, имеет такую же окраску по оттенку и интенсивности, какую имеет 0,5 н. раствор бихромата, установленный на высоте 8 мм.

Ход работы. В мерную колбочку емкостью 50 мл отмеривают точной пипеткой 1 мл исследуемой мочи, добавляют 1 мл 10% раствора щелочи и 1,5 мл 10% раствора пикриновой кислоты. Содержимое пробирки взбалтывают и оставляют стоять на 5 минут. В течение этого времени развивается окраска максимальной интенсивности¹. Через 5 минут² содержимое колбочки доливают водой до метки, колбочку закрывают пробкой, жидкость в колбочке перемешивают и колориметрируют. С целью экономии реактивов можно уменьшить количество исследуемой мочи и каждого реактива в 5 раз и брать в мерную пробирку соответственно

¹ Моча должна быть по возможности свежесобранной. Присутствие ацетона, ацетоуксусной кислоты и сероводорода мешает реакции. Эти вещества легко удаляются при кипячении мочи с небольшим количеством уксусной кислоты. В случае присутствия в моче креатина он при такой обработке мочи частично переходит в креатинин.

² Если содержимое колбочки развести водой до истечения 5 минут, то окраска разведенной жидкости не достигнет надлежащей интенсивности.

0,2 мл мочи, 0,2 мл 10% раствора щелочи и 0,3 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты. После пятиминутного стояния реакционную смесь доливают водой до 10 мл и колориметрируют. Расчет при этом не изменяется.

Колориметрирование. Вначале проверяют чистоту стаканчиков и равномерность освещения полей колориметра. В левый стаканчик наливают до половины стандартный раствор бихромата калия и устанавливают его на высоту 8 мм¹. В правый стаканчик наливают (до половины) испытуемый раствор. Поворотом винта изменяют высоту столба жидкости в правом стаканчике до тех пор, пока оба поля колориметра не будут одинаково окрашены. Колориметрирование производят 3—5 раз, каждый раз показания шкалы записывают в тетрадь². Для расчета пользуются средним арифметическим из 3—5 определений. Расхождение между отдельными определениями не должно превышать 0,3 мм шкалы.

Вычисление. В качестве стандарта вместо 0,1% раствора креатинина (1 мг в 1 мл) используют 0,5 н. раствор бихромата, который по цвету и интенсивности вполне совпадает с окраской пикрата креатинина. При составлении уравнения полагают, что испытуемая жидкость сравнивалась со стандартным раствором креатинина, содержащим 1 мг в 1 мл, обработанным так же, как обрабатывалась испытуемая жидкость, и установленным в колориметре на высоту 8,1 мм.

Не следует забывать основного правила колориметрии, что толщина слоя жидкости и концентрация вещества являются обратно пропорциональными величинами:

$$x : 1 = 8,1 : h; \quad x = \frac{1 \cdot 8,1}{h},$$

где h — высота столба жидкости испытуемого раствора.

В результате вычисления получают величину, выражающую количество креатинина в 1 мл исследуемой мочи. Определяют процентное содержание креатинина в моче и количество креатинина, выделенное за сутки, полагая, что суточное количество мочи равно 1500 мл.

Работа № 100

Открытие индикана в моче

Индикан представляет собой соль парной индоксилсерной кислоты и образуется в печени из ядовитого для организма индола. Индол, скатол, фенол и крезол являются продуктами гнилостного бактериального разложения

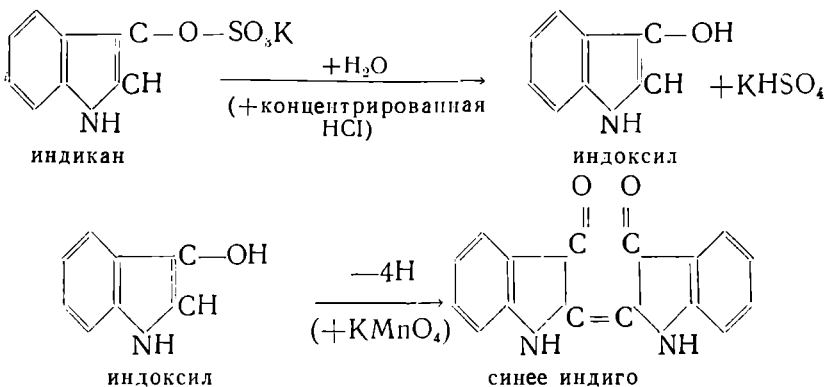
¹ Стандартный раствор может служить для серии определений, выливать его не следует до окончания работы.

² Образец записи см. стр. 184.

в кишечнике аминокислот триптофана и тирозина. Небольшое количество индикана (около 0,01 г в суточной порции мочи) содержится в нормальной моче, особенно при мясной диете. Повышенное количество индикана наблюдается при задержке опорожнения кишечника (запоры), при непроходимости кишок, брюшном тифе и ряде других заболеваний.

При добавлении к моче концентрированной соляной кислоты, марганцовокислого калия и хлороформа в присутствии индикана нижний хлороформный слой окрашивается в синий цвет.

Реакция обусловлена гидролитическим расщеплением индикана в присутствии концентрированной соляной кислоты на индоксил и кислый сернокислый калий, окислением индоксила в синее индиго и растворением синего индиго в хлороформе.



Ход работы. К 20 каплям мочи добавляют равный объем концентрированной соляной кислоты, 1—2 капли 1% раствора марганцовокислого калия¹ и 2—3 капли хлороформа.

Пробирку закрывают и в течение 1—2 минут осторожно опрокидывают. В присутствии индикана нижний хлороформный слой окрашивается в голубой или синий цвет. Интенсивность окраски хлороформного раствора зависит от количества индикана в моче.

АЗОТИСТЫЙ БАЛАНС И АЗОТИСТОЕ РАВНОВЕСИЕ

Азотистым балансом называется соотношение между количеством азота, введенного в организм с пищей, и количеством азота, выделенного из организма с мочой, калом и потом. Если число граммов азота, введенного с пищей, равно количеству выделенного азота, то организм находится в со-

¹ 1% раствор KMnO_4 можно заменить 1% раствором хлорного железа.

стоянии азотистого равновесия. Если количество введенного азота превышает количество выделенного, азотистый баланс называется положительным. Положительный азотистый баланс указывает на накопление белка в организме и наблюдается в молодом возрасте и в период восстановления организма после перенесенных заболеваний.

В случае, когда количество введенного азота меньше, чем количество выделенного, организм находится в отрицательном азотистом балансе. Отрицательный азотистый баланс указывает, что процессы распада преобладают над процессами синтеза и организм теряет запасы белка. Отрицательный азотистый баланс наблюдается при старении организма, при различных истощающих заболеваниях, голодании или неполноценном белковом питании.

Различные белки отличаются друг от друга по своему аминокислотному составу. Биологическая ценность белка определяется наличием в нем достаточного количества жизненно необходимых аминокислот, т. е. таких аминокислот, которые не могут быть синтезированы в организме и должны обязательно поступать с пищей. К жизненно необходимым относятся 10 аминокислот: фенилаланин, триптофан, гистидин, метионин, треонин, аргинин, лизин, валин, лейцин, изолейцин. Если удалить из диеты хотя бы одну из указанных аминокислот, наступает отрицательный азотистый баланс.

Работа № 101

Определение азота по микрометоду Кьельдаля

Органические вещества животных или растительных объектов разрушаются концентрированной серной кислотой при нагревании в присутствии катализаторов¹

Углерод органических соединений окисляется до углекислоты, водород образует воду, а сера серной кислоты восстанавливается и выделяется в виде сернистого газа. Весь азот отщепляется в виде аммиака, связывается серной кислотой и превращается в серноокислый аммоний. Последний разлагается концентрированной щелочью (в специальном приборе) с образованием аммиака. Аммиак перегоняется с парами воды в приемник, где он улавливается титрованным раствором серной кислоты. Избыток серной кислоты, не вступившей в реакцию с аммиаком, оттитровывают раствором щелочи той же нормальности. Для определения аммиака, имеющегося в воде, воздухе и реактивах², ставят

¹ В качестве катализаторов употребляют серноокислую медь и серноокислый калий. Ионы меди, попеременно меняя валентность, переносят электроны от углерода к сере. Серноокислый калий повышает температуру кипения смеси.

² Главным образом в концентрированной серной кислоте.

контрольный опыт, в котором вместо анализируемой жидкости берут дистиллированную воду в том же объеме. По разности результатов титрования контрольной и опытной пробы определяют, какое количество кислоты связалось с аммиаком, освободившимся при сжигании исследуемого вещества, и вычисляют содержание аммиака или азота в пробе, взятой для анализа, и процентное содержание азота в исследуемом веществе.

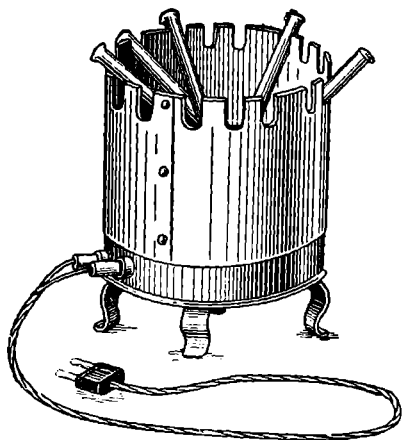


Рис. 15. Плитка с барьером для сжигания по Кьельдалю.

Ход работы. Сжигание органических веществ. В кьельдалевскую колбу для сжигания (круглодонную, с длинным горлышком из тугоплавкого стекла, объемом на 25 мл) переносят пипеткой 1 мл мочи, всыпают 1 г смеси, состоящей из 1 части сернокислого калия, и 4 частей сернокислого калия, и осторожно по стенке из маленького цилиндра приливают 1 мл концентрированной серной кислоты. Контрольную пробу заготавливают таким же образом, заменяя 1 мл мочи 1 мл дистиллированной во-

ды. Обе колбы помещают под тягой на электрической плитке, застланной тонким слоем асбеста и имеющей жестяной барьер цилиндрической формы с вырезанными по верхнему краю лунками для горлышек колб (рис. 15). Содержимое колб нагревают 30—40 минут, т. е. до тех пор, пока побульвавшая вначале от обугливания жидкость не станет светло-зеленой, а осадок бесцветным. Пока под тягой идет сжигание, подготавливают перегонный аппарат.

Подготовка перегонного аппарата (рис. 16). Перегонный аппарат состоит из парообразователя (А), парораспределителя (Б), бюретки для щелочи (В), отгонной колбы (Г), двухшариковой насадки (Д), холодильника (Е) и приемника (Ж). Парообразователем является двухлитровая колба, заполненная на $\frac{1}{2}$ — $\frac{2}{3}$ объема дистиллированной водой и закрытая пробкой с двумя отводными трубками: одной длинной (80—90 см), опущенной до дна колбы, служащей для регулирования давления пара в колбе, и другой изогнутой под углом 135° слегка выступающей внутри колбы у основания пробки, идущей к парораспределителю. Для равномерного кипения на дно парообразователя кладут стеклянные бусы, капилляры или кусочки битого фарфора. Паро-

распределителем служит эрленмейровская колба, укрепленная вверх дном и закрытая пробкой с тремя отводными трубками. Одна трубка, изогнутая, соединяет парораспределитель с парообразователем и доходит почти до дна колбы,

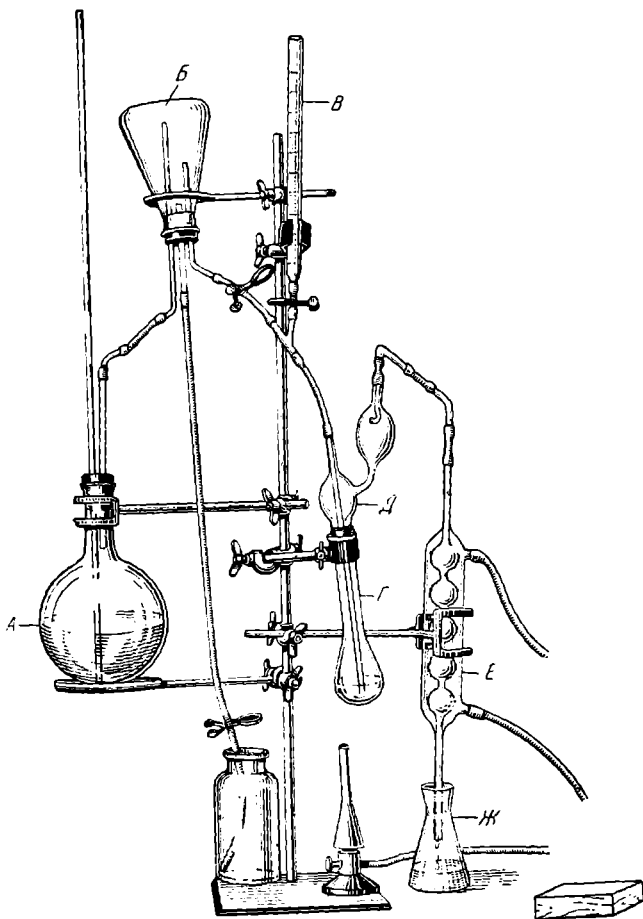


Рис. 16. Прибор для отгонки аммиака по Кьельдалю.

другая, прямая, заканчивающаяся внутри колбы у основания пробки, служит для отвода пара и воды наружу (на внешнем конце этой стеклянной трубки надета длинная каучуковая трубка с зажимом); третья трубка, изогнутая, достигает середины колбы; она соединяет парораспределитель с насадкой отгонной колбы. На пути между парораспределителем и насадкой помещен тройник У-образной

формы. Он соединен с парораспределителем каучуковой трубкой с зажимом; с насадкой тройник соединяется вплотную. К тройнику при помощи каучуковой трубки с винтовым зажимом присоединена небольшая бюретка с концентрированным раствором щелочи.

Двухшариковая насадка обычно пришлифована к отгонной колбе, но для учебных целей шлиф может быть заменен широкой каучуковой трубкой, надетой на насадку и плотно закрывающей отгонную колбу. Трубка насадки проходит через нижний шарик и доходит до дна отгонной колбы. Верхний шарик насадки соединен с холодильником. Последний укреплен на штативе вертикально, нижний конец его погружен в колбу-приемник. Колба-приемник устанавливается на подставке и может без труда опускаться и подниматься.

Прежде чем использовать аппарат для работы, его пропаривают с целью удаления аммиака, который может попасть из воздуха. Для этого закрывают зажим на трубке, отводящей пар от парораспределителя наружу, и открывают зажим на трубке, соединяющей парораспределитель с отгонной колбой, зажигают горелку под парообразователем и пускают воду в муфту холодильника. Пропаривание производят 15—20 минут, считая от начала кипения. По окончании пропаривания открывают наружный зажим парораспределителя, закрывают зажим на трубке, идущей к насадке, снимают отгонную колбу и приемник и удаляют воду.

Перегонка аммиака. Кьельдалевскую колбу, в которой проводили сжигание, остужают при комнатной температуре (*нельзя охлаждать ее под струей холодной воды во избежание несчастного случая*), а затем маленькими порциями добавляют в нее дистиллированную воду до $\frac{1}{4}$ объема. Содержимое кьельдалевской колбы количественно переносят через воронку в мерную колбу емкостью 50 мл. Кьельдалевскую колбу и воронку ополаскивают 2—3 раза небольшим количеством дистиллированной воды. Воду сливают в ту же мерную колбочку и объем жидкости доводят водой до метки. Колбу закрывают пробкой и содержимое ее тщательно перемешивают. В отгонную колбу отмеривают (точно) 2 мл полученной жидкости, колбу плотно присоединяют к насадке и закрепляют на штативе лапкой. В колбочку-приемник отмеривают (точно) из микробюретки 5 мл 0,01 н. раствора серной кислоты, добавляют индикатор Ташира и помещают ее под холодильник так, чтобы нижний конец форштоса (внутренняя трубка холодильника) был слегка погружен в кислоту. В отгонную колбу спускают из бюретки 3 мл раствора концентрированной щелочи (точность необязательна). Выделяется аммиак, который с паром отгоняется в приемник. Пар сначала конденсируется в отгонной колбе, а затем, когда жидкость в колбе нагреется, проходит сквозь нее, увлекая

аммиак. Насадка при этом сильно разогревается. Отгонку продолжают 5 минут после того, как нагреется верхний шарик насадки. Затем колбочку-приемник опускают так, чтобы форштос холодильника не касался кислоты, и отгонку продолжают еще 3 минуты. Во избежание потерь кончик форштоса ополаскивают небольшим количеством воды в приемник и только после этого колбочку вынимают из-под холодильника и приступают к титрованию. Производят по меньшей мере четыре отгонки: две с испытуемой жидкостью и две с контрольной пробой.

Титрование и расчет. Содержимое колбочки-приемника титруют из микробюретки 0,01 н. раствором щелочи. Результаты титрования фиксируют в таблице, там же производят расчет. Разница между количеством серной кислоты, оттитрованной в контрольной и опытной пробах, соответствует количеству кислоты, связанной в опытной пробе отогнанным аммиаком. Зная титр серной кислоты, вычисляют содержание азота в пробе, взятой для отгонки, и результат перечисляют на весь объем жидкости, полученной после сжигания и разведения. Учитывая, что для сжигания был взят 1 мл мочи, вычисляют вначале содержание азота в 100 мл мочи, а затем содержание азота в 1,5 л мочи, так как в сутки выделяется около 1,5 л мочи (1 мл 0,01 н. раствора H_2SO_4 эквивалентен 0,14 мг азота)

По количеству азота, выделенного с мочой за сутки, можно определить количество распавшегося в организме белка. Для этого полученную в результате анализа величину, выражающую количество выделенного азота, умножают на 6,25, исходя из того, что в белке в среднем содержится 16% азота ($100 : 16 = 6,25$).

Содержание азота в суточной моче

Количество мочи, взятой для сжигания (в мл)	Объем раствора минерализованной мочи (в мл)	Количество минерализованной мочи, взятое для отгонки аммиака	Количество 0,01 н. раствора NaOH, пошедшего на титрование (в мл)		Количество 0,01 н. раствора H_2SO_4 , связанного с NH_3 (в мл)	Количество азота в пробе, взятой для отгонки (в мг)	Количество азота в 1 мл мочи (в мг)	Содержание азота в моче (в %)	Содержание азота в 1,5 л мочи	Количество распавшегося белка за сутки
			контрольные пробы	опытные пробы						

Выводы:

Контрольные вопросы

1. Какие железы пищеварительного тракта выделяют ферменты, действующие на белки?
2. Какова роль соляной кислоты желудочного сока в переваривании белков?

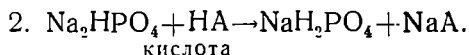
3. Какова роль энтерокиназы кишечного сока?
4. Под влиянием каких ферментов пищеварительного тракта и через какие промежуточные продукты протекает последовательный распад белков до аминокислот?
5. Где и в результате каких превращений образуются токсические продукты — фенол, крезол, индол, скатол и др.? Каким образом и где происходит их обезвреживание в организме? Изобразите процесс формулами.
6. Какие известны типы дезаминирования? Приведите соответствующие примеры.
7. Что такое переаминирование и какую роль в этом процессе играет фосфопиродоксаль и глютаминовая кислота?
8. Какие аминокислоты относятся к незаменимым и почему?
9. Какие гормоны образуются в организме из аминокислот?
10. Где и как образуются конечные продукты обмена простых белков (мочевина, креатинин, аммонийные соли)?
11. Сколько калорий выделяется при сгорании 1 г белка в животном организме?
12. На чем основан принцип определения азота по методу Кьельдаля и мочевины по методу Бородина?
13. Как определить азотистый баланс и вычислить, какое количество белка распалось в организме?

4. ОБМЕН МИНЕРАЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ В ЖИВОТНОМ ОРГАНИЗМЕ

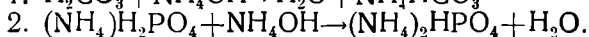
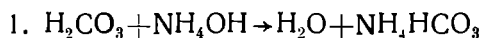
Для нормальной жизнедеятельности организма наряду с белками, жирами и углеводами необходимо поступление с пищей и минеральных веществ: натрия, калия, кальция, магния, железа, меди, цинка, фосфора, серы, хлора, брома, фтора, йода, марганца, кобальта, никеля, мышьяка, хрома и др. Минеральные вещества используются организмом для поддержания постоянства осмотического давления в жидкостях и тканях, для создания необходимой реакции среды (рН), поддержания тургора клеток и тканей, образования ферментов и других биологически важных веществ. Суточная потребность человека в минеральных веществах выражается следующими величинами: натрия 4—8 г, хлора 2—4 г, калия 2—3 г, фосфора 1,5—2 г, кальция 0,7—0,8 г, железа 0,015—0,020 г.

В пищеварительном канале минеральные вещества хорошо всасываются в кровь и поступают в различные ткани и жидкости организма, в некоторых органах и тканях они депонируются. Железо, например, больше всего депонируется в печени и селезенке, калий, фосфор и магний — в костной ткани, хлористый натрий — в коже, фтор — в зубной ткани, йод — в щитовидной железе и т. д. Хлор используется для образования соляной кислоты в желудке. Выделяются минеральные вещества через почки и кожу; небольшая часть их выделяется через кишечник. Мясная пища, богатая органическими соединениями фосфора и серы, способствует на-

коплению кислых эквивалентов, а растительная пища, содержащая много калия и магния, — щелочных. Особо важную роль играют минеральные вещества в поддержании кислотно-щелочного равновесия. В крови и тканях имеются карбонатные и фосфатные буферные системы, которые препятствуют сдвигам рН среды. Кислоты при поступлении в кровь реагируют с бикарбонатами и двузамещенными фосфатами с образованием угольной кислоты и однозамещенного фосфата.



Образовавшаяся угольная кислота выделяется легкими с выдыхаемым воздухом, а однозамещенные фосфорнокислые соли выводятся почками с мочой. В результате буферное соотношение между количеством слабой кислоты и ее соли остается неизменным и сдвига рН крови не происходит. При поступлении в кровь щелочей наблюдается обратное явление. Угольная кислота и однозамещенные фосфаты связывают щелочь с образованием бикарбонатов и двузамещенных фосфатов.



Повышение в крови количества бикарбонатов приводит к задержке в крови некоторого количества угольной кислоты, и буферное соотношение угольной кислоты и бикарбоната остается неизменным. Избыток двузамещенного фосфата выводится с мочой и не вызывает изменений в соотношении одно- и двузамещенных фосфорнокислых солей. Несмотря на отсутствие сдвига в рН среды, буферная емкость крови при поступлении в нее кислот и щелочей понижается и постепенно восстанавливается за счет поступления в кровь новых порций минеральных веществ из кишечника и тканей.

Кроме карбонатного и фосфатного буфера, большое значение в регулировании рН крови имеют белковые буферные системы, состоящие из белка и протеинов щелочных металлов. Белки — альбумин, глобулин — являются слабыми кислотами, в то время как их соли со щелочными металлами хорошо диссоциируют и обладают основным характером.

Вследствие многообразной роли минеральных веществ и их важного значения для жизнедеятельности организма нарушение минерального обмена приводит к тяжелым последствиям. Расстройство фосфорно-кальциевого обмена в

детском возрасте вызывает рахит, во взрослом состоянии приводит к остеопорозу.

Нарушение функции надпочечников, приводящее к изменению соотношения в концентрации солей калия и натрия, вызывает симптомы так называемой аддисоновой болезни. Недостаточное содержание в пище меди и кобальта вызывает некоторые формы малокровия, недостаток йода — эндемический зоб, недостаток фтора способствует развитию кариеса зубов и т. д. Поэтому количественное определение минеральных веществ в крови и моче имеет во многих случаях важное диагностическое значение и находит широкое применение в практике.

Моча является биологической жидкостью, в которой содержатся как органические, так и минеральные вещества. Взрослый человек выделяет в сутки в среднем 1200—1500 мл мочи. Количество мочи увеличивается при обильном введении жидкости и при низкой внешней температуре, уменьшается при обильном потовыделении. При некоторых заболеваниях (понос, лихорадочное состояние, острое воспаление почек) количество мочи снижается (олигурия), а иногда, например при закупорке мочевыводящих путей, выделение ее прекращается (анурия). Полиурия, т. е. выделение повышенного количества мочи (10—20 л в сутки), наблюдается при сахарном и несахарном мочеизнурении, при рассасывании больших экссудатов. Удельный вес мочи в норме колеблется в пределах от 1,010 до 1,025, чаще бывает 1,017—1,020 и находится в тесной связи с количеством отделяемой мочи. При различных патологических состояниях удельный вес мочи может изменяться.

Несоответствие между удельным весом и количеством мочи наблюдается при сахарном мочеизнурении, когда, несмотря на большое количество мочи, удельный вес ее остается высоким. Свежевыпущенная моча здорового человека имеет кислую реакцию на лакмус. Кислая реакция мочи обусловлена преобладанием в ней однозамещенных фосфорнокислых солей (NaH_2PO_4) над двузамещенными (Na_2HPO_4).

Общее количество кислореагирующих веществ может быть определено титрованием мочи щелочью. Соотношение в моче количества одно- и двузамещенных фосфорнокислых солей обуславливает активную реакцию среды. В норме рН мочи колеблется от 5 до 7. Патологические сдвиги в сторону более кислой реакции среды наблюдаются при диабете, голодании, почечной недостаточности и других заболеваниях, а в сторону более щелочной — после обильной кислой рвоты, во время рассасывания отеков, при заражении мочевыводящих путей микробами, вызывающими аммиачное брожение мочи.

Работа № 102
Определение рН мочи

Ход работы. Предварительно определяют реакцию мочи лакмусовой бумажкой. Для кислой мочи пользуются индикатором паранитрофенолом (зона перехода при $\text{pH} = 5,4 - 7,0$), для щелочной — метанитрофенолом (зона перехода при $\text{pH} = 6,8 - 8,4$). В 3 пробирки отмеривают по 3 мл свежей мочи¹, в первую прибавляют 0,5 мл индикатора, а в 2 других — по 0,5 мл воды и перемешивают. Окраску мочи

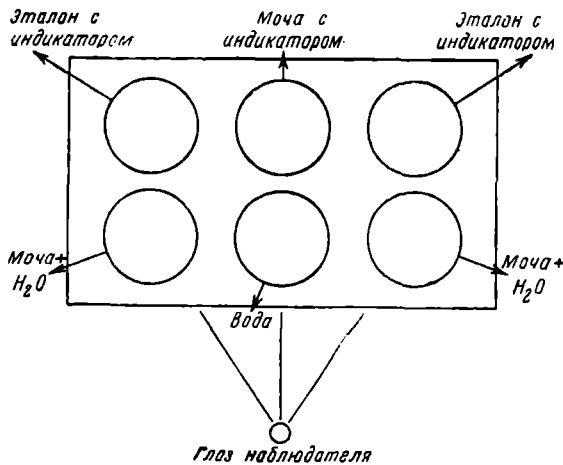


Рис. 17. Компаратор.

сравнивают в компараторе со стандартами (рис. 17). Первую пробирку помещают спереди в среднее гнездо компаратора, сзади ставят пробирку с водой. Две другие пробирки с мочой помещают в задние крайние гнезда, впереди их вставляют соответствующие стандартные пробирки. При таком расположении пробирок луч света проходит в каждой пробирке через стекло, мочу, индикатор и воду. Сравнивают окраску индикатора с мочой, с окраской стандартных пробирок и выбирают из индикаторного ряда наиболее подходящую по цвету; рН, указанное на эталоне, соответствует рН мочи.

Работа № 103

Определение общей титруемой кислотности мочи

Ход работы. В колбочку отмеривают 1 мл мочи, прибавляют 0,5 г щавелевокислого калия и 1—2 капли 0,5% спиртового раствора фенолфталеина, взбалтывают и титруют из микробю-

¹ Если моча сильно окрашена, ее предварительно разводят дистиллированной водой в 3 раза. При разведении рН мочи не изменяется.

ретки 0,01 н. раствором едкого натра до слабого розового окрашивания, не исчезающего в течение 30 секунд. Щавелевокислый калий прибавляется для удаления из раствора ионов кальция, так как во время титрования осадок фосфорнокислого кальция $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ может затемнять конец реакции. Щавелевокислый калий должен быть нейтральным. Кислотность мочи выражают количеством миллилитров 0,1 н. раствора едкого натра, пошедшего на нейтрализацию суточного количества мочи. В норме кислотность мочи варьирует в пределах от 200 до 500.

НЕОРГАНИЧЕСКИЕ СОСТАВНЫЕ ЧАСТИ МОЧИ

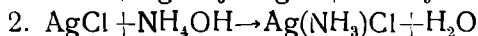
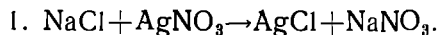
Хлориды

Хлориды выделяются с мочой в виде хлористых солей калия, натрия, аммония, кальция и магния. Из общего количества 15—25 г неорганических составных частей мочи на долю хлоридов приходится 10—15 г. Количество хлоридов в моче у здорового человека приблизительно соответствует содержанию поваренной соли в пище. При бессолевой диете выделение хлоридов с мочой резко снижается и может дойти до 1 г в сутки. Бессолевую диету назначают при некоторых заболеваниях, чаще всего связанных с заболеванием почек. Определение хлоридов в моче может служить контролем за течением болезни. Количество хлоридов в моче уменьшается в случаях частой рвоты, когда большая часть соляной кислоты выводится с рвотными массами.

Работа № 104

Обнаружение хлоридов в моче

При добавлении азотнокислого серебра к моче, подкисленной азотной кислотой, выпадает белый осадок хлористого серебра, темнеющий на свету, нерастворимый в азотной кислоте и растворяющийся в аммиаке.



Ход работы. К 20 каплям (1 мл) мочи добавляют 2 капли 10% раствора азотнокислого серебра и 2 капли 10% раствора азотной кислоты. Выпадает белый творожистый осадок хлористого серебра¹.

Содержимое пробирки перемешивают, часть мутной жидкости переливают в другую пробирку и прибавляют

¹ Подкисление азотной кислотой предотвращает образование растворимого в азотной кислоте фосфорнокислого серебра.

1—2 капли 10% раствора аммиака. Творожистый осадок хлористого серебра растворяется. К другой части мутной жидкости добавляют по каплям 10% раствор азотной кислоты. Растворения осадка не происходит.

Работа № 105

Количественное определение хлоридов в моче по способу Мора

Хлориды осаждаются титрованным раствором азотнокислого серебра в присутствии индикатора хромовокислого калия (K_2CrO_4). Хромовокислый калий вступает в реакцию с серебром только после того, как будут связаны все ионы хлора, присутствующие в жидкости, и образует с серебром осадок кирпично-красного цвета. Фосфорнокислые соли не мешают определению, так как ион PO_4^{---} вступает в реакцию с серебром после того, как будут связаны ионы CrO_4^{--} .

Ход работы. В колбочку отмеривают точно 1 или 2 мл мочи, прибавляют 1 каплю 5% раствора хромовокислого калия K_2CrO_4 и титруют из микробюретки эмпирическим раствором азотнокислого серебра¹. Выпадает белый творожистый осадок хлористого серебра. Титрование продолжают до тех пор, пока осадок не примет бледно-розовой окраски от появления красного осадка хромовокислого серебра. На основании данных титрования составляют пропорцию и определяют количество $NaCl$ в пробе, взятой для анализа. Вычисляют, какое количество $NaCl$ содержится в 100 мл мочи и какое количество $NaCl$ выделяется в суточной порции мочи, условно принятой за 1500 мл.

Фосфаты

Фосфорнокислые соли образуются в организме в результате распада фосфорсодержащих органических веществ (нуклеопротеиды, фосфопротеиды, фосфатиды, аденозинтрифосфорная кислота, фосфорные эфиры и др.). Фосфор выделяется с мочой в виде однозамещенных и двузамещенных солей калия, натрия, аммония, кальция и магния NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , $Ca(H_2PO_4)_2$ и т. д. Количество солей фосфорной кислоты, выделенных с мочой, отражает интенсивность обмена фосфорсодержащих соединений и в среднем составляет 2,5—3,5 г в сутки при пересчете на P_2O_5 .

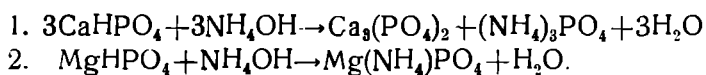
¹ Для массовых анализов используют эмпирический раствор азотнокислого серебра, который готовят с таким расчетом, чтобы 1 мл его осаждал весь хлор из 0,01 г хлористого натрия. Такой раствор носит название эмпирического и содержит в 1 л 29,061 г азотнокислого серебра.

Соотношение между однозамещенными и двузамещенными солями изменяется в связи с изменением характера пищевого рациона. При мясной пище выделяется больше однозамещенных солей, так как освобождающиеся при распаде белков ионы PO_4^{---} и SO_4^{--} связывают большое количество катионов. При употреблении овощной пищи наблюдается обратное явление — с мочой выделяется преобладающее количество двузамещенных солей фосфорной кислоты. В овощах присутствуют в большом количестве соли органических кислот, которые, сгорая в организме до CO_2 и H_2O , освобождают щелочные и щелочно-земельные металлы (катионы). Последние сдвигают кислотно-щелочное равновесие в сторону образования двузамещенных солей и приводят к выделению менее кислой мочи. Чем выше содержание в пище кислых эквивалентов (мясная пища), тем больше фосфора и кальция выводится с мочой, и, наоборот, при высоком содержании щелочных эквивалентов (растительная пища) содержание в моче солей фосфора и кальция снижается и значительная часть их выделяется через кишечник.

Работа № 106

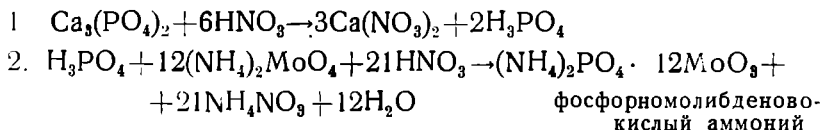
Обнаружение фосфатов в моче

При добавлении к моче аммиака или едкой щелочи выделяется белый аморфный осадок, растворяющийся при подкислении. Образование осадка обусловлено присутствием в моче однозамещенных и двузамещенных фосфорнокислых солей кальция и магния, которые в щелочной среде превращаются в нерастворимые в воде соединения: в трехзамещенный фосфорнокислый кальций и двойную аммонийно-магниевую соль — трипельфосфат.



↓
трипельфосфат

При нагревании полученных осадков с раствором молибденовокислого аммония образуется желтый кристаллический осадок фосфорномолибденовокислого аммония. Молибденовая реакция служит дополнительным доказательством присутствия в осадке солей фосфорной кислоты.



Ход работы. К 20 каплям мочи добавляют 2—3 капли 10% раствора аммиака. Образуется осадок фосфорнокислых солей кальция и магния. Осадок отделяют фильтрованием и растворяют на фильтре в 2—3 каплях 10% раствора азотной кислоты. К полученному раствору добавляют 10—15 капель молибденового реактива и кипятят. При нагревании жидкость окрашивается в желтый цвет, а при охлаждении выпадает желтый кристаллический осадок фосфорномолибденовокислого аммония.

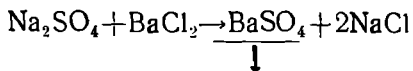
Серусодержащие соединения мочи

Все серусодержащие вещества мочи образуются в результате превращения белков в тканях и, в частности, превращения серусодержащих аминокислот (цистина, цистеина, метионина). Сера выделяется с мочой в форме неорганических сульфатов, солей эфиросерных кислот и так называемой «нейтральной» серы. Количество выделяемых сульфатов зависит главным образом от содержания в пище белков и колеблется параллельно с изменением количества азотистых составных частей мочи. В среднем за сутки выделяется около 2,5 г серы в виде сульфатов. Количество солей эфиросерных кислот увеличивается при усилении гнилостных процессов в кишечнике в связи с образованием фенола, крезола, индола, скатола, а также при отравлениях фенолами, бензином и др. Все эти ядовитые вещества обезвреживаются в печени путем превращения в эфиросерные кислоты. Эфиросерные кислоты менее ядовиты, чем свободные фенолы. В сутки в среднем выделяется около 0,3 г серы в форме эфиросерных кислот. К фракции «нейтральной» серы относятся различные соединения, построенные по типу сульфоновых кислот, в которых сера связана непосредственно с углеродом (а не через кислород, как у сульфатов и эфиросерных кислот). К таким соединениям относятся цистин, роданистые соли и другие вещества. Содержание этих веществ в моче очень незначительно и увеличивается при цистинурии.

Работа № 107

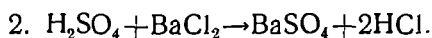
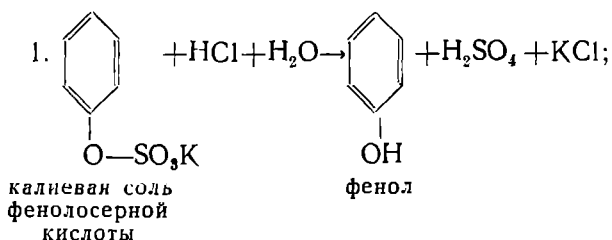
Обнаружение сульфатов и эфиросерных кислот в моче ¹

При добавлении к моче, подкисленной соляной кислотой, хлористого бария, образуется белый кристаллический осадок сернокислого бария, нерастворимый в кислотах и в щелочах



¹ Нейтральная сера реагирует с хлористым барием только после окисления в сульфаты.

Если осадок сернокислого бария отфильтровать и фильтрат прокипятить с соляной кислотой, жидкость в пробирке мутнеет. Появление мути обусловлено освобождением серной кислоты при гидролизе эфирсерных кислот и образованием новой порции сернокислого бария.

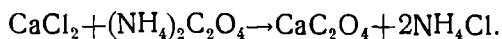


Ход работы. К 20 каплям мочи добавляют 5 капель 10% раствора соляной кислоты и по каплям 5% раствор хлористого бария до полноты осаждения, т. е. до тех пор, пока новая капля хлористого бария не будет вызывать образование мути. Жидкость фильтруют и кислый фильтрат помещают в кипящую водяную баню. Через 5—10 минут содержимое пробирки становится мутным от выделения новой порции сернокислого бария и приобретает слегка розоватую окраску вследствие образования продуктов окисления фенола.

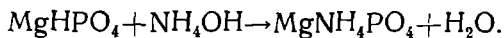
Работа № 108

Обнаружение кальция и магния в моче

При добавлении к моче раствора щавелевокислого аммония выпадает белый кристаллический осадок щавелевокислого кальция, нерастворимый в уксусной кислоте, но растворяющийся в минеральных кислотах.



Если осадок щавелевокислого кальция отфильтровать и фильтрат подщелочить аммиаком, то при стоянии выпадает небольшой кристаллический осадок фосфорнокислой аммиак-магнезии.



Ход работы. К 20 каплям (1 мл) мочи добавляют 1—2 капли 10% раствора уксусной кислоты и 2—3 капли 5% раствора щавелевокислого аммония. Выпадает кристалличе-

ский осадок шавелевокислого кальция (рис. 18). Под микроскопом кристаллы имеют вид почтовых конвертиков. Жидкость фильтруют и к фильтрату прибавляют 4—5 капель 10% раствора аммиака (до щелочной реакции на лакмус). Через некоторое время выпадает осадок фосфорнокислой аммиак-магнезии, нерастворимой в аммиаке, но растворяющейся в органических и минеральных кислотах.

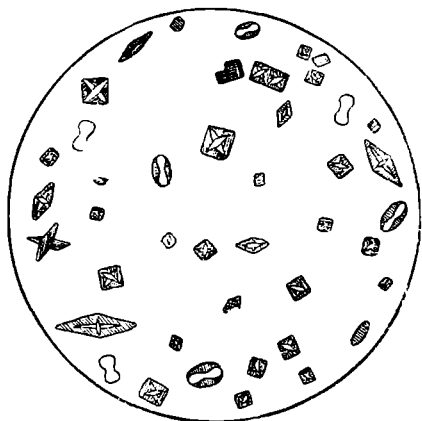
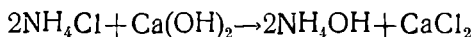


Рис. 18. Кристаллы шавелевокислого кальция.

Работа № 109

Обнаружение аммиака, калия и натрия в моче

Если в пробирку с мочой добавить раствор слабой щелочи, то жидкость приобретает запах аммиака вследствие разложения присутствующих в моче аммонийных солей.



Слабые щелочи типа гидроокиси кальция не разлагают азотсодержащие органические вещества (мочевину, креатинин и др.) и разрушают только аммонийные соли.

Для обнаружения ионов калия и натрия моча должна быть обуглена или озолена. В водной вытяжке после озоления натрий можно открыть пиросурьмянокислым калием, а калий — виннокаменной кислотой.

Ход работы. В пробирку наливают через воронку 1—2 мл мочи и столько же известкового молока [насыщенный раствор $\text{Ca}(\text{OH})_2$]. Закрывают пробирку пробкой¹ с укрепленной внутри пробирки влажной красной лакмусовой бумажкой. Через некоторое время бумажка синее.

¹ Пробку можно заменить кусочком ваты.

Контрольные вопросы

1. Каково значение минеральных солей для нормальной жизнедеятельности организма?
 2. Каким образом регулируется рН крови?
 3. Что такое буферная емкость крови и от чего она зависит?
 4. Что такое активная и титруемая кислотность мочи и от чего она изменяется?
 5. Какие нарушения в обмене воды и минеральных веществ наблюдаются при несахарном диабете, эндемическом зобе, бронзовой болезни, тетании, рахите, анемии?
 6. В составе каких веществ поступают в организм фосфор и сера и в виде каких соединений они выводятся из организма?
 7. Какое количество хлоридов выделяется с мочой в норме? От чего зависят колебания в выведении хлористого натрия и какие известны нарушения в выведении хлоридов?
-

РАЗДЕЛ III

ХИМИЯ ТКАНЕЙ

1. КРОВЬ

Кровь является внутренней средой организма, посредством которой осуществляется связь между отдельными органами и тканями. С кровью приносятся к тканям кислород и питательные вещества, поступающие в организм из внешней среды через легкие и пищеварительный тракт, и уносятся от органов и тканей конечные продукты обмена веществ, являющиеся отбросами и подлежащие выведению из организма через почки, легкие, печень, кожу и другие органы выделения. С кровью переносятся необходимые для нормальной жизнедеятельности организма инкреты и различные продукты промежуточного обмена, вырабатываемые в органах и тканях, отдаленных от места их непосредственного действия. У человека общее количество циркулирующей крови равно в среднем 4,5—5,5 л и составляет около $\frac{1}{13}$ веса тела.

Кровь имеет удельный вес, равный 1,050—1,060, и обладает довольно значительной вязкостью. Буферные системы крови поддерживают рН крови на постоянном уровне, близком к 7,36. Осмотическое давление крови равно 7,7—8,1 ат. Величина этого давления зависит от общей молярной концентрации осмотически активных веществ, находящихся в плазме. Наибольшее значение среди них имеют хлористый натрий и бикарбонат натрия. Постоянство осмотического давления крови поддерживается главным образом благодаря деятельности почек, через которые выводится избыток воды и растворимых солей.

Кровь состоит из форменных элементов (35—40%) и плазмы (60—65%). К форменным элементам крови относятся эритроциты, лейкоциты, лимфоциты и тромбоциты. Химический состав форменных элементов отличается от химического состава плазмы. Форменные элементы крови богаты сложными белками: в эритроцитах содержатся хромопротеиды (гемоглобин и купреин), лейкоциты и лимфоциты богаты нуклеопротеидами, тромбоциты содержат липопротеид про-

тромбокиназу, в состав протетической группы которого входит кефалин. Содержание гемоглобина в эритроцитах доходит до 40%. В цельной крови взрослого человека содержание гемоглобина составляет 12—14%, что соответствует 75—85% по гемометру Сали¹. Кроме гемоглобина, в эритроцитах содержится сложный белок, содержащий медь, называемый купреинном, и фермент карбоангидраза, в состав которого входит цинк. Из небелковых органических веществ в эритроцитах содержится в среднем 350 мг% лецитина, 150 мг% холестерина и др. Содержание глюкозы в эритроцитах меньше, чем в плазме, и составляет 60—70 мг%. Из минеральных веществ в эритроцитах содержится особенно много калия (около 470 мг%) и железа (около 105 мг%) и очень мало натрия (около 80 мг%).

В плазме крови содержатся преимущественно простые белки. В норме содержание белка в плазме колеблется от 6,5 до 8,5%, из них на долю альбумина приходится от 4 до 4,5%, на долю глобулина 2—3% и фибриногена 0,2—0,3%. Кроме того, в крови содержатся ферменты, как, например, протромбин, тромботропин, амилаза, липаза, протеазы, фосфатаза, аминифераза, холинэстераза и др. В плазме крови всегда находится некоторое количество промежуточных и конечных продуктов азотистого обмена: полипептиды, аминокислоты, мочевины, мочевая кислота, креатин, креатинин, билирубин, пуриновые основания, гиппуровая кислота, индикан, аммонийные соли и др. Азот всех этих небелковых веществ носит название остаточного азота крови, так как все эти вещества остаются в фильтрате после осаждения белков крови. Азот всех азотистых веществ крови, включая белки, носит название общего азота крови. Остаточный азот содержится в крови в количестве 20—30 мг%, причем половина его приходится на долю мочевины.

Содержание жира и липоидов в крови колеблется в пределах 450—850 мг%; из них на долю лецитина и стерина приходится от 200 до 400 мг%. После приема жирной пищи содержание жира и липоидов в крови может доходить до 1% и больше. Содержание сахара в крови в норме составляет 70—110 мг%. При сахарном диабете количество сахара в крови повышается до 120—150 мг%.

В крови содержатся в небольшом количестве органические кислоты: молочная, пировиноградная, кетоглутаровая, янтарная и др. В норме количество молочной кислоты не превышает 8—15 мг%. При напряженной мышечной работе и при недостатке кислорода количество ее может увеличиваться. При различных физиологических и патологических со-

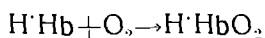
¹ В гемометре Сали за 100 принята окраска, соответствующая содержанию 16% гемоглобина в крови.

стояниях химический состав крови изменяется. Анализы крови имеют большое диагностическое значение, так как помогают следить за развитием патологического процесса и контролировать эффективность терапевтических мероприятий.

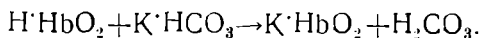
ДЫХАТЕЛЬНАЯ ФУНКЦИЯ КРОВИ

Дыхательной функцией крови называется способность крови переносить кислород от легких к тканям и углекислый газ от тканей к легким. И. М. Сеченов впервые указал на важную роль гемоглобина в переносе газов крови. В настоящее время процесс переноса кислорода и углекислого газа представляется следующим образом.

В легких, где парциальное давление кислорода высокое (80 мм ртутного столба), а углекислого газа низкое, кислород быстро соединяется с гемоглобином, образуя оксигемоглобин.

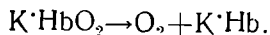


Оксигемоглобин обладает более сильной диссоциацией ионов водорода, чем гемоглобин. При взаимодействии с калиевой солью бикарбоната он вытесняет угольную кислоту и соединяется с калием. Схематично процесс, происходящий в капиллярах альвеол, может быть представлен следующим образом:



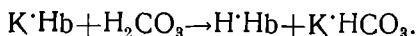
Образующаяся угольная кислота под влиянием фермента карбангидразы распадается на CO_2 и H_2O , которые и выделяются легкими. Для сохранения постоянства ионного равновесия между элементами крови из плазмы в эритроциты проникают анионы угольной кислоты, а из эритроцитов в плазму — анионы хлора. По мере разрушения в эритроцитах угольной кислоты ферментом карбангидразой в эритроциты поступают все новые и новые порции анионов угольной кислоты, а плазма при этом обогащается новыми порциями анионов хлора. Содержание хлоридов в плазме артериальной крови повышается, а концентрация бикарбонатов падает.

Эритроциты, содержащие калиевую соль оксигемоглобина, приносятся с кровью к тканям. В тканях парциальное давление кислорода малое (20—40 мм ртутного столба), а углекислого газа — высокое. Создаются условия для диссоциации оксигемоглобина на кислород и гемоглобин.

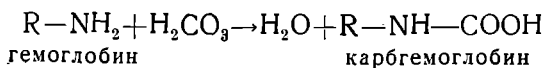


Кислород поступает из эритроцитов в ткани, а углекислый газ — из тканей в эритроциты. Угольная кислота как более сильная при взаимодействии с калиевой солью гемоглобина вытесняет гемоглобин и соединяется с калием. Схема-

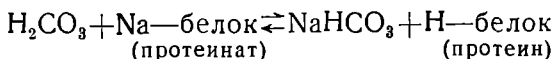
точно процесс, происходящий в тканевых капиллярах, может быть представлен в следующем виде:



В результате в эритроцитах накапливаются анионы угольной кислоты. Для сохранения постоянства ионного равновесия анионы угольной кислоты из эритроцитов переходят в плазму, а анионы хлора из плазмы проникают в эритроциты. Содержание хлоридов в плазме венозной крови понижается, а концентрация бикарбонатов нарастает. Таким образом, в легких и в тканях процесс диффузий ионов между эритроцитами и плазмой происходит в противоположном направлении. Кроме указанного пути, существуют и другие способы переноса угольной кислоты от тканей к легким. Угольная кислота может присоединяться к аминок группам белкового компонента гемоглобина с образованием карбгемоглобина. Схематично эту реакцию можно представить так:



Карбгемоглобин — очень нестойкое соединение. В легочных капиллярах он легко диссоциирует с отщеплением углекислоты. В переносе угольной кислоты большую роль играют и другие белковые вещества крови. При взаимодействии угольной кислоты с щелочными солями белков крови (протеинатами) образуются бикарбонаты и свободные белки:



Эта реакция обратимая и в тканевых капиллярах протекает слева направо, а в легочных капиллярах, где парциальное давление угольной кислоты низкое, наоборот, справа налево.

Хлориды крови

У здорового человека содержание хлоридов в крови при пересчете на хлористый натрий составляет 450—550 мг%, в плазме — 690 мг%, в эритроцитах почти в 2 раза меньше, чем в плазме. Хлориды принимают участие в газообмене и в регуляции активной реакции крови. Хлориды крови расходуются на образование соляной кислоты желудочного сока. Большие запасы хлористого натрия содержатся в коже и в печени. При некоторых патологических состояниях организма (заболевание почек и др.) хлориды задерживаются во всех тканях и особенно в подкожной клетчатке. Задержка хлоридов сопровождается задержкой воды и образованием отеков. При лихорадочных заболеваниях, бронзовой болезни содержание хлоридов в крови сильно понижается. Резкое

снижение содержания хлоридов в крови может наступить при введении в организм большого количества ртутных препаратов и служит сигналом наступающего ртутного отравления.

Работа № 110

Определение хлоридов в крови по методу Рушняка

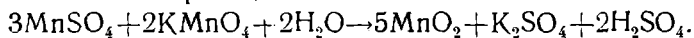
Хлориды крови или сыворотки осаждают раствором азотнокислого серебра в присутствии азотной кислоты. Избыток азотнокислого серебра определяют обратным титрованием роданистым аммонием в присутствии индикатора — железо-аммонийных квасцов. Разница между количествами добавленного азотнокислого серебра и оттитрованного обратно соответствует количеству азотнокислого серебра, связавшегося с хлоридами крови. Во избежание связывания ионов серебра белками и другими органическими веществами их минерализуют марганцовокислым калием при температуре кипения. Вычисляют количество хлоридов в крови в миллиграмм-процентах. Если концентрация употребляемых растворов 0,01 н., то грамм-эквивалент хлористого натрия равен $\frac{58,5}{100}$.

С целью лучшего контроля над качеством своей работы определение хлоридов производят одновременно в двух опытных пробах с кровью. Реакция протекает следующим образом:

1. $\text{NaCl} + \text{AgNO}_3 \rightarrow \text{AgCl} + \text{NaNO}_3$,
2. $\text{AgNO}_3 + \text{NH}_4\text{CNS} \rightarrow \text{AgCNS} + \text{NH}_4\text{NO}_3$.
Избыток
3. $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 + 6\text{NH}_4\text{CNS} \rightarrow 2\text{Fe}(\text{CNS})_3 + 3(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Ход работы. В 2 маленькие колбочки наливают по 2 мл дистиллированной воды. Микропипеткой набирают оксалатную кровь (0,1 мл) немного выше верхнего нулевого деления. Пипетку переводят в горизонтальное положение, кончик ее тщательно обтирают кусочком фильтровальной бумаги. Одновременно спускают на бумагу избыток взятой крови. Пипетку погружают в первую колбочку с дистиллированной водой, осторожно выдувают кровь и 2—3 раза промывают пипетку верхним слоем жидкости; содержимое колбочки перемешивают. Таким же образом берут вторую порцию крови. Затем в колбочки прибавляют по 2 мл 0,01 н. раствора азотнокислого серебра (осаждение хлоридов), по 10 капель концентрированной азотной кислоты (растворение других серебряных солей, например Ag_2SO_4) и по 5 капель насыщенного раствора марганцовокислого калия (KMnO_4) для окисления органических веществ в кислой среде при темпе-

ратуре 100° Обе колбочки ставят на асбестовую сетку, нагревают над слабым пламенем горелки до кипения и кипятят 5 минут. Если жидкость обесцветится, вновь добавляют 5 капель перманганата и кипячение продолжают еще 5 минут. Так поступают до тех пор, пока раствор при дальнейшем нагревании не перестанет обесцветываться или пока не выпадет бурый осадок перекиси марганца, не исчезающий при кипячении. Образование бурого осадка обусловлено взаимодействием двухвалентного марганца с добавленным избытком семивалентного марганца.



↓
бурый осадок

Для обесцвечивания избытка перманганата или перекиси марганца в колбочки добавляют глюкозу в порошке на кончике стеклянной лопаточки (ножа) и продолжают нагревание. Жидкость постепенно обесцвечивается за счет окисления глюкозы¹ и на дне колбочки собираются белые хлопья AgCl. После обесцвечивания и охлаждения жидкости в обе колбочки добавляют в качестве индикатора по 3—4 капли железо-аммонийных квасцов и избыток азотнокислого серебра титруют 0,01 н. раствором роданистого аммония до слабо розового окрашивания, не исчезающего в течение 15 секунд. Результаты титрования и расчет заносит в таблицу.

№ п/п	H ₂ O (в мл)	Кровь (в мл)	0,01 н. рас- твор AgNO ₃ (в мл)	0,01 н. рас- твор NH ₄ CNS (в мл)	Количество AgNO ₃ , связавше- гося с хло- ром	Содержание NaCl (в мг%)	
						во взятой пробе	в 100 мл крови

Выводы:

В нормальных условиях в крови человека и теплокровных животных содержится 450—550 мг% хлористого натрия.

Фосфаты крови

Фосфор содержится в крови в виде неорганических соединений преимущественно однозамещенных и двузамещенных солей (NaH₂PO₄, Na₂HPO₄ и т. д.) и в виде так называемого «кислоторастворимого» и «кислотонерастворимого» фосфора. К кислоторастворимым фосфорным соединениям относятся фосфорные эфиры глюкозы, глицеринового альдегида, пировиноградной кислоты, аденозинтрифосфорные и аденозиндифосфорные кислоты и другие вещества. К кислотонераство-

¹ Обесцвечивание обусловлено окислением глюкозы и восстановлением семивалентного марганца (KMnO₄) и четырехвалентного (MnO₂) до двухвалентного (MnSO₄).

римым соединениям относятся нуклеопротеиды, нуклеиновые кислоты, лецитин, кефалин и др. При анализах взятие крови производят с большими предосторожностями, предупреждающими гемолиз. При гемолизе количество неорганического фосфора в крови увеличивается за счет гидролиза кислоторастворимых соединений, присутствующих в эритроцитах. У здорового взрослого человека содержание неорганического фосфора в плазме или сыворотке крови составляет 3—5 мг%, у ребенка — 4—6 мг%. При рахите и остеомаляции (размягчение костей) количество фосфора в крови снижается до 1—2 мг% и нарушается нормальное соотношение между количеством кальция и фосфора. Лечение рыбьим жиром, содержащим витамин D, а также ультрафиолетовыми лучами¹ всегда сопровождается повышением содержания фосфора в крови. Повышение содержания фосфора в крови до 5—7 мг% наблюдается в период заживления костных переломов, при недостаточной функции паращитовидных желез и при почечной недостаточности. В последнем случае данные анализа о повышенном содержании фосфора в крови (иногда до 8 мг%) сигнализируют о тяжелом состоянии больного.

Работа № 111

Колориметрическое определение фосфорной кислоты в крови или в сыворотке крови

При добавлении молибденовокислого аммония, гидрохинона и сульфита (восстановителя) к жидкости, содержащей фосфорную кислоту, жидкость приобретает синюю окраску. Интенсивность окраски пропорциональна количеству фосфорной кислоты. Реакция обусловлена образованием комплексного соединения—фосфорно-молибденовокислого аммония $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{MoO}_3$, которое при добавлении гидрохинона и сульфита натрия (Na_2SO_3) в щелочной среде восстанавливается с образованием молибденовой сини (смесь различных окислов молибдена)². Цветную молибденовую реакцию широко используют для колориметрических методов количественного определения фосфорной кислоты. В качестве стандартного раствора употребляют раствор соли фосфорной кислоты известной концентрации, который обрабатывается параллельно и так же, как испытуемая жидкость. Определение фосфорной кислоты в крови, сыворотке или в плазме производят после осаждения белков трихлоруксусной кислотой.

¹ В коже содержится провитамин D — 7-дегидрохолестерин, который при освещении ультрафиолетовыми лучами превращается в витамин D.

² Осадок фосфорномолибденовокислого аммония, выделенный из азотнокислого раствора, имеет состав $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{MoO}_3$. Шестивалентный молибден, связанный в комплекс с анионом PO_4 , обладает способностью окислять такие вещества, которые простыми молибдатами не окисляются.

Ход работы. Получение безбелкового фильтрата крови. В пробирку наливают 2 мл дистиллированной воды. Оксалатную кровь или сыворотку крови в количестве 1 мл набирают сухой пипеткой (точно!) и выпускают на дно пробирки с водой; пипетку ополаскивают верхним слоем жидкости, втягивая и выпуская ее 2—3 раза. Жидкость перемешивают и добавляют 1 мл 20% раствора трихлоруксусной кислоты и спустя 5 минут фильтруют через беззольный фильтр или центрифугируют. Фильтрат должен быть бесцветен и прозрачен.

Получение молибденовой сини. В градуированную пробирку (или мерную колбочку) емкостью 10 мл отмеривают 2 мл безбелкового фильтрата крови, во вторую такую же пробирку отмеривают столько же стандартного раствора соли фосфорной кислоты¹. В обе пробирки добавляют по возможности почти одновременно по 1 мл молибденового реактива и по 1 мл раствора гидрохинона и содержимое пробирок перемешивают стеклянными палочками. Жидкость темнеет². Спустя 5 минут приливают маленькими порциями (во избежание бурного вспенивания) по 2 мл раствора $\text{Na}_2\text{SO}_3 + \text{Na}_2\text{CO}_3$. Содержимое пробирок вновь тщательно перемешивают, объем жидкости в пробирках доводят водой до 10 мл и через 10 минут колориметрируют.

Колориметрирование. Проверяют равномерность освещения двух полей в колориметре. В левый стаканчик колориметра наливают стандартный раствор, а в правый стаканчик — испытуемую жидкость. Если стаканчики мокрые, их ополаскивают соответствующим (стандартным или испытуемым) раствором. Левый стаканчик произвольно устанавливают на высоте 10—20 или 30 мм. Правый стаканчик устанавливают на такую высоту, при которой освещение обоих полей колориметра становится одинаковым. Меняя положение правого стаканчика, колориметрирование повторяют не менее 5 раз. Показания шкалы после каждого наблюдения записывают в тетрадь по следующей форме:

Колориметрирование

Левая (стандарт) 30 мм	Правая (испытуемый раствор) 20,6 21,1 20,8 21,5 20,9 <hr style="width: 50%; margin: 0;"/> 104,9
	Среднее 21 мм

¹ Стандартный раствор фосфорной кислоты содержит 0,01 мг фосфора в 1 мл.

² Стеклянные палочки оставляют в пробирках и вынимают их только тогда, когда объем жидкости в пробирках доводят до 10 мл.

Вычисление. Стандартный раствор содержит 0,02 мг (2 мл по 0,01 мг) фосфора и стоит на высоте 30 мм, испытуемый раствор имеет высоту 21 мм. Зная, что концентрация растворов обратно пропорциональна высоте столбов жидкости, составляют пропорцию и решают уравнение:

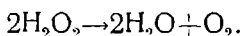
$$x = \frac{0,02 \text{ мг} \cdot 30}{21} = 0,0286 \text{ мг.}$$

Полученное количество фосфора содержится в 0,5 мл крови или сыворотки, взятой для колориметрирования. Определяют количество фосфора в 100 мл крови по уравнению:

$$x = \frac{0,0286 \cdot 100}{0,5} = 5,72 \text{ мг}$$

Ферменты крови

В крови содержится много разных ферментов. Среди них важное место занимает каталаза. По своей химической природе каталаза крови является геминовым ферментом. Каталаза участвует в процессе разложения перекиси водорода по следующему уравнению:

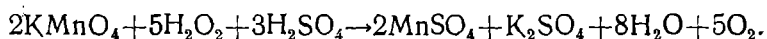


Одна молекула каталазы может разложить за 1 минуту 2 600 000 молекул перекиси водорода. Каталаза предохраняет живые организмы от токсического действия перекиси водорода, образующейся в процессе биологического окисления. Много каталазы содержится в ткани печени и эритроцитах, откуда ее и выделяют в кристаллическом виде. Каталаза инактивируется синильной кислотой, азидом натрия и другими соединениями.

Работа № 112

Определение каталазной активности крови по методу Баха и Зубковой

Принцип метода основан на определении количества субстрата (перекиси водорода), которое может быть разрушено ферментом (каталазой) в определенных условиях опыта. Количество перекиси водорода, взятое для опыта (контрольная проба), и количество перекиси водорода, оставшейся после действия каталазы (опытная проба), определяется титрованием перманганатом калия. Реакция протекает по следующему уравнению.



Ход работы. В колбочку емкостью 50 мл отмеривают пипеткой 20 мл дистиллированной воды. Затем для взятия крови из пальца берут иглу Франка, микропипетку емкостью 0,02 мл и фильтровальную бумагу. Кончик пальца обмывают спиртом, вытирают сухой стерильной ватой и прокалывают иглой Франка. К выступившей капле крови прикасаются кончиком пипетки, которую держат в горизонтальном положении. В силу капиллярности кровь быстро набирается в пипетку. Когда мениск крови перейдет за метку 0,02, т. е. кровь будет взята с избытком, кончик пипетки вытирают фильтровальной бумажкой и избыток крови удаляют прикосновением кончика пипетки к фильтровальной бумажке. Пипетку опускают до дна в приготовленную колбочку с дистиллированной водой и осторожно выдувают кровь. Затем пипетку приподнимают и промывают ее несколько раз путем втягивания и выпускания жидкости. Содержимое колбочки перемешивают вращательным движением. Получают разведение крови 1 1000. Часть полученного раствора крови (2—3 мл) нагревают в кипящей водяной бане в течение 5 минут и охлаждают под струей водопроводной воды. В 4 конические колбочки емкостью 20—25 мл наливают по 1 мл дистиллированной воды. В 2 колбочки отмеривают микропипеткой по 0,2 мл прокипяченного раствора крови (контрольные) и в 2 другие — по 0,2 мл непрокипяченного раствора крови (опытные). Во все колбочки добавляют по 0,5 мл 1% свежеприготовленного раствора перекиси водорода. Содержимое колбочек перемешивают и оставляют на 30 минут при комнатной температуре.

В опытной колбочке, где фермент активен, появляются пузырьки газа (кислорода) за счет разложения перекиси водорода каталазой крови. Жидкость контрольной колбочки остается без изменений.

По истечении 30 минут в каждую колбочку наливают по 1 мл 10% раствора серной кислоты для прекращения действия фермента и создания кислой реакции среды, необходимой для последующего титрования. Содержимое колбочек титруют из микробюретки 0,05 н. раствором перманганата калия до розовой окраски. Каталазную активность выражают каталазным числом, т. е. количеством миллиграммов перекиси водорода¹, которое может быть разложено 1 мл крови, разведенной 1 1000, т. е. 1 мкл неразведенной крови². В норме каталазное число (или показатель каталазы) составляет 14—18, но может варьировать от 12 до 20.

Результаты работы записывают в форме таблицы.

¹ Молекулярный вес H_2O_2 равен 34; грамм-эквивалент равен 17; 1 мл 0,05 н. раствора содержит 0,85 мг H_2O_2 .

² 1 микролитр равен 0,001 миллилитра.

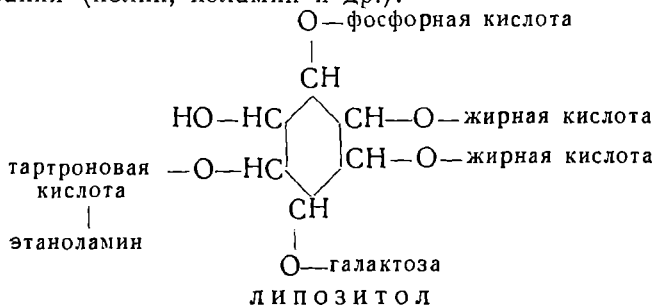
Взято крови	Общее количество разведенной крови 1:1000	Количество разведенной крови, взятой для анализа		Количество 0,05 н. раствора $KMnO_4$, пошедшее на титрование (в мл)		Количество H_2O_2 , разложенное каталазой		Каталазное число
		контроль		контроль		в мл 0,5 н. раствора	в мг	
Выводы:								

2. НЕРВНАЯ ТКАНЬ

В ткани мозга содержатся белки, жиры, углеводы, минеральные вещества, витамины и ферменты.

Белки мозговой и нервной ткани. Своеобразие белков ткани мозга состоит в том, что они богаты фосфором. А. Я. Данилевскому удалось выделить из мозга белковые вещества, которые были названы им нейроглобулином и нейростромином. Количество и качество белковых веществ изменяется с возрастом. Если у новорожденного содержится в ткани мозга 2,5% белков, то у взрослых количество белков равно 8—9%. С возрастом увеличивается содержание нейростромиина и нейроглобулина и уменьшается количество нейрокератина (труднорастворимого белка). Исследованиями А. В. Палладина и его сотрудников установлено, что нейростромин мозга идентичен рибонуклеопротеиду, а нейроглобулин — дезоксирибонуклеопротеиду. По мнению А. Я. Данилевского, специфическая деятельность нервных клеток связана с указанными выше белками.

В ткани мозга содержатся нейтральные жиры, фосфатиды (лецитин, кефалин, сфингофосфатид и др.), стериды и цереброзиды, причем в белом веществе в большем количестве, чем в сером. Почти весь холестерин находится в мозгу в свободном состоянии, а не в виде эфиров с жирными кислотами. Часть холестерина образует с белками комплексы — липопротеиды, играющие важную роль в жизнедеятельности нервных клеток. В мозгу содержится много липозитола. Это сложное вещество имеет в своем составе инозит, фосфорную кислоту, жирные кислоты, сахар, оксикислоты и азотистые основания (холин, коламин и др.).



Минеральные вещества содержатся в ткани мозга те же, что в других тканях организма. Количество их в сером и белом веществе неодинаково и увеличивается с возрастом. В сером веществе мозга содержится 1,5% минеральных веществ, в белом — 0,6%. Наличие значительно большего количества минеральных соединений в сером веществе мозга свидетельствует о важной роли минеральных веществ в деятельности нервной клетки. Преобладание ионов калия способствует возбуждению, а ионов кальция и магния — угнетению нервной деятельности. С лечебной целью используют иногда магниальный наркоз и введение хлористого кальция, а для возбуждения нервной системы — соли калия (противошоковая жидкость).

В числе азотистых экстрактивных веществ в мозговой ткани содержатся креатин, фосфокреатин, аденозинтрифосфорная кислота (АТФ), холин, пуриновые основания, мочевая кислота, аминокислоты, глютамин, аспарагин и др., в числе безазотистых веществ — глюкоза, инозит, молочная кислота. Все эти вещества могут быть обнаружены обычными характерными для них химическими реакциями в безбелковом фильтрате, полученном из ткани мозга.

Из мозговой ткани убойного скота готовят фармакопейные препараты, богатые органическим фосфором, которые находят широкое применение при лечении некоторых заболеваний нервной системы и употребляются как укрепляющие средства при нервном истощении, неврозах и т. п. К ним относятся препараты липоцеребрин, лецитин и др.

Работа № 113

Разделение белков мозговой ткани

Ход работы. Мозговую ткань в количестве 0,5 г растирают в фарфоровой ступке до гомогенной кашицы и добавляют маленькими порциями 0,25% раствор едкого натра в количестве 5 мл. Щелочная жидкость содержит все растворимые белки: альбумины, глобулины, нейростромин и нейроглобулин. Жидкость фильтруют через двойной слой марли; в осадке остается нейрокератин. К фильтрату добавляют около 4—5 капель концентрированной уксусной кислоты до слабокислой реакции на лакмус. Выпадает обильный осадок нуклеопротеидов (нейростромин и нейроглобулин). Осадок нуклеопротеидов отделяют фильтрованием. С фильтратом, содержащим альбумины и глобулины, прodelьвают реакцию осаждения белков наслаиванием жидкости на концентрированную азотную кислоту (см. стр. 31). Осадок нуклеопротеидов промывают на фильтре водой и с небольшими порциями его прodelьвают цветные реакции на

белки: биуретовую (стр. 6), реакцию Миллона (стр. 11), диазореакцию (стр. 13), реакцию Сакагучи (стр. 12) и реакцию Подобедова с α -нафтолом на углеводы (стр. 46).

Работа № 114

Выделение холестерина из мозговой ткани

Ход работы. Мозговую ткань в количестве 0,5 г растирают в фарфоровой ступке с двойным по объему или тройным по весу количеством гипса. Полученную массу намазывают тонким слоем на стеклянную пластинку и высушивают на воздухе или в сушильном шкафу. Сухую массу снимают скальпелем и растирают в фарфоровой ступке до гомогенного порошка. Порошок¹ переносят в сухую пробирку, добавляют 3 мл хлороформа и, закрыв пробирку корковой пробкой, взбалтывают 5—10 минут. По окончании встряхивания жидкость фильтруют через маленький складчатый фильтр, смоченный хлороформом. С фильтратом проделывают цветные реакции на холестерин (см. стр. 114, 115).

Работа № 115

Выделение фосфатидов из мозговой ткани

Ход работы. Мозговую ткань в количестве 0,5—1 г помещают в пробирку, добавляют 3—5 мл горячего спирта и нагревают на водяной бане при температуре 50—60° в течение 10—15 минут, тщательно перемешивая содержимое стеклянной палочкой. По окончании экстракции жидкость фильтруют в сухую пробирку и с фильтратом проделывают реакции на лецитин (см. стр. 113, 114).

Работа № 116

Определение фосфопировиноградной кислоты в ткани мозга

Фосфопировиноградная кислота является одним из промежуточных продуктов распада углеводов, жиров, и белков. Содержание ее в ткани мозга изменяется в зависимости от функционального состояния нервной системы: при возбуждении нервных клеток количество ее уменьшается, при торможении — нарастает. Применение медикаментозного сна в значительной мере основано на том, что энергетические вещества нервных клеток — глюкоза, пировиноградная кис-

¹ Для сокращения времени стеклянные пластинки с мозгом оставляют для следующей группы, а сами пользуются высушенным мозгом, приготовленным предыдущей группой.

лота и другие органические вещества — накапливаются в нервной ткани в свободном виде и в виде фосфорных эфиров и создают необходимые условия для нормальной жизнедеятельности.

Фосфопировиноградная кислота в щелочной среде окисляется йодом с отщеплением неорганической фосфорной кислоты. При помощи колориметрического метода определяют количество неорганической фосфорной кислоты до разрушения фосфопировиноградной кислоты и после ее разрушения. По разности двух полученных величин определяют количество фосфорной кислоты, отщепившейся от фосфопировиноградной при окислении ее йодом. По количеству фосфорной кислоты вычисляют количество фосфопировиноградной кислоты.

Ход работы. 1. Получение безбелкового фильтрата мозга. Мозговую ткань измельчают скальпелем на часовом стекле и на аптечных весах отвешивают 500 мг измельченной ткани. Ткань переносят в ступку, в которую налито 5 мл 5% раствора трихлоруксусной кислоты¹, тщательно растирают и оставляют на 30 минут. За этот период происходит осаждение белков и гидролиз лабильных фосфорных эфиров. Фосфопировиноградная кислота остается без изменения. Для отделения выпавшего в осадок белка жидкость фильтруют через складчатый фильтр или центрифугируют. Фильтрат используют для получения молибденовой сини и колориметрирования.

2. Получение молибденовой сини и колориметрирование. В две пронумерованные мерные пробирки емкостью 10 мл наливают по 0,5 мл безбелкового фильтрата крови и по 2,5 мл 0,1 н. раствора щелочи. В третью такую же мерную пробирку наливают 0,5 мл стандартного раствора соли фосфорной кислоты² и 2,5 мл воды. В первую пробирку добавляют 0,5 мл 0,1 н. раствора йода, перемешивают и оставляют на 15 минут. По истечении этого времени во все пробирки наливают по 2,5 мл 0,1 н. раствора серной кислоты. При этом в первой пробирке, в которую был добавлен йод, появляется бурая окраска от йода. Избыток йода оттитровывают 0,1 н. раствором бисульфита до исчезновения желтого окрашивания. Затем во все пробирки добавляют по 2,5 мл 2,5% раствора молибденовокислого аммония и по 0,5 мл 0,5% раствора аскорбиновой кислоты (или эйконогена), перемешивают и оставляют на 15—20 минут. Жидкость во всех пробирках приобретает синюю окрас-

¹ Трихлоруксусную кислоту берут из расчета 1 мл на 100 мг ткани.

² Для приготовления стандартного раствора употребляют соль двузамещенного фосфорнокислого калия. Раствор готовят с таким расчетом, чтобы 1 мл его содержал 0,01 мг фосфора.

ку. Содержимое пробирок доводят до метки дистиллированной водой (10 мл), перемешивают и колориметрируют.

Колориметрирование производят так же, как указано в работе по определению фосфора в крови (см. стр. 184), и результаты колориметрирования записывают в форме таблицы.

Высота столба жидкости		
стандартный раствор	исследуемый фильтрат	
	первая пробирка	вторая пробирка

Вычисление. Зная, что стандартный раствор содержит в 1 мл 0,01 мг фосфора, по данным колориметрирования вычисляют содержание неорганического фосфора в 1 мл фильтрата до разрушения фосфопировиноградной кислоты (вторая пробирка) и в 1 мл того же фильтрата после разрушения фосфопировиноградной кислоты (первая пробирка). По разности определяют количество фосфора фосфопировиноградной кислоты в 1 мл исследуемого фильтрата. Вычисляют количество фосфора фосфопировиноградной кислоты в 5 мл фильтрата, что соответствует 500 мг взятой для анализа мозговой ткани, а затем в 100 г мозговой ткани, т. е. данные анализа выражают в миллиграмм-процентах. Результаты анализа фиксируют в форме таблицы.

Навеска мозга	Общий объем фильтрата (в мл)	Количество неорганического фосфора в 1 мл фильтрата		Количество фосфора фосфопировиноградной кислоты		
		до разрушения фосфопировиноградной кислоты	после разрушения фосфопировиноградной кислоты	в 1 мл фильтрат	в 5 мл фильтрата	в 100 г мозговой ткани

Выводы:

3. МЫШЕЧНАЯ ТКАНЬ

Мышечная ткань составляет 42% от веса всего тела и является одной из важнейших систем организма. Она обеспечивает движение, кровообращение, дыхание, перистальтику пищеварительного аппарата и ряд других физиологических функций. Структурным элементом мышечной ткани является многоядерное мышечное волокно, построенное из пучка волокнистых образований — миофибрилл, жидкой части — саркоплазмы и оболочки волокна — сарколеммы.

Мышечная ткань содержит 75—80% воды и 20—25% сухого вещества. Около 80% сухого вещества составляют белки, остальные 20% — углеводы, липоиды, азотистые и безазотистые экстрактивные вещества, витамины и минеральные соли.

Из мышечной ткани выделено несколько белковых фракций, отличных по химической природе и физико-химическим свойствам: миоген, миоальбумин, миостромин, глобулин X, актин, миозин, нуклеопротеиды, коллаген. Все эти белковые вещества отличаются по молекулярному весу, изоэлектрической точке, растворимости, осаждаемости и по аминокислотному составу. Каждая белковая фракция, по-видимому, обладает особой специфической функцией.

Миоген является белком саркоплазмы. По физико-химическим свойствам он относится к альбуминам: он хорошо растворяется в воде и высаливается серноокислым аммонием при почти полном насыщении. Польским ученым Т. Барановским из воднорастворимой фракции мышечной ткани выделены два кристаллических белка: миоген А и миоген В. По данным В. А. Энгельгардта, миоген А обладает альдолазной активностью, т. е. способностью катализировать распад 1-6-дифосфорного эфира фруктозы на две фосфотриозы.

Миозин является сократительным белком миофибрилл. Он легко извлекается растворами хлористого аммония, натрия или калия и выпадает из раствора при диализе или высаливании серноокислым аммонием при концентрациях, близких к полунасыщению. В. А. Энгельгардт и М. Н. Любимова установили, что миозин обладает аденозинтрифосфатазной активностью, т. е. способностью катализировать реакцию гидролиза аденозинтрифосфорной кислоты на аденозиндифосфорную и фосфорную кислоты. Процесс расщепления аденозинтрифосфорной кислоты сопровождается выделением большого количества энергии и имеет непосредственное отношение к механизму мышечного сокращения.

Венгерский ученый Штрауб нашел, что в зависимости от продолжительности экстракции миозин может быть получен в двух формах. При кратковременной экстракции получается миозин А, при длительной — очень вязкой миозин В. Штрауб открыл, что превращение миозина А в миозин В обусловлено вторым белком, переходящим в раствор при длительной экстракции, и назвал этот белок актином. Актин и миозин, соединяясь, образуют комплекс — актомиозин, обладающий высокой вязкостью.

Если выдувать раствор актомиозина в воду, то он застудневает в виде нити. Актомиозиновые нити внешне похожи на мышечные фибриллы и используются как модели для изучения химизма мышечного сокращения. Если актомиозиновую нить поместить в свежий водный экстракт мышцы,

содержащий аденозинтрифосфорную кислоту, наблюдается сокращение.

Миоглобин по своей химической природе относится к хромопротеидам. Простетической группой миоглобина является гем. Миоглобин растворяется в воде. Миоглобин обладает большим сродством к кислороду, чем гемоглобин. Соединение миоглобина с кислородом называется оксимиоглобином. Миоглобин принимает участие в транспорте кислорода от гемоглобина к цитохромной системе мышц.

Работа № 117

Фракционированное разделение белков мышечной ткани

Ход работы. 1. Получение водной вытяжки (миоген). Мышечную ткань (0,5 г) растирают в фарфоровой ступке с 10 каплями дистиллированной воды в течение 3—5 минут до получения гомогенной массы. К растертой мышечной кашеце подливают при помешивании небольшими порциями (по 5—10 капель) дистиллированную воду (всего в количестве 3 мл). Водную вытяжку фильтруют через тройной слой марли. Остаток мышечной ткани сохраняют для получения солевой вытяжки, а с фильтратом проделывают биуретовую реакцию (см. стр. 6), высаливание альбуминов сернокислым аммонием (см. стр. 28) и гваяковую пробу на присутствие миоглобина (см. стр. 42).

2. Получение солевой вытяжки (миозин). Ткань, оставшуюся после получения водной вытяжки, отмывают от следов воднорастворимой альбуминовой фракции путем повторного экстрагирования новыми порциями воды до тех пор, пока промывная жидкость не перестанет давать биуретовую реакцию. Промывные жидкости выбрасывают. Отмытую ткань заливают в ступке 3 мл 5% раствора хлористого калия и растирают пестиком в течение 5 минут. В раствор переходит глобулиновая фракция белков мышечной ткани. Жидкость отделяют фильтрованием, остаток ткани сохраняют для получения коллагена, а с небольшими порциями фильтрата проделывают биуретовую реакцию, реакцию высаливания глобулинов и осаждение белка путем разведения десятикратным объемом дистиллированной воды.

3. Получение коллагена мышечной ткани. Для удаления следов глобулиновой фракции остаток ткани отмывают новыми порциями раствора хлористого калия до получения отрицательной биуретовой реакции. Промывную жидкость выбрасывают.

Остаток ткани переносят с марлевого фильтра в широкую пробирку с пробкой и трубкой в качестве холодильника (см. рис. 7, стр. 39), заливают 1 мл дистиллированной

воды и кипятят на сетке около 30 минут. При нагревании коллаген соединительной ткани переходит в раствор. Горячий раствор фильтруют и с фильтратом продельвают биуретовую реакцию. Получается сине-фиолетовое окрашивание, характерное для растворов коллагена.

ГЛИКОГЕН МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

Гликоген, или животный крахмал содержится в мышцах в количестве от 0,4 до 0,7% (обычно его количество не превышает 2%). Он играет роль запасного полисахарида и расходуется главным образом в процессе мышечной работы. С мышечными белками, особенно с миозином, гликоген образует комплексные соединения, обладающие высокой лабильностью.

Свободный гликоген представляет собой белый аморфный порошок, хорошо растворяющийся в воде с образованием сильно опалесцирующих коллоидных растворов, не образующих клейстера при кипячении. Гликоген хорошо осаждается спиртом, устойчив по отношению к действию щелочей, при реакции с йодом окрашивается в красный или красно-бурый цвет.

Работа № 118

Открытие гликогена в мышечной ткани

Мышечную ткань только что убитого животного¹ быстро на холоду отделяют от костной ткани и непродолжительное время сохраняют на холоду, предотвращая тем самым возможный ферментативный распад гликогена. 1 г измельченной ножницами мышечной ткани (или 0,5 г печени) заливают в фарфоровой чашке 4 мл кипящей дистиллированной воды и кипятят на огне (на горелке с асбестовой сеткой) в течение 2—3 минут. Белки при этом свертываются, а ферменты разрушаются. Содержимое фарфоровой чашки переносят в фарфоровую ступку и ткань тщательно растирают пестиком до получения гомогенной массы. Кашицу, если нужно, разбавляют 1 мл дистиллированной воды, переносят обратно в фарфоровую чашку и кипятят на огне еще в течение 20—30 минут, все время подливая каплями воду по мере выкипания жидкости. Гликоген переходит в раствор. Для более полного осаждения белка кипящую жидкость подкисляют 5—10 каплями 1% раствора

¹ Для получения гликогена удобно пользоваться мышечной тканью крысы или кролика. Животное предварительно в течение суток обильно кормят сахаром. Для обнаружения гликогена целесообразно использовать также печень животного. Содержание гликогена в печени значительно выше, чем в мышцах, и может достигать до 5—10%.

уксусной кислоты. Осадок белка отделяют фильтрованием через влажный бумажный фильтр и с фильтратом, содержащим коллоидный раствор гликогена прodelьвают описанные ниже реакции.

1. Осаждение гликогена спиртом. При взаимодействии коллоидного раствора гликогена со спиртом частицы гликогена теряют водную оболочку и он выпадает из раствора в виде белого аморфного осадка.

Ход работы. К 5 каплям жидкости, содержащей гликоген, добавляют 5—10 капель спирта. Жидкость мутнеет, а при стоянии выпадает осадок гликогена.

2. Йодная проба на гликоген. При добавлении йода к раствору гликогена жидкость приобретает розовое, красное или темно-бурое окрашивание. Реакция обусловлена адсорбцией йода на коллоидных частицах гликогена. В зависимости от концентрации его жидкость приобретает различную окраску.

Ход работы. В 2 пробирки наливают: в первую — 5 капель жидкости, содержащей гликоген, во вторую — 5 капель дистиллированной воды. В обе пробирки добавляют по 1—2 капли 1% раствора йода. В первой пробирке жидкость приобретает розовое или красное окрашивание, во второй — желтое (цвет йода в водном растворе).

3. Гидролиз гликогена амилазой слюны. При действии амилазы слюны гликоген распадается через ряд промежуточных продуктов (декстринов) до мальтозы и раствора его теряет способность давать с йодом окрашенные соединения.

Ход работы. К 5 каплям жидкости, содержащей гликоген, добавляют 1 каплю разбавленной в 10 раз слюны и перемешивают. Через 10—20 секунд добавляют 1—2 капли раствора йода. Жидкость принимает желтое окрашивание (цвет йода в водном растворе).

ЭКСТРАКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА МЫШЦ

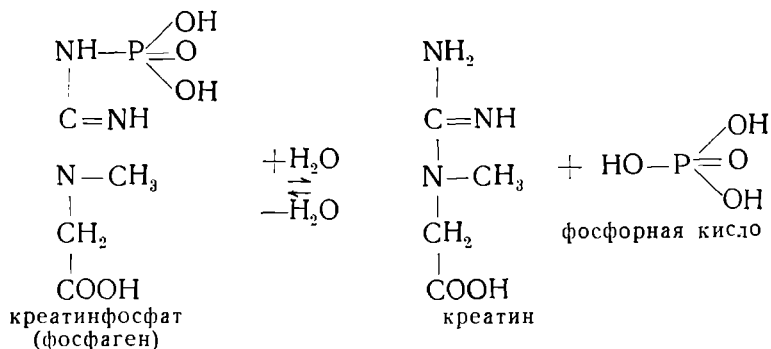
Экстрактивными веществами называются органические вещества, растворимые в воде, содержащиеся в ткани в незначительном количестве. Они могут быть обнаружены только в концентрированных вытяжках — экстрактах. К экстрактивным веществам относятся: аденозинтрифосфорная, аденозиндифосфорная, адениловая кислоты, креатин, креатинфосфат, карнозин, ансерин, карнитин, аминокислоты, молочная кислота и другие соединения.

Аденозинтрифосфорная кислота (АТФ) (см. стр. 36) представляет собой нуклеотид, построенный из аденина, рибозы и трех остатков фосфорной кислоты и содержится в мышцах в количестве 0,25—0,4%. Взаимодей-

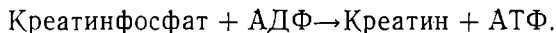
ствии ее с мышечным белком миозином, обладающим аденозинтрифосфатазной активностью, сопровождается превращением химической энергии макроэргических фосфорных связей АТФ в механическую энергию мышечного сокращения.

Выпускаемые советской промышленностью препараты аденозинтрифосфорной кислоты — миоль¹ и МАП² — успешно применяются как лечебные средства при мышечной дистрофии, стенокардии, перемежающейся хромоте и других заболеваниях.

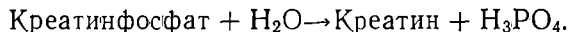
Креатинфосфорная кислота, или фосфаген, содержится в мышцах в количестве 0,2—0,5% и представляет собой производное креатина и фосфорной кислоты.



Креатинфосфат участвует в реакции фосфорилирования, образующейся в начальной фазе мышечного сокращения аденозиндифосфорной кислоты и таким образом поддерживает концентрацию аденозинтрифосфорной кислоты на определенном уровне.



Некоторое количество креатинфосфата распадается на креатин и неорганический фосфат.



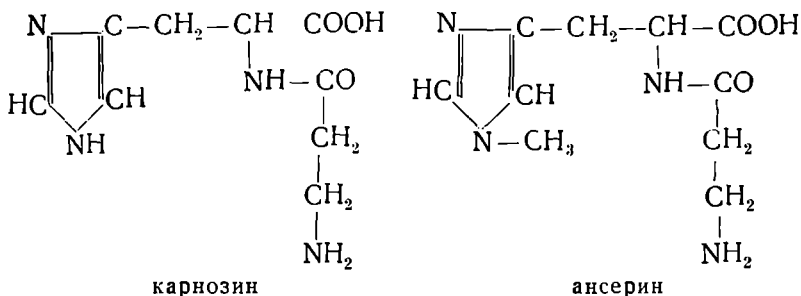
Неорганический фосфат в первые моменты мышечной работы используется для фосфорилиза гликогена (см. стр. 127), а позже для превращения 3-фосфоглицеринового альдегида в 1,3-дифосфоглицериновый альдегид (см. стр. 131). Креатинфосфат, по данным А. В. Палладина, накапливается в мышцах при тренировке и обуславливает большую работоспо-

¹ Миоль — экстракт из поперечнополосатой мускулатуры животных.

² МАП — мышечно-адениловый препарат, получаемый из пивных дрожжей.

способность и незначительную утомляемость тренированных мышц.

Карнозин представляет собой дипептид, построенный из гистидина и β-аланина, и содержится в мышцах в количестве от 0,2 до 0,3%. Ансерин — метилированное производное карнозина — находится в мышцах в количестве 0,1—0,15%.



Карнозин впервые был выделен из мышечного экстракта В. С. Гулевичем. Ансерин впервые обнаружен Н. Ф. Толкачевской в мышцах кур, а затем найден в мышцах других птиц, рыб и некоторых млекопитающих. С. Е. Северин установил, что карнозин стимулирует реакцию фосфорилирования 3-фосфоглицеринового альдегида с образованием 1,3-дифосфоглицеринового альдегида и тем самым способствует связыванию минерального фосфора (см. стр. 131). Карнозин и ансерин участвуют в реакциях перефосфорилирования между 1,3-дифосфоглицериновой и аденозиндифосфорной кислотой (см. стр. 131) и способствуют накоплению в мышцах аденозинтрифосфорной кислоты и фосфокреатина.

Молочная кислота образуется в мышцах в анаэробных условиях и является конечным продуктом гликолиза. Количество образовавшейся молочной кислоты эквивалентно количеству распавшейся глюкозы. Установлено, что содержание молочной кислоты в крови человека и животных повышается после мышечной работы. Особенно резкое увеличение количества молочной кислоты наблюдается после усиленных мышечных упражнений. Однако уровень молочной кислоты в крови быстро снижается, так как она поглощается печенью и превращается там в гликоген. Синтез гликогена из молочной кислоты не может протекать самопроизвольно и осуществляется только при условии сопряжения его с окислительными процессами, дающими энергию. По данным Пастера и Мейргофа, синтез гликогена сопряжен с окислением некоторой части молочной кислоты до углекислого газа и воды. Основная масса молочной кислоты при этом превращается в гликоген. В настоящее время установлено,

что в аэробных условиях при достаточном притоке кислорода гликоген и глюкоза окисляются до CO_2 и H_2O , минуя стадию образования молочной кислоты (см. стр. 133, 134).

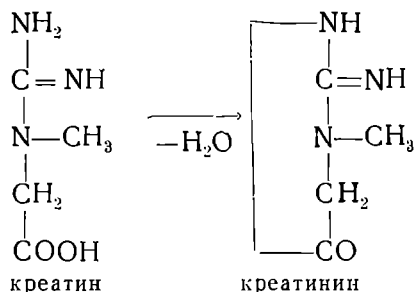
Работа № 119

Получение безбелковой вытяжки из мышечной ткани и открытие экстрактивных веществ

Мышечную ткань (1 г) тщательно растирают в течение 3—5 минут в ступке с 10 каплями дистиллированной воды до получения гомогенной кашицы, затем добавляют 4 мл воды и тщательно растирают еще несколько минут.

Содержимое ступки переносят в широкую пробирку и нагревают на голом огне до кипения. Выпавший осадок белка отделяют фильтрованием, а полученный фильтрат используют для обнаружения экстрактивных веществ: креатина, карнозина и молочной кислоты.

1. **Открытие креатина.** При нагревании в кислой среде креатин теряет воду и превращается в креатинин; последний может быть обнаружен специфическими для него химическими реакциями.



Ход работы. В пробирку наливают 1 мл безбелкового фильтрата мышечной ткани и 2 капли 10% раствора серной кислоты. Пробирку закрывают пробкой со стеклянной трубкой в качестве холодильника и помещают на асбестовую сетку (см. рис. 7, стр. 39). Жидкость кипятят в течение 30 минут. Креатин превращается в креатинин. Жидкость охлаждают, нейтрализуют 2—3 каплями 10% раствора соды и с небольшими порциями ее проделывают цветные реакции на креатинин: 1) с раствором пикриновой кислоты; 2) с раствором нитропруссид натрия (см. стр. 157).

2. **Открытие карнозина.** При нагревании раствора карнозина (или ансерина) с диазореактивом в щелочной среде жидкость окрашивается в оранжево-красный цвет. Реакция

обусловлена образованием окрашенного продукта конденсации карнозина с диазобензосульфокислотой (см. стр. 14).

Ход работы. К 5 каплям безбелкового фильтрата прибавляют равный объем диазореактива¹ и 3—4 капли 10% раствора углекислого натрия. Жидкость принимает оранжево-красное окрашивание.

3. Открытие молочной кислоты. При добавлении реактива Уфельмана (FeCl_3 и фенол) к раствору, содержащему молочную кислоту, жидкость окрашивается в зеленовато-желтый цвет вследствие образования молочнокислого железа (см. стр. 143 и 144).

Ход работы. К 10 каплям 1% раствора фенола добавляют 1 каплю 1% раствора хлорного железа. Получают реактив Уфельмана. К полученной жидкости фиолетового цвета добавляют по каплям безбелковый фильтрат мышечной ткани. В присутствии молочной кислоты фиолетовая окраска жидкости переходит в желто-зеленую.

Контрольные вопросы

1. Что такое дыхательная функция крови и как она осуществляется?

2. Назовите главные белки крови и небелковые азотистые вещества крови. Дайте объяснение понятиям «общий азот» и «остаточный азот» крови.

3. Чем отличаются различные производные кровяного пигмента: гемоглобин, оксигемоглобин, карбгемоглобин, карбоксигемоглобин, метгемоглобин?

4. Какова роль печени в обмене углеводов, жиров, простых и сложных белков, в обмене минеральных веществ и воды?

5. Какие простые и сложные белки содержатся в мозговой ткани?

6. Какие липоиды встречаются в мозговой ткани?

7. Каковы особенности химического состава белого и серого вещества мозговой ткани?

8. Назовите главные белки мышечной ткани и расскажите, какую роль они играют в процессе мышечного сокращения.

9. Назовите экстрактивные вещества мышечной ткани, расскажите, из каких веществ и как они образуются в организме и каково их участие в процессе мышечного сокращения.

¹ См. приготовление диазореактива на стр. 14 и 15.

РАЗДЕЛ IV

ОБМЕН ВЕЩЕСТВ В РАСТЕНИЯХ

Обмен веществ у растений имеет много коренных отличий от обмена веществ в животном организме и в то же время немало общих черт. Отличительной особенностью растений является их способность ассимилировать энергию солнечных лучей и использовать углекислый газ, воду и минеральные вещества на построение органических соединений. Общими чертами обмена веществ у растений и у животных являются некоторые процессы промежуточного внутриклеточного обмена углеводов, жиров и белков, как, например, β -окисление жирных кислот, аминирование и дезаминирование, карбоксилирование и декарбоксилирование, орнитинный и лимоннокислый цикл и др. Все эти процессы осуществляются под влиянием ферментных систем, которые по своей химической природе и биологическому действию близки к ферментным системам животного организма. Однако как у растений, так и у животных есть своя специфика как в смысле направленности действия ферментов, так и в отношении катализируемых процессов.

1. ОБМЕН УГЛЕВОДОВ

Углеводы составляют 85—90% сухого веса растений и играют большую роль в их жизнедеятельности. Они являются прежде всего структурными элементами растительных тканей и служат основным материалом при синтезе разнообразных веществ: жиров, белков, глюкозидов, дубильных веществ, органических кислот и т. д. В отличие от животных организмов растения не получают углеводов из внешней среды в готовом виде, а синтезируют их сами.

подавляющее большинство растений используют для синтеза углеводов вещества неорганической природы: углекислый газ и воду; источником энергии служат солнечные лучи. Небольшая часть растительных организмов, например некоторые бактерии, используют в качестве источника энергии процессы окисления различных неорганических веществ:

сероводорода, серы, водорода, аммиака, азотистой кислоты, закисных соединений железа и марганца (хемосинтез).

В растительном мире существует также небольшая группа растений, использующих для питания готовые органические вещества: глюкозу, пировиноградную и другие кислоты. К ним относятся бесхлорофильные растения — грибы и некоторые бактерии. Однако исследования последних лет показали, что эти растения (так называемые гетеротрофы) способны усваивать и углекислый газ из воздуха и осуществлять синтез органических веществ.

Образование углеводов из углекислого газа и воды в процессе фотосинтеза у высших растений совершается при участии хлорофилла (зеленого пигмента растений). Последовательный ход реакций, начиная от CO_2 и H_2O и кончая образованием углевода, еще точно не выяснен. В последнее время опыты с меченым углеродом показали, что в результате фотосинтеза образуется фосfogлицириновая кислота.

Имеются основания полагать, что фосfogлицириновая кислота возникает в результате присоединения CO_2 к какому-то неизвестному в настоящее время соединению, состоящему из 2 углеродных атомов. Существует два взгляда на природу этого двууглеродистого соединения: одни ученые полагают, что этим соединением является уксусная кислота, другие считают его гликолевой кислотой $\text{CH}_2\text{OH}-\text{COOH}$. Молекулы фосfogлицириновой кислоты при восстановлении превращаются в триозы, из которых путем конденсации образуются гексозы и полисахариды. Превращение фосfogлицириновой кислоты может протекать и в другом направлении. Из нее может образоваться фосfопировиноградная кислота, которая затем участвует в образовании различных органических кислот, аминокислот, жирных кислот и т. д.

Многочисленные исследования показали, что на свету в зеленых листьях растений чрезвычайно быстро и легко образуются моносахариды. Образование дисахаридов и полисахаридов является вторичной реакцией и может происходить в темноте из ранее образовавшихся моносахаридов. Так, например, в отсутствие света в листьях сахарной свеклы происходит образование сахарозы из глюкозы и фруктозы, введенных в лист путем вакуумной инфильтрации. Образовавшийся в листьях крахмал легко превращается в сахарозу, и в таком виде транспортируется из листьев в семена, клубни и луковицы. Там сахароза вновь превращается в полисахариды — крахмал или инулин, которые играют роль запасного питательного материала. Количество полисахаридов в зерне нарастает по мере созревания. При прорастании семян наблюдается обратное явление: крахмал постепенно исчезает, а количество растворимых углеводов — декстринов, дисахаридов и моносахаридов — увеличивается.

Открытие крахмала в зеленых листьях растений

Крахмал может быть обнаружен только в зеленых листьях растений; в пожелтевших листьях вследствие отсутствия в них хлорофилла синтеза крахмала не происходит.

Ход работы. В 2 пронумерованные пробирки помещают: в первую — зеленый листик растения, во вторую — пожелтевший. В обе пробирки наливают по 1—2 мл дистиллированной воды и содержимое кипятят 2—3 минуты. Горячую воду сливают и в каждую пробирку наливают по 1 мл этилового спирта. Пробирки помещают в кипящую водяную баню на 3—5 минут и ежеминутно встряхивают. Хлорофилл зеленого листа и ксантофилл желтого листа переходят в спирт, и листья обесцвечиваются. Окрашенный спирт сливают в 2 новые сухие пронумерованные пробирки, а почти бесцветные листья заливают в тех же пробирках новыми порциями спирта и нагревают еще раз в течение 3—5 минут. Спирт сливают, а листочки промывают несколько раз дистиллированной водой. Затем в каждую пробирку наливают 3—4 мл дистиллированной воды и пробирки помещают в кипящую водяную баню для размягчения тканей листа. Через 5—10 минут воду сливают, листочки помещают на пронумерованные кусочки фильтровальной бумаги. На отмытые листочки наносят несколько капель 1% раствора йода. При наличии в листочках крахмала постепенно появляются синие точки и, наконец, весь лист принимает синюю окраску. Работу по открытию крахмала и следующие работы по открытию редуцирующих веществ фиксируют в форме таблицы.

Материал исследования	Употребляемые реактивы	Получаемое окрашивание	Чем обусловлена реакция

Выводы:

Работа № 121

Открытие редуцирующих веществ в вытяжке из лука

При нагревании водной вытяжки из репчатого лука с реактивом Фелинга появляется желтый осадок гидрата закиси меди, или красный осадок закиси меди. Реакция обусловлена наличием в водной вытяжке из лука глюкозы и

других редуцирующих веществ, способных восстанавливать гидрат окиси меди в закись.

Ход работы. Репчатый лук натирают на терке. Из полученной мязки берут около 0,5 г в пробирку, добавляют 2 мл воды и кипятят 3—4 минуты. Жидкость фильтруют через бумажный фильтр и в фильтрате открывают редуцирующие вещества при помощи реакции Фелинга (см. стр. 140). Для реакции берут 10 капель фильтрата. Вместо лука можно использовать корень моркови.

Работа № 122

Открытие крахмала и редуцирующих веществ в семенах фасоли до и после прорастания

В семенах фасоли содержатся углеводы в форме полисахаридов. При прорастании семян некоторое количество полисахаридов распадается с образованием редуцирующих сахаров, которые могут быть обнаружены специальными реакциями (Фелинга, Троммера, Нилендера и др.; см. стр. 139, 140).

Ход работы. 1. Получение вытяжки из семян фасоли. Берут 2 семечка фасоли: одно проросшее, другое не проросшее, но набухшее. Каждое семечко растирают отдельно в ступке до состояния кашицы. В ступку добавляют 3 мл воды, тщательно размешивают и содержимое ступки переносят в пронумерованную центрифужную пробирку. Для лучшего извлечения крахмала и сахара содержимое центрифужных пробирок время от времени взбалтывают. После 10—15-минутного настаивания вытяжки центрифугируют 2—3 минуты. Центрифугаты сливают в чистые пронумерованные пробирки и с каждым из них проводят реакции на открытие крахмала и сахара.

2. Открытие крахмала реакцией с йодом. В 2 пробирки наливают по 10 капель вытяжки из проросших и из непроросших семян. Содержимое пробирок кипятят 1—2 минуты и охлаждают. В каждую пробирку добавляют по 1 капле 1% раствора йода. В обеих пробирках жидкость окрашивается в синий цвет.

3. Открытие редуцирующих сахаров реакцией Фелинга. В 2 пробирки наливают: в первую — 1—2 мл вытяжки из проросших семян, во вторую — такое же количество вытяжки из непроросших семян. Для осаждения белка в каждую пробирку добавляют по каплям 10% раствор уксуснокислого свинца до прекращения выделения мути (3—4 капли). Содержимое пробирок фильтруют через складчатые фильтры и с прозрачными фильтрами проводят реакцию Фелинга на сахар (см. стр. 140).

Накопление органических кислот в растениях сопровождается уменьшением количества углеводов. Изменения в соотношениях количества органических кислот и углеводов можно наблюдать в течение суток. Так, например, в листьях некоторых растений утром обнаруживается высокое содержание органических кислот и низкое содержание крахмала, а вечером, наоборот, содержание органических кислот заметно падает, а содержание крахмала повышается. Есть основания полагать, что образование и превращение органических кислот в растениях совершается по лимонно-кислomu циклу Кребса (стр. 134). С помощью метода вакуум-инфильтрации удалось установить, что после введения пировиноградной, щавелево-уксусной, а также янтарной кислот в листьях махорки увеличивается количество лимонной кислоты.

Состав органических кислот в различных частях растения неодинаков. Так, например, у апельсинового дерева в листьях преобладает яблочная кислота, а в плодах — лимонная. Некоторые растения содержат большое количество щавелевой кислоты в виде кальциевой соли. Определение общего количества органических кислот в растительных тканях представляют определенный интерес. Определяют его обычно титрованием. В качестве объекта исследования можно воспользоваться соевой мукой.

Работа № 123

Определение титруемой кислотности в водной вытяжке из соевой муки

Титруемую кислотность обычно выражают в миллилитрах 0,1 н. раствора щелочи, пошедшей на титрование вытяжки, полученной из 100 г растительного материала, или в миллиграммах органических кислот¹.

Ход работы. 1 г соевой муки растирают в ступке с 1—2 мл воды и 0,1—0,2 г стеклянного песка. Затем добавляют около 5 мл воды, тщательно размешивают и полученную взвесь переносят в мерную колбочку емкостью 25 мл. Ступку обмывают несколько раз небольшими порциями воды (2—3 мл), каждый раз сливая ее в ту же колбочку, затем добавляют 2 капли толуола, доводят объем вытяжки до метки водой и оставляют при комнатной температуре на 1 час. После настаивания часть вытяжки фильтруют. Из прозрачного или слегка опалесцирующего фильтрата берут

¹ При пересчете на миллиграммы какой-либо органической кислоты обычно выбирают ту, которая количественно преобладает в исследуемом материале.

5 мл в коническую колбочку, добавляют 2 капли спиртового раствора фенолфталеина и титруют 0,01 н. раствором едкого натра до появления розового окрашивания. Титрование повторяют 2—3 раза. Результаты работы записывают в форме таблицы.

Навеска муки (в г)	Объем вытяжки (в мл)	Взято вытяжки для титрования (в мл)	Количество 0,01 н. раствора NaOH, пошедшего на титрование (в мл)		Титруемая кислотность	
			пробы	всей вытяжки	в мл 0,1 н. раствора NaOH	в мг молочной кислоты ¹

Выводы:

Работа № 124

Спиртовое брожение (анаэробный распад углеводов у низших растений)

Если бродильный приборчик (рис. 19) заполнить раствором глюкозы и добавить растертые дрожжи, то при стоянии в закрытом колене приборчика накапливается углекислый газ, а в жидкости — этиловый спирт. Продукты брожения могут быть обнаружены специальными реакциями: спирт — реакцией с йодом по образованию йодоформа, углекислый газ — по поглощению его щелочью.

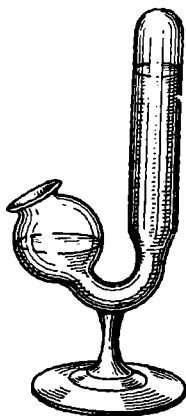


Рис. 19.
Бродильная трубка.

Ход работы. 0,5 г свежих дрожжей растирают в фарфоровой ступке с 10 мл 5% раствора глюкозы. Жидкость переливают в бродильный приборчик и, наклонив его, заполняют закрытое колено. Приборчик оставляют при комнатной температуре на 1—1½ часа. Образовавшийся углекислый газ собирается в верхней части закрытого колена приборчика. Для обнаружения углекислого газа в открытое колено приборчика наливают 10% раствор едкого натра до краев, приборчик плотно закрывают большим пальцем руки и несколько раз опрокидывают. Углекислый газ поглощается

щелочью и мякоть пальца втягивается внутрь с такой силой, что приборчик удерживается на пальце в всяком положении. Для открытия образовавшегося при брожении спирта небольшое количество (1 мл) жидкости фильтруют

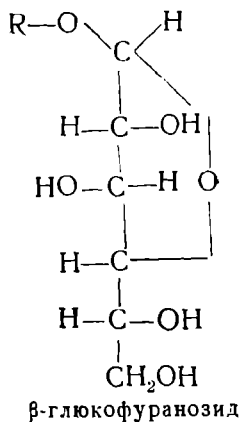
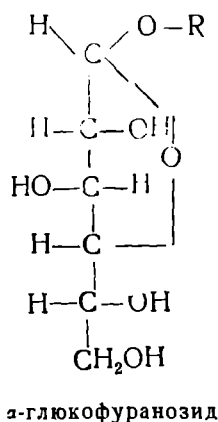
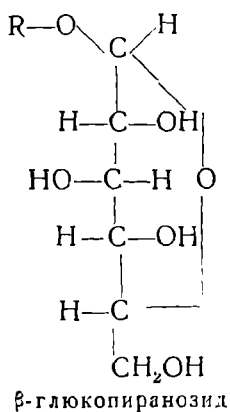
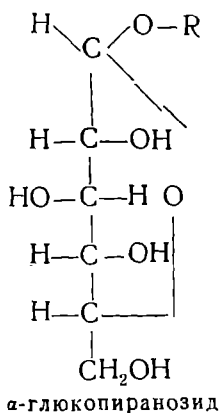
¹ Молекулярный вес молочной кислоты равен 90 г, 1 мл 0,1 н. раствора содержит 9 мг молочной кислоты.

и к фильтрату добавляют по каплям 10% раствор йода в растворе йодистого калия; выпадает осадок йодоформа, имеющий характерный запах и цвет.

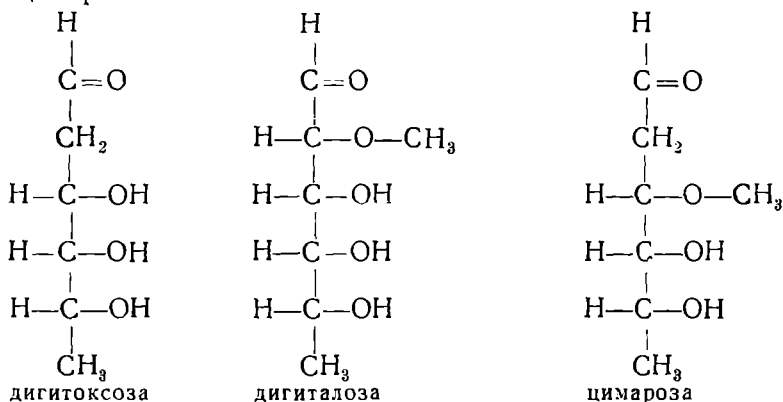
ГЛЮКОЗИДЫ

Из углеводов в некоторых растениях синтезируются глюкозиды — вещества, имеющие, по-видимому, важное значение в жизни растений.

Глюкозидами называются сложные эфиروобразные соединения, легко гидролизующиеся на углевод и вещество неуглеводного характера — аглюкон. Связь углевода с аглюконом осуществляется за счет полуацетального гидроксила. В качестве углевода в молекулу глюкозида входит остаток моносахарида с пяти- и шестичленным циклом типа фуранозы или пиранозы. В зависимости от расположения водорода и гидроксила у первого углеродного атома различают α - и β -глюкозиды:

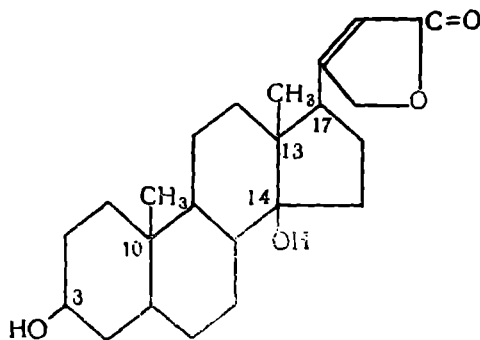


В состав некоторых так называемых сердечных гликозидов входят производные моносахаридов, называемые метилпентозами. К ним относятся дигитоксоза, дигиталоза и цимароза:



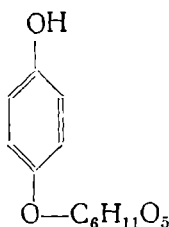
α - и β -гликозиды расщепляются под действием специфических для них ферментов. Выделенная из дрожжей α -гликозидаза катализирует гидролиз только α -гликозидов и не действует на β -гликозиды. Наоборот, эмульсин, выделенный из семян миндаля, катализирует расщепление β -гликозидов и не действует на α -форму. В растениях встречаются главным образом β -гликозиды, т. е. производные β -глюкозы.

Классификация гликозидов основана на химической природе аглюконов. Например, фенолгликозидами называются гликозиды, содержащие гидрохинон: антрагликозидами — содержащие антрахинон и т. п. Аглюконы сердечных гликозидов являются производными циклопентанопергидрофенантрена и называются генинами. Для генинов характерно наличие в 17-м положении ненасыщенного лактонного кольца. Наиболее изученным генином является дигитоксигенин наперстянки, имеющий следующее строение.

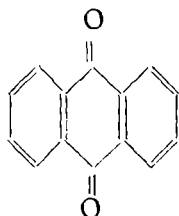


Дигитоксигенин имеет метильные группировки в 10-м и 13-м положении, два гидроксила в 3-м и 14-м положениях и ненасыщенное лактоновое кольцо в 17-м положении.

Представителем фенолглюкозидов является арбутин, применяемый в медицине как мочегонное средство.



Антраглюкозиды в качестве аглюкона содержат производные антрахинона.

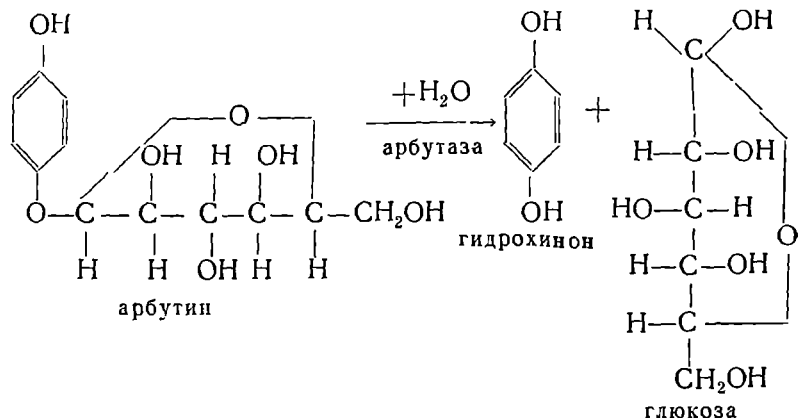


Глюкозиды встречаются в разнообразных частях растения — в семенах, плодах, листьях и корнях. Количество глюкозидов в растениях составляет десятые и сотые доли процента в пересчете на сухой вес. Содержание глюкозидов в растениях является постоянным и устойчивым признаком вида. Количество глюкозидов может изменяться в зависимости от условий внешней среды. Так, в пасмурную и дождливую погоду накопление глюкозидов снижается. В период засухи, мороза и в случаях повреждения насекомыми образование глюкозидов в растениях увеличивается. Глюкозиды обладают сильным биологическим действием, многие из них применяются как лекарственные вещества. Действие глюкозидов на организм определяется строением аглюкона. Наличие в глюкозидах сахара способствует растворимости глюкозидов.

Работа № 125

Открытие арбутина и арбутазы в листьях бадана и толокнянки

В листьях бадана и толокнянки содержится глюкозид арбутин и фермент арбутаза. Арбутаза катализирует реакцию гидролиза арбутина на глюкозу и гидрохинон. Реакция протекает по следующему уравнению.



При настаивании с водой листьев указанных выше растений арбутин и арбутаза переходят в раствор и фермент арбутаза разрушает арбутин на глюкозу и гидрохинон. Продукты распада могут быть обнаружены специальными реакциями.

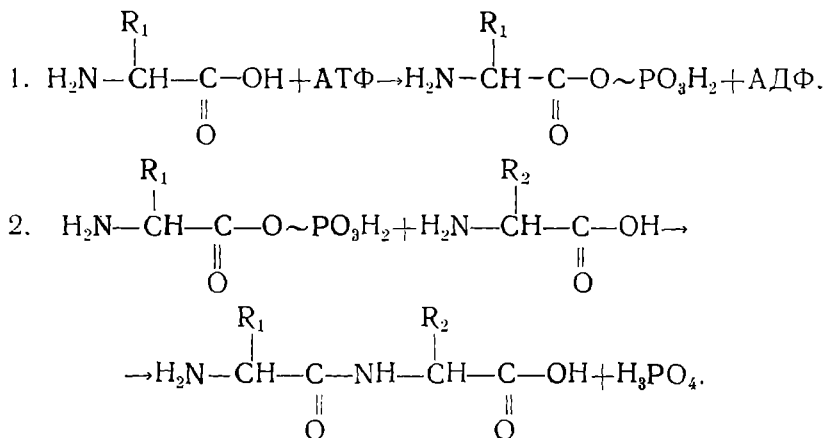
Ход работы. Открытие арбутина. 0,2 г свежих измельченных листьев бадана или 0,1 г сухих листьев толокнянки помещают в колбочку, заливают 10 мл кипящей воды и взбалтывают в течение 1—2 минут. Горячую вытяжку фильтруют и немедленно охлаждают водопроводной водой.

1. К 10 каплям фильтрата добавляют кристаллик сернокислого железа FeSO_4 ; появляется красное окрашивание, быстро переходящее в фиолетовое. При стоянии образуется темно-фиолетовый осадок.

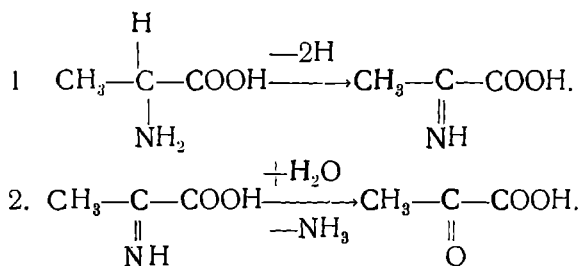
2. К 10 каплям фильтрата добавляют 1 каплю 1% раствора хлорного железа (FeCl_3); появляется синее окрашивание.

Открытие арбутазы. 0,2 г листьев бадана или 0,1 г сухих листьев толокнянки растирают в ступке со стеклянным песком, подливая небольшими порциями дистиллированную воду в количестве 10 мл. Небольшую порцию (2—3 мл) фильтруют и с фильтратом проделявают реакции на арбутин (см. выше). Содержимое ступки переносят в стаканчик и ставят на 15 минут в термостат при температуре 40° для ферментативного гидролиза. По истечении этого срока жидкость фильтруют, фильтрат подщелачивают 1 каплей 33% раствора едкого натра и делят на две части. В одной порции фильтрата открывают глюкозу реакцией Фелинга (стр. 140). Другую порцию оставляют стоять на воздухе. Через некоторое время гидрохинон окисляется и на поверхности жидкости появляется темное кольцо вследствие образования хингидрона. Хингидрон представляет собой соединение гидрохинона и хинона.

Аспарагиновая и глутаминовая кислоты играют важную роль в процессах переаминирования. Установлено, что в растениях возможно превращение одной аминокислоты в другую. Так, например, фенилаланин может превращаться в тирозин, гомоцистеин — в метионин, гистидин превращается в глутаминовую кислоту, аргинин — в орнитин и мочевину и т. д. Синтез белка из аминокислот протекает при участии протеаз; реакция идет с поглощением энергии. В процессах синтеза пептидных связей важную роль играет аденозинтрифосфорная кислота, которая, переходя в аденозиндифосфорную, передает богатые энергией фосфатные связи образующемуся пептиду. Процесс синтеза полипептидов может быть представлен в следующем виде:

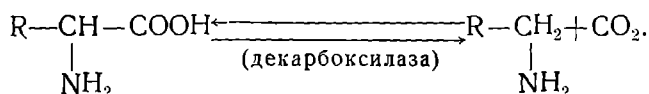


Процесс распада белков в растениях происходит под влиянием тех же протеолитических ферментов, при участии которых осуществляется их синтез, и протекает с выделением энергии. Распад белков особенно интенсивно протекает в прорастающих семенах. Аминокислоты, образующиеся при распаде белков, подвергаются дезаминированию. Основным путем дезаминирования аминокислот в растениях является окислительное дезаминирование, протекающее через стадию образования иминокислоты.

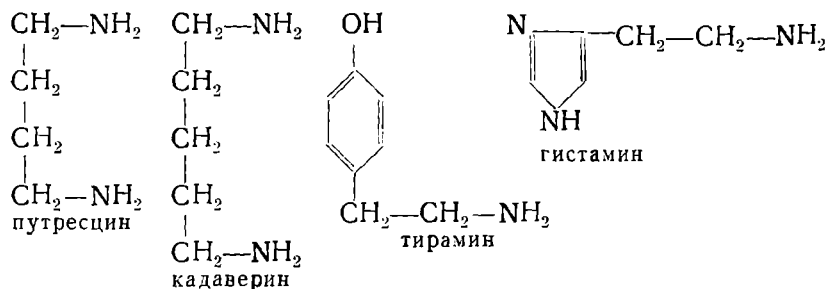


Безазотистые остатки аминокислот, образовавшиеся в процессе дезаминирования, могут служить источником возникновения углеводов и жиров. Аммиак, освободившийся в процессе дезаминирования, образует соли с органическими кислотами. У большинства высших растений обезвреживание аммиака происходит путем образования амидов — аспарагина и глутамина (Д. Н. Прянишников). Образование аспарагина и глутамина имеет важное физиологическое значение. Аспарагин и глутамин являются более устойчивыми соединениями, чем соответствующие им дикарбоновые аминокислоты, и не подвергаются окислительному дезаминированию. В растениях они играют роль резерва дикарбоновых аминокислот — необходимых участников в процессе ферментативного переаминирования.

В некоторых растениях при избыточном питании аммонийными солями глутамин накапливается в больших количествах и даже выделяется листьями наружу в виде капелек раствора. При высушивании капелек образуются кристаллы глутамина, видимые простым глазом. Распад аминокислот в растениях может происходить и другим путем. Под влиянием ферментов декарбоксилаз аминокислоты подвергаются декарбоксилированию с образованием аминов.



Эта реакция обратима. Амины найдены во многих высших и низших растениях. Так, например, путресцин и кадаверин, образующиеся при декарбоксилировании орнитина и лизина, найдены в рожках спорыньи, белене, белладонне, дурмане и в некоторых грибах. Тирамин найден в спорынье, гистамин — в спорынье и дрожжах.

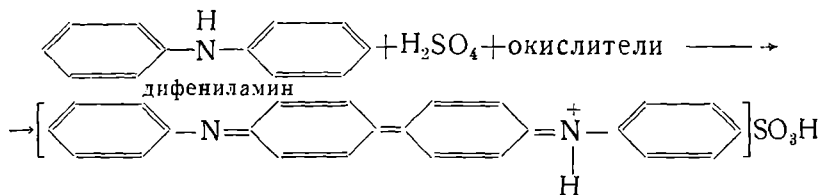


Во многих цветах содержатся продукты декарбоксилирования лейцина и валина — изоамиламин и изобутиламин.

Обнаружение нитратов и нитритов в зеленых листьях растения

Раствор дифениламина в концентрированной серной кислоте, нанесенный на кашицу из зеленых листьев, окрашивается в ярко-синий цвет.

Реакция обусловлена наличием в зеленых листьях нитратов и нитритов, которые реагируя в кислой среде как окислители, превращают дифениламин через ряд промежуточных продуктов в окрашенное вещество хиноидного строения. Схематично реакция может быть представлена в следующем виде:



дифенил-дифенохинон-диимин (сернокислая соль синего цвета)

Реакция очень чувствительна и применяется для открытия азотной кислоты. Эту реакцию дают и другие сильные окислители.

Ход работы. Кусочек свежего зеленого листа растирают на фарфоровой крышке стеклянной палочкой с 2—3 каплями 2% раствора дифениламина в крепкой серной кислоте. Появляется ярко-синее окрашивание.

Работа № 131

Фракционное разделение белков пшеничной муки

При последовательной обработке пшеничной муки водой, раствором хлористого натрия, раствором щелочи и спиртом получается ряд белковых фракций. Водная вытяжка содержит преимущественно альбумины, солевая — глобулины, щелочная — глютелины, спиртовая — проламины.

Ход работы. 1. Извлечение альбуминов. 0,5 г пшеничной муки растирают в ступке с 3 мл воды, через 2—3 минуты надосадочную часть жидкости фильтруют через бумажный плоский фильтр, а остаток муки промывают в ступке 2 мл воды и после 2—3-минутного отстаивания промытые воды удаляют. Промытый остаток сохраняют для выделения других фракций белка, а с фильтратом, со-

державшим альбумин, проделывают биуретовую пробу (см. стр. 6) и реакцию высаливания альбумина (см. стр. 28).

2. Извлечение глобулинов. Остаток муки после выделения альбуминов обрабатывают в ступке 10% раствором хлористого натрия и после отстаивания фильтруют. С фильтратом, содержащим глобулин, проделывают биуретовую реакцию и реакцию высаливания (см. стр. 6 и 28).

3. Извлечение глютелинов. Остаток муки после выделения глобулинов обрабатывают, как и в предыдущих случаях, 0,2% раствором едкого натра и после отстаивания фильтруют. К 10 каплям щелочной вытяжки добавляют по каплям 0,2% раствор уксусной кислоты. Появляется осадок глютелинов в виде мути.

4. Извлечение проламинов. 0,5 г пшеничной муки растирают в ступке с 3 мл 70% этилового спирта и смесь фильтруют через складчатый фильтр. С фильтратом, содержащим проламины, проделывают биуретовую реакцию (см. стр. 6) и реакцию осаждения проламинов при разведении вытяжки водой. Для этого к 10 каплям спиртовой вытяжки добавляют по каплям дистиллированную воду до появления осадка (или мути) проламинов. Результаты работы записывают в форме таблицы.

Материал исследования	Употребляемый растворитель	Название растворимого белка	Биуретовая реакция	Реакция осаждения

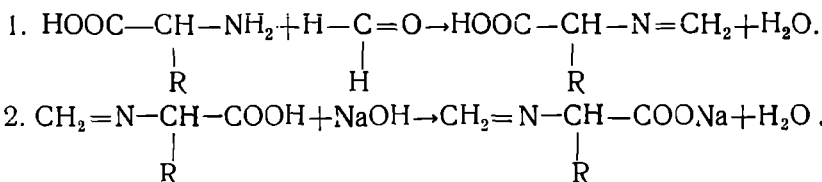
Выводы:

Работа № 132

Определение нарастания аминокислоты в процессе автолиза методом формолового титрования

При автолизе под влиянием присутствующих в клетках протеолитических ферментов происходит расщепление клеточных белков на полипептиды и аминокислоты и в автолизате увеличивается количество свободных карбоксильных и аминных групп. Полипептиды и аминокислоты являются амфотерными веществами. В водном растворе они способны диссоциировать как кислоты и как основания, поэтому определить количество кислотных или основных групп методом титрования можно только в том случае, если одна из них будет блокирована. Принцип метода формолового титрования основан на том, что прибавлением избытка формальдегида блокируют аминокислоты, а количество свобод-

ных карбоксильных групп определяют титрованием щелочью. Реакции протекают по следующим уравнениям:



Определяя количество щелочи, пошедшее при формальном титровании на нейтрализацию свободных карбоксильных групп до начала автолиза и по окончании его, вычисляют, какое количество щелочи связалось с карбоксильными группами вновь образовавшихся полипептидов и аминокислот. Поскольку при разрыве пептидной связи освобождаются аминные и карбоксильные группы в эквивалентных количествах, то по количеству щелочи, пошедшей на нейтрализацию карбоксильных групп, можно определить количество свободных аминок групп.

При расчете количества аминок азота свободных аминок групп учитывают, что 1 мл 0,01 н. раствора щелочи эквивалентен 0,14 мг азота. Следует иметь в виду, что метиленовые производные аминокислот и полипептидов, образующиеся при нейтрализации автолизата, являются солями очень слабых кислот и сильного основания, и в момент нейтрализации реакция среды автолизата становится щелочной (рН=9,1). Для титрования следовало бы применять индикатор, меняющий свою окраску при рН=9,1. За неимением такого можно воспользоваться фенолфталеином (зона перехода от рН=8,3 до рН=10,0) и титровать исследуемую жидкость до промежуточного розово-красного окрашивания, соответствующего рН=9,1. При применении фенолфталеина в качестве индикатора для удобства титрования заготавливают сначала контрольную пробу с рН=9,1, жидкость в которой окрашена в розово-красный цвет, и эту контрольную пробу используют для сравнения окраски при титровании опытных проб.

Ход работы. Навеску 0,4 г дрожжей, высушенных при комнатной температуре, растирают с небольшим количеством стеклянного песка (0,3—0,4 г), добавляя маленькими порциями 20 мл дистиллированной воды. Смесь переливают в колбочку, прибавляют 4 капли толуола и перемешивают. В чистую пробирку отбирают $\frac{1}{3}$ общего количества смеси, а остальные $\frac{2}{3}$ ставят в термостат при температуре 30—40° на 1—2 часа для автолиза. Отобранную порцию смеси фильтруют и фильтрат используют для титрования. Заготавливают две пробы: контрольную и опытную.

Контрольная проба. В коническую колбочку наливают 5 мл дистиллированной воды, 2,5 мл формоловой смеси и 3 мл 0,01 н. раствора щелочи. Жидкость приобретает ярко-красное окрашивание (рН смеси больше 10). Содержимое контрольной пробы титруют 0,01 н. раствором соляной или серной кислоты до бледно-розовой окраски (рН=8,3) и прибавляют 0,2 мл (4—5 капель) 0,01 н. раствора щелочи. Жидкость принимает розово-красный цвет (рН=9,1).

Опытная проба. В коническую колбочку отмеривают пипеткой 5 мл полученного фильтрата, добавляют 2,5 мл формоловой смеси и титруют 0,01 н. раствором щелочи до розово-красного цвета, т. е. до тех пор, пока окраска жидкости в опытной пробе не станет одинаковой с окраской контрольной пробы. Записывают количество щелочи, пошедшей на титрование опытной пробы (например, 2,48 мл).

Через 1—2 часа смесь, подвергавшуюся автолизу, вынимают из термостата, фильтруют и фильтрат используют для титрования, вновь заготавливая две пробы: контрольную и опытную. По разности результатов титрования двух опытных проб, взятых до начала автолиза и по окончании его, определяют количество щелочи, пошедшей на титрование полипептидов и аминокислот, образовавшихся в процессе автолиза.

Прирост свободных карбоксильных, а следовательно, и аминных групп выражают в миллиграммах азота, для чего полученную разность, выраженную в миллилитрах 0,01 н. раствора щелочи, умножают на грамм-эквивалент азота (0,14). Вычисляют прирост аминокислот в процентах к сухому веществу, подвергавшемуся автолизу. Результаты работы фиксируют в форме таблицы.

Навеска дрожжей	Объем смеси (в мл)	Объем смеси, взятой для титрования	Количество 0,01 н. раствора щелочи, пошедшей на титрование (в мл)		Количество азота аминокислот, освобожденных при автолизе (в мг)		
			до автолиза	после автолиза	в пробе (5 мл)	во всей смеси (20 мл)	в 100 г дрожжей

Выводы:

АЛКАЛОИДЫ

Алкалоидами называют группу природных азотсодержащих гетероциклических соединений с основными свойствами. Алкалоиды обладают сильным физиологическим действием. Содержание их в растениях незначительно

(1—2%); они встречаются в различных частях растения — в коре (хинное дерево), в клубнях (аконит), в листьях (кокаин). В клеточном соке алкалоиды находятся в растворенном состоянии, в старых и омертвевших тканях — в твердом виде. Исключительно много алкалоидов накапливается в коре хинного дерева (до 15—20%) и в млечном соке опийного мака (до 20%).

В зависимости от строения гетероцикла алкалоиды разделяются на несколько основных групп: 1) производные пиридина, 2) производные пирролидина, 3) производные хинолина и изохинолина, 4) производные индола и 5) производные пурина. Некоторые алкалоиды содержат в своей молекуле по два гетероцикла, например пиридиновый и пирролидиновый (никотин, анабазин и др.). В растениях алкалоиды находятся преимущественно в виде солей органических кислот — яблочной, лимонной и др., а иногда в виде солей минеральных кислот — серной, фосфорной, роданистоводородной. Встречаются также соединения алкалоидов с органическими кислотами более сложного строения (например, с аконитовой, хинной, меконовой и др.).

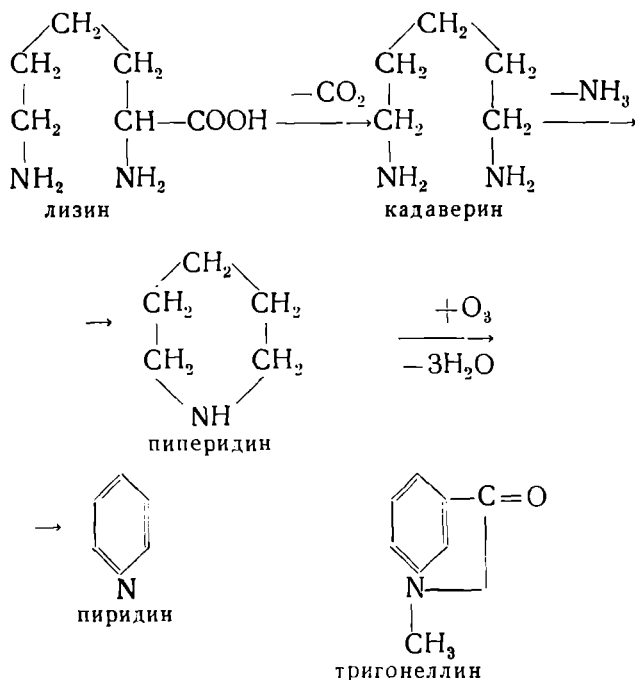
Соли алкалоидов растворимы в воде в отличие от собственно алкалоидов, которые в воде нерастворимы, но растворяются в органических растворителях — спирте, эфире, хлороформе и в слабых растворах кислот. В щелочах алкалоиды не растворяются, за исключением морфина, в молекуле которого имеется фенольный гидроксил. Алкалоиды обладают горьким вкусом. Многие алкалоиды являются оптически активными веществами и вращают плоскость поляризованного луча влево; в виде исключения встречаются правовращающие алкалоиды — цинхонин, а также рацематы — атропин.

Алкалоиды обнаруживаются только в растениях определенного рода и семейства. Например, растения семейства маковых, лютиковых, бобовых содержат большие количества алкалоидов, а в растениях семейства розоцветных алкалоиды совсем не найдены.

Физиологическая роль алкалоидов в жизни растения окончательно не выяснена. Их рассматривают и как продукты конечного обмена, и как запасные питательные вещества и как средства защиты растений. Работы, проведенные в последние годы, показали, что алкалоиды принимают определенное участие в обмене белковых веществ. Так, например, в прорастающих семенах табака образуется алкалоид никотин и одновременно уменьшается количество белка. При созревании семян, наоборот, наблюдается уменьшение количества никотина и накопление белков.

Материалом для образования многих алкалоидов могут служить продукты распада белковой молекулы. Например,

из аминокислоты лизина через промежуточный продукт кадаверин могут образоваться ядра пиридина и пиперидина:



Методом вакуумфильтрации доказано, что синтез пирролидиновых алкалоидов белладонны усиливается при введении в растение аминокислоты аргинина или продуктов его распада. Введение в табачное растение аминокислоты пролина повышает содержание в нем алкалоида никотина.

Алкалоиды, несмотря на большие различия в химическом строении, имеют ряд общих свойств. Например, они осаждаются некоторыми так называемыми алкалоидными реактивами, из числа которых наиболее часто применяются следующие: фосфорномолибденовая кислота, фосфорновольфрамовая кислота, танин (насыщенный водный раствор), пикриновая кислота (насыщенный водный раствор), раствор йода в йодистом калии (1% раствор), железистосинеродистый калий и др.

Для алкалоидов характерны цветные реакции с азотной кислотой и другими реактивами. Многие реакции осаждения и окрашивания обусловлены наличием гетероциклов в молекуле алкалоидов, поэтому алкалоидные реакции получаются с белками и некоторыми азотистыми гетероциклическими основаниями. При открытии алкалоидов для достоверности всегда необходимо производить несколько реакций.

Обнаружение алкалоидов в траве термопсиса

1. Реакция с раствором йода. При добавлении к водной вытяжке из травы термопсиса раствора йода в йодистом калии образуется осадок шоколадно-бурого цвета. Реакция обусловлена присутствием в траве термопсиса алкалоидов термопсина (неустановленного строения), цитизина (производного пиридина) и других, которые с раствором йода в йодистом калии образуют нерастворимые соединения.

Ход работы. Навеску в 0,2 г сухой травы термопсиса растирают в ступке до порошка, затем добавляют по каплям при растирании 5 мл воды и полученную жидкость фильтруют через складчатый бумажный фильтр. Прозрачный фильтрат используют для обнаружения алкалоидов. Для контроля готовят вытяжку из безалкалоидного растения, например из репчатого лука, пользуясь теми же приемами. Берут 3 пробирки. В первую пробирку наливают 10 капель вытяжки из травы термопсиса, во вторую — 10 капель вытяжки из лука, в третью — 10 капель воды. Во все пробирки добавляют по 2 капли 1% раствора йода в йодистом калии. В первой пробирке образуется осадок шоколадно-бурого цвета, в двух других пробирках осадка не образуется.

2. Реакция с танином. При добавлении к водной вытяжке из травы термопсиса насыщенного раствора танина образуется рыхлый осадок белого цвета. Реакция обусловлена наличием в траве термопсиса алкалоидов, которые дают с танином нерастворимые соли.

Ход работы. Берут 3 пробирки; в одну из них наливают 10 капель водной вытяжки из травы термопсиса, во вторую — 10 капель вытяжки из лука и в третью — 10 капель воды. Во все пробирки добавляют по 2 капли насыщенного раствора танина. В первой пробирке образуется осадок, в двух остальных — осадка не образуется. Результаты работы записывают в таблицу:

Название растения	Название алкалоида	Употребляемые реактивы	Наблюдаемые изменения

Выводы:

4. ОБМЕН МИНЕРАЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ В РАСТЕНИЯХ

Исследование химического состава растений показало, что, кроме азота, углерода, кислорода и водорода, они содержат много зольных элементов, а именно: калий, натрий, кальций, магний, кремний, фосфор, серу, хлор и др. Несмотря на то, что количество минеральных веществ незначительно (около 5%), роль, которую они играют в жизни растений, весьма велика. Одни минеральные вещества входят преимущественно в состав протоплазмы клеток (азот, кислород, водород), другие участвуют в построении ферментов (сера, фосфор, магний), третьи влияют на физико-химические свойства протоплазмы и поддерживают коллоидное состояние клеточных белков (натрий, калий, хлор и др.). При недостаточном поступлении из почвы зольных веществ наблюдается нарушение биохимических процессов в клетках растений, что отражается на внешнем виде растений.

Много усилий было приложено русскими исследователями Н. Н. Ивановым, Д. Н. Прянишниковым и др. для расшифровки роли отдельных элементов, особенно фосфора и азота, в жизни растений. Установлено, что азот поступает в растения из почвы в виде нитратных, нитритных и аммонийных ионов. Особенно хорошо используется растениями аммиак, который в корнях связывается с аспарагиновой кислотой и превращается в аспарагин. Аспарагин необходим растениям для синтеза белковых соединений.

В молекуле белка азот находится в восстановленном состоянии, т. е. в соединении с водородом, в то время как в почве основная масса азота находится в окисленном состоянии, т. е. в соединении с кислородом. Для восстановления азота требуется энергия, которую растения получают в процессе дыхания при окислении углеводов и других соединений. Недостаток азота в почве отражается на росте и внешнем виде растения. При обильном азотистом питании растения вырастают более крупными и имеют более зеленую окраску листьев.

В жизни растений очень важное значение имеет фосфор. Он входит в состав сложных белковых и липоидных соединений — нуклеопротеидов и фосфатидов. Основная масса фосфора в растениях находится в виде органических соединений, небольшая часть — в виде минеральных солей магния, кальция и калия.

Сера встречается в растениях в составе органических соединений в восстановленной форме в виде групп —SH и —S—S—. Восстановление серы (сернокислых солей) происходит в листьях. При недостатке серы в почве окраска растений становится бледной.

Калий, натрий и кальций находятся в растениях в виде солей органических и неорганических кислот. Соли калия оказывают влияние на синтез углеводов, белков и других веществ и способствуют оттоку образовавшихся в листе углеводов. При недостатке калия плохо развиваются опорные ткани и на растениях появляются бурые пятна.

Кальций составляет 75% золы растения; основная масса его находится в виде щавелевокислого кальция. Образование щавелевокислого кальция является защитной реакцией растения, так как ион кальция обезвреживает ядовитую щавелевую кислоту. Кальций в противоположность калию уплотняет протоплазму клеток. Откладывается кальций в более старых частях растения, обладающих пониженной жизнедеятельностью. Недостаток кальция отражается преимущественно на росте корневой системы.

Магний встречается в растениях главным образом в составе хлорофилла. Часть его находится в форме солей фосфорной кислоты, часть связана с лектиновыми веществами. Недостаток магния приводит к снижению роста растения и вызывает светлую пятнистость листьев.

Железо поступает в растение в окисленной форме; при недостатке его изменяется окраска листьев, так как железо участвует в синтезе зеленого пигмента растений — хлорофилла. Железо обладает способностью легко терять и приобретать электроны. Переходя из окисного в закисное и обратно, оно участвует в окислительно-восстановительных процессах в клетках растений. Железо участвует в построении геминных ферментов пероксидазы, каталазы и цитохромов.

Микроэлементы цинк, марганец, бор, алюминий и др. также играют важную роль в жизни растений. Установлено, что они способствуют синтезу витаминов и пигментов в растениях и влияют на обмен углеводов и белков. Для нормальной жизнедеятельности растения нужно правильное соотношение одно- и двухвалентных катионов. Так, например, в растворе хлористого натрия растение живет 15 минут, в растворе хлористого калия и хлористого натрия — 3 часа, в растворе хлористого кальция и хлористого натрия — 21 день, в растворе всех трех солей растение живет 40 суток.

В настоящее время при помощи метода меченых атомов удалось определить, в каких частях растения происходит наибольшее скопление того или иного элемента. Установлено, что в семенах содержится больше калия и фосфора, в листьях и стеблях — больше кальция. У низших растений минеральные вещества также играют важную роль в их жизнедеятельности. Питательная среда, на которой выращиваются микробы, должна содержать определенное количество минеральных солей. В золе, полученной от сжигания

микробных клеток, содержится больше всего фосфора. Второе место занимает калий, третье — натрий, четвертое — магний и последнее — кальций. Из анионов на первом месте стоит хлор, на втором — сера.

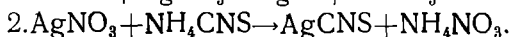
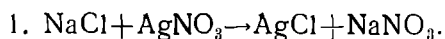
Основная масса фосфора микробных клеток находится в сложных белках — нуклеопротеидах, составляющих свыше 40—50% белков микробной клетки. Минеральные вещества в микробных клетках выполняют ту же роль, что и у высших растений. Они входят в состав протоплазмы, используются на построение ферментов и других биологически важных веществ и являются источниками энергии у анаэробов.

Работа № 134

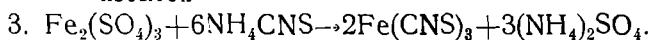
Количественное определение хлоридов в листьях лекарственных растений

Растительный материал разрушается марганцовокислым калием в кислом растворе в присутствии избытка азотнокислого серебра. Часть азотнокислого серебра связывается с хлором хлористых солей и с хлором, освободившимся при сжигании органических соединений.

Остаток азотнокислого серебра оттитровывают роданистым аммонием в присутствии индикатора — железо-аммиачных квасцов. Конец реакции определяют по появлению розовой окраски (роданистое железо). Разница между количеством добавленного азотнокислого серебра и количеством обратно оттитрованного соответствует количеству азотнокислого серебра, связавшегося с хлоридами растительного материала. Ход химических реакций может быть представлен в виде следующих уравнений:



избыток



красного цвета

Ход работы. Две навески по 0,1 г растительного материала (листьев солянки) помещают в 2 маленькие колбочки. Из микробюретки или пипетки вливают точно по 3 мл 0,01 н. раствора азотнокислого серебра, добавляют по 5 мл азотной кислоты, разведенной 1:1, и по 5 капель насыщенного раствора марганцовокислого калия. Обе колбочки ставят на асбестовую сетку и нагревают на слабом пламени горелки до кипения и кипятят 3—5 минут. Если жидкость обесцветится, вновь добавляют 5 капель перманганата и кипячение продолжают еще 3—5 минут. Так поступают до тех пор, пока раствор при дальнейшем нагревании не перестанет

обесцвечиваться или пока не выпадет бурый осадок перекиси марганца¹. Для обесцвечивания избытка перманганата и перекиси марганца добавляют глюкозу в порошок при помощи стеклянной лопаточки и продолжают нагревание. Жидкость постепенно обесцвечивается, так как происходит восстановление марганца за счет окисления глюкозы. На дне колбочки становятся заметными белые хлопья хлористого серебра. После обесцвечивания и охлаждения жидкости в обе колбочки добавляют по 3—4 капли раствора железо-аммиачных квасцов и избыток азотнокислого серебра титруют 0,01 н. раствором роданистого аммония до появления слабо-розового окрашивания, не исчезающего в течение 15—20 секунд. Результаты титрования заносят в таблицу и производят расчет.

Определение содержания хлора в листьях солянки

№ п/п	Навеска (в мг)	Добавлено мл 0,01 н. раствора AgNO ₃	Количество 0,01 н. раство- ра NH ₄ CNS, пошедшее на титрование (в мл)	Количество 0,01 н. раствора AgNO ₃ , связав- шегося с хло- ром (в мл)	Содержание хлора (в мг)	
					в пробе	в 100 г
1						
2						

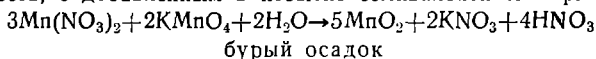
Выводы:

Примечание. 1 мл 0,01 н. раствора азотнокислого серебра или роданистого аммония эквивалентен 0,355 мг хлора.

Контрольные вопросы

1. Какие минеральные вещества служат источниками азота у растений для синтеза белковых веществ и каков путь их превращений?
2. В каких частях растения откладываются запасные белки?
3. В каких частях растения происходит наиболее интенсивный синтез белковых веществ?
4. Как осуществляется в растениях синтез аминокислот из кетокислот?
5. Каким аминокислотам принадлежит наиболее важная роль в процессах переаминирования?
6. Каково значение аспарагина и глутамина в обмене веществ у растений?
7. Какова роль аденозинтрифосфорной кислоты в синтезе белка из аминокислот?
8. При каких физиологических состояниях возрастает интенсивность действия протеолитических ферментов?
9. Что такое алкалоиды и каков путь их образования?

¹ Образование бурого осадка обусловлено взаимодействием двухвалентного марганца, образовавшегося в процессе окисления органических веществ, с добавленным в избытке семивалентным марганцем.



10. Как образуются в растениях пиридиновые, пиперидиновые, пирольные и пирролидиновые гетероциклы и какие аминокислоты служат источником их образования?

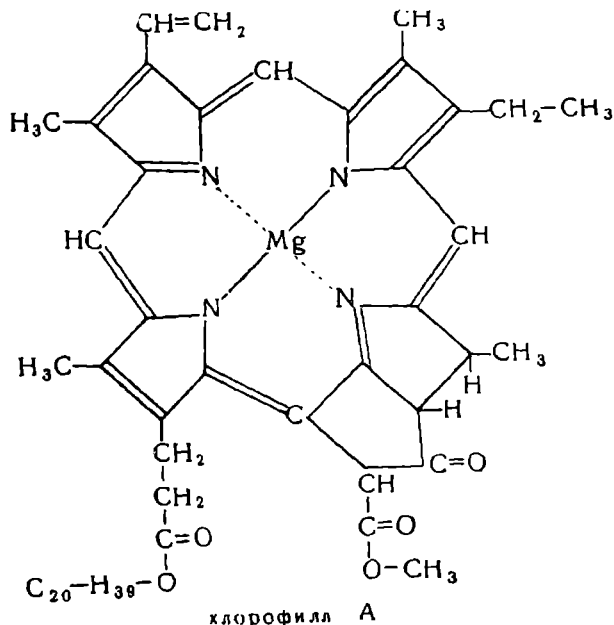
11. Какие химические реакции характерны для алкалоидов?

5. ПИГМЕНТЫ РАСТЕНИЙ

Хлорофилл и каротиноиды являются растительными пигментами, которые играют очень важную роль в процессе обмена веществ у растений.

ХЛОРОФИЛЛ

По химической природе¹ хлорофилл является производным порфина и по своему строению очень близок к красящему веществу крови — гемму. В отличие от гема в хлорофилле имеется магний, а не железо. М. С. Цвет с помощью хроматографического анализа установил, что зеленая окраска растений обусловлена наличием двух пигментов: 1) хлорофилла А (темно-сине-зеленый); 2) хлорофилла В (темно-оливково-зеленый). Хлорофилл В отличается по



химической структуре от хлорофилла А тем, что во втором пиррольном кольце вместо метильной группы содержится альдегидная группа.

¹ Изучением химической природы хлорофилла занимались М. В. Ненцкий, К. А. Тимирязев, М. С. Цвет, Р. Вильштеттер и Г. Фишер.

Экстрагирование хлорофилла из листьев крапивы в аппарате Сокслета

В аппарате Сокслета экстрагирование производится автоматически с небольшой затратой растворителя (эфир, спирт и др.). Аппарат состоит из трех шлифованных друг к другу частей: 1) колбы, 2) экстрактора, 3) холодильника (рис. 20).

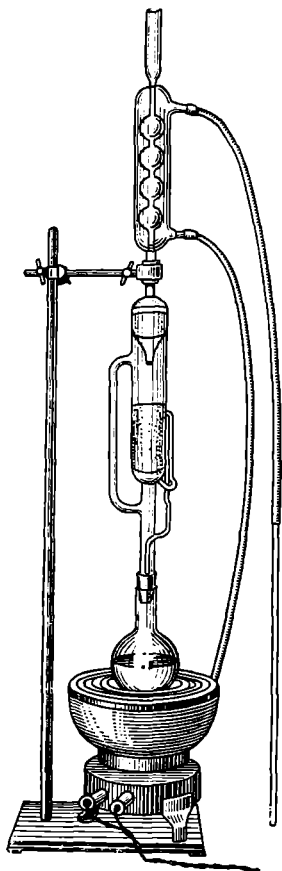


Рис. 20. Аппарат Сокслета.

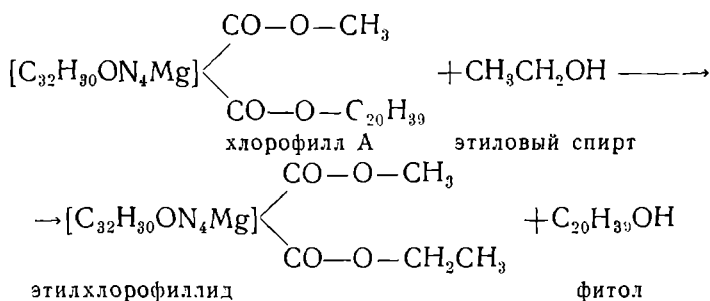
Ход работы. Навеску вещества вносят в гильзу, сделанную из обезжиренной фильтровальной бумаги, и закрывают обезжиренной ватой; гильзу помещают на дно экстрактора. Верхний край гильзы должен быть несколько выше изогнутой трубки экстрактора. Растворитель, например этиловый эфир, наливают в колбу до $\frac{3}{4}$ объема. Колбу присоединяют к нижнему шлифу экстрактора и укрепляют на штативе.

Верхний шлиф экстрактора присоединяют к холодильнику и пускают через него водопроводную воду. Когда прибор собран, колбу погружают в баню с горячей водой¹. Растворитель нагревается, закипает и пары его поднимаются по прямой трубке экстрактора в холодильник. Охлажденный эфир по каплям стекает из холодильника в экстрактор. Изогнутая трубка экстрактора служит сифоном, по которому растворитель с растворенными в нем веществами переливается из экстрактора в колбу каждый раз, когда уровень растворителя в экстракторе станет выше верхнего уровня жидкости в изогнутой трубке. Экстракцию продолжают до тех пор, пока переливающаяся из экстрактора жидкость не станет бесцветной. Экстракт в колбе имеет темно-зеленый цвет с интенсивно красной флуоресценцией.

¹ Температура воды в бане поддерживается на таком уровне, чтобы в 1 минуту из холодильника стекало около 60 капель эфира. В комнате, где работают с аппаратом Сокслета, следует избегать огня.

**Упрощенный способ экстрагирования пигментов
из листьев крапивы**

При настаивании листьев крапивы с горячим спиртом хлорофилл и другие пигменты с разной скоростью переходят в раствор. Хлорофилл при взаимодействии со спиртом превращается в этилхлорофиллид — сложный эфир, в котором остаток фитола замещен остатком этилового спирта.



Ход работы. 0,5 г сушеной крапивы измельчают в ступке, заливают 5 мл этилового спирта, переносят в пробирку и нагревают на кипящей бане. Когда спирт закипит, жидкость фильтруют через бумажный фильтр. Фильтрат зеленого цвета с интенсивно красной флуоресценцией содержит хлорофилл, хлорофиллид, ксантофилл и другие пигменты. Фильтрат используют для открытия в нем пигментов. Результаты работы фиксируют в таблице.

Качественные реакции на хлорофилл

Объект исследования	Употребляемые реактивы	Получаемое окрашивание или осадок	Чем обусловлена реакция

Работа № 137

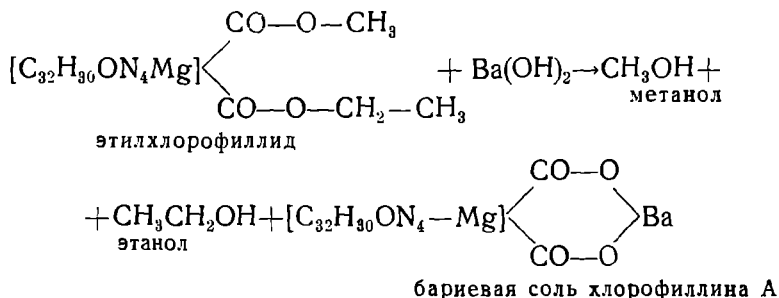
Разделение пигментов по Краусу

Ход работы. К 10 каплям полученного спиртового раствора хлорофилла прибавляют равный объем бензина и содержимое пробирки тщательно встряхивают, постукивая пальцем по дну пробирки.

Зеленые пигменты — хлорофиллы и хлорофиллиды — переходят в верхний бензиновый слой, а в нижнем слое остается желтый пигмент — ксантофилл. Если разделение слоев сразу не происходит, добавляют 1—2 капли воды и содержимое пробирки вновь встряхивают.

Осаждение хлорофилла баритовой водой

При добавлении баритовой воды к спиртовому раствору хлорофилла¹ выпадает осадок, окрашенный в зеленый цвет. Реакция обусловлена омылением эфирных групп хлорофилла баритовой щелочью и образованием нерастворимой бариевой соли хлорофиллинов А и Б. Жидкость над осадком имеет желтую окраску вследствие присутствия в вытяжке каротина и ксантофилла.



Ход работы. К 10 каплям спиртового раствора хлорофилла добавляют 20 капель баритовой воды и тщательно взбалтывают. При стоянии выпадает небольшой осадок бариевой соли хлорофиллина — зеленого цвета.

Работа № 139

Восстановление хлорофилла аскорбиновой кислотой

При нагревании спиртового раствора хлорофилла с аскорбиновой кислотой зеленая окраска жидкости переходит в желтую. Реакция обусловлена окислением аскорбиновой кислоты и образованием восстановленного хлорофилла, имеющего желтый цвет.

Ход работы. К 10 каплям спиртового раствора хлорофилла добавляют 2 капли воды и несколько кристалликов аскорбиновой кислоты. При нагревании в водяной бане (до 70—80°) жидкость приобретает желтую окраску.

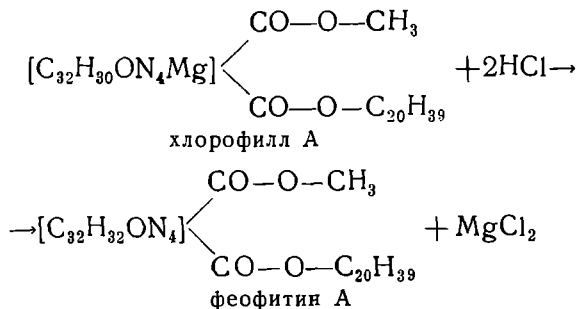
Работа № 140

Получение феофитина из хлорофилла

Если к спиртовому раствору хлорофилла прибавить 2—3 капли соляной кислоты, зеленая жидкость принимает оливково-бурое окрашивание. Реакция обусловлена обра-

¹ Правильнее — к спиртовой вытяжке из сушеных листьев крапивы.

зованием порфирина феофитина вследствие отщепления от молекулы хлорофилла атома магния.



Ход работы. К 5 каплям спиртового раствора хлорофилла прибавляют 1 каплю 10% раствора соляной кислоты. Образуется феофитин и жидкость окрашивается в оливково-бурый цвет.

Работа № 141

Получение вытяжки из шиповника и открытие в ней каротина

Мякоть шиповника в количестве 50 мг растирают в ступке со стеклянным песком, переносят в чистую сухую пробирку, добавляют 5—10 капель хлороформа и встряхивают. Каротин переходит в хлороформный раствор. Три капли полученной вытяжки переносят в чистую сухую пробирку, по стенке добавляют 5 капель концентрированной серной кислоты и осторожно встряхивают. В присутствии каротина верхний хлороформный слой жидкости окрашивается вначале в зеленоватый, а затем в синий цвет.

Работа № 142

Количественное определение каротина в календуле (или шиповнике) методом хроматографии и колориметрии

Принцип хроматографического метода М. С. Цвета заключается в том, что сложная смесь различных окрашенных веществ пропускается через вертикально поставленную трубку, наполненную адсорбентом.

В качестве адсорбента употребляют гидроокись алюминия, углекислый кальций, углекислый магний, тальк, крахмал, сахарную пудру и многие другие вещества. Каждое вещество обладает свойственной ему способностью адсорбироваться и концентрируется в строго определенном слое адсорбента. Вещества, не адсорбируемые данным ад-

сорбентом, проходят сквозь колонку и таким путем освобождаются от адсорбируемых веществ. В адсорбционной колонке получается несколько полос, окрашенных в разные

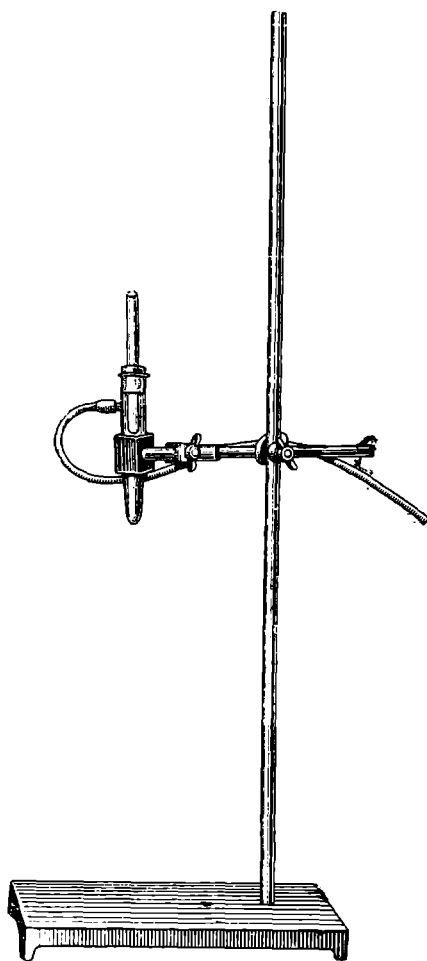


Рис. 21. Отсасывательная мерная пробирка с адсорбционной трубкой.

7—10 мм вставляют ватную подушку толщиной около 1 см. Вата препятствует прохождению адсорбента в приемник. В трубку маленькими порциями вносят окись магния MgO^2 , каждый раз слегка уплотняя ее стеклянной или деревянной

цвета. Пигменты, разделенные на хроматографической колонке, послойно извлекают соответствующими растворителями (элюируют). Количественное определение пигментов, содержащихся в каждой элюированной фракции и в фильтрате, производят колориметрическим методом. Хроматографический адсорбционный анализ в настоящее время широко применяют для разделения самых разнообразных веществ, в том числе и не обладающих окраской. Благодаря этому методу можно разделить и получить в чистом виде многие витамины, аминокислоты, пептиды, ферменты, минеральные вещества и др.

Ход работы. 100 мг лепестков календулы или ягод шиповника растирают в ступке со щепоткой стеклянного порошка. Для обезвоживания материала в ступку всыпают равное по весу количество безводного сернокислого натрия¹ (Na_2SO_4) и растирание продолжают до превращения смеси в сухой тонкий порошок. Смесь оставляют в темном месте на 20—30 минут и за это время подготавливают адсорбционную трубку. На дно адсорбционной трубки (рис. 21) длиной 12—15 см, диаметром

¹ Na_2SO_4 связывает 12 молекул кристаллизационной воды.

² MgO прокаливают в течение 30 минут при 105° .

палочкой¹. На слой адсорбента кладут снова слой ваты. В пробирку наливают бензин для смачивания адсорбента. К сухому порошку в ступке добавляют 1—2 мл бензина, растирают и бензиновую вытяжку пипеткой переносят в адсорбционную колонку, поставленную в отсасывательную пробирку (желательно мерную). Порошок заливают новой порцией бензина, снова растирают и переносят в адсорбционную трубку тогда, когда над адсорбентом еще остается слой предыдущей порции вытяжки. Извлечение продолжают до тех пор, пока проходящая через колонку жидкость не станет бесцветной². Измеряют объем полученного бензинового раствора, который затем используют для колориметрического определения каротина. В качестве стандартного раствора употребляют трижды перекристаллизованный бихромат калия $K_2Cr_2O_7$ в концентрации 300 мг в 1 л дистиллированной воды. 1 мл стандартного раствора по окраске соответствует 0,00208 мг α -каротина. Результаты анализа фиксируют в таблице.

Количественное определение каротина

Количество вещества, взятое для анализа (в мг)	Количество полученного бензинового раствора (в мл)	Показания шкалы колориметра		Количество каротина (в мг)			
		стандартный	исследуемый (все 5 показаний)	в 1 мл стандарта	в 1 мл исследуемого раствора	в 100 мг вещества	в 100 г вещества

Выводы:

6. АНТИБИОТИКИ НИЗШИХ РАСТЕНИЙ

Антибиотиками называются вещества, вырабатываемые микроорганизмами различного вида (бактериями, дрожжами, плесенями, актиномицетами), обладающие антибактериальным действием. Антибиотики высших растений получили название фитонцидов. Известны антибиотики и животного происхождения (лизозим и др.).

Идея использования антагонизма (антибиоза) между микробами для уничтожения болезнетворных бактерий принадлежит И. И. Мечникову. Он впервые обнаружил гибель гнилостных микробов при развитии в среде молочнокислой палочки и рекомендовал употребление в пищу простокваши

¹ Длина столбика MgO может колебаться от 4 до 7 см в зависимости от объема исследуемого раствора и от состава адсорбируемых пигментов.

² Первые порции фильтрата окрашены в желтый цвет. Колонка окрашена в оранжевый цвет.

(лактобациллина) для подавления вредной гнилостной флоры кишечника. Позднее (1871) русский ученый В. А. Манассеин установил, что зеленая плесень *Penicillium* при своем росте уничтожает бактерии, попадающие в культуральную среду. Практическое применение зеленой плесени *Penicillium* для лечения гнойных ран и язв впервые было осуществлено врачом-дерматологом А. Г. Полотебновым (1871). Много лет спустя (1940) английский ученый Флеминг выделил из культуральной жидкости плесневого грибка особое вещество, которое подавляло рост стафилококков и стрептококков, и назвал его пенициллином.

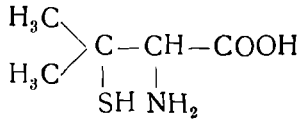
В настоящее время известно около 200 природных соединений, являющихся антибиотиками. По химической структуре они принадлежат к различным классам органических соединений. Многие из числа выделенных и изученных антибиотиков обладают сильным токсическим действием по отношению к макроорганизму и не могут быть использованы в медицинской практике. Наиболее широкое применение в качестве лекарственных препаратов получили только те антибиотики, которые наряду с отсутствием токсического действия обладают высокой специфической активностью против возбудителей инфекционных болезней, а именно: пенициллин, стрептомицин, грамицидин, хлоромидетин, ауреомицин, тетрацилин и др.¹

Механизм действия антибиотиков различен. Они либо препятствуют развитию микробов (бактериостатическое действие), либо вызывают их гибель (бактерицидное действие) или растворение (бактериолитическое действие). Некоторые антибиотики создают такие условия среды, в которых образуются нежизнеспособные дегенеративные формы микробов. Влияние антибиотиков на обмен веществ микробной клетки изучено недостаточно. Они избирательно поражают отдельные ферментативные системы и таким образом нарушают нормальный обмен веществ у микроорганизмов. Известно, например, что пенициллин подавляет обмен глютаминовой кислоты в клетках грамположительных бактерий и препятствует усвоению необходимых аминокислот из питательной среды. Тетрацилин оказывает задерживающее влияние на процессы фосфорилирования. Мало изучено влияние отдельных антибиотиков на макроорганизм. Установлено, что некоторые антибиотики оказывают благоприятное влияние. Так, например, ауреомицин в сочетании с кобаламином способствует росту и развитию птиц и свиней и получил поэтому широкое применение в сельскохозяйственной практике.

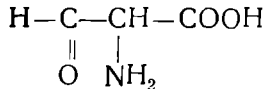
¹ В настоящее время применяются также альбомидин, экмолин, биомидин, бацитрин, микроцид и другие антибиотики. Число их все время возрастает.

ПЕНИЦИЛЛИН

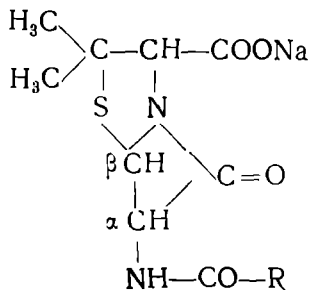
Пенициллины, вырабатываемые разными видами плесеней, неоднородны по химической природе, физическим свойствам и обладают неодинаковым антибактериальным и терапевтическим действием. Все пенициллины представляют собой дипептиды, построенные из диметилцистеина и



ацетилсерина, у которого спиртовая группа серина окислена в альдегидную.



По химическим свойствам пенициллины являются кислотами и получают из плесневых культур в виде натриевых или кальциевых солей. Строение основного ядра пенициллина может быть представлено следующей формулой:



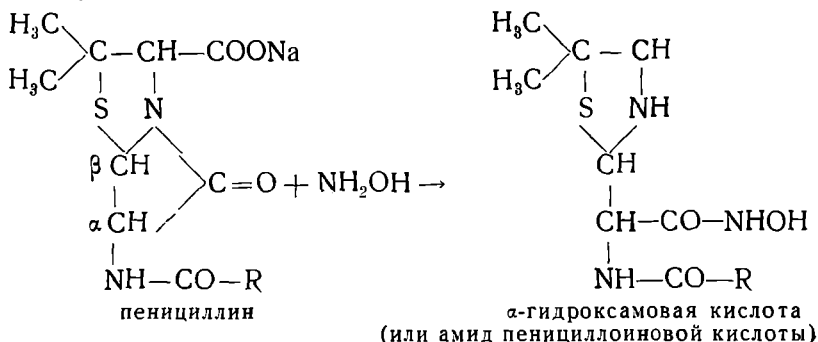
Пенициллины отличаются разными группировками R, соединенными с аминогруппой серина. У наиболее активных пенициллинов, применяемых в медицинской практике, боковой группировкой является фенилуксусная кислота или параоксифенилуксусная кислота. Получение пенициллинов такой химической структуры достигается добавлением фенилуксусной кислоты к культуральной среде.

Работа № 143

Открытие пенициллина реакцией с гидроксиламином

Если смесь растворов пенициллина и гидроксиламина нагреть до кипения и к продукту реакции после охлаждения добавить раствор хлорного железа, то жидкость приобретает красное окрашивание.

Реакция обусловлена раскрытием лактамного кольца пенициллина с образованием α -гидроксамовой кислоты (амид пенициллоиновой кислоты), которая с хлорным железом образует продукт конденсации красного цвета.



Ход работы. К 5 каплям 0,5% водного раствора продажного пенициллина добавляют 2 капли 5% раствора гидроксиламина и смесь нагревают до кипения. После охлаждения прибавляют 1 каплю 5% раствора хлорного железа. Жидкость приобретает розовую или красную окраску.

Работа № 144

Нитропруссидная реакция на пенициллин

При добавлении нитропрусида натрия к раствору пенициллина, предварительно прокипяченного со щелочью, жидкость приобретает красное окрашивание, быстро исчезающее. Реакция обусловлена освобождением при щелочном гидролизе сульфгидрильных групп пенициллина и образованием нестойкого соединения с нитропруссидом натрия.

Ход работы. К 2 каплям 0,5% раствора пенициллина добавляют 2 капли концентрированного раствора едкого натра и кипятят 1—2 минуты. По охлаждении добавляют по каплям 5% раствор нитропрусида натрия. Появляется красное окрашивание, переходящее в оранжевое и желтое.

ГРАМИЦИДИН С

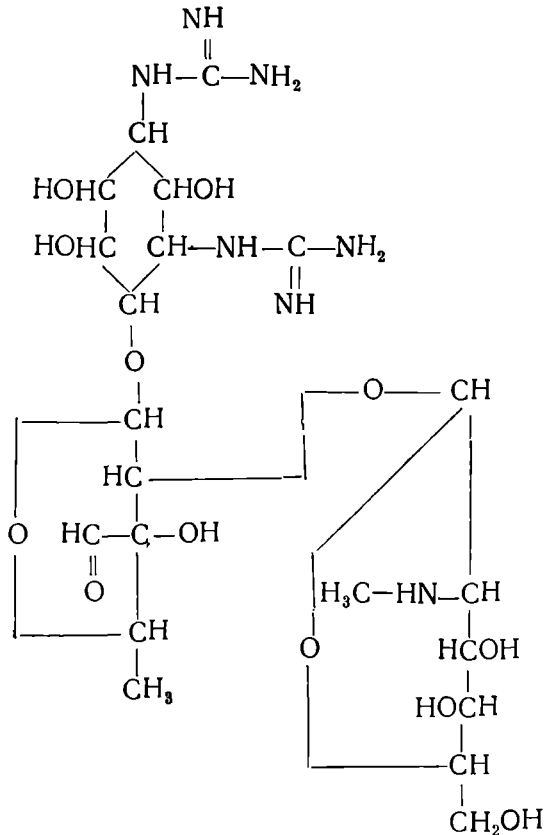
Грамицидин С выделен Т. Ф. Гаузе и М. Г. Бражниковой в 1942 г. из штамма споровой палочки *Bacillus brevis*, найденного в огородных почвах Подмосковья. Изучением химической природы грамицидина занимались А. Н. Белозерский и Т. С. Пасхина. Они установили, что грамицидин построен из пяти различных аминокислот: l-пролина, l-валина, l-орнитина, l-лейцина и d-фенилаланина, соединенных

Биуретовая реакция на грамицидин

Ход работы. К 2 каплям раствора грамицидина прибавляют 2 капли 10% раствора едкого натра и 1 каплю 0,1% раствора медного купороса. Жидкость приобретает фиолетовое окрашивание.

СТРЕПТОМИЦИН

Стрептомицин является продуктом жизнедеятельности лучистого грибка актиномицета¹. При изучении антибиотических свойств актиномицетов установлено, что культуральная жидкость, на которой растут актиномицеты, способна подавлять рост многих микроорганизмов и в том числе туберкулезной палочки.



стрептомицин

¹ Streptomyces griseus открыт А. В. Краинским (1914).

Химическое строение стрептомицина довольно сложное, молекула его состоит из двух компонентов: азотистого основания — стрептидина и дисахарида стрептобиозамина, представляющего собой соединение метилглюкозамина с пентозой. Оба структурных элемента стрептомицина связаны между собой гликозидной связью. Стрептомицин является основанием и с кислотами образует соли, хорошо растворимые в воде и нерастворимые в органических растворителях; разрушается сильными кислотами и щелочами.

Стрептомицин более токсичен, чем пенициллин. Он влияет на центральную нервную систему, вызывает ухудшение слуха и др.

Актиномицет *Streptomyces griseus* образует и другие антибиотики (актидин, гризеин и др.), а также продуцирует кобаламин. При добавлении к культуральной среде хлористого кобальта продукция кобаламина сильно возрастает.

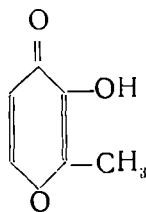
Антибиотики и витамины являются антагонистами по биологическому действию и в то же время находятся в глубокой взаимосвязи.

Для стрептомицина характерны некоторые цветные реакции.

Работа № 147

Мальтольная реакция на стрептомицин

Мальтольная реакция основана на способности стрептомицина гидролизоваться щелочью с образованием мальтола, дающего характерное окрашивание с ионами трехвалентного железа.



мальтол
 α -метил- β -окси-пирон

Реакция специфична для стрептомицина и получила применение при колориметрических анализах.

Ход работы. К 3 каплям 1% водного раствора стрептомицина добавляют 1 каплю 10% раствора NaOH и смесь кипятят на огне 5—10 секунд. Пожелтевшую и слегка мутную жидкость нейтрализуют 2 каплями 10% раствора HCl. Нейтральная жидкость становится прозрачной и бесцветной. К жидкости добавляют 1—2 капли 1% раствора FeCl₃. Появляется красно-фиолетовое окрашивание.

Реакция Сакагучи на гуанидиновую группировку стрептомицина

Ход работы. К 3 каплям 1% водного раствора стрептомицина добавляют 3 капли 10% раствора NaOH, 3 капли 0,1% спиртового раствора α -нафтола и 3—9 капель 2% свежеприготовленного раствора гипобромита натрия. Жидкость, содержащая стрептомицин, окрашивается в красный или розово-красный цвет (см. стр. 12).

Контрольные вопросы

1. Какова химическая природа хлорофилла и его роль в растениях?
 2. Какова химическая природа α -, β - и γ -каротина?
 3. Каково биологическое значение каротина для растений?
 4. Что такое антибиотики и каково их биологическое значение?
 5. Пенициллин, его химическая природа и механизм действия.
 6. Грамицидин, его химическая природа и механизм действия.
 7. Стрептомицин, его химическая природа и механизм действия.
 8. Какова химическая природа ауреомицина, тетрациклина и механизма их действия?
 9. Какие вещества называются фитонцидами? Их биологическое значение.
-

ПОСОБИЕ ДЛЯ ЛАБОРАНТОВ ПО ПОДГОТОВКЕ ПРАКТИЧЕСКИХ ЗАНЯТИЙ ПО БИОХИМИИ

С целью сокращения времени на подготовку реактивов и оборудования, необходимых для проведения практических занятий по биохимии, к практикуму прилагаются в качестве пособия следующие дополнения:

1. Описание лабораторного ящика и других видов лабораторного оборудования.
2. Описание установок для буферных и титрованных растворов.
3. Чертеж лабораторного ящика.
4. Схема расположения материалов для исследования и реактивов в лабораторном ящике.
5. Списки реактивов, оборудования и материалов исследования, необходимых для проведения каждого занятия. Они облегчают ежедневную подготовку и проверку наличия достаточного количества указанных реактивов и оборудования на рабочем месте студента. В списке указаны минимальные количества реактивов, необходимые для выполнения 100 определений. Целесообразно при приготовлении реактивов на 100 человек указанные количества реактивов удвоить или утроить.
6. Руководство по приготовлению материалов для исследования, реактивов, титрованных и буферных растворов.

ЛАБОРАТОРНЫЙ ЯЩИК

Лабораторный ящик (рис. 22 и 23) состоит из 6 полок с гнездами для склянок и небольшого выдвижного ящичка, расположенного под нижней полкой (для мерных пипеток, палочек и других предметов оборудования). Первая, третья и пятая полки имеют по 11 гнезд, вторая, четвертая и шестая — по 12 гнезд. Гнезда на полках размещены в шахматном порядке. Все гнезда и склянки пронумерованы, т. е. каждая склянка имеет свое определенное гнездо.

На первой, верхней, полке от 1-го до 11-го номера помещаются материалы исследования (белок, витамины, гормоны, кровь и т. д.), а также некоторые реактивы, употребляемые для количественных микроопределений (стандартные растворы, реактив Фолина и др.). На второй и третьей полках от 12-го до 34-го номера расположены органические реактивы; на четвертой и пятой полке от 35-го до 57-го номера — соли и простые вещества. На шестой, нижней, полке от 58-го до 69-го номера помещаются минеральные кислоты и щелочи. Внутри каждой группы реактивы расположены по алфавиту.

Так как для выполнения всех практических занятий требуется значительно больше реактивов, чем имеется гнезд в ящике, то по мере необходимости одни реактивы заменяют другими без нарушения алфавита в их расположении. Набор склянок с этикетками и пипетками, подготовленными для замены одних реактивов другими, находится в специальных фанерных ящиках с крышками, имеющих такие размеры: длина 26 см, ширина 9 см, высота 11 см. Количество склянок в каждом фанерном ящике соответствует количеству лабораторных ящиков в лаборатории.

В списке реактивов и материалов для исследования указан порядковый номер каждого реактива в лабораторном ящике. Всего в лаборатории должно быть 100 фанерных ящиков, из них для материалов

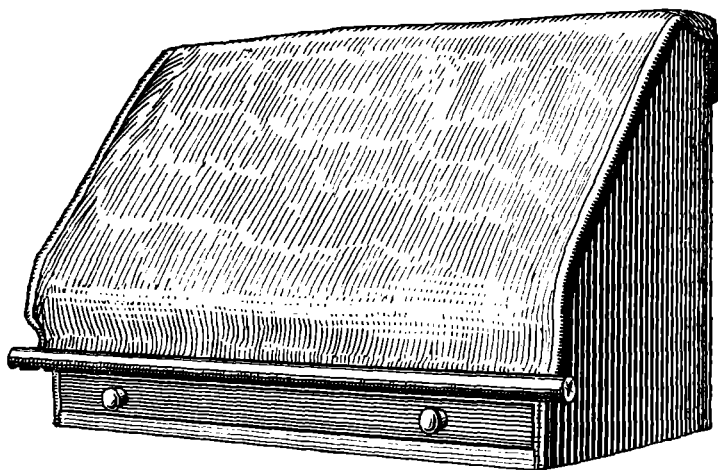
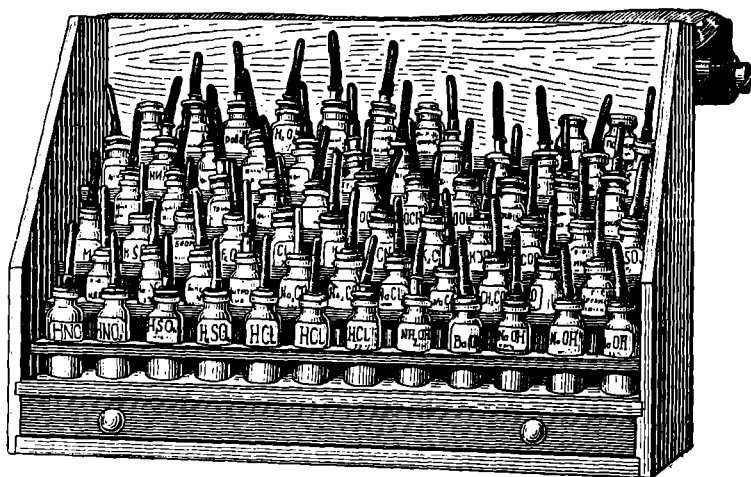


Рис. 22. Лабораторный ящик.

исследования — 45, для органических реактивов — 30, для солей и простых веществ — 25. Общее количество склянок с пробками и пипетками или с пробками и лопаточками в 25 лабораторных ящиках составляет 1725.

Для оборудования лабораторных ящиков целесообразно воспользоваться склянками от пенициллина или стрептомицина емкостью 18—20 мл, имеющими резиновые пробки. В среднюю просверленную часть пробки вставляют обычную глазную пипетку или стеклянную лопаточку. Общее количество глазных пипеток, необходимых для всех

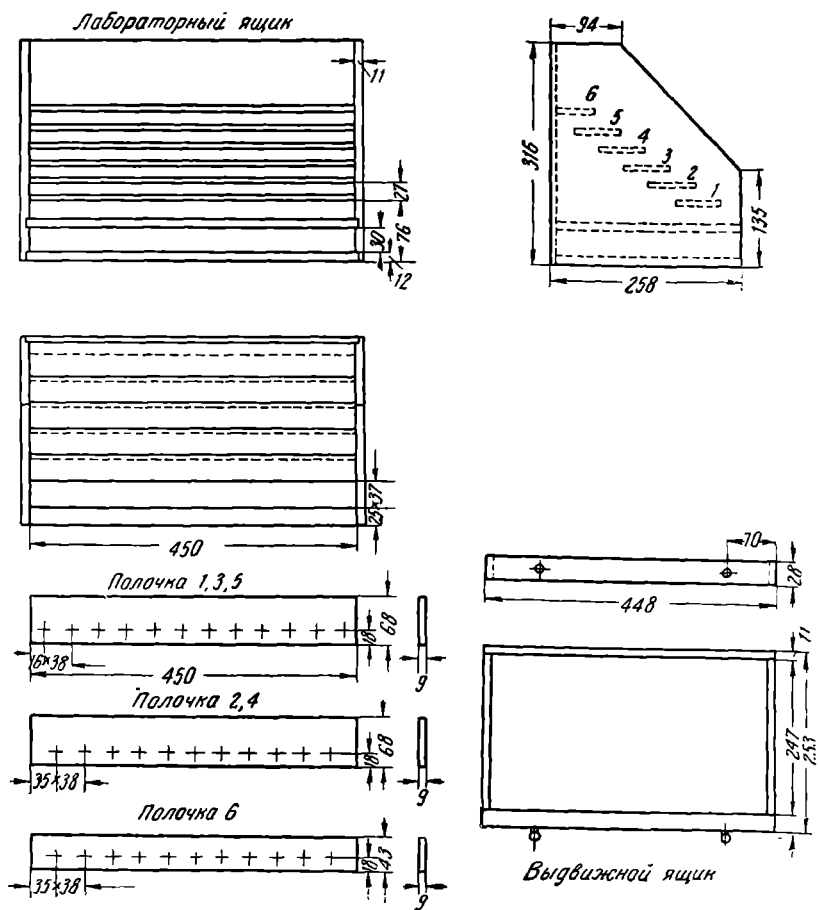


Рис. 23. Чертеж лабораторного ящика.

реактивов, составляет около 4000 штук, стеклянных лопаточек — около 400 штук. В лаборатории должен быть шкаф с набором склянок емкостью 100—200 мл для всех употребляемых реактивов, из них для органических веществ 60—65 склянок, для солей и простых веществ 50—55 склянок, для кислот и щелочей 15—20 склянок, для материалов исследования 45—50 склянок. Наличие такого запаса реактивов дает возможность без задержки пополнять любую склянку в лабораторном ящике по мере расходования соответствующего реактива. Кроме того, в эти склянки сливают реактивы из склянок лабораторного ящика при замене их другими.

Некоторые реактивы, употребляемые в больших количествах (например, бромноватистая щелочь для определения мочевины по Бородину, 2% раствор соляной кислоты для получения вытяжек, содержащих

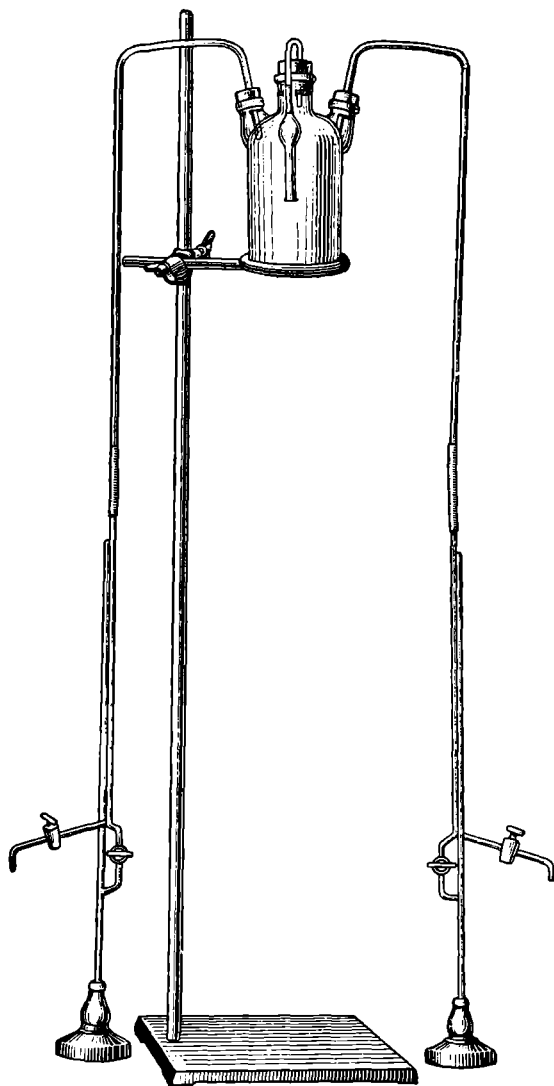


Рис. 24. Микробюретка с трехгорлой склянкой.

аскорбиновую кислоту и др.), заготавливают в склянках емкостью 100—200 мл и ставят на лабораторную полку на каждом рабочем месте. В списке реактивов имеются соответствующие указания. Общее количество склянок емкостью 100—200 мл для указанных выше реактивов составляет 200—400 штук.

УСТАНОВКА ДЛЯ БУФЕРНЫХ И ТИТРОВАННЫХ РАСТВОРОВ

Буферные и титрованные растворы разливают в двухгорлые или трехгорлые склянки.

Трехгорлые склянки монтируются с двумя микробюретками и служат для установки на двухстороннем Двухгорлые или одногорлые склянки с тубусом (рис. 25) монтируются с одной микробюреткой и служат для оборудования односторонних лабораторных столов.

Горлышки склянок закрывают пробками с отверстиями, в которые вставляются изогнутые стеклянные трубки (сифоны), соединяющие склянки с микробюретками (см. рис. 24 и 25). Одно из горлышек склянки закрывают пробкой с хлоркальциевой трубкой, заполненной натронной известью. Изогнутую стеклянную трубку одним концом при помощи каучуковой трубки присоединяют к микробюретке, укрепленной на штативе, другой конец проходит через пробку в горлышке склянки и опускается до дна склянки. Краны в микробюретке смазывают специальной смазкой. Обильного смазывания кранов следует избегать, так как комки смазки могут закупорить кран и загрязнить микробюретку. Слой смазки на кране должен быть очень тонким (смазка придает блеск матовой части крана). После смазки муфта с краном становятся совершенно прозрачными.

Реактив наливают и подливают в склянку через горлышко, закрытое пробкой с хлоркальциевой трубкой.

Для заполнения микробюретки первый раз осторожно надевают каучуковую трубку на градуированную часть микробюретки, открывают кран на неградуированной трубке и засасывают жидкость ртом через каучуковую трубку до тех пор, пока жидкость не дойдет до крана. Краном регулируют заполнение микробюретки и после заполнения снимают каучуковую трубку с ее градуированной части.

Первые порции раствора выпускают (этим достигается удаление пузырьков воздуха) и микробюретку заполняют вновь. При повторном смазывании кранов на каучуковую трубку, соединяющую микробюретку с изогнутой стеклянной трубкой, надевают винтовой зажим и выпускают жидкость из микробюретки. Кран и муфты кранов насухо протирают фильтровальной бумагой и после этого смазывают.

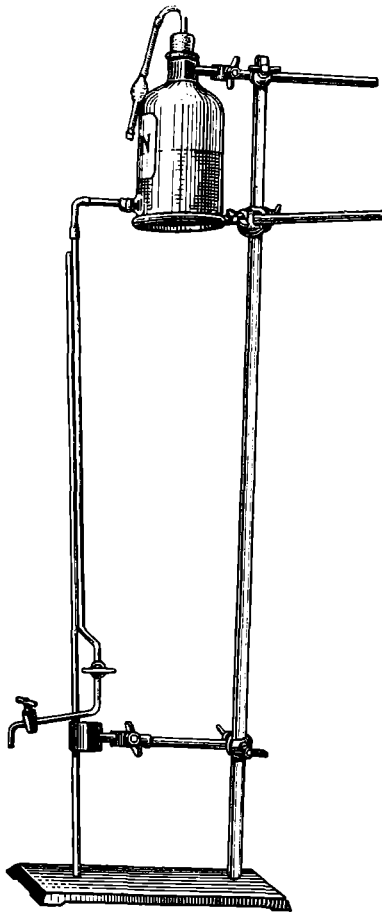


Рис. 25. Микробюретка с одногорлой склянкой с тубусом.

СХЕМА РАСПОЛОЖЕНИЯ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ

Первая полка

№ за- ятия	Название темы		2	3	4	
1	Химическая природа белка	Белок пше- ничный, 1% рас- твор	Белок яич- ный, 1% раствор	Желатин, 1% рас- твор	Раствор смеси амино- кислот для хрома- тогра- фии	
2	Физико-хи- мические свойства белка	Белок яич- ный, не- разведен- ный	Белок яич- ный, 1% раствор	Желатин, 1% рас- твор	Мука пше- ничная	
3	Сложные белки	Дрожжи свежие или сухие	Кровь окса- латная	Кровь окса- латная в разведе- нии 1:500	Молоко цель- ное	
4	Витамины	Викасол, 50 мг% раствор	Метинон, 0,25% спиртовой раствор	Никотино- вая кисло- та в по- рошке	Пири- доксин, 5% рас- твор	Рибофла- вин, 25 мг% раствор
5	Гормоны	Адреналин 1:1000 (для ка- чествен- ных ре- акций)	Инсулин	Фоллику- лин, спир- товой раствор	Щито- видная железа в по- рошке	
6	Ферменты гидроли- тические	Дрожжи свежие				
7	Ферменты окисли- тельно- восстано- витель- ные	Вытяжка из хрена	Кровь окса- латная	Молоко све- жее		
8	Обмен жи- ров и ли- пидов	Белок яич- ный, 1% раствор	Вытяжка из поджелу- дочной железы	Желток яичный в порошке или све- жий	Желчь в разве- дении 1:2	Масло под- сол- нечное

ИССЛЕДОВАНИЯ И РЕАКТИВОВ В ЛАБОРАТОРНОМ ЯЩИКЕ
(верхняя)

6	7	8	9	10	11
				Лакмус си- ний (бу- мажки)	Лакмус крас- ный (бу- мажки)
			Танин, 0,1% раствор	То же	То же
				» »	
Рыбий жир	Тиамин в порошке	Токоферол, 0,1% раствор		»	» »
	Адреналин, стандарт- ный 4 мг% раствор		Фолина реактив	» »	» »
				» »	»
Перекись водорода, 3% нейт- рализован- ный раствор		Фосфатный буфер рН=6,8	Янтарная кислота, 0,01 н. рас- твор нейтрали- зованный	» »	»
Молоко прокипя- ченное и разведен- ное 1:1	Мыло, 1% раствор	Моча с 0,5% содержа- нием аце- тона	Моча с 0,5% содержа- нием аце- тоуксус- ной кис- лоты	Холестерин, 1% рас- твор в хлорофор- ме	» »

№ за- дания	Название темы	1		3	4	5
9	Обмен углеводо- в	Крахмал 0,5 % раствор				
10	Регуляция углевод- ного об- мена	Моча с 0,5% содержа- нием глю- козы				
11	Перевари- вание белков	Вытяжка из поджелу- дочной железы (трипсин)	Желудоч- ный сок активный	Желудоч- ный сок с молочной кислотой	Желу- дочный сок для титро- вания	Молоко свежее
12	Обмен бел- ковых ве- ществ	Моча				
13	Обмен ми- нераль- ных ве- ществ	Моча				
14	Кровь	Кровь окса- латная	Сыворотка крови			
15	Мозг и мышечная ткань	Мозг в по- рошке				

6	7	8	9	10	11
Медь серноокислая, полунасыщенный раствор	Уксусная кислота, 3% раствор	Фосфатный буфер рН=8,0	Метафосфорная кислота, 5% раствор	Лакмус синий (бумажки)	Лакмус красный (бумажки)
	Уксусная кислота, 3% раствор			То же	То же
Фибрин	Фибрин окрашенный		Конго (бумажки)	» »	»
			Калий двухромовокислый стандартный 0,5 н. раствор	»	» »
				» »	» »
	Аммоний молибденовокислый, 5% раствор в серной кислоте (молибденовый реактив)	Содовосернистый раствор	Калий фосфорнокислый однозамещенный, стандартный раствор (1 мл=0,01 мг фосфора)	» »	»
Йод, 0,1 н. раствор	Аммоний молибденовокислый, 2,5% раствор в серной кислоте (молибденовый реактив)	Натрий сернистокислый (бисульфит натрия), 0,1 н. раствор	Калий фосфорнокислый однозамещенный, стандартный раствор (1 мл=0,01 мг фосфора)	» »	»

№ за- дания	Название темы	1	2	3	4	5
16	Обмен угле- водов и жиров в растени- ях	Алоэ в по- рошке	Бадан, све- жие листья измель- ченные	Дрожжи свежие	Лук реп- чатый измель- ченный	Морковь измель- ченная
17	Обмен азо- тистых и мине- ральных веществ в растениях	Дрожжи су- хие	Лук репча- тый из- мельчен- ный	Мука пше- ничная	Термоп- сис в порош- ке	Солянка в по- рошке
18	Пигменты растений и анти- биотики	Грамини- дин	Крапива сухая	Пеницил- лин, 0,5% раствор	Стрепто- мицин, 1% рас- твор	Шипов- ника ягоды или ка- ленду- ла

Органические
вторая полка (в скобках)

12	13	14	15	16	17
Ацетон (2,8,15)	Анилин (4)	Анилино- вый реак- тив (4)	Бензидин, 0,2% спир- товой рас- твор (3)	Гваяковая смола, 1% раствор (3, 7, 15)	Дихлорфе- нолиндо- фенол, 0,01% рас- твор (4)
	Адреналин, 0,1% рас- твор (7)	Вазелино- вое масло (7,9)	Вератрол, 0,2% спир- товой рас- твор (9)	Гидроксил- амин, 5% раствор (18)	Диметилпа- рафенил- лендиа- мин, 1% раствор (7)
	Аскорбино- вая кис- лота, 0,5% раствор (15)	Гидрохи- нон, 1% раствор (14)	Глюкоза в порошке (14, 17)		Диметил- аминоазо- бензол, 0,5% спир- товой рас- твор (11)
	Аскорбино- вая кис- лота в порошке (18)	Бензин (18)			Дифенил- амин, 2% раствор в серной кислоте (17)

6	7	8	9	10	11
Масло под-солнечное свежее	Масло под-солнечное несвежее	Мука соевая	Толокнянка в порошке	Лакмус синий (бумажки)	Лакмус красный (бумажки)
	Азотная кислота в разведении 1:1	Уксусная кислота, 0,2% раствор	Формоловая смесь	То же	То же
			Калий двухромовокислый, стандартный раствор	» »	» »

реактивы*указаны номера занятий)*

18	19	20	21	22	23
Дифенил-аминовый реактив (3)	Нингидрин, 0,1% раствор (1)	Метиленовая синь, 0,01% раствор (4)	α -нафтол, 0,1% спиртовой раствор (1, 15, 18)	Пикриновая кислота, 10% раствор (1, 2, 12, 15, 18)	Сахароза, 10% раствор (1)
Крахмал, 1% раствор (5, 9, 10)	Метиленовая синь, 0,05% раствор с формальдегидом (7)	Метиленовая синь, 0,05% раствор (7)	α -нафтол, 1% спиртовой раствор (3, 7)	Пирогаллол, 2% раствор (7)	Сахароза, 0,5% раствор (6)
Крахмал, 0,5% раствор (6, 16)					Сахароза 5% раствор (8)

Органические

Третья полка (в скобках)

24	25	26	27	28	29
Спирт этиловый 96° (2, 8, 15, 16, 18)	Сульфаниловая кислота, 1% раствор (1, 4, 5, 15)	Сульфосалициловая кислота, 10% раствор (2)	Трихлоруксусная кислота, 10% раствор (2)	Танин, насыщенный раствор (2)	Уксусная кислота, концентрированная (1, 3, 8, 15)
Спирт этиловый, 70% раствор (17)		Тирозин, 0,1% раствор (7)	Трихлоруксусная кислота 20% раствор (14)	Тимол, 1% спиртовой раствор (3)	
		Ташира индикатор (12)	Трихлоруксусная кислота, 5% раствор (15)	Уксусный ангидрид (8, 15, 16)	
		Толуол (16, 17)	Танин, насыщенный раствор (17)		

Соли и простые

Четвертая полка (в скобках)

35	36	37	38	39	40
Аммоний молибденовокислый, 7,5% раствор в азотной кислоте (3, 13)	Аммоний сернокислый в порошке (2, 15, 17)	Аммоний сернокислый, насыщенный раствор (2)	Железо хлорное, 5% раствор (2, 4, 8, 18)	Железо хлорное, 1% раствор (4, 5, 11, 15, 16, 18)	Йод, 0,1% раствор (4, 6)
Аммоний сернокислый, насыщенный раствор (15, 17)	Аммоний щавелевокислый, 5% раствор (13)	Бром в хлороформе в разведении 1:60 (4) Барий хлористый, 5% раствор (13) Бромная вода свежеприготовленная, 3% раствор (16)	Железоаммиачные квасцы, 30% раствор (14, 17) Железо сернокислое в порошке (16)		Йод, 10% раствор (8, 16)

указаны номера занятий)

30	31	32	33	34
Уксусная кислота, 10% раствор (2, 3, 4, 5, 13) Уксусная кислота с хлороформом в соотношении 2:1 (16)	Уксусная кислота, 1% раствор (2, 11, 15)	Фенол, насыщенный водой (для хроматографии) (1) Фенол, 1% раствор (11, 15) Формальдегид с серной кислотой в соотношении 50:1 (16)	Цистеин, 0,025% раствор (4) Фенолфталеин, 0,5% спиртовой раствор (8, 11, 13, 16)	Хлороформ (4, 12, 15, 16, 18)

вещества

указаны номера занятий)

41	42	43	44	45	46
Калий железисто-синеродистый, 5% раствор (2) Калий железосинеродистый, 5% раствор (4) Йод, 1% раствор (6, 15, 16, 17)	Калий йодноватокислый, 10% раствор (5) Калий марганцовокислый, 1% раствор (12) Калий йодистый, 2% раствор (16) Кадмий хлористый, насыщенный спиртовой раствор (8, 15)	Калий йодноватокислый, 0,1% раствор (5) Калий хромовокислый, 5% раствор (13) Калий хлористый, 5% раствор (15) Калий марганцовокислый, насыщенный раствор (14, 17)	Медь уксуснокислая, 5% раствор (4) Кальций углекислый в порошке (7, 11) Калий шавелевокислый в порошке (13) Кальций сернокислый в порошке (15) Магния окись в порошке, прокаленная (18)	Медь сернокислая, 7% раствор (2, 3, 6, 10, 16) Медь сернокислая, 0,1% раствор (18)	Медь сернокислая, 1% раствор (1, 2, 3, 5, 6, 11, 15, 17)

**Соли и простые
Пятая полка (в скобках)**

47	48	49	50	51	52
Миллона реактив (1, 3, 5, 15)	Натрий азотистокислый, 5% раствор (свежеприготовленный) (1, 4, 5, 15)	Натрий бромноватистокислый (гипобромит), 2% раствор (свежеприготовленный) (1, 15, 18)	Натрий нитропруссид, 5% раствор (свежеприготовленный) (1, 8, 12, 15, 18)	Натрий углекислый в порошке (1, 5) Натрий углекислый, 1% раствор (8) Натрий двууглекислый, 10% раствор (11) Натрий серноватистокислый (гипосульфит), 0,1 н. раствор (16)	Натрий углекислый, 10% раствор (1, 4, 5, 8, 15) Натрий сернокислый, безводный, в порошке (18)

Минеральные кислоты

Шестая полка (в скобках)

58	59	60	61	62	63
Азотная кислота, концентрированная (1, 2, 3, 4, 14, 15)	Азотная кислота, 10% раствор (2, 13)	Серная кислота, концентрированная (1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 12, 15, 18)	Серная кислота, 10% раствор (3, 14, 15)	Соляная кислота, концентрированная (2, 4, 12) Соляная кислота, 10% раствор (18)	Перекись водорода, 3% раствор, свежеприготовленный (3, 15) Соляная кислота, 10% раствор (12, 13)

вещества
указаны номера занятий

53	54	55	56	57
Натрий хлористый, 5% раствор (2)	Натрий хлористый, насыщенный раствор (2)	Свинец уксуснокислый, 5% раствор (1, 2, 5)	Серебро азотнокислое, 1% раствор (2, 3, 13)	Сегнетова соль, 35% щелочной раствор (6, 10, 16)
Натрий хлористый, 1% раствор (6)	Ниллендера реактив (10)	Свинец уксуснокислый, 10% раствор (16)		
Натрий хлористый, 10% раствор (17)				

и щелочи

указаны номера занятий)

64	65	66	67	68	69
Перекись водорода, 1% раствор (свежеприготовленный)(7,14)	Аммиак, концентрированный (1, 3, 5, 8) Аммиак, 10% раствор (13) Бария гидроокись, насыщенный раствор (18)	Натр едкий, 0,2% (0,4%) раствор(2, 3, 15, 17) Кальция гидроокись в порошке (9) Кальция гидроокись, насыщенный раствор (13)	Натр едкий, концентрированный раствор (1, 3, 5, 16, 18)	Натр едкий, 10% раствор (1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 15, 17, 18)	Дистиллированная вода

**СПИСКИ РЕАКТИВОВ, ОБОРУДОВАНИЯ
И МАТЕРИАЛОВ ИССЛЕДОВАНИЯ, НЕОБХОДИМЫЕ
ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ КАЖДОГО ЗАНЯТИЯ**

Для всех занятий необходимо следующее оборудование рабочего места:

Оборудование и материалы	На одного студента	На группу в 25 человек
Баня водяная с треножником и вставкой для пробирок	1	25
Воронка (диаметр 3—5 см)	1	25
Горелка газовая	1	25
Палочка стеклянная	1	25
Пипетка глазная	1	25
Пробирки	12	300
Штатив для пробирок	1	25
Штатив железный с кольцом и асбестовой сеткой	1	25
Карандаш по стеклу	1	25

РАЗДЕЛ I

БЕЛКИ, ВИТАМИНЫ, ГОРМОНЫ И ФЕРМЕНТЫ

Химическая природа белка

Занятие 1

№ п/п	Название реактива, его концентрация и номер работы (в скобках)	Количество реактива на 100 человек	Порядковый номер в лабораторном ящике	Примечание
	<i>Материал исследования</i>			
1	Белок пшеничный, 1% раствор (1—10)	600 мл	1	См. приготовление, п. 1
	Белок яичный, 1% раствор (1—10)	600	2	См. приготовление, п. 3
	Желатин, 1% раствор (1—10)	600	3	
	Раствор смеси аминокислот для хроматографии (11)	10	4	См. приготовление, п. 17
	<i>Органические реактивы</i>			
5	Лакмус синий и красный		10 и 11	На всех занятиях
6	α -нафтол, 0,1% спиртовой раствор (6)	60	21	См. приготовление, п. 38
7	Нингидрин 0,1% раствор (3)	60	19	
8	Нингидрин, 0,1—0,2% спиртовой раствор (11)	25	В пульверизаторе	

№ п/п	Название реактива, его концентрация и номер работы (в скобках)	Количество реактива на 100 человек	Порядковый номер в лабораторном ящике	Примечание
9	Пикриновая кислота, 10% раствор (2)	40 мл	22	
10	Сахароза, 10% раствор (8)	20	23	
11	Сульфаниловая кислота, 1% раствор в 2% соляной кислоте (7)	60	25	См. приготовление, п. 40
12	Уксусная кислота, концентрированная (8)	100	29	
13	Фенол, насыщенный водой (для хроматографии) (11)	100	32	См. приготовление, п. 44.
<i>Соли и простые вещества</i>				
14	Медь сернокислая, 1% раствор (1)	10	46	
15	Миллона реактив (5)	40	47	См. приготовление, п. 58
16	Натрий азотистокислый, 5% раствор (свежеприготовленный) (7)	60	48	
17	Натрий бромноватистокислый, 2% раствор (свежеприготовленный) (6)	100	49	См. приготовление, п. 59
18	Натрий нитропруссид, 5% раствор свежеприготовленный (10)	60	50	
19	Натрий углекислый, порошок (2)	200 г	51	
20	Натрий углекислый, 10% раствор (7)	100 мл	52	
21	Свинец уксуснокислый, 5% раствор (9)	20	55	
<i>Минеральные кислоты</i>				
22	Азотная кислота, концентрированная (4)	60	58	
23	Серная кислота, концентрированная (8)	320	60	
<i>Щелочи</i>				
24	Аммиак, концентрированный (4)	200	65	
25	Натр едкий, 30% раствор (4, 9, 10)	300	67	
26	Натр едкий, 10% раствор (1,6)	300	68	

№ п/п	Оборудование и материалы	На одного студента	На группу в 25 человек
1	Бумага фильтровальная (полоска длиной 12—15 см, шириной 1—1,5 см) (11)	1	25
2	Иголка с ниткой (11)	1	25
3	Карандаш грифельный (11)	1	25
4	Капилляры длиной 4—5 см (11)	1	25
5	Линейка школьная (11)	1	25
6	Пробирка длиной 18—20 см, диаметром 2—2,5 см (11)	1	25
7	Пульверизатор стеклянный (11)	1	12—25
8	Стекло оконное (пластинка) (11)	1	25
9	Термостат с t° 35—40° (11)		1
10	Шкаф сушильный с приспособлением для подвешивания бумажных полосок (11)		1
11	Штатив для широких пробирок (для установки их в термостате) (11)		3

Физико-химические свойства белка

З а н я т и е 2

№ п/п	Название реактива, его концентрация и номер работы (в скобках)	Количество реактива на 100 человек	Порядковый номер в лабораторном ящике	Примечание
<i>Материал исследования</i>				
1	Белок яичный, неразведенный (12)	40 мл	1	См. приготовление, п. 2
2	Белок яичный, 1% раствор (14—22)	600	2	
3	Желатин, 1% раствор (14)	600	3	См. приготовление, п. 3
4	Мука пшеничная (12)	40 г	4	
<i>Органические реактивы</i>				
5	Ацетон (17)	250 мл	12	
6	Каллодий ¹ (13)	400		
7	Пикриновая кислота, 10% раствор (21)	30	22	
8	Спирт этиловый 96° (14, 17)	2 400	24	
9	Сульфосалициловая кислота, 10% раствор (20)	10	26	
10	Танин, насыщенный раствор (21)	20	28	
11	Танин, 0,1% раствор (14)	1 000	9	
12	Трихлоруксусная кислота, 10% раствор (20)	10	27	

¹ Коллодий выдается преподавателем или лаборантом; реактив разливают в склянки емкостью 100 мл.

№ п/п	Название реактива, его концентрация и номер работы (в скобках)	Количество реактива на 100 человек	Порядковый номер в лабораторной ящике	Примечание
13	Уксусная кислота, 10% раствор (16,21)	30 мл	30	
14	Уксусная кислота, 1% раствор (16, 21)	30	31	
<i>Соли и простые вещества</i>				
15	Аммоний сернистый в порошке (15)	400 г	36	80 г в 100 мл воды
16	Аммоний сернистый, насыщенный раствор (15)	100 мл	37	
17	Железо хлорное, 5% раствор (22)	60	38	
18	Медь сернистая, 1% раствор (13)	20	46	
19	Медь сернистая, 7% раствор (22)	60	45	
20	Калий железистосинеродистый, 5% раствор (21)	30	41	
21	Натрий хлористый, насыщенный раствор (16)	20	54	
22	Натрий хлористый, 5% раствор (12)	200	53	
23	Свинец уксуснокислый, 5% раствор (22)	60	55	
24	Серебро азотнокислое, 1% раствор (13, 22)	60	56	
<i>Минеральные кислоты</i>				
25	Азотная кислота, концентрированная (18,19)	700	58	
26	Азотная кислота, 10% раствор (13)	10	59	
27	Серная кислота, концентрированная (18)	100	60	
28	Соляная кислота, концентрированная (18)	100	62	
<i>Щелочи</i>				
29	Натр едкий, 10% раствор (13,16)	100	68	
30	Натр едкий, 0,2% раствор (12)	1 000	66	
<i>Растворы для приготовления буферных смесей¹ (в склянках с сифонами)</i>				
31	Натрий фосфорнокислый двузамещенный, 0,2 М раствор (14)	600		См. приготовление, п. 87

¹ В зависимости от избранной работы по определению изоэлектрической точки готовят те или иные растворы.

№ п/п	Название реактива, его концентрация и номер работы (в скобках)	Количество реактива на 100 человек	Порядковый номер в лабораторной ящике	Примечание
32	Лимонная кислота, 0,1 М раствор (14)	700 мл		См. приготовление, п. 88
33	Натрий уксуснокислый, 0,2 М раствор (14)	500 »		См. приготовление, п. 83
34	Уксусная кислота, 0,2 М раствор (14)	500—700 мл		См. приготовление, п. 82
35	Казеин, 0,4% раствор в 0,2 М растворе уксуснокислого натрия (14)	300 мл		См. приготовление, п. 84

№ п/п	Оборудование и материалы	На одного студента	На группу в 25 человек
1	Бюретка емкостью 25 мл и склянка на 100 мл для 0,1% раствора танина (14)	1	25 или 13
2	Микробюретки (для буферных растворов) (14)	2	50 или 25
3	Палочки стеклянные для зажимания коллодиевых мешочков (13)	2	50
4	Пипетка на 1 мл с делениями (14)	1	25
5	Пипетка на 2 мл (14)	1	25
6	Резинки кольцевые для скрепления стеклянных палочек (13)	2	50
7	Склянки двухгорлые или трехгорлые с сифонами (для буферных растворов) (14)	2	50 или 25
8	Смазка для кранов (14)		5 г (см. приготовление, п. 39)
9	Стаканчик или пробирочка 3×5 см (для приготовления коллодиевых мешочков) (13)	1	25
10	Стакан большой на 50—100 мл для погружения коллодиевых мешочков (13)	1	25
11	Ступка фарфоровая с пестиком (12)	1	25
12	Трубки хлоркальциевые с натровой известью (для буферных растворов) (14)	2	50 или 25
13	Фильтры бумажные (12)	2	50

Сложные белки

Занятие 3

№ п/п	Название реактива, его концентрация и номер работы (в скобках)	Количество реактива на 100 человек	Порядковый номер в лабораторной ящике	Примечание
<i>Материал исследования</i>				
1	Дрожжи свежие или сухие (24)	100 г	1	В пакетиках по 100 мг в ящичке
2	Казеин в порошке (28)	20 "		
3	Кровь оксалатная разведенная I 500 (25)	20 мл	3	} См приготовления, п. 14
4	Кровь оксалатная (26)	10	2	
5	Молоко цельное (27)	400	4	
6	Селезенка или зубная железа (привозят с бойни) (23)	100 г		
<i>Органические реактивы</i>				
7	Бензидин, 0,2% спиртовой раствор (свежеприготовленный) (25)	60 мл	15	См. приготовление, п. 24
8	Бензидин, 1% раствор в уксусной кислоте (свежеприготовленный) (25)	60 "	15	См. приготовление, п. 25
9	Гваяковая смола, 1% спиртовой раствор (25)	20 "	16	См. приготовление, п. 26
10	Дифениламинный реактив (23)	50 "	18	См. приготовление, п. 30
11	Лакмус красный		11	
12	Лакмус синий		10	
13	α-нафтол, 1% спиртовой раствор (30)	20 "	21	См. приготовление, п. 38
14	Уксусная кислота, концентрированная (26, 27, 29)	80 "	29	
15	Уксусная кислота, 10% раствор (27)	70 "	30	
16	Тимол, 1% спиртовой раствор (30)	20 "	28	
<i>Соли и простые вещества</i>				
17	Аммоний молибденовокислый, 7,5% раствор в азотной кислоте (24, 28)	200 "	35	См. приготовление, п. 48

№ п/п	Название реактива, его концентрация и номер работы (в скобках)	Количество реактива на 100 человек	Порядковый номер в лабораторной ящике	Примечание	
18	Медь сернистая ¹ , 7% раствор (24)	300 мл	45	В склянках емкостью 100 мл	
19	Медь сернистая, 1% раствор (24, 27)	10 "	46		
20	Миллона реактив (27)	50 "	47		
21	Натрий хлористый, 5% раствор (23)	1500 "			
22	Серебро азотнокислое, 1% раствор (24)	50 "	56		
<i>Минеральные кислоты</i>					
23	Азотная кислота, концентрированная (28)	150 "	58		
24	Серная кислота, концентрированная (27, 30)	200 "	60		
25	Серная кислота, 10% раствор (24)	800 "	61		См. приготовление, п. 75
26	Перекись водорода, 3% раствор (свежеприготовленный) (25)	80 "	63		См. приготовление, п. 78
<i>Щелочи</i>					
27	Аммиак, концентрированный (24)	10 "	65		
28	Натр едкий, 30% раствор (24)	300 "	67		
29	Натр едкий, 10% раствор (24, 27, 28)	600 "	68		
30	Натр едкий, 0,4% раствор (или 0,1 н. раствор) (23)	200 "	66		

№ п/п	Оборудование и материалы	На одного студента	На группу в 25 человек
1	Весы роговые с разновесами (23)		13—25
2	Весы центрифужные (23)		4
3	Микроскоп (26)		8
4	Палочка деревянная длиной 12—15 см (23)	1	25
5	Порошок стеклянный (23)	100—200 мг	5 г
6	Пробирка размером 15 см × 1,5 см с пробкой и стеклянной трубкой длиной 25—30 см (24)	1	25
7	Пробирки центрифужные (23)	2	50
8	Стакан емкостью 100—150 мл (23)	1	25

¹ См. приготовление реактива Фелинга, п. 70

№ п/п	Оборудование и материалы	На одного студента	На группу в 25 человек
9	Стекло покрывное (26)	1	25
10	Стекло предметное (26)	1	25
11	Фильтры бумажные (28)	2	50
12	Центрифуга (23)		2—4
13	Цилиндр мерный емкостью 10—25 мл (23)	1	25
14	Ступка фарфоровая с пестиком (23)	1	25

Витамины
З а н я т и е 4

№ п/п	Название реактива, его концентрация и номер работы (в скобках)	Количество реактива на 100 человек	Порядковый номер в лабораторном ящике	Примечание
	<i>Материал исследования</i>			
1	Викасол, 0,05% раствор (45)	50 мл	1	См. приготовление, п. 4
2	Метинон, 0,25% спиртовой раствор (45)	50	2	
3	Никотиновая кислота в порошке (34)	2 г	3	См. приготовление, п. 16
4	Пиридоксин, 5% раствор (35)	50 мл	4	
5	Рибофлавин, 25 мг% раствор (взвесь) (33)	100	5	
6	Рыбий жир свежий (41—43)	40 "	6	
7	Тиамин в порошке (31, 32)	500 мг	7	
8	Токоферол, 0,1% спиртово-сахарный раствор (продажный) (44)	50 мл	8	} В пакетиках, в ящичке
9	Хвоя свежая (36—39)	100 г		
10	Шиповник, сухие плоды (36—39)	100 "		
	<i>Органические реактивы</i>			
11	Анилин свежеперегнанный (45)	20 мл	13	См. приготовление, п. 22
12	Цистеин, 0,025% раствор (45)	50	33	См. приготовление, п. 23
13	Анилиновый реактив (43)	10	14	
14	2,6-дихлорфенолиндофенол, 0,01% раствор (37)	100	17	См. приготовление, п. 40
15	Метиленовая синь, 0,01% раствор (37)	20	20	
16	Сульфаниловая кислота, 1% раствор (31)	80	25	
17	Уксусная кислота, 10% раствор (34)	200 "	30	
18	Хлороформ (41, 43)	100 "	34	

№ п/п	Название реактива, его концентрация и номер работы (в скобках)	Количество реактива на 100 человек	Порядковый номер в лабораторном ящике	Примечание
<i>Соли и простые вещества</i>				
19	Раствор брома в хлороформе (1 : 60) (42)	30 мл	37	См. приготовление, п. 52
20	Железо хлорное, 5% раствор (35)	10	38	
21	Железо хлорное, 1% раствор (36)	20	39	
22	Иод, 0,1% водный раствор (38)	100	40	
23	Калий железосинеродистый, 5% раствор (32, 36)	10	41	
24	Медь уксуснокислая, 5% раствор (34)	300	44	
25	Натрий азотистокислый, 5% раствор свежеприготовленный (31)	100	48	
26	Натрий углекислый, 10% раствор (31, 37)	100	52	
27	Сурьма треххлористая, 33% раствор в хлороформе ¹ (40)	30		
28	Цинк металлический (стружка) (33)	20 г	В лабораторном внутреннем ящике	
<i>Минеральные кислоты</i>				
29	Азотная кислота, концентрированная (44)	100 мл	50	См. приготовление, п. 76
30	Соляная кислота, концентрированная (33)	50	62	
31	Соляная кислота, 2% раствор (37, 39)	4 000	В склянках емкостью 100 мл	
32	Серная кислота, концентрированная (41)	10	60	
<i>Щелочи</i>				
33	Натр едкий, 10% раствор (32, 45)	60	68	
<i>Титрованные растворы (в склянках с сифонами)</i>				
34	2,6-дихлорфенолиндофенол, 0,001 н. раствор (39)	2 000		См. приготовление, п. 90

¹ Хранить в специальной склянке у преподавателя.

№ п/п	Оборудование и материалы	На одного студента	На группу в 25 человек
1	Весы роговые с разновесами (39)	1 (на двоих)	12
2	Колба мерная емкостью 50 мл (39)	1	25
3	Колба эрленмейеровская емкостью 25 мл (39)	2	50
4	Микробюретка с сифоном и склянкой емкостью 500 мл — 1 л для 2,6-дихлорфенолидофенола (39)	1	25
5	Пипетка на 1 мл (39)	1	25
6	Пипетка на 5 мл с делениями (39)	1	25
7	Пробирки (сухие) (40—44)	5	125
8	Склянка емкостью 100 мл для 2% раствора соляной кислоты (36—39)	1	13—25
9	Смазка для кранов (39)		5 г (См. приготовление, п. 39)
10	Ступка фарфоровая с пестиком (39)	1	25
11	Фильтры бумажные (39)	2	50

Гормоны

З а н я т и е 5

№ п/п	Название реактива, его концентрация и номер работы (в скобках)	Количество реактива на 100 человек	Порядковый номер в лабораторной ящике	Примечание
<i>Материал исследования</i>				
1	Адреналин, 0,1% раствор (47—49)	110 мл	1	
2	Инсулин в ампулах (51)	150	2	См. приготовление, п. 13
3	Фолликулин, спиртовой раствор (52)	200	3	См. приготовление, п. 20
	Щитовидная железа в порошке (46)	20 г	4	См. приготовление, п. 21
<i>Органические реактивы</i>				
5	Крахмал, 1% раствор (46)	10 мл	18	
6	Сульфаниловая кислота, 1% раствор (49)	30	25	См. приготовление, п. 40
7	Уксусная кислота, 10% раствор (47)	20	30	
<i>Соли и простые вещества</i>				
8	Железо хлорное, 1% раствор (48)	60	39	

№ п/п	Название реактива, его концентрация и номер работы (в скобках)	Количество реактива на 100 человек	Порядковый номер в лабораторной ящике	Примечание
9	Калий йодноватокислый, 10% раствор (47)	20 мл	42	
10	Калий йодноватокислый, 0,1% раствор (46)	20	43	
11	Медь сернокислая, 1% раствор (51)	10	46	
12	Миллона реактив (51)	20	47	См. приготовление, п. 58
13	Натрий азотистоксикислый, 5% раствор (свежеприготовленный) (49)	30	48	
14	Натрий углекислый в порошке кристаллический (46)	100 г	51	
15	Натрий углекислый, 10 ⁰ / _с раствор (49, 50)	30 мл	52	
16	Натрий углекислый, 10 ⁰ / _с раствор (50)	1 600 „	В бюретках емкостью 25 мл ¹	См. приготовление, п. 61
17	Свинец уксуснокислый, 5% раствор (51)	10	55	
18	Фолина реактив (50)	200	9	См. приготовление, п. 71
<i>Минеральные кислоты</i>				
19	Серная кислота, концентрированная (46, 52)	200	60	
<i>Щелочи</i>				
20	Аммиак, концентрированный раствор (48)	10	65	
21	Нагр едкий, концентрированный раствор (51)	50	67	
22	Нагр едкий, 10% раствор (51)	50	68	
<i>Стандартные растворы и задачи</i>				
23	Адреналин, стандартный 4 мг% раствор (свежеприготовленный) (50)	200	7	См. приготовление, п. 109
24	Задачи для колориметрического определения адреналина (свежеприготовленные) (50)		В пробирках	См. приготовление, п. 112

¹ Реактив разливают в склянки емкостью 100 мл.

№ п.п.	Оборудование и материалы	На одного студента	На группу в 25 человек
1	Бюретка емкостью 25 мл для 10% раствора углекислого натрия (50)	1	25 или 13
2	Колориметры Дюбоска (50)		4—8
3	Пипетки на 1 мл (для адреналина) (50)	2	50
4	Пипетка с делениями на 1 мл (для реактива Фолина) (50)	1	25
5	Пипетка на 2 мл (для воды) (46)	1	25
6	Пробирки сухие (или колбочки) на 10—20 мл (50)	2	50
7	Склянка на 100 мл для 10% раствора углекислого натрия (50)		25 или 13
8	Ступка фарфоровая с пестиком (46)	1	25
9	Тигель фарфоровый (46)	1	25
10	Фильтры бумажные (46)	2	50
11	Щипцы тигельные (46)	1	25

Ферменты гидролитические

Занятие 6

№ п.п.	Название реактива, его концентрация и номер работы (в скобках)	Количество реактива на 100 человек	Порядковый номер в лабораторном ящике	Примечание
	<i>Материал исследования</i>			
1	Дрожжи свежие (53)	50 г	1	
	<i>Органические реактивы</i>			
2	Крахмал растворимый, 0,5% раствор (54—59)	3 000 мл	18	См. приготовление, п. 32
3	Крахмал растворимый 0,1% раствор (60)	5 000	В бюретках емкостью 25 мл и склянке на 100 мл	См. приготовление, п. 33
4	Сахароза, 0,5% раствор (57)	200	23	
	<i>Соли и простые вещества</i>			
5	Йод, 0,1% водный раствор (54—59)	160	40	См. приготовление, п. 52
6	Йод, 1% водный раствор (60)	100	41	
7	Медь сернистая, 1% раствор (54, 55, 57, 59)	20	46	
8	Медь сернистая, 7% раствор (54, 55, 57)	370	45	См. приготовление, п. 56

№ п/п	Название реактива, его концентрация и номер работы (в скобках)	Количество реактива на 100 человек	Порядковый номер в лабораторной ящике	Примечание
9	Натрий хлористый, 1% раствор (59)	20 мл	53	
10	Натрий хлористый, 0,1% раствор (60)	1 200	В бюретке емкостью 25 мл и склянке на 100 мл	См. приготовление, п. 63
11	Сегнетова соль, щелочной раствор (54, 55, 57) <i>Щелочи</i>	370	57	См. приготовление, п. 65
12	Натр едкий, 10% раствор (54, 55, 57) <i>Растворы для приготовления буферных смесей (в склянках с сифонами)</i>	400	68	
13	Натрий фосфорнокислый, двухзамещенный, 0,2 М раствор (58)	1 200		См. приготовление, п. 87
14	Лимонная кислота, 0,1 М раствор (58)	350		См. приготовление, п. 88
15	Натрий фосфорнокислый двухзамещенный $\frac{1}{15}$ М раствор (58)	700		См. приготовление, п. 86
16	Калий фосфорнокислый однозамещенный, $\frac{1}{15}$ М раствор (58)	700		См. приготовление, п. 85

№ п/п	Оборудование и материалы	На одного студента	На группу в 25 человек
1	Баня со льдом (56)	1	25
2	Бюретка емкостью 25 мл и склянка емкостью 100 мл для дистиллированной воды (54, 56, 60)	1	25
3	Бюретка емкостью 25 мл и склянка емкостью 100 мл для 0,1% раствора крахмала (60)	1	25
4	Бюретка емкостью 25 мл и склянка на 100 мл хлористого натрия (60)	1	25
5	Весы роговые с разновесами на 0,5 г (53)	1	25

№ п/п	Оборудование и материалы	На одного студента	На группу в 25 человек
6	Микробюретки с сифоном и склянкой емкостью 500 мл для натрия фосфорнокислого двузамещенного (58)	1	25
7	Микробюретка с сифоном и склянкой емкостью 500 мл — 1 л лимонной кислоты (58)	1	25
8	Пипетка на 1 мл (60)	1	25
9	Пипетка на 5 мл (54)	1	25
10	Пробирка мерная или колбочка емкостью 10 мл (57, 58, 59, 60)	1	25
11	Стекло размером 10 × 10 см (53)	1	25
12	Ступка фарфоровая с пестиком (53)	1	25
13	Термометр (58)	1	25
14	Фильтры бумажные (53)	2	50

Окислительно-восстановительные ферменты
Занятие 7

№ п.п	Название реактива, его концентрация и номер работы (в скобках)	Количество реактива на 100 человек	Порядковый номер в лабораторном ящике	Примечание
<i>Материал исследования</i>				
1	Вытяжка из хрена (66, 67)	300 мл	1	См. приготовление, п. 8
2	Картофель вареный (63)	2 кг	2	
3	Картофель свежий (61, 63)	2 кг 200 г		2
4	Кровь оксалатная (68)	10 мл	3	
5	Листья зеленые (69)	20 г		3
6	Молоко свежее (70)	600 мл	3	
7	Мышечная ткань свежая (кашица) (64, 65, 71)	60 г		В фарфоровой чашке
<i>Органические реактивы</i>				
8	Адреналин, 0,1% раствор (62)	100 мл	13	
9	Вазелиновое масло (70)	150	14	
10	Гваяковая смола, 1% спиртовой раствор (63, 67)	100	16	См. приготовление, п. 26
11	N-диметил-пара-фенилендиамин, 1% водный раствор (65)	40	17	
12	Метиленовая синь, 0,05% водный раствор (70, 71)	20	20	
13	Метиленовая синь, водный 0,05% раствор (с формальдегидом) (70)	40	19	См. приготовление, п. 35
				См. приготовление, п. 36

№ п/п	Название реактива, его концентрация и номер работы (в скобках)	Количество реактива на 100 человек	Порядковый номер в лабораторной ящике	Примечание
14	α -нафтол, 1% спиртовой раствор (65)	40 мл	21	См. приготовление, п. 38
15	Пирогаллол, 2% водный раствор (66, 67)	800	22	
16	Гирозин, 0,1% раствор (62)	200	26	См. приготовление, п. 42
17	Янтарная кислота, нейтрализованный 0,01 н. раствор (71)	800	9	
<i>Соли и простые вещества</i>				
18	Кальций углекислый в порошке (69)	20 г	44	См. приготовление, п. 47
<i>Минеральные кислоты</i>				
19	Перекись водорода, 1% раствор (свежеприготовленный) (66, 67, 68)	400 мл	64	См. приготовление, п. 77
20	Перекись водорода нейтрализованная, 3% раствор (свежеприготовленный) (69)	1 000	6	
<i>Буферные растворы</i>				
21	Фосфатный буфер pH=6,8 (71)	400	8	См. приготовление, п. 85—86

№ п/п	Оборудование и материалы	На одного студента	На группу в 25 человек
1	Бумага фильтровальная 10×10 см (65)	5	125
2	Марля (10×10 см, 4 кусочка) (61, 64)	1	1 м ²
3	Насос Камовского (или водоструйный)		2
4	Пипетка на 1 мл (71)	1	25
5	Пипетки на 2 мл (69, 71)	1	25
6	Пипетка на 5 мл с делениями (61, 66, 69)	1	25
7	Прибор для определения каталазной активности (69)	1	25
8	Пробирка мерная на 10 мл (или цилиндр) (69)	1	25
9	Пробирки Тунберга (71)	2	50
10	Смазка для пробирок Тунберга (71)	—	5 г
11	Ступка фарфоровая с пестиком (61, 69)	1	25
12	Стакан на 150—200 мл (62)	1	25
13	Термометр (62, 70)	1	13—25
14	Чашка Петри (61, 63, 69)	1	25
15	Чашка фарфоровая для мышечной ткани (64, 65, 71)	1	25

ОБМЕН ВЕЩЕСТВ В ЖИВОТНОМ ОРГАНИЗМЕ

Обмен липидов

Занятие 8

№ п.п	Название реактива, его концентрация и номер работы (в скобках)	Количество реактива на 100 человек	Порядковый номер в лабораторном ящике	Примечание
<i>Материал исследования</i>				
1	Белок яичный, 1% раствор (72)	200 мл	1	См. приготовление, п. 3
2	Вытяжка из поджелудочной железы (липаза) (74)	250	2	См. приготовление, п. 5
3	Желток яичный в порошке (или свежий) (76)	100 г	3	См. приготовление, п. 9
4	Желчь (разведенная 1:2) (72, 73, 82)	200 мл	4	См. приготовление п. 12
5	Молоко прокипяченное и разведенное 1:1 (74, 75)	1 400	6	
6	Мыло, 1% раствор (72, 73)	1 200	7	
7	Моча с 0,5% содержанием ацетона (83)	300	8	
8	Моча с 0,5% содержанием ацетоуксусной кислоты (83, 85)	200	9	
9	Масло подсолнечное (72)	100	5	
10	Холестерин, 1% раствор в хлороформе (80, 81)	200	10	
<i>Органические реактивы</i>				
11	Ацетон (78)	50	12	
12	Сахароза, 5% раствор (82)	20	23	
13	Спирт этиловый 96° (76)	600	24	
14	Уксусный ангидрид (81)	100	28	
15	Уксусная кислота концентрированная (83)	100	29	
16	Фенолфталеин, 0,5% спиртовой раствор (74, 75)	30	33	См. приготовление, п. 45
<i>Соли и простые вещества</i>				
17	Железо хлорное, 5% раствор (85)	50	38	
18	Иод, 10% раствор (84)	100	40	См. приготовление, п. 52
19	Кадмий хлористый, насыщенный спиртовой раствор (78)	20	42	См. приготовление, п. 53
20	Натрий углекислый, 10% раствор (74)	20 "	52	

№ п/п	Название реактива, его концентрация и номер работы (в скобках)	Количество реактива на 100 человек	Порядковый номер в лабораторном ящике	Примечание
21	Натрий углекислый, 1% раствор (72)	220 мл	51	
22	Натрий нитропруссид, 5% раствор (83)	40	50	
	<i>Минеральные кислоты</i>			
23	Серная кислота концентрированная (80, 81, 82)	320	60	
	<i>Щелочи</i>			
24	Аммиак, концентрированный раствор (83)	150	65	
25	Натр едкий, 10% раствор (79, 83, 84)	150	68	
	<i>(в бюретках с сифонами)</i> <i>(в бюретках с сифонами)</i>			
26	Натр едкий, 0,01 н. раствор (75)	7 000		См. приготовление, п. 98

№ п.п	Оборудование и материалы	На одного студента	На группу в 25 человек
1	Колбы или стаканчики для титрования (75)	2	50
2	Микробюретка с сифоном и склянкой емкостью 500 мл—1 л для 0,01 н. раствора NaOH (75)	1	25
3	Пипетка на 10 мл (75)	1	25
4	Пипетка на 2 мл (75)	1	50
5	Пипетка на 1 мл (75)	1	25
6	Пробирки сухие (76, 78, 80, 81)	5	125
7	Стаканчик высокий (высота 10 см, диаметр 3,5 см) для количественного определения липазной активности (75)	1	25
8	Сталагмометр (73)	1	25
9	Термометр (74)	1	15—25
10	Фильтр бумажный (76)	2	50

Обмен углеводов

А. Превращения углеводов в пищеварительном тракте, в мышечной и других тканях

Занятие 9

№ п/п	Название реактива, его концентрация и номер работы (в скобках)	Количество реактива на 100 человек	Порядковый номер в лабораторной ящике	Примечание
<i>Материал исследования</i>				
1	Кровь кролика оксалатная (берется на занятии) (86)	60 мл		См. приготовление, п. 14
2	Крахмал растворимый, 0,5% раствор (87)	200	1	См. приготовление, п. 32
3	Мышечная кашка (свежая) (87)	200 г	В чашке Петри	См. приготовление, п. 15
<i>Органические реактивы</i>				
4	Вазелиновое масло (87)	400 мл	14	
5	Вератрол или гваякол, 0,2% спиртовой раствор (87)	40	15	
6	Крахмал растворимый, 1% раствор (86)	80	18	См. приготовление, п. 32
7	Уксусная кислота, 3% раствор (86)	1 600	7	
<i>Соли и простые вещества</i>				
8	Медь сернистая, полунасыщенный раствор (87)	400	6	См. приготовление, п. 57
9	Натрий или калий щавелевокислый в порошке (96)	4 г	На столе преподавателя	
10	Тройной раствор (86)	2 400 мл	В бюретке емкостью 25 мл ¹	См. приготовление, п. 69
11	Цинк сернистый, 0,45% раствор (86)	4 000	То же ¹	См. приготовление, п. 73
<i>Минеральные кислоты</i>				
12	Серная кислота концентрированная (87)	700	60	
13	Метафосфорная кислота, 5% раствор (87)	800	9	

¹ Реактивы разливают в склянки емкостью 100 мл.

№ п/п	Название реактива, его концентрация и номер работы (в скобках)	Количество реактива на 100 человек	Порядковый номер в лабораторной ящике	Примечание
<i>Щелочи</i>				
14	Кальция гидроксид в порошке (87)	200 г	66	
15	Натр едкий, 0,1 н. раствор (86)	1 800 мл	В бюретке емкостью 25 мл ¹	См. приготовление, п. 80
<i>Буферные растворы</i>				
16	Фосфатный буфер pH = 8 (87)	1 200	8	См. приготовление, п. 85—86
<i>Титрованные растворы в микробюретках с сифонами</i>				
17	Калий железосинеродистый, $\frac{1}{200}$ н. раствор (86)	1 600		См. приготовление, п. 91
18	Натрий гипосульфит, $\frac{1}{200}$ н. раствор (86)	1 600		См. приготовление, п. 95—96

№ п/п	Оборудование и материалы	На одного студента	На группу в 25 человек
1	Бани со вставками для пробирок и для стаканчиков (86)	1	25
2	Бумага фильтровальная (86, 87)		} 4 бюретки могут быть укреплены на 1 штативе
3	Бюретка емкостью 25 мл и склянка емкостью 100 мл для 0,1 н. раствора едкого натра (86)		
4	Бюретка емкостью 25 мл и склянка емкостью 100 мл для сернистого цинка (86)		
5	Бюретки емкостью 25 мл и склянки емкостью 100 мл для тройного раствора и для 3% раствора уксусной кислоты (86)		
6	Вата промытая и высушенная ² (86)	2,5 г	70
7	Весы аптекарские с разновесами на 0,5 г (87)	1 (на двоих)	12
8	Воронки (диаметр 3—5 см) (86)	4	100

¹ Реактив разливают в склянки емкостью 100 мл.

² Вату используют в качестве фильтра при определении сахара в крови. Для освобождения ваты от присутствующих в ней редуцирующих веществ ее нужно несколько раз прокипятить в дистиллированной воде, каждый раз сливая и отжимая воду. Отмытую и отжатую вату сушат на воздухе.

№ п/п	Оборудование и материалы	На одного студента	На группу в 25 человек
9	Карандаш по стеклу (86, 87)	1	12
10	Микробюретка с сифоном и склянкой емкостью 500 мл—1 л для железосинеродистого калия (86)	1	25
11	Микробюретка с сифоном и склянкой емкостью 500 мл—1 л для гипосульфита (86)	1	25
12	Микропипетка для взятия крови (86)	1 или 2	25—50
13	Пипетка на 1 мл для гликогена и сернокислой меди (87)	1	25
14	Пипетка на 2 мл для уксусной кислоты (86) (если нет бюреток)	1	25
15	Пипетка на 3 мл для тройного раствора (86) (если нет бюреток)	1	25
16	Пипетка на 5 мл с делениями для фосфатного буфера и метафосфорной кислоты (87)	1	25
17	Смазка для кранов (86)		5 г. См. приготовление, п. 39
18	Стаканчики высокие (высота 10 см, диаметр 3,5 см) (86)	4	100
19	Термостат (87)	1	1

Оборудование стола для взятия крови у кролика

№ п/п	Оборудование и материалы	На 2 стола	Примечание
1	Банка емкостью 100—200 мл для слива (86)	2	
2	Баночки с дистиллированной водой (86)	2	
3	Бюкс с порошком оксалата натрия или калия (86)	2	
4	Иглы от шприца для прокола уха кролика (86)	4	
5	Йод, 10% спиртовой раствор (86)	20 мл	
6	Лоток для грязной ваты (86)	2	
7	Ножницы для обрезания шерсти на ухе кролика (86)	4	
8	Палочки стеклянные (86)		
9	Полотенце (86)	2	
10	Спирт (86)	50 мл	
11	Стакан толстостенный с ватными тампонами (86)	2	
12	Стерилизатор плоский (86)	2	
13	Тигли для крови (86)	6	
14	Эфир для высушивания микропипеток (86)	50 мл	
15	Ящик для кролика с крышкой и вырезом для головы (86)	2	

Примечание. Для проведения занятия нужны 2 кролика весом 2,5—3 кг.

Б. Регуляция и нарушение углеводного обмена

З а н я т и е 10

№ п	Название реактива, его концентрация и номер работы (в скобках)	Количество реактива на 100 человек	Порядковый номер в лабораторном ящике	Примечание
<i>Материал исследования</i>				
1	Кровь из уха кролика оксалатная берется на занятии (88, 89)	60 мл + 60 мл	—	См. приготовление, п. 14
2	Моча с 0,5% содержанием глюкозы (90, 91, 92)	300	1	
<i>Органические реактивы</i>				
3	Крахмал (растворимый), 1% раствор (88, 89)	160	18	См. приготовление, п. 32
4	Уксусная кислота, 3% раствор (88, 89)	3 200	7 (или в Бюретке емкостью 25 мл) ¹	
<i>Соли и простые вещества</i>				
5	Медь сернистая, 7% раствор (90, 91)	60	45	
6	Натрий или калий щавелевокислый порошок (88, 89)	4 г	На столе преподавателя	
7	Ниллендера реактив (92)	30 мл	54	См. приготовление, п. 64
8	Сегнетова соль, щелочной раствор	30	57	См. приготовление, п. 65
9	Тройной раствор (88, 89)	4 800	В бюретке емкостью 25 мл ¹	См. приготовление, п. 69
10	Цинк сернистый, 0,45% раствор (88, 89)	8 000	В бюретке емкостью 25 мл ¹	См. приготовление, п. 73
<i>Щелочи</i>				
11	Натр едкий, 10% раствор (90)	30	68	

¹ Реактив разливают в склянки емкостью 100 мл.

№ п.п.	Название реактива, его концентрация и номер работы (в скобках)	Количество реактива на 100 человек	Порядковый номер в лабораторной ящике	Примечание
12	Натр едкий, 0,1 н. раствор (88, 89)	1 200 мл	В бюретке емкостью 25 мл ¹	
<i>Титрованные растворы (в склянках с сифонами)</i>				
13	Калий железосинеродистый, $\frac{1}{200}$ н. раствор (88, 89)	3 200 .		См. приготовление п. 91
14	Натрий гипосульфит, $\frac{1}{200}$ н. раствор (88, 89)	3 200 .		См. приготовление, пп. 95—96

№ п.п.	Оборудование и материалы	На одного студента	На группу в 25 человек
1	Бани со вставками для пробирок и для стаканчиков (88, 89)	1	25
2	Бумага фильтровальная		
3	Бюретка емкостью 25 мл и склянка емкостью 100 мл для 0,1 н. раствора едкого натра (88, 89)	1	4 бюретки могут быть укреплены на одном штативе
4	Бюретка емкостью 25 мл и склянка емкостью 100 мл для сернистого цинка (88, 89)	1	
5	Бюретки емкостью 25 мл и склянки емкостью 100 мл для тройного раствора и для 3% раствора уксусной кислоты (88, 89)	2	
6	Вата промытая и высушенная (в баночке) (88, 89)	5	
7	Воронки маленькие (диаметр 3—5 см) (88, 89)	4	150 г
8	Карандаш по стеклу (88, 89)	1	100
9	Микробюретка с сифоном и склянкой емкостью 500 мл—1 л для гипосульфита (88, 89)	1	12
10	Микробюретка с сифоном и склянкой емкостью 500 мл—1 л для железосинеродистого калия (88, 89)	1	25
11	Микропипетка для взятия крови (88, 89)	1—2	13 или 25—50
12	Пипетки для уксусной кислоты на 2 мл (88, 89) (если нет бюреток)	1	25
13	Пипетка на 3 мл для тройного раствора (88, 89) (если нет бюреток)	1	25
14	Смазка для кранов (88, 89)		5 г. См. приготовление, п. 39

¹ Реактив разливают в склянки емкостью 100 мл.

Оборудование стола для взятия крови у кролика

№ п.п	Оборудование и материалы	На 2 стола	Примечание
1	Адреналин, стерильный раствор в ампулах (88, 89)	1 мл 1 ампула)	
2	Банки емкостью 100—200 мл (для слива) (88, 89)	2 шт.	
3	Баночка с дистиллированной водой (88, 89)	2 »	
4	Бюкс с порошком оксалата натрия или кальция (88, 89)	2 »	
5	Глюкоза, 40% стерильный раствор (88, 89)	20 мл. См. при- готов- ление, п. 28	
6	Иглы от шприца (для прокола вены уха кролика) (88, 89)	4 шт.	
7	Инсулин, стерильный раствор в ампулах (88, 89)	1 ам- пула	
8	Йод, 10% спиртовой раствор (88, 89)	20 мл	
9	Лоток для грязной ваты (88, 89)	2 шт.	
10	Ножницы для обрезания шерсти на ухе кролика (88, 89)	2 »	
11	Палочки стеклянные (88, 89)	4	
12	Полотенце (88, 89)	2 »	
13	Спирт (для высушивания микропипеток) (88, 89)	50 мл	
14	Стакан толстостенный с ватными тампонами (88, 89)	2 шт.	
15	Стерилизатор плоский (88, 89)	2 »	
16	Тигли для крови (88, 89)	6 »	
17	Физиологический раствор, стерильный (88, 89)	4 мл	
18	Шприц емкостью 1 мл с иглой (для введения адреналина) (88, 89)	1 шт.	
19	Шприц емкостью 1 мл с иглой (для введения инсулина) (88, 89)	1 »	
20	Шприц емкостью 20 мл с иглой (для введения глюкозы) (88, 89)	1 »	
21	Эфир (для высушивания микропипеток) (88, 89)	50 мл	
22	Ящик для кролика с крышкой и вырезом для головы (88, 89)	2 шт.	

Примечание. Для проведения занятия нужны 2 кролика весом 2,5—3 кг.

Обмен белков

А. Превращения белков в пищеварительном тракте

Занятие 11

№ п/п	Название реактива, его концентрация и номер работы (в скобках)	Количество реактива на 100 человек	Порядковый номер в лабораторном ящике	Примечание
<i>Материал исследования</i>				
1	Вытяжка из поджелудочной железы (трипсин) (96)	600 мл	1	См. приготовление, п. 5, 6
2	Желудочный сок, активный (93, 94, 95)	90	2	См. приготовление, п. 10, или 7
3	Желудочный сок с молочной кислотой (93)	400	3	См. приготовление, п. 11
4	Желудочный сок нормальный (без пепсина) для титрования (93)	1 600	4 и задача (в пробирке)	См. приготовление, п. 11
5	Желудочный сок с повышенной кислотностью (для титрования) (93)	1 600	Задача (в пробирке)	См. приготовление, п. 11
6	Желудочный сок с пониженной кислотностью (для титрования) (93)	1 600	Задача (в пробирке)	См. приготовление, п. 11
7	Молоко свежее (95)	20 "	5	
8	Фибрин (94)	60 г	6	См. приготовление, п. 19
9	Фибрин окрашенный (96)	60 "	7	См. приготовление, п. 19
<i>Органические реактивы</i>				
10	Диметиламиноазобензол, 0,5% спиртовой раствор (93)	30 мл	17	См. приготовление, п. 29
11	Бумага Конго (93)		9	См. приготовление, п. 31
12	Бумага лакмусовая (93)		10—11	См. приготовление, п. 34
13	Уксусная кислота, 1% раствор (96)	50	31	
14	Фенол, 1% раствор (93)	200	32	

№ п/п	Название реактива, его концентрация и номер работы (в скобках)	Количество реактива на 100 человек	Порядковый номер в лабораторной ящике	Примечание
15	Фенолфталеин, 0,5% спиртовой раствор (93) <i>Соли и простые вещества</i>	30 „	33	См. приготовление, п. 45
16	Железо хлорное, 1% раствор (93)	180 мл	39	
17	Кальций углекислый в порошке (95)	200 г	44	
18	Медь сернистая, 1% раствор (94)	150 мл	46	
19	Натрий двууглекислый, 10% раствор (94) <i>Щелочи</i>	40	51	
20	Натр едкий, 10% раствор (94) <i>Титрованные растворы в бюретках с сифонами</i>	60	68	
21	Натр едкий, 0,01 н. раствор (93)	4 л		См. приготовление, пп. 97—98

№ п/п	Оборудование и материалы	На одного студента	На группу в 25 человек
1	Колбочки для титрования (93)	2	50
2	Микробюретка для 0,01 н. раствора едкого натра (93)	1	25
3	Пипетка на 1 мл (93)	1	25
4	Термометр (94—96)	1	25
5	Фильтр бумажный (95)	2	50

Б. Конечные продукты азотистого обмена

Занятие 12

№ п/п	Название реактива, его концентрация и номер работы (в скобках)	Количество реактива на 100 человек	Порядковый номер в лабораторной ящике	Примечание
<i>Материал исследования</i>				
1	Моча (97—101)	750 мл	1	
<i>Органические реактивы</i>				
2	Пикриновая кислота, 10% раствор (98, 99)	50	22	
3	Ташира индикатор (101)	200	26	См. приготовление, п. 41
4	Хлороформ (100)	20	34	
<i>Соли и простые вещества</i>				
5	Калий марганцовокислый, 1% раствор (100)	20	42	
6	Натрий бромоватистокислый (щелочной раствор) (97)	1 000 „	В склянке емкостью 100 мл	См. приготовление, п. 60
7	Натрий нитропруссид, 5% раствор (98)	10	50	
8	Натрий хлористый, насыщенный раствор (готовится из столовой соли) (97)	20 л	В склянке емкостью 200 мл	См. приготовление, п. 62
9	Смесь для сжигания (101)	200 г	2 г (в пакетиках по 1 г)	См. приготовление, п. 66
<i>Минеральные кислоты</i>				
10	Серная кислота концентрированная (по возможности свежая, не содержащая аммиака) (101)	300 мл	60	
11	Соляная кислота концентрированная (100)	200	62	
12	Соляная кислота, 10% раствор (97)	400	63	
<i>Щелочи</i>				
13	Натр едкий, 10% раствор (98, 99)	400	68	

№ п/п	Название реактива, его концентрация и номер работы (в скобках)	Количество реактива на 100 человек	Порядковый номер в лабораторном ящике	Примечание
14	Натр едкий, концентрированный раствор (33%) (101)	1 000 мл	В склянке емкостью 100 мл	
<i>Титрованные растворы (в склянках с сифонами)</i>				
15	Натр едкий, 0,01 н. раствор (101)	600		См. приготовление, пп. 97—98
16	Серная кислота, 0,01 н. раствор (101)	1 000		См. приготовление, пп. 103—104
<i>Стандартные растворы</i>				
17	Калий двуххромовокислый, 0,5 н. раствор (99)	500	9	См. приготовление, п. 110

№ п/п	Оборудование и материалы	На одного студента	На группу в 25 человек
1	Асбест для плитки (101)		3 куска
2	Банки для мочи (97)	1	25
3	Барометр (97)		1
4	Вода дистиллированная (прокипяченная) (101)	100 мл	2,5 л
5	Горелка газовая (101)	2	50
6	Колба кьельдалевская для сжигания емкостью 15—25 мл (101)	2	50
7	Колба мерная емкостью 50 мл (или пробирка мерная на 10 мл) (97, 99)	1	25
8	Колориметр (99)		6—8
9	Микробюретки емкостью 5 мл с сифонами и склянками емкостью 500 мл—1 л для 0,01 н. раствора NaOH и 0,01 н. раствора серной кислоты (101)	2	26—50
10	Пипетка емкостью 1 мл (или на 0,2 мл) (99)	1	25
11	Пипетка емкостью 2 мл (или на 1 мл с делениями) (99)	1	25
12	Пипетка на 5—10 мл (97)	1	25
13	Плитка электрическая с жестяным барьером (101)		3
14	Прибор Бордина (97)		6—12
15	Прибор Кьельдаля (101)		6—12
16	Фильтр бумажный (97—101)	2	50
17	Склянки емкостью 100 мл для бромноватистокислого натрия и хлористого натрия (97)	2	12—24
18	Термометр комнатный (97)		1

Обмен минеральных веществ в животном организме

Занятие 13

№ п/п	Название реактива, его концентрация и номер работы (в скобках)	Количество реактива на 100 человек	Порядковый номер в лабораторном ящике	Примечание
<i>Материал исследования</i>				
1	Моча (102—109)	1800 мл	1	
<i>Органические реактивы</i>				
2	Метанитрофенол, 0,3% раствор (рН = 6,8—8,4) (102)	100 мл	В ящике для определения рН по Михаэлису 11 10	
3	Паранитрофенол, 0,1% раствор (рН = 5,4—7,0) (102)	100		
4	2,5-динитрофенол, 0,025% раствор (рН = 4,0—5,4) (102)	100		
5	Лакмус красный (102, 109)			
6	Лакмус синий (102)			
7	Универсальный индикатор (102)	20 мл		
8	Уксусная кислота, 10% раствор (108)	20		
9	Фенолфталеин, 0,5% спиртовой раствор (103)	20	33	См. приготовление, п. 45
<i>Соли и простые вещества</i>				
10	Аммоний молибденовокислый, 7,5% раствор в азотной кислоте (106)	150	35	См. приготовление, п. 48
11	Аммоний щавелевокислый, 5% раствор (108)	30	36	
12	Барий хлористый, 5% раствор (107)	50	37	
13	Калий хромовокислый, 5% раствор (105)	10	43	
14	Калий щавелевокислый в порошке (103)	100 г	44	
15	Серебро азотнокислое, 1% раствор (104)	20 мл	56	
<i>Минеральные кислоты</i>				
16	Азотная кислота, 10% раствор (104, 106)	70	59	
17	Соляная кислота, 10% раствор (107)	50	63	

№ п/п	Название реактива, его концентрация и номер работы (в скобках)	Количество реактива на 100 человек	Порядковый номер в лабораторном ящике	Примечание
<i>Щелочи</i>				
18	Аммиак, 10% раствор (104, 106, 108)	80 мл	65	
19	Кальция гидроксид, насыщенный раствор (109)	400	66	
<i>Титрованные растворы (в склянках с сифонами)</i>				
20	Натр едкий, 0,01 н. раствор (103)	2 000 .		См. приготовление, пп. 97—98
21	Серебро азотнокислое (эмпирический раствор), титр: 1 мл = 0,01 г NaCl (105)	1 000 .		
				См. приготовление, п. 102

№ п/п	Оборудование и материалы	На одного студента	На группу в 25 человек
1	Компоратор (102)	1	25
2	Колбочка коническая для титрования (105)	2	50
3	Прибор для определения концентрации водородных ионов по Михаэлису (102)	Набор стандартов с м-нитрофенолом (рН = 6,8—8,4), п-нитрофенолом (рН = 5,4—7,0), 2,5-γ-динитрофенолом (рН = 4,0—5,4) и универсальный индикатор	4—8
4	Пипетка на 1 мл с делениями (102)	1	25
5	Пипетка на 3 мл (102)	1	25
6	Пробирка с пробкой корковой (109)	1	25
7	Фильтр бумажный (106, 107, 108)	1—2 шт.	25—50.

РАЗДЕЛ III
ХИМИЯ ТКАНЕЙ

Кровь

З а н я т и е 14

№ п/п	Название реактива, его концентрация и номер работы (в скобках)	Количество реактива на 100 человек	Порядковый номер в лабораторном ящике	Примечание
<i>Материал исследования</i>				
1	Кровь оксалатная (берут заранее у кролика) (110)	40 мл	1	См. приготовление, п. 14
2	Сыворотка крови или кровь (привозят с бойни) (111)	200	2	Задача (см. ниже) заменяет сыворотку крови
<i>Органические реактивы</i>				
3	Гидрохинон, 1% раствор (111)	400	14	См. приготовление, п. 27
4	Глюкоза в порошке (110)	100 г	15	
5	Трихлоруксусная кислота, 20% раствор (111)	200 мл	27	
<i>Соли и простые вещества</i>				
6	Аммоний молибденовокислый (молибденовый реактив) (111)	400	7	См. приготовление, п. 49
7	Железо-аммиачные квасцы, 30% раствор (110)	40	38	См. приготовление, п. 51
8	Калий марганцовокислый, насыщенный раствор (110)	400	43	См. приготовление, п. 55
9	Содово-сернистый раствор (111)	400	8	См. приготовление, п. 67
<i>Минеральные кислоты</i>				
10	Азотная кислота концентрированная (110)	400	58	
11	Перекись водорода, свежеприготовленный 1% раствор (112)	400	64	См. приготовление, п. 78
12	Серная кислота, 10% раствор (112)	800	61	
<i>Стандартные растворы и задачи</i>				
13	Калий фосфорнокислый однозамещенный, стандартный раствор (111)	600	9	См. приготовление, п. 111

№ п/п	Название реактива, его концентрация и номер работы (в скобках)	Количество реактива на 100 человек	Порядковый номер в лабораторном ящике	Примечание
14	Задача на определение фосфора (111) <i>Титрованные растворы (в склянках с сифонами)</i>	Дается каждому студенту в пробирках приблизительно по 3 мл		См. приготовление, п. 113
15	Аммоний роданистый, 0,01 н. раствор (110)	1 600 мл		См. приготовление, п. 89
16	Калий марганцовокислый, 0,05 н. раствор (112)	5 000		См. приготовление, п. 94
17	Серебро азотнокислое, 0,01 н. раствор (110)	1 600		См. приготовление, п. 101

№ п/п	Оборудование и материалы	На одного студента	На группу в 25 человек
1	Бумага фильтровальная (110)	Кусочки	
2	Вата	1 г	25 г
3	Йод, спиртовой раствор для смазывания пальца после укола (112)		20 мл
4	Игла Франка (112)		5
5	Колориметр (111)		8—10
6	Колба коническая емкостью 50 мл (112)	1	25
7	Колба коническая емкостью 20—25 мл (110, 112)	6	150
8	Микробюретка с сифоном и склянкой емкостью 500 мл—1 л для 0,01 н. раствора азотнокислого серебра (110)	1	25 или 13
9	Микробюретка с сифоном и склянкой емкостью 500 мл—1 л для 0,01 н. раствора роданистого аммония (110)	1	25
10	Микробюретка с сифоном и склянкой емкостью 500 мл—1 л для 0,05 н. раствора марганцовокислого калия (112)	1	25
11	Микропипетка емкостью 0,02 мл для крови (112)	1	25
12	Микропипетка емкостью 0,1 мл для крови (110)	1	25
13	Микропипетка емкостью 0,2 мл для раствора крови (112)	1	25

№ п/п	Оборудование и материалы	На одного студента	На группу в 25 человек
14	Пипетка емкостью 1 мл, градуированная (112)	1	25
15	Пипетка емкостью 1 мл Мора (111, 112)	1	25
16	Пипетка емкостью 2 мл (110, 111)	1	25
17	Пипетка емкостью 20 мл для воды (112)	1	25
18	Пробирка градуированная или мерная колбочка емкостью 10 мл (111)	1	25
19	Спирт и эфир (для высушивания микропипеток) (110—112)		50 мл
20	Фильтр беззольный (111)	1	25

Нервная ткань
Занятие 15

№ п/п	Название реактива, его концентрация и номер работы (в скобках)	Количество реактива на 100 человек	Порядковый номер в лабораторном ящике	Примечание
	<i>Материал исследования</i>			
1	Мозг (получают с бойни) свежий (113—115)	300 г	В чашке Петри	
2	Мозг (высушенный, порошок) (114)	200 .	1	См. стр. 188, работа № 114
	<i>Органические реактивы</i>			
3	Ацетон (115)	100 мл	12	
4	Аскорбиновая кислота, 0,5% раствор (116)	100	13	
5	Лакмус синий (бумага) (113)		10	См. приготовление, п. 34
6	Лакмус красный (бумага) (113)		11	
7	α -нафтол, 0,1% спиртовой раствор (113)	30	21	См. приготовление п. 38
8	Спирт этиловый (115)	1000	24	
9	Сульфаниловая кислота, 1% раствор (113)	30	25	См. приготовление п. 40
10	Трихлоруксусная кислота, 5% раствор (116)	1000	27	
11	Уксусная кислота концентрированная (113)	50	29	
12	Уксусный ангидрид (114)	50	28	
13	Хлороформ (114)	600	34	

№ п/п	Название реактива, его концентрация и номер работы (в скобках)	Количество реактива на 100 человек	Порядковый номер в лабораторном ящике	Примечание
<i>Соли и простые вещества</i>				
14	Аммоний молибденовокислый, 2,5% раствор в серной кислоте (116)	500 мл	7	См. приготовление, п. 49
15	Йод, 0,1 н. раствор (116)	100	6	См. приготовление, п. 52
16	Кальций сернокислый в порошке (гипс) (114)	300 г	44	
17	Кадмий хлористый, насыщенный спиртовой раствор (115)	20 мл	42	См. приготовление, п. 53
18	Медь сернокислая, 1% раствор (113)	20	46	
19	Миллона реактив (113)	20	47	См. приготовление, п. 58
20	Натрий азотистокислый, 5% раствор (свежеприготовленный) (113)	30	48	
21	Натрий бромноватистокислый, 2% раствор (свежеприготовленный) (113)	50	49	См. приготовление, п. 59
22	Натрий сернистокислый, кислый, 0,1 н. раствор (116)	100	8	
23	Натрий углекислый, 10% раствор (113)	50	52	
<i>Минеральные кислоты</i>				
24	Азотная кислота, концентрированная (113)	100	58	
25	Серная кислота, концентрированная (114)	300	60	
<i>Щелочи</i>				
26	Натр едкий, 10% раствор (113)	250	68	
27	Натр едкий, 0,25% раствор (113)	1 000	66	
<i>Титрованные растворы (в склянках с сифонами)</i>				
28	Натр едкий, 0,1 н. раствор (116)	1 000	В бюретках емкостью 25 мл и склянках емкостью 100 мл	См. приготовление, пп. 97—98
29	Серная кислота, 0,1 н. раствор (116)	1 000		См. приготовление, п. 103
<i>Стандартные растворы</i>				
30	Раствор калия фосфорнокислого однозамещенного (0,01 мг фосфора в 1 мл) (116)	100	9	См. приготовление, п. 111

№ п/п	Оборудование и материалы	На одного студента	На группу в 25 человек
1	Бюретка для 0,1 н. раствора едкого натра (116)	1	25—13
2	Бюретка для 0,1 н. раствора серной кислоты (116)	1	25—13
3	Весы роговые с разновесами (116)		3—6
4	Колориметр (116)		8—10
5	Марля (10×10 см) (113)	2	50
6	Палочки стеклянные для мерных пробирок (113, 116)	2	50
7	Пипетка емкостью 1 мл с делениями (116)	1	25
8	Пипетка емкостью 5 мл с делениями (116)	1	25
9	Пробирки мерные емкостью 10 мл (113, 116)	3	75
10	Пробирка сухая с пробкой (114)	4	100
11	Скальпель (114)	1	25
12	Слянки на 100 мл для 0,1 н. растворов едкого натра и серной кислоты (116)	2	50—26
13	Стекло (10×10 см) (114)	1	25
14	Стекло часовое (116)	1	25
15	Ступка фарфоровая с пестиком (113, 116)	1	25
16	Термометр (115)	1	25
17	Фильтр бумажный (113, 114, 116)	2	50
18	Шкаф сушильный (114)		1

Мышечная ткань

№ п/п	Название реактива, его концентрация и номер работы (в скобках)	Количество реактива на 100 человек	Порядковый номер в лабораторном ящике	Примечание
<i>Материал исследования</i>				
1	Мышечная ткань, измельченная в мясорубке (117, 119)	500 г		В чашке Петри
2	Мышечная ткань свежееубитого животного (или печень) (118)	100 „		То же
<i>Органические реактивы</i>				
3	Гваяковая смола, 1% спиртовой раствор (117)	20 мл	16	См. приготовление, п. 26
4	Пикриновая кислота, 10% раствор (119)	50	22	
5	Спирт этиловый 96° (118)	100	24	
6	Сульфаниловая кислота, 1% раствор (119)	30	25	См. приготовление, п. 40
7	Уксусная кислота, 1% раствор (118)	100 „	31	
8	Фенол, 1% раствор (119)	100 „	32	

№ п/п	Название реактива, его концентрация и номер работы (в скобках)	Количество реактива на 100 человек	Порядковый номер в лабораторном ящике	Примечание
<i>Соли и простые вещества</i>				
9	Аммоний сернокислый в порошке (117)	400 г	36	См. приготовление, п. 52
10	Аммоний сернокислый, насыщенный раствор (117)	100 мл	35	
11	Железо хлорное, 1% раствор (119)	10	39	
12	Йод, 1% раствор в 2% растворе йодистого калия (118)	40	41	
13	Калий хлористый, 5% раствор (117)	60	43	
14	Медь сернокислая, 1% раствор (117)	60	46	
15	Натрий азотистокислый, 5% раствор (свежеприготовленный) (119)	30	48	
16	Натрий нитропруссид, свежеприготовленный 5% раствор (119)	10	50	
17	Натрий углекислый, 10% раствор (119)	50	52	
<i>Минеральные кислоты</i>				
18	Серная кислота, 10% раствор (119)	20	60	См. приготовление, п. 75
19	Перекись водорода, 3% раствор (свежеприготовленный) (117)	20	63	См. приготовление, п. 78
<i>Щелочи</i>				
20	Натр едкий, 10% раствор (117)	250 "	68	

№ п/п	Оборудование и материалы	На одного студента	На группу в 25 человек
1	Марля для фильтрования (10×10 см) (117)	4	100
2	Пробирка и трубка для гидролиза (117)	1	25
3	Пробирка мерная или цилиндрик на 10 мл (117)	1	25
4	Ступка фарфоровая с пестиком (117, 118, 119)	1	25
5	Фильтр бумажный (117, 118)	2	50
6	Чашка фарфоровая (118)	1	25
7	Штатив железный с 3 кольцами и сеткой (для гидролиза) (117, 118)	1	25

РАЗДЕЛ IV
ОБМЕН ВЕЩЕСТВ В РАСТЕНИЯХ
Обмен углеводов и жиров
З а н я т и е 16

№ п/п	Название реактива, его концентрация и номер работы (в скобках)	Количество реактива на 100 человек	Порядковый номер в лабораторном ящике	Примечание
<i>Материалы исследования</i>				
1	Алоэ в порошке (126)	20 г	1	
2	Бадан, измельченные свежие листья (125)	100	2	
3	Дрожжи свежие (124)	100	3	
4	Листья зеленые (120)	200 "	В чашке Петри в ящичке	
5	Листья пожелтевшие (120)	200 "	То же	
6	Лук, измельченный на терке (121)	100 "	4	} Или в тигельках
7	Морковь, измельченная на терке (121)	100 "	5	
8	Масло подсолнечное, свежее (127, 128, 129)	250 мл	6	
9	Масло подсолнечное, несвежее (128)	250 "	7	
10	Мука соевая (123)	200 г	8	
11	Толокнянка в порошке (арбутин) (125)	20 "	9	
12	Фасоль проросшая (122)	200 "	В чашке Петри в ящичке	См. приготовление, п. 18
13	Фасоль набухшая (122)	200	То же	См. приготовление, п. 18
<i>Органические реактивы</i>				
14	Глюкоза, 5% раствор (124)	2 000 мл	В склянке емкостью 100 мл	
15	Крахмал, 0,5% раствор (128)	40	18	См. приготовление, п. 32
16	Спирт этиловый 96° (120)	200	24	
17	Смесь уксусной кислоты с хлороформом (в соотношении 2:1) (128)	100 "	30	
18	Смесь формалина с серной концентрированной кислотой (в соотношении 50:1) (129)	200	32	
19	Толуол (123)	40	26	
20	Уксусный ангидрид (129)	60	28	
21	Фенолфталеин, 0,5% раствор (123)	20	33	См. приготовление, п. 45
22	Хлороформ (129)	100	34	
<i>Соли и простые вещества</i>				
23	Бромная вода (127)	40 мл	37	См. приготовление, п. 50
24	Железо сернистое в порошке (125)	20 г	38	

№ п/п	Название реактива, его концентрация и номер работы (в скобках)	Количество реактива на 100 человек	Порядковый номер в лабораторной ящике	Примечание	
25	Железо хлорное, 1% раствор (125)	10 мл	39	См. приготовление, п. 52	
26	Раствор йода в йодистом калии, 10% раствор (124)	50 "	40		
27	Раствор йода в йодистом калии, 1% раствор (120, 122)	40 "	41		
28	Калий йодистый, 2% раствор (128)	50 "	42		
29	Медь сернокислая, 7% раствор (121, 122, 125)	200 "	45		
30	Натрий гипосульфит, 0,1 н. раствор (128)	200 "	51	См. приготовление, п. 65	
31	Свинец уксуснокислый, 10% раствор (122)	80 "	55		
32	Сегнетова соль, щелочной раствор (121, 122, 125)	200 "	57		
<i>Щелочи</i>					
33	Натр едкий, 33% раствор (125)	10 "	67		
34	Натр едкий, 10% раствор (124, 126)	1 100 "	В склянке на 100 мл		
<i>Титрованные растворы (в склянках с сифонами)</i>					
35	Натр едкий, 0,01 н. раствор (123)	500		См. приготовление, п. 98	

№ п/п	Оборудование и материалы	На одного студента	На группу в 25 человек
1	Бумага фильтровальная (121—125)	10	250
2	Весы роговые (123)		6—8
3	Колбочка коническая на 25 мл (123, 125)	1	25
4	Колба мерная на 25 мл (123)	1	25
5	Микробюретка с сифоном и склянкой для 0,01 н. раствора едкого натра (123)	1	25
6	Порошок стеклянный (123, 125)	0,4 г	20 г
7	Пипетка глазная сухая (129)	1	25
8	Пипетка емкостью 5 мл с делениями (123)	1	25
9	Прибор бродильный (124)	1	25
10	Пробирки центрифужные (122)	1—2	25—50
11	Пробирки сухие (129)	2	50
12	Склянки емкостью 100 мл для 5% раствора глюкозы и 10% раствора едкого натра (124)	2	26—50
13	Стаканчик на 15—20 мл или пробирка (125)	1	25

№ п/п	Оборудование и материалы	На одного студента	На группу в 25 человек
14	Ступка фарфоровая с пестиком (122, 123, 124, 125)	1	25
15	Сушильный шкаф (129)		1
16	Термостат с t° 40° (125)		1
17	Центрифуга (122)		2—4

Обмен азотистых и минеральных веществ

Занятие 17

№ п/п	Наименование реактива, его концентрация и номер работы (в скобках)	Количество реактива на 100 человек	Порядковый номер в лабораторном ящике	Примечание
<i>Материал исследования</i>				
1	Дрожжи сухие (132)	80 г	1	
2	Лист зеленый (130)	200 шт.	В чашке Петри в ящике	
3	Лук репчатый (133)	40 г	2	
4	Мука пшеничная (131)	200 "	3	
5	Термопис (сухие листья) (133)	40 "	4	
6	Солянка (сухие листья) (134)	40 "	5	
<i>Органические реактивы</i>				
7	Глюкоза в порошке (134)	20 г	15	
8	Дифениламин, 2% раствор в серной кислоте (130)	30 мл	17	См. приготовление, п. 30
9	Спирт этиловый, 70% раствор (131)	600	24	
10	Танин, насыщенный раствор (133)	60	27	
11	Толуол (132)	40	26	
12	Уксусная кислота, 0,2% раствор (131)	1200 "	8	
13	Формоловая смесь (132)	500 "	9	См. приготовление, п. 46
<i>Соли и простые вещества</i>				
14	Аммоний сернокислый в порошке (131)	20 г	36	
15	Аммоний сернокислый, насыщенный раствор (131)	100 мл	35	
16	Железо-аммиачные квасцы, 30% раствор (134)	30	38	См. приготовление, п. 51
17	Раствор йода в йодистом калии, 1% раствор (133)	60	41	См. приготовление, п. 52
18	Калий марганцовокислый, насыщенный раствор (134)	200	43	См. приготовление, п. 55
19	Медь сернокислая, 1% раствор (131)	10	46	

№ п/п	Наименование реактива, его концентрация и номер работы (в скобках)	Количество реактива на 100 человек	Порядковый номер в лабораторной ящике	Примечание
20	Натрий хлористый, 10% раствор (131) <i>Минеральные кислоты</i>	400 мл	53	
21	Азотная кислота (в разведении 1:1) (134) <i>Щелочи</i>	1 000 .	7	
22	Натр едкий, 10% раствор (131)	50	68	
23	Натр едкий, 0,2% раствор (131) <i>Титрованные растворы в склянках с сифонами</i>	200 .	66	
24	Аммоний роданистый, 0,01 н. раствор (134)	2 000		См. приготовление, п. 89
25	Натр едкий 0,01 н. раствор (132)	640 мл		См. приготовление, пп. 97—98
26	Серная кислота, 0,01 н. раствор (132)	640		См. приготовление, пп. 103—104
27	Серебро азотнокислое, 0,01 н. раствор (134)	2 000		См. приготовление, п. 101

№ п/п	Оборудование и материалы	На одного студента	На группу в 25 человек
1	Бюретка и склянка емкостью 100 мл для дистиллированной воды (131—133)	1	25
2	Весы роговые с разновесом на 100 мг (134)	1	25
3	Колбочка коническая (132)	5	125
4	Крышка фарфоровая от тигля (130)	1	25
5	Микробюретки с сифоном и склянкой для 0,01 н. раствора едкого натра и для 0,01 н. раствора серной кислоты (132)	2	26—50
6	Микробюретка с сифоном и склянкой для 0,01 н. раствора роданистого аммония (134)	1	25
7	Микробюретка с сифоном и склянкой для 0,01 н. раствора азотнокислого серебра (134)	1	13
8	Порошок стеклянный (132)	0,4 г	10 г
9	Пипетка на 5 мл с делениями (131, 132, 134)	2	50
10	Пробирка мерная емкостью 10 мл (132, 133)	1	25
11	Ступка фарфоровая (131—133)	1	25
12	Термостат (132)		1
13	Фильтр бумажный (131)	10	250

№ п/п	Название реактива, его концентрация и номер работы (в скобках)	Количество реактива на 100 человек	Порядковый номер в лабораторном ящике	Примечание
<i>Материал исследования</i>				
1	Грамицидин (145, 146)	40 мл	1	
2	Крапива сухая (135, 136)	100 г	2	
3	Пенициллин, 0,5% раствор (143, 144)	70 мл	3	
4	Стрептомицин, 1% раствор (147, 148)	30	4	
5	Шиповник (ягоды) или календула (141, 142)	30 г	5	
<i>Органические реактивы</i>				
6	Аскорбиновая кислота в порошке (139)	20 "	13	В склянках емкостью 100 мл
7	Бензин (137, 142)	2 500 мл	14	
8	Гидроксиламин, 5% раствор (143)	20 "	16	
9	α -нафтол, 0,1% спиртовой раствор (148)	30 "	21	
10	Пикриновая кислота, 10% раствор (145)	10 "	22	
11	Спирт этиловый 96° (136)	1 000 "	24	
12	Хлороформ (141)	100 "	34	
<i>Минеральные кислоты</i>				
13	Соляная кислота, 10% раствор (140, 147)	80 "	62	См. приготовление, п. 76
14	Серная кислота концентрированная (141)	50 "	60	
<i>Щелочи</i>				
15	Бария гидроксид, насыщенный раствор (138)	200 "	65	См. приготовление, п. 79
16	Натр едкий, концентрированный раствор (144)	20 "	67	
17	Натр едкий, 10% раствор (146, 147, 148)	130 "	68	
<i>Соли и простые вещества</i>				
18	Железо хлорное, 5% раствор (143)	20 "	38	
19	Железо хлорное, 1% раствор (147)	20	39	
20	Магния окись (прокаленная) (142)	500 г	44	
21	Медь сернокислая, 0,1% раствор (146)	10 мл	45	

№ п/п	Название реактива, его конден-трация и номер работы (в скобках)	Количество реактива на 100 человек	Порядо-вый номер в лабора-торном ящике	Примечание
22	Натрий бромноватистокислый, 2% раствор (свежеприготов-ленный) (148)	100 мл	49	
23	Натрий нитропруссид (свеже-приготовленный), 5% рас-твор (144)	30 „	50	
24	Натрий сернокислый (безвод-ный), сухой (142)	20 г	52	
<i>Стандартные растворы</i>				
25	Калий двухромовокислый, 30 мг% раствор (142)	1 000 мл	9	

№ п/п	Оборудование и материалы	На од-ного сту-дента	На группу в 25 че-ловек
1	Вата (142)	1 г	25 г
2	Пипетка глазная сухая (142)	1	25
3	Порошок стеклянный (141, 142)	2 г	50 г
4	Пробирка сухая (142)	2	50
5	Пробирка отсасывательная (142)	1	25
6	Склянки емкостью 100 мл для бензи-на (142)	1	25—13
7	Ступка фарфоровая с пестиком (136, 141, 142)	1	25
8	Термометр (139)	1	25
9	Трубка адсорбционная (142)	1	25
10	Фильтр бумажный (136)	2	50
<i>На группу</i>			
11	Аппарат Сокслета (135)		2 шт.
12	Баня водяная (135)		2
13	Гильза из обезжиренной фильтровальной бумаги (135)		2 „
14	Крапива сухая (135)		2 па-кета по 25 г
15	Трубка каучуковая для холодильника (135)		5 м
16	Штатив для аппарата Сокслета с 3 лап-ками и с кольцом для бани (135)		2
17	Эфир (135)		2 склянки по 250 мл

ПРИГОТОВЛЕНИЕ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ НЕКОТОРЫХ РЕАКТИВОВ, ТИТРОВАННЫХ И БУФЕРНЫХ РАСТВОРОВ

1. МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Белок пшеничный, 1% щелочной раствор

200 мг пшеничной (или соевой) муки растирают в фарфоровой ступке с 5 мл 0,2% раствора NaOH (0,1 н. раствор, разбавленный 1 л). После отстаивания верхний слой жидкости сливают и употребляют для цветных реакций. В пшеничной муке содержится 8—9% белка.

2. Белок яичный неразведенный

Белок куриного яйца фильтруют через марлю. После фильтрования теряется тягучесть белка (обработку желтка см. п. 9).

3. Белок яичный, 1% раствор

Белок куриного яйца фильтруют через марлю. Один объем профильтрованного белка смешивают с 10—12 объемами дистиллированной воды, тщательно перемешивают и фильтруют. Белок куриного яйца содержит от 10 до 13% альбумина и глобулина. При разведении водой глобулин выпадает в осадок и его отделяют путем фильтрования.

4. Викасол, 0,05% раствор

5 таблеток продажного викасола, содержащих 75 мг витамина (1 таблетка = 15 мг викасола), растирают в фарфоровой ступке и там же растворяют в 100—150 мл дистиллированной воды. Раствор фильтруют через бумажный фильтр и фильтрат употребляют для реакций.

5. Вытяжка из свежей поджелудочной железы (трипсин)

В клетках поджелудочной железы образуется трипсиноген (неактивная форма трипсина), который под влиянием энтерокиназы кишечного сока превращается в активный трипсин. Измельченную железу выдерживают на воздухе 5—10 часов, после чего растирают в фарфоровой ступке с раствором глицерина¹, слегка подкисленным уксусной кислотой (на 1 г железы берут 4 мл раствора глицерина), и оставляют на сутки. На следующий день жидкость отделяют от остатков ткани центрифугированием (или фильтруют через марлю).

Перед употреблением полученный экстракт разводят 4 объемами 0,4% раствора двууглекислого натрия (NaHCO₃). Реакция среды должна быть слабо щелочной на фенолфталеин. Кроме трипсина, вытяжка содержит амилазу, липазу и др.

Вытяжка из свежей поджелудочной железы (липаза)

Панкреатическую железу возможно быстрее после забоя животного измельчают, смешивают с 3—4 мл желчи и растирают в фарфоровой ступке со стеклом или песком в течение 30 минут. Смесь переносят в склянку из темного стекла и заливают 4 объемами водного глицерина (2 части глицерина + 1 часть воды), добавляют несколько кристалликов тимола и оставляют на 2—3 дня. По истечении этого времени жидкость фильтруют через марлю (или центрифугируют) и фильтрат

¹ Раствор глицерина готовят смешиванием двух объемов глицерина с одним объемом дистиллированной воды.

хранят в холодном месте (сохраняется в течение года). В вытяжке присутствуют липаза, амилаза и другие ферменты поджелудочной железы. Перед употреблением вытяжку разводят 4 объемами воды или 0,2% раствором NaHCO_3 . Реакция среды должна быть нейтральной или слабо щелочной ($\text{pH} = 7,0\text{--}8,0$).

6. Вытяжка из сухого панкреатина

Сухой препарат панкреатина настаивают с 10 частями 50% или 85% водным раствором глицерина при температуре 30° в течение 4—8 часов. Вытяжку центрифугируют и получают прозрачный раствор, содержащий ферменты амилазу, липазу, трипсин, протаминазу, нуклеазу и полипептидазу. Глицерин является хорошим дезинфицирующим веществом и предохраняет вытяжку от действия микроорганизмов. Перед употреблением глицериновую вытяжку разводят водой в 5 раз. Для приготовления водной вытяжки на 1 часть железы берут 50 частей воды. Водная вытяжка не может долго сохраняться.

Получение сухого панкреатина (сухой ферментный препарат из панкреатической железы). Поджелудочную железу, по возможности освобожденную от жира, измельчают в мясорубке 3—5 раз и растирают в течение 30 минут в фарфоровой ступке с 2 объемами ацетона (на 100 г железы берут 200 мл ацетона), добавляя его небольшими порциями, и оставляют на час. Через час хлопья отфильтровывают и обрабатывают вторично тем же количеством ацетона, затем смесью ацетона и эфира (1 л) и 2 раза таким же объемом чистого эфира. Порошок высушивают между листами фильтровальной бумаги на воздухе. Вес сухого вещества составляет приблизительно $\frac{1}{5}$ веса железы. Сухое вещество размельчают в фарфоровой ступке и просеивают через сито. Пылеобразная фракция составляет $\frac{2}{3}$ всей высушенной железы и содержит значительно больше ферментов, нежели волокнистая. Отсеивание порошка удобно производить в закрытом эксикаторе, в котором вместо вставки помещено сито соответствующего размера. Сито можно приготовить из капроновой ткани, обшив ею кольцо от бани, плотно прилегающее к стенкам эксикатора.

7. Вытяжка из слизистой оболочки свиного желудка (или раствор пепсина в 0,5% растворе HCl)

Желудок разрезают, промывают водой и соскабливают слизистую оболочку ножом. Соскоб ткани растирают в ступке с битым стеклом или песком и настаивают с 1 л 0,5% раствора HCl (1 л концентрированной HCl на 1 л дистиллированной воды). Раствор фильтруют через марлю. Остаток слизистой оболочки настаивают с 0,5% раствором HCl таким же образом еще 2—3 раза. Из одного желудка можно получить 3—4 л искусственного желудочного сока. Для лучшей сохранности полученный раствор смешивают с равным объемом глицерина.

8. Вытяжка из хрена

100 г измельченного на терке хрена настаивают в течение 3—4 часов со 100 мл дистиллированной воды (или со 100 мл 0,05% раствора углекислого натрия). Вытяжку время от времени встряхивают и фильтруют через двойной слой марли.

9. Желток яичный (порошок)

Желток куриного яйца намазывают тонким слоем на стеклянные пластинки размером 20×20 см или 30×20 см и высушивают на воздухе. Сухую массу соскабливают ножом и порошок сохраняют в сухом прохладном месте. Вместо сухого желтка можно пользоваться прожаренным яичным порошком.

10. Желудочный сок активный (1% раствор пепсина в 0,5% растворе HCl)

10 г продажного пепсина растворяют в 1 л 0,5% раствора HCl. Для приготовления 0,5% раствора HCl отмеривают цилиндром 11 мл концентрированной HCl и разбавляют дистиллированной водой до 1 л.

11. Желудочный сок для титрования

Для приготовления желудочного сока с нормальной, повышенной и пониженной кислотностью и с отсутствием соляной кислоты заготавливают следующие реактивы: 1) 100 мл HCl в разведении 1 10; для этого к 10 мл концентрированной HCl добавляют 90 мл дистиллированной воды; 2) 25 мл молочной кислоты в разведении 1 10; для этого к 2,5 мл концентрированной молочной кислоты добавляют 22,5 мл дистиллированной воды; 3) 2 л 1% раствора желатина (или другого белка); для этого 10 г желатина растворяют сначала при нагревании в небольшом количестве воды и полученный раствор разбавляют дистиллированной водой до 2 л; 4) 5 г кристаллического однозамещенного фосфорнокислого натрия (NaH_2PO_4).

Желудочный сок с нормальной кислотностью. Смешивают приготовленные реактивы в следующих соотношениях: 0,5% раствора желатина 500 мл, HCl (1 10) 22,5 мл, молочной кислоты (1 10) 5 мл, NaH_2PO_4 кристаллического 1,25 г. В результате анализа получают приблизительно следующие величины: общая кислотность 52—53, свободная HCl 29—30, связанная HCl 14—15.

Желудочный сок с повышенной кислотностью. Смешивают приготовленные реактивы в следующих соотношениях: 0,5% раствора желатина 500 мл, HCl (1 10) 35 мл, молочной кислоты (1 10) 5 мл, NaH_2PO_4 0,5 г. В результате анализа получают приблизительно следующие величины: общая кислотность 74—76, свободная HCl 54—55, связанная HCl 14—15.

Желудочный сок с пониженной кислотностью. Смешивают приготовленные реактивы в следующих соотношениях: 0,5% раствора желатина 500 мл, HCl (1 10) 11 мл, молочной кислоты (1 10) 5 мл, NaH_2PO_4 0,5 г. В результате анализа получают приблизительно следующие величины: общая кислотность 25—26, свободная HCl 11—12, связанная HCl 8—9.

Желудочный сок с отсутствием HCl и наличием молочной кислоты. Смешивают приготовленные реактивы в следующих соотношениях: 0,5% раствора желатина 500 мл, молочной кислоты (1 10) 7,5 мл, NaH_2PO_4 0,5 г. В результате анализа получают приблизительно следующие величины: общая кислотность 9,0, свободной HCl нет, качественная реакция на молочную кислоту положительная.

12. Желчь

Свежая желчь может быть заменена продажной сгущенной желчью. К 20 мл продажной сгущенной желчи добавляют 80 мл дистиллированной воды.

Желчь, разведенная 1 2. Желчь, разведенная 1:2, может быть заменена разведенной продажной желчью. Для этого к 20 мл сгущенной продажной желчи добавляют 280 мл дистиллированной воды.

13. Инсулин

Для экономии можно использовать препарат инсулина, срок годности которого окончился.

14. Кровь оксалатная

Для предупреждения свертывания крови в тигелек, приготовленный для взятия крови, добавляют 2—5 мг щавелевокислого натрия. Концентрация оксалата во взятой крови должна быть около 0,1%. Кровь

берут из ушной вены кролика и каждую падающую в тигелек каплю крови смешивают с оксалатом при помощи маленькой стеклянной палочки.

15. Мышечная кашица

Мышечную кашицу готовят из мяса только что забитой крысы, кролика или другого животного. Мясо измельчают ножницами; при больших количествах мяса пользуются мясорубкой.

16. Рибофлавин, 0,025% раствор (витамин В₂)

25 мг рибофлавина растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Часть рибофлавина остается в виде взвеси.

17. Раствор аминокислот для хроматографического анализа

Заготавливают растворы, состоящие из трех различных аминокислот, по следующей прописи:

Смесь № 1: в 10 мл дистиллированной воды растворяют 60 мг глютаминной кислоты, 40 мг аланина и 50 мг лейцина.

Смесь № 2: в 10 мл дистиллированной воды растворяют 60 мг глютаминной кислоты, 40 мг гликокола и 40 мг аланина.

Смесь № 3: в 10 мл дистиллированной воды растворяют 60 мг аспарагиновой кислоты, 40 мг серина и 40 мг лейцина.

Смесь № 4: в 10 мл дистиллированной воды растворяют 60 мг аспарагиновой кислоты, 40 мг гликокола и 60 мг лейцина.

18. Фасоль (проросшие и набухшие семена)

Семена фасоли одинакового размера помещают между листами влажной фильтровальной бумаги (или в опилках) и оставляют при комнатной температуре на 3—4 дня. Признаком прорастания семян является появление маленьких ростков длиной не более 1 см.

Набухшие семена фасоли получают тем же способом, но берут их через 1 сутки.

19. Фибрин

Свежевыпущенную кровь непрерывно помешивают палочкой. На палочке оседают нити фибрина. Фибрин снимают и отмывают в проточной воде в течение нескольких дней. Сначала сгусток фибрина подвешивают в марлевой салфетке к водопроводному крану на несколько часов, а затем отмывают его руками в тазу с холодной водой до полной белизны. Хранят фибрин в спирте в закрытой банке. Перед употреблением тщательно отмывают от спирта.

Фибрин окрашенный. Волокна фибрина погружают в 0,1% глицириновый раствор кармина. Фибрин окрашивается в красный цвет. После окраски фибрин тщательно отмывают водой.

20. Фолликулин, спиртовой раствор

10 ампул масляного раствора фолликулина тщательно взбалтывают со 100 мл этилового спирта. Получается нестойкая эмульсия. После отстаивания верхний спиртовой раствор сливают и употребляют для реакций.

21. Щитовидная железа (высушенный препарат)

250 г свежих щитовидных желез пропускают 2 раза через мясорубку и тщательно растирают 30 минут в фарфоровой ступке, все время подливая небольшими порциями 500 мл этилового спирта. Содержимое

ступки переносят в банку, закрывают пробкой и оставляют. На следующий день спирт отделяют фильтрованием на бюхнеровской воронке, осадок переносят в фарфоровую ступку, вновь растирают 15—20 минут с 500 мл спирта и вторично оставляют на ночь со спиртом в той же банке. Осадок отфильтровывают и заливают в банке 500 мл эфира; время от времени взбалтывают. Через 1—2 часа фильтруют, на фильтре промывают новой порцией 200—300 мл эфира, высушивают сначала на воздухе между листами фильтровальной бумаги. Количество полученной высушенной железы может обеспечить работу 100 человек.

II. ОРГАНИЧЕСКИЕ РЕАКТИВЫ

22. Анилин

Если анилин красного цвета, его перед употреблением перегоняют

23. Анилиновый реактив

Смешивают 15 частей анилина с 1 частью концентрированной соляной кислоты.

24. Бензидин, 0,2% спиртовой раствор

0,2 г бензидина растворяют в 100 мл 96° этилового спирта. Хранят в темной склянке не более недели.

25. Бензидиновый реактив

0,2 г бензидина растворяют в 20 мл ледяной уксусной кислоты (1% раствор бензидина в ледяной уксусной кислоте).

26. Гваяковая смола, 1% спиртовой раствор

1 г гваяковой смолы растворяют в 100 мл 50% спирта и сохраняют в склянке из темного стекла.

27. Гидрохинон, 1% раствор

1 г гидрохинона растворяют в 100 мл дистиллированной воды и добавляют 1 каплю концентрированной серной кислоты. Раствор должен быть почти бесцветным. При длительном стоянии он приобретает коричневую окраску и тогда уже не годен к употреблению.

28. Глюкоза, стерильный 40% раствор

40 г глюкозы растворяют при нагревании в 60 мл дистиллированной воды. Раствор фильтруют через складчатый фильтр и переливают в баночку с притертой пробкой. Пробку обвязывают пергаментной бумагой. Раствор стерилизуют в течение 30 минут. Если нет стерилизатора, пользуются водяной баней.

29. Диметиламиноазобензол, 0,5% раствор (индикатор)

0,25 г п-диметиламиноазобензола растворяют в 50 мл этилового спирта. Зона перехода при $\text{pH} = 2,9\text{—}4,0$ (красный — желтый).

30. Дифениламин, раствор в H_2SO_4

2 г дифениламина растворяют в 100 мл концентрированной H_2SO_4 .

Дифениламиноновый реактив

Отвешивают 100 мг дифениламина и растворяют в 10 мл концентрированной уксусной кислоты, добавляют 0,28 мл концентрированной серной кислоты. Чтобы знать, сколько капель серной кислоты нужно добавить, поступают так: в мерную сухую пробирку капают из глазной

пипетки 1 мл концентрированной H_2SO_4 и записывают количество капель, то же повторяют еще раз, берут среднее, т. е. определяют сколько капель в 1 мл концентрированной H_2SO_4 ; рассчитывают, сколько капель H_2SO_4 в 0,28 мл концентрированной H_2SO_4 , и это количество добавляют в реактив.

31. Конгорот, конго-бумага

0,2 г конгорот растворяют в 50 мл 50% этилового спирта. В полученный раствор погружают на короткий срок полоски фильтровальной бумаги и развешивают их в помещении с чистым воздухом. Приготовленная бумага должна окрашиваться в сине-фиолетовый цвет при $pH = 3,0$ и ниже и в красный — при $pH = 5,2$ и выше.

32. Крахмал, 0,5—1% раствор (индикатор)

0,5 или 1 г продажного растворимого крахмала размешивают в 10 мл воды и вливают в 90 мл кипящей воды, кипятят 1—2 минуты и охлаждают. Если пользуются обычным картофельным крахмалом, то раствор его обязательно фильтруют. Раствор хорошо сохраняется месяцами, если к нему прибавить до насыщения (35 г) химически чистого $NaCl$ или 28 г KCl . Способ приготовления растворимого крахмала см. № 33.

33. Крахмал растворимый, 0,1% раствор

1 г продажного растворимого крахмала размешивают в 10 мл дистиллированной воды и вливают в 1 л кипящей воды. Раствор переливают в стеклянную емкость 100 мл, которые ставят около бюретки на 25 мл с надписью «Крахмал 0,1% для метода Вольгемута». Для приготовления растворимого крахмала 23 г воздушно сухого картофельного крахмала помещают в 1 л 1 н. раствора HCl и оставляют на 2 недели при комнатной температуре, время от времени помешивая. После настаивания крахмал отфильтровывают, тщательно промывают водой и высушивают при температуре не выше 50° . Можно получить растворимый крахмал настаиванием с 7,5% раствором HCl при 40° в течение 3 дней, но в этом случае имеется опасность освобождения редуцирующих групп.

34. Лакмусовая бумага (индикатор)

0,2 г растертого лакмуса растворяют при размешивании в подщелоченной воде (80 мл дистиллированной воды + 9 мл $1/10$ н. раствора едкого натра). Раствор фильтруют и прибавляют 20 мл этилового спирта. В полученный раствор погружают на короткий срок полоски хорошей фильтровальной бумаги, по возможности с меньшим количеством золы, после чего полоски развешивают в помещении с чистым воздухом для сушки. Полученная бумага должна давать нейтральную реакцию в растворе фосфатной буферной смеси, приготовленной с $pH = 6,9—7,0$ (см. приготовление пп. 85 и 86). При $pH = 6,47$ бумага должна показывать слабокислую реакцию, при $pH = 7,17$ — слабо щелочную. Зона перехода при $pH = 5,0—8,0$ (красная — синяя).

35. Метиленовая синь, 0,05% водный раствор

а) 5 мл насыщенного спиртового (2%) раствора метиленовой сини растворяют в 195 мл дистиллированной воды; б) 100 мг метиленовой сини растворяют в 200 мл дистиллированной воды.

36. Метиленовая синь с формальдегидом

Растворяют 5 мл насыщенного (2%) спиртового раствора метиленовой сини и 5 мл формалина в 190 мл дистиллированной воды. Получают 0,05% раствор метиленовой сини в 1% растворе формальдегида (продажный формалин является 40% раствором формальдегида).

37. Метиловый красный, 0,02% раствор

10 мг метилового красного (метилрот) растворяют в 50 мл водного спирта (30 мл спирта + 20 мл воды). Зона перехода при $\text{pH} = 4,2-6,3$ (красная — желтая).

38. α -нафтол 0,1 и 1%

0,1 г или 1 г α -нафтола растворяют в 100 мл 70% этилового спирта.

39. Смазка для стеклянных кранов

500 г вазелина и 10 г натурального каучука (нарезанного маленькими кусочками) нагревают на водяной бане при температуре 100° до тех пор, пока каучук не растворится (приблизительно 6 дней). В горячий сплав прибавляют щепотку воска для густоты. Если смазка получится жидкой, добавляют вторую щепотку воска.

40. Сульфаниловая кислота, 1% раствор

1 г сульфаниловой кислоты растворяют в 100 мл 2% раствора соляной кислоты.

41. Ташира индикатор

Основной раствор: 40 мл 0,1% спиртового раствора метилового красного смешивают с 10 мл 0,1% спиртового раствора метиленовой сини. Рабочий раствор: к 1 объему основного раствора прибавляют 1 объем спирта и 2 объема воды.

Примечание. Ташир — фамилия автора, предложившего пользоваться в качестве индикатора смесью, состоящей из метилового красного и метиленовой сини. Переход окраски этого сложного индикатора от фиолетового цвета к зеленому легче улавливается глазом, чем от красного к желтому (через оранжевый). При отсутствии индикатора Ташира можно пользоваться раствором метилового красного (см. приготовление, п. 37).

Название индикатора	Окраска при pH	
	4,2	6,3
Метиловый красный	Красная	Желтая
Метиленовая синь	Синяя	Синяя
Индикатор Ташира	Фиолетовая	Зеленая

42. Тирозин, 0,1% раствор в 0,01 н. растворе Na_2CO_3

0,5 г тирозина и 0,27 г безводной Na_2CO_3 растворяют в 500 мл дистиллированной воды при слабом нагревании. Вместо безводной соды можно пользоваться $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ в количестве 0,58 г или $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ в количестве 0,72 г.

Молекулярный вес: $\text{Na}_2\text{CO}_3 = 106,00$; $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O} = 124,02$;
 $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 232,12$; $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O} = 286,16$.

43. Универсальный индикатор

В 100 мл этилового спирта растворяют: бромтимоловой сини 80 мг, диметиламиноазобензола 60 мг, метилового красного 40 мг, тимоловой сини 100 мг, фенолфталеина 20 мг.

**Окраска универсального индикатора
при разных значениях pH**

pH		4	6	8	10
Окраска универсального индикатора	Красная	Оранжевая	Желтая	Зеленая	Сине-фиолетовая

Зона перехода окраски каждого индикатора

Название индикатора	pH	Окраска индикатора
Диметиламиноазобензол	2,9—4,0	Красная — желтая
Метиловый красный	4,2—6,3	Красная — желтая
Бромтимоловый синий	6,0—7,6	Желтая — синяя
Фенолфталеин	8,3—10,0	Бесцветная — красная
Тимоловый синий	9,3—10,5	Бесцветная — синяя

**44. Фенол, насыщенный водой,
для хроматографического определения аминокислоты**

100 г растертого в фарфоровой ступке фенола и 50 мл дистиллированной воды энергично взбалтывают в делительной воронке в течение нескольких минут. Жидкости дают отстояться и через 7—10 часов нижний слой водонасыщенного фенола сливают в сухую склянку.

45. Фенолфталеин, 0,5% спиртовой раствор (индикатор)

0,5 г фенолфталеина растворяют в 50 мл спирта и затем разбавляют 50 мл воды. Зона перехода при pH = 8,3—10 (бесцветная — красная).

46. Формоловая смесь

К 50 г продажного 30—40% раствора формалина прибавляют 1 мл 0,5% раствора фенолфталеина (см. приготовление 45) и затем эту смесь доводят 0,2 н. раствором щелочи до слабо розового окрашивания.

47. Янтарная кислота, 0,01 н. раствор

1,18 г янтарной кислоты растворяют в 1 л дистиллированной воды. Кислый раствор нейтрализуют 10% раствором Na_2CO_3 до амфотерной реакции на лакмус (10% раствора Na_2CO_3 расходуется на нейтрализацию не более 5 мл; прибавлять его следует небольшими порциями). Молекулярный вес янтарной кислоты = 118,09.

III. СОЛИ И ПРОСТЫЕ ВЕЩЕСТВА

48. Аммоний молибденовокислый, раствор в азотной кислоте (для качественной реакции на H_3PO_4)

Первый способ (из молибденовокислого аммония): 75 г $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ растворяют в 500 мл воды и прибавляют 500 мл концентрированной HNO_3 . Полное растворение наступает после добавления HNO_3 .

Второй способ (из молибденовой кислоты): 50 г молибденовой кислоты растворяют в 200 мл 10% раствора аммиака. В полученный раствор небольшими порциями при сильном встряхивании вливают 750 г концентрированной HNO_3 (удельный вес 1,2). Через несколько дней реактив сливают с осадка.

49. Аммоний молибденовокислый, раствор в H_2SO_4 (молибденовый реактив для колориметрического определения H_3PO_4)

50 г (или 25 г) молибденовокислого аммония растворяют приблизительно в 600 мл дистиллированной воды и, если нужно, фильтруют. Раствор переносят в мерную колбу на 1 л. В другой колбе к 250 мл дистиллированной воды приливают 150 мл концентрированной серной кислоты. Второй раствор соединяют с первым и по охлаждению доливают водой до метки.

50. Бромная вода

Воду насыщают бромом. Бром берут из расчета 3,1 г (1 мл) на 100 мл воды. Растворение производят под тягой.

51. Железо-аммиачные квасцы, 30% раствор (индикатор)

В 100 мл горячей дистиллированной воды растворяют 30 г железо-аммиачных квасцов. После охлаждения прибавляют концентрированную азотную кислоту (8—10 мл) до слабо желтой окраски раствора.

Молекулярный вес $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot (\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4 \cdot 24\text{H}_2\text{O} = 964,42$.

52. Йод в растворе йодистого калия ($\text{J}_2 + \text{KJ}$)

1 г йода и 2 г KJ растворяют в небольшом количестве воды. После растворения объем жидкости доводят до 100 мл. Для получения 10% или 0,1% раствора йода количество йода и йодистого калия соответственно увеличивают или уменьшают в 10 раз.

53. Кадмий хлористый, спиртовой раствор

Хлористый кадмий (CdCl_2) растирают в ступке и высушивают до постоянного веса в сушильном шкафу при 105—120°. Высушенный порошок растворяют в 96° спирте из расчета 1,5 г на 100 мл спирта (получают насыщенный раствор).

54. Калий йодистый, 1% раствор

0,1 г KJ растворяют в 10 мл дистиллированной воды.

55. Калий марганцовокислый (насыщенный раствор)

10 г KMnO_4 растворяют в 100 мл дистиллированной воды, нагретой до 70° [растворимость в 100 весовых частях холодной воды (0°) равна 2,83; в горячей воде (75°) — 32,35 г; молекулярный вес = 158,08].

**56. Медь сернокислая, 7% раствор
(для реакции Фелинга)**

70 г химически чистого свежеперекристаллизованного медного купороса растворяют в 1 л дистиллированной воды.

Молекулярный вес $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} = 249,69$.

57. Медь сернокислая, полунасыщенный раствор

Полунасыщенный раствор CuSO_4 готовят из насыщенного раствора разведением его 1 л. Для приготовления 1 л насыщенного раствора CuSO_4 растворяют 400 г медного купороса в 1000 мл дистиллированной воды при нагревании. После растворения раствор охлаждают при помешивании. Избыток медного купороса выпадает в осадок и его удаляют фильтрованием.

58. Миллона реактив

100 г ртути растворяют в 143 мл концентрированной HNO_3 (удельного веса 1,4) сначала при комнатной температуре, затем при нагревании на водяной бане. Раствор разводят 2 объемами воды с небольшим количеством 1% раствора KNO_3 или NaNO_3 . Через некоторое время жидкость сливают с отстоявшегося осадка. При долгом хранении реактив окисляется.

59. Натрий бромноватисто-кислый (гипобромит натрия), 2% раствор

2 г брома (0,65 мл) растворяют в 100 мл 5% раствора NaOH при охлаждении льдом (удельный вес брома = 3,12). Растворение производят под тягой.

60. Натрий бромноватистый, щелочной раствор

300 г NaOH растворяют в фарфоровой чашке в 1 л дистиллированной воды. После охлаждения щелочь переливают в бутылку, которую помещают под тягой в лед, и небольшими порциями при тщательном взбалтывании добавляют заранее отмеренное количество (16 мл) жидкого брома (16 мл = 50 г). Раствор хранят в темной склянке. Годен к употреблению 2—3 месяца.

61. Натрий углекислый, 10% раствор

Растворяют 200 г безводного углекислого натрия в 2 литрах кипящей дистиллированной воды.

62. Натрий хлористый, насыщенный раствор

1 кг поваренной соли растворяют в 2,6 л кипящей дистиллированной воды, охлаждают, добавляют Na_2CO_3 до слабо щелочной реакции (по фенолфталеину) и фильтруют. Растворимость NaCl : в 100 г воды при 100° — 39,2 г, при 0° — 35,6 г.

63. Натрий хлористый, 0,1% раствор

Раствор готовят из расчета 1 г NaCl на 1 л дистиллированной воды из химически чистой соли.

64. Ниллендера реактив

4 г сегнетовой соли и 2 г основного азотнокислого висмута $\text{Bi}(\text{OH})_2\text{NO}_3$ растворяют в 100 мл 10% раствора едкого натра.

65. Сегнетова соль (для реакции Фелинга)

346 г сегнетовой соли (двойная калийнатриевая соль виннокаменной кислоты) растворяют при нагревании в дистиллированной воде и добавляют 140 г едкого натра. После растворения и охлаждения раствор доводят водой до 1 л.

66. Смесь для сжигания

Растирают в ступке смесь, состоящую из 1 весовой части сернокислой меди (CuSO_4) и 4 весовых частей сернокислого калия (K_2SO_4). Смесь рассыпают по 1 г в виде аптечных порошков.

67. Содовосернистый раствор

25 мл 15% раствора сернистоокислого натрия (NaSO_3) смешивают со 100 мл 20% раствора углекислого натрия (из сухой безводной соли), перед употреблением фильтруют. Раствор не стоек, его готовят в небольшом количестве на несколько определений.

68. Сурьма треххлористая, 33% раствор в хлороформе

33 г треххлористой сурьмы растворяют в 66 мл хлороформа в сухой склянке. Перед употреблением раскрывают ампулу с сурьмой и тут же опускают в хлороформ (чтобы сурьма не окислилась). Попадание влаги портит реактив. Вес треххлористой сурьмы определяют по разности весов ампулы с веществом и пустой ампулы.

69. Тройной раствор (хлорцинкйодистый раствор)

50 г сернокислого цинка и 250 г хлористого натрия растворяют в 1 л воды и, если нужно, фильтруют. Перед употреблением на каждые 100 мл цинкнатриевого раствора добавляют 2,5 йодистого калия.

70. Фелинга реактив

Для приготовления реактива Фелинга смешивают равные объемы 7% раствора сернокислой меди (см. приготовление, п. 56) и щелочного раствора сегнетовой соли (см. приготовление, п. 65). 1 мл реактива Фелинга содержит такое количество гидроокиси меди, которое эквивалентно 5 мг глюкозы.

71. Фолина реактив (для количественного определения адреналина)

В колбе емкостью 1,5 л смешивают 100 г вольфрамовокислого натрия, 20 г фосфорномолибденовой кислоты, 50 мл 85% фосфорной кислоты и 750 мл дистиллированной воды. В колбу вставляют воронку, которую сверху покрывают часовым стеклом. Смесь кипятят на сильном огне в течение 2 часов (кипение должно быть равномерным); получается жидкость, окрашенная в интенсивно желтый цвет. Жидкости дают остыть, по охлаждению переливают в цилиндр и доливают водой до 1 л (если нужно, фильтруют).

Проверка качества реактива: 1 мл реактива подщелачивают насыщенным раствором или порошком углекислого натрия. Если не происходит посинения, реактив доброкачественный.

72. Хромовая смесь для очистки стеклянной посуды

15 г тонко измельченного бихромата калия или бихромата натрия ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ или $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) растворяют в 500 мл концентрированной серной кислоты. Смесь хранят в банке, закрытой стеклянной пробкой.

73. Цинк сернокислый, 0,45% раствор

Заготавливают в запас 45% раствор сернокислого цинка и из него по мере необходимости на 10—14 дней готовят 0,45% раствор разведением в 100 раз.

76. Соляная кислота, 2%, 10% и 0,2% растворы

Для получения 2% раствора HCl в фарфоровую чашку наливают 95,5 мл дистиллированной воды и осторожно при помешивании стеклянной палочкой вливают из мерного цилиндрика 4,5 мл концентрированной соляной кислоты удельного веса 1,19. Для получения 10% раствора таким же образом смешивают 77,3 мл H_2O с 22,7 мл концентрированной HCl ; для получения 0,2% раствора смешивают 99,5 H_2O с 0,45 мл концентрированной HCl .

77. Перекись водорода, нейтрализованный 3% раствор (для газометрического определения каталазной активности)

Пергидроль (30% раствор H_2O_2) растворяют в дистиллированной воде в отношении 1:9 (в 10 раз). Для нейтрализации на каждые 100 мл 3% раствора перекиси водорода добавляют 1 г углекислого кальция (CaCO_3), перемешивают и дают отстояться.

Примечание. 2 мл 3% раствора перекиси водорода могут выделить около 21,5 мл кислорода (при 20°). При титровании перманганатом на 2 мл 3% раствора перекиси водорода идет около 35 мл 0,1 н. раствора перманганата.

78. Перекись водорода, 1% и 3% раствор

1% и 3% раствор H_2O_2 готовят перед употреблением из продажного 30% пергидроля. К 1 мл пергидроля добавляют 20 мл дистиллированной воды (или соответственно 3 мл H_2O_2 и 27 мл H_2O). По расчету на титрование 0,5 мл 1% раствора H_2O_2 должно пойти 5,88 мл 0,05 н. раствора KMnO_4 .

79. Бария гидроокись, насыщенный раствор

38 г гидроокиси бария растворяют в 1 л дистиллированной прокипяченной (для удаления CO_2) воды.

80. Натр едкий, 0,1 н. раствор

Титр может быть не вполне точным, но концентрация не должна значительно превышать указанную. Готовят растворением 4 г NaOH в 1 л прокипяченной воды.

81. Буферные и титрованные растворы (общие указания)

Буферные и титрованные растворы готовят из фиксаналов или химически чистых реактивов. В последнем случае целесообразно иметь в лаборатории заранее приготовленные основные растворы 1 М или 0,1 н. концентрации. По мере необходимости из основных более концентрированных растворов готовятся рабочие растворы 0,1 М или 0,01 н. концентрации и др.

Буферные и титрованные растворы готовят в мерных колбах на прокипяченной и охлажденной дистиллированной воде, не содержащей CO_2 и NH_3 . Для предупреждения порчи буферных растворов к ним прибавляют несколько кристалликов тимола (предотвращает развитие микробов).

Дистиллированную воду кипятят в течение 5—10 минут. Колбу с прокипяченной водой закрывают пробкой, к которой присоединена хлоркальциевая трубка с натральной известью. При наполнении хлоркальциевой трубки в шарообразную часть кладут кусок чистой ваты, насыпают натронную известь в виде зерен величиной с горошину, закрывают слоем чистой ваты и пробкой со вставленной в нее стеклянной трубкой. Вата и вещество должны быть уложены свободно, чтобы не мешать движению воздуха.

Для приготовления титрованных растворов можно пользоваться фиксаналами. Ампулу с фиксаналом обмывают дистиллированной водой и обтирают

фильтровальной бумагой. В мерную колбу вставляют воронку. В воронку вставляют стеклянный боек (обычно он прилагается к коробке с фиксаналом), острый конец которого должен быть обращен вверх. Ампуле дают свободно падать так, чтобы дно ее разбилось при ударе об острый конец бойка. После этого острой стеклянной палочкой пробивают боковое углубление ампулы и дают содержимому ее вытечь в мерную колбу. Не меняя положения ампулы, ее промывают с помощью промывалки с наконечником 6-кратным по объему ампулы количеством дистиллированной воды. Мерную колбу доливают до метки дистиллированной водой, закрывают пробкой и содержимое колбы тщательно перемешивают.

При приготовлении растворов из сухих фиксаналов следует заботиться о том, чтобы воронка была совсем сухая. Ампула осторожно встряхивается и содержимое ее через воронку пересыпается в колбу. Ампулу многократно промывают дистиллированной водой, пользуясь промывалкой с наконечником. В СССР выпускаются фиксаналы следующих кислот, щелочей и солей: H_2SO_4 ; HCl ; $NaOH$; KOH ; Na_2CO_3 ; $NaHCO_3$; $NaCl$; KCl ; $H_2C_2O_4$; $(NH_4)_2C_2O_4$; $K_2C_2O_4$; $Na_2C_2O_4$; $K_2Cr_2O_7$; K_2CrO_4 ; $Na_2S_2O_3$; I_2 ; $KMnO_4$; $AgNO_3$; NH_4CNS ; $KCNS$; $NaCNS$; $Na_2B_4O_7$; $BaCl_2$. Фиксаналы обеспечивают точность титров и особенно удобны для подготовки студенческих лабораторных занятий.

V. БУФЕРНЫЕ РАСТВОРЫ

82. Уксусная кислота, 0,2 М раствор (для приготовления ацетатного буфера)

12 г уксусной кислоты (ледяной) растворяют в 1 л прокипяченной дистиллированной воды. Для получения кристаллов концентрированную уксусную кислоту ставят в холодильник. Уксусная кислота кристаллизуется. Оставшийся над кристаллами водный раствор уксусной кислоты сливают в другой сосуд, а кристаллы употребляют для приготовления раствора. Температура плавления CH_3COOH равна $16,7^\circ$. Молекулярный вес 60,05.

83. Натрий уксуснокислый, 0,2 М раствор (для приготовления ацетатного буфера)

27,2 г свежеперекристаллизованного уксуснокислого натрия растворяют в 1 л прокипяченной дистиллированной воды, не содержащей CO_2 (в мерной колбе). При перекристаллизации следует учесть, что растворимость кристаллического уксуснокислого натрия ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$) в холодной воде (при 0°) равна 76,2 г, а в горячей воде (при 50°) — 138,8 г. Растворимость безводного уксуснокислого натрия (CH_3COONa) в холодной воде (при 0°) — 119 г, в горячей воде (при 100°) — 170 г. Молекулярный вес $NaC_2H_3O_2 \cdot 3H_2O = 136,09$.

84. Казенин, 0,4% раствор в 0,2 М растворе уксуснокислого натрия

4 г казенина и 27,2 г свежеперекристаллизованного $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ растворяют в мерной колбе в 1 л прокипяченной и охлажденной дистиллированной воды, не содержащей CO_2 .

Фосфатный буфер

85. Калий фосфорнокислый однозамещенный, $1/15$ М раствор

Отвешивают на аналитических весах 9,078 г химически чистого KH_2PO_4 . Соль количественно переносят в мерную колбу и растворяют в небольшом количестве прокипяченной и охлажденной дистиллированной воды. После растворения соли объем жидкости в колбе доводят до метки водой. Молекулярный вес $KH_2PO_4 = 136,09$.

86. Натрий фосфорнокислый двузамещенный, $\frac{1}{15}$ М раствор

Отвешивают на аналитических весах 11,867 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, растворяют в мерной колбе в 1 л хорошо прокипяченной дистиллированной воды. Молекулярный вес $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 178,01$.

Для получения буферных растворов с нужным рН смешивают полученные растворы в следующих соотношениях.

рН смеси	Количество $\frac{1}{15}$ М растворов (в мл)	
	Na_2HPO_4	KH_2PO_4
5,59	0,5	9,5
5,91	1,0	9,0
6,24	2,0	8,0
6,47	3,0	7,0
6,64	4,0	6,0
6,81	5,0	5,0
6,98	6,0	4,0
7,17	7,0	3,0
7,38	8,0	2,0
7,72	9,0	1,0
8,04	9,5	0,5

87. Натрий фосфорнокислый двузамещенный 0,2 М раствор (для приготовления фосфатно-цитратного буфера)

Растворяют 35,603 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ или 71,634 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ в 1 л хорошо прокипяченной и остуженной дистиллированной воды. Прокипяченную воду и приготовленный раствор закрывают пробкой с трубкой, наполненной натронной известью. Фосфат, содержащий в себе частицы кристаллизационной воды, получают из свежеперекристаллизованного путем двухнедельного выветривания его на воздухе (до постоянного веса), либо путем высушивания в течение 2 суток в термостате при температуре 36—38°. Молекулярный вес безводного фосфата $\text{Na}_2\text{HPO}_4 = 141,98$, двухводного фосфата $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 178,01$, свежеперекристаллизованного фосфата $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} = 358,17$.

88. Лимонная кислота, 0,1 М раствор (для приготовления фосфатно-цитратного буфера)

Растворяют 21,008 г лимонной кислоты в 1 л прокипяченной и охлажденной дистиллированной воды. Для сохранения в буферные растворы прибавляют несколько кристалликов тимола. Молекулярный вес $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O} = 210,08$.

VI. ТИТРОВАННЫЕ РАСТВОРЫ

89. Аммоний роданистый, 0,01 н. раствор

0,01 н. раствор роданистого аммония готовят разведением 0,1 н. раствора с точным учетом его концентрации. Ввиду гигроскопичности препарата для приготовления 0,1 н. раствора рекомендуется отвешивать количество NH_4CNS , несколько большее рассчитанного (например, 8 г на 1 л). Для установки титра 10 мл этого раствора разводят в мерной колбе до 100 мл. Титр устанавливают по 0,01 н. раствору AgNO_3 (см. приготовление, п. 101) в присутствии в качестве индикатора железозаммиачных квасцов (см. приготовление, п. 51).

Пример расчета. Допустим, на титрование 2 мл раствора AgNO_3 пошло 2,14 мл раствора NH_4CNS . Приготовленный раствор оказался слабее, чем требуется. Для приготовления точного 0,01 н. раствора необходимо на каждые 100 мл раствора брать не 10 мл исходного 0,1 н. раствора NH_4CNS , а больше, т. е. $\frac{10 \cdot 2,14}{2} = 10,7$ мл.

90. 2,6-дихлорфенолиндофенол, 0,001 N раствор

0,5 г мелкоистолченного 2,6-дихлорфенолиндофенола растворяют в 700 мл горячей дистиллированной воды. После охлаждения или на следующий день фильтруют и добавляют 300 мл фосфатного буфера с $\text{pH} = 6,98-7,0$ (см. приготовление, пп. 85 и 86). Титр раствора устанавливают по аскорбиновой кислоте. Раствор хранят в склянке из темного стекла. При продолжительном хранении раствор изменяется. Окисление аскорбиновой кислоты происходит замедленно и затрудняется определением конца титрования.

Определение титра 2,6-дихлорфенолиндофенола (метод Прокошева). В колбочку для титрования наливают 1 мл раствора аскорбиновой кислоты (10 мг аскорбиновой кислоты растворяют в 100 мл 2% раствора HCl), добавляют 1 мл 1% раствора йодистого калия (см. приготовление, п. 54), 5 капель 1% раствора крахмала (см. приготовление, п. 32) и титруют из микробюретки 0,001 н. раствором йодноватокислого калия (см. приготовление, пп. 92—93) до появления синего окрашивания. В другой колбочке такое же количество аскорбиновой кислоты (1 мл) титруют раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления не исчезающего розового окрашивания. Аскорбиновая кислота окисляется, а 2,6-дихлорфенолиндофенол восстанавливается в лейкосоединение. По данным титрования и известной нормальности раствора KJO_3 вычисляют нормальность и титр 2,6-дихлорфенолиндофенола.

Пример расчета. На титрование 1 мл аскорбиновой кислоты израсходовано в среднем: в первом случае — 1,48 мл 0,001 н. раствора KJO_3 , во втором случае — 1,30 мл раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола. На основании полученных данных составляют пропорцию и решают уравнение:

$$\begin{aligned} 1,48 \text{ мл} &= 0,001 \text{ н.} \\ 1,30 \text{ " } &= x \\ \frac{x}{0,001} &= \frac{1,48}{1,30} \\ x &= \frac{0,001 \cdot 1,48}{1,30} = 0,00114 \text{ н.} \end{aligned}$$

Таким образом, раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола имеет нормальность, равную 0,00114, которая может быть выражена так: 0,001 н. с фактором $F = 1,14$. Титр раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола выше титра 0,001 н. раствора и выразится величиной $0,088 \text{ мг} \times 1,14 = 0,10032 \text{ мг}$, т. е. титр = 0,10 мг аскорбиновой кислоты.

Для получения точного 0,001 н. раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола (1 мл которого эквивалентен 0,088 мг аскорбиновой кислоты) к полученному раствору с $F = 1,14$ добавляют вычисленное количество дистиллированной воды и титр полученного раствора вновь проверяют указанным выше способом.

Пример расчета. Допустим, что после титрования осталось 970 мл 0,001 н. раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола с фактором

$F=1,14$. Вычисляют, какой объем занимал бы раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола, если бы его концентрация была точно 0,001 н.:

$$\begin{array}{r} 970 \text{ мл} - F=1,14 \\ x \quad \quad - F=1 \\ \hline x = \frac{970 \cdot 1,14}{1} = 983 \\ 983 - 970 = 13 \end{array}$$

Как видно из приведенного примера, к раствору 2,6-дихлорфенолиндофенола следует добавить 13 мл дистиллированной воды, т. е. довести объем раствора до 983 мл.

Определение титра 2,6-дихлорфенолиндофенола по соли Мора. В колбочку отмеривают из микробюретки 5 мл раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, добавляют 3 мл насыщенного раствора шавелевокислого аммония или натрия¹ и синий раствор титруют 0,01 н. раствором соли Мора из микробюретки до появления бледно-желтой окраски². По данным титрования и известной нормальности раствора соли Мора определяют нормальность раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола.

Пример расчета. На титрование 5 мл раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола пошло в среднем 0,57 мл раствора соли Мора 0,01 н.

$$\begin{array}{r} 0,57 \text{ мл} - 0,01 \text{ н.} \\ 5 \quad \quad - x \\ \hline x = \frac{0,57 \cdot 0,01}{5} = 0,00114 \text{ н.} \end{array}$$

Таким образом, раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола имеет нормальность, равную 0,00114, которая может быть выражена как 0,001 н. с фактором $F=1,14$. Титр раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола равен 0,10 мг аскорбиновой кислоты (т. е. $0,088 \times 1,14 = 0,10032$).

91. Калий железосинеродистый, 0,005 н. раствор

1,65 г химически чистого $K_3[Fe(CN)_6]$ точно отвешивают на аналитических весах, переносят в мерную колбу емкостью 1 л, растворяют в дистиллированной свежепрокипяченной и охлажденной воде, прибавляют 10,6 г безводного углекислого натрия (прокаленного в фарфоровом тигле и охлажденного в эксикаторе) и объем жидкости доводят водой до метки. Раствор хранят в темной бутылки на холоду, титр его не изменяется в течение 2 месяцев. Химически чистый препарат $K_3Fe(CN)_6$ не должен содержать трехвалентного железа и железистосинеродистых соединений. До приготовления титрованного раствора препарат

¹ В результате реакции 2,6-дихлорфенолиндофенола и соли Мора образуются ионы трехвалентного железа, которые вступают в реакцию со шавелевокислым аммонием и дают комплексное соединение зеленовато-желтоватого цвета. Шавелевокислый аммоний добавляют для удобства наблюдения конца реакции. Переход от синего к зеленовато-желтому улавливается легче, чем от синего к бесцветному.

² Приготовление 0,01 н. раствора соли Мора, см. п. 105.

$K_3Fe(CN)_6$ проверяют на чистоту. Для этого 0,250 г $K_3[Fe(CN)_6]$ растворяют в 5 мл H_2O .

а) К 1 мл 5% раствора $K_3[Fe(CN)_6]$ добавляют 2 капли 1% раствора H_2SO_4 и 2 капли 1% раствора $K_4[Fe(CN)_6]$. В присутствии трехвалентного железа жидкость окрашивается в синий цвет.

б) К 1 мл 5% раствора $K_3[Fe(CN)_6]$ добавляют 1 каплю 5% раствора $FeCl_3$ и 1—2 капли 10% раствора HCl . В присутствии $K_4[Fe(CN)_6]$ жидкость приобретает синее окрашивание. Обе реакции должны быть отрицательными.

92. Калий йодноватокислый, основной 0,01 н. раствор

Готовят из фиксанала или отвешивают на аналитических весах 0,3567 г химически чистого KJO_3 , высушенного до постоянного веса при температуре 102° , и растворяют в мерной колбе в 1 л дистиллированной воды.

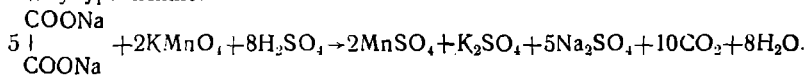
93. Калий йодноватокислый, рабочий 0,001 н. раствор

10 мл 0,01 н. раствора KJO_3 переносят точной пипеткой в мерную колбу на 100 мл и содержимое колбы доводят до метки дистиллированной водой.

94. Калий марганцовокислый, 0,01 н. и 0,05 н. растворы ✓

Готовят из фиксанала или из заранее приготовленного 0,1 н. раствора. Для приготовления 0,1 н. раствора растворяют 3,3 г $KMnO_4$ в 1 л дистиллированной воды в склянке из темного стекла. Склянку закрывают пробкой и оставляют на 10—15 дней. За этот срок обычно происходит полное окисление примесей, оказавшихся в растворе, и в дальнейшем раствор хорошо сохраняется, не меняя установившейся концентрации, близкой к 0,1 н. Растворы $KMnO_4$ меньшей концентрации (0,05 н. или 0,01 н.) готовят путем точного разведения (в мерной колбе) исходного 0,1 н. раствора в хорошо прокипяченной и охлажденной дистиллированной воде. Нормальность полученного раствора устанавливают по раствору шавелевой кислоты или шавелевокислого натрия (см. приготовление, пп. 100, 106 и 107).

В колбочку отмеривают точно 2 мл 0,01 н. раствора шавелевой кислоты (или шавелевокислого натрия), добавляют 1 мл 10% раствора H_2SO_4 и содержимое колбочки нагревают до $70-90^\circ$. Горячий раствор титруют испытуемым раствором марганцовокислого калия до не исчезающего слабо розового окрашивания. Реакция протекает по следующему уравнению:



По результатам титрования и известной нормальности раствора шавелевокислого натрия (или шавелевой кислоты) вычисляют нормальность и фактор раствора $KMnO_4$.

Пример расчета. На титрование 2 мл 0,01 н. раствора $Na_2C_2O_4$ с $F = 1,07$ пошло в среднем 2,17 мл раствора $KMnO_4$.

а) 2 мл 0,01 н. раствора с $F = 1,07 = 2 \cdot 1,07 = 2,14$ мл 0,01 н. раствора.

б) 2,14 мл — 0,01 н. раствор $Na_2C_2O_4 = 2,17$ мл — x н. раствор $KMnO_4$

$$в) x = \frac{0,01 \cdot 2,14}{2,17} = 0,00986 \text{ н.}$$

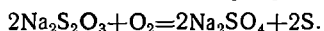
$$F_{KMnO_4} = \frac{2,14}{2,17} = 0,986.$$

Фактор поправки испытуемого раствора вычисляют, беря отношение количества миллилитров исходного раствора к количеству миллилитров испытуемого или беря отношение нормальности испытуемого раствора к нормальности исходного:

$$K_{MnO_4} = \frac{0,00986}{0,01} = 0,986.$$

95. Натрий гипосульфит, 0,1 н. раствор

Гипосульфит готовят из фиксаля. При отсутствии его 25 г гипосульфита натрия растворяют в 1 л хорошо прокипяченной и охлажденной дистиллированной воды (без CO_2). Разведение и установку титра производят через 10 дней после приготовления раствора. Если применять свежeproкипяченную и охлажденную дистиллированную воду и прибавлять для увеличения устойчивости титра 0,1 г Na_2CO_3 на 1 л раствора, то установку титра можно производить через день после приготовления раствора. Хранить раствор $Na_2S_2O_3$ нужно в бутылках, защищенных от CO_2 , т. е. закрытых пробкой с хлоркальциевой трубкой, наполненной натронной известью. Титр $Na_2S_2O_3$ медленно уменьшается, поэтому его необходимо время от времени проверять. Уменьшение титра происходит вследствие окисления гипосульфита кислородом воздуха



и от разложения гипосульфита микроорганизмами (тиобактериями)
Молекулярный вес $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O = 248,20$.

96. Натрий гипосульфит, 0,005 н. раствор

Готовят из 0,1 н. раствора, отмеривая точно 50 мл в мерную колбу емкостью 1 л и доливая прокипяченной (для удаления CO_2) дистиллированной водой до метки. Титр раствора устанавливают по 0,01 н. раствору йодноватокислого калия (см. приготовление, пп. 92 и 93). Для титрования отмеривают 1 мл 0,01 н. раствора KJO_3 , прибавляют 2 мл 3% раствора уксусной кислоты, 2 мл тройного раствора (см. приготовление, п. 69) и 2 капли 1% раствора крахмала (см. приготовление, п. 32). Смесь титруют из микробюретки гипосульфитом натрия до исчезновения синей окраски.

97. Натр едкий, 0,1 н. раствор (приготовление из металлического натрия)

Куски металлического натрия очищают фильтровальной бумагой от керосина, срезают сухим ножом внешние части и быстро отвешивают на технических весах 2,5 г. Взвешенные куски немедленно разрезают на чистой бумаге на тонкие пластинки и бросают в колбу емкостью 1 л, в которую налито 2,5 мл этилового спирта (лучше абсолютного). При этом происходит образование алкоголята и жидкость сильно разогревается. Когда все кусочки полностью растворяются, добавляют сначала по каплям, а затем небольшими порциями воду, всего в количестве 1 л. Вода должна быть полностью освобождена от CO_2 . Воду готовят заранее путем длительного кипячения, после которого колбу с водой закрывают пробкой, снабженной отогнутой вниз трубкой, соединенной с хлоркальциевой трубкой с натронной известью, и в таком виде охлаждают. Раствор щелочи из колбы переливают в склянку емкостью 1 л с пробкой. В отдельных пробах устанавливают титр приготовленного раствора по янтарной (см. приготовление, п. 108) или щавелевой кислоте (см. приготовление, п. 106). Для этого отмеривают точной пипеткой 5 мл янтарной или щавелевой кислоты, прибавляют 1 каплю фенолфталеина и титруют приготовленным 0,1 н. раствором щелочи до появления слабо розового окрашивания.

Натр едкий, 0,1 н. раствор (приготовление из концентрированного раствора). Чтобы избежать загрязнения карбонатами, титрованный раствор готовят из насыщенного раствора едкого натра. В фарфоровой чашке растворяют 50 г едкого натра в 50 мл дистиллированной воды. Жидкость сильно разогревается. По охлаждении раствор переливают в цилиндр или склянку и закрывают парафинированной пробкой. Углекислый натрий почти нерастворим в концентрированном растворе едкого натра и в течение нескольких дней выпадает на дно. Отстоявшийся прозрачный раствор употребляют для приготовления титрованного раствора. Отмеривают 7,5 мл прозрачной жидкости в мерную колбу емкостью 1 л и доводят дистиллированной водой до метки. Раствор щелочи переливают в склянку емкостью 1 л и закрывают парафинированной пробкой. Титр устанавливают по янтарной (см. приготовление, п. 108) или щавелевой кислоте (см. приготовление, 106). В качестве индикатора пользуются фенолфталеином. Титр следует проверять не реже одного раза в месяц; более слабые растворы требуют более частой проверки.

98. Натр едкий, 0,01 н. раствор

Готовят из 0,1 н. раствора едкого натра путем точного разведения дистиллированной водой, не содержащей CO_2 (см. приготовление, п. 97). Хранят в склянке, обработанной паром в течение 15 минут. Для приготовления можно также пользоваться фиксаналом.

99. Натрий хлористый, 0,01 н. раствор

Раствор готовят из фиксанала или из перекристаллизованной, высушенной, прокаленной и охлажденной в эксикаторе соли. На аналитических весах отвешивают 0,1461 г NaCl и растворяют в мерной колбе емкостью на 250 мл в дважды дистиллированной воде. Для перекристаллизации растворяют при нагревании 40 г NaCl в 100 мл дистиллированной воды. Горячий раствор фильтруют и фильтрат охлаждают при помешивании стеклянной палочкой. Выпавшие кристаллы NaCl в количестве около 3 г отделяют фильтрованием через бюхнеровскую воронку, отжимают между листами фильтровальной бумаги. Кристаллы высушивают в сушильном шкафу, а затем прокаливают в тигле на голом огне. Растворимость NaCl в 100 мл воды при температуре 100° равна 39,2 г, при 0° равна 35,6 г. Молекулярный вес $\text{NaCl} = 58,45$.

100. Натрий щавелевокислый, 0,1 н. раствор

Раствор готовят из фиксанала или из химически чистой соли. Щавелевокислый натрий отличается большой стойкостью как в сухом виде, так и в растворе. Соль безводна. Для освобождения ее от гигроскопической влаги ее высушивают до постоянного веса в сушильном шкафу при температуре $105\text{--}110^\circ$ или в эксикаторе над серной кислотой. 0,0670 г щавелевокислого натрия растворяют в мерной колбе в 100 мл дистиллированной воды. Получают 0,01 н. раствор.

Молекулярный вес $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4 = 134,01$.

101. Серебро азотнокислое, 0,01 н. раствор

1,6989 г химически чистого AgNO_3 растворяют в мерной колбе емкостью 1 л в дважды дистиллированной воде. Объем жидкости доводят до метки и перемешивают. Если нет уверенности в чистоте препарата, его титр устанавливают по 0,01 н. раствору хлористого натрия (см. приготовление, п. 99). В качестве индикатора употребляют 5% раствор хромовокислого калия или натрия (K_2CrO_4).

Молекулярный вес $\text{AgNO}_3 = 169,89$.

102. Серебро азотнокислое, эмпирический раствор

Эмпирический раствор AgNO_3 готовится с таким расчетом, чтобы 1 мл его осаждал хлор из 0,01 г хлористого натрия. Отвешивают на аналитических весах 29,061 г AgNO_3 и растворяют в мерной колбе в 1 л дистиллированной воды.

103. Серная кислота, 0,1 н. раствор

2,8 мл концентрированной H_2SO_4 (удельного веса 1,84) растворяют в мерной колбе в 1 л дистиллированной воды. Титр раствора устанавливают по раствору титрованной щелочи (см. приготовление, п. 97).

Пример расчета. 1 л 0,1 н. раствора должен содержать 4,908 г H_2SO_4 . Известно, что в 100 г концентрированной серной кислоты удельного веса 1,84 содержится 95,6 г H_2SO_4 . Вычисляют, в каком весеом количестве концентрированной H_2SO_4 содержится 4,908 г.

$$\begin{aligned} 100 \text{ г} & \text{—} 95,6 \text{ г } \text{H}_2\text{SO}_4 \\ x & \text{—} 4,908 \text{ г} \\ x & = \frac{100 \cdot 4,908}{95,6} = 5,14 \text{ г.} \end{aligned}$$

Для перерасчета найденного весового количества серной кислоты на объем нужно весовое количество разделить на удельный вес:

$$5,14 : 1,84 = 2,8 \text{ мл.}$$

Молекулярный вес $\text{H}_2\text{SO}_4 = 98,08$; грамм-эквивалент = 49,04.

104. Серная кислота, 0,01 н. или 0,02 н. раствор

Готовят из 0,1 н. раствора серной кислоты путем точного разведения в мерной колбе дистиллированной водой.

105. Соль Мора

3,83 г соли Мора $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 1 л 0,02 н. серной кислоты (0,56 мл концентрированной кислоты удельного веса 1,84 в 1 л). В кислой среде раствор соли Мора хорошо сохраняет свой титр в течение 1—2 месяцев, если его держать в плотно закрытой склянке в темноте. Титр соли Мора устанавливают по 0,01 н. раствору марганцовокислого калия KMnO_4 (см. приготовление, п. 94).

106. Щавелевая кислота, 0,1 н. раствор

Раствор готовят из фиксанала или из свежеперекристаллизованной щавелевой кислоты. 0,6302 г свежеперекристаллизованной щавелевой кислоты растворяют в мерной колбе на 100 мл в прокипяченной и охлажденной дистиллированной воде. Перекристаллизацию щавелевой кислоты производят следующим образом. 5 г химически чистой щавелевой кислоты растворяют в 10 мл горячей дистиллированной воды. Раствор доводят до кипения и горячим фильтруют. Фильтрат охлаждают при помешивании стеклянной палочкой. Выпадает мелкокристаллический осадок щавелевой кислоты, содержащей 2 молекулы кристаллизационной воды. Осадок отделяют фильтрованием через бюхнеровскую воронку, отжимают между листами фильтровальной бумаги и высушивают на фильтровальной бумаге до тех пор, пока порошок не перестанет прилипать к стеклянной палочке. Перекристаллизованная щавелевая кислота некоторое время может сохраняться в эксикаторе над водой. При хранении на воздухе она частично теряет кристаллизационную воду.

Основной раствор в 100 мл содержит 100 мг фосфора. Рабочий раствор в 100 мл содержит 1 мг, а в 1 мл — 0,01 мг фосфора. Молекулярный вес $\text{KН}_2\text{PО}_4$ равен 136,09.

112. Задачи для количественного определения адреналина

Задачи для количественного определения адреналина с различным содержанием его готовят для каждого занятия из продажного 0,1% (1 1000) раствора адреналина путем соответствующего разведения. Для этого в 8 пронумерованных мерных колбочек емкостью 25 мл наливают в каждую указанное в таблице количество продажного адреналина и доводят объем жидкости до метки дистиллированной водой. Колбочки закрывают пробками и содержимое перемешивают. Получают 8 задач с различным процентным содержанием адреналина.

№ колбочки (задачи)	1	2	3	4	5	6	7	8
Количество 0,1% раствора адреналина (в мл)	1,5	1,4	1,3	1,2	1,1	0,9	0,8	0,7
Содержание адреналина в задаче (в мг%)	6,0	5,6	5,2	4,8	4,4	3,6	3,2	2,8

113. Задачи для количественного определения фосфора

Задачи для количественного определения фосфора готовят из основного стандартного раствора. В 8 пронумерованных мерных колбочек емкостью 100 мл наливают в каждую указанное в таблице количество основного стандартного раствора и объем жидкости в колбочках доводят до метки дистиллированной водой. Колбочки закрывают пробками и содержимое их перемешивают. Получают задачи с различным процентным содержанием фосфора.

№ колбочки	1	2	3	4	5	6	7	8
Количество основного стандартного раствора (в мл)	0,6	0,7	0,8	0,9	1,1	1,2	1,3	1,4
Содержание фосфора в задаче (в мг%)	2,4	2,8	3,2	3,6	4,4	4,8	5,2	6,4

Задача заменяет безбелковый фильтрат крови (см. метод определения фосфора в крови). Задачу обрабатывают по методу, описанному в практикуме, и на основании полученных данных вычисляют процентное содержание фосфора в крови.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Авитаминозы 47
Аглюконы 208
Агматин 12, 13
Адамкевича и Шульца-Распайля реакция 15
Адениловая кислота 36
Аденин 37
Аденозинтрифосфорная кислота (АТФ) 131, 132, 133, 194, 196
Адермин 52
Адреналин 69, 136, 325
— влияние на содержание сахара крови 138
— диазореакция 70
— определение количественное 70
— продажный препарат 138
— реакция с йодатом калия 70
— с хлорным железом 70
— химические свойства 69
Адренохром 69
Азот 227
— определение микрометодом Кьельдаля 161
Азотистые вещества растений, обмен 215
Азотистый баланс 160
— — отрицательный 161
— — положительный 161
— обмен, конечные продукты 148, 287
Азотная кислота 314
Азотнокислое серебро, эмпирический раствор 171
Активаторы ферментов 83
Актин 193
Актиномнцеты 244
Актомиозин 193
Акцепторы водорода 86
Алкалоиды 223
— группы 224
— обнаружение, реакция с раствором йода 226
— — — танином 226
Аллоксинадениннуклеотид 97
Альбумин яичный, определение изоэлектрической точки 26
Альдегид 9
Альдегидодегидраза 98
Амилаза, активность — влияние рН среды 82
— — определение по Вольгемуту 84
— действие, влияние активаторов и парализаторов 83
— — на крахмал 76
— единица активности 85
Аминоазот 221, 222
Аминокислоты 5, 216, 218
— дезаминирование в растениях 217
— коэффициент распределения 19
— определение хроматографическим методом 18
— пептидная связь 5
— раствор для хроматографического анализа 306
— циклические 10
Аминополипептидаза 142
Аммиак 148
— обнаружение в моче 175
Аммоний молибденовокислый 311
— роданистый 317
Анейрин 48
Анилин 307
Ансерин 198
Антибиотики 239, 301
Антрагидрохиноны 211
Антраглюкозиды 211
Анурия 168
Апофермент 75
Аппарат Сокслета 234
Арбутаза 209, 210
Арбутин 209, 210
Аргинин 12, 149, 150
Аскорбиновая кислота 53—57
— — восстановление ею метиленовой сини 55
— — — феррицианида калия 54
— — йодная проба 56
— — определение количественное 57

Аспарагин 218, 227
Ауреоминин 240
Ацетон 117
— йодоформная проба (проба Либена) 118
Ацетонемия 117
Ацетоновые тела 117
Ацетонурия 117
Ацетоуксусная кислота 117, 118, 119

Бария гидроокись 315
Белки, высаливание 28
— денатурация 23
— — необратимая 23
— — обратимая 24
— изозлектрическая точка 23
— — — определение 26
— коллоидные частицы, величина 22
— молекула 5
— молекулярный вес 22
— мозговой ткани 187
— мышечной ткани 193, 194
— нервной ткани 187
— обмен 141
— определение количественное по Робертсу-Стольникову 32
— превращения в пищеварительном тракте 141, 285
— растворимость 24
— реакция осаждения 28—34
— сложные 35, 267
— — протетическая группа 35, 74
— физико-химические свойства 22, 264
— химическая природа 5, 262
— цветные реакции 5

Белковые вещества 215
— растворы, опалесценция 22
Белок пшеничный 303
— яичный 303
— — неразведенный 303

Бензидин, 0,2% спиртовой раствор 307
Бензидиновая проба на гемин 42
Бензидиновый реактив 307
Биуретовая реакция (Пиотровского) 6
Биуретовый комплекс, окраска 7
Бородина метод количественного определения мочевины 150
— прибор 151
Бродильный приборчик 206
Бромная вода 311
Буферные растворы, приготовление 315
— — формула вычисления рН 27

Викасол 65, 303
— реакция 66
Витамин А (антисерофталмический) 59, 233

Витамин В₁ 48
— В₂ 50
— В₆ 52
— С (антицинготный) 53
— D (антирахитический) 61
— D₂ 61
— D₃ 61
— E (антистерильный) 63
— K (антигеморрагический) 64
— PP (противопеллагрический) 51

Витамины 47, 269
— водорастворимые 47, 48
— жирорастворимые 47, 59

Вода, поверхностное натяжение —
— влияние желчи и мыла 110
— — — уравнение 110

Вставка для бани 123
Высаливание белков 28
Вытяжка из дрожжей 76
— — сухого панкреатина 304
— — хрена 304
— поджелудочной железы, действие на фибрин 147

Галактоза 120
Галахром 87, 88
Гваяковая кислота, окисление 89, 94
Гваяковая смола, 1% спиртовой раствор 307
Геллера проба 31
Гем, строение 40
— химическая природа 41
Гематин 41
Гемералопия 59
Гемин 41, 42
— получение кристаллов из гемоглобина 42
— проба гваяковая 42
Гемоглобин 40
— содержание в крови 177, 178
Генин 208
Гетеротрофы 202
Гиалуриновая кислота 45
Гидролазы 75
Гидрохинон, 1% раствор 307
Гипергликемия 138
— адрениновая 136
Гипертиреоз 68
Гипобромит 12
Гипогликемия 137
Гистидин 13, 14, 15
Глиоксилевая кислота 15
Гликоген 121, 126
— анаэробный распад 135
— мышечной ткани 195, 196
— превращение в глюкозу 121
— ресинтез 198
— содержание в печени 121
Гликокол 108
Гликоциамин 12, 13

- Глобулин, содержание в яичном белке 29
 Глюкоза 120, 139
 — окисление 139
 — стерильный 40% раствор 307
 Глюкозиды 207
 — классификация 208
 Глюкозо-1-фосфат 121, 128
 Глюкозурия 138
 — адреналиновая 136
 — алиментарная 137
 — почечная 139
 Глюкопротеиды 44
 Глютамин 218
 Гормоны 67, 271
 — белковой природы 67
 — мозгового слоя надпочечника 69
 — половые 72
 — — женские 72
 — — мужские 72
 — — синтетические 73
 — стеринавой природы 67
 — щитовидной железы 67
 Грамицидин 242
 — биуретовая реакция 244
 — пикрат, получение 243
 Гуанин 37
- Дегидразы 96
 — анаэробные 100
 — — простетическая группа 100
 — — химическая природа 100
 — аэробные 96, 97
 — — строение, схема 97
 — — химическая природа 97
 Дезоксирибоза 35, 37
 Дезоксирибонуклеопротенды 38
 — выделение из ткани селезенки 38
 Дезоксиголевая кислота 108
 Диабет (сахарная болезнь) 137
 Диазобензосульфокислота 13, 14
 Диазореактив 13
 Диазореакция на гистидин и тирозин (Паули) 13
 Диализ 25
 Диализатор 25
 Дигиталоза 208
 Дигитоксигенин 208, 209
 Дигитоксоза 208
 Дикетопиперазиновая реакция 8
 Дикетопиперазиновые кольца 8
 Диметиламиноазобензол, 0,5% раствор 307
 Динитротирозин 10
 Донаторы водорода 86
 Дифениламин, раствор 307
 Дифениламинный реактив 307
 1-3-дифосфоглицериновый альдегид 131
- Дифосфопиридиннуклеотид (ДПН) 100
 2,6-дихлорфенолиндофенол 318
 Енолаза 132
 Желатин 10, 11
 — определение изоэлектрической точки 26
 Железо 228
 Железы эндокринные 67
 Желток яичный 304
 Желудочный сок, активный 305
 — — анализ 142, 143
 — — действие на фибрин 145
 — — определение общей кислотности 144
 — — — реакции 143
 — — — свободной соляной кислоты 144
 — — проба на молочную кислоту 143
 — — — — свободную соляную кислоту 143
 Желчные кислоты 108
 Желчь 305
 Жир(ы) нейтральный, расщепление 105
 — обмен в растениях 211
 — превращение в пищеварительном тракте 104
 — — в тканях и органах 116
 — эмульгирование 108
 — — окисление 116
 — — — теория β -окисления (теория Кноппа) 116
 Жирные кислоты ненасыщенные 213
- Зимогены 74
- Изопрен 232
 Изоэлектрическая точка белка, определение 26
 Ингибитор 141
 Индикан, открытие в моче 159
 Индикатор Ташира 309
 — универсальный 309, 310
 Инсулин 71, 305
 — влияние на содержание сахара в крови 137
 — единица 137
 — продажный препарат 137
 — цветные реакции 72
 Йод в растворе йодистого калия 311
 — открытие в щитовидной железе 68
 Йодная проба на аскорбиновую кислоту 56
- Кадмий хлористый 311

Казеин 316
— выделение из молока 43
— гидролиз 44
— определение изоэлектрической точки 27
Калий 228
— двуххромовокислый 324
— железосинеродистый 319
— йодистый 311
— иодноватокислый 320
— марганцовокислый 311, 320
— обнаружение в моче 175
— фосфорнокислый однозамещенный 316, 324
Кальций 228
— обнаружение в моче 172, 174
Кальциферол 61
— анилиновая проба 63
— бромхлороформная проба 62
Карбгемоглобин 180
Карбоксиполипептидаза 142
Карнозин 198
— открытие в мышечной ткани 199
Картин, количественное определение 237
Картинонды 232
Каталаза 92, 185
— активность, определение газометрическое 94
— — — по Баху-Зубковой 185
Каталазное число 186
Квасцы железо-аммиачные 311
Кератомалация 59
Кислород, процесс переноса к тканям 179
Клупени 10
Кобаламин 240, 245
Кодегридаза 100
— первая (K_{Cr}) 100
— вторая (K_{Co}) 100
Козимаза 100
Коллоидный мешочек, приготовление 25
Компаратор 169
Конгорот (конго-бумага) 308
Кофермент 75
Кознзим А 116
Коэффициент распределения 19
Крахмал 76, 308
— анаэробный распад 135
— действие амилазы 76
— открытие в зеленых листьях 203
— — в семенах фасоли 204
— расщепление, схема 77
Креатин, открытие в мышечной ткани 199
Креатинин, определение количественное по Фолину 158
— открытие в моче 156, 157
Креатинфосфат 197

Креатинфосфорная кислота (фосфаген) 197
Кровь 177, 291
— гемоглобин, содержание 177, 178
— дыхательная функция 179
— оксалатная 305
— определение каталазной активности 185
— — фосфорной кислоты 183
— — хлоридов 181
— осмотическое давление 177
— остаточный азот 178
— рН 177
— плазма 177
— удельный вес 177
— ферменты 185
— форменные элементы 177
— фосфаты 182
Ксантиндегидраза 98
Ксантопротеиновая реакция 10
Ксерофтальмия 59
Куриная слепота 59

Лабораторный ящик 247
Лакмусовая бумага (индикатор) 308
Лактофлавин 50
Лецитин 106
— выделение из яичного желтка 113
— гидролиз 114
— осаждение 114
— получение эмульсии 113
— расщепление 106
Либена проба 118
Либермана-Бурхардта реакция на холестерин 115
Лимонная кислота 317
Липаза 303
— активирование желчью 105
— действие на жир молока 111
— кинетика действия 112
Липиды, обмен 105, 277
Липозитол 187
Липонды, превращение в пищеварительном тракте 105
Липопротенды 187

Магний, обнаружение в моче 174
Магнийфторфосфат 132
Мацерационный сок Лебедева 76
Медь сернокислая 312
Метилгуанидин 12, 13
Метиленовая синь 55, 308
— — с формальдегидом 308
Метилловый красный 309
Метилпентозы 208
Метинон 65, 66
Метинин 17
Метод Кьельдаля 161
— Лебедева 76

- Метод Рушняка 181
 — Тильманса 57
 — Хагедорн-Иенсена 121
 Микробиуретка 250, 251
 Миллона реактив 312
 — реакция 11, 12
 Минеральные вещества, обмен 166
 — — — нарушения, значение 167
 — — — содержание в мозговой ткани 189
 — — — суточная потребность человека 166
 Миоген 193, 194
 — А 193
 — Б 193
 Миоглобин 194
 Миозин 193, 194
 — А 193
 — Б 193
 Миоль 197
 Миофибриллы 192
 Мозговая ткань, белки 187
 — — — разделение их 189
 — — — выделение фосфатидов 190
 — — — холестерина 190
 Молибден шестивалентный 183
 Молоко, створаживание 146
 Молочная кислота 126, 133, 198
 — — — открытие в мышечной ткани 200
 Мононуклеотиды 35
 Мора соль 323
 Моча, неорганические составные части 170
 — — — обнаружение аммиака, калия и натрия 175
 — — — кальция и магния 174
 — — — сульфатов 173
 — — — фосфатов 172
 — — — эфиросерных кислот 173
 — — — определение общей кислотности 169
 — — — рН 169
 — — — хлоридов 171
 — — — соединения серосодержащие 173
 — — — удельный вес 168
 Мочевина, определение количественное по Бородину 150—156
 — синтез в организме 148
 — — — — Кребса теория орнитинового цикла 149
 — — — — Ненцкого теория 148
 Муконды 44
 Мукополисахариды 45
 — гидролиз 45
 Мугаза 128
 Муцины 44
 — выделение из слюны 45
 — нафтоловая проба (реакция Подобедова) 46
 Мышечная кашка 306
 Мышечная ткань 192, 295
 — — — гликоген, открытие 195
 — — — получение безбелковой вытяжки 199
 — — — фракционированное разделение белков 194
 — — — экстрактивные вещества, открытие 199
 Мышечно-адениловый препарат (МАП) 197
 Мышцы, экстрактивные вещества 196
 Насос Камовского 103
 Натрий бромноватисто-кислый 312
 — бромноватистый 312
 — гипосульфит, раствор 321
 — едкий 315, 321, 322
 — обнаружение в моче 175
 — углекислый 312
 — уксуснокислый 316
 — фосфорнокислый двузамещенный 317
 — хлористый 312, 322
 — шавелевокислый 322
 α -нафтол 12, 309
 Нейроглобулин 187
 Нейрокератин 187
 Нейростромин 187
 Ненцкого теория синтеза мочевины 148
 Нервная ткань 187, 293
 — — — белки 187
 Никотинамид 51
 Никотиновая кислота 52
 Нилендера проба на сахар 140
 — реактив 312
 Нингидрин 9
 Нингидриновая реакция 9
 Нитраты и нитриты, обнаружение 220
 Нитропруссидная проба 118
 — реакция 18, 242
 Нуклеиновые кислоты 35
 Нуклеозид 36
 Нуклеопротеиды 35
 — гидролиз 39
 Нуклеотид адениловый 100
 — пиридиновый 100
 Обмен азотистый 148
 — белков 141
 — веществ 104
 — — у растений 201
 — жиров 104
 — липидов 104
 — минеральных веществ 166
 — — — в растениях 227
 — углеводов 120

- Озонид гваяковой смоляной кислоты 89
Окисление монофенолов 88
— жирных кислот 116
— органических веществ 85
Оксигемоглобин 179
Оксидазы 87
Оксиметилфурфурол 15
Оксмиоглобин 194
Олигурия 168
Оптимум рН 82
Орнитин 149, 150
Остеомаляция 61
Остеопороз 61
- Парализаторы ферментов 83**
Паули реакция 13
Пеллагра 51
Пенициллин 240, 241
— нитропруссидная реакция 242
Пепсин 141
Пепсиноген 141
Пептидная связь 5
Пептизация 34
Пептоны 7, 142
— биуретовая реакция 7
Перекиси органические 92
Перекисные соединения 213
Перекись водорода 315
— — расщепление 94
Пероксидазы 92
Петтенкофера реакция на желчные кислоты 115
Пигменты растений 231, 301
— — разделение по Краусу 235
— — экстрагирование 235
рН буферного раствора 27
— оптимум 82
— среды 82
Пикраминная кислота 8
Пикриновая кислота 8
Пиотровского реакция 6
Пиримидиновое кольцо 48
Пиридоксин 52
— проба феррихлоридная 53
Пировиноградная кислота 132
— — аэробное окисление 134
Пирогаллол, окисление 93
Плитка для сжигания по Кьельдалю 162
Подобедова реакция 46
Полинуклеотиды 35
Полипептидные цепи 5
— — водородные связи 5
Полипептиды 7, 39
— биуретовая проба 39
— — реакция 7, 39
— синтез в растениях 217
Полиурия 168
Полифенол 92
- Половые железы, гормоны 72
Прибор Бородина 151
— для газометрического определения каталазной активности 95
— — гидролиза 39
— — отгонки аммиака по Кьельдалю 163
— — распределительной хроматографии 20
Проба анилиновая 63
— бензидиновая 42
— бромхлороформная 62
— гваяковая 42
— Геллера 31
— Герхардта 119
— Ланге 118
— Легаля 118
— Либена 118
— молибденовая 40
— нафтоловая 46
— Ниллендера 140
— с медью 52
— серебряная 40
— Троммера 40, 139
— Фелинга 140
— феррихлоридная 53
Пробирка отсасывательная мерная с адсорбционной трубкой 238
— Тунберга 102
Прогестерон 72
Прокошева метод 318
Протопорфирин 41
Профермент 74
Прянишニコва схема 215
Пульверизатор стеклянный 21
Пуриновые основания, серебряная проба 40
Пурпургаллин 93
- Растения 201**
— антибиотики 239, 301
— анаэробный распад 206
— белки 215
— — синтез и распад 217
— — фракционное разделение 220—221
— глюкозиды 207
— обмен азотистых веществ 215, 299
— — веществ 201
— — жиров 211—215, 297
— — — Иванова схема 212
— — минеральных веществ 227, 299
— — углеводов 201, 297
— органические кислоты, определение 205
— пигменты 231, 301
— редуцирующие вещества, открытие 203, 204
— спиртовое брожение 206
Рахит 61

- Реактив «надн», окисление 91, 92
 — Фелинга 313
 — Фолина 70, 313
 Реактивы алкалоидные 33
 — органические 307
 Реакция Адамкевича и Шульца-Рас-
 пайля 15
 — биуретовая 6
 — Вейля 157
 — Витби 214
 — дикетопиперазиновая 8
 — ксантопротеиновая 10
 — Либермана-Бурхардта 115, 214
 — Миллона 11
 — нингидриновая 9
 — нитрования 10
 — Петтенкофера 115
 — Подобедова 46
 — Сакагучи 12, 246
 — Сальковского 114, 214
 — Фоля 17
 — фурфуроловая 115
 — Яффе 157
 Ретинол 59
 — реакции 60, 61
 Рибоза 35, 36
 — проба Троммера 40
 Рибонуклеопротенды 38
 Рибофлавин 50, 51
 — раствор 306
 Робертс-Стольникова определение
 белка 32
 Рушняка метод определения хлори-
 дов в крови 181

 Сакагучи реакция 12, 246
 Сальковского реакция 114, 214
 Сальмин 10
 Сарколемма 192
 Саркоплазма 192
 Сахар, определение в крови мето-
 дом Хагедорна-Иенсена 121
 — открытие в моче 139
 — — — — проба Ниллендера 140
 — — — — Троммера 139
 — — — — Фелинга 140
 — уровень содержания в крови 121
 Сахарараза 76
 — получение по Лебевеу 76
 Сахароза, расщепление гидролитиче-
 ское 81
 Сера 227
 Серебро азотнокислое 322
 Серная кислота 314, 323
 Ситостерол 212
 Смазка для стеклянных кранов 309
 Смесь для сжигания 313
 Содовосернистый раствор 313
 Сокслета аппарат 233, 234
 Соляная кислота 142

 Соляная кислота, растворы 315
 Соль Мора 323
 — сегнетовая 312
 — фосфорной кислоты, стандартный
 раствор 191, 324
 Сталагмометр 110, 111
 Стероиды, обнаружение 214
 Стилбены 73
 Стрептомицин 244
 — мальтозная реакция 245
 Сукциндегидраза 102
 Сульфаниловая кислота, диазотиру-
 вание 14
 — — — — раствор 1% 309
 Сульфосалициловая кислота, осаж-
 дение белка 32
 Сурьма треххлористая 313
 Сфингофосфатиды 188
 Схема Иванова 212
 Схема расположения материалов в
 лабораторном ящике 252—261

 Таурин 108
 Ташира индикатор 309
 Теория β-окисления жирных кислот
 116
 Террамицин 240
 Тестостерон 72
 Тиазоловое кольцо 48
 Тиамин 48
 — диазореакция 49
 — реакция окисления в тиохром
 49—50
 — химическая природа 48
 Тильманса метод 57
 Тимин, пиримидиновое основание 37
 Тиреоглобулин 68
 Тирозин 11, 13
 — окисление кислородом 89
 — раствор 0,1% 309
 — реакция нитрования 10
 Тирозиназа 87
 Тироксин 68
 Титрованные растворы, пригото-
 вление 315, 317
 Токоферол 63, 64
 — реакция с азотной кислотой 64
 Триозофосфат, енольная форма 130
 Трипсин 142, 303
 Трипсиноген 142
 Триптофан 10, 11, 15, 16
 Трифосфопиридиннуклеотид (ТФП)
 100, 101
 Тройной раствор 124, 313
 Троммера проба 40, 139

 Углеводы 120
 — анаэробное превращение 127,
 — — — — схема 133
 — обмен 120, 279

- Углеводы, обмен, регуляция и нарушения 136, 282
 — превращения в мышечной и других тканях 126
 — — в пищеварительном тракте 120
 — содержание в мозговой ткани 188
 — растений, обмен 201
 Углекислый газ 179, 202
 Угольная кислота 179
 Уксусная кислота 316
 Установка для буферных и титрованных растворов 251
- Фасоль** 306
Фелинга проба 140
 — реактив 313
Фенилаланин 10, 11
Фенол 310, 142, 159
Фенолфталеин 310
Феофитин, получение 236
Фермент(ы) 74
 — активность, влияние рН среды 82
 — апофермент 75
 — гемновый дыхательный 90
 — гидролитические 75, 273
 — энзогены 74
 — катализ, скорость 79
 — кофермент 75
 — крови 185
 — мозговой ткани, активность 188
 — окислительно-восстановительные 86, 275
 — оптимальная температура 79
 — пороговое количество 84
 — превращение неактивной формы в активную 75
 — протетические группы 75
 — профермент 74
 — специфичность 80, 82
 — термолабильность 78
 — физико-химические свойства 74
Феррихлоридная проба на пиридоксин 53
Феррицианид калия, восстановление 54
Фибрин 306
Филлохинон 64
Фильтровальная бумага для хроматографирования 19
Фитонциды 239
Фолина реактив 70, 313
Фолликулин 72
 — реакция с серной кислотой 73
 — спиртовой раствор 306
Фоля реакция 17
Формальдегид 98
Формоловая смесь 310
Фосаген 197
Фосфатиды 190
Фосфаты 171
- Фосфаты крови** 182
 — обнаружение в моче 172
Фосфоглицириновая кислота 131, 202
Фосфодезоксирибоза 36
Фосфопиривиноградная кислота 132, 190, 202
Фосфопротеиды 43
Фосфорибоза 36
Фосфор 227
 — кислотонерастворимый 182
 — кислоторастворимый 182
 — содержание в крови 183
Фосфорная кислота, колориметрическое определение 183
 — — молибденовая проба 40
 — — стандартный раствор соли 191
Фосфорнокислые соли 171
Фосфорные эфиры 121
Фотосинтез 202
Фурфуrolовая реакция (реакция Петтенкофера) 115
Фтиокол 65
- Хагедорна-Иенсена метод** 121
 — таблица 125
Хемосинтез 202
Химия тканей 177
Химотрипсиноген 142
Химотрипсин 142
Хлориды 170
 — обнаружение в моче 170
 — определение количественное способом Мора 171
 — — содержания в крови по Рушняку 181
 — растений, количественное определение 229
Хлорофилл 231
 — А 231
 — Б 231
 — восстановление аскорбиновой кислотой 235, 236
 — осаждение баритовой водой 236
 — экстрагирование 234
Холевая кислота 108, 109
Холекальциферол 61
 — точка плавления 61
Холестериды, расщепление 107
Холестерин 114, 187
 — выделение из мозговой ткани 190
Холин 114
Холофермент 75
Хромовая смесь для очистки стеклянной посуды 313
Хромопротеиды 40
- Церебозиды** 188
Цимароза 208
Цинк серноокислый 313

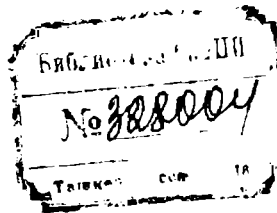
Цистеин 17
Цистин 17
Цитозин 37
Цитохромоксидаза 89, 90
Цитохромы 89, 90
Цитрулин 149
Цинга 53

Щавелевая кислота 323, 324
Щитовидная железа 306
— — гормоны 67

Экстрактивные вещества мышц 196
Эмульгирование жира 108

Энтерокиназа 142
Эпоксиды 233
Эргокальциферол 61
— точка плавления 61
Эргостерол 212, 213
Эстрадиол 72
Этилхлорофиллид 235
Эфиросерные кислоты 173
— — обнаружение в моче 173
Эфиры фосфорные 121

Янтарная кислота 102, 310, 324
— — окисление метиленовой синью
102



РАЗДЕЛ I

БЕЛКИ, ВИТАМИНЫ, ГОРМОНЫ И ФЕРМЕНТЫ

1. Химическая природа белка

Работа № 1. Биуретовая реакция (Пиотровского)	6
Работа № 2. Дикетопиперазиновая реакция с пикриновой кислотой	8
Работа № 3. Нингидриновая реакция на α -аминокислоты	9
Работа № 4. Ксантопротеиновая реакция на циклические аминокислоты	10
Работа № 5. Реакция на тирозин (Миллона)	11
Работа № 6. Реакция на аргинин (Сакагучи)	12
Работа № 7. Диазореакция на гистидин и тирозин (Паули)	13
Работа № 8. Реакции на триптофан Адамкевича и Шульца-Распайля	15
Работа № 9. Реакция Фоля на серусодержащие аминокислоты	17
Работа № 10. Нитропруссидная реакция на серусодержащие аминокислоты	18
Работа № 11. Хроматографический метод определения аминокислот	18
Контрольные вопросы	21

2. Физико-химические свойства белковых веществ

Работа № 12. Растворимость белка	24
Работа № 13. Диализ	25
Работа № 14. Определение изоэлектрической точки белка	26
Работа № 15. Разделение белковых фракций методом высадки	28
Работа № 16. Осаждение белка при кипячении	29
Работа № 17. Осаждение белка органическими растворителями	30

<i>Работа № 18.</i> Осаждение белка концентрированными минеральными кислотами	31
<i>Работа № 19.</i> Количественное определение белка по Робертсу-Стольникову	32
<i>Работа № 20.</i> Осаждение белка некоторыми органическими кислотами	32
<i>Работа № 21.</i> Осаждение белка алкалоидными реактивами	33
<i>Работа № 22.</i> Осаждение белка солями тяжелых металлов	34
Контрольные вопросы	34

3. Сложные белки

НУКЛЕОПРОТЕИДЫ

<i>Работа № 23.</i> Выделение дезоксирибонуклеопротейда из ткани селезенки или зубной железы и открытие дезоксирибонуклеиновой кислоты	38
Х <i>Работа № 24.</i> Гидролиз нуклеопротейдов дрожжей	39

ХРОМОПРОТЕИДЫ

<i>Работа № 25.</i> Гваяковая и бензидиновая пробы на геминую группировку гемоглобина	42
<i>Работа № 26.</i> Получение кристаллов гемина из гемоглобина	42

ФОСФОПРОТЕИДЫ

<i>Работа № 27.</i> Выделение казеина из молока	43
<i>Работа № 28.</i> Гидролиз казеина и открытие в гидролизате фосфорной кислоты	44

ГЛЮКОПРОТЕИДЫ

<i>Работа № 29.</i> Выделение муцина из слюны	45
<i>Работа № 30.</i> Нафтоловая проба на углеводную группировку муцина (реакция Подобедова)	46
Контрольные вопросы	46

4. Витамины

ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ

Тиамин (витамин В ₁ , анейрин)	48
<i>Работа № 31.</i> Диазореакция на тиамин	49
<i>Работа № 32.</i> Реакция окисления тиамина в тиохром	49
Рибофлавин (витамин В ₂ , лактофлавин)	50
<i>Работа № 33.</i> Реакция восстановления рибофлавина	51
Никотинамид (витамин РР, противопеллагрический)	51
Х <i>Работа № 34.</i> Проба с медью на никотиновую кислоту	52
Пиридоксин (витамин В ₆ , адермин)	52
<i>Работа № 35.</i> Феррихлоридная проба на пиридоксин	53
Аскорбиновая кислота (витамин С, антицинготный)	53
<i>Работа № 36.</i> Восстановление феррицианида калия аскорбиновой кислотой	51

<i>Работа № 37.</i> Восстановление метиленовой сини и 2,6-дихлор-фенолиндофенола аскорбиновой кислотой	55
<i>Работа № 38.</i> Йодная проба на аскорбиновую кислоту	56
<i>Работа № 39.</i> Количественное определение аскорбиновой кислоты с 2,6-дихлорфенолиндофенолом по методу Тильманса	57

ЖИРОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ

Ретинол (витамин А, антисерофталмический)	59
<i>Работа № 40.</i> Реакция на ретинол с треххлористой сурьмой	60
<i>Работа № 41.</i> Реакция на ретинол с концентрированной серной кислотой	61
Кальциферол (витамин D, антирахитический)	61
<i>Работа № 42.</i> Бромхлороформная проба на кальциферолы	62
<i>Работа № 43.</i> Анилиновая проба на кальциферол	63
Токоферол (витамин E, антистерильный)	63
<i>Работа № 44.</i> Реакция с азотной кислотой на токоферол	64
Филлохинон (витамин K, антигеморрагический)	64
<i>Работа № 45.</i> Реакции на метиннон и викасол	66
Контрольные вопросы	66

5. Гормоны

ГОРМОНЫ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

<i>Работа № 46.</i> Открытие йода в щитовидной железе	68
Гормон мозгового слоя надпочечника — адреналин	69
<i>Работа № 47.</i> Реакция на адреналин с йодатом калия	70
<i>Работа № 48.</i> Реакция на адреналин с хлорным железом	70
<i>Работа № 49.</i> Диазореакция на адреналин	70
<i>Работа № 50.</i> Количественное определение адреналина по методу Фолина	70
Гормон поджелудочной железы — инсулин	71
<i>Работа № 51.</i> Цветные реакции на инсулин	72
Гормоны половых желез	72
<i>Работа № 52.</i> Реакция на фолликулин (эстрон) с концентрированной серной кислотой	73
Контрольные вопросы	73

6. Ферменты

А. ГИДРОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ (ГИДРОЛАЗЫ)

<i>Работа № 53.</i> Получение сахаразы из дрожжей по способу А. Н. Лебедева	76
<i>Работа № 54.</i> Действие амилазы на крахмал	76
<i>Работа № 55.</i> Термолабильность ферментов	78
<i>Работа № 56.</i> Влияние температуры на скорость ферментативного катализа	79
<i>Работа № 57.</i> Специфичность ферментов	80
<i>Работа № 58.</i> Влияние pH среды на активность амилазы	82
<i>Работа № 59.</i> Влияние активаторов и парализаторов на действие амилазы	83

Работа № 60. Количественное определение активности ами- лазы слюны по методу Вольгемута	84
Контрольные вопросы	86
Б. ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТЫ	
Оксидазы	87
Тирозиназа	87
Работа № 61. Получение тирозиназы из картофеля	88
Работа № 62. Окисление тирозина кислородом в присутствии тирозиназы	89
Работа № 63. Окисление гваяковой кислоты кислородом в присутствии тирозиназы	89
Цитохромоксидаза и цитохромы	89
Работа № 64. Получение препарата, содержащего цитохромы и цитохромоксидазу	91
Работа № 65. Окисление реактива «нади» кислородом воз- духа в присутствии цитохрома и цитохромоксидазы	91
Пероксидазы и каталаза	92
Работа № 66. Окисление пирогаллола перекисью водорода в присутствии пероксидазы	93
Работа № 67. Окисление гваяковой кислоты перекисью водо- рода в присутствии пероксидазы	94
Работа № 68. Разложение перекиси водорода каталазой крови	94
Работа № 69. Газометрический метод определения каталаз- ной активности	94
Дегидразы	96
Аэробные дегидразы	96
Ксантиндегидраза	98
Работа № 70. Окисление формальдегида метиленовой синью в присутствии ксантиндегидразы (альдегидразы) молока	99
Анаэробные дегидразы	100
Сукциндегидраза	102
Работа № 71. Окисление янтарной кислоты метиленовой синью в присутствии сукциндегидразы	102
Контрольные вопросы	103

РАЗДЕЛ II

ОБМЕН ВЕЩЕСТВ В ЖИВОТНОМ ОРГАНИЗМЕ

1. Обмен липидов

ПРЕВРАЩЕНИЯ ЖИРОВ И ЛИПОИДОВ В ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОМ ТРАКТЕ	
Желчные кислоты	108
Работа № 72. Эмульгирование жира	108
Работа № 73. Влияние желчи и мыла на поверхностное на- тяжение воды	110
Работа № 74. Действие липазы на жир молока	111
Работа № 75. Кинетика действия липазы	112

<i>Работа № 76.</i> Выделение лецитина из яичного желтка	113
<i>Работа № 77.</i> Получение эмульсии лецитина	113
<i>Работа № 78.</i> Осаждение лецитина	114
<i>Работа № 79.</i> Гидролиз лецитина	114
<i>Работа № 80.</i> Реакция на холестерин (реакция Сальковского)	114
<i>Работа № 81.</i> Реакция на холестерин (реакция Либермана-Бурхардта)	115
<i>Работа № 82.</i> Фурфуроловая реакция на желчные кислоты (реакция Петтенкофера)	115

ПРЕВРАЩЕНИЯ ЖИРОВ В ОРГАНАХ И ТКАНЯХ

<i>Работа № 83.</i> Нитропруссидная проба на ацетон и ацетоуксусную кислоту	118
<i>Работа № 84.</i> Йодоформная проба на ацетон (проба Либена)	118
<i>Работа № 85.</i> Феррихлоридная проба на ацетоуксусную кислоту (проба Герхардта)	119
Контрольные вопросы	119

2. Обмен углеводов

ПРЕВРАЩЕНИЯ УГЛЕВОДОВ В ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОМ ТРАКТЕ

Гликогенообразовательная функция печени	121
<i>Работа № 86.</i> Определение сахара в крови по методу Хагедорна-Иенсена	121

ПРЕВРАЩЕНИЯ УГЛЕВОДОВ В МЫШЕЧНОЙ И ДРУГИХ ТКАНЯХ

<i>Работа № 87.</i> Анаэробный распад гликогена или крахмала до молочной кислоты (гликолиз)	135
---	-----

РЕГУЛЯЦИЯ И НАРУШЕНИЕ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА

<i>Работа № 88.</i> Влияние инсулина на содержание сахара в крови	137
<i>Работа № 89.</i> Влияние адреналина на содержание сахара в крови	138
Открытие сахара в моче	139
<i>Работа № 90.</i> Проба Троммера на сахар	139
<i>Работа № 91.</i> Проба Фелинга на сахар	140
<i>Работа № 92.</i> Проба Ниллендера на сахар	140
Контрольные вопросы	141

3. Обмен белков

ПРЕВРАЩЕНИЯ БЕЛКОВ В ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОМ ТРАКТЕ

<i>Работа № 93.</i> Анализ желудочного сока	142
<i>Работа № 94.</i> Действие желудочного сока на фибрин	145
<i>Работа № 95.</i> Створаживание молока пепсином желудочного сока	146
<i>Работа № 96.</i> Действие вытяжки из поджелудочной железы на фибрин	147

КОНЕЧНЫЕ ПРОДУКТЫ АЗОТИСТОГО ОБМЕНА

Синтез мочевины в организме	148
<i>Работа № 97.</i> Количественное определение мочевины по способу Бородина	150
<i>Работа № 98.</i> Открытие креатинина в моче	156
<i>Работа № 99.</i> Количественное определение креатинина в моче по методу Фолина	158
<i>Работа № 100.</i> Открытие индикана в моче	159

АЗОТИСТЫЙ БАЛАНС И АЗОТИСТОЕ РАВНОВЕСИЕ

<i>Работа № 101.</i> Определение азота по микрометоду Кьельдаля	161
Контрольные вопросы	165

4. Обмен минеральных веществ в животном организме

<i>Работа № 102.</i> Определение рН мочи	169
<i>Работа № 103.</i> Определение общей титруемой кислотности мочи	169
Неорганические составные части мочи	170
Хлориды	170
<i>Работа № 104.</i> Обнаружение хлоридов в моче	170
<i>Работа № 105.</i> Количественное определение хлоридов в моче по способу Мора	171
Фосфаты	171
<i>Работа № 106.</i> Обнаружение фосфатов в моче	172
Серусодержащие соединения мочи	173
<i>Работа № 107.</i> Обнаружение сульфатов и эфирсерных кислот в моче	173
<i>Работа № 108.</i> Обнаружение кальция и магния в моче	174
<i>Работа № 109.</i> Обнаружение аммиака, калия и натрия в моче	175
Контрольные вопросы	176

РАЗДЕЛ III

ХИМИЯ ТКАНЕЙ

1. Кровь

ДЫХАТЕЛЬНАЯ ФУНКЦИЯ КРОВИ

Хлориды крови	180
<i>Работа № 110.</i> Определение хлоридов в крови по методу Рушняка	181
Фосфаты крови	182
<i>Работа № 111.</i> Колориметрическое определение фосфорной кислоты в крови или в сыворотке крови	183
Ферменты крови	185
<i>Работа № 112.</i> Определение каталазной активности крови по методу Баха и Зубковой	185

2. Нервная ткань

<i>Работа № 113.</i> Разделение белков мозговой ткани	189
<i>Работа № 114.</i> Выделение холестерина из мозговой ткани	190
<i>Работа № 115.</i> Выделение фосфатидов из мозговой ткани	190
<i>Работа № 116.</i> Определение фосфопировиноградной кислоты в ткани мозга	190

3. Мышечная ткань

<i>Работа № 117.</i> Фракционированное разделение белков мышечной ткани	194
Гликоген мышечной ткани	195
<i>Работа № 118.</i> Открытие гликогена в мышечной ткани	195
Экстрактивные вещества мышц	196
<i>Работа № 119.</i> Получение безбелковой вытяжки из мышечной ткани и открытие экстрактивных веществ	199
Контрольные вопросы	200

РАЗДЕЛ IV

ОБМЕН ВЕЩЕСТВ В РАСТЕНИЯХ

1. Обмен углеводов

<i>Работа № 120.</i> Открытие крахмала в зеленых листьях растений	203
<i>Работа № 121.</i> Открытие редуцирующих веществ в вытяжке из лука	203
<i>Работа № 122.</i> Открытие крахмала и редуцирующих веществ в семенах фасоли до и после прорастания	204
Органические кислоты	205
<i>Работа № 123.</i> Определение титруемой кислотности в водной вытяжке из соевой муки	205
<i>Работа № 124.</i> Спиртовое брожение (анаэробный распад углеводов у низших растений)	206
Глюкозиды	207
<i>Работа № 125.</i> Открытие арбутина и арбутазы в листьях бадана и толокнянки	209
<i>Работа № 126.</i> Открытие антраглюкозидов в порошке алоэ и в ревене	211

2. Обмен жиров

<i>Работа № 127.</i> Обнаружение ненасыщенных жирных кислот в подсолнечном масле	213
<i>Работа № 128.</i> Открытие перекисных соединений в растительном масле	213
<i>Работа № 129.</i> Обнаружение стеролов в растительном масле	214
Контрольные вопросы	215
	341

3. Обмен азотистых веществ

БЕЛКОВЫЕ ВЕЩЕСТВА

<i>Работа № 130.</i> Обнаружение нитратов и нитритов в зеленых листьях растений	220
<i>Работа № 131.</i> Фракционное разделение белков пшеничной муки	220
<i>Работа № 132.</i> Определение нарастания аминоказота в процессе автолиза методом формолового титрования	221
Алкалоиды	223
<i>Работа № 133.</i> Обнаружение алкалоидов в траве термопсиса	229

4. Обмен минеральных веществ в растениях

<i>Работа № 134.</i> Количественное определение хлоридов в листьях лекарственных растений	229
Контрольные вопросы	230

5. Пигменты растений

Хлорофилл	231
Каротиноиды	232
<i>Работа № 135.</i> Экстрагирование хлорофилла из листьев крапивы в аппарате Сокслета	234
<i>Работа № 136.</i> Упрощенный способ экстрагирования пигментов из листьев крапивы	235
<i>Работа № 137.</i> Разделение пигментов по Краусу	235
<i>Работа № 138.</i> Осаждение хлорофилла баритовой водой	236
<i>Работа № 139.</i> Восстановление хлорофилла аскорбиновой кислотой	236
<i>Работа № 140.</i> Получение феофитина из хлорофилла	236
<i>Работа № 141.</i> Получение вытяжки из шиповника и открытие в ней каротина	237
<i>Работа № 142.</i> Количественное определение каротина в календуле (или шиповнике) методом хроматографии и колориметрии	237

6. Антибиотики низших растений

Пенициллин	241
<i>Работа № 143.</i> Открытие пенициллина реакцией с гидроксиламином	241
<i>Работа № 144.</i> Нитропруссидная реакция на пенициллин	242
Грамицидин С	242
<i>Работа № 145.</i> Получение пикрата грамицидина	243
<i>Работа № 146.</i> Биуретовая реакция на грамицидин	244
Стрептомицин	244
<i>Работа № 147.</i> Мальтозная реакция на стрептомицин	245
<i>Работа № 148.</i> Реакция Сакагучи на гуанидиновую группировку стрептомицина	246
Контрольные вопросы	246

ПРИЛОЖЕНИЯ

Пособие для лаборантов по подготовке практических занятий по биохимии	247
Лабораторный ящик	247
Установка для буферных и титрованных растворов	251
Схема расположения материалов для исследования и реактивов в лабораторном ящике	252
Списки реактивов, оборудования и материалов исследования, необходимые для проведения каждого занятия	262
Приготовление материалов для исследования некоторых реактивов, титрованных и буферных растворов	303
<i>Предметный указатель</i>	326

*Добрынина Валентина Ивановна
и Свешникова Екатерина Александровна*
Руководство к практическим занятиям
по биологической химии

Редактор *С. С. Дебов*

Техн. редактор *Э. А. Романова*

Корректор *М. Х. Хабусева*

Переплет художника *М. В. Большакова*

Сдано в набор 19/V 1958 г. Подписано к печати
12/XI 1958 г. Формат бумаги 60×92¹/₁₆. 10,75 бум. л.
21,5 печ. л. 21,09 уч.-изд. л. Тираж 8000 экз.
Т-11913. МУ-21.

Медгиз, Москва, Петровка, 12

Заказ 341. 1-я типография Медгиза, Москва,
Ногатинское шоссе, д. 1

Цена 6 р. 30 к. Переплет 1 р. 50 к.