

577.1
Д - 254

ПРАКТИКУМ ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ



Н. С. ДРОЗДОВ, Н. П. МАТЕРАНСКАЯ

577.1
Д-754

ПРАКТИКУМ ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Допущено
Главным управлением высшего и среднего сельскохозяйственного
образования Министерства сельского хозяйства СССР
в качестве учебного пособия для студентов зоотехнических
и ветеринарных институтов и факультетов



ИЗДАТЕЛЬСТВО «ВЫСШАЯ ШКОЛА»
Москва — 1970

«Практикум по биологической химии» включает наряду с практическими задачами теоретический материал по общей биохимии, изложенный с учетом современных представлений о строении и роли нуклеиновых кислот, белков, липидов, углеводов.

Приведены схемы ферментативных превращений веществ в организме животного. Введена новая классификация и номенклатура ферментов, принятая Международным биохимическим Конгрессом.

Материал пособия основан на современных методах исследования (хроматография, электрофорез и др.) и может быть использован не только студентами, но аспирантами, преподавателями и работниками научно-исследовательских институтов.

В «Практикуме» 10 таблиц. Приложение (13 таблиц), 25 рисунков.

ПРЕДИСЛОВИЕ

Истинный химик должен
быть теоретиком и практиком.

М. В. Ломоносов

«Практикум по биологической химии» составлен по программе курса биохимии с основами физической и коллоидной химии для зоотехнических и ветеринарных вузов и факультетов. В полном соответствии с этой программой и с содержанием рекомендуемого курса практических занятий в настоящее руководство входят работы по общему курсу биохимии, включающие тесно с ним связанные задачи по физической и коллоидной химии, а также работы по специальному разделу биохимии жидкостей и тканей организма. При этом, работы, касающиеся общего раздела, подчинены по своему характеру и материалу специфическим задачам курса биохимии учебного плана подготовки работников зоотехнических и ветеринарных специальностей.

«Практикум» объединяет работы в восемь глав: I. Элементарный и общий химический состав организма. II. Физико-химические факторы биохимических процессов. III. Ферменты. IV. Углеводы. V. Липиды. VI. Белки. VII. Витамины. VIII. Биохимия тканей и жидкостей организма (кровь, моча и мышечная ткань). Ко всем разделам «Практикума» даны вступления, которые, не заменяя более подробного изложения вопроса в теоретическом курсе, должны помочь студенту в проведении лабораторных работ. Пояснения по более мелким разделам и общие вступления к отдельным работам должны, кроме того, помочь студенту критически оценить значение получаемых им результатов.

Таблицы, относящиеся к теоретическому курсу даны в «Практикуме» в виде приложения в конце книги.

В «Практикум» включены лишь такие работы, возможность успешного выполнения которых в условиях студенческих занятий неоднократно проверена практически. Изданный в 1950 г. проф.

Н. С. Дроздовым учебник «Практическое руководство по биохимии мяса» (Пищепромиздат—Москва) переработан и дополнен для издания в качестве учебного пособия для сельскохозяйственных вузов, соответствующего ныне действующей программе (Н. П. Матеранская).

Работа над рукописью была начата обоими авторами и возглавлялась проф. Николаем Сергеевичем Дроздовым. Но скоропостижная кончина Николая Сергеевича прервала эту работу и не дала возможности своевременно ее завершить совместно.

Выражаю глубокую благодарность члену-корреспонденту АН СССР—Вацлаву Леоновичу Кретовичу за ценные советы при подготовке «Практикума» к изданию, а также доценту МГУ Сергею Васильевичу Шестакову за помощь в работе.

Н. Матеранская

Глава I. ЭЛЕМЕНТАРНЫЙ И ОБЩИЙ ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ОРГАНИЗМА

Организм без внешней среды, поддерживающей его существование, невозможен, поэтому в научное определение организма должна входить и среда, влияющая на него.

И. М. Сеченов

Живые организмы не являются случайным фактом в химической организованности земной коры; они образуют ее наиболее существенную и неотделимую часть. Они неразрывно связаны с косной материей земной коры, с минералами и с горными породами. Реальный организм неразрывно связан с окружающей средой... Нельзя изучать и понять организм, нельзя познать его форму и жизнедеятельность, не изучая и не зная среду жизни.

В. И. Вернадский

Живые организмы вступают в теснейшую связь с окружающей их средой. Эта связь выражается прежде всего в непрерывном в течение жизни всякого организма процессе питания. Организм поглощает из окружающей среды вещества, из которых и образуются химические соединения, входящие в его состав. Автотрофы такой синтез осуществляют непосредственно и исключительно из неорганических веществ окружающей среды и используют солнечную энергию (фотосинтез) или химическую энергию (хемосинтез). Гетеротрофы прямо или косвенно используют вещества и энергию ассимилированную автотрофами. В результате этого элементарный состав всех живых

организмов имеет определенную связь с элементарным составом суммы неорганических компонентов (составных частей) окружающей их среды. Сопоставление элементарного состава организмов с элементарным составом среды указывает не только на сходство, поскольку большая часть известных элементов входит в состав организмов, но и на различие в количественном содержании отдельных элементов, что является следствием активной избирательности веществ при ассимиляции, характерной для всякого организма (табл. 1).

Такие элементы, как O, H, C, N, S, P, K, Mg, Ca, Fe и Cl, содержание которых в организмах достигает количества от не-

Таблица 1

Расположенный по декадам средний элементарный состав воды океана (гидросферы), живых организмов и земной коры

Декады	Весовые %	Элементы в составе гидросферы	Элементы в составе живых организмов	Элементы в составе земной коры (атмосферы, гидросферы и литосферы)
I	$>10^1$	O, H	O, H	O, Si
II	10^0-10^1	Cl, Na	C, N, Ca	Al, Fe, Ca, Na, K, Mg, H
III	$10^{-1}-10^0$	Mg	S, P, Si, K	C, Mn, Cl, S, P, Ti
IV	$10^{-2}-10^{-1}$	S, Ca, K	Mg, Fe, Na, Cl, Al	N, Ba, B, V, Li, Sr, Br, Cu, F
V	$10^{-3}-10^{-2}$	C, Br, Sr	Mn, B, Sr	Be, J, Co, Th, Zn, Pb, Mo, Rb, Sn
VI	$10^{-4}-10^{-3}$	B, F	Ba, Cu, Ln, Li, Ti, V	As, Cs, Hg, Bi, Cd, W
VII	$10^{-5}-10^{-4}$	Si, Pb, N, Ln, Ba	J, F, Br, Rb, Sn, Ni, As, Mo, Co	La, As, Ag, Se, Fe, Sb
VIII	$10^{-6}-10^{-5}$	Li, J, Fe, P, As, Al, Cu, Mn		Au, Pt
IX	$10^{-7}-10^{-6}$		Hg	He
XII	$10^{-10}-10^{-9}$	Ag, Au		
XIII				
XIV	$10^{-12}-10^{-10}$	Ra	Ra	Ra

скольких десятков до $10^{-2}\%$, называют макроэлементами, они составляют основную массу органических и неорганических соединений организма. Элементы, содержание которых достигает количества от 10^{-2} до $10^{-5}\%$, называют микроэлементами. Они участвуют в построении соединений с высокой биологической активностью: гормонов, ферментов, дыхательных пигментов и других веществ организма.

Организмы не только непрерывно поглощают вещества из окружающей среды, но и столь же непрерывно выделяют конечные продукты своей диссимиляторной деятельности. Газообразные продукты при этом возвращаются в атмосферу, органические же соединения экскретов и самих погибших организмов подвергаются полной минерализации в результате жизнедеятельности многочисленных сапрофитов.

Таким образом, если у автотрофов органические вещества образуются в основном из угольной кислоты атмосферы (или угольной кислоты, растворенной в воде) и если в процессе дыхания ими непрерывно потребляется газообразный кислород, то в свою очередь и живые организмы влияют на состав газов, образующих земную атмосферу, и на другие химические компоненты окружающей среды.

Следовательно, в результате многообразных процессов взаимодействия живого организма и окружающей среды последняя не остается по отношению к организму инертной и независимой от него.

Анализ элементарного состава показывает, что главную по весу часть живого организма составляет вода. Содержание воды в организмах в среднем колеблется от 70 до 90%, однако у некоторых обитающих в воде беспозвоночных воды может быть 95—98%. В отдельных тканях и органах одного и того же организма содержание воды различно. Так, у высших млекопитающих воды в крови содержится в среднем 80%, в мышцах — 75%, в жировой ткани — 30%, в костной ткани — 45%, в почках — 80%, в печени — 74%, в коже — 70%. Вода играет важную роль, являясь универсальной средой биохимических процессов в организме, значительная часть органических и неорганических соединений в которой находится в состоянии истинных или коллоидных растворов.

Сухой (плотный) остаток образуют неорганические и органические вещества. В костной ткани неорганические (минеральные) вещества составляют большую часть всех плотных веществ. Так как тот или другой элемент может входить в состав как органических, так и неорганических соединений, то определение его суммарного содержания в тканях и органах еще не дает представления о форме, в которой он может там находиться, для этого необходимо раздельное исследование органических и неорганических соединений.

Содержание отдельных минеральных веществ в различных тканях и жидкостях организма различно, как это можно видеть из данных, приведенных в табл. 1 (см. Приложение).

Для каждой отдельной клетки или для каждой отдельной ткани соотношение между различными входящими в их состав минеральными веществами, т. е. соотношение между различными катионами и анионами, сохраняется довольно постоянным. Нарушение такого соотношения обычно более или менее тяжело отражается на жизненных функциях организма.

Основную массу органических веществ составляют белки (протеины), углеводы и липиды. Кроме них в состав клеток входят многочисленные безазотистые и азотсодержащие органические вещества — промежуточные или конечные продукты обмена белков, углеводов и липидов, т. е. биологически высокоактивные соединения. Изучение этих веществ, входящих в состав клеток и тканей организма часто в ничтожно малых количествах, наряду с изучением белков, углеводов и липидов, имеет важное значение для понимания реакций обмена веществ в организме.

Работа 1. Определение содержания воды и сухого остатка в крови

Ход работы. Высушить до постоянного веса стаканчик с притертой крышкой и плоским дном; внести 1 мл крови (можно взять и меньшее количество, например, 0,1 мл); закрыть крышкой и взвесить. Снять крышку, поставить стаканчик в сушильный шкаф и высушить вместе с содержимым в течение 2 ч при температуре 100—110°С (не выше). Потом стаканчик закрыть крышкой и поставить в эксикатор; после охлаждения взвесить; снова поставить в сушильный шкаф и сушить 15 мин. Сушку и взвешивание продолжать до тех пор, пока не будет достигнут постоянный вес. Разность между весом стаканчика до и после сушки покажет содержание воды во взятой навеске крови. Вычислить содержание воды и плотного остатка в процентах.

Во избежание ошибок определение проводить в двух параллельных опытах. Переносить стаканчик специальными щипцами или пинцетом (не руками!).

Содержание воды в цельной крови около 80%, сухого остатка — около 20%. В сыворотке и плазме крови воды около 90%, сухого остатка около 10%.

Работа 2. Определение содержания воды и сухого остатка в мышечной ткани

Ход работы. В тарированный стаканчик с притертой крышкой взять навеску 1—2 г измельченной мышцы, следить за тем, чтобы взятая навеска распределилась равномерным слоем по дну стаканчика. Дальнейшее определение проводить так же, как

и в предыдущей работе. Результат определения выразить в процентах.

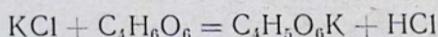
Содержание воды в мышце около 70—75%, плотного остатка около 25—30%.

Работа 3. Качественное открытие важнейших элементов, входящих в состав тканей

В состав всех клеток и тканей организма входят углерод, кислород, водород и азот. Они составляют основную массу органического вещества. В организме обнаружены также сера, хлор, фосфор, натрий, калий, магний, железо и другие элементы, входящие в состав органических и неорганических соединений. Для их обнаружения исследуемую ткань подвергают минерализации сухим путем, вначале до образования углистого остатка, а затем до полного озоления.

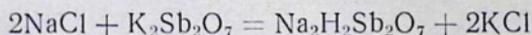
Ход работы. 5 г мышечной ткани или крови поместить в тигель и нагреть на пламени горелки до полного обугливания и прекращения дыма. После охлаждения тигля образовавшийся уголь повторно экстрагировать небольшими порциями горячей воды и водные вытяжки профильтровать через бумажный фильтр. В водной вытяжке должны находиться хлористые соли металлов первой группы, которые обнаруживаются следующими реакциями:

I. K^+ : 1) при добавлении раствора винной кислоты образуется кислый виннокислый калий (белый кристаллический осадок):



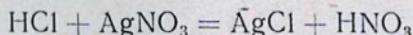
2) проба, содержащая K^+ при сгорании дает пламя красно-фиолетового цвета (наблюдать через призму с раствором индиго);

II. Na^+ : 1) при добавлении раствора кислого пиросурьмянокислого калия образуется кислый пиросурьмянокислый натрий (белый кристаллический осадок):

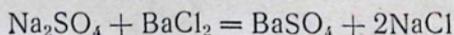


2) проба, содержащая Na^+ при сгорании дает пламя желтого цвета;

III. Cl^- : при добавлении к вытяжке, подкисленной азотной кислотой, раствора азотнокислого серебра образуется хлористое серебро (белый творожистый осадок):

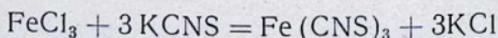


IV. SO_4^{2-} : при добавлении раствора хлористого бария образуется сернокислый барий (белый кристаллический осадок):

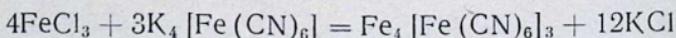


Уголь, оставшийся на фильтре после экстрагирования водой, высушить и прокалить в тигле до полного озоления. Зола растворить в 0,5%-ной соляной кислоте и раствор профильтровать. В полученном растворе находятся главным образом фосфаты металлов второй группы и соли трехвалентного железа. Они обнаруживаются следующими реакциями:

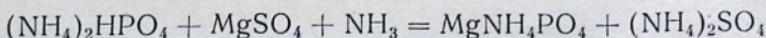
I. Fe^{3+} : 1) при добавлении к небольшой части солянокислого раствора роданистого калия образуется роданистое железо (красное окрашивание):



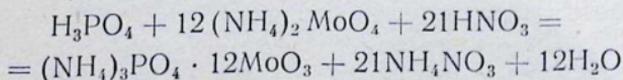
2) при добавлении раствора желтой кровяной соли образуется железистосинеродистая соль окиси железа (синее окрашивание):



II. Ca^{2+} , Mg^{2+} , PO_4^{3-} — образуется при нейтрализации остальной части солянокислого раствора золы раствором аммиака до появления легкой мути. Затем добавить 10%-ную уксусную кислоту до растворения образовавшейся мути. В полученном уксуснокислом растворе осадить кальций добавлением раствора щавелевокислого аммония; образовавшийся осадок щавелевокислого кальция отфильтровать и из фильтра, добавив аммиак, осадить магний в воде фосфорноаммонийномагниевои соли (фосфорная кислота содержится в испытуемой жидкости). Отфильтровать выпавший осадок и из фильтра, прибавив магниезальную смесь, осадить фосфорную кислоту:



Для установления присутствия фосфорной кислоты в полученных осадках (II и III; см. схему) их отфильтровать, слегка промыть водой и растворить на фильтре в разбавленной азотной кислоте. Полученный раствор нагреть с раствором молибденовокислого аммония (взять в избытке). При этом выпадет желтый осадок фосфорномолибденовокислого аммония:



Осадок фосфорномолибденовокислого аммония образуется и без нагревания, но значительно медленнее.

Схема открытия кальция, магния и фосфорной кислоты

Солянокислая вытяжка золы ткани

Добавление аммиака и подкисление уксусной кислотой

Уксуснокислый раствор содержит Ca^{2+} , Mg^{2+} и PO_4^{3-}

Добавление раствора щавелевокислого аммония

I осадок CaC_2O_4

фильтрат (Mg^{2+} и PO_4^{3-})

Добавление аммиака

II осадок MgNH_4PO_4

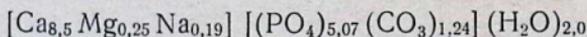
II фильтрат (PO_4^{3-})

Добавление магниальной смеси

III осадок MgNH_4PO_4

Работа 4. Качественное исследование состава кости

Минеральные вещества костной ткани составляют половину или большую часть сухого вещества ткани и состоят главным образом из фосфорнокислого и углекислого кальция. Кроме того, в состав минеральных веществ, образующих твердую часть кости, входят Mg, Na, Cl и F. Твердое неорганическое вещество костной ткани человека имеет состав, близкий к



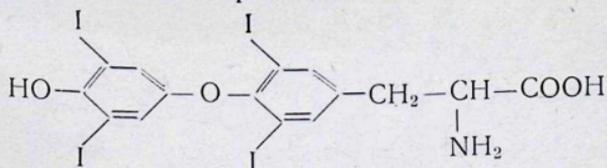
Ход работы. Хорошо очищенные и грубо измельченные кости настоять в течение нескольких дней с 0,5%-ной соляной кислотой. При этом минеральная часть кости перейдет в раствор и останутся нерастворившимися органические белковые вещества. В кислом экстракте открыть присутствие ионов Na, Ca, Mg, Fe и H_3PO_4 , как это указано в предыдущей работе.

Часть нерастворившегося органического вещества кости оставить в кислом растворе для дальнейшего исследования (работа 115), а другую часть хорошо отмыть водой до почти полного исчезновения реакции на Cl^- , после чего высушить и сжечь в тигле. Органическое вещество при этом вначале обуглится, а затем полностью сгорит.

Работа 5. Качественное открытие йода в ткани щитовидной железы

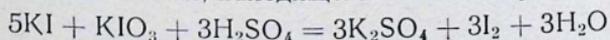
В ткани щитовидной железы находится йодосодержащее белковое вещество — тиреоглобулин. В последнем йод находится

в виде аминокислоты — тироксина:

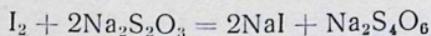


Для открытия йода необходима предварительная минерализация, которая может быть достигнута сплавлением с содой, причем йод отщепляется в виде йодистого натрия.

Ход работы. 2—3 г хорошо измельченной ткани щитовидной железы смешать с содой и сплавить в тигле. Сплав извлечь горячей водой, экстракт профильтровать и нейтрализовать 50%-ной серной кислотой. Часть полученного раствора подкислить, добавить 1—2 капли 1%-ного раствора крахмала и 0,5 мл 2%-ного раствора H_2SO_4 . Появится синее окрашивание за счет выделения йода из йодистого калия, находящегося в исследуемом растворе:



Добавить по каплям 0,01 н. раствор тиосульфата, обесцвечивающего раствор:

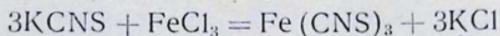


К другой части раствора после подкисления добавить немного 3%-ного раствора перекиси водорода и 1—2 капли раствора крахмала. Синее окрашивание указывает на выделение йода.

Работа 6. Качественное открытие роданистых солей в слюне человека

В некоторых случаях для того чтобы обнаружить те или другие катионы и анионы, нет надобности прибегать к минерализации или частичному разрушению органических веществ. Это относится к отдельным случаям открытия и количественного определения неорганических веществ в жидкостях организма. Само собой разумеется, что элементы, входящие в состав органических соединений без предварительной минерализации, обычными качественными реакциями обнаружены быть не могут.

Ход работы. 2 мл слюны подкислить соляной кислотой и добавить 2—3 капли сильно разбавленного раствора хлорного железа. Жидкость окрасится в красный цвет:

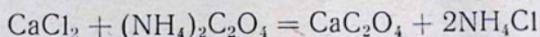


Вместо раствора хлорного железа можно пользоваться бумагой, смоченной раствором FeCl_3 , на которую нанести каплю подкисленной слюны. Реакция на роданистые соли выходит особенно отчетливо со слюной курильщиков, где роданистых солей больше.

Работа 7. Определение кальция в мышечной ткани по Ретинскому

Для определения кальция в тканях необходимо прежде всего разрушить органическую часть ткани. С этой целью ткань подвергают или озолению на пламени горелки, или гидролитическому расщеплению органических веществ ткани, которые при этом превращаются в большей своей части в легко растворимые и не мешающие определению кальция вещества. В отдельных случаях, впрочем, как, например, в сыворотке крови, возможно и непосредственное определение кальция без предварительной минерализации или разрушения органической части ткани.

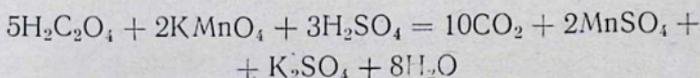
Само определение кальция основано на его осаждении щавелевокислым аммонием:



Выпавший щавелевокислый кальций отделяется, разлагается действием серной кислоты:



и выделившаяся щавелевая кислота титруется раствором перманганата:



Ход работы. 1,0 г хорошо измельченной мышечной ткани поместить в мерную колбу емкостью 10 мл, добавить 6 мл химически чистой концентрированной соляной кислоты уд. в. 1,19 и поставить на кипящую водяную баню на 8—9 ч. Затем содержимое колбы охладить, добавить до метки дистиллированную воду и, тщательно перемешав, профильтровать через двойной обеззоленный фильтр в сухую колбочку. Фильтрат может быть желтовато или коричневато окрашенным, но должен быть совершенно прозрачным.

В две конусообразные центрифужные пробирки емкостью 15 мл поместить в каждую по 4 мл полученного фильтра и по 3 мл насыщенного раствора щавелевокислого аммония и, добавив 1—2 капли раствора метилрот, нейтрализовать смесь добавлением раствора аммиака. Пробирки оставить стоять 10—12 ч для полного выпадения осадка щавелевокислого кальция.

Пробирки уравновесить добавлением воды в более легкую из них и центрифугировать: слить жидкость с осадка, добавить в каждую пробирку по 4 мл холодной дистиллированной воды, встряхнуть и снова центрифугировать, жидкость снова слить с осадка. После двукратной промывки осадка в каждую пробирку налить по 2 мл 5%-ной серной кислоты и нагреть на водяной бане 5 мин, при этом происходит освобождение щавелевой кис-

лоты. Охладить содержимое пробирок, титровать его из микробюретки 0,01 н. KMnO_4 до появления стойкого слаборозового окрашивания.

Из затраченных на титрование объемов 0,01 н. KMnO_4 взять среднее и вычесть 0,01 мл для устранения обычной при таком титровании ошибки на появление окраски. Результат определения выразить в мг Са на 100 г исследуемой ткани, т. е. в мг %. Так как 1 мл 0,01 н. KMnO_4 , согласно вышеприведенным уравнениям реакций, отвечает 0,2 мг Са (ат. вес 40,07), то, умножая эту величину на объем перманганата, деля на взятую для определения часть (0,4) навески, выраженной в граммах, и умножая результат на 100, найти содержание Са в мг %.

Содержание кальция в скелетных мышцах крупного рогатого скота 5—7 мг %. В тканях кальций находится частью в виде неорганических солей в растворах, а частью связан с белковыми веществами тканей.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ

Работа 8. Определение малых количеств йода в животных организмах по Драгомировой

Ход работы. Взять навеску от 50 до 100 г воздушносухого вещества. Измельченную навеску смешать с поташом ($\frac{1}{5}$ от веса анализируемой навески), лишенным йода, смочить водой, подсушить в сушильном шкафу при 105—110° С и подвергнуть осторожному озолению в фарфоровой или платиновой чашке при температуре муфеля не выше 480—500° С или же на маленьком пламени газовой горелки.

Когда сгорание прекратится, углистую массу охладить и слегка смочить водой, подсушить и снова подвергнуть осторожному прокаливанию при постоянном перемешивании стеклянной палочкой или платиновым шпателем. Озоленное вещество обработать 30—40 мл горячей воды. Раствор отфильтровать и остаток на фильтре промыть 3—4 раза горячей дистиллированной¹ водой, беря по 15—20 мл каждый раз. Фильтраты собрать вместе, после этого к золе добавить 1—2 мл 10 %-ного K_2CO_3 , смесь просушить в той же чашке и вновь прокалить. Процесс озоления ускорить смачиванием вещества водой. Это смачивание необходимо повторить несколько раз во время процесса озоления.

Обычно после второго прокаливании остается почти совсем чистая зола, которую надо вновь обработать 30—40 мл воды, промыть 3—4 раза горячей дистиллированной водой, беря по 15—20 мл. Фильтраты собрать вместе. Желательно указанные выше операции повторить три раза. Фильтраты и промывные

¹ В работах по определению микроэлементов необходимо пользоваться бидистиллированной водой.

воды от двух или трех озолений слить и упаривать досуха в фарфоровой (лучше в платиновой) чашке.

Полученная после упаривания масса, обычно состоящая из поташа и других растворимых компонентов золы, содержит еще органические примеси, которые удаляются осторожным прокаливанием при температуре 480—500° С в муфеле.

Чашку с солями просушить в сушильном шкафу при 105—110° С. Температуру постепенно поднимать до 160—170° С. После получасового подсушивания чашку перенести в муфель и оставить на 5 мин при 480—500° С. Этого времени обычно недостаточно, чтобы произошло полное сгорание органических примесей. Для ускорения этого процесса чашку охладить, массу солей смочить водой, подсушить в сушильном шкафу, снова прокалить в муфеле 5 мин при 480—500° С. Все операции повторить, если остались следы неудаленных органических примесей. Белый или слегка сероватый цвет находящихся в чашке солей указывает на полное сгорание органических веществ. Всю массу солей, состоящую, главным образом, из поташа и содержащую весь йод в виде йодида, подвергнуть экстракции этиловым спиртом.

Сухую поташную массу, содержащую весь йод, смочить небольшим количеством воды и тщательно растереть в платиновой чашке (диаметром 8 см) агатовым или яшмовым пестиком до получения однородной вязкой массы. В случае если такого состояния не наступит, добавить еще поташа.

В полученную массу внести 5—7 мл 96%-ного перегнанного осушенного этилового спирта и тщательно растереть в течение 5 мин. Затем прозрачный спиртовой экстракт осторожно слить в другую платиновую чашку. Операцию экстракции повторить еще 2—3 раза и экстракты слить вместе. В чашку с остатком добавить 1—2 капли 10%-ного поташа. Остаток просушить и осторожно прокалить (до покраснения дна чашки) на небольшом пламени и экстракции спиртом повторить (обычно для полного выделения йода делают 9 экстракций, повторяя операцию прокаливания).

Общий объем всех спиртовых экстракций 60—100 мл. Чашку с экстрактами поставить на слабо кипящую водяную баню, нагреваемую на закрытой электрической плитке, спирт медленно выпарить досуха (не допускать кипения спирта). Сухой остаток, состоящий главным образом из поташа, высушить в сушильном шкафу при 150° С, после чего прокалить на газовой горелке таким образом, чтобы дно платиновой чашки нагревалось не выше начала красного каления.

Если после полуминутного прокаливания соли в чашке еще содержатся органические примеси, что можно видеть по желтоватой окраске остатка, то остаток слегка смочить водой, подсушить и вновь прокалить. На дне чашки на этот раз остается едва заметный белый налет, содержащий весь йодид. Если

в раствор спирта перешло много поташа, следует еще раз экстрагировать этот остаток спиртом. Затем тонкий налет солей, содержащихся в чашке, смыть 10 мл воды в коническую колбочку из белого стекла с широким горлышком емкостью 100 мл. Раствор подкислить 2 каплями концентрированной H_2SO_4 и для окисления йодида в йодат к подкисленному раствору добавить при помощи микропипетки 0,3 мл свежеприготовленной насыщенной бромной воды и на кончике ножа тальк для равномерности кипения. После внесения всех реактивов колбочку установить в наклонном положении на предварительно хорошо нагретой песчаной бане.

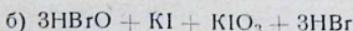
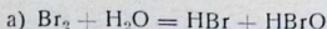
Раствор оставить кипеть 5 мин. В колбе останется после этого 5 мл раствора. Далее колбочку снять, стенки ее осторожно обмыть содержимым посредством легкого движения руки, затем колбочку осторожно охладить в холодной ванне или непосредственно под краном. В охлажденную колбочку добавить 1—2 капли насыщенного раствора фенола, затем кристаллик йодистого калия (приблизительно 5-кратное количество сравнительно с требуемым по реакции).

Следует избегать избытка KI в растворе, так как такой избыток в присутствии крахмала может вызвать окрашивание испытываемого раствора в лиловый цвет вместо синего, что затрудняет определение конца титрования.

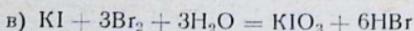
Выделившийся йод оттитровать из микробюретки 0,001 н. раствором тиосульфата в присутствии свежеприготовленного 0,5% -ного раствора крахмала.

Многочисленные определения йода в чистых солях показали, что при соблюдении указанных правил окисления йода бромной водой всегда удается открыть 95—97% введенного йода, т. е. потеря его при окислении не превышает 3—5%.

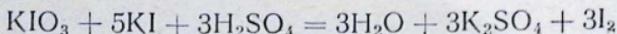
Окисление йода бромной водой идет по уравнениям:



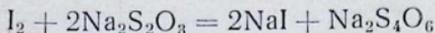
Суммируем обе реакции:



После удаления избытка свободного брома выпариваем образовавшийся йодат реагирует в кислой среде, к которой добавлен KI, по уравнению



Выделившийся йод титруется тиосульфатом:



Найденное абсолютное количество йода во взятом количестве материала равно:

$$P = 21 \cdot 15 \text{ V мг йода,}$$

где P — количество йода в микрограммах;
 V — число *мл* точно в 0,001 н. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

Результаты анализа выражаются в %. Точность опыта $\pm 0,1$.

Перед началом титрования провести контрольный опыт с дистиллированной водой, применив все реактивы, которые приготовлены для данной задачи.

Работа 9. Определение малых количеств марганца в животных организмах по Лаврухиной

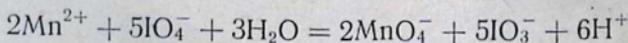
Ход работы. I. 5 г сухого вещества ткани животных, высушенного при 100°C в сушильном шкафу, поместить в платиновую чашку или (что менее желательно) в кварцевую или фарфоровую, обуглить при невысокой температуре, как указано выше. Затем чашку поместить в муфельную печь и нагревать при $550\text{--}600^\circ\text{C}$ до получения белой золы. После охлаждения золу смочить несколькими каплями концентрированной HCl , добавить 1—2 *мл* воды и раствор нагреть. Раствор вместе с осадком перенести в небольшой стакан, добавить 1—2 *мл* H_2SO_4 (1:1) и выпаривать до появления паров HCl (когда присутствует много кальция, то серную кислоту не добавлять, а остаток выпаривать досуха 2—3 раза, причем каждый раз добавлять немного HNO_3).

Осадок растворить в воде, разбавить до 25 *мл*, нагреть и, если присутствует осадок, последний отфильтровать через фильтр, предварительно промытый горячей 0,1 н. серной кислотой. Осадок на фильтре промыть небольшим количеством разбавленной серной кислоты.

Так как в этом случае осадка получается ничтожно мало, то им пренебрегают и в фильтрате определяют марганец.

II. Окислить периодатом калия (для этого к раствору добавить 3 *мл* концентрированной H_2SO_4 и 3 *мл* 85%-ной H_3PO_4 , раствор разбавить до 75 *мл*). После добавления 0,3 г периодата калия раствор нагреть до кипения и выдержать при температуре ниже точки кипения 10—15 *мин*. Затем охладить и разбавить до 100 *мл*. Определенный объем этого раствора сравнить со стандартным раствором перманганата в колориметре.

Реакция окисления марганца до перманганата протекает в горячем растворе, содержащем азотную, серную или фосфорную кислоты, следующим образом:



Стандартный раствор перманганата, который применяют для сравнения с анализируемым раствором (в нем определяют малое количество перманганата), получают окислением раствора, содержащего 0,053 г $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Окисление проводят в одинаковых условиях. Стандартный раствор разбавляют перед употреблением до 100 *мл*, тогда 1 *мл* такого раствора содержит 0,1 мг Mn .



Глава II. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Физиологическое совершенство, непонятное как непосредственное приобретение за период индивидуального развития, может быть понятно как наследие несметных веков исторического процесса.

К. А. Тимирязев

Во всем разнообразии химических реакций, протекающих в живом организме, можно установить некоторые общие факторы, влияющие на их течение. Так, на интенсивность и направленность биохимических процессов в животных и растительных организмах (или вне организма — в опытах *in vitro*) исключительное влияние оказывают физические и физико-химические факторы. Различные изменения в характере и интенсивности химических превращений в значительной степени определяются изменениями и колебаниями физико-химического состояния внутренней среды организма.

ОСМОТИЧЕСКОЕ ДАВЛЕНИЕ

Проникновение растворителя через полупроницаемую мембрану в раствор называется осмосом, давление частиц растворенного вещества на полупроницаемую мембрану — осмотическим давлением.

Клетки тканей отделены друг от друга и от межклеточных пространств с циркулирующими в них тканевыми жидкостями, клеточными оболочками, имеющими по своим свойствам много общего с простейшими полупроницаемыми мембранами. Поэтому совершенно очевидно то значение, которое должны играть осмотические процессы для жизнедеятельности как каждой отдельной клетки, так и всего организма в целом.

Осмотическое давление растворов, обнаруживаемое при отделении их полупроницаемой мембраной от чистого раствори-

теля или растворов другой концентрации, выражается для недиссоциирующих соединений уравнением

$$p = cRT$$

(где c — молярная концентрация растворенного вещества), а для электролитов уравнением

$$p = icRT$$

(где i — коэффициент, показывающий степень диссоциации).

Для биологических жидкостей определение осмотического давления с помощью приведенных формул было бы затруднительно прежде всего уже потому, что молярная концентрация в этом случае — величина трудно определяемая. Поэтому осмотическое давление биологических жидкостей определяется криоскопическим методом — по понижению температуры замораживания раствора. Так как молекулярное понижение температуры замораживания для воды

$$E = \frac{\Delta t}{c} = 1,84^\circ,$$

а, с другой стороны, из предыдущего уравнения следует, что

$$\frac{p}{c} = RT = 22,4,$$

то из этих равенств может быть определено осмотическое давление раствора (в атмосферах) для температуры 0°C :

$$\frac{p}{\Delta t} = \frac{22,4}{1,85} \quad \text{или} \quad p = \frac{22,4}{1,85}.$$

Для любой другой температуры

$$p = \frac{22,4 \Delta t}{1,85} \left(1 + \frac{t}{273} \right).$$

Таким образом, криоскопический метод дает возможность просто и с высокой степенью точности (точность $0,001^\circ$ или $0,012 \text{ атм}$) определить осмотическое давление в различных биологических средах. Следует лишь отметить, что для коллоидных растворов определение величины осмотического давления этим методом затруднительно, так как приходится прибегать к непосредственным измерениям с помощью осмометра, несмотря на ряд затруднений и погрешностей такого способа.

Наблюдение за явлением осмоса и определение осмотического давления производят при помощи осмометра.

Работа 10. Определение осмотического давления при помощи осмометра

Ход работы. В стеклянный сосуд 1, дно которого затянато полупроницаемой мембраной, налить испытуемый раствор, например глицерин, и опустить в стакан с водой (рис. 1). Подъем уровня в трубке осмометра будет происходить до тех пор, пока скорость перехода молекул воды из стакана через полупроницаемую перегородку в раствор глицерина станет равной скорости перехода воды из раствора в стакан.

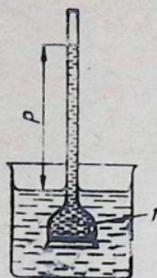


Рис. 1. Схема осмометра:

1 — стеклянный сосуд, дно которого затянато полупроницаемой мембраной, p — осмотическое давление

В начале процесса скорость перехода молекул воды из стакана в сосуд с глицерином будет большей и поэтому уровень жидкости в трубке осмометра сразу повысится, что создаст гидростатическое давление, дальнейший же переход молекул воды из сосуда в стакан приведет к динамическому равновесию. Установившееся в результате осмоса гидростатическое давление является мерой осмотического давления.

Задача 1. Подсчитать осмотическое давление для 0,9%-ного раствора хлористого натрия (физиологический раствор) при температуре 37°C , или $i=1,9$ а молекулярный вес $\text{NaCl}=58,2$.

Задача 2. Подсчитать осмотическое давление крови человека, для которой $\Delta t=0,55^{\circ}$, при 0° и при 37°C .

Задача 3. Подсчитать осмотическое давление мочи при 0°C . Для мочи найдено $\Delta t=2,0^{\circ}\text{C}$.

Работа 11. Изменение эритроцитов под действием гипертонического и гипотонического растворов

Ход работы. I. Поместить каплю крови между предметным и покровным стеклом под микроскоп. Затем на край покровного стекла нанести каплю насыщенного раствора хлористого натрия. При этом в результате обезвоживания произойдет характерное изменение формы и размеров эритроцитов (съезживание).

II. Добавить к крови дистиллированную воду. Наблюдать набухание эритроцитов, приводящее к полному разрушению их оболочки (гемолиз).

Работа 12. Изменение эритроцитов в растворах хлористого натрия различных концентраций

Ход работы. Взять десять пробирок, в каждую поместить по 1 мл раствора хлористого натрия следующих концентраций:

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
%	0,24	0,30	0,36	0,42	0,48	0,54	0,60	0,66	0,72	0,78

Эти растворы проще всего приготовить из 1%-ного раствора хлористого натрия с помощью микропипетки.

В каждую пробирку поместить затем по одной капле крови и встряхнуть. После некоторого стояния определить ту минимальную концентрацию хлористого натрия, при которой еще не происходит разрушения эритроцитов с отдачей в раствор гемоглобина, т. е. нет еще гемолиза, и по этой концентрации подсчитать осмотическое давление в таком растворе.

Работа 13. Определение величины осмотического давления криоскопическим методом

При определении осмотического давления методом криоскопии (греч. криос — холод) расчеты производят, исходя из законов Вант-Гоффа: $p_{осм} = cRT$ и Рауля $\Delta t = k \cdot m$.

Преобразовав приведенное выше уравнение для любой температуры, получаем $p_{осм} = 12,04 \Delta t$.

Для экспериментального определения понижения температуры замерзания раствора в лабораторной практике применяются термометр Бекмана, который дает возможность отсчитывать температуру с точностью до $0,002^\circ\text{C}$ (рис. 2) Термометр Бекмана имеет в верхней части дополнительный резервуар с ртутью.

Перед работой термометр установить на измеряемую температуру замерзания растворителя, т. е. подобрать такое количество ртути в нижнем резервуаре, чтобы в данном интервале температур столбик ртути в капилляре находился в пределах шкалы термометра Бекмана.

Охлаждение жидкости производится в пробирке 1 (рис. 3), в которую вставляется термометр Бекмана и мешалка. Пробирка 1 помещается через деревянную пробку в более широкую пробирку 2. Последняя служит для предохранения пробирки 1 от механических повреждений и создания более равномерного охлаждения жидкости. Пробирка 2 с помощью металлического кольца опускается в большой сосуд 3, наполняемый охлаждающей смесью.

Ход работы. I. Определение температуры замерзания растворителя. Пробирку 1 вынуть из прибора для криоскопических определений, закрыть отверстие пробки бумагой, чтобы в пробирку 2 не попали кусочки льда, и набить сосуд 3 охлаждающей

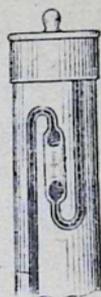


Рис. 2. Верхняя часть термометра Бекмана

смесью, состоящей из мелкоиздробленного льда и соли. Температура охлаждающей смеси должна быть ниже температуры замерзания растворителя на 3° — 5° .

В пробирку 1 налить пипеткой 20 мл дистиллированной воды, опустить в нее мешалку и термометр Бекмана (предварительно обмыть дистиллированной водой и вытереть фильтровальной бумагой!). Пробирку 1 вместе с термометром и мешалкой вставить в пробирку 2, находящуюся в охлаждающей смеси, и наблюдать за изменением мениска ртути в термометре. По мере охлаждения растворителя ртуть сжимается и мениск ее движется вниз по шкале термометра.

При медленном охлаждении жидкость переохлаждается. Переохлаждение вести на 1° ниже точки замерзания жидкости, затем жидкость встряхнуть мешалкой. При этом начинается процесс кристаллизации растворителя, освобождается теплота кристаллизации, нагревающая растворитель до истинной температуры замерзания. Мениск ртути после встряхивания раствора мешалкой быстро поднимается, затем останавливается. Точка, в которой он остановится, и является температурой замерзания чистого растворителя.

Отсчет этой точки произвести с помощью лупы с точностью до $0,002^{\circ}$ и записать. Пробирку 1 вместе с термометром и мешалкой вынуть из охлаждающей смеси, теплом руки и помешиванием мешалки расплавить образовавшийся лед, вставить пробирку снова в охлаждающую смесь и повторить опыт еще раз. Температура замерзания растворителя считается установленной, если результаты двух измерений отличаются не больше, чем на $0,003^{\circ}$.

II. Определение температуры замерзания раствора. В пробирку 1 к растворителю, точка замерзания которого уже определена, прибавить точно отмеренное количество раствора вещества, осмотическое давление которого надо определить (если исследуемое вещество берется в сухом виде, то внести точную навеску его). Раствор перемешать мешалкой и пробирку 1 поставить в охлаждающую смесь. Измерения температуры замерзания раствора произвести аналогично изме-

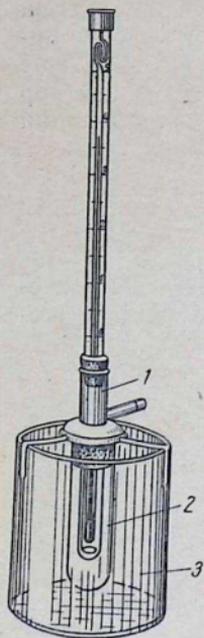


Рис. 3. Прибор для криоскопических определений:

1 — пробирка для мешалки и термометра Бекмана, 2 — пробирка, служащая для погружения в охлаждающую смесь пробирки 1, 3 — сосуд для охлаждающей смеси

рениям температуры замерзания растворителя (опыт повторить два раза с точностью до $0,003^\circ$).

Для получения более верного отсчета рекомендуется не допускать переохлаждения раствора больше чем на $0,5^\circ$ по сравнению с температурой замерзания чистого растворителя.

Определив температуры замерзания чистого растворителя и раствора, вычислить понижение температуры замерзания раствора и, подставив значение Δt в уравнение $p_{осм} = 12,04$, вычислить величину осмотического давления раствора.

АКТИВНАЯ РЕАКЦИЯ СРЕДЫ И БУФЕРНЫЕ СИСТЕМЫ ОРГАНИЗМА

Характерной особенностью живой клетки является обнаруживаемое отличие ее активной реакции от активной реакции окружающей ее среды и, в известных пределах, значительная независимость и постоянство этой реакции, достигаемое непрерывно действующими системами живой клетки, назначение которых состоит в поддержании этого постоянства концентрации ионов водорода $[H^+]$. Это постоянство $[H^+]$ клетки имеет исключительно большое значение для ее жизнедеятельности, так как обеспечивает режим внутриклеточных биохимических процессов и возможность процессов обмена между клеткой и внешней средой.

Активная реакция клеток и тканей животного организма близка к нейтральной, но несколько различна для разных тканей:

	pH
Кровь	7,35—7,45
Соединительная ткань	7,2—7,4
Кожный эпителий	5,5
Почки	7,2—7,4
Мышечный сок	6,8—6,9

Жидкости, выделяемые организмом во внешнюю среду, могут обладать концентрацией ионов водорода, резко отличной от нейтральной. Высокая кислотность, например, присуща желудочному соку (pH 1,2). Кислую реакцию (pH 5—6) имеет и моча плотоядных животных (моча растительноядных имеет щелочную реакцию). Наоборот, щелочную реакцию имеют желчь (pH 7, 8—8,6) и сок поджелудочной железы (pH 7,5—8,0).

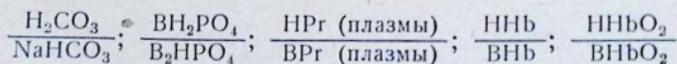
Исследование $[H^+]$ различных клеток, тканей и других биологических объектов, а также $[H^+]$, характерной для отдельных биохимических процессов, имеет значение не только для изучения этих процессов (in vivo), но и для выяснения условий, при

которых они могут быть воспроизведены экспериментально (in vitro).

Постоянство активной реакции живой клетки поддерживается теми буферными системами, которыми располагает клетка, и, с другой стороны, непрерывным освобождением клетки от конечных продуктов обмена веществ путем экскреции в окружающую среду. Так как в процессах обмена веществ образуются преимущественно кислые продукты, то в живой функционирующей клетке имеется тенденция к сдвигу концентрации ионов водорода в кислую сторону. Образующиеся кислоты связываются буферными системами клетки, которые обладают ограниченной емкостью и не в состоянии были бы сохранить $[H^+]$ клетки в достаточно узких границах, если бы не происходила постоянная и непрерывная экскреция продуктов обмена в окружающую среду, являющаяся вторым, весьма существенным, механизмом сохранения относительно постоянного значения рН живой клетки.

У одноклеточных и простейших многоклеточных животных организмов освобождение от продуктов внутриклеточного обмена происходит путем непосредственного обмена между клеткой и внешней средой. У более высокоорганизованных животных появляется обособленная от внешней среды тканевая жидкость, которая приобретает значение внутренней среды организма, и обмен веществ между клетками и внешней для организма средой происходит через посредство этой жидкости и лишь при ее участии. У позвоночных животных, имеющих развитую сосудистую систему, внутри организма циркулируют две жидкости: кровь и лимфа.

Кровь и лимфа находятся в теснейшей связи между собой. Лимфа является собственно тканевой жидкостью, и клетки тканей осуществляют непосредственный обмен с нею; кровь же, связанная, с одной стороны, с лимфой и, с другой — с экскреторными органами, обеспечивает обмен с окружающей организм средой. Таким образом, кислые продукты внутриклеточного обмена — угольная, фосфорная и нелетучие органические кислоты выводятся в тканевую жидкость и попадают затем в кровь. Кровь высших животных имеет довольно постоянную концентрацию ионов водорода, и в пределах нормы возможны лишь незначительные сдвиги рН крови. Такое постоянство активной реакции среды достигается благодаря наличию в крови ряда буферных систем:



Из этих буферных систем главная часть бикарбонатного буфера, протеиновый буфер и часть фосфатного находятся в плазме, а гемоглобиновый и другая часть фосфатного буфера

находятся в эритроцитах. Совместное действие всех перечисленных буферных систем обеспечивает постоянство $[H^+]$ крови, которая, если ее выразить в величинах рН, колеблется в норме у человека между 7,35—7,45, т. е. в пределах 0,1 рН. Возможные прижизненные колебания рН крови, однако, значительно шире: от рН 7,0 до рН 7,8. Покишение крови до рН 7,0 (ацидоз) наблюдается при накоплении кислот (недостаточное освобождение от CO_2 или накопление нелетучих кислот) или при недостатке оснований.

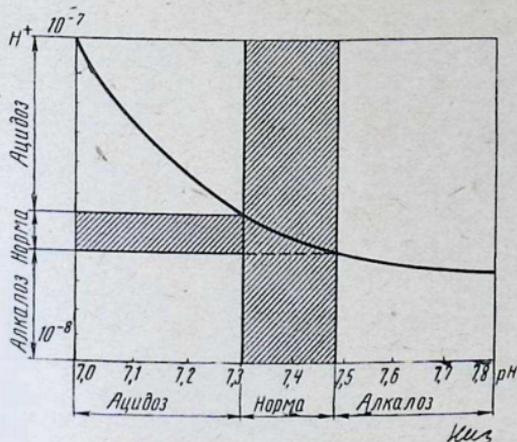


Рис. 4. Прижизненные колебания рН крови

Щелочение крови до рН 7,8 (алкалоз) наблюдается при избытке оснований в жидкостях и тканях организма или при недостатке кислот (рис. 4).

КОЛОРИМЕТРИЯ

Колориметрический анализ основан на определении зависимости интенсивности окраски раствора от концентрации красящего вещества.

Интенсивность света, прошедшего через столб жидкости, зависит от длины волны и интенсивности падающего света, природы и концентрации растворенного вещества, температуры и высоты столба жидкости. Для двух растворов одного и того же вещества с разной концентрацией, находящихся в одинаковых условиях, одинаковая интенсивность света будет достигнута, если

$$\frac{C_1}{C_2} = \frac{H_1}{H_2},$$

где C_1 и C_2 — концентрации растворов; H_1 и H_2 — высоты столбов растворов.

Если концентрация раствора C_1 известна и найдены высоты столбов, при которых интенсивность света, прошедшего через оба столба, одинакова, можно определить концентрацию испытуемого раствора:

$$C_2 = C_1 \frac{H_1}{H_2}.$$

Так как степень поглощения света зависит от условий освещения и природы жидкости, то для получения точных результатов испытуемые растворы должны иметь одинаковые условия и общую природу.

Определения производят с помощью прибора, называемого колориметром. Устройство колориметра показано на рис. 5.

Исследуемый и эталонный растворы поместить в стаканчики 1, перемещением которых вверх или вниз достигается большая и меньшая глубина опускания стеклянных погружателей 4 в растворы и различная толщина слоя жидкости, через который проходит луч света.

Световые лучи, падающие на зеркало 5, оказываются в системе призм, укрепленных в держателе 6, и направляются еще на бипризму. Лучи, проходящие через правый стаканчик, падают на левую наклонную грань бипризмы, а проходящие через левый стаканчик — на правую. Благодаря этому рассматриваемый в окуляр 7 светлый круг кажется разделенным на два полукружия; правое полукружие освещается светом, проходящим через левый стаканчик, а левое — через правый. При помощи указателя производится отсчет высоты столба жидкости.

Перед работой с колориметром проверить положение нулей. Оба стаканчика поставить на подвижные столики и поднять вращением винтов кремальерного устройства до тех пор, пока нижние плоскости стеклянных погружателей не соприкоснутся с доньшком стаканчиков. Указатели должны быть против нулевых делений на шкалах, что достигается передвижением в нужном направлении винта (установленные стаканчики менять местами нельзя).

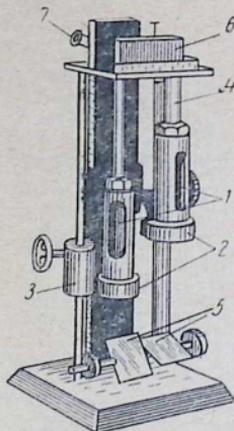


Рис. 5. Колориметр:

1 — стаканчики для исследуемого и эталонного растворов, 2 — столики для стаканчиков, 3 — ползун, на котором укреплен стаканчик, 4 — стеклянный погружатель для раствора, 5 — зеркала; 6 — держатель для крепления призм, 7 — окуляр

После проверки положения нулей в один из стаканчиков налить эталонный раствор, а в другой — испытуемый. Стаканчик со светлой жидкостью наполнить больше и установить так, чтобы высота столба оказалась максимальной, а указатель находился против целых делений (для удобства расчета). Перемещением второго стаканчика вверх и вниз (наблюдать в окуляр!) установить такое положение, когда оба полукружия будут иметь одинаковую интенсивность освещения и одинаковую окраску. После этого найти высоту второго столба.

Для получения более объективных результатов рекомендуется высоту столба определить несколько раз и взять среднее соотношение. Для повторных определений следует изменять высоту положения неподвижного стаканчика.

Работать с колориметром надо при равномерном освещении обоих полукружий. Свет должен быть рассеянным и перед колориметром не должно быть предметов, отбрасывающих тень на зеркало. Растворы, подвергающиеся колориметрированию, должны быть не слишком сильно окрашенные. Относительная ошибка определения не должна превышать 4—5%.

Работа 14. Колориметрическое определение концентрации водородных ионов безбуферным методом

Для грубого, приближенного определения рН какой-либо жидкости можно воспользоваться любой серией индикаторов, подобранной таким образом, что следующие друг за другом индикаторы имеют последовательно меняющийся интервал изменения окраски. Такая серия индикаторов приведена в табл. 2.

Таблица 2

Серия индикаторов

Название индикатора	Границы рН для переходной окраски индикаторов	Характер изменения окраски	Количество капель, добавляемых на 10 мл испытуемой жидкости
Метилвиолет	0,1—3,2	Зеленая — синяя — фиолетовая	3—8
Диметилгельб	2,9—4,0	Красная — желтая	1—2
Метилоранж	3,0—4,4	Красная — желтая	3—5
Метилрот	4,2—6,3	Красная — желтая	2—4
Лакмоид	4,4—6,4	Розовая — синяя	1—4
Нейтральрот	6,8—8,0	Красная — оранжевая	10—20
Фенолфталеин	8,3—10,0	Бесцветная — розовая	3—20

До работы следует ознакомиться с серией индикаторов, прибавляя их к растворам 0,1-н. соляной кислоты и 0,1 н. едкого натра.

Ход работы. I. Пользуясь серией индикаторов, определить приближенно рН дистиллированной и водопроводной воды. Для этого в несколько пробирок с исследуемой водой прибавить последовательно индикаторы. Так как при этом часть индикаторов дает щелочные окраски, часть — кислые, а для одного или двух получаются окраски, близкие к переходным, или переходные окраски, то на основании подобного испытания можно решить, в каком приблизительно интервале лежит рН исследуемой воды.

II. Для точного колориметрического определения перейти затем к безбуферному определению с рядом Михаэлиса. При этом пользоваться уже готовыми сериями окрасок индикаторов, в которых окраска каждой отдельной пробирки отвечает строго определенному рН.

Ряд Михаэлиса получают, смешивая различные количества раствора индикатора с подобранным количеством 0,1 н. раствора соды. Получаются, таким образом, ряды пробирок со стандартными растворами различной интенсивности желтого цвета, свойственного растворам взятых индикаторов. Готовый ряд Михаэлиса включает в себя четыре серии пробирок, для приготовления которых служат метанитрофенол, паранитрофенол, γ - и α -динитрофенолы (табл. 3).

Таблица 3

Ряд Михаэлиса

I. Метанитрофенол

№ пробирки	1	2	3	4	5	6	7	8	9
рН	8,4	8,2	8,0	7,8	7,6	7,4	7,2	7,0	6,8

II. Паранитрофенол

№ пробирки	10	11	12	13	14	15	16	17	18
рН	7,0	6,8	6,6	6,4	6,2	6,0	5,8	5,6	5,4

III. α -или 2,5-динитрофенол

№ пробирки	19	20	21	22	23	24	25	26
рН	5,4	5,2	5,0	4,8	4,6	4,4	4,2	4,0

IV. α -или 2,4-динитрофенол

№ пробирки	27	28	29	30	31	32	33	34	35
pH	4,4	4,2	4,0	3,8	3,6	3,4	3,2	3,0	2,8

Определение pH методом сравнения испытуемого раствора с рядом Михаэлиса ведется путем колориметрического сопоставления окраски испытуемой жидкости, к которой добавлен один из четырех указанных индикаторов, с окрасками стандартных растворов. Для облегчения колориметрирования можно пользоваться компаратором. Правильные результаты получаются, однако, лишь при соблюдении следующих условий:

1) пробирки, употребляемые для колориметрирования, должны быть из бесцветного стекла, одинакового диаметра, хорошо выщелочены паром;

2) сравнение окраски стандартных растворов возможно лишь с окраской испытуемой жидкости, к которой добавлен тот же, что и в данной серии стандартных растворов, индикатор (например, стандартные пробирки с паранитрофенолом сравниваются лишь с жидкостью, к которой добавлен раствор паранитрофенола);

3) в пробирке с испытуемой жидкостью должна быть определенная, сравнимая с стандартным раствором, концентрация индикатора; поэтому следует брать на 6 мл испытуемой жидкости 1 мл раствора индикатора.

III. Пользуясь рядом Михаэлиса, определить pH дистиллированной и водопроводной воды. Для этого к 6 мл исследуемой воды добавить 1 мл раствора одного из четырех индикаторов, выбор которого сделать на основании результатов, полученных при приближенном определении концентрации водородных ионов, откуда известен интервал возможных значений pH. Подобрать затем стандартный раствор, соответствующий по окраске исследуемому, или определить между какими стандартными растворами лежит окраска испытуемого раствора.

После этого таким же способом определить pH разбавленных в два-четыре раза слюны и сыворотки крови.

Работа 15. Колориметрическое определение концентрации водородных ионов окрашенной жидкости

В большинстве случаев биологические объекты исследования окрашены. Задача безбуферного метода, как и всякого колориметрического метода, несколько осложняется, так как в этих

случаях необходимо поставить опыт так, чтобы собственная окраска исследуемой жидкости была исключена.

Ход работы. Определить рН мочи. Для этого необходимо разбавить ее в пять-шесть раз водой. В гнезде 1 и 3 компаратора (рис. 6) поместить пробирки, налив в одну 6 мл разбавленной мочи, в другую 1 мл воды, а в гнездо 2 поместить пробирку с дистиллированной водой. Затем к 6 мл мочи добавить 1 мл раствора индикатора и поместить пробирку в гнездо 5. Теперь, помещая в гнезда 4 и 6 пробирки со стандартными растворами и сравнивая их окраску в проходящем свете с окраской испы-

туемой мочи, провести колориметрирование, как и в предыдущем опыте.

Разбавление не препятствует правильному определению рН мочи вследствие наличия в ней буферных систем. Свойственная ей концентрация ионов водорода изменяется при этом мало.

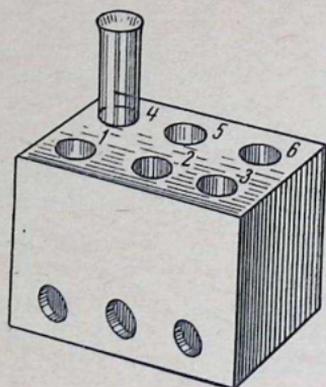


Рис. 6. Компаратор для колориметрического определения рН:

1—6 — гнезда компаратора

Работа 16. Приготовление буферных смесей и изучение их свойств

В работах, описанных ниже, пользуются фосфатноцитратными буферными смесями. Смеси готовят из 0,2 М раствора Na_2HPO_4 и 0,1 М раствора лимонной кислоты, как это указано в табл. 4.

Приготовить 0,2 М раствор Na_2HPO_4 , растворяя 35,628 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ на 1000 мл раствора, дистиллированную воду хорошо прокипятить. Двухводный кристаллогидрат получить двухнедельным выветриванием на воздухе обыкновенного $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$.

0,1 М раствор лимонной кислоты приготовить растворением 21,008 г лимонной кислоты на 1000 мл раствора.

Ход работы. I. Для изучения свойств буферных смесей приготовить смесь № 25. Такая смесь имеет рН 7,0, т. е. примерно ту же концентрацию водородных ионов, что и дистиллированная вода. Добавить к смеси и к дистиллированной воде две-три капли метилоранжа и затем по каплям 0,1 н. раствор соляной кислоты до появления розовой окраски. Сравнить количество пошедшей в том и в другом случае кислоты.

Повторить опыт, прибавляя к той же смеси и воде фенолфталеин и затем 0,1 н. раствор едкого натра до появления розовой окраски.

Таблица 4

Фосфатно-цитратные буферные смеси

Чтобы резко изменить концентрацию водородных ионов воды, требуется добавление ничтожного количества кислоты или щелочи, в то время как для достижения такого же изменения в буферной смеси необходимо добавление значительного количества кислоты или щелочи.

II. Приготовить смесь № 20 и определить для нее рН, пользуясь рядом Михаэлиса. После этого разбавить смесь в десять раз дистиллированной водой и снова определить рН. Из сравнения результатов этих двух определений можно видеть, насколько изменился рН смеси при разведении. Сравнить это изменение с изменением рН, происходящим при десятикратном разведении 0,1 н. соляной кислоты.

Из опыта можно сделать вывод о сравнительно малом изменении концентрации водородных ионов буферной смеси при разведении ее водой.

Работа 17.

Колориметрическое определение концентрации водородных ионов с помощью буферных смесей

Ход работы. Исследуя водопроводную воду с серией индикаторов (см. работу 14), найти индикатор, дающий окраску переходную между кислой и щелочной. Затем приготовить несколько буферных смесей, рН которых лежит в интервале переходной окраски выбранного индикатора.

№ смеси	рН смеси	мл 0,2 М раствора Na_2HPO_4	мл 0,1 М раствора лимонной кислоты
1	2,2	0,40	19,60
2	2,4	1,24	18,76
3	2,6	2,18	17,82
4	2,8	3,17	16,83
5	3,0	4,11	15,89
6	3,2	4,94	15,06
7	3,4	5,70	14,30
8	3,6	6,44	13,56
9	3,8	7,10	12,90
10	4,0	7,71	12,29
11	4,2	8,28	11,72
12	4,4	8,82	11,18
13	4,6	9,35	10,65
14	4,8	9,86	10,14
15	5,0	10,30	9,70
16	5,2	10,72	9,28
17	5,4	11,15	8,85
18	5,6	11,60	8,40
19	5,8	12,09	7,91
20	6,0	12,63	7,37
21	6,2	13,22	6,78
22	6,4	13,85	6,15
23	6,6	14,55	5,45
24	6,8	15,45	4,55
25	7,0	16,47	3,53
26	7,2	17,39	2,61
27	7,4	18,17	1,83
28	7,6	18,73	1,27
29	7,8	19,15	0,85
30	8,0	19,45	0,55

Прибавить к этим смесям и к водопроводной воде равные количества того же индикатора и найти путем колориметрического сравнения буферную смесь, отвечающую по окраске исследуемой воде.

Сравнить полученный результат с результатом безбуферного определения рН водопроводной воды (работа 14).

Этим же способом с буферными смесями определить рН мочи. При этом пользоваться компаратором и теми указаниями, которые сделаны при описании работы 15. Сравнить результат определения с результатом, полученным безбуферным методом.

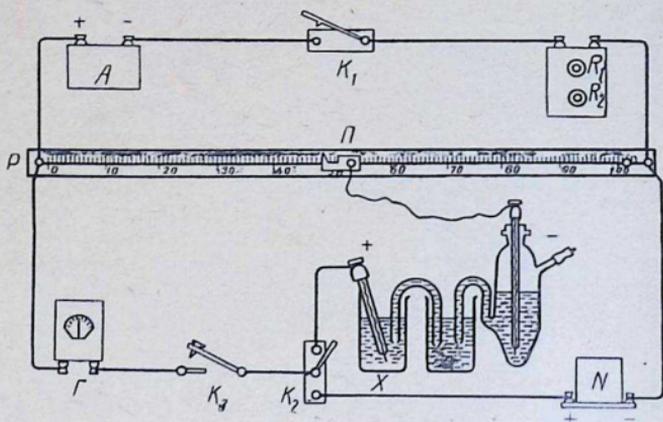


Рис. 7. Схема потенциометра. А — аккумулятор; N — нормальный элемент; X — исследуемый элемент; P — реохорд-1018; Г — гальванометр; R₁ и R₂ — добавочные сопротивления; П — ползунок; K₁, K₂, K₃ — ключи

ПОТЕНЦИОМЕТРИЯ

Работа 18. Потенциометрический метод определения рН

Ход работы. Составить гальваническую цепь из двух электродов: стандартного, с известной величиной электродного потенциала, и исследуемого, содержащего раствор водородных ионов неизвестной концентрации (рис. 7).

Для определения рН раствора хингидронно-каломелевой цепи приготовить сначала хингидронный электрод. Опустить платиновую проволочку в исследуемый раствор, затем взять каломелевый электрод и соединить его с хингидронным электродом сифоном, наполненным раствором хлористого калия в агар-

агаре. Измерить электродвижущую силу полученного элемента и вычислить величину рН исследуемого раствора по формуле

$$\text{pH} = \frac{0,4541 - E}{0,058}.$$

Вывод формулы следует ниже.

Электродвижущая сила хингидронно-каломельной цепи равна разности потенциалов хингидронного и каломельного электродов:

$$E = \Sigma_{\text{хг}} - \Sigma_{\text{кал.}}$$

Подставляя значение $\epsilon_{\text{хг}}$ из уравнения электродного потенциала Нернста и величину $\epsilon_{\text{кал.}}$, получим:

$$E = \Sigma_{\text{хг}}^0 + \xi \lg \text{CH}^+ - \epsilon_{\text{кал.}}$$

$$\text{откуда } - \lg \text{CH}^+ = \frac{(\epsilon_{\text{хг}}^0 - \epsilon_{\text{кал.}}) - E}{\xi}$$

$$\text{и } \text{pH} = \frac{(\epsilon_{\text{хг}}^0 - \epsilon_{\text{кал.}}) - E}{\xi}.$$

При $\epsilon_{\text{хг}} = 18^\circ \text{C}_{\text{хг}} = 0,7044 \text{ в.}$

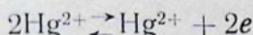
$$\epsilon_{\text{кал.}} = 0,2503 \text{ в.}, \text{ тогда } \text{pH} = \frac{(0,7044 - 0,2503) - E}{0,058},$$

$$\xi_{\text{кал.}} = 0,058, \text{ тогда } \text{pH} = \frac{0,4541 - E}{0,058}.$$

I. Каломельный электрод. Каломельный электрод представляет собой ртуть в контакте с раствором каломели и хлористого калия: $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2, \text{KCl}$.

Каломель — труднорастворимое соединение, следовательно, концентрация ионов ртути в растворе очень мала, а в присутствии хлористого калия еще больше понижается, так как у обеих солей имеется общий ион Cl^- , и остается постоянной при сохранении концентрации KCl неизменной. Потенциал такого электрода зависит от концентрации ионов хлора и следовательно от концентрации KCl .

На электроде протекает реакция:



Величина потенциала каломельного электрода:

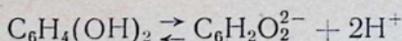
$$\epsilon_{\text{кал.}} = 0,2503 - 0,0007 (t = 18^\circ \text{C}),$$

следовательно, при 18°C $\epsilon_{\text{кал.}} = 0,2503 \text{ в.}$

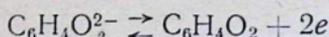
II. Хингидронный электрод. Хингидронный электрод представляет собой такую окислительно-восстановительную систему,

которая составлена с участием органических соединений $C_6H_4O_2 \cdot C_6H_4(OH)_2$ — хингидрон — кристаллическое соединение, состоящее из двухатомного фенола $C_6H_4(OH)_2$ — гидрохинона — и отвечающего ему дикетона $C_6H_4O_2$ — хинона. Хингидрон (слабо растворимый в воде) частично распадается на хинон и гидрохинон. При внесении в раствор избытка хингидрона в нем создаются постоянные и эквивалентные концентрации хинона и гидрохинона.

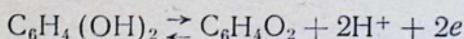
Гидрохинон, являясь слабой двухосновной кислотой, диссоциирует по уравнению:



и возникший анион, по составу равный хинону, превращается в него, окисляясь (отдавая электроны):



Суммарное уравнение будет:



Измерение потенциала этой окислительно-восстановительной системы позволяет определить рН среды, так как равновесие зависит от концентрации ионов водорода.

Величина окислительно-восстановительного потенциала выражается уравнением Нернста:

$$\varepsilon = \varepsilon^\circ + \frac{\xi}{n} \lg \frac{[Ox]}{[Red]},$$

где $[Ox]$ — концентрация окисленной формы;

$[Red]$ — концентрация восстановленной формы.

Для хингидронного электрода

$$\varepsilon_{\text{хг}} = \varepsilon_{\text{хг}}^\circ + \frac{\xi}{n} \lg \frac{[C_6H_4O_2] [H^+]^2}{[C_6H_4(OH)_2]},$$

так как в насыщенном водном растворе

$$\frac{C_6H_4O_2}{C_6H_4(OH)_2} = 1, \text{ то } \varepsilon_{\text{хг}} = \varepsilon_{\text{хг}}^\circ + \frac{\xi}{2} 2 \lg [H^+]$$

$$\text{или } \varepsilon_{\text{хг}} = \varepsilon_{\text{хг}}^\circ + \xi \lg [H^+].$$

Стандартный (нормальный) потенциал хингидронного электрода при 18°C $\varepsilon_{\text{хг}}^\circ = 0,7044 \text{ в}$.

Глава III. ФЕРМЕНТЫ

Где есть белки, а они образуют основу того вещества, которое мы называем протоплазмой, мы имеем не только материал — самое сложное органическое вещество, но и орудие — фермент, обуславливающее возможность бесконечного ряда продуктов его распада и их обратного синтеза. В комке белкового вещества потенциально дан весь разнообразный химизм живого тела.

К. А. Тимирязев

Ферментами, или энзимами, называются биокатализаторы разнообразных реакций обмена веществ, которые лежат в основе жизнедеятельности организма. Поэтому изучение как самих ферментов, так и ферментативных реакций является одной из важнейших задач биохимии. Ферментативное действие впервые было открыто русским ученым Кирхгофом в 1811 г.

Так как по характеру своего действия ферменты являются катализаторами, то при их участии осуществляются только термодинамически возможные реакции, причем роль фермента (катализатора) заключается в очень значительном повышении скорости реакции, которая при обычных температурах в отсутствие фермента ничтожно мала или практически равна нулю. Это ускорение реакции при участии фермента достигается как путем образования промежуточного соединения фермента с субстратом (реагирующим веществом), так и благодаря включению промежуточных процессов, вследствие чего достигается снижение энергии активации катализируемой реакции. Таким образом, скорость ферментативной реакции пропорциональна количеству

катализирующего ее фермента. Так как фермент не входит в суммарное уравнение катализируемой реакции, т. е. не находится в числе продуктов реакции и изменяется незначительно, то при участии ничтожно малых количеств ферментов осуществляется превращение очень больших количеств реагирующих веществ.

Ферменты, как и всякие катализаторы, изменяют лишь скорость, с которой достигается состояние равновесия обратимой реакции, но не влияют на положение этого равновесия, и поэтому в зависимости от соотношения реагирующих веществ один и тот же фермент может ускорять как прямую, так и обратную реакцию.

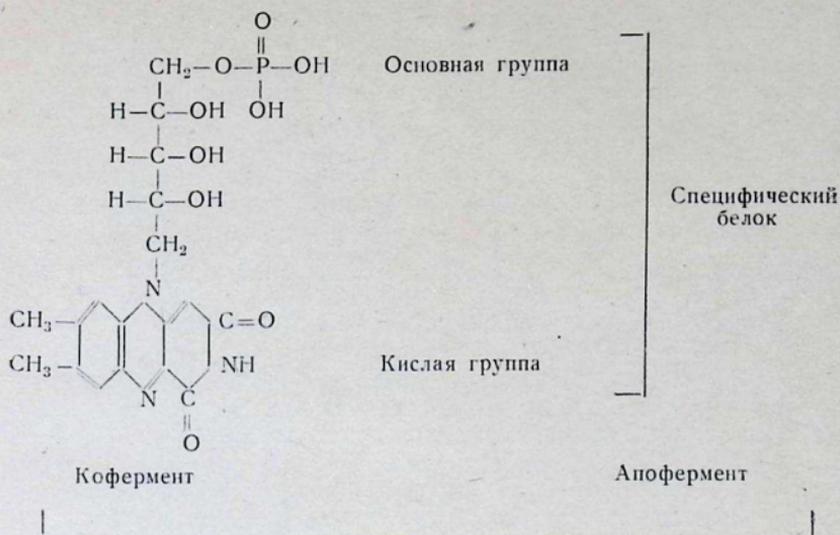
По своей химической природе ферменты — белковые вещества, обладающие высоким молекулярным весом (от 127 000 — рибонуклеаза, до 1 000 000 — пируватдекарбоксилаза зародыша пшеницы) и коллоидными свойствами. Ферменты находятся в очень малых количествах во всех живых клетках и жидкостях организма; при этом в различных клетках могут содержаться самые разнообразные ферменты. Одни ферменты сравнительно хорошо растворимы в воде и поэтому легко извлекаются из клеток, другие — прочно связаны с элементами клеточной структуры и могут быть извлечены в раствор только после механического разрушения или автолитического расщепления клеток.

Выделить ферменты в очищенном состоянии трудно. Однако многие ферменты получены в виде белковых микрокристаллов.

Ферменты — мультимеры (большинство ферментов построено из отдельных субъединиц — высокомолекулярных белков диссоциирующих на протомеры) обладают наибольшей активностью в целом, непродиссоциированном состоянии. При диссоциации на протомеры резко снижается их каталитическая активность.

Для многих ферментов (ферментов-протендов) установлено наличие двух компонентов белкового вещества (апофермента) и простетической, или активной, группы (кофермента) — вещества небелкового характера или, в некоторых случаях, атома тяжелого металла (некоторые оксидазы, например, являются Си-протеидами). При этом у одних ферментов эти компоненты прочно между собой связаны, у других же — связь эта непрочна и фермент в растворе находится в значительной части в диссоциированном состоянии в виде кофермента и апофермента, причем кофермент, в противоположность апоферменту, диффундирует через полупроницаемые мембраны и является термостабильным.

Примерами таких диссоциирующих двухкомпонентных ферментных систем могут служить фосфорилаза животных тканей (кофермент — адениловая кислота), дегидрогеназа глутаминовой кислоты — никотинамидадениндинуклеотидфосфат —

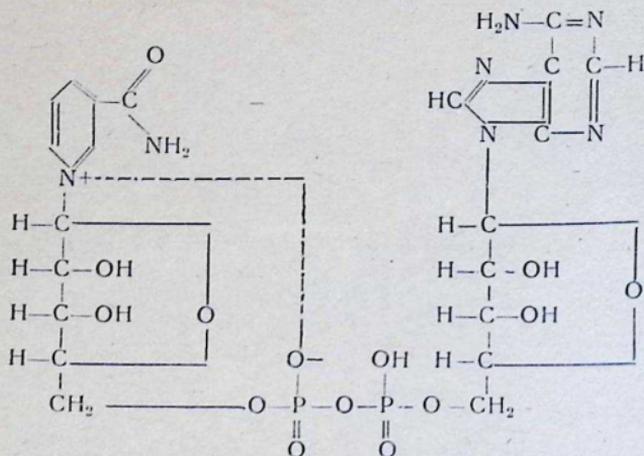
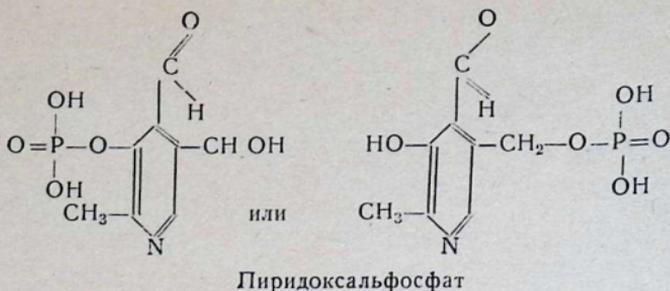


Рибофлавинкиназа
(„Желтый фермент“)

НАДФ и рибофлавинкиназа (кофермент — флавиномононуклеотид — ФМН).

В ряде случаев один и тот же кофермент может входить в состав нескольких ферментов с различной специфичностью к субстрату и, следовательно, белковый носитель является частью, определяющей не только высокую каталитическую активность, но и специфичность всей ферментной системы. Примерами таких коферментов служат никотинамидадениндинуклеотид — НАД, образующий с соответствующими специфическими апоферментами лактатдегидрогеназу, маликдегидрогеназу, алкагольдегидрогеназу и другие ферментные системы, а также пиридоксальфосфат, являющийся коферментом декарбоксилазы аминокислот и аминотрансферазы.

Ферменты, как и все белковые вещества, имеют асимметрическое строение, что обуславливает стереохимическую специфичность их действия. В связи с этой особенностью ферментов и катализируемых ими реакций находится то общее явление, что основные биогенные соединения, входящие в состав живой клетки и живого организма, являются оптически активными веществами.



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

По сравнению с простейшими катализаторами для ферментов характерна высокая специфичность их действия, которая не всегда одинаково выражена у различных ферментов. Наряду с ферментами высокоспецифичными, такими как гликозидазы, ускоряющими гидролиз только определенных дисахаридов, или таким, как уреаза, расщепляющая только мочевину, имеются и ферменты, не обладающие строгой специфичностью, как, например, пептидгидролазы, ускоряющие гидролиз целого ряда соединений, построенных по общему типу, начиная от некоторых простейших дипептидов и кончая высокомолекулярными белковыми веществами.

Другой особенностью почти всех ферментов является их термолабильность, т. е. склонность быстро и необратимо терять в растворах свою активность при сравнительно непродолжитель-

ном нагревании до 80—100° С. Это может быть использовано для отличия ферментов от обычных катализаторов. Термолабильность ферментов связана с их белковой природой. Как и все белки, ферменты образуют коллоидные растворы (золи), при нагревании которых при температуре 70—100° С на поверхности коллоидной мицеллы происходят химические процессы, необратимо изменяющие свойства белка и носящие название тепловой денатурации.

С повышением температуры до известного предела скорость ферментативных реакций возрастает, причем для большинства ферментативных реакций температурный коэффициент до 30° С равен 1,3—2,0. При дальнейшем повышении температуры хотя и происходит нарастание скорости, однако температурный коэффициент уменьшается, что свидетельствует о начинающемся процессе разрушения фермента. Наконец, при достижении определенной температуры наблюдается довольно быстрое уменьшение скорости реакции, так как наступает интенсивное разрушение фермента. Температурный оптимум для большинства ферментов животных организмов лежит между 40—50° С, а для ферментов растений — между 50—60° С. Температурный оптимум для одного и того же фермента зависит от продолжительности опыта, присутствия различных веществ и чистоты препарата фермента.

Ферменты разрушаются в сильно кислых и сильно щелочных растворах и устойчивы только в определенных границах изменения активной реакции среды. В этих границах скорость катализируемой ферментом реакции различна при различных концентрациях ионов водорода $[H^+]$, причем только при определенной $[H^+]$ наблюдается наибольшая скорость реакции. Такая оптимальная концентрация ионов водорода отвечает наибольшей активности фермента. Оптимальная $[H^+]$ не всегда одинакова для различных препаратов одного и того же фермента и изменяется иногда в зависимости от степени чистоты фермента. Кроме того, оптимальные концентрации ионов водорода двух ферментативных реакций с различными субстратами, но катализируемых одним и тем же ферментом, могут быть несколько отличными.

Скорость ферментативной реакции, которая определяется количеством субстрата, прореагировавшего в единицу времени, находится в зависимости от количества субстрата, количества фермента и ряда других факторов (температуры, $[H^+]$, присутствия продуктов ферментативной реакции, активаторов и ингибиторов, степени чистоты ферментного препарата). При малых количествах субстрата скорость ферментативной реакции возрастает пропорционально количеству субстрата; при избыточных количествах субстрата — постепенно падает. При оптимальных или избыточных количествах субстрата скорость ферментативной реакции обычно прямо пропорциональна количеству фермента, таким образом скорость реакции возрастает вдвое при увеличе-

нии в два раза количества фермента. В присутствии некоторых веществ скорость ферментативной реакции при прочих равных условиях может быть различной с одним и тем же количеством фермента. Такие вещества или увеличивают активность фермента (активаторы), или уменьшают (ингибиторы).

Кроме активных групп (ферменты — протенды) или активных центров (ферменты — протеины) биокатализаторы имеют субстратный центр — участок ответственный за присоединение субстрата к ферменту и аллостерический центр, при присоединении к которому изменяется третичная структура белковой молекулы. Это присоединение приводит к изменению конфигурации активного центра и, как следствие, к увеличению или уменьшению каталитической активности фермента.

Аллостерическая регуляция нарушается при диссоциации ферментов-мультимеров на отдельные субъединицы. Последние являются, видимо, аллостерическими регуляторами активности других субъединиц, что видно на примерах каталазы (мол. вес 252 тыс.) и 6 протомерами в молекуле, уреазы (мол. вес 480 тыс.), имеющей 8 субъединиц.

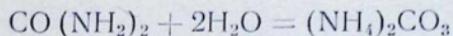
К числу активаторов и парализаторов относятся различные окислители и восстановители. Эти вещества могут или необратимо разрушать фермент, или своим присутствием создавать определенное окислительно-восстановительное состояние среды, выражаемое величиной окислительно-восстановительного потенциала E_h , которое отражается на активности фермента. Так, например, активность уреазы является функцией E_h , причем оптимальная активность наблюдается при $E_h = +150 V$ и постепенно падает при более низких и более высоких значениях E_h .

Часть ферментов находится в клетках и тканях в виде неактивных форм — проферментов (зимогенов), приобретающих ферментативную активность лишь после взаимодействия со специфическими или неспецифическими активаторами, в результате чего образуется активная форма фермента.

Работа 19. Специфичность ферментативного действия

Фермент амилаза, ускоряет гидролиз α -гликозильных (глюкановых) связей молекулы крахмала; синей окраски с йодом не образуется. В слюне крупного рогатого скота и лошадей амилаза практически отсутствует.

В бобах сои и в других растениях содержится фермент уреазы, ускоряющий гидролиз мочевины (диамид угольной кислоты).



Оба эти фермента активны в одних и тех же условиях; оптимум действия амилазы слюны при рН 6, 8, оптимум для уреазы — рН 7,0.

Ход работы. В две пробирки (1 и 2) налить по 5 мл 0,1%-ного раствора крахмала, предварительно убедившись, что при добавлении к такому раствору одной-двух капель раствора I в KI получается синее окрашивание. Затем в две другие пробирки (3 и 4) налить по 5 мл 1%-ного раствора мочевины, к которому предварительно добавить несколько капель фенолфталеина. После этого в пробирки 1 и 3 внести по 1 мл профильтрованной слюны (можно пользоваться слюной, предварительно разбавленной водой), а в пробирки 2 и 4 по 1 мл раствора уреазы (см. работу 28) и поставить в водяной термостат при 38—40° С на 10—25 мин. По окончании нагревания в пробирки 1 и 2 добавить по одной капле раствора йода в йодистом калии.

Гидролитическое расщепление крахмала (исчезновение синей окраски с йодом) произойдет только в присутствии амилазы (пробирка № 1), а расщепление мочевины (появление розового окрашивания фенолфталеина) только в присутствии уреазы (пробирка 3).

Работа 20. Термолабильность ферментов и влияние $[H^+]$ на ферментативные реакции

Ход работы. Взять три пробирки и налить в каждую по 5 мл 0,1%-ного раствора крахмала. Затем в первую и вторую прибавить по 1 мл дистиллированной воды, а в третью — 1 мл 0,1 н. раствора соляной кислоты. После этого в первую и третью пробирки прибавить по 1 мл профильтрованной слюны (можно пользоваться слюной, разбавленной в несколько раз водой), а во вторую — 1 мл той же слюны, но предварительно прокипяченной и охлажденной. Все три пробирки поставить на 20—25 мин в термостат при 37° С. Вынуть пробирки из термостата, охладить, погружая в ледяную воду и доливая холодной водой, а затем в каждую добавить по одной-две капли раствора йода в йодистом калии.

Только в первой пробирке происходит расщепление крахмала (синего окрашивания при добавлении раствора I и KI не наблюдается). Во второй пробирке фермент необратимо инактивирован нагреванием, а в третьей — реакция протекает слишком медленно вследствие высокой кислотности раствора (оптимум действия амилазы слюны при рН 6,8). Поэтому во второй и третьей пробирках получается синее окрашивание с раствором I в KI.

Работа 21. Влияние температуры на скорость ферментативной реакции

Ход работы. Взять четыре пробирки и поместить в каждую по 5 мл 0,25%-ного раствора крахмала. Затем пробирку 1 поместить в ледяную воду, пробирки 2 и 3 — в термостат при 38° С и пробирку 4 — в сильно кипящую водяную баню. После этого, по возможности одновременно, внести в пробирки 1, 2 и 4 по

0,5 мл слюны, а в пробирку 3 — 0,5 мл прокипяченной слюны. Время от времени из пробирки 2 брать каплю и вносить в 1 мл сильно разбавленного раствора I в KI.

Когда такая капля перестает давать окрашивание и, следовательно, в пробирке 2 расщепление крахмала закончилось, во все пробирки добавить 3—4 мл 1,0 н. H_2SO_4 и охладить. Затем добавить во все пробирки по две-три капли раствора йода в йодистом калии.

Только в пробирке 2, нагревавшейся при температуре, близкой к оптимальной, расщепление крахмала оказывается законченным (нет окрашивания с йодом). В пробирке 3 расщепления крахмала нет, так как фермент предварительно инактивирован нагреванием.

Работа 22. Зависимость скорости ферментативной реакции от количества фермента

Ход работы. Взять четыре пробирки и налить в каждую по 3 мл фосфатно-цитратной буферной смеси с рН 6,8 (смесь № 24). Затем в каждую пробирку поместить по 4 мл 0,25% -ного раствора крахмала и добавить по возможности одновременно, в первую пробирку 1 мл слюны, разведенной в 20 раз, во вторую — 1 мл слюны, разведенной в 40 раз, в третью — 1 мл слюны, разведенной в 80 раз и в четвертую — 1 мл слюны, разведенной в 160 раз. Без промедления поместить пробирки в термостат при температуре 38—40° С, а затем время от времени брать пробы в количестве нескольких капель и смешивать в отдельных пробирках с сильно разбавленным раствором I в KI. В начале пробы дают синее, а затем красно-фиолетовое и красное окрашивание. Отмечают с точностью до 0,5 мин время от начала опыта до исчезновения синего окрашивания с йодом для каждой из четырех пробирок. Этот момент является концом амилолитического расщепления.

Результаты опыта изобразить графически, откладывая по оси абсцисс относительную концентрацию амилазы, а по оси ординат соответствующее время.

Время, необходимое для расщепления крахмала, обратно пропорционально скорости реакции.

Работа 23. Определение $[H^+]$ оптимальной для амилолитической активности амилазы слюны

Ход работы. Взять семь пробирок и налить в каждую по 5 мл фосфатно-цитратной буферной смеси (см. работу 16) по следующей схеме:

№ пробирки	1	2	3	4	5	6	7
№ смеси	10	15	17	21	24	27	30
рН	4,0	5,0	5,4	6,2	6,8	7,4	8,0

Затем в каждую пробирку налить по 4 мл 0,25%-ного раствора крахмала и по 1 мл разведенной слюны. Без промедления поместить все пробирки в термостат при температуре 38° С. Время от времени брать из всех пробирок пробы в количестве нескольких капель и смешивать в отдельных пробирках с сильно разбавленным раствором I в KI. Вначале пробы дают синее окрашивание, а по прошествии некоторого времени красно-фиолетовое или красное окрашивание и, наконец, перестают давать окраску с йодом.

Для каждой из пяти пробирок отметить время (с точностью до 0,5 мин), когда проба перестает давать синее окрашивание. Этот момент можно считать концом амилолитического расщепления. Полученные результаты изобразить графически. Для этого по оси абсцисс нанести рН опытов, а по оси ординат — соответствующее время расщепления крахмала. Нанесение точки соединить кривой (рис. 8).

Данные опыта записать по следующей форме:

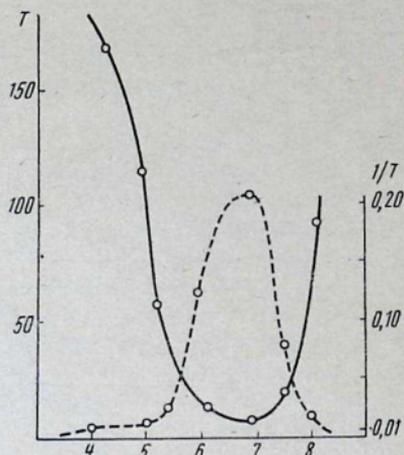


Рис. 8. Кривые прямой и обратной зависимости активности амилазы от рН

рН	Время, мин	1/T	рН	Время, мин	1/T
4,0	160	0,006	6,8	5	0,200
5,0	110	0,009	7,4	14	0,071
5,4	60	0,017	8,0	85	0,011
6,2	8	0,125			

Опыт, в котором расщепление произошло в наиболее короткий срок, соответствует максимальной активности фермента, а рН этого опыта — оптимальной [H⁺].

Работа 24. Влияние хлористого натрия и фенилтиомочевины на амилолитическую активность амилазы слюны

Ход работы. В три пробирки налить по 1 мл 0,25—0,5% раствора крахмала и по 4 мл буферной смеси с рН 6,8 (смесь № 24). Затем в первую пробирку налить 3 мл воды, во вторую 3 мл 0,1%-ного раствора хлористого натрия, а в третью —

3 мл 0,02%-ного раствора фенилтиомочевины. После этого в каждую пробирку добавить по 1 мл разведенной слюны и сразу поставить в термостат (температура 38° С). Время от времени брать пробы и отмечать для каждой пробирки время, необходимое для исчезновения (в пробе) синего окрашивания с раствором I в KI. Сравнивая время расщепления крахмала во второй и третьей пробирках с временем расщепления в первой пробирке (контроль), вычислить соответствующее ускорение в минутах.

ОТДЕЛЬНЫЕ ПРЕДСТАВИТЕЛИ ФЕРМЕНТОВ И ПОЛУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Так как ферменты представляют интерес со стороны их каталитической функции и изучаются в связи с катализируемыми ими реакциями, то номенклатура и классификация ферментов основаны на признаках, характерных для соответствующих ферментативных реакций или для веществ, испытывающих превращение в том или ином ферментативном процессе. Такой принцип при дополнительном условии добавления для наименования фермента окончания «аза» дает простой способ к обозначению любого, даже еще очень мало и поверхностно изученного, фермента. Однако, этот универсальный способ номенклатуры имеет и свои недостатки, так как может приводить в отдельных случаях к ошибочным определениям, когда для одного и того же фермента могут быть даны различные наименования или, наоборот, различные ферменты могут получить одно название. Такого рода неясности и ошибки в номенклатуре ферментов устраняются при более глубоком изучении как самого фермента, так и механизма катализируемой им реакции. Только выделение фермента в очищенном состоянии и подробное изучение его химических и физико-химических свойств, строения и функции его активной группы, условий и механизма самой ферментативной реакции могут служить достаточно надежными основаниями для его характеристики.

Поэтому основой для общей классификации ферментов и выбран принцип подразделения ферментов на группы согласно типу катализируемой реакции, которая в сочетании с названием субстратов служит основой наименования ферментов.

Согласно решению Международной комиссии по ферментам, состоявшейся в 1956 году, принята следующая классификация ферментов.

I. Оксидоредуктазы — окислительно-восстановительные ферменты, катализирующие реакции переноса водорода на какой-либо акцептор и в том числе на кислород и перекись водорода.

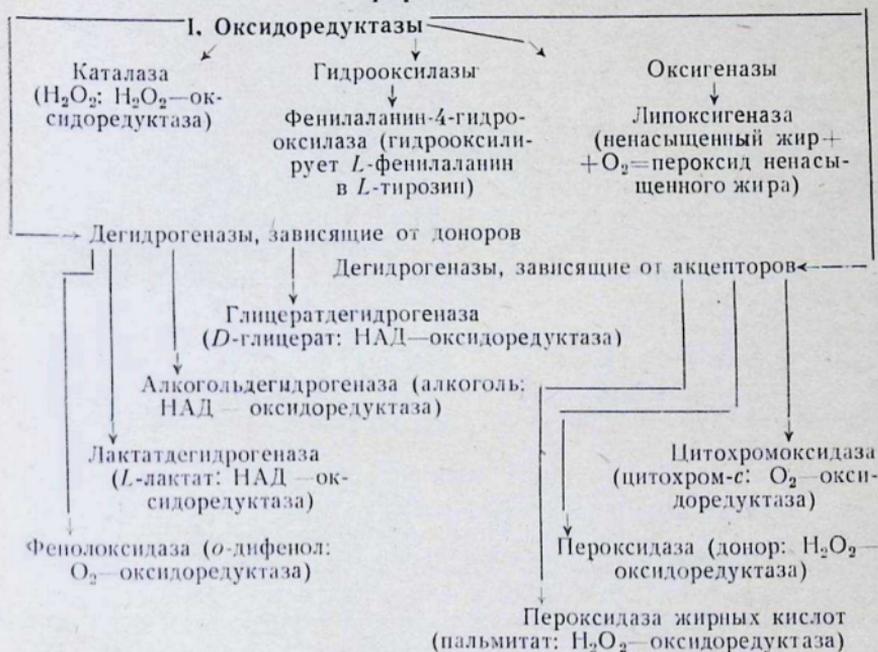
Эта большая группа ферментов подразделяется на классы, различающиеся донорами — веществами, от которых отнимается водород ферментом (окисление).

В свою очередь эти классы разбиваются на подклассы и зависимость от акцептора — вещества, присоединяющего водород от фермента (восстановление).

В качестве примера оксидоредуктазы может быть приведена алкогольдегидрогеназа. Название говорит о том, что этот фермент относится к классу действующих на $> \text{СН—ОН}$ — группу доноров (спирты), подкласс же определяется акцептором — никотинамидадениндинуклеотидом (НАД). Реакция, катализируемая этим ферментом, представляет собой превращение первичных или вторичных спиртов в альдегиды или кетоны (соответственно). Алкогольдегидрогеназа является переносчиком водорода на никотинамидадениндинуклеотид, который присоединив водород, превращается в восстановительную форму — НАД. H_2 (или $\text{НАД—Н} + \text{Н}^+$). Систематическое название этого фермента будет — алкоголь: НАД-оксидоредуктаза¹.

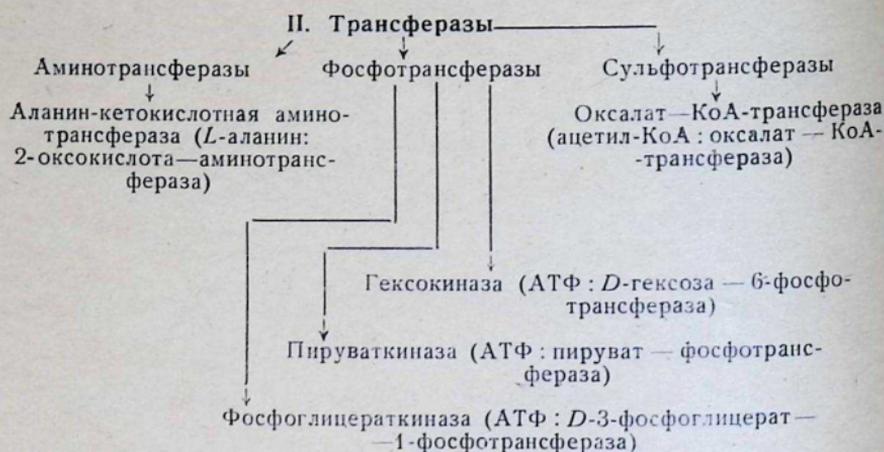
В отдельные классы этой группы выделены такие окислительно-восстановительные ферменты, которые используют O_2 в качестве окислителя — гидрооксилазы и оксигеназы.

Принципы классификации и отдельные представители ферментов



¹ При дальнейшем изложении систематическое название фермента — название, данное согласно решению Международной комиссии по ферментам, будет приводиться в скобках, в отличие от рабочего названия.

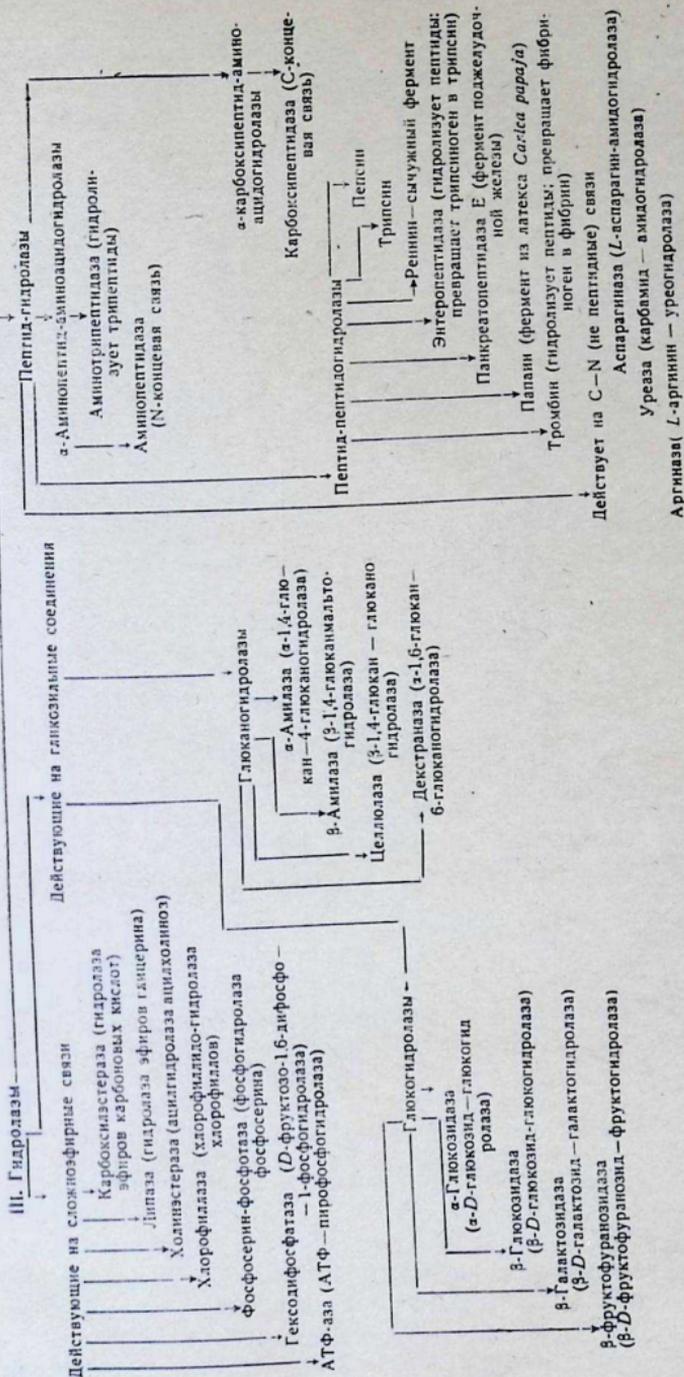
II. Трансферазы — ферменты, переносящие остатки молекул. Поэтому в названии трансферазы входит наименование той группы, которая подвергается переносу. Например, аминотрансфераза — фермент, переносящий аминокруппы; сульфотрансфераза — фермент, переносящий сульфогруппу и т. п.



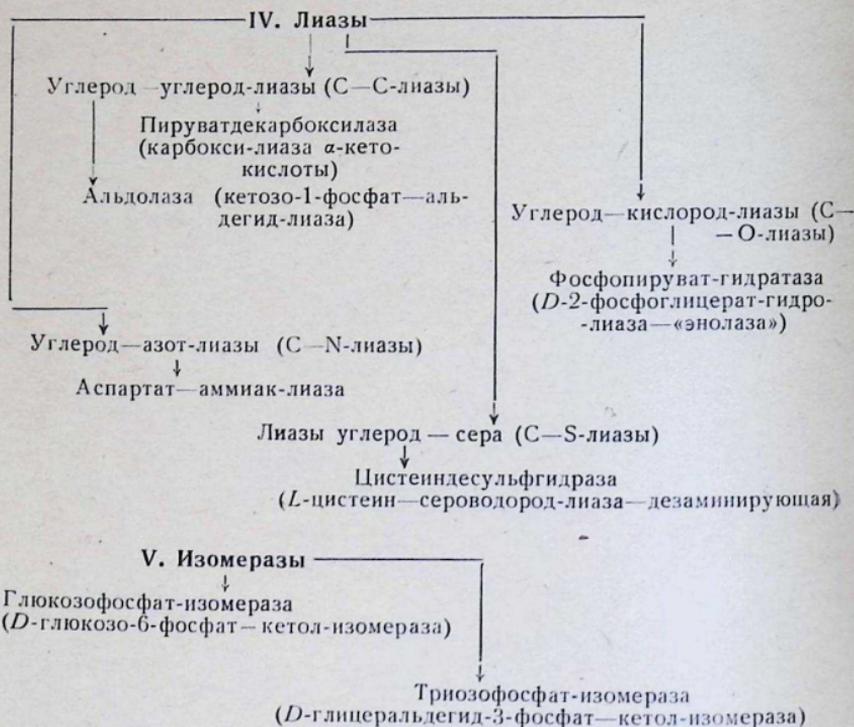
III. Гидролазы — ферменты, ускоряющие реакции гидролиза различных соединений. Они подразделяются на: 1) *эстеразы*, действующие на сложноэфирные связи (карбоксилэстераза — гидролизует сложноэфирные связи эфиров карбоновых кислот и спиртов; липаза — гидролаза эфиров глицерина — гидролизует триглицериды); 2) *гликозидазы* (гликозид — гликогидролазы), ускоряющие гидролиз гликозидных связей ди- и полисахаридов и гликозидов и 3) *пептидгидролазы*, действующие на пептидные связи дипептидов, полипептидов и белков (аминопептидаза гидролизует ди- и трипептиды со стороны свободных аминокрупп, карбоксиполипептидаза гидролизует полипептиды со стороны свободных карбоксильных группы, пепсин и трипсин гидролизуют белки).

IV. Лиазы. Эта группа объединяет ферменты, отщепляющие от субстратов ту или иную группу с образованием двойной связи, или, наоборот, присоединяющие различные группы к двойным связям. Примером является альдолаза, расщепляющая кетозо-1-фосфат на диксоацетонфосфат и альдегид. Систематическое название, указывающее на природу действия этого фермента будет: кетозо-1-фосфат — альдегид-лиаза (см. схему на стр. 47).

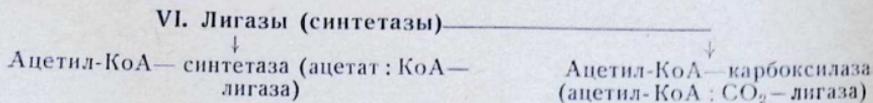
V. Изомеразы. К этой группе ферментов относятся такие, которые ускоряют разнообразные изомерные превращения. Рацемазы — более частное деление — ферменты, превращающие



изомеры *D*-форм в *L*-формы; *цис-транс*-изомеразы, изомеризируют переход *цис*-формы в *транс*-форму; внутримолекулярные оксидоредуктазы катализируют взаимопревращение альдоз и кетоз.



VI. Лигазы. Это — ферменты, которые катализируют присоединение двух молекул друг к другу, связанные с расщеплением пиррофосфатной связи в молекуле АТФ или аналогичного трифосфата.



Приведенный перечень охватывает не все известные ферменты, однако дает представление о разнообразии типов биокатализаторов. Число различных индивидуальных ферментов, по-видимому, еще значительнее, так как ферменты, даже тождественные

или мало отличающиеся по своему действию, но различные по своему биологическому происхождению, часто неидентичны.

Это может зависеть как от наличия сопутствующих ферменту веществ, так может быть и проявлением видовой специфичности. Поэтому при названии фермента часто используется источник, из которого он взят.

Получение фермента в очищенном состоянии заключается в выделении его из клеток и тканей, отделения от сопутствующих ферментов и инертных веществ и, наконец, кристаллизации фермента.

Такая полная очистка, осуществленная для сравнительно ограниченного числа ферментов, представляет довольно сложную экспериментальную задачу. Неполная очистка ферментных препаратов бывает связана со значительными трудностями из-за ничтожного количества фермента в исходном материале. Практически наиболее часто исследованию подвергаются препараты ферментов большей или меньшей степени очистки или же непосредственно с вытяжкой из объектов животного или растительного происхождения, содержащей изучаемый фермент.

Работа 25. Получение препарата, содержащего панкреатическую амилазу (α -1,4-глюкан-4-глюканогидролаза)

Панкреатическая амилаза — фермент, ускоряющий гидролиз α -гликозильных (глюкановых) связей в молекулах полисахаридов (крахмала, гликогена). Подобно амилазе слюны она активируется хлористым натрием и оптимально активна при pH 6,8.

Препарат, содержащий панкреатическую амилазу, извлекается из поджелудочной железы водным глицерином, или же получается в сухом виде (сухой панкреатин). В том и другом случае препарат содержит, наряду с амилазой, много липазы и протеазы, которые, если хотят препарат очистить, удаляют адсорбцией с помощью глинозема и каолина.

Поджелудочную железу по возможности освобождают от жировой ткани, измельчают, смешивают с пятикратным объемом ацетона и встряхивают около двух часов. Фильтруют, осадок снова обрабатывают ацетоном, затем ацетоном с эфиром (1:1) и, наконец, два раза двойным объемом эфира. Затвердевший осадок высушивают на фильтровальной бумаге, тщательно измельчают в ступке или шаровой мельнице и просеивают через тонкое сито. Получают светлый порошок. Препарат при настаивании при 30°С с 10 частями 85%-ного водного глицерина или с 50 частями воды дает прозрачные растворы, содержащие трипсин, липазу и панкреатическую амилазу, причем амилаза переходит в раствор наиболее легко и полно.

Ход работы. Взять четыре пробирки и налить в каждую по 3 мл 0,25%-ного раствора крахмала, а затем в пробирки 1 и 2

по 1 мл дистиллированной воды, в пробирку 3 — 1 мл 0,1 н. соляной кислоты и в пробирку 4 — 1 мл 0,1%-ного раствора хлористого натрия. После того, по возможности одновременно, прилить в пробирки 1, 3 и 4 по 1 мл экстракта панкреатической амилазы, а в пробирку 2 — 1 мл прокипяченного и охлажденного экстракта. Без промедления поставить все пробирки в термостат при 38° С. Время от времени из пробирок брать по капле жидкости и переносить в разбавленный раствор йода в йодистом калии и, таким образом, следить за скоростью расщепления крахмала. В пробирке 2 расщепление крахмала не происходит, так как фермент инактивирован нагреванием, а в пробирке 3 расщепление идет очень медленно, вследствие высокой кислотности (оптимум активности панкреатической амилазы рН 6,8). Сравнить скорость гидролиза в пробирках 1 и 4.

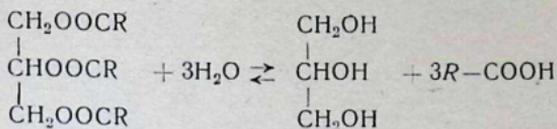
Работа 26. Гидролитическое расщепление жира при действии панкреатической липазы (гидролаза эфиров глицерина)

Панкреатическая липаза ускоряет реакцию гидролиза сложноефирных связей в молекуле жиров (триглицеридов), протекающую с образованием глицерина и жирных кислот, и гидролиз некоторых других сложных эфиров, например этиловых эфиров высокомолекулярных жирных кислот. Оптимум действия панкреатической липазы лежит при рН 7,0—8,0, однако, как и для многих других ферментов, значение оптимума зависит от присутствия тех или иных сопутствующих веществ и состава буферной смеси. При прочих равных условиях липолитическое расщепление протекает тем энергичнее, чем выше степень дисперсности жира. Желчь в организме ускоряет гидролиз жиров в кишечнике. При щелочной реакции панкреатическая липаза активируется желчными солями, солями кальция, мылами и альбумином.

В качестве раствора, содержащего панкреатическую липазу, может служить водно-глицериновая вытяжка из сухого панкреатина (см. предыдущую работу) или глицериновый экстракт поджелудочной железы. В качестве субстрата ферментативной реакции служит жир молока.

Ход работы. В две пробирки налить по 5 мл предварительно прокипяченного и охлажденного молока. Затем в каждую добавить по одной капле фенолфталеина и осторожно, по каплям, 1%-ного раствора соды до появления розового окрашивания. После этого в первую пробирку прилить 1 мл глицеринового экстракта поджелудочной железы, содержащего липазу, а во вторую — 1 мл того же экстракта, но предварительно прокипяченного и охлажденного. Обе пробирки поставить на 20—25 мин в термостат при 37° С.

Окраска в первой пробирке исчезает вследствие связывания избыточной щелочи, образующимися при липолитическом процессе жирными кислотами:



Во второй пробирке цвет не меняется (остается розовая окраска) ввиду отсутствия ферментативного процесса (липаза инактивирована нагреванием).

Работа 27. Кинетика гидролитического расщепления жира под действием липазы

В качестве субстрата ферментативной реакции служит жир молока, находящийся в диспергированном состоянии. Образующиеся при гидролизе жирные кислоты оттитровываются раствором едкого натра по фенолфталеину и по их приросту судят о течении липолитического процесса.

Ход работы. Взять 50 мл предварительно прокипяченного и охлажденного молока и добавить в ту же колбу 3 мл глицеринового раствора липазы. Быстро взять пипеткой 5 мл смеси и титровать 0,01 н. едким натрием по фенолфталеину. Оставшуюся смесь поставить в термостат при 38° С и заметить время. Через определенные промежутки времени (через каждые 10—15 мин) брать пробы по 5 мл и также титровать 0,01 н. едким натром. Полученные результаты изобразить графически, откладывая по оси абсцисс время, а по оси ординат миллилитры 0,01 н. NaOH, пошедшие на титрование.

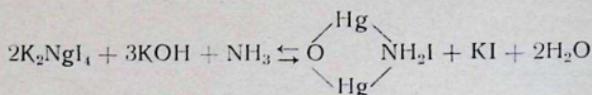
Работа 28. Получение препарата уреазы из бобов сои (карбамид-амидогидролаза)

Активная уреазы находится во многих высших растениях и у бактерий¹. Одним из источников для ее получения служат бобы сои. Гидролиз мочевины, катализируемый уреазой, приводит к образованию углекислого аммония, который может быть обнаружен или по изменению реакции среды (на фенолфталеин), или пробой на аммиак с реактивом Несслера.²

¹ Уреаза часто применяется для определения мочевины в различных биологических объектах животного происхождения.

² Растворяют 50 г KI в 50 мл воды и добавляют горячий концентрированный раствор сулемы до прекращения растворения образующегося при сливании растворов осадка. Прибавляют раствор — 150 г KOH в 300 мл воды, доводят до 1000 мл и добавляют еще 5 мл раствора сулемы. Дают отстояться и сливают с осадка прозрачный раствор. Хранят в темной склянке.

Реактив Несслера — раствор K_2HgI_4 — реагирует с аммиаком в щелочной среде при рН не ниже 12 с образованием буровато-желтого окрашивания по уравнению



Избыток KOH смещает реакцию вправо, а избыток KI — влево. Получаемая окраска чувствительна к реакции среды. Чем меньше количество присутствующего KI , тем чувствительнее реакция на аммиак. При большом количестве KI реактив вообще не чувствителен. Чувствительность реактива пропорциональна количеству растворенной HgI_2 .

Ход работы. I. Сухие бобы сои тщательно измельчить и обезжирить многократным настаиванием с петролейным эфиром. Обезжиренную муку бобов высушить на фильтровальной бумаге на воздухе и извлечь пятикратным объемом воды при температуре $+5^\circ C$. Процентрифугировать, прозрачный центрифугат испарить досуха под вакуумом при температуре $35-40^\circ C$. Полученный порошок хорошо растворим в воде.

II. К нескольким миллилитрам 1%-ного раствора мочевины добавить одну-две капли фенолфталеина и 1—2 мл раствора уреазы (1:10), поставить в термостат при 38° или $40^\circ C$ при 30 мин. Параллельно провести такой же опыт с прокипяченным раствором уреазы. Содержимое первой пробирки делается красным (образование углекислого аммония).

Образование аммиака можно обнаружить и иным путем. Для этого повторить опыт и после нагревания при $38^\circ C$ осторожно добавить раствор едкого натра. Выделение аммиака обнаружить по запаху и по буровато-желтому окрашиванию при добавлении нескольких капель реактива Несслера.

Работа 29. Получение препарата пепсина (пептид-пептидогидролаза)

Пепсин — фермент, ускоряющий гидролиз белковых веществ, обнаруживаемый в желудочном соке и активный при рН 1,6—2,0. Клетки слизистой оболочки желудка образуют неактивную форму пепсина — пепсиноген (препепсин). Последний под действием пепсина превращается в пепсин. Этот автокатализ, однако, при кислотности среды, когда рН $> 5,4$, не происходит, так как пепсин остается связанным в неактивном состоянии с веществом полипептидного характера (ингибитором). Только при кислотности более высокой т. е. при рН меньшем чем 5,4 пепсин освобождается от этого соединения, а ингибитор подвергается

вать 0,1 н. соляной кислотой и к полученному нейтральному раствору добавить равный объем 0,1 н. соляной кислоты и волоконно фибрина. Поставить в термостат при 37° С на 20—30 мин.

Растворения фибрина не наступает, вследствие необратимого инактивирования пепсина в щелочной среде.

Работа 30. Трипсин и триптический гидролиз белка (пептид-пептидогидролаза)

Трипсин—протеаза, ускоряющая гидролиз пептидных связей в белках и белках частично гидролизованных (альбумозах и пептонах), а также в некоторых поли- и дипептидах. Оптимум активности лежит около рН 8,0, но, как и у пепсина, несколько отличен для различных белков. В клетках поджелудочной железы образуется неактивная форма трипсина— поэтому как свежая железа, так и ее секрет не обнаруживают триптической активности. Трипсиноген превращается в активный трипсин под действием энгеропептидазы (активатора, выделяемого из слизистой тонких кишок), самого трипсина и концентрированных растворов солей. Превращение трипсиногена в трипсин при рН 7,8—8,5 протекает под действием трипсина (имеет место автокаталитический процесс). При хранении поджелудочной железы наблюдается превращение трипсиногена в трипсин.

Трипсиноген образуется в клетках поджелудочной железы наряду с другими ферментами. Кроме уже упомянутых амилазы и липазы (см. предыдущие задачи) в панкреатической железе образуются химотрипсин (химотрипсиноген), протаминаза и карбоксипептидаза.

Ход работы. I. Для получения препарата, содержащего трипсин, поджелудочную железу, по возможности освободить от жира и соединительной ткани, измельчить и оставить лежать на воздухе около 5—10 ч. Затем добавить водного глицерина (на 1 г железы 4 мл 50%-ного глицерина очень слабо подкисленного уксусной кислотой) и перемешивать около двух часов. После суточного настаивания центрифугировать и отделить водно-глицериновый экстракт, который содержит кроме трипсина панкреатическую амилазу и липазу. Перед употреблением экстракт развести, добавляя равный объем воды.

II. В три пробирки поместить приблизительно одинаковое количество предварительно обработанного кипящей водой фибрина (одно-два волокна в каждую пробирку). Затем в первую пробирку налить 5 мл 0,4%-ного раствора соды и 2 мл экстракта, во вторую— 5 мл воды и 2 мл предварительно прокипяченного экстракта и в третью— 5 мл 0,1 н соляной кислоты и 2 мл экстракта. Все три пробирки поставить в термостат при

38°С и, встряхивая через 5—10 мин, следить за растворением волокон фибрина.

Растворение происходит только в первой пробирке, где фермент не инактивирован и реакция среды слабощелочная.

Работа 31. Коагулирующее действие химозина и других протеаз (пептид-пептидогидролаза)

В клетках слизистой оболочки желудка образуется неактивная форма химозина (ренина) — прохимозин (прореннин). Прохимозин при кислотности большей чем рН 5,0 превращается в химозин — фермент, вызывающий свертывание молока. Это свертывание представляет собой конечный результат ферментативного расщепления белка молока — казеина — на параказеин и сывороточную альбумозу. Образовавшийся параказеин в присутствии ионов кальция превращается в нерастворимую кальциевую соль, которая и выпадает в виде осадка.

Химозин, специфичность ферментативного действия которого ограничена упомянутым превращением казеина в параказеин (коагулазное действие), образуется в значительных количествах слизистой сычуга телят, чем и вызвано название его «сычужный фермент». Однако, коагулирующее действие проявляет не только химозин — оно присуще всем животным и растительным протеазам: пепсину, химотрипсину, папаину и другим. Оптимальное рН коагулирующего действия химозина 5,4 пепсина — 5,3, химотрипсина — 7,0. Химозин практически неактивен при рН 7,0, но относительно устойчив в сравнении с пепсином в щелочной среде при рН 9,0 (пепсин быстро инактивируется при рН 9).

Ход работы. I. Для получения препарата химозина хорошо измельченную слизистую оболочку сычуга теленка смешать, перемешивая с 0,04 н. соляной кислотой, беря на одну часть слизистой одну часть кислоты. Через 10—15 мин профильтровать через марлю. Фильтрат с рН 5,2 подвергнуть диализу против водопроводной воды до тех пор, пока раствор фермента не достигнет рН 5,4 (около 3—4 ч). Затем к раствору фермента добавить спирта до концентрации 50% и выпавший осадок отделить центрифугированием. Осадок снова растворить в дистиллированной воде и отделить центрифугированием нерастворившийся белок (муцин). К раствору снова добавить спирт до концентрации 50% и выпавший осадок фермента отделить, отжать, высушить на воздухе и измельчить.

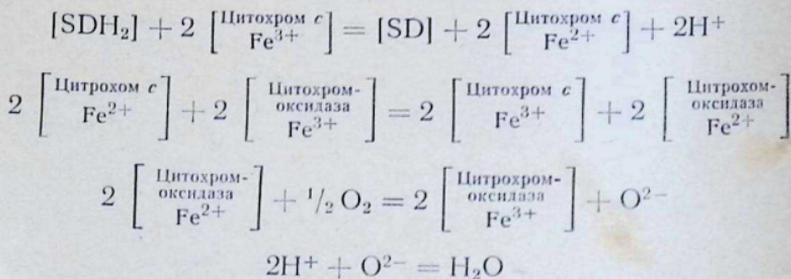
II. 0,1 г сухого препарата сычужного фермента извлечь в течение суток 50-ю мл воды при температуре около +5°С и при повторном встряхивании жидкости. Прозрачный раствор употребить для опытов. В четыре пробирки налить по 5 мл свежего молока (рН 6,6—6,8). Затем в первую прибавить 0,25 мл раствора химозина, во вторую — 0,25 мл раствора химозина и несколько

капель 10%-ного раствора едкого натра, в третью — 0,25 мл предварительно прокипяченного раствора химозина и в четвертую 0,25 мл раствора химозина и несколько капель 2%-ного раствора щавелевокислого калия. Все пробирки поставить на 15—20 мин в термостат при 37—40° С.

Только в первой пробирке произойдет свертывание. Во второй пробирке его не будет вследствие слишком высокой щелочности раствора, в третьей — фермент инактивирован нагреванием, а в четвертой — растворимые соли кальция удалены из раствора в виде нерастворимого щавелевокислого кальция. При таком удалении солей кальция молоко не свертывается, но ферментативное расщепление казеина с образованием параказеина происходит. Поэтому, если четвертую пробирку прокипятить для полного устранения дальнейшего действия фермента и по охлаждении добавить немного 2%-ного раствора хлористого кальция, то параказеин, образовавшийся ранее при действии фермента, превращается в кальциевую соль, в результате чего происходит свертывание.

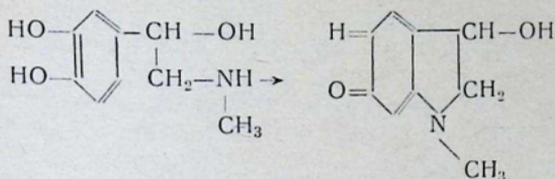
Работа 32. Цитохромоксидаза (цитохром- с:O₂ — оксидоредуктаза)

Цитохромоксидаза — фермент, находящийся почти во всех растительных и животных клетках. Действие этого фермента, по-видимому, строго специфично и сводится к катализу реакции окисления восстановленного цитохрома за счет газообразного кислорода. Поэтому можно считать, что цитохромоксидаза в живой клетке является последним в цепи ферментов, переносящих водород с окисляемого субстрата на кислород.

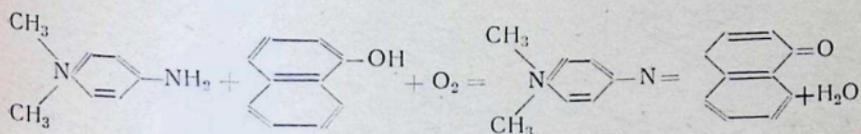


Цитохромоксидаза в присутствии цитохрома *c* и молекулярного кислорода окисляет восстановленную сукциндегидрогеназу SD — систему янтарная кислота — сукциндегидрогеназа. Кроме того, цитохром *c* может служить акцептором водорода при окислении некоторых аминов и фенолов, как, например, парафенилендиамина, гидрохинона, пирокатехина, адреналина. Поэтому

эти вещества окисляются цитохромоксидазой в присутствии кислорода. Адреналин при этом окисляется в красноокрашенный хинонадренехром:



Щелочной раствор α -нафтола и N-диметил-парафенилендиамина (реактив «нади́») окисляется в системе цитохром — цитохромоксидаза молекулярным кислородом с образованием индофеноловой голубой:



Это образование индофеноловой голубой с реактивом «нади́» служит к обозначению цитохромоксидазы как индофенолоксидазы. Однако «индофеноловая реакция» не является специфичной для цитохромоксидазы, так как некоторые другие оксидоредуктазы (например, *n*-дифенолоксидаза, фенолоксидаза) также образует индофеноловую голубую с реактивом «нади́».

Цитохром и цитохромоксидаза являются протеидами, содержащими в качестве активной группы железопорфириновый комплекс, и поэтому угнетаются HCN и H₂S.

Цитохромоксидаза служит примером фермента, прочно связанного с клеточной структурой. При извлечении ферментов из ткани она остается в нерастворившемся остатке. Кроме того, цитохромоксидаза — фермент, очень чувствительный к нагреванию и действию различных реактивов. Он инактивируется уже при нагревании до +55°С, при высушивании и при действии ацетона и спирта.

Ход работы. I. Для получения препарата, содержащего цитохромоксидазу вместе с цитохромами, сердечную мышцу или скелетные мышцы хорошо измельчить и извлечь четырех-пятикратным объемом дистиллированной воды. Профильтровать, повторить извлечение и снова профильтровать и промыть водой остаток ткани. Получается почти неокрашенная каша, содержащая цитохромоксидазу, цитохромы «а», «b» и «с», наряду с некоторыми дегидрогеназами (рис. 9).

II. К небольшому количеству извлеченной и промытой мышечной ткани, помещенной на фильтровальную бумагу, добавить 1—2 капли реактива «наді»¹. Через несколько минут появляется яркое синее или зеленовато-синее окрашивание, обусловленное образованием индофеноловой голубой. Другую часть извлеченной ткани предварительно нагреть при 60—70° С около 5 мин и по охлаждении прибавить реактив «наді». Окраска не появляется, что свидетельствует об инактивировании фермента.

Водный экстракт мышцы не дает окрашивания с реактивом «наді», так как цитохромоксидаза удерживается тканью. Окраска появляется только при добавлении к водному экстракту из мышцы кроме реактива «наді» несколько капель раствора перекиси водорода (пероксидазное действие; см. работу 35).

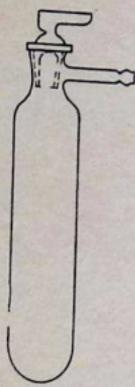
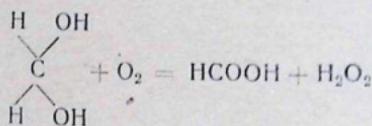


Рис. 9. Суд для энзиматического дегидрирования

Часть извлеченной мышечной ткани поместить на фильтровальную бумагу и добавить 1—2 капли спиртового раствора гваяковой смолы. При этом не наблюдается образования окраски, как это имеет место при пробах на фенолоксидазу (см. работу 34).

Работа 33. Альдегидоксидаза (ксантинооксидаза) молока (альдегид: O₂ — оксидоредуктаза)

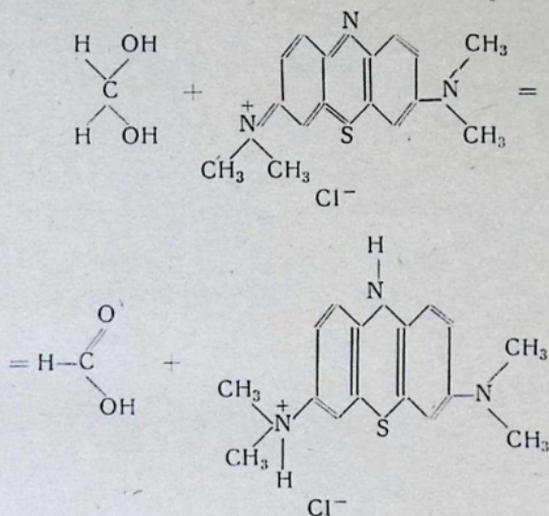
В молоке содержится фермент, ускоряющий дегидрогенирование различных алифатических и ароматических альдегидов (формальдегида, ацетальдегида, бензальдегида, салицилового альдегида и других), почему этот фермент и носит название альдегидоксидазы. Если реакция дегидрогенирования протекает в присутствии газообразного кислорода (в аэробных условиях), то водород переносится на кислород с образованием перекиси водорода. Например:



Гидрат формальдегида Муравьиная кислота

¹ Реактив «наді» — щелочной водноспиртовой раствор α-нафтола и диметил-парафенилендиамина, довольно быстро изменяется при хранении и должен быть свежеприготовленным. Реактив удовлетворительного качества имеет темную коричневую окраску без розоватого оттенка.

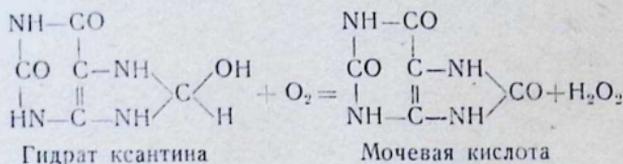
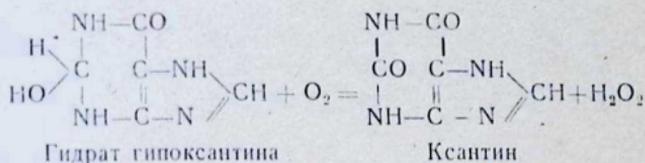
В присутствии метиленовой синей эта последняя служит акцептором, на который альдегидоксидаза переносит водород с окисляемого альдегида:



Если же в присутствии метиленовой синей вести процесс в анаэробных условиях, то протекает только первая из указанных реакций и, таким образом, действие альдегидоксидазы может быть обнаружено по обесцвечиванию метиленовой синей.

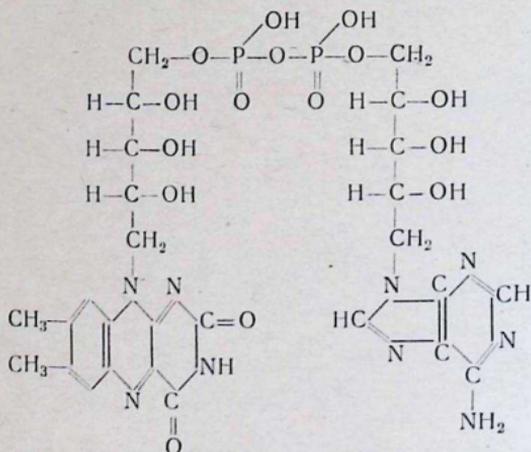
Кроме указанных, акцепторами водорода могут быть и нитраты, восстанавливающиеся в нитриты.

По-видимому, тот же фермент молока ускоряет в присутствии газообразного кислорода и реакцию дегидрогенирования гипоксантина, ксантина, некоторых других пуриновых оснований и НАД. Ввиду этого фермент носит также название ксантиноксидазы. Дегидрогенирование гипоксантина и ксантина протекает по уравнениям:



Таким образом, альдегидоксидаза (ксантинооксидаза) молока является ферментом мало специфичным как и донору, так и к акцептору водорода.

Кроме молока ксантинооксидаза найдена у крупного рогатого скота в печени и в других органах. Фермент представляет собой протеид, содержащий в качестве активной группы флавинадениндинуклеотид — ФАД:



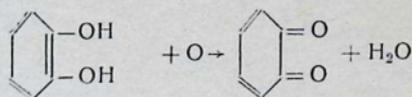
При опытах на альдегидоксидазу молока с метиленовой синей необходимо иметь в виду, что бактерии также обесцвечивают метиленовую синюю и поэтому следует употреблять только свежее молоко.

Ход работы. В две пробирки налить по 5 мл сырого молока, а в третью — 5 мл предварительно прокипяченного молока. В первую и третью пробирки налить по 0,3 мл реактива (5 мл насыщенного спиртового раствора метиленовой синей, 5 мл формалина и 190 мл воды), а во вторую — 0,3 мл водного раствора метиленовой синей. Жидкость во всех трех пробирках покрыть слоем парафинового масла. Пробирки поставить в термостат при +40° С. Через некоторое время наблюдать полное обесцвечивание содержимого первой пробирки. Вторая и третья останутся окрашенными в голубой цвет (во второй пробирке отсутствовал акцептор — формалин, в третьей — фермент инактивирован нагреванием).

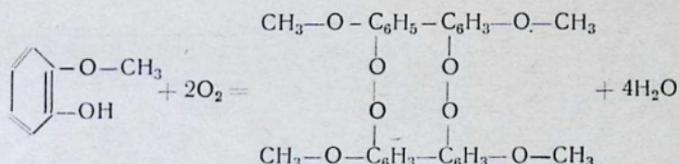
Работа 34. Фенолоксидаза (катехолоксидаза, о-дифенол: O₂-оксидоредуктаза)

Фенолоксидаза, или полифенолоксидаза, — фермент, широко распространенный в составе растительных клеток, но находящийся также в отдельных тканях и органах животных. Фенол-

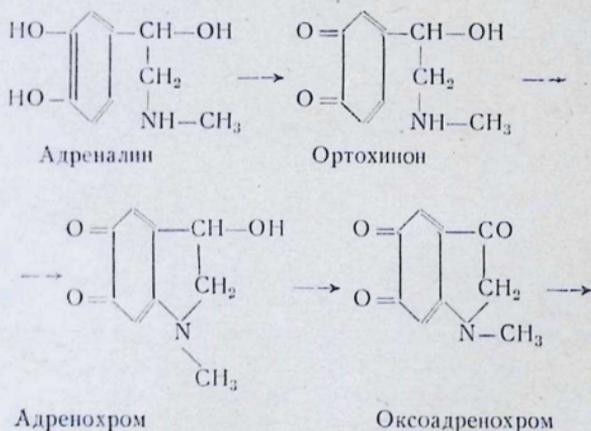
оксидаза катализирует реакцию окисления полифенолов в присутствии газообразного кислорода как акцептора водорода. При этом в простейших случаях образуются соответствующие хиноны:

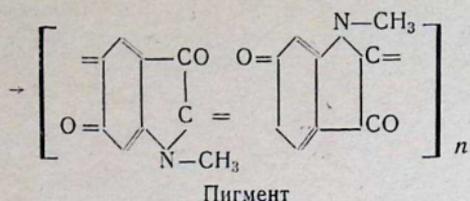


В других случаях эта реакция может осложняться процессами конденсации и дальнейшего окисления. Например, гваякол (монометилвый эфир пирокатехина) при действии фенолоксидазы образует продукт окислительной конденсации красного цвета:

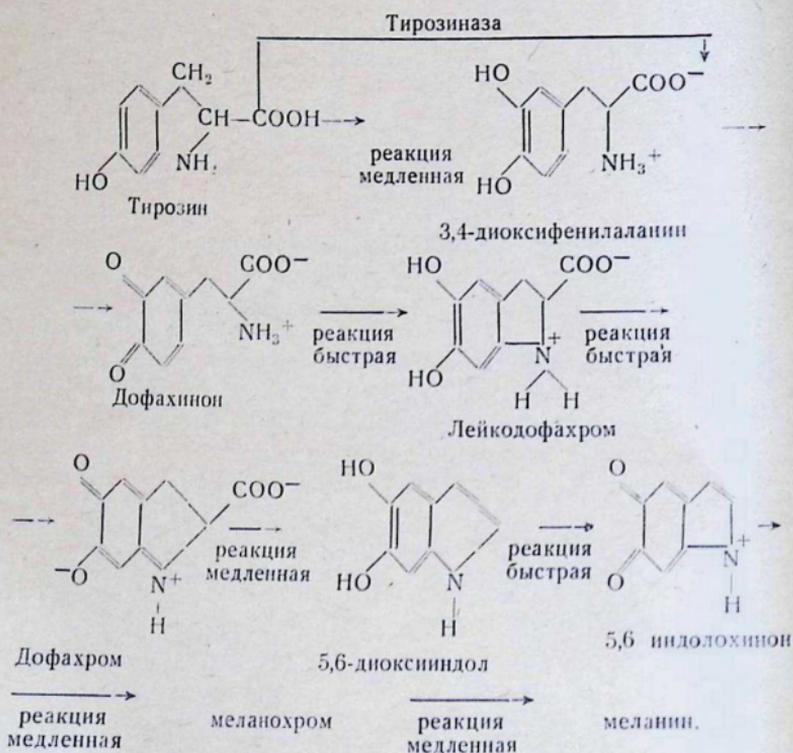


При действии фенолоксидазы на гваяковую смолу получается продукт окисления, окрашенный в ярко-синий цвет. Кроме полифенолов фенолоксидаза окисляет также парафенилендиамин и реактив «наді». При действии полифенолоксидазы на адреналин, последний дегидрогенизируется вначале в ортохинон, а затем следует ряд реакций, приводящих к образованию через окрашенный в красный цвет адренохром черного пигмента:



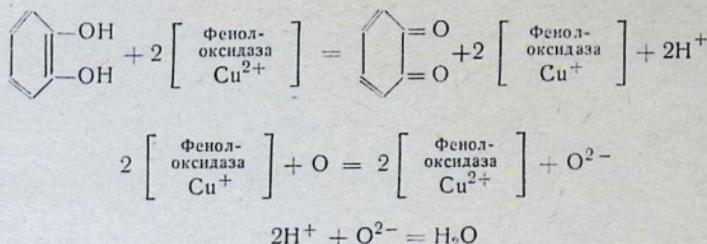


Подобным же путем под действием тирозиназы (монофенол-оксидазы) тирозин превращается через окрашенные в красный цвет промежуточные продукты в черный азотсодержащий пигмент — меланин. При этом тирозин вначале окисляется в диоксифенилаланин («дофа»), который затем дегидрируется в хинон и далее через ряд промежуточных продуктов конденсируется в меланин:



Фенолоксидазы (полифенолоксидаза, лакказы, тирозиназа) по своему строению является Си-протеидами, содержащими около 0,20—0,25% меди. Таким образом, они сходны с дыхательными пигментами низших животных — гемоцианинами, но, в про-

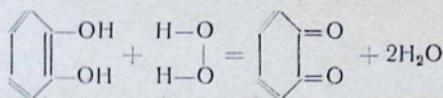
тивоположность последним, содержат медь, обратимо окисляющуюся молекулярным кислородом в двухвалентную. У растений и у многих животных фенолоксидазы или очень близкие к ним ферменты являются составной частью общей окислительной ферментативной системы, переносящей водород с окисляемого субстрата на кислород:



Ход работы. I. Проба с раствором гваяковой смолы. На разрез сырого картофеля (лучше всего пользоваться тонкими срезами с поверхностных частей картофельного клубня) нанести одну-две капли свежеприготовленного 5%-ного спиртового раствора гваяковой смолы. По прошествии некоторого времени появляется яркое синее окрашивание, обусловленное образованием окрашенных продуктов окисления гваяковой смолы. Параллельно сделать такой же опыт на разрезе вареного картофеля, при этом синее окрашивание не появляется, так как фермент инактивирован нагреванием.

Работа 35. Пероксидаза (донор: H_2O_2 —оксидоредуктаза)

Пероксидазы, встречающиеся особенно широко в растительных клетках, у животных находятся в крови, мышцах и молоке. Пероксидазы катализируют реакции окисления многих фенолов и аминов, причем акцептором водорода служит перекись водорода:



Подобным образом дегидрогенизируется гидрохинон, пирокатехин, пирогаллол, гваякол, крезолы, фенолендиамин, бензидин, реактив «надй» — щелочный раствор α -нафтола и диметилпарафенилендиамина, лейкосоединения 2,6-дихлорфенолиндофенола и малахитовой зеленой, но также и некоторые неорганические соединения, например, с выделением йода и нитриты. Пероксидаза окисляет также адреналин с образованием аденохрома.

Таким образом, пероксидазами окисляются главным образом те же субстраты, что и фенолоксидазами, с той лишь разницей, что здесь необходимо участие перекиси водорода в качестве акцептора водорода. По этой причине при всех пробах на пероксидазную активность необходима предварительная проба на оксидазный эффект, так как очень часто один и тот же реагент служит как для открытия фенолоксидаз, так и для открытия пероксидаз. Кроме перекиси водорода в качестве акцепторов водорода пероксидазами могут быть использованы и некоторые органические пероксиды.

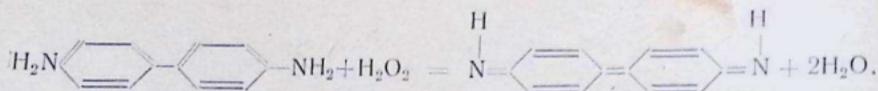
Пероксидазы представляют собой протеиды, содержащие в качестве активной группы железопорфириновый комплекс. Вследствие этого они угнетаются HCN, H₂S, гидроксиламином, тиомочевинной. Пероксидазы угнетаются также перекисью водорода, поэтому необходимо следить за тем, чтобы избытка ее при пробах на пероксидазу не было. Пероксидазы, по сравнению с другими ферментами, довольно стойки по отношению к инактивированию нагреванием. Присутствие фермента каталазы может угнетать пероксидазную реакцию за счет разложения перекиси водорода.

Для изучения особенно активных растительных пероксидаз пользуются хорошо измельченным на терке хреном, смешанным с равным объемом воды или же отфильтрованным водным экстрактом.

Пероксидаза хрена

Ход работы. I. Гваяковая проба. К полученной взвеси хрена или к водному экстракту добавить одну-две капли свежеприготовленного 5%-ного спиртового раствора гваяковой смолы и убедиться в том, что синего окрашивания не возникает. Затем добавить 1—2 капли 0,5%-ной перекиси водорода, после этого появится яркое синее окрашивание. Повторить пробу с прокипяченным препаратом фермента — окрашивания не будет.

II. Бензидиновая проба. К раствору, содержащему пероксидазу хрена, добавить 2—5 капли спиртового раствора бензидина и затем 1—2 капли 0,5%-ной перекиси водорода. Сразу появляется темно-синее окрашивание, обусловленное тем, что бензидин окисляется в парахинондиимид:



соль которого образует ярко окрашенное молекулярное соединение с неокисленным бензидином.

III. Проба с реактивом «наді». Добавить к взвеси измельченного хрена в воде 2—3 капли свежеприготовленного реактива

«наді» (спиртовой 1%-ный раствор α -нафтола, 1%-ный раствор диметил-р-фенилендиамина и 1,5%-ный раствор Na_2CO_3 и затем 1—2 капли 0,2%-ного раствора H_2O_2). Сразу появляется интенсивное синее окрашивание образующейся индофеноловой синей.

Повторить все вышеописанные пробы с прокипяченным экстрактом хрена и убедиться в том, что пероксидазного действия не будет.

Пероксидаза молока

Ход работы. Для проб на пероксидазу молока в четыре пробирки налить по 3 мл сырого молока и в другие четыре пробирки по 3 мл предварительно прокипяченного молока. Затем добавляют гваяковую пробу, бензидиновую пробу и пробу с раствором «наді». Во всех случаях с прокипяченным молоком пробы на пероксидазу отрицательны.

Пероксидаза мышц

Ход работы. Для проб на пероксидазу мышц небольшое количество измельченной мышечной ткани извлечь равным объемом воды и отфильтровать экстракт. С водным экстрактом сделать гваяковую пробу, пробу с реактивом «наді» и бензидиновую пробу. Повторить пробы с прокипяченным экстрактом.

Пероксидаза крови

Ход работы. I. Для исследования пероксидазы кровь разбавить в десять раз водой и с таким раствором делать гваяковую и бензидиновую пробу. Повторить те же пробы с предварительно прокипяченной разбавленной кровью.

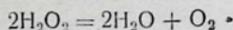
II. Для проб обнаружения пероксидов в окисленном жире взять 1—2 г испорченного (содержащего перекиси) жира, добавить равный объем 96%-ного спирта и встряхнуть. Затем добавить 4—5 капель разведенной водой в десять раз крови, 5 капель свежеприготовленного спиртового раствора гваяковой смолы и 5—10 мл воды и хорошо встряхнуть. Появляется голубая окраска.

Параллельно поставить контрольный опыт, в который не добавлять крови (пероксидазу) или прибавить прокипяченный раствор крови (фермент инактивирован нагреванием). Окраска в контрольном опыте не появится.

Работа 36. Кatalаза (H_2O_2 : H_2O_2 -оксидоредуктаза)

Кatalаза — фермент, широко распространенный в клетках как животных, так и растительных организмов, и отсутствующий лишь у облигатных анаэробов. У млекопитающих особенно

богаты ею кровь и печень. Каталаза ускоряет реакцию разложения перекиси водорода на воду и молекулярный кислород:

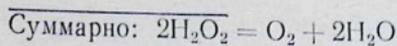
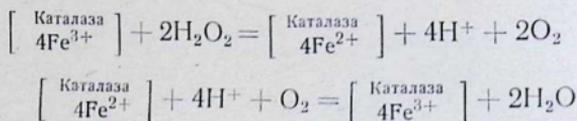


и это действие каталазы строго специфично.

Биологическая функция каталазы состоит в освобождении клетки от избытка перекиси водорода, образующейся при многих окислительно-восстановительных процессах, как, например, при действии ксантиноксидазы, уриказы, оксидазы *L*- α -аминокислот, диаминооксидазы, и при ряде других ферментативных процессов. Образующаяся перекись водорода или расходуется в процессах, катализируемых пероксидазой, или же разрушается каталазой, причем образующийся кислород снова может быть использован в окислительных реакциях клетки. Таким образом, каталаза является важным элементом общей окислительно-восстановительной системы клетки.

Как и пероксидазы, каталаза представляет собой протейд, содержащий в качестве активной группы железопорфириновый комплекс (содержание в кристаллической каталазе $\text{Fe} = 0,12\%$). По некоторым данным, в молекуле каталазы, наряду с гематиновыми группами, содержится и желчнопигментная группа.

Каталаза угнетается HCN , H_2S , гидросиламином. Она неустойчива: разрушается при $\text{pH} < 3$. Разложение перекиси водорода при действии каталазы можно представить в виде следующей схемы:



Ход работы. I. К 2 мл свежей дефибринированной крови прилить 1—2 мл 3%-ного раствора перекиси водорода. Происходит обильное выделение кислорода. При повторении опыта с прокипяченной кровью каталазное действие не наблюдается.

II. Небольшой кусок мышечной ткани измельчить и извлечь равным объемом воды. К водной вытяжке добавить 3%-ную перекись водорода. Наблюдается заметное выделение кислорода. При повторении опыта после нагревания ткани с водой до кипения действие каталазы обнаружить не удастся.

III. К 2 мл молока прилить 1 мл 3%-ного раствора перекиси водорода. Происходит выделение кислорода. При таком же опыте с прокипяченным молоком выделения кислорода не наблюдается.

IV. Прилить небольшое количество 3%-ного раствора перекиси водорода к 2 мл картофельного сока и к 2 мл такого же сока, но предварительно прокипяченного и охлажденного. Выделение наблюдается только в первом случае.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ И АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

В основе всякого количественного определения ферментативного действия или активности действия фермента лежат те изменения, которые происходят с субстратом соответствующей ферментативной реакции. Об этих изменениях и об их скорости можно судить либо по исчезновению исходных веществ, подвергающихся ферментативному воздействию, либо по образованию и накоплению продуктов ферментативной реакции.

Наиболее часто активность действия ферментов выражается количеством вещества, которое за строго определенное время и в строго определенных условиях опыта подверглось тому или иному изменению. Например, за единицу ферментативного действия сахаразы принимают гидролитическое расщепление 4 г тростникового сахара в 25 мл 1%-ного раствора однозамещенного фосфата натрия, приводящее за 1 мин при 15,5° С к нулевому вращению, т. е. к расщеплению 75,9% сахарозы.

Ферментативное действие может быть оценено также временем, необходимым для строго определенного изменения субстрата ферментативной реакции в строго определенных условиях опыта. Определяемая таким образом величина обратно пропорциональна величине, характеризующей активность ферментативного действия, обычно обозначается как «показатель времени». Например, для определения активности мальтазы может служить измерение времени, необходимого для того, чтобы довести до 50% гидролиз 2,5 г гидрата мальтозы, растворенных в 50 мл фосфатного буфера с рН 6,8 при 30° С.

Кроме этих двух способов активность ферментативного действия в отдельных случаях выражают константой скорости реакции, причем эта константа измеряется в строго определенных условиях опыта и в определенных пределах ферментативного изменения субстрата. Так, например, для характеристики активности амилазы может быть избрана величина, кратная константе мономолекулярной реакции:

$$K = 0,4243 \quad K = \frac{1}{t} \lg \frac{a}{a-x},$$

определяемой при ферментативном гидролизе смеси 25 мл 1%-ного раствора крахмала (0,25 г), 10 мл фосфатного буфера с рН 6,8, 1 мл 0,2 н. раствора хлористого натрия и 1 мл раствора

фермента при 37°С в пределах первых 40% расщепления крахмала.

Следует иметь в виду, что во всех случаях определения ферментативного действия определяется не количество фермента, а его каталитическая активность, выражаемая тем или иным способом через скорость ферментативной реакции. Активность же фермента зависит не только от его весового количества, но, при прочих равных условиях, и от наличия или отсутствия активаторов и ингибиторов и состояния самой катализируемой реакции. Поэтому единицы ферментативного действия, характеризующие активность фермента и обозначаемые часто терминами «единица фермента» или «энзимная единица», лишь с известными оговорками могут служить мерой количества фермента.

Если активность действия фермента, выраженную тем или иным способом, относить к определенному количеству исследуемого препарата фермента, то можно получить представление об активности данного препарата или о «концентрации фермента» в данном препарате («энзиматической силе» препарата). Активность препаратов ферментов часто выражается «энзимными числами».

Несмотря на общие для различных ферментов наименования результатов определений, никакой общей меры для действия различных ферментов не существует. Более того, все выражения активности ферментов имеют условное значение и потому для каждого отдельного фермента могут быть сравнимы лишь при строгом и точном воспроизведении условий их определения.

Следующие работы дают представление о простейших случаях определения ферментативного действия и активности ферментов.

Работа 37. Определение амилолитической активности амилазы слюны

Метод основан на определении наименьшей относительной концентрации фермента, достаточной для гидролиза определенного количества крахмала при избранных температуре и времени реакции. Для этого служит опыт с геометрическим рядом концентраций фермента, т. е. с рядом разведений исследуемого раствора или препарата фермента. При ориентировочных определениях и определениях, не требующих особой точности, пользуются наиболее легко приготовляемым рядом с множителем 0,5, т. е. рядом разведений в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 и 512 раз.

Концом ферментативного гидролиза крахмала считают или момент исчезновения синего окрашивания с йодом, т. е. полное

расщепление крахмала до декстринов, или же момент полного исчезновения окрашивания с йодом («ахроматический пункт»), т. е. гидролиз крахмала до стадии низкомолекулярных декстринов и мальтозы.

Ход работы. Для составления ряда разведений пользуются профильтрованной слюной или предварительно разбавленной в несколько раз и также профильтрованной слюной. Затем в десяти чистых и хорошо выщелоченных паром пробирках готовят ряд разведений слюны. Для этого в первую и вторую пробирки налить с помощью пипетки по 1 мл профильтрованной слюны. Затем во вторую пробирку прилить 1 мл воды, смешать и 1 мл смеси перенести в третью пробирку. В третью пробирку добавить 1 мл воды, смешать и снова 1 мл смеси перенести в четвертую пробирку. Такую операцию продолжать далее до десятой пробирки, из которой после разведения водой 1 мл смеси удалить. Этим путем получают ряд разведений. В первой пробирке неразведенная слюна, во второй — разведенная в два раза, в третьей — в четыре раза, в четвертой — в восемь раз, в пятой — в шестнадцать раз и т. д.

Для проведения работы с рядом разведений во все пробирки налить по 2 мл фосфатно-цитратной буферной смеси с рН 6,8 (смесь № 24; см. работу 14) и после этого по 1 мл 1%-ного раствора растворимого крахмала, приготовленного на 0,2%-ном растворе хлористого натрия. Все пробирки поставить в термостат при температуре 37° С на 10, 20 или 30 мин. По истечении этого времени вынуть пробирки из термостата, быстро наполнить ледяной водой и погрузить в сосуд с холодной водой. Прибавить затем во все пробирки по 2—3 капли 0,2 н. раствора йода в йодистом калии и отметить пробирку с наименьшей концентрацией слюны, в которой не появляется синее или сине-фиолетовое окрашивание.

Таким образом определяется наименьшая концентрация слюны, достаточная для полного гидролитического расщепления (до состояния декстринов, не дающих с йодом синего окрашивания) взятого количества крахмала за данное время и при данной температуре. Амилолитическая активность слюны может быть выражена числом миллилитров 1%-ного раствора крахмала, подвергшихся такому расщеплению благодаря действию 1 мл исходной слюны. Эта активность может быть вычислена следующим образом. Если, например, при опыте 30-минутной продолжительности первой окрашенной в синий цвет пробиркой оказалась шестая, то полное расщепление до принятого предела произошло в пятой пробирке, т. е. пробирке, где слюна разведена в 16 раз. Так как 1 мл такой слюны расщепляет 1 мл 1%-ного раствора крахмала, то 1 мл неразведенной слюны должен расщеплять 1%-ного раствора крахмала $1 \times 16 = 16$ мл. Другими

словами, диастатическая, или амилолитическая, активность слюны, обозначаемая буквой D , для данного случая будет:

$$D_{30'}^{37} = 16.$$

Точность такого определения очень невелика, так как относительные концентрации фермента в двух соседних пробирках различаются ровно в два раза, а поэтому в ближайшие два результата определения отличаются также в два раза. Следовательно, истинное значение для активности в приведенном примере лежит между величинами 16 и 32.

Для того чтобы повысить точность определения, необходимо составить дополнительный геометрический ряд разведений, члены которого заполнили бы интервал, лежащий между концентрацией и в пробирке, где обнаружено полное расщепление (в рассматриваемом случае 1/16; пробирка пятая) и ближайшей меньшей концентрацией, при которой не наблюдалось полного расщепления (в рассматриваемом случае 1/32; пробирка шестая). С этой целью составляют геометрический ряд разведений с множителем 0,9, беря за исходный раствор фермента, разведенный в шестнадцать раз (пятая пробирка). При этом можно ограничиться составлением только следующих восьми растворов с концентрациями 1,00; 0,900; 0,810; 0,729; 0,656; 0,590; 0,531; 0,478, так как последний член такого ряда уже имеет концентрацию более низкую, чем соответствующий ближайший член первого геометрического ряда с множителем 0,5.

К 1 мл исследуемой слюны прибавить 15 мл воды и перемешать. Таким образом получить слюну, разведенную в шестнадцать раз. Затем взять восемь чистых пробирок и поместить в первую пробирку 1 мл разведенной в шестнадцать раз слюны, а в остальные по 1 мл воды. После этого во вторую пробирку внести 9 мл разведенной в шестнадцать раз слюны, перемешать и 9 мл полученного раствора перенести в третью пробирку, откуда снова после смешивания перенести 9 мл раствора в четвертую пробирку и т. д. Из последней восьмой пробирки 9 мл жидкости выбросить. Таким образом получить следующий геометрический ряд относительных концентраций фермента: первая пробирка — 1/16, вторая — $1/16 \times 0,9$, третья — $1/16 \times 0,81$ и т. д.

Теперь в каждую пробирку отмерить по 2 мл фосфатно-цитратной буферной смеси с рН-6,8 и затем по 1 мл 1%-ного раствора крахмала, приготовленного на 0,2% растворе хлористого натрия. Все пробирки поставить в термостат при 37° С на 30 мин и затем найти пробирку, в которой произошло полное расщепление крахмала, как это уже описано. Если, например, при этом такой пробиркой оказалась третья, то очевидно, что амилолитическая (диастатическая) активность слюны будет:

$$D_{30'}^{37} = 20.$$

Работа 38. Определение активности химозина

Для определения употребляют молоко (свежее или прокипяченное), к которому добавлено 0,1 объема 10%-ного раствора хлористого кальция. Лучше использовать искусственное молоко,

при работе с которым результаты получаются более постоянными и сравнимыми. Последнее готовят, растворяя 10 мг молочного порошка в 100 мл дистиллированной воды при 50° С, и по охлаждению добавляют 1 мл 10%-ного раствора хлористого кальция.

Ход работы. Взять десять пробирок и в первую поместить 1 мл разведенного в десять раз раствора сычужного фермента (см. работу 31) и 1 мл воды. Перенести из первой пробирки во вторую 1 мл содержимого и добавить 1 мл воды. Снова из второй пробирки перенести 1 мл в третью и снова добавить 1 мл воды. Продолжать такое разведение фермента до десятой пробирки (в которой оставить 1 мл, а 1 мл выбросить), получается геометрический ряд разведений, т. е. разведения в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 и т. д. раз. В одиннадцатую пробирку, которая служит в качестве контрольной, внести 1 мл воды. Теперь во все пробирки налить по 10 мл молока и поместить в термостат на 20 мин при 35° С. Отметить наименьшую концентрацию фермента, которая оказалась достаточной для того, чтобы вызвать свертывание и определить активность в сычужных единицах, т. е. вычислить количество миллилитров молока, которое могло бы быть при данных условиях свернуто 1 мл неразведенного фермента. Например, если молоко свернулось в первых пяти пробирках, а в остальных, начиная с шестой, молоко осталось жидким, то при данных условиях 10 мл молока свертываются 1 мл фермента, разведенного в 320 раз, а 1 мл неразведенного фермента может свернуть 3200 мл молока. Следовательно, активность данного сычужного фермента равна 320 сычужным единицам.

Работа 39. Определение активности тромбина (фибрин-фермент, пептид-пептидогидролаза)

В этом методе, как и в приведенных выше методах, используется геометрический ряд разведений фермента. В качестве раствора тромбина служит свежая сыворотка крови, а раствором фибриногена служит инактивированная нагреванием свежая магниезиальная плазма. Для получения такой плазмы 3 мл свежевыпущенной крови смешивают с 1 мл 28%-ного раствора сернокислого магния и центрифугируют. Прозрачную плазму отбирают пипеткой и помещают на 30 мин в термостат при 50—60° С. Для определений употребляют такую плазму, разведенную в пять раз.

Ход работы. Взять десять пробирок и во все пробирки, кроме первой, налить по 1 мл 1%-ного хлористого натрия. Затем в первую и вторую пробирки налить по 1 мл свежей неразведенной сыворотки (раствор тромбина). Содержимое второй пробирки смешать и 1 мл смеси перенести пипеткой в третью пробирку. Содержимое третьей пробирки также перемешать и снова 1 мл

смеси перенести в четвертую пробирку. Такую операцию продолжать далее до десятой пробирки, из которой после перемешивания 1 мл смеси удалить. Получить таким путем геометрический ряд разведений тромбина. Затем в одиннадцатую пробирку (контрольную) поместить 1 мл 1%-ного раствора хлористого натрия. Теперь во все 11 пробирок налить по 1 мл плазмы (раствор фибриногена) и поставить все пробирки в холодильный шкаф при $+5^{\circ}\text{C}$ на 24 ч. По окончании опыта определить ту минимальную концентрацию тромбина, при которой еще наблюдается хотя бы незначительное свертывание. В контрольной пробирке свертывание не должно наблюдаться.

Активность тромбина выразить количеством миллилитров плазмы, свертываемой 1 мл неразведенной сыворотки. Если, например, свертывание наблюдалось в первых восьми пробирках, а в девятой и десятой пробирках свертывания не произошло, то количество фибриногена, содержащееся в 1 мл плазмы, коагулировало 1 мл сыворотки, разведенной в 128 раз. Следовательно, 1 мл неразведенной сыворотки свертывает 128 мл плазмы. Таким образом, активность тромбина равна 128 единицам. В норме активность тромбина сыворотки от 64 до 256 единиц.

Работа 40. Определение активности пепсина по Метту

Простой метод определения активности протеаз был разработан С. Меттом в лаборатории академика Ивана Петровича Павлова. Этот метод особенно часто применяется при определении активности пепсина.

Ход работы. Смешать несколько белков куриного яйца и профильтровать через марлю. Наполнить белком тонкостенные стеклянные трубки диаметром 1—2 мм и коагулировать белок в трубках погружением их в воду, нагретую до 85°C . Свернувшийся белок должен совершенно равномерно заполнить трубку.

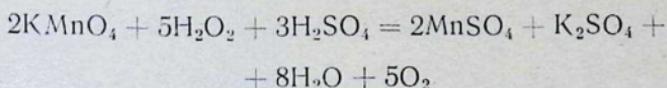
В исследуемый раствор пепсина или в исследуемый желудочный сок опустить несколько кусков трубки по 20 мм длиной. Поставить в термостат на 10 ч при температуре 37°C . После этого с помощью лупы измерить с обоих концов каждой трубки длину переваренного столбиком белка. Из всех определений найти среднее арифметическое. Так как согласно правилу, найденному Борисовым, количество расщепленного белка x прямо пропорционально корню квадратному из количества F , употребленного для переваривания пепсина:

$$x = K \sqrt{F},$$

то пептическую активность можно найти, возводя найденную среднюю длину переваренного столбика в квадрат. Например, если в среднем сумма переваренных с двух концов трубки столбиков равна 3 мм, то активность пептического действия равна 9.

Работа 41. Определение активности каталазы по Баху и Зубковой

Активность каталазы может быть выражена количеством миллиграммов перекиси водорода, разрушенной за определенное время и при определенных условиях опыта. Для определения наличия перекиси водорода может служить титрование ее раствором перманганата в кислой среде. Реакция протекает по уравнению:



Ход работы. В небольшой стаканчик налить точно 20 мл дистиллированной воды. Затем добавить при помощи пипетки 0,02 мл крови и несколько раз ополоснуть пипетку насасыванием жидкости. Таким образом получить кровь разведенную в 1000 раз.

Взять четыре конические колбы емкостью по 50 мл и налить в каждую по 7 мл дистиллированной воды. Затем в две колбы прибавить по 1 мл разведенной в 1000 раз крови, а в две других — по 1 мл той же крови, но предварительно прокипяченной. Теперь налить во все четыре колбы по 2 мл 1%-ного раствора химически чистой перекиси водорода и поставить в термостат при 18°С ровно на 30 мин. Через 30 мин во все колбы налить по 3 мл 10%-ной серной кислоты для прекращения действия каталазы и для подкисления раствора перед титрованием и затем титровать 0,1 н. раствором перманганата до появления светло-розового окрашивания, не исчезающего в течение 0,5 мин.

В первых двух колбах титруется оставшаяся неразрушенной перекись водорода, а в двух последних (контроль) — все количество перекиси водорода, взятой для опыта. Поэтому количество разрушенной перекиси может быть найдено по разности между двумя этими титрованиями. Например, если на титрование в опыте в среднем из двух определений пошло 3,0 мл 0,1 н. раствора перманганата, а на титрование контрольных колб пошло 8,0 мл, то количество разрушенной каталазой перекиси водорода соответствует 5,0 мл 0,1 н. раствора перманганата. Как следует из приведенного выше уравнения, 1 мл 0,1 н. раствора перманганата эквивалентен 1,7 мг перекиси водорода. Следовательно, каталазное действие 1 мл разведенной в 1000 раз крови равно $1,7 \times 5 = 8,5$ мг разложенной перекиси водорода, а каталазное действие 1 мл исходной крови $8,5 \times 1000 = 8500$ мг.

Глава IV. УГЛЕВОДЫ

Все живое вещество (совокупность живых организмов биосферы) в конечном итоге в значительной части своей массы происходит из угольной кислоты атмосферы или угольной кислоты, растворенной в воде, так как это единственные источники, из которых оно извлекает потребный ему углерод.

В. И. Вернадский

К углеводам — глюцидам относится обширная группа природных соединений, которая может быть подразделена на: 1) моносахариды, или монозы, 2) олигосахариды, или кристаллические полисахариды (дисахариды, трисахариды, тетрасахариды и 3) полисахариды, или полиозы, — высокомолекулярные углеводы — биополимеры со свойствами коллоидов.

Моносахариды — простейшие углеводы — представляют собой соединения, характеризующиеся смешанными функциями и содержащие одновременно гидроксильные и карбонильные группы (окси-оксосоединения). Образуют таутомерные формы циклических полуацеталей. В зависимости от характера карбонильной группы различают альдозы (оксиальдегиды) и кетозы (оксикетоны).

Олигосахариды — полные ацетали, образуются с выделением воды из двух или нескольких молекул моносахаридов. При этом молекула воды выделяется благодаря взаимодействию спиртового гидроксила одной молекулы и гидроксила таутомерной формы карбонильной группы (гликозидного гидроксила) другой молекулы моносахарида; или же благодаря взаимодействию гидроксильных таутомерных форм карбонильной группы двух молекул моносахарида. Таким образом, по своему строению они являются гликозидами или гликозидо-гликозидами. Олигосахариды сравнительно легко гидролизуются с образованием соот-

ветствующих моносахаридов. Они дают истинные растворы, обладают, подобно монозам, сладким вкусом и обычно хорошо кристаллизуются.

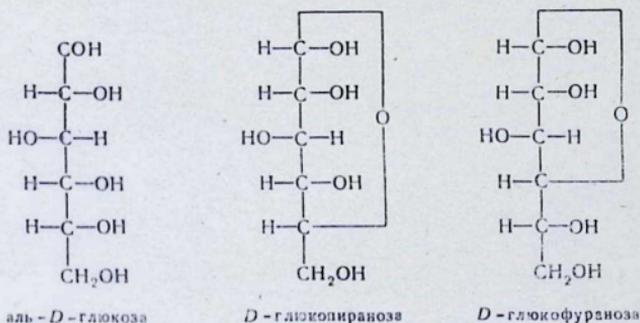
Полисахариды построены по тому же принципу, что и олигосахариды, но не из нескольких, а из многих молекул моносахаридов. Поэтому они имеют высокий молекулярный вес, нерастворимы в воде или дают коллоидные растворы, аморфны (крип-токристалличны). Полисахариды не обладают сладким вкусом. При их гидролизе в качестве промежуточных продуктов образуются олигосахариды, а в качестве конечных продуктов — моносахариды.

Углеводы участвуют в процессах обмена веществ и являются компонентами структур многих естественных соединений, как, например, нуклеопро-теидов, глюкoпpо-теидов, некоторых витаминов и коэнзимов. Углеводы — конечные продукты фотохимического синтеза у зеленых растений. Животные, лишённые способности к подобной аккумуляции солнечной энергии используют вещества, накопленные растениями.

Изучению процесса фотосинтеза и выяснению его роли для существования всех живых организмов на земле посвящены классические исследования К. А. Тимирязева.

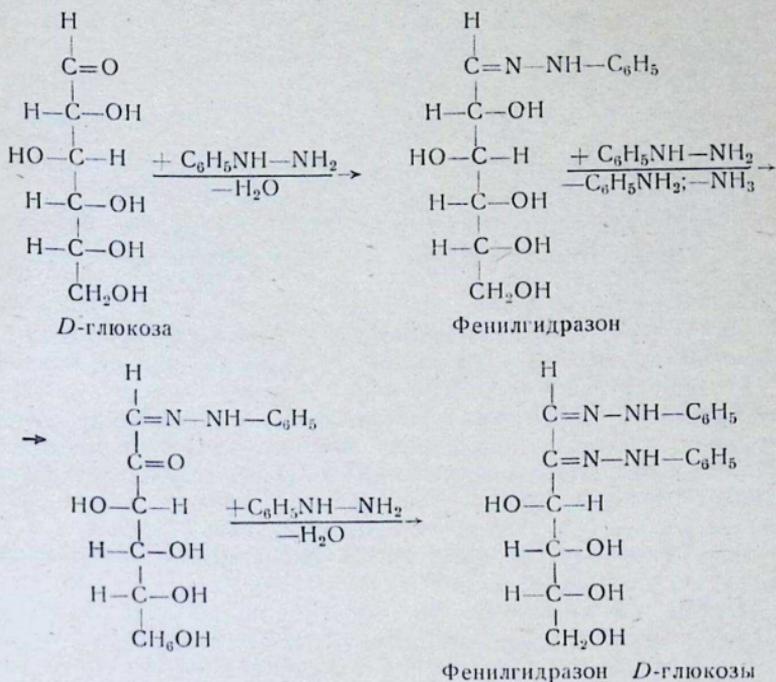
МОНОСАХАРИДЫ

Работа 42. D(+)-Глюкоза (декстроза, виноградный сахар)



Глюкоза — одно из широко распространенных естественных соединений и одно из важнейших сахаристых веществ. Этот моносахарид является структурным элементом при построении молекул многих олигосахаридов и важнейших полисахаридов, таких, как гликоген, крахмал, клетчатка (целлюлоза). Глюкоза — редуцирующий сахар и в растворах обнаруживает мутаротацию, как следствие взаимного превращения, до достижения равновесия α - и β -форм:

соседний с карбонильной группой углеродный атом окисляется второй молекулой фенолгидразина до > CO группы, а третья молекула фенолгидразина присоединяется по месту новой карбонильной группы, образуя озон. Реакция может быть изображена следующим образом:



1 г глюкозы растворить в 20 мл воды, добавить 3 г уксуснокислого натрия и затем 2 г хлоргидрата фенолгидразина. Раствор нагреть на водяной бане (около двух часов). При этом выпадают желтые кристаллы озона. По охлаждении жидкости их отфильтровать и перекристаллизовать из горячего водного спирта. Образуются светло-желтые иголочки D-глюкозазона с температурой плавления 204—205° С.

D-глюкоза, D-манноза и D-фруктоза дают один и тот же озон, что весьма важно в смысле установления их строения.

IV. Восстановительная способность глюкозы. Все углеводы, обладающие свободной карбонильной группой (свободным гликозидным гидроксилом), дают ряд характерных реакций, основанных на окислении этой группы и восстановлении некоторых слабых окислителей: окисей меди, серебра и других. Сахара, дающие такие реакции, носят название редуцирующих, в проти-

вположность редуцирующим углеводам, не содержащим свободной карбонильной группы. С увеличением молекулярного веса редуцирующая способность падает (так, например, полисахариды, имеющие свободную карбонильную группу, практически не редуцируют). Реакции восстановления (окисление сахаров) протекают легко в щелочной среде и труднее в нейтральной и особенно кислой среде.

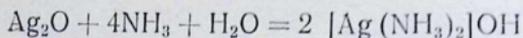
1. Проба на восстановление окиси меди. К раствору глюкозы (1—2%-ной) прибавить половину объема 10%-ного раствора едкого натра и затем несколько капель раствора серноокислой меди. Нагреть до кипения. Вначале образуется желтый осадок гидрата закиси меди (CuOH), который при дальнейшем нагревании переходит в красный осадок закиси меди (Cu_2O).

2. Проба Фелинга. Реактив Фелинга готовят, смешивая равные объемы раствора медного купороса (69,28 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1000 мл воды) и щелочного раствора сегнетовой соли (346 г $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ и 140 г NaOH в 1000 мл воды). 3 мл полученного раствора Фелинга прилить к 9 мл 1%-ного раствора глюкозы и довести до кипения. Выделяется красный осадок закиси меди (Cu_2O).

3. Проба с реактивом, содержащим соль висмута. Реактив совершенно аналогичен реактиву Фелинга, только вместо соли окиси меди раствор содержит соль висмута. При доведении до кипения раствора глюкозы с равным объемом раствора 4 г сегнетовой соли 2 г основного азотно-кислого висмута в 100 мл 10%-ного едкого натра образуется черный осадок металлического висмута.

4. Проба на восстановление аммиачного раствора серебра. Нагреть 4 мл раствора глюкозы в 2 мл аммиачного раствора серебра и наблюдать выделение на стенках пробирки зеркала металлического серебра.

Аммиачный раствор серебра готовят путем добавления к 5%-ному раствору азотнокислого серебра необходимого количества аммиака до растворения выпадающего вначале буроватого осадка:

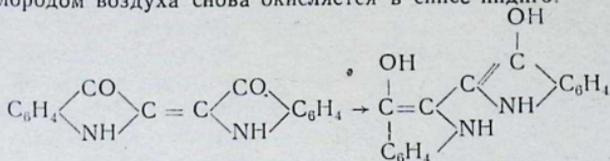


5. Проба Барфёда. Прокипятить 1%-ный раствор глюкозы с реактивом Барфёда (раствор уксуснокислой меди и уксуснокислого натрия в разбавленной уксусной кислоте) и наблюдать выпадение красного осадка закиси меди.

Проба Барфёда отличается от всех предыдущих реакций восстановления тем, что окисление сахара протекает не в щелочной среде, а в среде, близкой к нейтральной. В этих условиях редуцирующие дисахариды, в противоположность моносахаридам, практически не окисляются. Таким образом, такие дисахариды не восстанавливают реактив Барфёда, что позволяет отличать их от моносахаридов.

6. **Проба на восстановление индиго.** 1—2%-ный раствор глюкозы слегка подщелочить несколькими каплями раствора соды, прибавить 1—2 капли раствора индиго и нагреть. При этом синий цвет переходит в желтый. По охлаждению и встряхивании жидкость снова приобретает голубую окраску.

Эта проба основана на восстановлении синего индиго в белое индиго, которое кислородом воздуха снова окисляется в синее индиго:



Работа 43. Определение угла вращения плоскости поляризации и удельного вращения *D*-глюкозы

Большинство естественных соединений, образующихся в растительных и животных организмах, являются оптически активными, т. е. вращают плоскость поляризации проходящего через них или через их растворы луча поляризованного света. Причина оптической активности заключается в асимметричном строении молекул вещества. Асимметричное строение обусловлено обычно наличием одного или нескольких асимметричных атомов углерода и значительно реже, как например, у инозита (гексаоксициклогексана), асимметрией молекулы в целом. Вращение может быть правым (по часовой стрелке) и обозначается знаком плюс (+) или левым (против часовой стрелки) и обозначается знаком минус (-).

Для характеристики вращающей способности вещества служит величина так называемого удельного вращения. Удельное вращение для вещества, находящегося в растворе, может быть выражено формулой

$$[\alpha] = \frac{\alpha \cdot 100}{l \cdot c},$$

где α — наблюдаемый угол вращения, l — толщина слоя жидкости (длина трубки) в дециметрах, а c — концентрация вещества в 100 мл раствора. Удельное вращение может быть выражено и так:

$$[\alpha] = \frac{\alpha \cdot 1000}{l \cdot p \cdot d},$$

где p — процентное содержание, т. е. число грамм вещества в 100 г раствора, а d — плотность раствора.

Удельное вращение зависит от условий опыта. Прежде всего удельное вращение является функцией температуры и длины

волны (λ) луча света. Поэтому измерение удельного вращения необходимо вести при монохроматическом свете определенной длины волны и при определенной температуре. Обычно измерения ведут в свете желтого натриевого пламени ($\lambda = 5893 \text{ \AA}$) и при температуре 20°C . Поэтому и удельное вращение получает обозначение $[\alpha]_D^{20}$. Кроме того, удельное вращение зависит от природы растворителя и концентрации c исследуемого вещества. Сравнению могут подлежать лишь величины удельного вращения, найденные в одном и том же растворителе. Влияние концентрации c обычно не очень велико, однако при точных измерениях с ним приходится считаться. Так, например, для *D*-глюкозы в 10%-ном водном растворе в состоянии равновесия $[\alpha]_D^{20} = +52,74^\circ$, а в 1—4%-ных растворах $[\alpha]_D^{20} = +52,52^\circ$. Зависимость $[\alpha]_D$ от концентрации для *D*-глюкозы может быть выражена следующей формулой:

$$[\alpha]_D^{20} = +52,5 + 0,018796 p + 0,00051683 p^2,$$

где p — процентное содержание глюкозы в растворе.

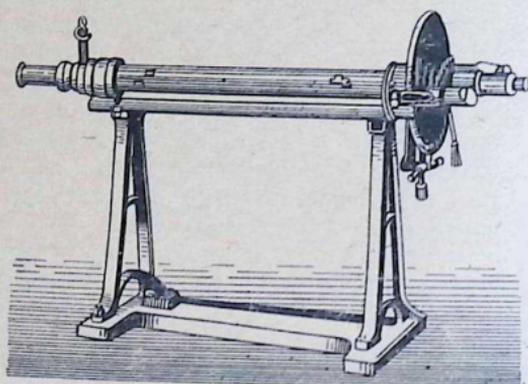


Рис. 10. Поляриметр

Для практического определения вращающей способности служат поляриметры различных систем. Наиболее широко применяются полутеневые поляризационные приборы (рис. 10). Источником света служит натриевое пламя, свет которого фильтруется через 6—9%-ный раствор $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. В качестве светофильтра может также служить раствор, содержащий 6% $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ и 4% CuSO_4 .

Прежде всего определяют нулевое положение прибора. Помещают между поляризатором трубку, наполненную водой, и, вращая анализатор, добиваются некоторого среднего одина-

кового полутеневого освещения обеих половин поля зрения. Установку производят, подводя к точке равной освещенности обеих половин поля зрения один раз справа, другой раз — слева. Берут среднее из полученных значений. Угол поворота анализатора считается по большому кругу с делениями и нониусом. Таким образом, отсчет может быть сделан с точностью до $0,01^\circ$. После этого наливают в трубку исследуемый раствор сахара. При этом следят за тем, чтобы в трубке не осталось пузырьков воздуха и чтобы боковые стекла были не слишком туго прижаты (во избежание двойного лучепреломления). Помещают трубку в поляриметр и определяют угол поворота анализатора, необходимый для достижения равномерного освещения обеих половин поля зрения, совершенно так же, как при определении нулевого положения прибора. Теперь, зная нулевое положение прибора и угол поворота анализатора, легко найти угол, на который вращает плоскость поляризации исследуемый раствор сахара.

Для определения удельного вращения D -глюкозы наполняют трубку поляриметра водным раствором, содержащим 4 г глюкозы в 100 мл раствора. Раствор должен быть приготовлен за сутки до начала работы. Определяют угол вращения плоскости поляризации α . По найденному α находят $[\alpha]_D$ по вышеприведенной формуле. Если удельное вращение сахара известно, то, определяя угол вращения α раствора с неизвестной концентрацией сахара, можно определить эту концентрацию по формуле:

$$c = \frac{\alpha \cdot 100}{[\alpha]_D \cdot l}.$$

Работа 44. Наблюдение мутаротации с раствором D -глюкозы

Для многих углеводов окончательное (постоянное) вращение плоскости поляризации устанавливается вследствие мутаротации лишь через некоторое время после их растворения.

Ход работы. Приготовить раствор, содержащий 4 г глюкозы в 100 мл раствора. Наполнить им трубку поляриметра и сразу же после растворения, а затем через каждые 20—30 мин, измерить угол вращения. Через несколько часов оставить раствор на 20—25 ч и снова два-три раза измерить угол вращения, который теперь остается постоянным. Сравнить полученные в продолжение опыта значения для $[\alpha]_D$.

Растворенная D -глюкоза обнаруживает удельное вращение $[\alpha]_D^{20^\circ} = 111-113^\circ$, которое постепенно уменьшается до $[\alpha]_D^{20^\circ} \sim +52,5^\circ$ (состояние равновесия α - и β -форм D -глюкозы).

Работа 45. Определение глюкозы по Фелингу

Большинство методов количественного определения глюкозы основано на реакциях ее окисления и, следовательно, могут быть применены и для определения других редуцирующих моно-

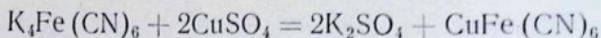
и дисахаридов. Реакции окисления сахара в щелочной среде, однако, не протекают в стехиометрических соотношениях. Обычно имеет место сложный окислительный распад молекулы сахара, приводящий к образованию ряда продуктов окисления. Так, например, окисление глюкозы раствором Фелинга дает среди продуктов окисления молочную, тартроновую, глюконовую и глюкуроновую кислоты. В таких случаях: 1) результаты определений не могут быть вычислены по какому-либо стехиометрическому уравнению, а вычисляются по заранее эмпирически найденным величинам и 2) для получения сравнимых результатов необходимо строго придерживаться определенных условий методики работы. Для определения заранее готовят два раствора.

I. 69,28 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1000 мл воды.

II. 346 г сегнетовой соли ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) и 140 г едкого натра в 1000 мл воды.

Перед самым употреблением смешивают равные объемы этих растворов и получают готовый для определения раствор Фелинга. 1,0 мл такого раствора соответствует 0,005 г окисляемой глюкозы.

Ход работы. В коническую колбу отмерить точно 20 мл раствора Фелинга, добавить 80 мл воды, нагреть на сетке до кипения и постепенно из бюретки прибавить (приблизительно) 0,25%-ный раствор глюкозы. Легкое кипение поддерживать во все время приливания раствора сахара. Прибавление раствора сахара продолжать до полного исчезновения голубой окраски раствора, т. е. до полного восстановления всей соли окиси меди. Так как исчезновение последних следов голубой окраски бывает плохо заметно, то дополнительной индикаторной пробой может служить проба на присутствие в жидкости соли окиси меди. Для этой пробы взять каплю жидкости на молочно-белое стекло, подкислить уксусной кислотой и прибавить каплю 10%-ного раствора железистосинеродистого калия. В присутствии соли окиси меди получается коричневое пятно, благодаря образованию железистосинеродистой соли окиси меди:



Если для полного обесцвечивания 20 мл раствора Фелинга пошло 40 мл исследуемого раствора глюкозы, то в 100 мл раствора глюкозы содержится:

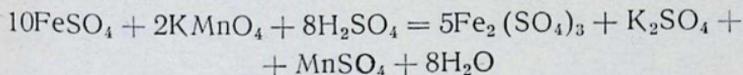
$$\frac{0,005 \cdot 20 \cdot 100}{40} = 0,25 \text{ г.}$$

Работа 46. Определение глюкозы по Бертрану

Этот метод основан на окислении сахара избытком раствора Фелинга. Образующуюся при этом закись меди отделяют и окисляют солью окиси железа:



При этом образуется эквивалентное количество закисной соли железа, которое определяется титрованием с перманганатом:



По количеству израсходованного 0,1 н. раствора перманганата легко найти количество меди, так как из написанных уравнений следует, что 1 мл 0,1 н. раствора KMnO_4 соответствует 6,36 мг Си. Дальнейший пересчет найденного количества меди в мг глюкозы обычным путем невозможен ввиду того, что окисление сахара солью окиси меди не следует определенному стехиометрическому соотношению. Поэтому найденное количество меди переводится в мг глюкозы по нижеследующей, эмпирически найденной, табл. 5.

Если по способу Бертрана определяется не глюкоза, а другой сахар, то необходимо пользоваться специальной таблицей, найденной для этого сахара (табл. 6).

Для работы необходимы следующие растворы:

I. 40 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1000 мл воды.

II. 200 г сегнетовой соли и 150 г едкого натра в 1000 мл воды.

III. 50 г $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ и 200 мл концентрированной серной кислоты в 1000 мл воды. Этот раствор не должен содержать Fe^{2+} . Поэтому к нему добавляют 0,1 н. раствор KMnO_4 до очень слабой розовой окраски.

IV. 0,1 н. или 0,2 н. раствор KMnO_4 .

Ход работы. В коническую колбу емкостью 150 мл налить 20 мл раствора глюкозы, содержащей не более 100 мг сахаристого вещества (в противном случае исходный раствор сахара должен быть соответственно разбавлен) и добавить смесь из 20 мл раствора I и 20 мл раствора II. Довести до кипения и кипятить ровно три минуты. Жидкость после этого должна быть окрашена в синий цвет, т. е. должен еще быть избыток соли окиси меди. Дать осесть образовавшемуся красному осадку закиси меди и затем осторожно, декантируя, стараясь по возможности не взмучивать осадка, фильтровать жидкость через стеклянный пористый фильтр и промыть осадок в колбе и на фильтре горячей водой до исчезновения щелочной реакции. При этом следить за тем, чтобы осадок все время был покрыт водой

Определение глюкозы по способу Бертрана, мг

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

(во избежание окисления закиси меди). После этого осадок на фильтре растворить в возможно малом объеме раствора III и перенести определенное количество раствора в коническую колбу с главным осадком. Туда же добавить еще раствор III (всего около 20 мл) и легким встряхиванием добиваться полного растворения осадка закиси меди. Если этого не произошло, добавить еще небольшое количество раствора III. Полученный раствор титровать 0,1 н. или 0,2 н. раствором перманганата до перехода зеленого окрашивания в розовое.

Результат определения выразить в мг %. Если, например, при определении глюкозы в 20 мл раствора на титрование пошло

Определение мальтозы по способу Бертрана, мг

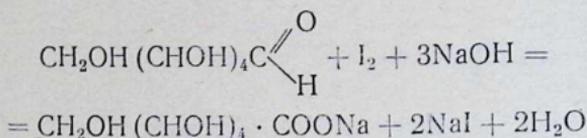
Мальтоза	Медь	Маль- тоза	Медь	Маль- тоза	Медь	Мальтоза	Медь
10	11,2	33	36,5	56	61,4	79	86,1
11	12,3	34	37,6	57	62,5	80	87,2
12	13,4	35	38,7	58	63,5	81	88,3
13	14,5	36	39,8	59	64,6	82	89,4
14	15,6	37	40,9	60	65,7	83	90,4
15	16,7	38	41,9	61	66,8	84	91,5
16	17,8	39	43,0	62	67,9	85	92,6
17	18,9	40	44,1	63	68,9	86	93,7
18	20,0	41	45,2	64	70,0	87	94,8
19	21,1	42	46,3	65	71,1	88	95,8
20	22,2	43	47,4	66	72,2	89	96,9
21	23,3	44	48,5	67	73,3	90	98,0
22	24,4	45	49,5	68	74,3	91	99,0
23	25,5	46	50,6	69	75,4	92	100,1
24	26,6	47	51,7	70	76,5	93	101,1
25	27,7	48	52,8	71	77,6	94	102,2
26	28,9	49	53,9	72	78,6	95	102
27	30,0	50	55,0	73	79,7	96	104,2
28	31,1	51	56,1	74	80,8	97	105,3
29	32,2	52	57,1	75	81,8	98	106,3
30	33,3	53	58,2	76	82,9	99	107,4
31	34,4	54	59,3	77	84,0	100	108,4
32	35,3	55	60,3	78	85,1		

15 мл 0,1 н. раствора перманганата, то количество определенной титрованием меди будет $6,36 \times 15 = 95,4$ мг. По таблице это количество меди соответствует 50 мг глюкозы и, следовательно, содержание глюкозы в исследуемом растворе 250 мг %.

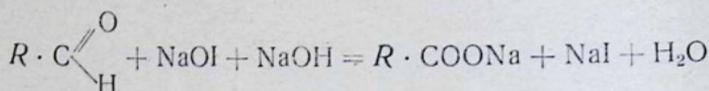
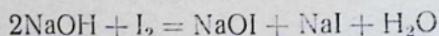
В случае определения не глюкозы, а другого сахара, необходимо пользоваться специальной таблицей. Например, для определения мальтозы берут 10 или 20 мл раствора с содержанием 10—100 мг мальтозы. Определение вести так же, как это описано для случая глюкозы. Количество миллиграммов определенной титрованием меди перевести по табл. 6 в миллиграммы мальтозы и результат определения выразить в мг %.

Работа 47. Определение глюкозы с гипойодитом

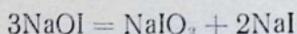
Альдозы окисляются гипойодитом в альдоновые кислоты; в частности, глюкоза окисляется с образованием глюконовой кислоты по суммарному уравнению:



которое складывается из двух реакций:



Параллельно основной реакции окисления протекает реакция



скорость которой, однако, при достаточной щелочности раствора очень мала, по сравнению со скоростью восстановления гипойодита. Поэтому определение альдоз должно вестись в достаточном щелочном растворе. С другой стороны, при избытке щелочи реакция окисления не останавливается на образовании альдоновой кислоты. Она окисляется дальше и при значительной концентрации щелочи нельзя точно установить время конца реакции. Таким образом, результаты определения зависят от концентрации и количества взятой щелочи, которой, во всяком случае, должно быть достаточно для нейтрализации образующейся глюконовой кислоты.

Окисление альдоз гипойодитом интересно не только тем, что протекает по стехиометрическому уравнению, но также и тем, что при соблюдении определенных условий кетозы не окисляются гипойодитом. Это делает метод применимым для определения альдоз в присутствии кетоз, например глюкозы в присутствии фруктозы. Однако при применении метода к биохимическим объектам следует иметь в виду, что кроме альдоз некоторые другие вещества могут также окисляться в указанных условиях.

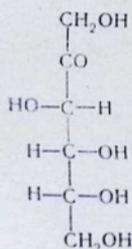
Ход работы. К 20 мл 0,5%-ного раствора глюкозы прилить из бюретки точно отмеренный объем 0,1 н. раствора йода. Количество йода взять в 1,5—2 раза больше, требующегося по уравнению. Затем при обычной температуре и энергичном взбалтывании прибавить по каплям 0,1 н. раствор едкого натра

в полуторакратном избытке по сравнению с теоритическим количеством (при расчете на йод). Смесь оставить стоять 10—20 мин. Осторожно подкислить 25%-ной серной кислотой до едва заметной реакции на конго и титровать выделившийся йод 0,1 н. раствором тиосульфата, вначале до слабо-желтой окраски, а затем, после прибавления нескольких капель раствора крахмала, до исчезновения синей окраски.

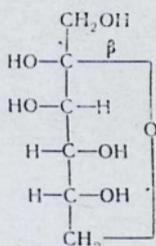
Одновременно поставить контрольный опыт, где вместо раствора глюкозы взять 20 мл воды. Из объема раствора тиосульфата, пошедшего в контрольном опыте, вычесть объем, пошедший на основное титрование. Разность, выраженную в миллилитрах 0,1 н. раствора йода, пересчитать в миллиграммы сахара, имея в виду, что по вышеприведенному уравнению 1 мл 0,1 н. раствора йода соответствует 9,005 мг глюкозы, или 17,11 мг мальтозы. Результат определения выразить в мг %.

Ошибка определения не должна превышать 0,5%. При концентрации глюкозы 0,1% и общем количестве титруемой глюкозы в 10 мг ошибка не больше 1—1,5%.

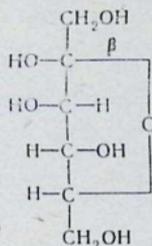
Работа 48. *D*(—)-Фруктоза (левулоза)



Кето-*D*-фруктоза



D-фруктопираноза



D-фруктофураноза
(*α*- или *β*-*D*-фруктоза)

Фруктоза особенно широко распространена в составе растительных организмов. Является структурным элементом при построении различных олигосахаридов и некоторых полисахаридов (инулин). Редуцирующий сахар; в растворах обнаруживает явление мутаротации. Конечное $[\alpha]_D^{20} = -92^\circ$. С фенилгидразином дает фенилозасон, идентичный с озонами *D*-глюкозы и *D*-маннозы. Отличается от этих сахаров тем, что легко образует метилфенилозасон с температурой плавления 158—160° С при действии метилфенилгидразина. Дрожжами сбраживается так же легко, как и *D*-глюкоза.

Ход работы. I. Определение удельного вращения. Водный раствор *D*-фруктозы, содержащий 2 г вещества в 100 мл, исследовать в поляриметре, определить α и найти $[\alpha]_D$.

II. Получение озона. Озон образуется из *D*-фруктозы еще легче, чем из *D*-глюкозы. Для получения озона поступают аналогично описанному получению *D*-глюкозазона (работа 42). Полученный озон перекристаллизовать из водного спирта, определить температуру плавления (204—205° С) и температуру плавления смеси с *D*-глюкозазоном. Убедиться в идентичности полученного озона с *D*-глюкозазоном.

III. Цветные реакции и реакции восстановления. С 1%-ным раствором фруктозы проделать пробы Подобедова—Молиша, Фелинга, Барфедда и пробу с аммиачным раствором серебра. Констатировать, что все эти пробы положительны.

Работа 49. Реакция Селиванова

Реакция Селиванова дает возможность отличить фруктозу от глюкозы и вообще кетозы от альдоз. Основана она так же, как и реакция Молиша, на образовании при действии соляной кислоты на фруктозу *o*-оксиметилфурфузола, дающего с резорцином окрашенный продукт конденсации. Эту реакцию, вообще говоря, дают и альдозы, но при более длительном воздействии соляной кислоты.

Ход работы. 5 мл 2—3%-ного раствора фруктозы смешать с 5 мл 25—30%-ной соляной кислоты и несколькими кристаллами резорцина. При коротком нагревании появляется интенсивное красное окрашивание. Параллельно поставить ту же пробу с 1—2%-ным раствором глюкозы.

Работа 50. Цветная реакция с ванилином на фруктозу

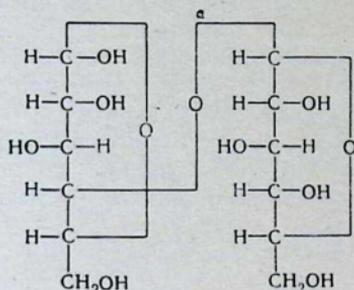
Эта реакция основана на конденсации продуктов расщепления фруктозы с ванилином (4-окси-3-метоксибензальдегидом), причем, в зависимости от концентрации сахара, получается слабозерозовое и красное окрашивание. Реакция отрицательна с глюкозой, галактозой, аскорбиновой кислотой, диоксиацетоном, но положительна с олигосахаридами и полисахаридами, в состав которых входит фруктоза, например, с сахарозой, инулином.

Ванилиновый реагент готовят, растворяя 0,2 г ванилина в смеси 25 мл концентрированной соляной кислоты и 75 мл 85%-ной фосфорной кислоты. Такой раствор хранят в хорошо закрытой темной склянке.

Ход работы. 1 мл исследуемого раствора (менее 1% фруктозы) смешать с 5 мл ванилинового реагента и нагреть две минуты на водяной бане, после чего быстро охладить в ледяной воде. Окраска затем устойчива и пригодна для количественных колориметрических определений.

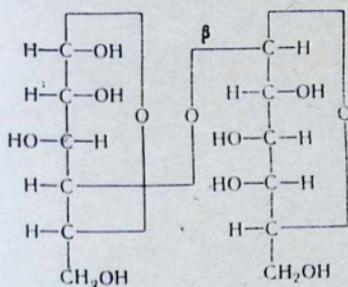
ДИСАХАРИДЫ

Работа 51. Мальтоза (4-[α -*D*-глюкозидо-(1,5)-*D*-глюкоза (1,5)] и лактоза (4-[β -*D*-галактозидо-(1,5)]-*D*-глюкоза (1,5))



Мальтоза

Мальтоза (солодовый сахар) образуется при амилолитическом гидролизе крахмала. Редуцирующий сахар дает реакцию восстановления с реактивом Фелинга, но не восстанавливает реактив Барфёда. В растворах обнаруживает явление мутаротации. Конечное $[\alpha]_D^{20} = +136^\circ$; α -мальтоза — $[\alpha]_D^{20} = +160^\circ$; β -мальтоза — $[\alpha]_D^{20} = +118^\circ$. Образует озазон. Расщепляется дрожжами (α -глюкозидаза) на две молекулы *D*-глюкозы. Не изменяется под действием эмульсина (β -глюкозидазы).



Лактоза

Лактоза — сахар молока млекопитающих. Редуцирующий сахар. Восстанавливает жидкость Фелинга, но не выделяет закиси меди при нагревании с реактивом Барфёда. В растворах обнаруживает мутаротацию. Конечное $[\alpha]_D^{20} = +55,2^\circ$. Дает озазон. При действии молочнокислых дрожжей (β -галактозидаза) и эмульсина (β -глюкозидазы), а также кишечным соком животных расщепляется на *D*-глюкозу и *D*-галактозу. Не расщепляется α -глюкозидазами.

Ход работы I. Получение фенилмальтозозона и фениллактозозона. Озозоны получить в условиях, аналогичных описанным при получении *D*-глюкозозона (работа 42). Здесь озозоны, легче растворимы в воде, выпадают лишь по охлаждению жидкости. Фенилмальтозозон имеет температуру плавления 206° С, фениллактозозон — температуру плавления 210—212° С.

II. Цветные реакции и реакции восстановления. С 1—2%-ными растворами мальтозы и лактозы проделать пробы Подобедова — Молиша, Фелинга, Барфёда. Затем к 2—3 мл раствора сахара добавить 2—3 капли 25%-ной серной кислоты и кипятить пять минут. По охлаждению точно нейтрализовать жидкость осторожным добавлением раствора едкого натра и нагреть с реактивом Барфёда. Положительный результат реакции указывает на образование при гидролизе моносахаридов.

Работа 52. Качественный анализ смеси углеводов методом распределительной хроматографии на фильтровальной бумаге

Метод хроматографического адсорбционного анализа («Адсорбция» в главе VI «Белки») был разработан в 1903—1906 гг. русским исследователем М. С. Цветом. В настоящее время этот метод применяется при разделении сложных смесей различных биологических соединений: пигментов, аминокислот, антибиотиков, витаминов, энзимов, гормонов. Метод М. С. Цвета дает возможность использовать распределительную хроматографию на фильтровальной бумаге.

При движении какого-либо несмешивающегося с водой растворителя по целлюлозной бумаге происходит распределение растворенного вещества междудвигающимися по поверхности целлюлозного волокна растворителем и связанной этим волокном водой. Относительное расстояние, на которое передвигается растворенное вещество, в направлении движения растворителя зависит при определенных избранных условиях опыта только от коэффициента распределения данного вещества между водой и растворителем. Таким образом, после достаточно продолжительного размывания растворителем нанесенной на бумагу смеси сахаров, характеризующихся различными коэффициентами распределения, компоненты смеси оказываются локализованными на различных расстояниях по направлению движения растворителя. После удаления растворителя путем высушивания при 100—105° С хроматограмма проявляется, для чего служит смесь равных объемов в 0,1 н. раствора азотнокислого серебра и 5 н. раствора аммиака, которой смачивается бумага. При высушивании на бумаге образуются темно-коричневые пятна на местах локализации отдельных редуцирующих сахаров.

В случае фруктозы и, особенно, нередуцирующих олигосахаридов, содержащих фруктозу, для проявления хроматограммы пользуются смесью равных объемов 0,2%-ного алькогольного раствора нафторезорцина и 2,0%-ного водного раствора трихлоруксусной кислоты (приготавливаемой непосредственно перед употреблением). При этом после высушивания получают яркочерные пятна.

Метод позволяет определить качественный состав смеси углеводов в том или ином биологическом объекте. Определению может мешать присутствие некоторых органических оснований и солей (NaCl и KCl), дающих при проявлении хроматограммы аммиачным раствором серебра коричневые пятна.

Ход работы. Для работы использовать достаточно плотную и однородную, совершенно чистую фильтровальную бумагу. Из такой бумаги вырезать кусок около 50 см длины и 8 см ширины. Затем на расстоянии 6—7 см от верхнего края куска нанести вдоль по ширине куска на расстоянии 1,5 см один от другого последовательно капли 1%-ных водных растворов глюкозы, фруктозы, мальтозы и затем каплю смеси всех трех растворов. Верхний край куска бумаги опустить затем в корытце (из стекла или нержавеющей стали), наполненное фенолом, насыщенным водой, и укрепленное в стеклянной или металлической камере, герметической закрывающейся (рис. 11). На дно камеры поместить насыщенную фенолом воду (для насыщения воздуха камеры). Хроматографирование продолжать около 20 ч, после чего бумагу вынуть из камеры, отметить фронт распространения растворителя и высушить бумагу при 100—105° С. Затем бумагу смочить аммиачным раствором азотнокислого серебра и быстро (5—10 мин) высушить в шкафу при 105° С. Определить относительное расстояние для каждого отдельного сахара как отношение расстояния до соответствующего пятна к расстоянию до фронта распространения растворителя. Повторить опыт хроматографирования с 1%-ными растворами фруктозы, сахарозы, мальтозы и с смесью этих сахаров, пользуясь различными способами проявления.

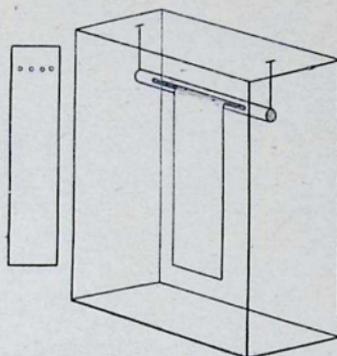
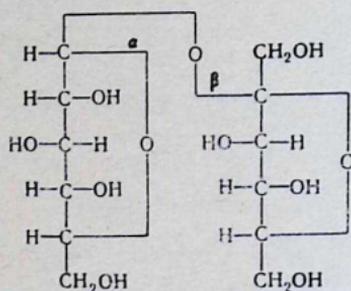


Рис. 11. Камера для хроматографирования

Для хроматографирования может быть использована также смесь 40 мл нормального бутилового спирта, 10 мл ледяной уксусной кислоты и 50 мл воды, причем после расслаивания

такой смеси водный слой помещается на дно камеры, а слой растворителей идет на заполнение корытца. Относительные расстояния здесь иные, чем с фенолом.

Работа 53. Сахароза [α -*D*-глюкозидо (1,5)- β -*D*-фруктозид (2,5)]



Сахароза

Сахароза, или тростниковый сахар, один из распространеннейших растительных дисахаридов. Не обладает редуцирующей способностью, не обнаруживает в растворах мутаротации и не образует озона $[\alpha]_D^{20^\circ} = +66,5^\circ$.

Специфичность гликозидаз относится к гликозидно связанному остатку монозы и сахароза, в которой обе монозы соединены за счет своих гликозидных групп, расщепляется двумя энзимами: α -глюкозидазой и β -*h*-фруктозидазой.

Оба фермента находятся в дрожжах и отличаются оптимальным pH. Оптимум активности α -глюкозидазы — pH 6,5—7,0, а β -*h*-фруктозидазы — pH 4,7. При гидролитическом расщеплении сахарозы образуются эквимолекулярные количества *D*-глюкозы и *D*-фруктозы. Сам процесс носит название инверсии, так как в результате расщепления направление вращения изменяется: $[\alpha]_D^{20^\circ} = +66,5^\circ$ переходит в $[\alpha]_D^{20^\circ} = -20^\circ$.

Ход работы. С 5—10%-ным раствором сахарозы сделать пробы Подобедова — Молиша и Селиванова. Затем раствор сахарозы нагреть с реактивом Фелинга. Восстановления при этом не наблюдается. 5—10 мл раствора сахарозы нагреть с несколькими каплями 10%-ной серной кислоты. По охлаждении жидкость осторожно нейтрализовать, разделить на две части и с полученным гидролизатом сделать пробы Фелинга и Барфёда. Результат проб положительный, что указывает на образование в результате гидролиза моносахаридов.

Работа 54. Получение препарата β -фруктофуранозидазы

Гидролиз сахарозы даст *D*-глюкозу и *D*-фруктозу. Сама сахароза не восстанавливается при нагревании реактивы Фелинга и Барфёда, а продукты ее гидролиза восстанавливают (см. работы 45 и 46), и по реакции восстановления можно судить о наличии процесса гидролиза.

Ход работы. 100—200 г дрожжей хорошо растереть с чистым песком и высушить, разложив тонким слоем, на воздухе. Затем извлечь двойным объемом воды, профильтровать и добавить к фильтрату при перемешивании избыток ацетона. Выпавший осадок отсосать, высушить на воздухе и измельчить в порошок. Для работы пользоваться водным извлечением этого порошка, содержащего фермент.

В две пробирки поместить по 1 мл полученного раствора фермента, добавить по 5 мл 1%-ного раствора сахарозы и поставить в термостат при 38° С. Параллельно поставить такой же опыт с 1 мл прокипяченного раствора фермента. Через 15—20 мин к содержимому первой пробирки добавить равный объем реактива Фелинга, а во вторую — реактива Берфёда и нагреть до кипения. Образование красного осадка закиси меди указывает на присутствие *D*-глюкозы и *D*-фруктозы, получившихся в результате гидролиза сахарозы. В контрольном опыте восстановления нет.

ПОЛИСАХАРИДЫ

В растительных организмах полисахариды, или полиозы, откладываются или как запасные (резервные) вещества (крахмал, инулин), или же входят в состав стенки растительной клетки (целлюлоза), и в таком случае играют существенную роль в построении твердого остова растений. В организме животных встречаются полиозы, являющиеся резервными углеводами (гликоген) и полиозы, имеющие значение структурных веществ (тунциин оболочников и моллюсков, хитин насекомых и ракообразных).

Крахмал — резервный полисахарид растений, молекула которого построена из остатков *D*-глюкозы, соединенных друг с другом α -гликозидными связями, нерастворимый в воде, дающий синее окрашивание с йодом. Молекулярный вес крахмала 110 000—140 000. Легко гидролизруется при действии различных животных и растительных амилаз с образованием мальтозы. Зерна крахмала не однородны и состоят из амилозы, нерастворимой в воде и дающей синее окрашивание с йодом, и амилопектина, содержащего около 0,17% фосфора (в виде остатка фосфорной кислоты), дающего с йодом красно-фиолетовое окрашивание и растворимого в воде.

Гидролиз крахмала. Молекула крахмала может быть распелена гидролитически при совместном действии четырех ферментов.

α - и β -Амилазы расщепляют только связи 1,4 в молекуле крахмала.

β -Амилаза расщепляет каждую вторую связь со всех концов молекулы крахмала, но лишь до точек ветвления. В результате действия этого фермента образуется β -мальтоза и высокомолекулярный β -декстрин.

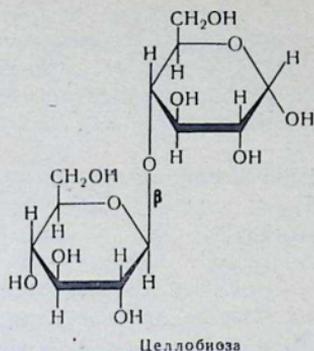
α -Амилаза расщепляет связи 1,4 не только до мест ветвления, но и между ними. В результате действия этого фермента образуется не только α -мальтоза, но и некоторое количество глюкозы и низкомолекулярные α -декстрины.

В молекуле амилозы имеются аномальные структуры, которые расщепляются при участии особого Z-фермента. Только при совместном действии β -амилазы и Z-фермента часть крахмала, а именно амилоза, не имеющая связей 1,6, расщепляется на 100%.

Находящиеся в другой части крахмала — амилопектине — в точках ветвления связей 1,6 расщепляются специфическим ферментом амило-1,6-глюкозидазой, называемым R-ферментом. Действие этого фермента проявляется после расщепления α - и β -амилазами значительной части наружных цепей амилопектина.

Гликоген — резервный полисахарид, находящийся в различных органах и тканях многих животных. Подобный гликогену полисахарид, обладающий всеми свойствами гликогена, обнаружен также у грибов, дрожжей и водорослей. У высших животных особенно много гликогена в печени. Гликоген по многим свойствам напоминает крахмал, но отличается от него растворимостью в воде и тем, что с йодом дает красновато-бурую окраску. По характеру этой окраски и по содержанию остатка фосфорной кислоты сходен с амилопектином. Молекулярный вес 110 000—140 000. $[\alpha]_D^{20} = +196^\circ$. Гликоген очень устойчив к действию даже концентрированных растворов едких щелочей. При кислотном гидролизе дает так же, как и крахмал, D-глюкозу, а при энзиматическом гидролизе (при действии амилаз) образуется мальтоза.

Целлюлоза — нерастворимый в воде полисахарид, молекула которого построена из 200—2000 остатков β -D-глюкозы. Отличается от крахмала и гликогена тем, что не дает окрашивания с йодом, значительно труднее гидролизуется в кислых растворах и не гидролизуется при действии амилаз. При полном гидролизе образуется D-глюкоза, при осторожном гидролизе получается целлобиоза или 4- $[\beta$ -D-глюкозидо(1,5)-D-глюкоза-(1,5)], что говорит о наличии β -глюкозидных связей в молекуле целлобиозы, гидролизуемых β -глюкозидазой:



Работа 55. Получение крахмала и растворимого крахмала

Ход работы I. Получение крахмала. Картофель освободить от кожицы, измельчить на терке и отделить крахмал отмучиванием. Отмученный крахмал отфильтровать и высушить. Рассмотреть под микроскопом форму зерен и сравнить с формой зерен пшеничного крахмала. Окрасить зерна крахмала под микроскопом, добавляя каплю раствора I в KI. Исследовать растворимость полученного крахмала в холодной и горячей воде и спирте.

В холодной воде крахмал не растворяется, а в горячей набухает.

II. Получение растворимого крахмала. Растворимый крахмал является первой ступенью деструкции крахмала (после него образуются молекулы с меньшей степенью полимеризации, чем исходный крахмал). Обыкновенный крахмал может быть превращен в растворимый крахмал (амидулин) при длительном действии разбавленных кислот на холоду, при длительном нагревании, если предварительно в течение короткого времени он был обработан кислотами, или же при нагревании с глицерином при 190° С.

0,5 г растворимого крахмала размешать в небольшом количестве воды, добавить до 100 мл горячей воды, перемешивая нагреть до полного растворения.

Для исследования свойств полученного раствора к нему по охлаждению добавить спирт, в другой пробе — твердый сернистый аммоний — до полного насыщения. Выпавший в обоих случаях крахмал отделить и снова растворить в воде.

Полученный раствор крахмала нагреть с реактивом Фелинга. Эта проба дает отрицательный результат, так как крахмал не обладает редуцирующим действием. Затем к 10 мл раствора крахмала добавить несколько капель 25%-ной серной кислоты и кипятить 10 мин. Полученную после гидролиза жидкость

разделить на две части. Одну часть нейтрализовать и нагреть с реактивом Фелинга, вторую — нейтрализовать осторожным добавлением щелочи и нагреть с реактивом Барфёда. Положительный результат и той и другой пробы показывает, что в результате гидролиза крахмала образуется моносахарид *D*-глюкоза.

Работа 56. Реакция крахмала с йодом

Для крахмала, гликогена и близких к ним декстринов является характерным синее, красновато-фиолетовое или буроватое окрашивание при добавлении к их растворам йода в растворе йодистого калия. Целлюлоза, инулин, лишенин, не дают окрашивания с йодом. Реакция эта основана на образовании нестойкого адсорбционного соединения с йодом. При этом синее окрашивание, которое характерно для крахмала и близких к нему амилодекстринов, обусловлено образованием адсорбционного соединения йода с амилозой, состав которого колеблется от $n I_2 + 10n (C_6H_{10}O_5)$ до $n I_2 + 20n (C_6H_{10}O_5)$. Благодаря непрочности этого соединения и коллоидным свойствам раствора, реакция крахмала с йодом чувствительна к присутствию спирта, к нагреванию и действию едких щелочей, с которыми йод образует гипойодиты.

Ход работы. К раствору крахмала добавить 2—3 капли раствора *I* в *KI*. Окрашенный в синий цвет раствор разделить на три части. К первой добавить 10%-ный раствор едкого натра, ко второй — алкоголь, третью нагреть до кипения. Во всех случаях окраска исчезает, причем в третьей пробе окраска вновь появляется при охлаждении.

Работа 57. Промежуточные ступени гидролиза крахмала

Следующими за растворимым крахмалом (амидулином) ступенями деструкции крахмала являются декстрины, причем они образуются в качестве промежуточных продуктов как кислотного, так и диастатического гидролиза крахмала. Различают четыре группы декстринов.

Амилодекстрины. Дают синее окрашивание с раствором *I* в *KI*. Осаждаются спиртом. $[\alpha]_D \cong +196^\circ$. По строению они ближе к крахмалу, чем другие декстрины. Восстановительная способность (с реактивом Фелинга) составляет 1% восстановительной способности мальтозы.

Эритродекстрины. Дают с раствором *I* в *KI* красное окрашивание. Осаждаются спиртом. $[\alpha]_D \cong +194^\circ$. Восстановительная способность составляет 2—3% восстановительной способности мальтозы.

Ахродекстрины. С раствором *I* в *KI* не дают окраски. Растворяются в 70%-ном спирте. $[\alpha]_D \cong +192^\circ$. Восстановительная спо-

способность составляет 10% восстановительной способности мальтозы.

Мальтодекстрины. С раствором I в KI не дают окраски. Не осаждаются спиртом. $[\alpha]_D \cong +183^\circ$. Восстановительная способность составляет 30—40% восстановительной способности мальтозы.

Дальнейшими продуктами гидролиза крахмала являются мальтоза и D-глюкоза, причем энзиматический гидролиз при действии амилаз протекает только до образования мальтозы.

Ход работы. I. Для кислотного гидролиза крахмала взять 10—20 пробирок, наполнить их до половины холодной водой и в каждую прибавить 1—2 капли раствора I в KI. Затем к 20 мл раствора крахмала прибавить 0,5 мл 20%-ной серной кислоты и гидролиз вести при кипении. В начале опыта, а затем через каждые две-три минуты брать 0,5 мл жидкости и переносить в приготовленные пробирки с водой. Произойдет постепенное изменение цвета от синего к красному, а затем окрашивания не будет вообще. Жидкость кипятить еще некоторое время и по охлаждению и нейтрализации убедиться в наличии в ней редуцирующего сахара (проба Фелинга).

II. Для ферментативного гидролиза крахмала взять вместо серной кислоты 1 мл профильтрованной и разведенной слюны. Поместить в термостат при 34—40° С и время от времени брать пробы жидкости. Получить, как и в предыдущем опыте, различные окраски с йодом. Исследовать жидкость в конце гидролиза на присутствие редуцирующего сахара (пробы Фелинга и Барфёда).

Работа 58. Гидролиз целлюлозы (клетчатка)

Кислотный гидролиз целлюлозы идет значительно труднее, чем гидролиз крахмала и гликогена. В присутствии разбавленных кислот такой гидролиз достаточно полно протекает только после длительного нагревания. Гидролиз идет значительно, если целлюлозу обработать предварительно 70—80%-ной серной кислотой, а затем нагревать с разбавленной кислотой.

Ход работы. С небольшим кусочком ваты (клетчатка) провести гидролиз при кипячении с 2—3%-ной серной кислотой 10 мин, нейтрализовать и нагревать с реактивом Фелинга. Проба дает отрицательный результат. Небольшой кусочек ваты вновь растворить, но уже в 80%-ной серной кислоте, разбавить водой и кипятить 5 мин. Нейтрализовать жидкость и нагреть с реактивами Фелинга и Барфёда. В обоих случаях проба теперь положительна, что говорит об образовании при гидролизе моносахарида (D-глюкоза).

Работа 59. Получение гликогена

Для получения гликогена из печени животного необходимо, по возможности, без промедления извлечь его из ткани, так как гликоген подвергается быстрому ферментативному расщеплению. Одним из наиболее простых способов получения из печени экстракта, содержащего гликоген, является извлечение его раствором трихлоруксусной кислоты, причем получающийся экстракт одновременно освобождается от растворимых белков.

Ход работы. Взвешенную печень только что убитого кролика растереть с равным объемом 10%-ной трихлоруксусной кислоты и чистым кварцевым песком. Затем добавить двойной объем 5%-ной трихлоруксусной кислоты, перемешать и отсосать жидкость. Остаток повторно растереть с равным объемом 5%-ной трихлоруксусной кислоты и отсосать жидкость. Полученные экстракты соединить и добавить спирт до концентрации 50%. Выпавший осадок отделить центрифугированием, два раза промыть 50%-ным спиртом. Полученный таким путем чистый гликоген высушить и взвесить. Так как при этом способе почти нет потерь гликогена, то полученный вес отнести к весу взятой печени и найти приблизительно содержание гликогена в процентах.

Часть полученного гликогена растворить в воде. Сделать реакцию с йодом и пробы на редуцирующую способность (пробы Барфёда и Фелинга). Затем нагреть раствор с очень разбавленной серной кислотой и после охлаждения и нейтрализации сделать те же пробы на присутствие редуцирующего сахара.

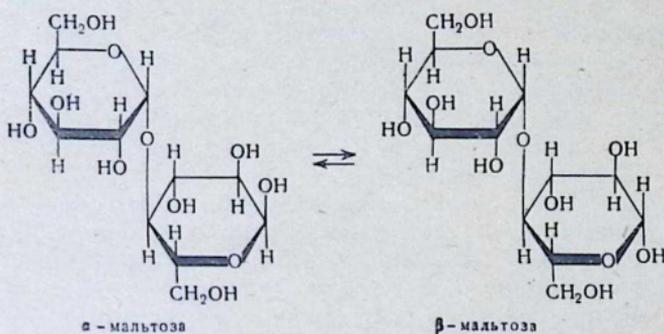
ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ УГЛЕВОДОВ

В желудочно-кишечном тракте животных такие полисахариды как крахмал, гликоген и различные олигосахариды, подвергаются энзиматическому гидролизу. Крахмал и гликоген гидролитически расщепляются при участии амилазы слюны и панкреатической амилазы. Дисахариды гидролизуются при действии гликозидаз: α -глюкозидазы, β -фруктофуранозидазы и β -галактозидазы панкреатического и кишечного соков. Таким образом, все эти углеводы испытывают полный энзиматический гидролиз до моносахаридов (*D*-глюкозы, *D*-фруктозы, *D*-галактозы), которые через стенку кишечника поступают в кровь воротной вены.

В желудочно-кишечном тракте жвачных животных нет ферментов, катализирующих гидролиз целлюлозы. Такие ферменты (целлюлазы) обнаружены у некоторых моллюсков, насекомых и ракообразных. Целлюлоза энергично расщепляется ферментами грибов и бактерий. Ферментами кишечной флоры животных целлюлоза разлагается до водорода, углекислоты (или метана) и жирных кислот (уксусной, масляной и др.). Поэтому у живот-

ных флора желудочно-кишечного тракта имеет для них исключительное значение.

При расщеплении крахмала и гликогена под действием амилаз в обычных условиях конечным продуктом распада всегда является равновесная смесь α - и β -мальтозы. В действительности же амилазы различного происхождения отличаются по своему действию на крахмал. Распад крахмала при действии солодовой амилазы (преимущественно α -амилазы) приводит к образованию β -мальтозы — $[\alpha]_D^{20^\circ} = +118^\circ$, а при расщеплении такадиастазом (*Aspergillus oryzae*) и панкреатической амилазой (преимущественно α -амилазы) образуется α -мальтоза — $[\alpha]_D^{20^\circ} = +160^\circ$. Образование обычной равновесной мальтозы является результатом мутаротации, которую в дальнейшем испытывают первоначально образующиеся α - или β -мальтоза (конечное $[\alpha]_D^{20^\circ} = +136^\circ$).



α - и β -Амилазы отличаются по своей устойчивости к нагреванию, различно относятся к активированию хлористым натрием и угнетению α - и β -мальтозой и аскорбиновой кислотой. Они отличаются и по характеру ускоряемого ими гидролиза; при действии α -амилазы происходит быстрое образование декстринов при сравнительно медленном накоплении мальтозы, а при действии β -амилазы происходит быстрое накопление мальтозы при сравнительно медленном исчезновении декстринов. Таким образом, α -амилаза соответствует декстриногенамилазе, действие которой связано преимущественно с образованием декстринов, а β -амилаза быстрее приводит к осахариванию (сахарогенамилаза). В соответствии с этими двумя сторонами гидролиза может быть определена активность амилолитического (декстринирующего) или осахаривающего действия амилаз.

Работа 60. Определение осахаривающего действия панкреатической амилазы

Ход работы. В колбу емкостью 50 мл налить 25 мл 1%-ного раствора крахмала (0,25 г крахмала), 10 мл фосфатного буфера с рН 6,8 (5,1 мл 0,2 М KH_2PO_4 и 4,9 мл 0,2 М $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) и 1,0 мл 0,2 М раствора хлористого натрия. Смесь помещают в термостат при 37°С и приблизительно через 4 мин прибавляют 1 мл экстракта, содержащего панкреатическую амилазу. Ровно через 10 мин после добавления фермента реакцию прекратить добавлением 2 мл 1,0 н. серной кислоты. Смесь количественно перенести в коническую колбу и определить образовавшуюся мальтозу с гипойодитом (см. работу 51). Для этого добавить 0,1 н. раствор йода, из расчета 0,6 мл раствора йода на каждый миллиграмм мальтозы и затем по каплям при хорошем взбалтывании прилить 0,1 н. раствор едкого натрия. Раствор щелочи взять в таком количестве, чтобы после нейтрализации прибавленной ранее кислоты и превращения однозамещенного фосфата в двузамещенный (на что требуется в общем около 30 мл 0,1 н. раствора едкого натра) щелочи было бы в 1,5 раза больше прибавленного раствора воды. После 10—20-минутного стояния смесь осторожно подкислить 25%-ной серной кислотой до едва заметной реакции на конго и выделившийся йод оттитровать 0,1 н. раствором тиосульфата.

Одновременно поставить контрольный опыт, смесь в термостат не помещать, но весь дальнейший опыт проводить совершенно аналогично описанному. Из объема раствора тиосульфата, использованного в контрольном опыте, вычесть объем, пошедший на основное титрование. Разность, выраженную в миллилитрах 0,1 н. раствора йода, пересчитать в миллиграммы мальтозы, имея в виду, что 1 мл такого раствора отвечает 17,11 мг мальтозы. Если эта разность, например составила 2 мл 0,1 н. раствора йода, то мальтозы образовалось в результате ферментативного гидролиза $16,11 \times 2 = 34,22$ мг или 0,0342 г. Отсюда вычислить константу скорости мономолекулярной реакции, служащую мерой ферментативного действия, по формуле

$$K = \frac{1}{t} \lg \frac{a}{a-x},$$

где t — время, x — количество образовавшейся мальтозы, a — начальная концентрация, равная действительному пределу осахаривания, или 75% исходной навески (0,25 г), т. е. 0,1875 г. Таким образом, для рассматриваемого случая:

$$K = \frac{1}{10} \lg \frac{0,1875}{0,1875 - 0,0342} = 0,00874,$$

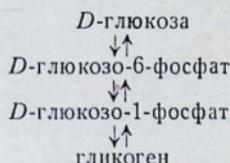
т. е. ферментативное действие равно 0,00874 «единицы амилазы».

Для данного метода следует брать такое количество фермента, чтобы константа реакции лежала в пределах 0,001—0,003; при этом за 10—30 мин расщепляется 10—30% крахмала.

ОБМЕН УГЛЕВОДОВ

Глюкоза, доставляемая кровью воротной вены в печень, превращается здесь в запасный углевод — гликоген, который и откладывается в клетках печени. В свою очередь, гликоген печени расщепляется до глюкозы, которая переходит в кровь сосудов большого круга кровообращения. Этой гликогенной функцией печени обеспечивается постоянное в норме содержание сахара в крови (60—90 мг% для крови и 70—110 мг% для плазмы) и лимфе.

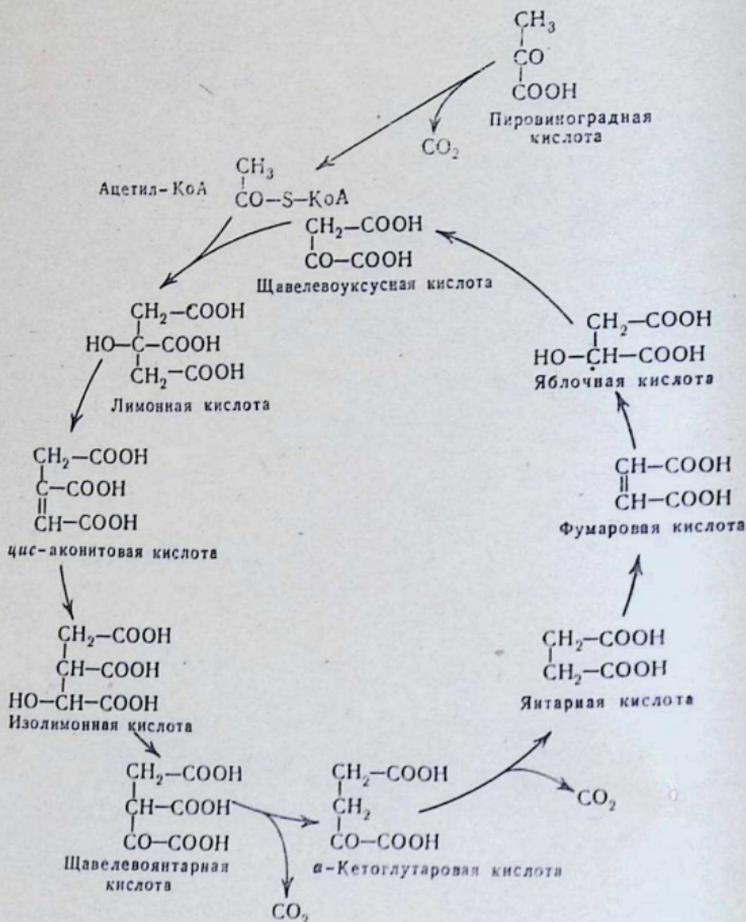
Образование гликогена из глюкозы и обратное превращение гликогена в глюкозу происходит в результате ферментативных процессов фосфорилирования и дефосфорилирования. При синтезе гликогена глюкоза фосфорилируется в 6-фосфорный эфир глюкозы, последний затем изомеризуется в 1-фосфорный эфир глюкозы, который далее, в реакции обратной фосфоролитической, превращается в гликоген. Те же реакции, протекающие в обратном направлении, ведут к образованию глюкозы из гликогена.



Содержание гликогена в печени не является постоянным и зависит прежде всего от состава пищи. В среднем содержание гликогена в печени человека около 6% от веса органа, а общее количество гликогена в печени в среднем 100—120 г. Так как ассимиляционная способность печени имеет известный предел, то при введении большого количества углеводов с пищей часть резорбированного сахара проникает через печень в кровь, вызывая тем самым пищевую (алиментарную) гипергликемию. Когда гипергликемия достигает 170 мг%, глюкоза появляется и в моче (глюкозурия). Подобные же явления наблюдаются (у человека) и при нарушении эндокринной функции панкреатической железы. При этом причиной гипергликемии является недостаточное образование и поступление в кровь гормона инсулина, стимулирующего окислительный распад углеводов в тканях и процесс гликогенообразования. Поэтому введение инсулина приводит к резкому снижению уровня сахара в крови (гипогликемии)¹.

¹ Л. Соболевым в 1902 г. было впервые указано на возможность получения активных препаратов инсулина из поджелудочной железы и на значение применения этих препаратов при лечении сахарного диабета.

Молочная кислота, образовавшаяся в результате гликогенолиза, в аэробных условиях исчезает вследствие того, что меньшая часть ее (около одной пятой) подвергается полному окислительному распаду до углекислоты и воды, а большая часть превращается в гликоген, вероятно, путем обращения



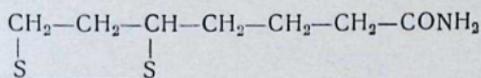
реакций гликогенолиза. Подобное обращение гликогенолиза требует энергии, которая черпается за счет энергии, освобождающейся в реакциях аэробного окисления молочной кислоты. Таким образом, анаэробная и аэробная фазы обмена углеводов в мышце должны быть теснейшим образом связаны между собой.

Окисление молочной кислоты в аэробных условиях начинается с дегидрогенизации, в результате чего молочная кислота превращается в пировиноградную кислоту, которая далее под-

вергается полному окислению до CO_2 и H_2O . Этот процесс окисления пировиноградной кислоты осуществляется ферментативной системой, прочно связанной со структурой клетки.

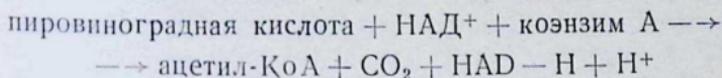
Аэробный путь распада пировиноградной кислоты включает цепь реакций, носящих название цикла Сент-Дьерди — Крепса, лимоннокислого цикла или цикла трикарбоновых кислот (см. стр. 104).

Начинается окисление с образования ацетилкофермента А (ацетил-КоА). В связи ацильного радикала ацетил-КоА содержится то количество энергии, которое освобождается при дегидрогенизации. Ацетил-КоА, конденсируясь с щавелевоуксусной кислотой, образует первый этап лимонно-кислого цикла. Дальнейшие реакции, связанные с переносом водорода с окисляющегося субстрата, осуществляются при помощи дегидрогеназ и ряда промежуточных ферментов — переносчиков, причем последним членом такой цепи у большинства организмов является система цитохромов и цитохромоксидазы, непосредственно окисляемая молекулярным кислородом. Для действия указанной системы ферментов нужны следующие коферменты: никотинамидадениндинуклеотид (НАД), тиаминпирофосфат (ТПФ), кофермент А (КоА) и амид липоевой кислоты



Кроме того, необходимо присутствие ионов магния или марганца (Mg^{2+} , Mn^{2+}).

Процесс окисления пировиноградной кислоты можно представить в виде следующего уравнения:



Указанный окислительный распад, равно как и упомянутый путь переноса водорода, не являются единственным, представляющим реакции аэробного обмена углеводов в живой клетке. Следует также иметь в виду, что реакция аэробного окисления входит в цепь реакций обмена не только углеводов, но и жиров и белков (см. стр. 198).

Реакции, во многом сходные с реакциями гликолиза, имеют место при спиртовом брожении углеводов. Спиртовое брожение представляет анаэробное превращение молекулы моносахарида в спирт и углекислый газ, которое протекает при действии комплекса ферментов дрожжевых клеток. Русскими учеными Л. А. Ивановым и А. Н. Лебедевым впервые было указано на важную роль фосфорных соединений в процессе спиртового брожения. Начальный этап брожения заключается в фосфорилиро-

вани молекулы моносахарида, причем *D*-глюкоза и *D*-фруктоза в присутствии АТФ и фермента гексокиназы превращаются в глюкозо-6-фосфат или фруктозо-6-фосфат. Дальнейший путь превращений этих фосфорных эфиров тот же, что и при гликолизе, вплоть до образования пировиноградной кислоты. Пировиноградная кислота декарбоксилируется при участии фермента дрожжевой клетки карбоксилазы, причем образуется ацетальдегид, который дальше гидрогенируется в этиловый спирт тем водородом, который отщепляется при ферментативной дегидрогенизации 1,3-дифосфо-*D*-глицеринового альдегида.

Работа 61. Открытие сахара в моче

При нарушениях углеводного обмена и при введении больших количеств сахара может наблюдаться повышение уровня сахара в крови выше нормы (гипергликемия). Если содержание сахара в крови превышает при этом 170 мг%, то сахар появляется в моче (глюкозурия). Обнаружить сахар в моче в этих случаях можно, пользуясь пробами на редуцирующий сахар. При этом следует, однако, иметь в виду, что такие составные части мочи, как мочева кислота, креатинин, уробилин и уробилиноген, индикан, парные глюкуроновые кислоты, пигменты и белок также дают реакции восстановления. Белок, если таковой присутствует, должен быть осажден или гидратом окиси цинка, или же кипячением мочи, подкисленной уксусной кислотой. Более специфичной на сахар пробой является проба брожением, так как в этом случае другие редуцирующие вещества мочи не мешают правильному открытию.

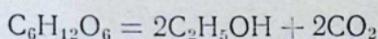
Ход работы. I. Проба с реактивом Фелинга. 1 мл реактива Фелинга развести тройным объемом воды, нагреть до кипения и добавить 5—10 капель исследуемой мочи. При наличии сахара раствор становится желтым или желто-красным от выпадающей закиси меди.

II. Проба с висмутовым реактивом. К 5 мл исследуемой мочи добавить 20 капель висмутового реактива (см. работу 45) и кипятить две-три минуты. При этом образуется белый осадок фосфатов, который, если присутствует сахар, приобретает желто-коричневую или черную окраску. Такую же окраску приобретает и жидкость.

III. Проба брожением. Проба брожением является наиболее достоверной и надежной для открытия сахара в моче. Однако, как глюкоза, так и фруктоза одинаково легко сбраживаются дрожжами и поэтому в случае необходимости решить, с каким из этих моносахаридов имеют дело, необходимо определить для мочи вращение плоскости поляризованного луча света, так как глюкоза обладает правым, а фруктоза — левым вращением. Моча должна быть прозрачной и иметь кислую или нейтраль-

ную, но не щелочную реакцию, в противном случае ее надо подкислить винной кислотой и предварительно нагреть для удаления угольной кислоты.

Предварительно проверить активность дрожжей и, кроме того, убедиться в том, что сами они не содержат сахара. Для этого небольшой кусочек прессованных дрожжей хорошо перемешать с 20—25 мл 1%-ного раствора *D*-глюкозы и заполнить полученной смесью вертикальную запаивную часть и нижнее колено бродильной трубки, изображенной на рис. 12. Затем такой же кусочек дрожжей смешать с предварительно прокипяченной и охлажденной дистиллированной водой и наполнить вторую бродильную трубку. Оба прибора поместить в термостат при 38° С. Если дрожжи активны, в первом приборе уже через 30—60 мин заметно скопление углекислого газа, образующегося в результате брожения глюкозы, что можно выразить суммарным уравнением:



Для того чтобы убедиться в том, что при брожении действительно образуются спирт и CO_2 , к жидкости в трубке прибавить 2—3 мл 20%-ного раствора едкого натра. При смешении наблюдается полное поглощение газа. Затем к щелочной жидкости добавить несколько капель раствора I в KI, при этом образуется йодоформ с характерным запахом по суммарному уравнению:

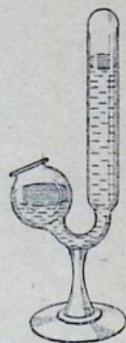
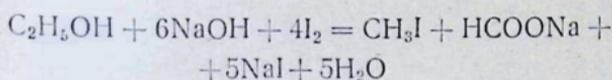


Рис. 12.
Бродильная
трубка

Если дрожжи не содержат сахара, то во второй трубке через 10—20 ч не наблюдается скопления газа.

Ход работы. Небольшой кусочек дрожжей хорошо смешать с 20—25 мл исследуемой мочи (предварительно прокипяченной), охлажденной и, если необходимо, то и подкисленной), заполнить бродильную трубку и поставить прибор в термостат при 38° С на 10—20 ч. При наличии сахара наблюдается скопление газа, по объему которого можно составить приблизительное суждение о содержании сахара в исследуемой моче.

Работа 62. Определение гликогена в печени

Для определения гликогена в печени кролика берут две навески. В одной определяют количество редуцирующих веществ (сахара), а в другой подвергают гликоген гидролизу, после чего

также определяют количество редуцирующих веществ. Разность между этими определениями дает количество глюкозы во взятой навеске, образовавшееся при гидролизе гликогена.

Ход работы. Взвесить 1 г печени только что убитого кролика и растереть тщательно с 10 мл воды. Смесь перенести в мерную колбу на 200 мл, сполоснуть водой и довести водой до метки. Взять 5 мл полученной жидкости и определить сахар. Другую такую же навеску печени растереть с 15 мл 2,5%-ной соляной кислоты. Смесь перенести в колбу на 50 мл с обратным воздушным холодильником и поставить на кипящую водяную баню на 1 ч. По охлаждении массу перенести в колбу на 200 мл, ополоснуть водой и довести водой до метки. Взять 2 мл полученной жидкости, нейтрализовать 1—2 каплями 10%-ного едкого натра и определить сахар так же, как в 0,1 мл крови.

Из числа миллиграммов глюкозы, определенных в 1 г печени после гидролиза, вычесть миллиграммы глюкозы, найденные в 1 г печени до гидролиза. Полученный результат дает содержание гликогена, выраженное в мг глюкозы. Для пересчета найденного результата в мг гликогена его умножают на 0,9, т. е. на отношение эквивалентных весов гликогена и глюкозы — $162 : 180 = 0,9$. Содержание гликогена в печени около 5—6%.

Работа 63. Определение гликогена в мышечной ткани по Журавской и Крылову

Ход работы. Во взвешенную центрифужную пробирку, содержащую от 4 до 9 мл 30%-ного раствора едкого кали, внести около 2—4 г измельченной мышечной ткани, после чего в горлышко пробирки вставить неплотно стеклянную пробку и пробирку погрузить в кипящую водяную баню. Щелочной гидролиз продолжать 30—45 мин. В течение этого времени пробирки встряхивать через 5—10 мин.

После окончания гидролиза к содержимому пробирки добавить при перемешивании палочкой 5—10 мл 90%-ного спирта и вновь поместить пробирку в водяную баню. Как только смесь начнет кипеть, нагревание прекратить и выпавший гликоген отделить после охлаждения центрифугированием. Если получится окрашенный осадок, его подвергнуть вторичному щелочному гидролизу, а затем осадить спиртом при нагревании. Полученный осадок гликогена промыть 10 мл 96%-ного спирта, а затем эфиром. Спирт и эфир удалить декантацией после центрифугирования, а остатки эфира — испарением в водяной бане.

К осадку гликогена добавить 5 мл горячей дистиллированной воды, после чего раствор нейтрализовать по лакмусу при перемешивании сначала 2—3 каплями концентрированной соляной кислоты, а затем 2,2%-ным раствором. После нейтрализации

в пробирку внести 20 мл 2,2%-ного раствора соляной кислоты, закрыть пробирку стеклянной пробкой и гидролизовать гликоген на кипящей водяной бане в течение трех часов.

По окончании кислотного гидролиза содержимое пробирки количественно перенести в мерную колбу на 50 мл, нейтрализовать по лакмусу едким кали и довести дистиллированной водой до метки. Затем раствор перемешать, отфильтровать и из фильтрата отобрать по 2—5 мл для определения редуцирующего сахара.

Отмеренный объем кислотного гидролизата внести в пробирку 200×20; объем жидкости в случае необходимости довести дистиллированной водой до 5 мл, после чего внести 5 мл реагента Сомоги.¹ Раствор перемешать, пробирки поместить в металлический штатив и погрузить на 20 мин в сильно кипящую водяную баню.

Одновременно поставить контрольный опыт, в котором к 5 мл дистиллированной воды добавить 5 мл реагента Сомоги¹. После нагревания пробирки охладить водопроводной водой и затем к содержимому пробирки добавить 1 мл 2,5%-ного раствора йодистого калия. Вслед за этим быстро, при энергичном встряхивании, внести 3 мл 1 н. раствора H₂SO₄. Выделившийся йод оттитровать в присутствии крахмала 0,005 н. раствором тиосульфата.

На основании полученных результатов по содержанию глюкозы вычислить количество гликогена в исследуемой ткани по следующей формуле:

$$x = \frac{0,927 \cdot 0,135 (a - b) \cdot 50 \cdot 100}{AB} \text{ мг\%,}$$

где 0,927 — коэффициент для пересчета глюкозы в гликоген; 0,135 — количество мг глюкозы, соответствующее 1 мл 0,005 н. раствора тиосульфата; (a—b) — разность в мл 0,005 н. раствора тиосульфата, израсходованного в контрольном и основном опытах; А — навеска мышечной ткани; В — количество мл раствора глюкозы, взятое для определения.

¹ 28 г двузамещенного фосфата натрия и 40 г сегнетовой соли растворяют приблизительно в 500 мл воды, затем добавляют 100 мл 1 н. раствора едкого натра; при перемешивании вливают 80 мл 10%-ного раствора сернистой меди (CuSO₄·5H₂O) и затем добавляют 180 г сернистого натрия (Na₂SO₃). После растворения сернистого натрия жидкость переносят в мерную колбу, куда добавляют 50 мл 0,1 н. раствора йодата и затем объем раствора доводят дистиллированной водой до 1 л. Указанное содержание йодата делает реагент пригодным для определения растворов, максимальная концентрация глюкозы в которых составляет 0,5 мг в 5 мл раствора. Спустя один-два дня после приготовления реагент профильтровывают и хранят в склянке темного стекла.

Работа 64. Определение молочной кислоты

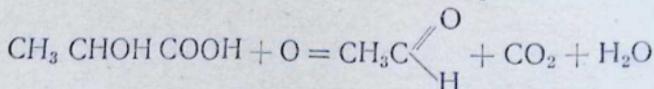
Для определения молочной кислоты в экстрактах тканей необходимо предварительно удалить белковые вещества и углеводы.

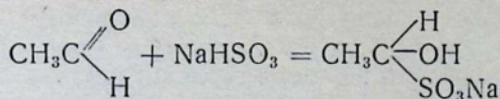
I. Колориметрический метод определения с параоксидифенилом. Метод основан на измерении интенсивности окраски соединения, образующегося в процессе реакции ацетальдегида, который возник за счет окисления молочной кислоты с параоксидифенилом.

Ход работы. Полученный в центрифужной пробирке несодержащий белки фильтрат в трихлоруксусной кислоте подвергнуть центрифугированию. До этого за полчаса к 2—3 мл фильтрата добавить 0,5 мл 20%-ного химически чистого раствора медного купороса, довести до 5 мл, добавить 0,5 г гидроокиси кальция (в порошке) и тщательно перемешать. В специально обработанные хромовой смесью, чистые и сухие пробирки отобрать 0,5 мл прозрачного центрифуга и поместить эти пробирки в ледяную воду. Внести одну каплю 4%-ного раствора медного купороса, после чего добавить (медленно при постоянном встряхивании) 3 мл концентрированной химически чистой серной кислоты. Затем пробирку поставить в кипящую водяную баню на 5 мин, после чего охладить в холодной воде до 20° С и добавить к содержимому пробирки 0,05 мл щелочного раствора параоксидифенила (1,5- %ный раствор в 0,5%-ном растворе химически чистой NaOH). Смесью осторожно перемешать специальной палочкой и поставить в водяную баню при 30° С на 30 мин. Спустя это время, пробирку погрузить на 90 сек в кипящую водяную баню, после чего охладить до комнатной температуры и проколориметрировать (см. стр. 26), сравнивая развивающуюся окраску с окраской стандартных пробирок, содержащих известное количество молочной кислоты и предварительно обработанных так же, как и опытные.

При помощи этого метода определяют молочную кислоту, когда ее содержится от 3-х до 15 мг в пробе. В случае больших количеств молочной кислоты определять ее затруднительно из-за слишком густой окраски. Развивающаяся окраска красивого фиолетового цвета нарастает пропорционально исходной концентрации молочной кислоты, так что в случае содержания молочной кислоты более 15 г, необходимо трихлоруксусный экстракт развести дистиллированной водой.

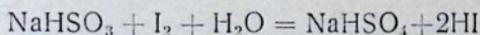
II. Бисульфитный метод. Принцип метода основан на том, что молочная кислота, окисленная в ацетальдегид, реагирует в виде этого соединения с бисульфитом натрия:





Окисление ведется перманганатом в растворе, содержащем сернокислый марганец, причем образуются промежуточные ступени окисления марганца и этим избегается возможность дальнейшего окисления ацетальдегида. Образовавшийся ацетальдегид отгоняется и поглощается раствором бисульфита натрия в виде бисульфитного соединения.

Избыток бисульфита окисляется йодом, после чего бисульфитное соединение, неустойчивое уже в слабощелочной среде, разлагается добавлением бикарбоната и выделившийся бисульфит, количество которого эквивалентно связанному ацетальдегиду, оттитровывается йодом:



Из вышеприведенных уравнений очевидно, что при этом определении два атома йода отвечают одному молю молочной кислоты, т. е. граммэквивалент йода соответствует 45 г молочной кислоты.

Ход работы. 3 мл крови смешать с 21 мл дистиллированной воды, при этом кровь полностью гемолизируется. К жидкости добавить 3 мл 5%-ного раствора метафосфата натрия и затем 3 мл 0,5 н. серной кислоты. Белки выпадут в осадок, который удалить фильтрованием. К 20 мл фильтрата (соответствует 2 мл исходной крови) добавить 2 мл 8%-ного раствора сернокислой меди и 4 мл взвеси гидрата окиси кальция (1 часть $\text{Ca}(\text{OH})_2$ и 4 части воды) или сухого порошкообразного $\text{Ca}(\text{OH})_2$, для того, чтобы осадить углеводы (жидкость после такого добавления должна быть окрашена в голубой, но не зеленоватый цвет, если этого нет, добавить еще $\text{Ca}(\text{OH})_2$ и довести объем жидкости до 30 мл). Смесь оставить стоять на час, время от времени встряхивая, после чего профильтровать или процентрифугировать.

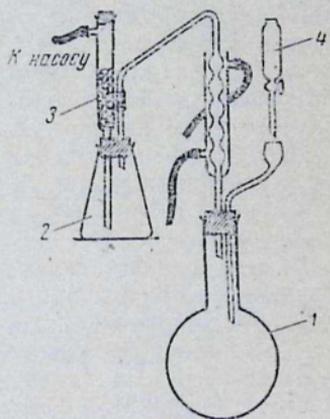


Рис. 13. Прибор для определения молочной кислоты:

1 — колба прибора, в которую помещают исследуемый раствор, 2 — приемник-поглотитель, 3 — колонка, 4 — делительная воронка

15 мл полученного фильтрата (соответствуют 1 мл исходной крови) перенести в колбу 1 прибора (рис. 13). Туда же добавить 10 мл кислого раствора сернокислого марганца (100 г $MnSO_4$ растворить в 500 мл воды, добавить 280 мл концентрированной серной кислоты и довести водой до 1000 мл), прибавить воды до объема 60—80 мл и вложить несколько капиллярных трубок для равномерного кипения. В приемник-поглотитель 2 поместить 5—10 мл 1%-ного раствора бисульфита и столько воды, чтобы при выдавливании жидкости в колонку 3, она заполнила ее нижнюю часть. Соединить все части прибора и пустить воду в холодильник. После этого пустить водоструйный насос и нагреть колбу 1 до кипения. Затем из делительной воронки 4 приливать по каплям 0,01 н. раствор перманганата до тех пор, пока не прекратится обесцвечивание перманганата. Кипячение и просасывание воздуха продолжать еще пять минут для полной дистилляции ацетальдегида из колбы 1.

Отъединить и спустить приемник 2, промыть колонку 3 дистиллированной водой и добавить к жидкости в приемнике несколько капель 1%-ного раствора крахмала в насыщенном растворе хлористого натрия. Затем из бюретки прибавить 0,1 н. раствор йода до полного окисления избыточного бисульфита и появления голубого окрашивания, которое затем довести до слабого голубого оттенка осторожным добавлением нескольких капель 0,01 н. раствора тиосульфата. После этого прибавить около 0,5 г сухого бикарбоната натрия и освободившийся бисульфит титровать 0,01 н. или 0,005 н. раствором йода до голубого окрашивания, устойчивого в течение 10 сек.

Для устранения возможной ошибки из-за нечистоты реактивов и содержания альдегидов в просасываемом воздухе, поставить контрольный опыт, результат титрования которого вычсть из основного опыта.

Если в результате определения на окисление бисульфита, полученного при разложении бисульфитного соединения, оказались израсходованными 0,4 мл 0,01 н. раствора йода, то количество молочной кислоты в 1 мл исследуемой крови $0,4 \times 0,45 = 0,18$ мг (содержание молочной кислоты в крови 18 мг%). Ошибка определения около 5%.

Глава V. ЛИПИДЫ

Основное свойство, характеризующее организмы, отличающее их от неорганизмов, заключается в постоянном деятельном обмене между их веществом и веществом окружающей среды. Организм постоянно воспринимает вещество, превращает его в себе подобное (усваивает, ассимилирует), вновь изменяет и выделяет. Жизнь простейшей клеточки, комка протоплазмы, существование организма складывается из двух превращений: принятия и накопления — выделения и траты вещества.

К. А. Тимирязев

К группе липидов относят многочисленные естественные соединения весьма разнообразного химического строения. Хотя в строении липидов и можно усмотреть ту общую особенность, что многие из них являются сложными эфирами многоатомных спиртов и жирных кислот или фосфорной кислоты, однако, в целом их химический характер слишком различен, чтобы можно было дать строгое структурно-химическое определение этой группе веществ.

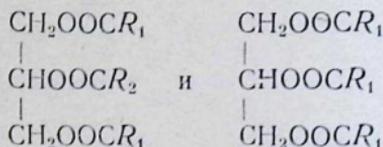
Поэтому для характеристики липидов особое значение имеет их растворимость. Все липиды, будучи нерастворимыми в воде, растворимы легко в эфире, петролейном эфире, бензоле, хлороформе, дихлорэтаноле, трихлорэтилене, четыреххлористом углероде, сероуглероде и некоторых других индифферентных органических растворителях. Кроме того, многие липиды растворимы в спирте и ацетоне. По своей растворимости липиды, таким образом, резко отличаются от углеводов и белков. Такая своеобразная растворимость липидов является свойством практически важным, поскольку она позволяет отделить их от других соединений, находящихся в составе различных тканей и органов.

Характерная и общая для всех липидов растворимость не исключает, однако, некоторых, довольно заметных, различий в растворимости у различных представителей этой группы веществ. Так, например, нейтральные жиры представляют собой вещества с резко гидрофобным характером, легко растворимы в эфире и значительно труднее в спирте, в то время как фосфатиды, хотя и нерастворимы в воде, но набухают в ней, образуя эмульсии, и легче растворимы в спирте, чем жиры.

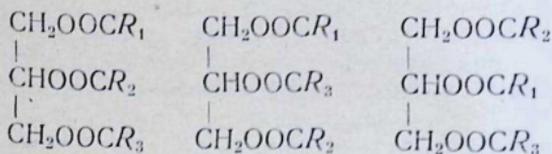
К липидам относятся следующие соединения: 1) жиры (триглицериды), 2) воска (цериды), 3) каротиноиды и родственные им углеводороды, 4) стероиды, 5) фосфатиды, 6) ацетальфосфатиды, 7) сфингомиэлины и 8) цереброзиды.

ЖИРЫ

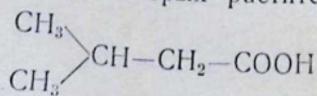
Естественные жиры представляют собой сложную смесь, состоящую из разнокислотных триглицеридов. Число различных триглицеридов, входящих в состав естественного жира, зависит как от числа жирных кислот, образующих триглицериды жира, так и от возможности различных изомерных структур. Триглицериды при двух различных жирных кислотах могут существовать в виде двух изомерных соединений:



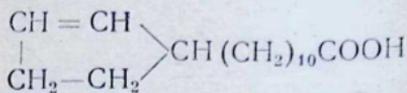
и при трех различных кислотах в виде трех изомерных соединений:



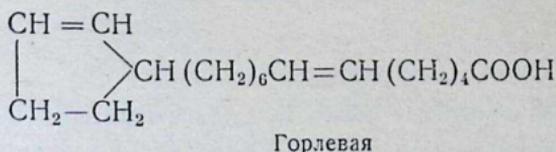
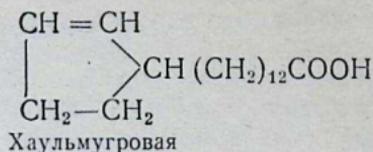
Число жирных кислот, входящих в состав естественных жиров, довольно значительно, причем среди них встречаются как низкомолекулярные, так и высокомолекулярные предельные и непредельные жирные кислоты. За исключением таких кислот как изовалериановая, найденная в жире дельфина, или таких как хаульмугровая, гиднокарповая и горлевая, входящих в состав некоторых растительных масел,



Изовалериановая



Гиднокарповая



все жирные кислоты естественных жиров имеют открытую цепь нормального строения, содержащую четное число углеродных атомов.

Эти же кислоты входят в состав и других липидов: стеридов, фосфатидов, цереброзидов.

Свойства жира зависят, прежде всего, от того, какие из жирных кислот входят в состав образующих его триглицеридов. Такой состав может быть как качественно, так и количественно очень различным. В табл. 2 (см. «приложение») приведены данные о составе жирных кислот некоторых жиров.

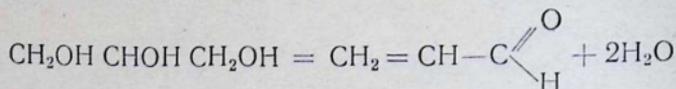
Кроме триглицеридов в состав жира, получаемого из тканей и органов путем экстрагирования жирорастворителями или каким-либо иным путем, входит ряд веществ липидного характера, составляющих так называемую фракцию неомыляемых веществ жира. В эту фракцию входят углеводороды, каротиноиды, стероиды, витамины, пигменты. Хотя количество этих веществ обычно не велико, однако присутствие их в жире сильно влияет на некоторые его свойства и пищевую ценность.

Таким образом, естественный жир представляет собой сложную смесь различных триглицеридов и веществ, составляющих фракцию неомыляемых, причем все эти отдельно взятые составные части естественного жира при большом разнообразии в строении не обладают тем резким различием в свойствах, которое открывало бы простой путь к их разделению. Поэтому при изучении как самого жира, так и изменений, с ним происходящих, химическому и физико-химическому исследованию подвергают обычно жир как целое.

Работа 65. Качественное исследование жира

Ход работы. I. Растворимость жира. Исследовать растворимость говяжьего сала и растительного масла при обычной температуре и при нагревании на водяной бане, в воде, спирте, эфире, петролейном эфире, дихлорэтане, хлороформе, бензоле и сероуглероде.

II. Проба на глицерин. Все жиры дают реакции, характерные для глицерина. Этим они отличаются от жирных кислот, которые схожи с ними во многих других свойствах. Простейшей реакцией на глицерин является акролеиновая проба, основанная на образовании акролеина при отнятии воды от глицерина;



Небольшой кусочек говяжьего сала смешать с кристаллическим кислым сернокислым калием или с борной кислотой, внести смесь в сухую пробирку и нагреть на пламени горелки. При этом наблюдается резкий своеобразный запах акролеина. В выделяющиеся из пробирки пары внести бумажку, смоченную аммиачным раствором азотнокислого серебра. Бумажка чернеет в результате восстановления акролеином серебряной соли.

III. Проба на ненасыщенные жирные кислоты. К 1 мл растительного масла и 1 мл воды в пробирке добавить 2 капли спиртового раствора йода. После непродолжительного встряхивания содержимое пробирки с раствором крахмала не дает синего окрашивания, т. е. не обнаруживает присутствия свободного йода.

К 1 мл растительного масла добавить несколько капель бромной воды, которая сразу обесцвечивается.

Работа 66. Щелочное омыление жира и получение жирных кислот

Ход работы. В небольшой фарфоровый стакан со стеклянной мешалкой поместить 3 г говяжьего сала и 100 мл воды. Добавить 10 мл 2 н. раствора едкого натра и при помешивании кипятить (слабое кипение!) около 3 ч. Время от времени доливать воду взамен испарившейся. По окончании омыления вылить содержимое стакана в 300 мл горячей воды (получится густой раствор). Выделить мыло добавлением к теплomu раствору поваренной соли (оставить на ночь). Отделившееся и застывшее мыло снять с жидкости, растворить при нагревании в воде и добавить к еще теплomu раствору 2 н. раствор серной кислоты до ясно кислой реакции на конго. Выделяющиеся жирные кислоты всплывают на поверхности и затвердевают по охлаждению. Их снять, расплавить для удаления остатков минеральной кислоты с небольшим количеством теплой воды и по охлаждению снова снять и высушить. С полученными жирными кислотами проделать следующие реакции:

1) исследовать растворимость жирных кислот в воде, спирте, эфире, петролейном эфире, хлороформе и бензоле; сравнить растворимость жирных кислот с растворимостью жира;

2) исследовать растворимость жирных кислот в 10%-ном растворе соды;

3) к спиртовому раствору жирных кислот добавить несколько капель 0,1 н. раствора едкого натра, окрашенного фенолфталеином;

4) акроленовая проба (проба на глицерин) с жирными кислотами отрицательна.

Работа 67. Определение температуры плавления жира

Температура плавления для химически индивидуальных веществ является совершенно определенной константой. Для естественных жиров, т. е. смесей различных триглицеридов, не наблюдается резкой температуры плавления и обычно отмечается начало плавления, когда жир начинает размягчаться, и конец плавления — момент перехода в прозрачную жидкость.

Ход работы. Конец тонкого стеклянного капилляра диаметром 1—2 мм наполнить говяжьим жиром, укрепить капилляр резиновым кольцом на термометре (конец капилляра с жиром у ртутного шарика термометра) и опустить нижний конец термометра в небольшой стакан с водой. Поднимать медленно температуру воды (приблизительно на 1° в одну минуту) и отметить начало и конец плавления жира.

Для химически индивидуальных веществ температуры плавления и застывания, как правило, совпадают. Этого не наблюдается у жиров и выделенных из них смесей жирных кислот. Для характеристики жиров часто пользуются величиной температуры застывания, а в некоторых случаях, когда жир не имеет определенно выраженной температуры застывания, определяют температуру застывания выделенной из него смеси жирных кислот, или так называемый «титр жира».

Работа 68. Определение кислотного числа жира

Кислотностью жира, или кислотным числом, называется число миллиграммов едкого калия, необходимое для нейтрализации свободных жирных кислот, содержащихся в 1 г жира.

Ход работы. Взвесить 5 г жира, растворить навеску в спирте, предварительно нейтрализованном по фенолфталеину, и титровать 0,1 н. раствором едкого калия до появления розового окрашивания. Отнеся пошедший при титровании объем 0,1 н. раствора едкого калия к 1 г жира и, переведя этот объем по известному титру в миллиграммы едкого калия, найти кислотное число.

Работа 69. Проба на появление кислотности в жире с нейтральной красной

Одним из признаков различных видов порчи тканевого жира является образование свободных жирных кислот. Благодаря этому по увеличению кислотности жира, который вначале совершенно нейтрален, можно судить о его прогрессирующей порче. Появляющаяся в жире кислотность можно определить количественно. Метод определения кислотности изложен в работе 68. Для быстрого открытия образующихся в жире (при порче) кислот может служить реакция с нейтральной красной — индикатором, меняющим свою окраску при изменении кислотности из зеленовато-желтой в красную.

Ход работы. 0,25—0,5 г исследуемого жира тщательно растереть небольшим шпателем на дне широкой фарфоровой чашки с 0,5—1,0 мл 0,01%-ного раствора нейтральной красной в водопроводной воде.

Излишек раствора красителя слить и наблюдать за окраской, которую принял жир. Совершенно свежий жир имеет при этом зеленовато-желтую окраску, жир с очень малой кислотностью — коричневатую-желтую окраску, жир испорченный с относительно высокой кислотностью имеет коричневую или красноватую окраску.

Работа 70. Определение числа омыления и эфирного числа жира

Числом омыления называется число миллиграммов едкого калия, необходимом для нейтрализации всех как свободных, так и входящих в состав триглицеридов, жирных кислот, содержащихся в 1 г жира.

Ход работы. I. Определение числа омыления. В колбу емкостью 250 мл, снабженную обратным холодильником, поместить навеску около 1—2 г жира. Добавить с помощью пипетки 30 мл 0,5 н. спиртового раствора едкого калия и нагреть на водяной бане при кипении около 50 мин. После этого омыление закончено. Охладить содержимое колбы, добавить несколько капель раствора фенолфталеина и титровать 0,5 н. раствором соляной кислоты до исчезновения красного окрашивания. Таким образом, оттитровывается избыток щелочи, не пошедшей на нейтрализацию жирных кислот.

Так как титр спиртового раствора едкого калия неустойчив, то он заранее не определяется. Общее количество едкого калия, взятого для определения числа омыления, находят путем титрования 30 мл 0,5 н. раствора едкого калия 0,5 н. раствором соляной кислоты по фенолфталеину. Определив это количество кислоты, можно, вычитая из него объем кислоты, пошедшей на

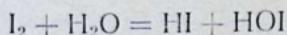
титрование избытка щелочи найти объем 0,5 н. раствора соляной кислоты, отвечающий тому количеству едкого калия, которое пошло на нейтрализацию жирных кислот. Отнести этот объем к 1 г жира и, выразив результат (по известному титру 0,5 н. соляной кислоты) в миллиграммах едкого калия, найти число омыления.

II. Определение эфирного числа. Эфирным числом называется число миллиграммов едкого калия, необходимое для нейтрализации жирных кислот, образующихся при омылении триглицеридов, содержащихся в 1 г жира. Очевидно, что это число может быть найдено, как разность между числом омыления данного жира и его кислотным числом.

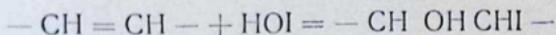
Работа 71. Определение йодного числа жира.

Йодное число является одной из количественных характеристик непредельности жира. Йодным числом называется число граммов йода, эквивалентное тому количеству галоида, которое присоединяется к 100 г жира, при обработке последнего галогенсодержащим раствором в условиях того или иного метода.

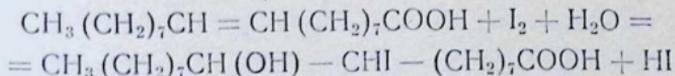
Сам йод не способен к количественному насыщению непредельных связей жира, и поэтому при практическом определении йодных чисел применяют реакции присоединения хлористого йода, бромистого йода или йодноватистой кислоты. Одним из простых и быстрых методов определения йодных чисел является метод, основанный на том, что йод с водой реагирует по уравнению:



В обычных условиях эта реакция почти не идет, но в присутствии веществ, поглощающих йодноватистую кислоту, как это имеет, например, место в случае непредельного жира, образование йодноватистой кислоты протекает количественно в пределах взаимодействия по схеме:



Таким образом, суммарное уравнение метода, написанное в целях простоты изображения для случая реакции с олеиновой кислотой, будет:



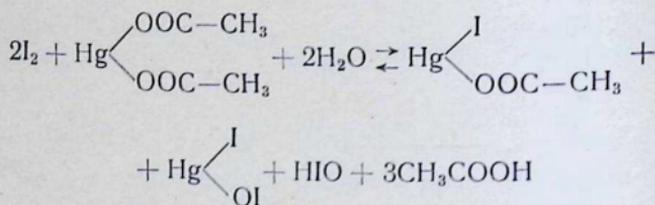
Избыток йода, обычно применяемый, оттитровывается раствором тиосульфата.

Ход работы. I. Определение спиртовым раствором йода. В коническую колбу емкостью 400 мл поместить навеску жира около 0,2—0,3 г и растворить в 20—30 мл спирта (если нужно, слабо нагреть на водяной бане). Затем в колбу прилить, точно отмерив 25 мл 0,2 н. спиртового раствора йода, смешать, прилить 200 мл воды и хорошо встряхнуть. После пятиминутного стояния титровать 0,1 н. раствором тиосульфата, вначале до слабо-желтой окраски, а затем добавить 1 мл раствора крахмала и титровать до исчезновения синей окраски. Объем раствора тиосульфата, пошедшего на титрование, отвечает избыточному йоду.

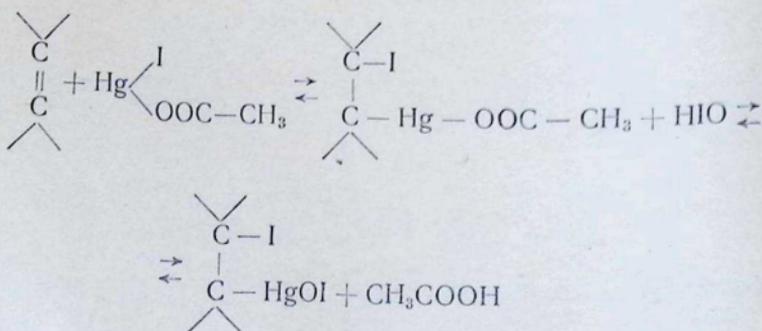
Затем 25 мл 0,2 н. спиртового раствора йода оттитровать 0,1 н. раствором тиосульфата и вычесть из полученного объема раствора тиосульфата объем, найденный ранее. По разности найти объем раствора тиосульфата, соответствующий связанному жиром йоду. Переведа этот объем по известному титру в граммы йода и отнеся результат к 100 г жира, найти йодное число.

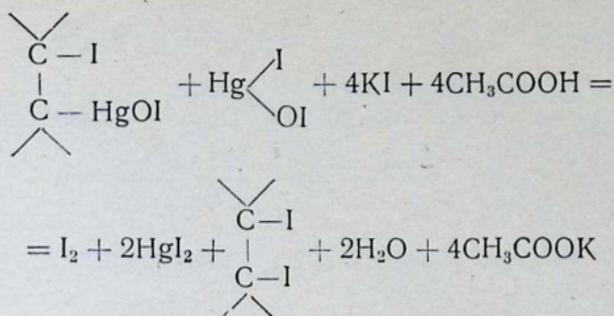
Кроме того, для определения йодного числа жира может быть применен метод, основанный на присоединении йода к ненасыщенным связям жирных кислот в присутствии ацетата ртути. В основе метода лежат следующие реакции:

1) реакция йода с ацетатом ртути:



2) взаимодействие реагента по месту ненасыщенной части молекулы:





II. Определение в присутствии ацетата ртути. 0,3—0,4 г жира поместить в коническую колбу с притертой пробкой и растворить в 10—15 мл чистого бензола. Добавить, точно отмеривая из бюретки, 25—35 мл раствора йода в бензоле (25 г йода в 1000 мл бензола). После смешивания в колбу внести 9 мл свежеприготовленного 10%-ного раствора ацетата ртути в 97—98%-ной уксусной кислоте. Смешать и оставить стоять 10 мин. После этого добавить 20 мл 20%-ного раствора йодистого калия, хорошо встряхнуть, разбавить 50—100 мл воды и титровать 0,1 н. раствором тиосульфата в присутствии крахмала до исчезновения голубой окраски.

Параллельно поставить контрольный опыт без жира. Разность между расходом 0,1 н. раствора тиосульфата в контрольном опыте и опыте с жиром отвечает количеству присоединенного к жиру йода. Если эта разность равна a мл 0,1 н. раствора тиосульфата, то искомое йодное число равно 1,2693, умноженному на a и деленному на взятую навеску жира.

Работа 72. Определение жира в мясе

Для определения содержания липидов обезвоженное тем или иным способом мясо подвергают экстракции петролейным эфиром, диэтиловым эфиром или смесью эфира и спирта. По потере веса после экстракции вычисляют содержание жира в мясе в процентах.

Для обезвоживания мяса навеску перетирают с прокаленным песком или стеклом и затем высушивают при температуре около 100—105°С или же смешивают навеску мяса с гипсом или двуводным фосфатом, которые обезвоживают ткань за счет образования кристаллогидратов.

Ход работы. Взять навеску около 2—3 г измельченного мяса в тарированный стаканчик, содержащий прокаленный до постоянного веса песок.

Стеклянной палочкой перетереть мясо с песком и поставить в сушильный шкаф. Высушивание вести до постоянного веса,

причем параллельно определить содержание воды во взятом мясе.

Сухой остаток после перетиранья палочкой количественно перенести в гильзу из бумаги, экстрагированной эфиром и высушенной до постоянного веса. Гильзу затем взвесить и поместить в экстрактор аппарата Сокслета для извлечения жира и экстрагировать эфиром или петролейным эфиром при легком кипении в течение 10—12 ч. Гильзу вынуть из экстрактора, высушить до постоянного веса и по разности (потере) веса найти содержание жира во взятой навеске мяса.

Эфир из экстрактора перенести в маленькую колбу и отогнать эфир. В остатке будет экстрагированный жир. С ним проделать качественную реакцию на обнаружение глицерина (см. работу 65).

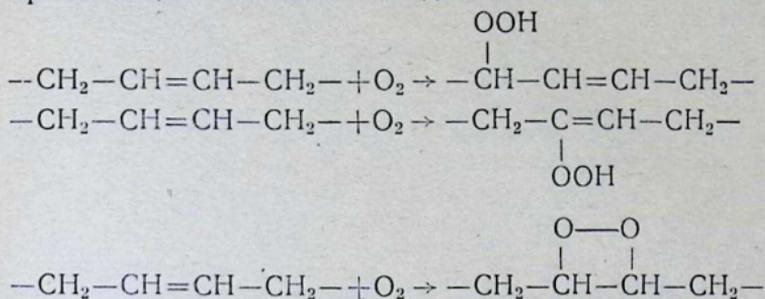
ИЗМЕНЕНИЯ ЖИРОВ ПРИ ОКИСЛЕНИИ

Хранение жира после выделения из тканей или органов приводит к сложным и разнообразным процессам порчи. При такой порче жиры теряют не только свои вкусовые качества, но и пищевую ценность. Наиболее распространенными типами порчи пищевых жиров являются: осаливание, окисание и альдегидно-кетонное прогоркание. Все типы порчи основаны на явлениях, связанных с автокаталитическим окислением. В практике такие виды порчи различают главным образом на основании органолептических признаков, но эти признаки позволяют определить продукты, образующиеся на более поздних стадиях окислительной порчи.

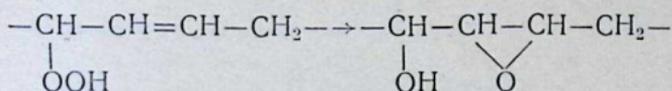
Окислительная порча — сложный процесс, включающий большое число последовательно и параллельно протекающих по цепному типу реакций. Работами авторов установлено, что на самой ранней стадии взаимодействия ненасыщенных соединений с кислородом (если исключено интенсивное влияние света), образуются непрочные соединения. Кислород от такого соединения может быть легко отделен под вакуумом.

Реакции, протекающие при окислительной порче, могут быть подразделены на две фазы. В первой фазе происходит взаимодействие окисляющегося вещества с кислородом воздуха и протекают реакции образования первичных продуктов окисления, которые хотя и не ухудшают органолептических свойств жира, однако, уже в этой начальной стадии автоокисления существенно изменяют состав окисляющегося материала и, следовательно, его пищевую ценность. В начале процесса окисления происходят реакции взаимодействия непредельных кислот жира с молекулярным кислородом при действии света с образованием перекисей. Перекиси в дальнейшем играют роль катализатора процес-

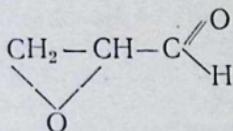
сов, протекающих в начальной стадии окисления:



Следующими за перекисями образуются эпокисоединения, которые получают путем изомеризации перекисей:



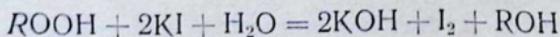
Эпигидриновый альдегид, находящийся в связанном состоянии в окисляющемся жире, также характерен для первой фазы окисления:



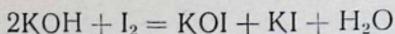
При дальнейшем течении окислительного процесса происходят вторичные реакции окислительного распада и окислительного уплотнения, в результате которых образуются вещества, достаточно резко изменяющие органолептические свойства. Из соединений, образующихся в результате окислительного распада жирных кислот и жиров, обнаружены: метилалкилкетоны, альдегиды (эпигидриновый, муравьиный, гептиловый, каприловый и др.), кислоты (муравьиная, уксусная, пропионовая, масляная, капроновая, каприловая и др.), и также возможно образование окиси-, эпокси- и дикетокислот.

Работа 73. Открытие перекисей в прогорклом жире

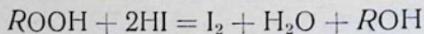
Реакция с йодистым калием и йодистоводородной кислотой. При встряхивании жира, содержащего перекиси, с раствором йодистого калия выделяется йод:



Так как при этом одновременно образуется КОН, то йод реагирует с ним



и реакция выделения йода делается малочувствительной. Поэтому эту реакцию ведут в кислой среде, где с перекисями реагирует йодистоводородная кислота:



Реакция при этом очень чувствительна, но необходимы контрольные опыты для устранения ошибки, могущей быть из-за возможного выделения йода вследствие окисления йодистоводородной кислоты кислородом воздуха:



Прогорклый жир растворяют в хлороформе или дихлорэтане и встряхивают полученный раствор с двойным объемом 10%-ного раствора йодистого калия, подкисленного уксусной кислотой, с добавкой 2—3 капель раствора крахмала. Появляется синее окрашивание от выделяющегося йода. Эту же реакцию повторяют без добавления уксусной кислоты, с нерастворенным жидким жиром и ставят опыт без жира.

Работа 74. Определение перекисей в присутствии третичного амина по Дроздову и Стариковой

Ход работы. В колбу с притертой пробкой внести 2 мл 60%-ного раствора серной кислоты (или 5 мл 26%-ного раствора соляной кислоты) и 1 мл диметиланилина. Смесь охладить и добавить в раствор 1 г жира в 5 мл хлороформа (дихлорэтана) и 1 мл насыщенного раствора йодистого калия. Смесь встряхивать в течение 1 мин и оставить стоять 4 мин. После этого добавить 50 мл воды и избыток 0,01 н. раствора гипосульфита. После встряхивания избыток гипосульфита оттитровать йодом в присутствии крахмала. Параллельно поставить контрольный опыт и его результат вычесть из результата основного опыта.

Работа 75. Определение кислорода эпокси групп (оксирановый кислород) по Дроздову и Матеранской

Ход работы. Для определения кислорода эпокси групп навеску 0,4—0,8 г окисленного жира поместить в коническую колбу емкостью 250 мл с притертой пробкой. Навеску растворить в 5 мл абсолютного эфира и к полученному раствору добавить 25 мл 0,2 н. хлористого водорода в абсолютном эфире. Колбу закрыть притертой пробкой и оставить на 3 ч. После трехчасового стояния добавить 50 мл нейтрального 96%-ного спирта, 1 мл раство-

ра фенолфталеина и титровать избыток хлористого водорода 0,1 н. раствором едкого натра.

Так как титр эфирного раствора хлористого водорода не является устойчивым, то параллельно поставить контрольный опыт, который вести с теми же 15 мл 0,2 н. раствора хлористого водорода, но без навески исследуемого вещества.

Кроме того, необходимо определить кислотность самого исследуемого вещества, так как эта кислотность должна учитываться при дальнейшем вычислении. Для определения кислотности взять такую же навеску исследуемого вещества, как и в основном опыте, растворить в конической колбе в 75 мл нейтрального спирта и титровать в присутствии фенолфталеина 0,1 н. раствором едкого натрия.

Результат определения может быть выражен или в процентах оксианового кислорода (1), или миллиграммами кислорода эпоксигрупп на 1 г исследуемого вещества (2). В первом случае вычисление ведется по формуле:

$$\text{оксиановый кислород, \%} = \frac{B - (A - C) \times 0,1 \times 0,016 \times 100}{\text{навеска, г}}, \quad (1)$$

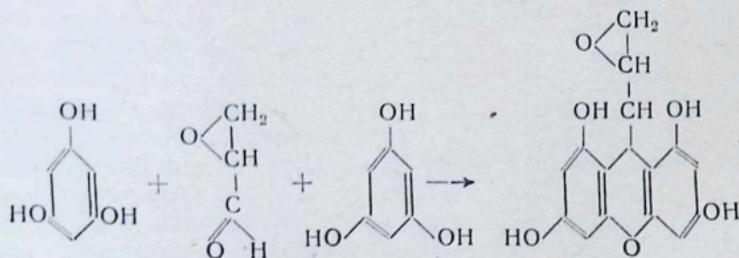
где A — мл 0,1 н. едкого натра, пошедшего на титрование опыта с навеской, B — мл 0,1 н. раствора едкого натра, пошедшие на титрование контрольного опыта и C — мл 0,1 н. раствора едкого натра, истраченные на титрование при определении кислотности исследуемого вещества.

Во втором случае пользуются аналогичной формулой:

$$\text{оксиановый кислород, \%} = \frac{B - (A - C) \times 0,1 \times 0,016 \times 1000}{\text{навеска, г}} \text{ мг О на 1 г} \quad (2)$$

Работа 76. Открытие эпигидринового альдегида

Летучий эпигидриновый альдегид, образующийся при прогоркании жира, находится в нем в связанном состоянии, по-видимому, в виде ацетала. При действии концентрированной соляной кислоты он освобождается и конденсируется с добавленным к жиру флороглюцином с образованием красноокрашенного вещества:



Вместо флороглюцина могут быть применены также резорцин, дающий красный продукт конденсации, или пирогаллол, дающий зеленое окрашивание.

Ход работы. 2—3 г прогорклого жира расплавить в пробирке и встряхнуть с равным объемом концентрированной соляной кислоты (уд. вес 1,19). По охлаждении добавить 2 мл 1%-ного эфирного раствора флороглюцина или резорцина и снова хорошо встряхнуть. При этом солянокислый слой окрашивается в розовый или красный цвет.

Работа 77. Количественное колориметрическое определение эпигидринового альдегида по Дроздову и Матеранской

Образование окрашенного соединения эпигидринового альдегида с флороглюцином может быть использовано для количественного колориметрического определения этого альдегида. Солянокислый слой, окрашенный в розовый или красный цвет, сравнивается с окраской стандартных растворов в колориметре.

Приготовление шкалы окрасок достигается соответствующим разведением основного 0,1%-ного водного раствора кислого фуксина дистиллированной водой, на 1000 мл которой прибавлено 0,5 мл 20%-ной серной кислоты.

Окраска полученных растворов достаточно устойчива, если их хранят в запаянных или хорошо закрытых пробками пробирках. При защите от действия прямого или очень интенсивного диффузного солнечного света интенсивность окраски практически не меняется в течение четырех месяцев.

Таблица 7

Количество эпигидринового альдегида в шкале окрасок		
№ пробирок	Фуксин, мл	Эпигидриновый альдегид, мкг/мл
1	0,05	0,015
2	0,1	0,090
3	0,2	0,240
4	0,3	0,390
5	0,4	0,540
6	0,5	0,690
7	0,6	0,840
8	0,7	0,990
9	0,8	1,140
10	0,9	1,240

В табл. 7 показано, сколько миллилитров 0,1%-ного раствора фуксина надо взять и потом довести водой до 50 мл, чтобы получить стандартный раствор.

Ход работы. Для колориметрического определения эпигидринового альдегида 1,0 г исследуемого жира или жирной кислоты поместить в градуированную пробирку (одинакового размера со стандартными пробирками) из неокрашенного стекла с притертой пробкой. Навеску растворить в 2 мл эфира. Затем добавить 1 мл 37%-ной химически чистой соляной кислоты, встрях-

нуть смесь, добавить 2 мл 0,1%-ного раствора флороглюцина в эфире, снова встряхнуть и поместить в кипящую водяную баню на 1 мин (открыв пробирку). Вынув пробирку из бани, через 1 мин сравнить окраску нижнего окрашенного водного слоя с окрасками стандартных растворов, пользуясь компаратором, или при помощи колориметра. Затем измерить объем окрашенного слоя и по найденной величине для концентрации эпигидринового альдегида, а также по объему окрашенной жидкости вычислить содержание эпигидринового альдегида во взятой навеске или в 100 г исследуемого жира.

Работа 78. Открытие альдегидов в прогорклом жире

Альдегиды отгоняются и открываются в дистиллате с помощью реакции с фуксинсернистой кислотой. Последняя готовится растворением 5 г фуксина в 100 мл воды и этот раствор смешивается с раствором 12 г кристаллического сульфата натрия в небольшом объеме воды и затем с 100 мл 1,0 н. соляной кислоты. Объем доводят до 1000 мл и оставляют на сутки, после чего реактив готов к употреблению.

Ход работы. Для открытия альдегидов 5 г прогорклого жира смешать в колбе емкостью 50 мл с 20 мл насыщенного раствора хлористого натрия, добавить небольшой кусочек пемзы и отогнать с прямым холодильником 10 мл жидкости. К дистилляту добавить 2 мл раствора фуксинсернистой кислоты, при этом образуется красноватое окрашивание. При добавлении 2 мл хлороформа и встряхивании нижние альдегиды, до валерианового, переходят в водный слой, а высшие, начиная с капронового, — в слой хлороформа.

Работа 79. Липоксигеназа

Образование перекисей в жире происходит не только под воздействием кислорода воздуха и света, но может быть и результатом ферментативной реакции, катализируемой липоксигеназой. Липоксигеназа — фермент, находящийся в некоторых растительных и животных тканях, обладает максимальной активностью при pH—7—9 и температуре 20—30° С.

Липоксигеназа в присутствии кислорода воздуха ускоряет процесс образования сопряженных гидроперекисей, линолевой и линоленовой кислот или триглицеридов, содержащих эти кислоты. Если при этом присутствует каротин, то он быстро обесцвечивается, окисляясь кислородом при участии перекисей. Эта индуцированная реакция окисления каротина, наблюдаемая по обесцвечиванию его раствора, может служить индикатором действия липоксигеназы.

Ход работы. Для получения экстракта, содержащего липоксигеназу, 10 г обезжиренной муки бобов сои хорошо встряхнуть

с 100 мл воды, отцентрифугировать и отделить прозрачный экстракт.

В две конические колбы на 250 мл поместить по 5 мл раствора каротина (80 мг каротина в 200 мл ацетона + 400 мл спирта). Затем в первую добавить 2—3 капли свежего хлопкового или льняного масла или ненасыщенной жирной кислоты. Добавить в обе колбы по 100 мл воды и по 2 мл фосфатного буфера (60 мл 0,5 М NaHPO_2 + 40 мл 0,5 М KH_2PO_4) и затем по 5 мл водного экстракта, содержащего липоксигеназу. Смешать содержимое колб. При этом желтая окраска каротина в первой колбе начинает быстро исчезать в то время как во второй колбе обесцвечивание происходит лишь очень медленно (около 20 ч).

Работа 80. Определение активности липоксигеназы

Для количественной оценки действия липоксигеназы определяют образующиеся в результате ферментативной реакции перекиси ненасыщенных жирных кислот. Опыт ведут при оптимальной для действия липоксигеназы температуре 30°С.

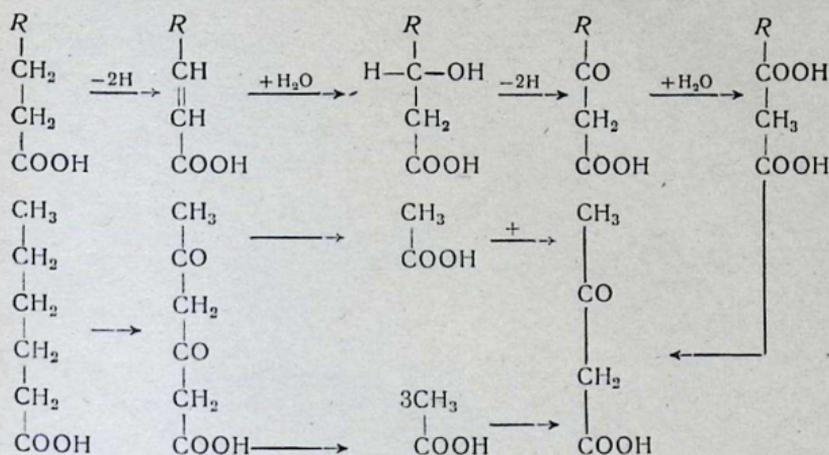
Ход работы. В колбу с хорошей мешалкой, помещенную в термостат при 30°С, внести 20 мл водного экстракта соевой муки, 40 мл воды и 100 г свежего, не содержащего перекисей, хлопкового или льняного масла и хорошо перемешать в течение 10 (или 20) мин. К полученной эмульсии добавить для лучшего ее разделения, хлористого натрия и центрифугировать. Отобрать прозрачное масло и определить в нем содержание перекисей (см. работу 73). Параллельно поставить контрольный опыт, который вести так же, но без добавления раствора фермента. Результаты выразить числом мл 0,01 н. раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ на 100 г масла.

ОБМЕН ЖИРОВ

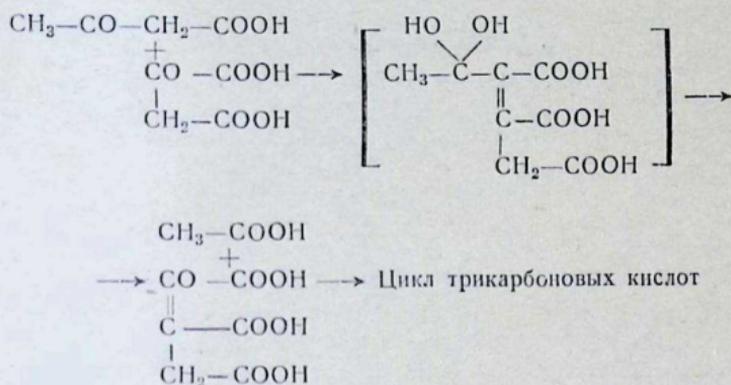
Биологическая роль жиров в организме разнообразна. Так, они могут быть использованы как энергетический материал и отложены в запас. Такое значение жиров особенно велико у гомойотермных животных, у которых компенсация тепловых потерь идет за счет постоянного выделения энергии, источником которой являются преимущественно реакции катаболической фазы обмена жиров.

Катаболическая фаза обмена жиров включает реакции окислительного распада фосфорного эфира глицерина и жирных кислот, образующихся при ферментативном расщеплении тканевого жира. Фосфорный эфир глицерина окисляется через диоксиацетонфосфат, фосфоглицериновый альдегид и пировиноградную кислоту до конечных продуктов обмена, т. е. до CO_2 и H_2O . Жирные кислоты в печени подвергаются β -окислению

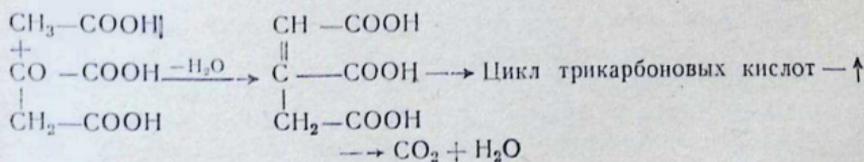
с образованием β-кетокислот или поликетокислот путем активирования их соединением с коэнзимом А (КоА). Конечным продуктом β-окисления является ацетил-КоА.



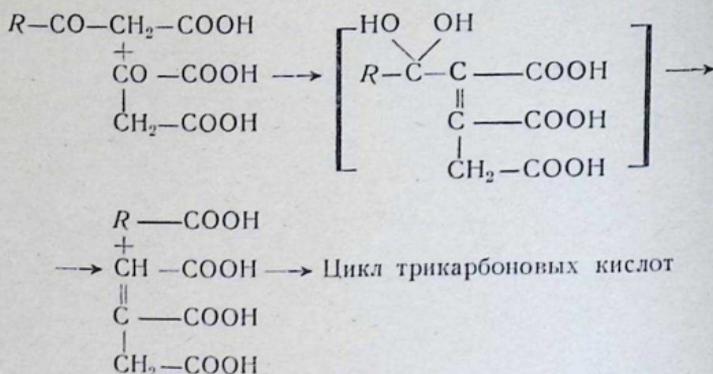
Дальнейшее окисление протекает в цепи реакций, составляющих цикл трикарбоновых кислот:



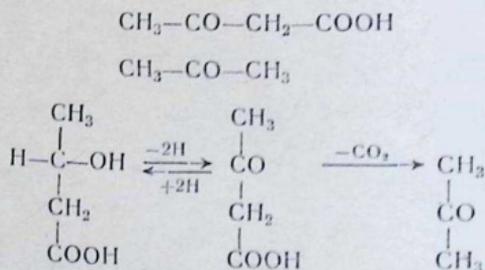
Подобную же конденсацию с щавелевоуксусной кислотой испытывает и уксусная кислота (ацетил-КоА):



В мышцах β -окисление заканчивается на образовании кето-кислот, которые затем, подобно ацетоуксусной, конденсируются с щавелевоуксусной кислотой:



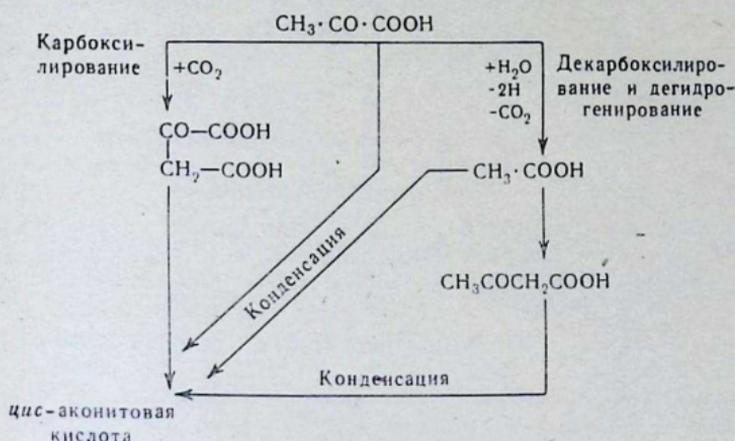
Таким образом, реакции цикл трикарбоновых кислот являются промежуточными реакциями обмена как углеводов, так и жиров. Поэтому нарушения в течении реакций аэробной фазы обмена углеводов являются в то же время и нарушениями окислительного распада жиров. При недостатке углеводов в организме (углеводном голодании) и особенно при сахарном диабете, когда окислительный распад углеводов в организме нарушен, происходит накопление в крови избыточного количества ацетоуксусной кислоты, окисление которой в таких случаях замедлено. Это приводит, с одной стороны, к ацидозу, а с другой — к выделению ацетоуксусной кислоты с мочой. Кроме ацетоуксусной кислоты в случае нарушения обмена с мочой выделяются всегда β -оксималяновая кислота и ацетон:



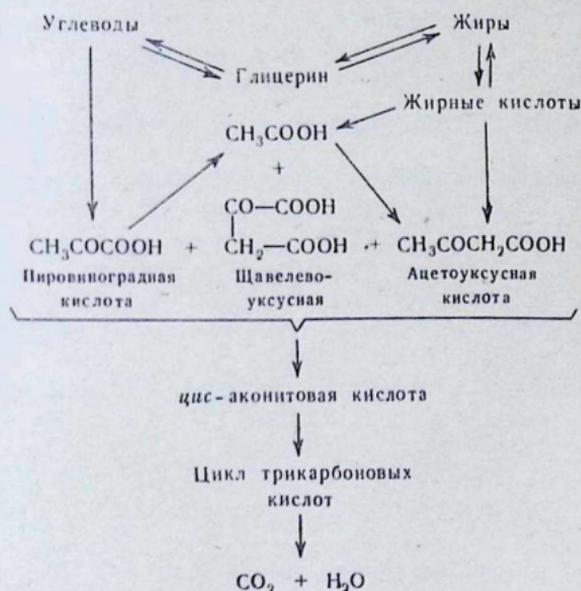
Эти три продукта неполного окисления носят название «ацетоновых тел», а само явление носит название ацетонурии.

Хотя ацетоуксусная кислота может возникать частично и при обмене углеводов за счет конденсации двух молекул уксусной кислоты, образующейся при дегидрогенировании или декарбоксилировании пировиноградной кислоты, однако, такая ацетоуксусная кислота полностью окисляется и не вызывает ацетонурии.

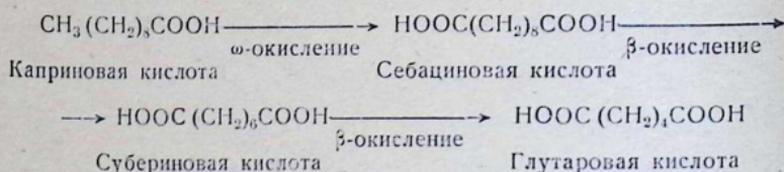
Полное окисление ацетоуксусной кислоты в данном случае обеспечивается образованием одновременно достаточного количества щавелевоуксусной кислоты:



Поэтому повысить интенсивность окисления ацетоуксусной кислоты и уменьшить ацетонию можно введением в организм животных углеводов (антикетогенное действие углеводов); наоборот, устранение углеводов из пищи усиливает ацетонию. Схематически взаимная связь реакции обмена углеводов и жиров может быть изображена следующим образом:



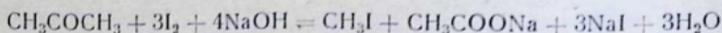
β -Окисление представляет собой главный, но не единственный, путь окислительного распада жирных кислот в организме. Так, например, жирные кислоты со средней длиной цепи атомов углерода от C_8 до C_{10} частично (около 10%) испытывают в организме ω -окисление с образованием дикарбоновых кислот, которые далее подвергаются β -окислению, как это видно из следующего примера:



Работа 81. Открытие ацетоновых тел в моче

Для открытия ацетона употребляют или непосредственно мочу, или дистиллят, получаемый при перегонке с водяным паром 100 мл нейтрализованной мочи. Употребление дистиллята имеет то преимущество, что пробы на ацетон свободны от многих (но не от всех) помех, вызываемых другими веществами, находящимися в моче. При дистилляции ацетоуксусная кислота декарбоксилируется и в дистиллят переходит как преформированный ацетон мочи, так и ацетон, образующийся из ацетоуксусной кислоты.

Ход работы. I. Проба на образование йодоформа. Проба основана на образовании йодоформа при действии щелочного раствора йода на ацетон. Образование йодоформа протекает по следующему суммарному уравнению:



Эта проба не является специфичной для ацетона, так как ее дают также этиловый спирт и ацетальдегид.

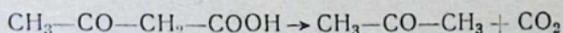
К 5 мл мочи, или дистиллята мочи, прибавить 1 мл 10%-ного раствора едкого натра и затем раствор I в KI до получения слабо-желтой окраски. Жидкость мутнеет, выделяется светложелтый кристаллический осадок (или муть), обладающий характерным запахом йодоформа.

II. Проба на ацетоуксусную кислоту. Ацетоуксусная кислота с хлорным железом дает красный оттенок. Очень похожие окраски дают родановая, муравьиная и уксусная кислоты и некоторые фенолы. Характерным для ацетоуксусной кислоты является то, что окраска исчезает при нагревании или продолжительном стоянии.

К 10 мл мочи прибавить по каплям 5—10%-ный раствор хлорного железа до прекращения выпадения осадка фосфата

железа (FePO_4). Осадок отфильтровать, и к фильтру добавить еще несколько капель раствора хлористого железа. В присутствии ацетоуксусной кислоты раствор хлорного железа становится красным, окраска исчезает при кипячении раствора.

Для открытия ацетоуксусной кислоты необходимо употреблять свежую мочу, так как ацетоуксусная кислота довольно быстро исчезает, превращаясь в ацетон и угольную кислоту:



Еще быстрее этот процесс происходит при нагревании, поэтому прокипяченная моча не дает реакций на ацетоуксусную кислоту.

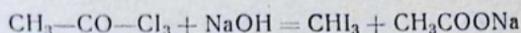
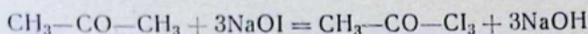
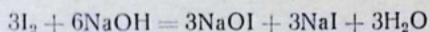
III. Открытие β -оксимасяной кислоты основано на том, что после удаления из мочи ацетона и ацетоуксусной кислоты β -оксимасяная кислота окисляется и образовавшийся ацетон обнаруживается цветной реакцией.

15—25 мл мочи разбавить вдвое водой, подкислить уксусной кислотой и испарить на водяной бане до объема 10 мл. Жидкость разделить на две части. К первой добавить 1 мл 3%-ной перекиси водорода, осторожно нагреть и охладить. Затем сделать реакцию с нитропруссидом натрия в обеих пробах. В случае наличия в моче β -оксимасяной кислоты реакция значительно интенсивнее в первой пробе, где образовался ацетон при окислении β -оксимасяной кислоты.

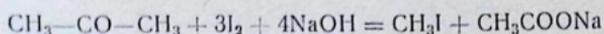
β -Оксимасяная кислота появляется в моче всегда в сопровождении ацетоуксусной кислоты. Присутствие ее в моче вероятно, если моча, освобожденная от сахара или не содержащая сахара имеет левое вращение. Удельное вращение β -оксимасяной кислоты $[\alpha]_D^{20} = 24,12^\circ$.

Работа 82. Количественное определение ацетона в моче

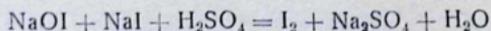
Ацетон отгоняется из мочи с током воздуха и поглощается в избытке щелочного раствора йода. При этом образуется йодоформ:



или суммарно:



По окончании поглощения ацетона жидкость подкисляется и выделившийся избыточный йод



оттитровывается тиосульфатом. Таким образом, определяется количество йода, израсходованное на реакцию с ацетоном. Как явствует из приведенных уравнений, один *г/экв* йода отвечает одной шестой *г/моля* ацетона и, следовательно, 1 *мл* 0,1 н. раствора йода отвечает 0,9666 *мг* ацетона.

В цилиндр 1 прибора (рис. 14) внести 20 *мл* мочи, 0,2 *г* щавелевой кислоты, 10 *г* хлористого натрия и несколько капель парафинового масла или керосина для уменьшения вспенивания. Затем в цилиндр 2 внести 20 *мл* 0,1 н. раствора йода, 20 *мл* 20%-ного раствора едкого натра и 60 *мл* воды. Цилиндры соеди-

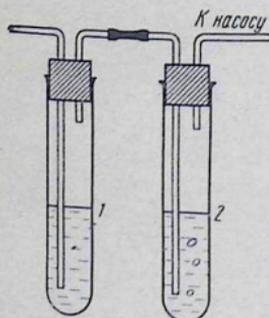
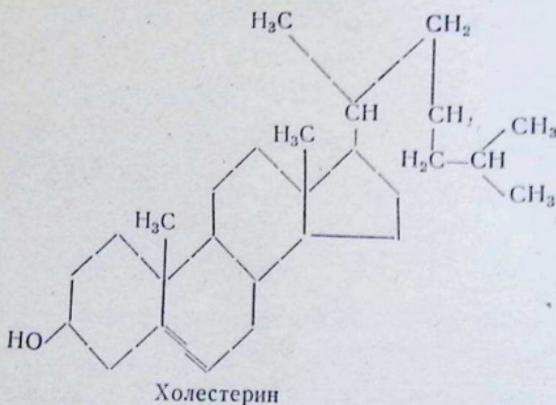


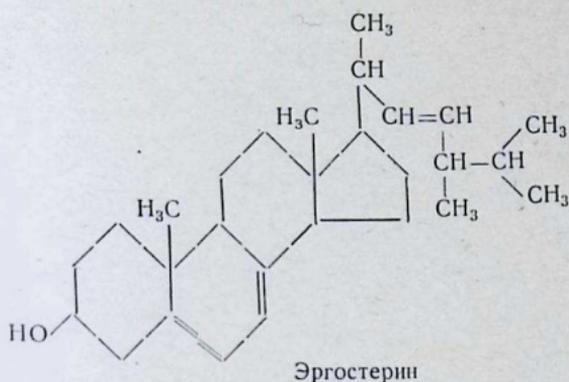
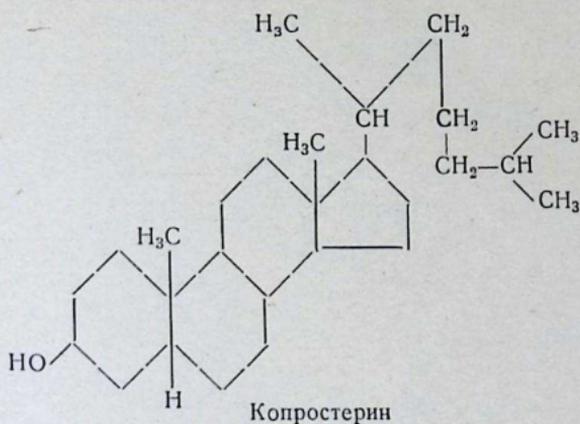
Рис. 14. Прибор для определения ацетона:
1—2 — цилиндры

нить и прососать воздух с помощью водоструйного насоса в течение 30 *мин.* После этого прибор разобрать и содержимое цилиндра 2 подкислить 20%-ной серной кислотой до заметной реакции на конго. Выделившийся йод оттитровать тиосульфатом в присутствии крахмала. Определить количество связанного йода и вычислить содержание ацетона в *мг* в 100 *мл* исследуемой мочи (в *мг%*) и в суточном объеме мочи.

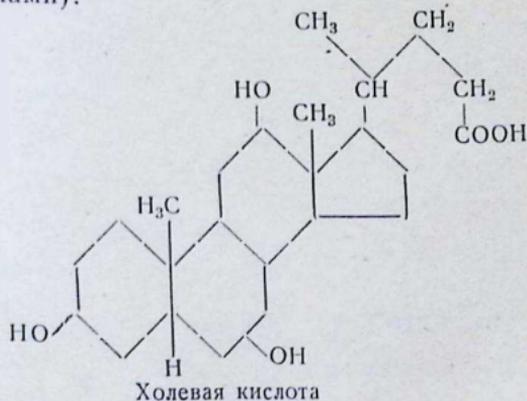
СТЕРОИДЫ

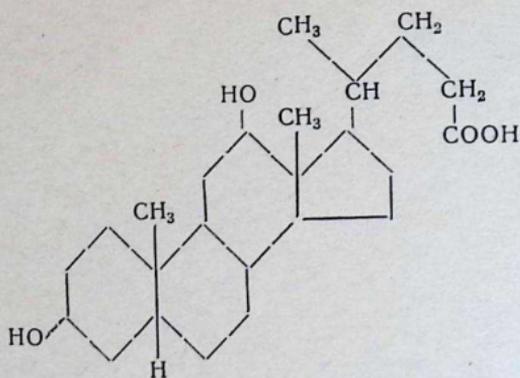
Группу стероидов образуют многочисленные биогенные соединения, являющиеся производными циклопентапергидрофенантрена. Из них наиболее давно известны одноатомные вторичные спирты — стерины (стеролы) и их сложные эфиры с жирными кислотами (стериды). К стеринам относятся: холестерин, содержащийся во всех клетках и многих жидкостях животного организма, копростерин (стерин кала), эргостерин и ряд других.



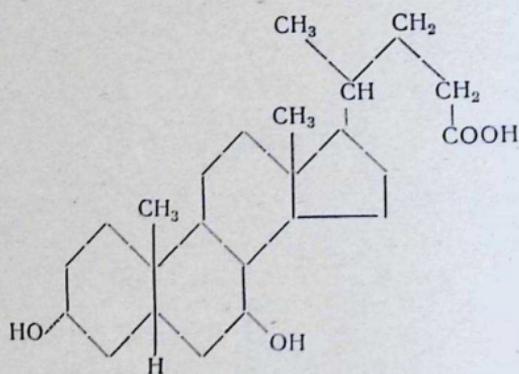


Продуктами частичного окисления копростерина являются желчные кислоты, которые в желчи находятся в виде парных желчных кислот, т. е. амидов, образованных с таурином и гликоколлом. Далее приводится постепенное окисление биогенных производных циклопентанпергидрофенантрена (взаимосвязь указана стрелками).

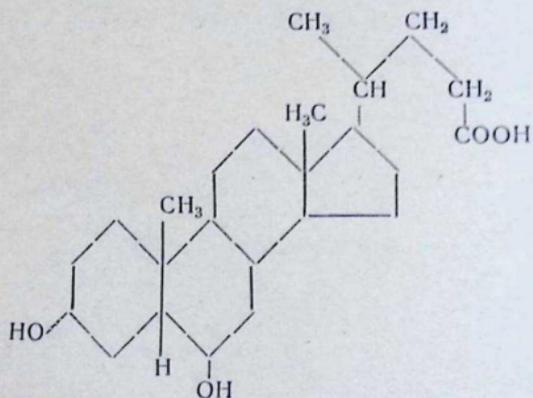




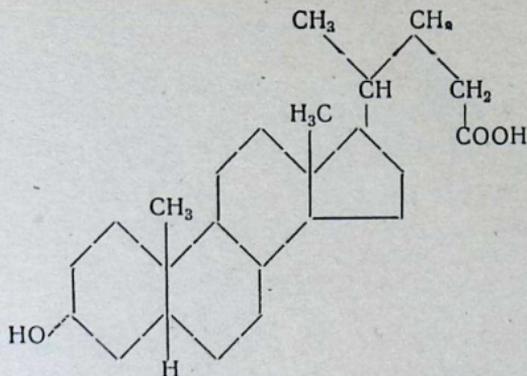
Дезоксихолевая кислота



Хенодезоксихолевая кислота

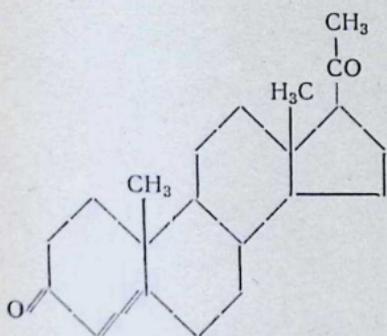


Гнидезоксихолевая кислота

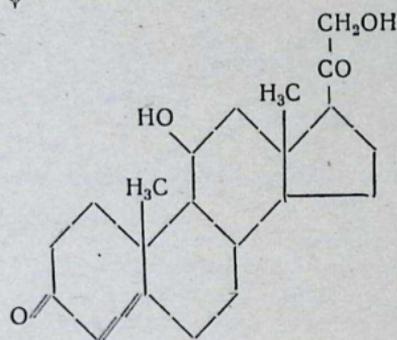


Литохолевая кислота

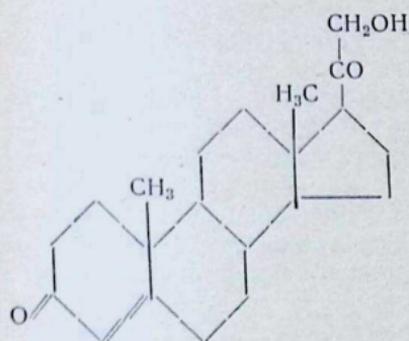
Желчные кислоты



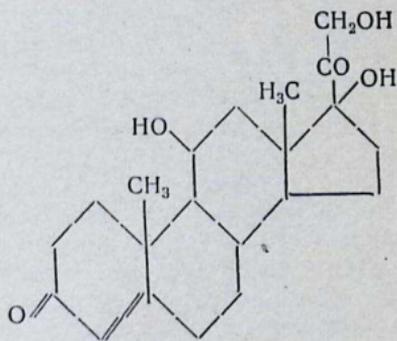
Прогестерон



Кортикостерон



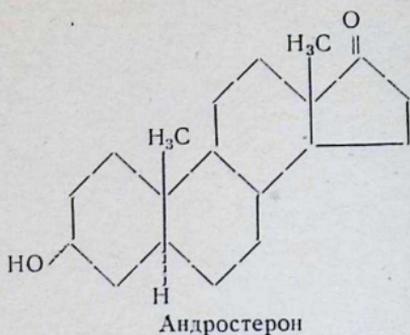
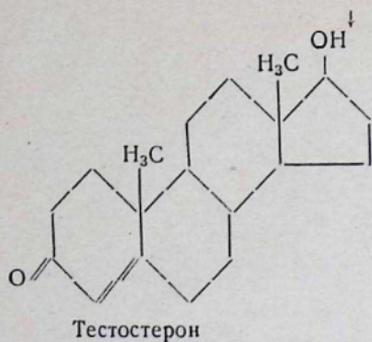
11-Дезоксикортикостерон



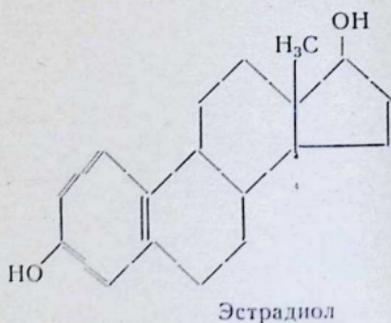
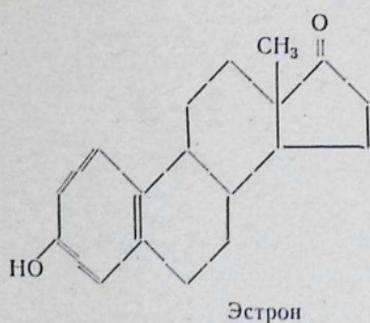
17-Оксикортикостерон

Прегнагенный гормон и гормоны коры надпочечников





Андрогенные гормоны



Эстрогенные гормоны

Более глубокое окисление боковой цепи стерина приводит к образованию прегнаногенного гормона (гормона желтого тела) — прогестерона и гормонов коры надпочечников: кортикостерона, 11-дезокортикостерона, 17-оксикортикостерона и ряда других, регулирующих солевой и водный обмен и обмен углеводов в организме.

При полном окислительном отщеплении боковой цепи стерина образуются андрогенные и экстрогенные гормоны. Сюда относятся гормон тестикул — тестостерон, андростерон — андрогенный гормон мочи, эстрон, эстрадиол и некоторые другие эстрогенные гормоны.

Кроме того, существует связь между стеринами и образованием витаминов группы D. Так, при облучении ультрафиолетовыми лучами эргостерина образуется витамин D₂, а при облучении 7-дегидрохолестерина — витамин D₃.

Работа 83. Получение холестерина из мозга

Ход работы. Измельченный мозг крупного рогатого скота тщательно смешать с тремя весовыми частями гипса. Через несколько часов масса затвердевает и легко измельчается и растирается в ступке.

К 20—30 г полученного порошка добавить ацетон в таком количестве, чтобы покрыть порошок, и после перемешивания в течение 15—20 мин фильтровать экстракт, промывая остаток на фильтре небольшим количеством ацетона. При этой операции в ацетоновый экстракт переходят холестерин и его эфиры и незначительное количество жира и фосфатидов, а в остатке остается главная часть фосфатидов. Поэтому остаток после экстракции сохраняют для извлечения фосфатидов (работа 87).

Полученный ацетоновый экстракт испарить досуха. Сухой остаток разделить на две части. С одной частью сделать цветные реакции на холестерин (см. следующую работу), а другую перекристаллизовать из спирта или эфира. Холестерин кристаллизуется из спирта в виде пластинок, а из эфира — в виде игл. Определить температуру плавления полученных кристаллов (температура плавления холестерина 147°C).

Работа 84. Цветные реакции на холестерин

Следующие цветные реакции дают не только холестерин и его эфиры, но и многие другие стерины и стероиды.

Ход работы. Сырой (неочищенный) холестерин, полученный в предыдущей работе, растворить в хлороформе и с этим раствором проделать следующие реакции.

I. Реакция Сальковского. К раствору холестерина в хлороформе добавить равный объем серной кислоты уд. веса 1,76 (10 частей концентрированной серной кислоты и 1 часть воды) и встряхнуть.

Слой хлороформа окрашивается в кроваво-красный цвет, а слой серной кислоты — в красный цвет с сильной зеленой флуоресценцией.

II. Реакция с смесью формалина и концентрированной серной кислоты. К 2 мл раствора холестерина в хлороформе добавить равный объем концентрированной серной кислоты, к которой добавлен формалин (на 50 г концентрированной серной кислоты 1 г формалина), и встряхнуть. При этом верхний слой хлороформа окрашивается в вишнево-красный цвет, а нижний — в буро-красный с зеленой флуоресценцией. Отделить слой хлороформа, слить его в сухую пробирку и добавить 3 капли уксусного ангидрида. Появляется синее окрашивание, постепенно переходящее в зеленое.

Работа 85. Открытие холестерина в желчи

Холестерин, находящийся практически во всех клетках и тканях животного организма, является постоянной составной частью желчи.

Ход работы. 20 мл желчи выпарить досуха на водяной бане. Сухой остаток хорошо перемешать стеклянной палочкой с 5—10 мл эфира и эфирный экстракт отфильтровать. Эфир отогнать, остаток растворить в хлороформе и с полученным раствором сделать цветные реакции на холестерин (см. предыдущую работу).

Работа 86. Свойства и реакции желчных кислот

Желчные кислоты принадлежат к веществам, понижающим поверхностное натяжение раствора. Желчь обладает более низким поверхностным натяжением, чем вода, что играет существенную роль при образовании стойких эмульсий жиров в физиологических условиях, при действии желчи в тонких кишках на пищевую массу.

Ход работы. I. В две пробирки налить по 5 мл дистиллированной воды и затем в одну из них прибавить 3—5 капель желчи или раствора желчных кислот. После этого на поверхность жидкости в пробирках насыпать по небольшому количеству серного цвета. В пробирке с чистой водой серный цвет плавает на поверхности, а в пробирке с разбавленной желчью — тонет.

II. Получение желчных кислот. К 1000 мл желчи крупного рогатого скота добавить 20 мл 80%-ной уксусной кислоты и выпавший осадок белков отделить центрифугированием. К прозрачному центрифугату добавить 100 г едкого калия и после растворения жидкость кипятить с обратным холодильником около 10—15 ч. К темноокрашенной жидкости по охлаждению добавить соляной или серной кислоты до получения кислой реакции. При этом выделяется смолистый коричневый осадок желчных кислот, который постепенно затвердевает в кристаллическую массу. Кристаллы отделить фильтрованием, промыть водой и перекристаллизовать из водного этилового спирта. После первой кристаллизации получают почти белые кристаллы с температурой плавления 180° С. После трех кристаллизаций — белые кристаллы с температурой плавления 195—196° С.

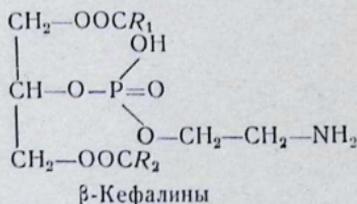
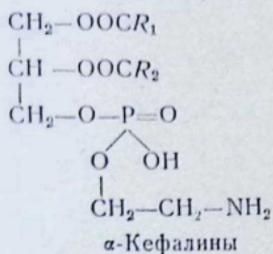
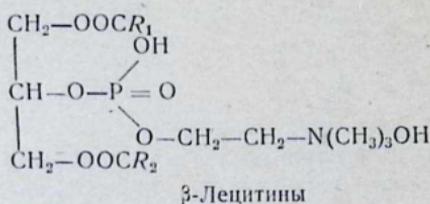
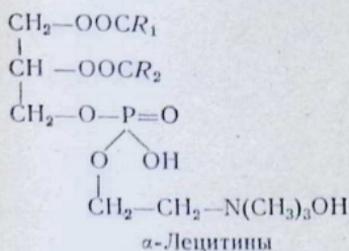
Для открытия желчных кислот может служить реакция, основанная на том, что желчные кислоты дают окрашенные соединения с оксиметилфурфуролом, образующимся при действии концентрированной серной кислоты на растворы сахарозы или фруктозы (см. работу 42). Холестерин не дает так легко этой реакции и поэтому она может быть применена для обнаружения желчных кислот.

III. К 3—4 мл разведенной в пять раз желчи или к раствору желчных кислот прибавить в пробирке 5—10 капель 5%-ного раствора сахарозы. Встряхнуть жидкость и затем осторожно налить 2 мл концентрированной серной кислоты. На границе слоев появляется осадок желчных кислот и образуется красно-фиолетовое кольцо. Смешать содержимое пробирки при хорошем охлаждении. Жидкость приобретает вишнево-красную окраску. При проведении этой реакции следует избегать разогревания жидкости, так как при повышении температуры окраска появляется и в отсутствии желчных кислот.

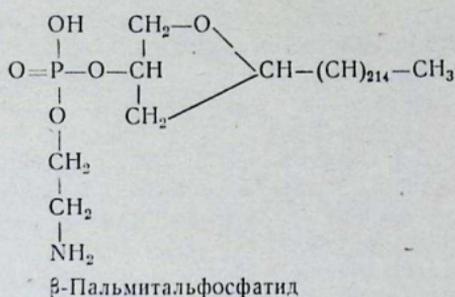
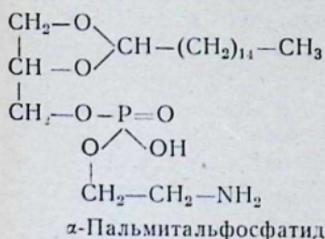
ФОСФОЛИПИДЫ

К фосфатидам относятся липиды, отличающиеся тем, что в их молекуле содержится эфирносвязанный остаток фосфорной кислоты. Фосфатиды нерастворимы в воде, но набухают в ней, образуя эмульсии или коллоидные растворы. Большинство фосфатидов нерастворимо в ацетоне. Фосфатиды образуют непрочные соединения с белками и другими соединениями клетки, причем эти соединения легче растворимы в воде, чем сами фосфатиды. Фосфатиды легче гидролизуются, чем простые триглицериды. Фосфатиды довольно многочисленны и разнообразны по своему строению.

Наиболее изученными фосфатидами являются лецитины и кефалины. Первые при гидролизе, наряду с глицерином, фосфорной кислотой и жирными кислотами, дают холин, а вторые — коламин (этаноламин). В зависимости от положения остатка фосфорной кислоты возможны изомерные структуры α - и β -лецитинов и кефалинов (схемы):

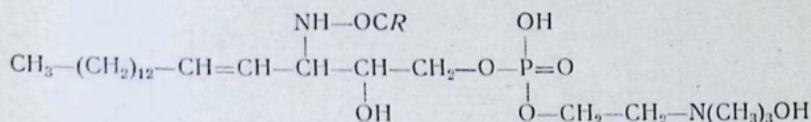


В тканях животного организма широко распространены фосфатиды, близкие к кефалинам, но содержащие вместо остатков жирных кислот остаток пальмитала или стеарала. Эти соединения, построенные по типу полных ацеталей, носят название ацетальфосфатидов:



Смесь таких ацетальфосфатидов — плазмалоген можно отделить от других фосфатидов ткани вследствие нерастворимости их в серном и петролейном эфире.

Особую группу фосфатидов представляет сфингомиелины, отличающиеся от всех перечисленных фосфатидов тем, что не принадлежат к глицеридам и вместо глицерина содержат аминокликоль-сфингозин. При гидролизе сфингомиелинов кроме сфингозина получают холин, фосфорная кислота и жирные кислоты — стеариновая, лигноцериновая и нервоновая. Для сфингомиелинов можно считать вероятной следующую общую формулу строения:



Сфингомиелины обнаружены пока только в составе животных организмов, где они находятся в различных тканях и органах, но в особенно значительном количестве они находятся в нервной ткани.

Работа 87. Выделение и исследование фосфатидов

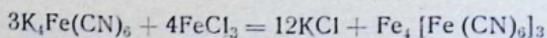
После извлечения из мозга холестерина (см. работу 83) остаток поместить в колбу с обратным холодильником или в аппарат Сохлета с кипящим спиртом или смесью одной части спирта и одной части эфира. После трехчасовой экстракции охлажденный экстракт фильтровать и растворитель отогнать

досуха на водяной бане. Остаток представляет собой главным образом смесь лецитинов и кефалинов.

Ход работы. Небольшую часть полученного сухого остатка растворить в спирте. Спиртовой раствор разделить на три части. К одной добавить воды, при этом образуется белая опалесцирующая эмульсия, к другой — несколько капель насыщенного спиртового раствора хлористого кадмия, выпадет белый осадок нерастворимого кадмиевого соединения лецитинов, и к третьей — ацетон.

Исследовать растворимость фосфатидов в воде, бензоле, эфире, хлороформе.

I. Открытие азота. При прокаливании азотсодержащего органического вещества с металлическим калием образуется цианистый калий, который с гидратом закиси железа дает железистосинеродистый калий $K_4Fe(CN)_6$. Этот последний с солями окиси железа образует синий осадок железистосинеродистой соли окиси железа:



Небольшое количество полученных фосфатидов поместить в пробирку вместе с зернышком металлического калия и прокалить до полного разложения. Раскаленную пробирку опустить осторожно под тягой в стаканчик с 5 мл дистиллированной воды. Пробирка лопнет. Раствор отфильтровать от угля и кусочков стекла, прибавить немного раствора железного купороса и кипятить одну-две минуты. По охлаждении прибавить 2—3 капли раствора хлорного железа и подкислить разбавленной соляной кислотой. При этом выпадает синий осадок железистосинеродистой соли окиси железа или, если азота было мало, жидкость приобретает зеленовато-синюю окраску, и осадок выделяется лишь после стояния.

II. Продукты гидролиза фосфатидов. Оставшуюся часть фосфатидов поместить в большую пробирку, добавить тройной объем 10%-ного раствора едкого натра и кипятить 15—20 мин. При этом происходит гидролиз фосфатидов. Так как холин, отщепляющийся от лецитинов, подвергается, кроме того, дальнейшему расщеплению с образованием триметиламина, то во время нагревания ощущается характерный для триметиламина запах селедочного рассола.

Полученный после гидролиза щелочной раствор разбавить небольшим количеством воды и подкислить 10%-ной соляной кислотой, при этом выделяются жирные кислоты. Жирные кислоты отделить фильтрованием. Фильтрат нейтрализовать и выпарить на водяной бане досуха. Часть сухого остатка сплавить в пробирке с кислым сернокислым калием, при этом образуется акролеин (проба на глицерин; работа 65).

Другую часть сухого остатка сплавить в тигле со смесью из двух частей соды и одной части азотнокислого калия и осторожно прокалить сплав до полного окисления. Остаток растворить в разбавленной азотной кислоте и добавить к полученному раствору большой избыток раствора молибденовокислого аммония. После непродолжительного нагревания выделяется желтый осадок фосфорномолибденовокислого аммония (открытие фосфорной кислоты; работа 3).

Глава VI. БЕЛКИ (протеины)

Жизнь — это способ существования белковых тел, существенным моментом которого является *постоянный обмен веществ с окружающей их внешней природой*, причем с прекращением этого обмена веществ прекращается и жизнь, что приводит к разложению белка.

Ф. Энгельс («Диалектика природы.» Госполитиздат, 1952, стр. 244)

Белки являются основной составной частью протоплазмы. Существование живой клетки, не содержащей белковых веществ, невозможно. Сложная совокупность явлений, которая характерна для живого организма, имеет в своей основе непрерывные процессы ассимиляции и диссимиляции белковых веществ.

Белки представляют группу высокомолекулярных органических соединений, содержащих азот, в химическом отношении характеризующихся тем, что при гидролизе они распадаются, через ряд промежуточных продуктов, до аминокислот. В настоящее время в составе различных белков обнаружено до 20 аминокислот (см. приложение, табл. 4).

Аминокислоты, входящие в состав белков, принадлежат к ряду α -аминокислот. Все они, за исключением оптически недействительного глицина, имеют асимметрическое строение. При этом, независимо от различного направления вращения в их растворах все белковые аминокислоты относятся по конфигурации α -С-атома к *L*-ряду, т. е. конфигурация их α -С-атома соответствует пространственной конфигурации *L*-молочной кислоты или пятого С-атома *L*-глюкозы. Такие аминокислоты как цистин, изолейцин, треонин и оксипролин имеют два асимметрических С-атома и могут существовать в виде четырех стереоизомерных

форм, из которых только одна является природной. Энантиоморфные α -аминокислоты (содержащие в равных количествах *D*- и *L*-форму), могут встречаться в составе белков лишь в виде следов, но они входят в состав некоторых полипептидов, продуктов обмена микроорганизмов, как, например, грамицидина и тироцидина. Таким образом, молекула белков, в состав которой входят *L*- α -аминокислоты, имеет асимметрическое строение.

Белки построены из остатков аминокислот, соединенных между собой пептидной связью. Этот главный тип связи определяет первичную структуру белковой молекулы.

Наряду с образованием основных цепей возможно взаимодействие между отдельными свободными группировками в боковых ветвях белковых молекул благодаря водородным связям. Такое взаимодействие приводит к скручиванию цепей в определенную пространственную конфигурацию, обуславливающую вторичную структуру белковой молекулы.

Третичная структура определяется укладкой спиральных и аморфных участков пептидной цепи при помощи вандерваальсовых сил, возникающих между боковыми радикалами аминокислот.

Ассоциация двух или большего числа белков с образованием комплексов приводит к формированию четвертичной структуры (актомиозин, состоящий из актлина и миозина, гемоглобин, состоящий из 4-х субстанций, и др.).

Первичная структура

↓ Полипептидная цепь — амидные связи.

Вторичная структура

↓ Спиралеобразное закручивание полипептидной цепи — водородные связи.

Третичная структура

↓ Складывание цепей в клубки — „конформация“ молекул благодаря внутримолекулярным связям.

Четвертичная структура

↓ Ассоциация молекул в комплексы надмолекулярного уровня. Образование сверхмолекул — протомеров.

Отдельные белки обладают значительным разнообразием в аминокислотном составе, химических свойствах, величине молекулярного веса и физиологической роли. Такое же разнообразие наблюдается и в отношении физико-химических свойств белков. Большинство белков имеет ясно выраженный характер лиофильных коллоидов; в клетках и тканях белки находятся или в состоянии золя, или в состоянии геля. Некоторые белки образуют коллоидные растворы при растворении в воде или в спирте, для других — золеобразование возможно лишь в присутствии электролитов. Однако, наряду с растворимыми белками,

существует целая группа белков — склеропротеннов, которые являются опорными или покровными веществами и практически нерастворимы.

Коллоидные растворы нативных белков монодисперсны, т. е. обладают определенной величиной молекулярного веса. Точное определение молекулярного веса белков сталкивается со значительными трудностями и поэтому величины молекулярного веса, находимые различными методами (осмотическое давление, диффузия, ультрацентрифугирование), часто не дают полного совпадения. Значения для молекулярного веса некоторых белков приведены в табл. 5 (см. приложение).

Переход из состояния золя в состояние геля, т. е. коагуляция (осаждение) белкового золя, может быть обратимым, если полученный гель способен снова перейти в золь, или необратимым, когда такой обратный переход невозможен. В последнем случае имеет место процесс денатурации белка и полученный осадок является денатурированным протеином. Белковые золи наименее стойки и наиболее легко коагулируют при изоэлектрическом состоянии белкового амфолита, т. е. при $[H^+]$, соответствующей изоэлектрической точке данного белка.

Кроме такого типа реакций осаждения, где коагуляция связана с тем или иным изменением коллоидного состояния или свойств самого протеина, белки дают реакции осаждения, основанные на адсорбции поверхностью самих белков некоторых коллоидных осадков, или же на образовании нерастворимых соединений с некоторыми веществами.

АДСОРБЦИЯ

Вещества, обладающие очень большой поверхностью, способны при соприкосновении поглощать часть газообразного вещества или вещества, растворенного в жидкости. Такое явление носит название сорбции.

Сорбция, происходящая только на поверхности, называется адсорбцией. Поглощения, происходящие в толще поглотителя, называются абсорбцией.

Адсорбция зависит от природы как адсорбента (поглотителя), так и адсорбируемого вещества. Из смеси различных веществ адсорбируется преимущественно наиболее поверхностно-активное вещество. При фильтрации раствора смеси веществ через колонку адсорбента, растворимые вещества адсорбируются послойно. На такой избирательной адсорбции и основан хроматографический метод разделения смесей веществ. Могут адсорбироваться молекулы, ионы, коллоидные частицы.

Для очистки и выделения белковых веществ — ферментов — применяются методы адсорбционного фракционирования, являющиеся наиболее эффективными.

Работа 88. Измерение адсорбции уксусной кислоты на поверхности животного угля

Ход работы. Приготовить разбавлением 2 н. раствор уксусной кислоты в шести колбах примерно следующих концентраций и в таких количествах:

№ колбы	1	2	3	4	5	6
Раствор, мл	150	150	150	125	110	105
Нормальность	0,012	0,025	0,05	0,1	0,2	0,4

Точное содержание уксусной кислоты определить титрованием 0,1 н. раствором NaOH (индикатор — фенолфталеин), причем из колб 1, 2 и 3 пипеткой отобрать по 50 мл, из колбы 4 — 25 мл, из колбы 5 — 10 мл и из колбы 6 — 5 мл раствора. Таким образом, во всех колбах остается по 100 мл раствора. В каждую колбу внести по 3 г животного угля, затем тщательно взболтать все колбы в течение 10 мин. Отфильтровать отдельно содержимое каждой колбы в течение 10 мин. Отфильтровать отдельно содержимое каждой колбы через бумажные фильтры. Отобрать из фильтров пробы пипеткой в таких же количествах, какие были взяты для первоначального титрования, и определить титрованием количество уксусной кислоты. Разность между результатами первого титрования и второго (после пересчета на 100 мл) дает количество уксусной кислоты c_1 , поглощенное 3 г угля из 100 мл раствора.

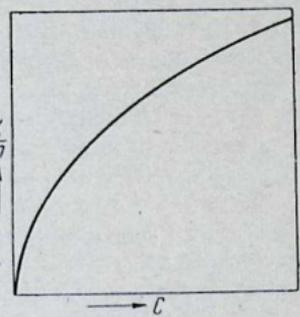


Рис. 15. Изотерма адсорбции:

m — масса поглотителя, c — концентрация, x — общее количество растворенного вещества

Титрованием раствора уксусной кислоты до добавления угля определить ее первоначальную концентрацию c в пересчете на миллилитры 0,1 н. раствора едкого натра, а титрованием фильтра — ее концентрацию c_1 после адсорбции:

$$x = c + c_1$$

Результаты нанести на график: по оси абсцисс нанести значение c_1 , а по оси ординат значение $\frac{x}{m}$ (m — вес поглотителя). Полученная кривая есть изотерма адсорбции (рис. 15).

Работа 89. Вытеснение с поверхности адсорбента одного вещества другим

Ход работы. В три конические колбы на 200—300 мл, пронумерованные восковым карандашом, влить пипеткой по 20 мл 0,1 н. раствора уксусной кислоты. В колбы 1 и 2 добавить по 20 мл дистиллированной воды, а в колбу 3—20 мл ацетона. Колба 1—контрольная. В колбы 2 и 3 внести точно по 1,0 г животного угля и взбалтывать жидкость в каждой колбе в течение 5 мин.

За тремя колбами первого ряда поставить предварительно пронумерованные такие же три колбы с воронками и сухими фильтрами во второй ряд и отфильтровать в них содержимое колб первого ряда (из первой колбы в первую, из второй во вторую и из третьей в третью). Убрать первые три колбы в сторону, на их место поставить три маленькие колбы (1, 2, 3) и пипеткой перенести в них по 10 мл фильтратов в том же порядке (из первой в первую и т. д.). Налить в бюретку 0,1 н. раствор едкого натра. Внести в каждую из трех колб с фильтрами по 2 капли фенолфталеина и титровать уксусную кислоту.

Отметить число миллилитров раствора едкого натра, пошедшее на каждое титрование.

РЕАКЦИИ ОСАЖДЕНИЯ

Реакции осаждения применяются прежде всего для качественного открытия белковых веществ. Некоторые из них имеют также значение для количественного осаждения белков. Наконец, те реакции осаждения, которые вызывают обратимое изменение белков, служат для их выделения и разделения. Следует иметь в виду, что реакции осаждения свойственны не только белкам. Так, например, алкалоидными реактивами осаждаются альбумозы, пептоны и многие органические основания.

Для проведения реакций осаждения служит белок куриного яйца, разведенный физиологическим раствором.

Работа 90. Осаждение при нагревании, кислотами и солями тяжелых металлов

Ход работы I. Осаждение нагреванием. Раствор белка нагреть до кипения, при этом происходит коагуляция. Параллельно нагреть раствор белка, подкисленный 1—2 каплями 1%-ной уксусной кислоты. Произойдет более полное осаждение белка.

Нагреть до кипения сначала сильно подкисленный, а затем сильно подщелоченный раствор белка. Осаждения не наблюдается, так как в этих условиях образуются продукты неглубокого гидролиза белка: кислотный или щелочной альбуминаты.

II. Осаждение кислотами. При осторожном добавлении к раствору белка концентрированной азотной кислоты на границе жидкостей образуется белый хлопьевидный осадок. Эту же пробу повторить с концентрированными серной и соляной кислотами.

III. Осаждение солями тяжелых металлов. 1. К раствору белка прибавить несколько капель 10%-ного раствора азотнокислого серебра. Происходит выделение осадка. 2. К раствору белка добавить осторожно, по каплям, разбавленный раствор сернокислой меди. Осадок, растворяется в избытке осадителя.

Работа 91. Осаждение алкалоидными реактивами

Ход работы. Пикриновая кислота. Добавить к раствору белка, подкисленного уксусной кислотой, 5—6 капель насыщенного раствора пикриновой кислоты. Образуется желтоватый осадок.

Танин. При добавлении раствора танина к подкисленному уксусной кислотой раствору белка выделяется сероватый осадок.

Железистосинеродистый калий. К подкисленному уксусной кислотой раствору белка добавить по каплям 5%-ный раствор $K_4Fe(CN)_6$. Выделяется осадок.

Фосфорновольфрамовая и фосфорномолибденовая кислоты. Осадить белок, добавляя к белковому раствору 10%-ный раствор фосфорновольфрамовой или фосфорномолибденовой кислоты.

Трихлоруксусная и сульфосалициловая кислоты. Белок осадить, добавляя к белковому раствору несколько капель 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты или равный объем 10%-ного раствора сульфосалициловой кислоты.

Водный раствор 2%-ной лимонной кислоты и 1%-ной пикриновой кислоты (реактив I) и насыщенный раствор йодной ртути в 5%-ном йодистом калии (реактив II). Осадить белок добавлением реактива I или добавлением к подкисленному соляной кислотой белковому раствору реактива II.

Работа 92. Осаждение спиртом и нейтральными солями щелочных и щелочноземельных металлов (высаливание)

При смешении раствора белка с избытком спирта выделяется осадок. Осаждение это обратимо при условии, если оно ведется при достаточно низкой температуре (лучше всего при $0^\circ C$) и не слишком длительном воздействии спирта.

Ход работы. I. К раствору яичного белка добавить мелкоизмельченный твердый хлористый натрий до полного насыщения. При этом выпадает осадок глобулина. Его отфильтровать и к фильтрату добавить твердый мелкоизмельченный сернокислый аммоний до полного насыщения. Выпадает осадок альбумина.

II. К раствору белка добавить равный объем насыщенного раствора сернокислого аммония. При этом (полунасыщение) выпадает осадок глобулина. Его отфильтровать и к фильтрату добавить твердый измельченный сернокислый аммоний до полного насыщения. Выпадает осадок альбумина.

III. К раствору белка добавить до полного насыщения твердый сернокислый магний. При этом выпадает глобулин. Его отфильтровать и в фильтрате обнаружить присутствие белка (альбумина) нагреванием и одной из проб с алкалондными реактивами.

Для того чтобы убедиться в обратимости осаждения солями, полученные осадки белков растворить в воде (альбумины) или в 5—10%-ных растворах NaCl , MgSO_4 и других солей (глобулины).

Работа 93. Очистка белков диализом

Очистка коллоидных растворов производится в приборе, называемом диализатором (рис. 16).

В колбу 1 с полупроницаемой перепонкой 2 налить коллоидный раствор. Воронку погрузить в сосуд с дистиллированной водой, которая должна быть проточной. Для поддержания постоянного уровня в сосуде 3 служит сифон 6. Трубки 4 и 5 для притока и спуска воды.

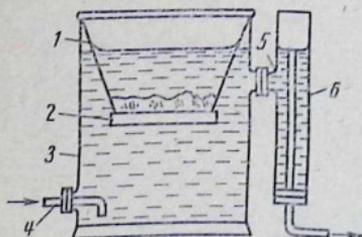


Рис. 16. Диализатор:

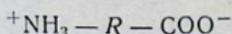
1 — воронка, 2 — полупроницаемая перепонка, 3 — стеклянный сосуд, 4 — трубка для притока воды, 5 — трубка для спуска воды, 6 — автоматический сифон

Следить за ходом анализа, отбирая время от времени пробы из наружного раствора и проверяя аналитически присутствие веществ, имеющихся в золе и проходящих через перепонку. Диализ считается законченным, когда качественная реакция на удаляемые вещества дает отрицательные результаты.

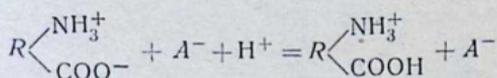
Ход работы. Диализ золя желатины. В мешочек из коллодия налить 1%-ный раствор желатины, добавить к нему небольшое количество хлористого натрия и погрузить в дистиллированную воду. Спустя два часа, отобрать отдельные порции воды из наружного слоя и произвести пробы на ионы хлора раствором азотнокислого серебра и на желатину 2%-ным раствором танина. Смесь танина и желатины дает характерное окрашивание. Пробы производить через каждые полчаса, записывая результаты опыта.

ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ ТОЧКА

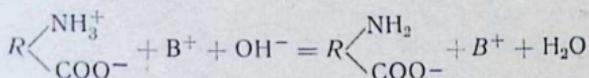
Белки — амфолиты, способны к двоякого рода диссоциации — кислотной и основной. Белковый амфолит может быть в состоянии, при котором его молекулы электронейтральны вследствие того, что они находятся в виде амфионов



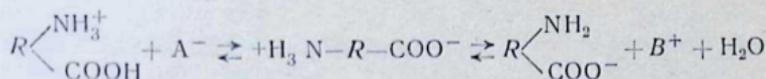
Такое состояние носит название изоэлектрического состояния и для каждого белка в зависимости от его химических свойств наблюдается при определенной концентрации водородных ионов, которая поэтому называется изоэлектрической точкой данного белкового амфолита. При любой другой $[\text{H}^+]$ белок уже не будет электронейтральным. В средах с концентрацией водородных ионов большей, чем изоэлектрическая точка данного протеина, его молекулы находятся в состоянии белковых катионов



и белок будет обладать ясно выраженным основным характером. Наоборот, в средах с концентрацией водородных ионов меньшей, чем изоэлектрическая точка данного белка, молекулы его находятся в состоянии белковых анионов



и, следовательно, белок будет обладать кислым характером. Иными словами, состояние белковой молекулы может быть различным при различных $[\text{H}^+]$ среды относительно положения его изоэлектрической точки. Таким образом, определение изоэлектрической точки является необходимым для суждения о том, в каком из трех возможных состояний



находится белок в среде с той или иной концентрацией водородных ионов (A^- — кислотный остаток; B^+ — ион металла).

Кроме белков, многие из веществ, входящих в состав живой клетки или находящихся в жидкостях организма в качестве продуктов обмена веществ, являются по своей природе амфолитами. Сюда относятся: аминокислоты, полипептиды, нуклеозиды, нуклеотиды, нуклеиновые кислоты и др. У всех этих веществ,

так же как и у белков, наблюдается изоэлектрическое состояние и зависимость характера диссоциации от активной реакции среды (см. приложение, табл. 6).

Работа 94. Определение изоэлектрической точки белков (желатина) методом коагуляции

Коллоидные растворы белковых амфолитов обладают в изоэлектрической точке минимальной стабильностью. Для некоторых белков эта минимальная устойчивость их коллоидных растворов сказывается в том, что они в изоэлектрической точке самопроизвольно коагулируют; другие белки в этой точке наиболее легко коагулируют при добавлении какого-либо осадителя. Это свойство белковых растворов служит основанием для ниже-следующего метода определения изоэлектрической точки.

Ход работы. Приготовить смесь пробирок и поместить в каждую по 5 мл буферных смесей (фосфатно-цитратных), как указано в приведенной форме:

№ пробирки . . .	1	2	3	4	5	6	7
№ смеси	20	18	16	14	12	10	8
pH	6,0	5,6	5,2	4,8	4,4	4,0	3,6

В восемь пробирок поместить по 2 мл 1%-ного раствора желатины. В пробирку 4 добавить при встряхивании 90%-ный спирт до очень легкого помутнения раствора. Затем в остальные пробирки добавить такое же количество спирта, как и в пробирку 4. После 30-минутного стояния отметить пробирку с максимальным помутнением и, таким образом, найти pH, отвечающий изоэлектрической точке желатины.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Под влиянием электрического поля молекулы белка двигаются в сторону анода или катода, так как они обладают электрическим зарядом. Скорость движения пропорциональна числу зарядов молекулы, но она зависит от формы и величины молекулы — факторов, также оказывающих влияние на движение молекул. Скорость движения при электрофорезе зависит от напряженности применяемого поля, для чего пользуются величиной электрофоретической мобильности, равной скорости движения молекулы белка (*см/сек*) при напряженности 1 *в/см*.

Кроме того электрофоретическая мобильность зависит от pH и от ионной силы. При изоэлектрической точке электрофоретическая мобильность равна нулю, выше этой точки молекулы белка двигаются как анионы, ниже — как катионы. Мобильность

тем большая, чем дальше от изоэлектрической точки проходит электрофорез. При электрофоретическом исследовании смеси нужно выбирать соответствующую величину рН, при которой будет оптимальное разделение компонентов.

Скорость движения белковых молекул зависит также от концентрации ионов. Определения обычно проводят при ионной силе 0,1 или еще меньше.

Ионная сила не идентична ионной концентрации. На электрический заряд, оседание, растворение и электрофоретическую подвижность коллоидов растворы разных солей одинаковой концентрации влияют по-разному. Ионы, несущие несколько положительных и отрицательных зарядов, оказывают большее влияние на гидратацию белка, чем ионы, несущие один положительный или отрицательный заряд. Это обстоятельство учитывают при исследовании белков и поддерживают на постоянном уровне ионную силу, а не концентрацию.

Растворы солей с одинаковой ионной силой влияют на белки одинаково. Ионная сила определяется по формуле:

$$\mu = c \frac{\sum n z^2}{2},$$

где μ — ионная сила, c — молекулярная концентрация, n — число ионов в молекуле, z — заряд иона.

Таким образом, ионная сила 0,1 М раствора NaCl=0,1, так как $\sum n z^2 = 1 \cdot 1^2 + 1 \cdot 1^2$. Однако уже в случае 0,1 М раствора $MgSO_4 \sum n z^2 = 1 \cdot 2^2 + 1 \cdot 2^2$, следовательно, ионная сила этого раствора равна 0,4. Чтобы получить раствор $MgSO_4$, равный по ионной силе 0,1 М раствору NaCl, надо приготовить 0,025 М раствор $MgSO_4$. Электрофореграмма сыворотки крови представлена на рис. 17. Величина абсорбции света показывает количественное соотношение отдельных компонентов, она пропорциональна величине площади, находящейся под кривой.

Для определения скорости электрофоретического движения существует несколько методов.

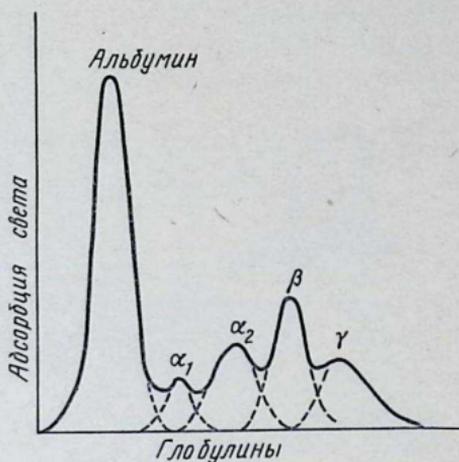


Рис. 17. Электрофорез на бумаге белков сыворотки крови (α_1 , α_2 , β , γ — фракции глобулинов)

Работа 95. Метод электрофореза на бумаге

Сущность метода заключается в том, что оба конца ленты фильтровальной бумаги, смоченные буфером, нужно опустить в буферный раствор, связанный с электродами. Исследуемый раствор нанести на бумагу в виде точки или полосы из нескольких капель. Аппарат (рис. 18) закрыть, чтобы препятствовать испарению тонкого слоя буферного раствора. Через несколько часов электрофореза (в зависимости от применяемой силы поля) белки под действием тока отходят от места их нанесения на не-

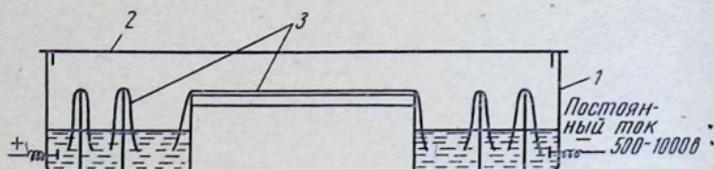


Рис. 18. Аппарат для электрофореза на бумаге:

1 — резервуар, 2 — крышка, 3 — фильтровальная бумага

сколько сантиметров. После окончания опыта ленту фильтровальной бумаги высушить и окрасить каким-либо красителем — фуксином, амидным черным, азокармином, или бромфенолблау. После окрашивания белки проявляются в виде пятен или полосок (см. рис. 25).

ЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ

Для белков характерны некоторые цветные реакции. Часть этих реакций обусловлена присутствием тех или иных атомных группировок, общих для молекул различных белков, и поэтому такие реакции являются общими цветными реакциями на белки. К таким реакциям относятся биуретовая (реакция на полипептидную структуру) и нингидриновая (реакция на α -аминокислоты).

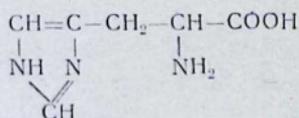
Другие реакции связаны с наличием в молекуле белка остатка той или иной аминокислоты и, следовательно, характерны только для белков, в молекулу которых входит данная аминокислота. Эти реакции ценны тем, что с их помощью легко составить общее представление о качественном аминокислотном составе исследуемого белка. Следует иметь в виду, что некоторые из цветных реакций на отдельные аминокислоты применимы только к свободным аминокислотам, т. е. лишь в растворах, получающихся после гидролиза белков (белковых гидролизатах). Кроме того, ни одна из цветных реакций в отдельности не

является строго специфичной для белковых веществ. Поэтому для суждения о присутствии белка в том или ином изучаемом объекте необходима совокупность цветных реакций и реакций осаждения.

Для следующих задач служит белок куриного яйца, разведенный в пять-десять раз водой и отфильтрованный от выпавшего глобулина. Для отдельных реакций употребляют, кроме того, растворы казеина, желатины, пептона и белковые гидролизаты.

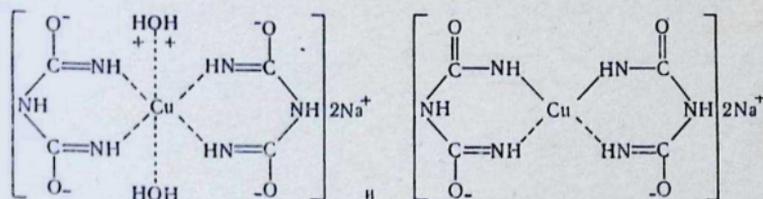
Работа 96. Биуретовая реакция (реакция Пиотровского)

В сильно щелочном растворе при добавлении соли меди такие вещества, как биурет ($\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$), оксамид ($\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{CO}-\text{NH}_2$), полипептиды и белки образуют окрашенные в сине-фиолетовый и красновато-фиолетовый цвет комплексы соли. Биуретовая реакция, таким образом, обусловлена присутствием в молекуле или двух $-\text{CO}-\text{NH}$ -групп или $-\text{CO}-\text{NH}$ -группы и групп $-\text{C}(-\text{NH})-\text{NH}_2$ или $-\text{CH}_2-\text{NH}-$, связанных непосредственно между собой или через посредство атома углерода или азота. Биуретовую реакцию поэтому дают пептиды, содержащие, по крайней мере, три остатка аминокислот. Однако некоторые соединения, как, например, гистидин,



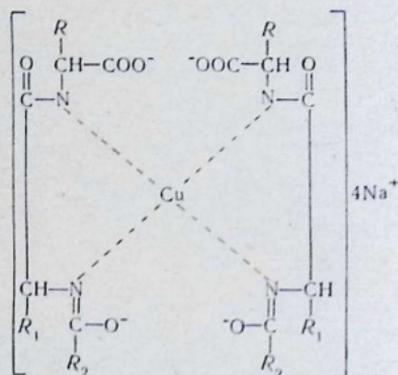
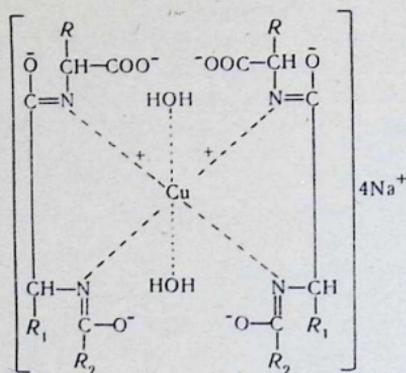
не содержащие пептидной связи, дают положительную биуретовую реакцию и поэтому эта реакция не является строго специфичной для полипептидных цепей.

Строение фиолетово-красной $\text{Cu}-\text{Na}$ -комплексной соли биурета может быть изображено двумя мезомерными структурами:



Аналогично фиолетовая $\text{Cu}-\text{Na}$ -комплексная соль полипептидов и белков, цвет которой обуславливает окраску при

биуретовой реакции, должна иметь строение, изображаемое следующими схематическими формулами:



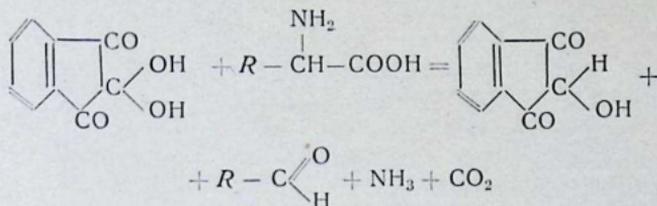
Пептоны при обычном проведении биуретовой реакции дают красноватую окраску. Однако и здесь при добавлении достаточного избытка соли меди получается сине-фиолетовое окрашивание.

Присутствие в исследуемом растворе $MgSO_4$ и $(NH_4)_2SO_4$ препятствует биуретовой реакции. При наличии аммонийных солей следует употреблять большой избыток едкой щелочи. Биуретовая реакция употребляется и для количественного определения белков.

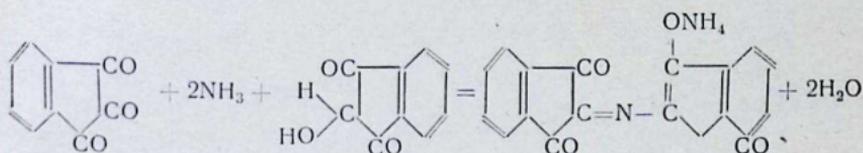
Ход работы. К раствору белка добавить равный объем 10%-ного раствора едкого натра и затем по каплям 0,1%-ный раствор сернистой меди. Жидкость приобретает фиолетовую окраску. Реакцию повторить с раствором пептона, казеина и желатины.

Работа 97. Нингидриновая реакция

При нагревании растворов белков и полипептидов с трикетогидринденгидратом (нингидрином) образуется синее окрашивание. Эта реакция обусловлена присутствием α -аминокислот со свободной α -аминогруппой, которые реагируют с нингидрином по уравнению:



причем образуются альдегид, аммиак, CO_2 и восстановленный нингидрин. Восстановленный нингидрин с аммиаком и второй молекулой нингидрина образуют окрашенный в синий цвет продукт конденсации:



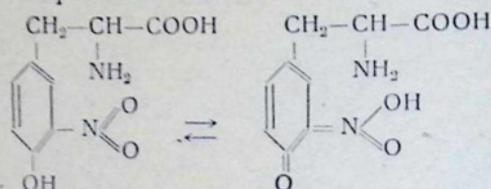
строение которого аналогично строению мурексида. Окраска чувствительна к $[\text{H}^+]$, поэтому нингидриновую реакцию ведут в нейтральном растворе. Кроме того, следует иметь в виду, что аммиак и β -аланин также дают положительную нингидриновую реакцию. Чувствительность нингидриновой реакции может быть повышена добавлением аскорбиновой кислоты.

Ход работы. К 3 мл раствора белка добавить 1 мл свежеприготовленного 0,1%-ного раствора нингидрина. Смесь нагреть до кипения и через минуту охладить. Появляется красивое синее окрашивание.

Работа 98. Ксантопротеиновая реакция (на тирозин, триптофан, фенилаланин)

Если смешать раствор белка с концентрированной азотной кислотой, то выпадает осадок белка, который при нагревании смеси частью растворяется с образованием желтоокрашенного раствора. При этом происходит образование нитросоединений триптофана и тирозина. Если далее к полученному раствору осторожно добавить едкой щелочи или аммиака, то появляется красновато-оранжевое окрашивание. Это окрашивание

обусловлено образованием солей таутомерных ациформ нитро-соединений — нитроновых кислот:



Триптофан дает более ярко-красную окраску, чем тирозин. Фенилаланин не нитруется при действии одной азотной кислоты, но при добавлении концентрированных серной и азотной кислот нитрование идет. Ксантопротеиновая реакция получается лучше с сухими препаратами белка.

Ход работы. К раствору белка или к сухому казенну добавить по каплям концентрированную азотную кислоту и затем нагревать до кипения. По охлаждении осторожно добавить по каплям концентрированный раствор едкого натра или аммиака. Появляется оранжево-красное окрашивание.

Работа 99. Реакция на тирозин (реакция Миллона)

При добавлении к раствору белка реактива Миллона, содержащего азотную и азотистую закисную ртуть, образуется вначале белый осадок, который при нагревании делается красным. Реакция эта обусловлена образованием ртутной соли нитросоединения тирозина. Триптофан дает желтоватое окрашивание. Красное окрашивание с реактивом Миллона дают фенол, салициловый альдегид, пирокатехин и другие полифенолы и алкалоиды, содержащие фенольную группу. Однако в белке только тирозин может давать с реактивом Миллона красное окрашивание и поэтому эта реакция употребляется для качественного и количественного определения тирозина в белке и гидролизатах белка. Реакция не может быть применена для определения тирозина в присутствии большого количества неорганических солей (например, в моче) или в сильно щелочных растворах.

Ход работы. К 1 мл раствора белка добавить 2—3 капли реактива Миллона и осторожно нагреть. Появляется красное окрашивание раствора белка или белый осадок белка, образовавшийся вначале, приобретает красное окрашивание.

Работа 100. Реакция на тирозин с нитрозо-β-нафталом

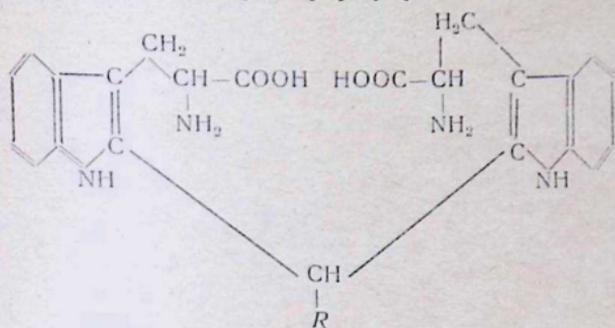
Нитрозо-β-нафтол в присутствии азотной кислоты реагирует с тирозином с образованием красноокрашенного вещества. Реакция очень чувствительна и применима для белков и белковых гидролизатов.

Ход работы. К 1 мл 0,2%-ного раствора казеина добавить одну каплю 1%-ного спиртового раствора нитрозо-β-нафтола, нагреть до кипения и добавить 1—2 капли концентрированной азотной кислоты. Появляется розовое или красное окрашивание.

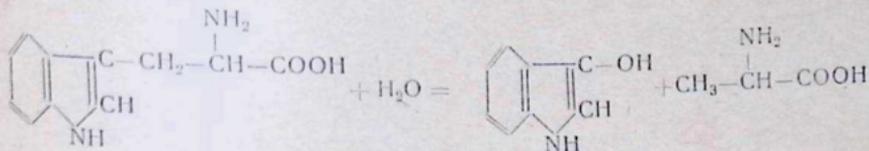
Повторить пробу с раствором яичного белка и с раствором желатины.

Работа 101. Реакции на триптофан (реакции конденсации с альдегидами)

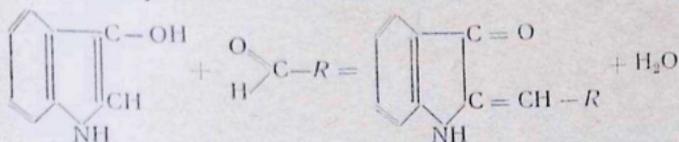
Триптофан в кислом растворе реагирует со многими альдегидами, в результате чего образуются окрашенные продукты конденсации, имеющие общую формулу:



В отдельных случаях триптофан, по-видимому, подвергается расщеплению:



после чего образовавшийся индоксил конденсируется с альдегидом, образуя окрашенное соединение:



Поэтому некоторые из нижеупомянутых реакций получаются также с индолом и его дериватами.

Ход работы. I. Реакция с глиоксиловой кислотой. К раствору белка прибавить в избытке ледяную уксусную кислоту, подогреть до полного растворения и по охлаждении осторожно добавить концентрированную серную кислоту. На границе двух слоев

после некоторого стояния появляется красно-фиолетовое окрашивание.

Окраска получается вследствие взаимодействия триптофана с глиоксиловой кислотой (СОНСООН), находящейся в виде примеси в ледяной уксусной кислоте. Поэтому вместо ледяной уксусной кислоты для реакции можно употреблять раствор глиоксиловой кислоты. Следы меди в реактивах значительно повышают интенсивность образующейся окраски.

II. Реакция с α -оксиметилфурфуролом. Раствор белка смешать с несколькими каплями 10%-ного раствора сахарозы и осторожно добавить концентрированную серную кислоту. На месте соприкосновения двух слоев появляется вишнево-красное окрашивание.

Окраска появляется вследствие реакции триптофана с оксиметилфурфуролом, образующимся при действии концентрированной серной кислоты на сахарозу.

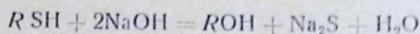
Работа 102. Реакция с бромом на гистидин

Эта реакция специфична для гистидина и может служить для его количественного определения. Только гистидин дает сине-фиолетовую окраску; гистамин дает желтую или оранжевую окраску. Однако реакция не применима к белкам, а только к гидролизатам белка после специальной обработки.

Ход работы. К 2 мл раствора гистидина добавить по каплям 1%-ный раствор брома в 30%-ной уксусной кислоте до появления желтого окрашивания, не исчезающего за 10 мин. После этого добавить 2 мл смеси из 2 частей концентрированного раствора аммиака и 1 части 10%-ного раствора углекислого аммония и нагреть в течение 5 мин на кипящей водяной бане. Появляется сине-фиолетовое окрашивание.

Работа 103. Реакция на серусодержащие аминокислоты

При нагревании белка в сильно щелочном растворе серусодержащие аминокислоты — цистеин, цистин и метионин — отщепляют серу в виде щелочного сульфида:



и этот сульфид при добавлении свинцовой соли образует черный сернистый свинец. Эрготнионин также дает эту реакцию.

Ход работы. Раствор белка кипятить с двойным объемом 10%-ного раствора едкого натра. При этом можно заметить выделение аммиака и по запаху и по посинению влажной лакмусовой бумаги. К полученному горячему раствору добавить небольшое количество раствора плумбита натрия, который готовят, добавляя к раствору уксуснокислого свинца раствор едкого

натра до растворения образовавшегося вначале осадка гидрата окиси свинца. При добавлении раствора плумбита появляется коричневое или черное окрашивание, или же черный осадок.

Работа 104. Реакция на метионин

Нитропруссид натрия образует с метионином и гликоколом красный пигмент. Если вести реакцию в сильно щелочной среде, то присутствие других аминокислот (гистидина и триптофана) не влияет на образующуюся окраску. Однако присутствие значительных количеств цистина препятствует определению. Метод применим к белковым гидролизатам.

Ход работы. 5 мл исследуемого раствора смешать с 1 мл 14,3 н. NaOH (57,2 г NaOH в 100 мл воды), 1 мл 1%-ного раствора гликокола и 0,3 мл 10%-ного раствора нитропруссиды натрия и затем нагреть 10 мин при 35—40° С. Охладить в ледяной воде и добавить 5 мл смеси HCl + H₃PO₄ (9 объемов концентрированной HCl + 1 объем 85%-ной H₃PO₄). Встряхивать в течение 1 мин и охладить.

Получающаяся окраска может быть сравнена с окраской, полученной таким же образом с раствором метионина известной концентрации, и тогда эта реакция может служить для количественного определения метионина.

Работа 105. Реакция на аргинин

При действии гипохлорита или гипобромита натрия α -нафтол конденсируется с метилгуанидином, агматинном, гликоциамином, аркаином и аргинином с образованием красноокрашенных пигментов. В белках аргинин — единственная аминокислота, дающая эту реакцию, и поэтому она может применяться для качественного и количественного определения аргинина в белках. Аммиак, гистидин, тирозин и триптофан могут мешать определению.

Ход работы. К раствору белка прибавить щелочной раствор α -нафтола и затем небольшое количество раствора хлорноватистого натрия. Появляется красное окрашивание.

Поместить в пробирку 5 мл исследуемого раствора белка и охладить льдом. Добавить 1 мл 10%-ного раствора едкого натра и 1 мл 0,02%-ного щелочного раствора α -нафтола. Охладить льдом еще 2—3 мин и добавить 10—20 капель раствора гипобромита (2 г брома в 100 мл 5%-ного едкого натра). Появляется красное окрашивание. Оно довольно быстро начинает исчезать из-за дальнейшего окисления образовавшегося пигмента избытком гипобромита. Для того чтобы стабилизировать окраску, к жидкости добавить 1 мл 40%-ного раствора мочевины, раскисляющей избыточный гипобромит.

Работа 106. Реакция на гликокол (глицин)

Диальдегид ортофталевой кислоты реагирует с аммиаком и некоторыми аминокислотами с образованием окрашенных продуктов. При реакции с глицином, триптофаном и аммиаком эти окрашенные продукты реакции растворимы в хлороформе, с другими аминокислотами они или не образуются, или нерастворимы в хлороформе. Реакция эта может быть использована для открытия глицина, если предварительно удалить триптофан и аммиак.

Ход работы. К 5 мл 0,02%-ного раствора глицина добавить 2 мл М/15 фосфатного буфера с рН 8,0 и реактива, содержащего диальдегид ортофталевой кислоты. Перемешать и через 2 мин добавить свежеприготовленную и охлажденную смесь из 6 мл спирта и 1 мл концентрированной серной кислоты. Перемешать, добавить 10 мл хлороформа и хорошо встряхнуть. Слой хлороформа окрашивается в зеленый цвет.

Работа 107. Реакция Подобедова

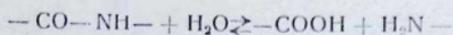
Многие белки содержат остаток, имеющий свойства углевода, обнаруживаемый с помощью общей реакции на углеводы (см. работу 42).

Ход работы. К раствору белка добавить несколько капель 10%-ного спиртового раствора α -нафтола и затем осторожно добавить концентрированной серной кислоты. На границе двух слоев появляется фиолетовое кольцо.

МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ АМИНОКИСЛОТ, ПОЛИПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ

Одной из главных задач при химическом изучении белков и полипептидов является определение их аминокислотного состава. Аммиачный азот определяется с величиной молекулярного веса, а азот — по точке и растворимости белков и полипептидов.

Кроме того, часто требуется определение общего содержания азота в белках и полипептидах, так и тех изменений, которые происходят при ферментативном гидролизе белков и полипептидов. Для определения азота в белках и полипептидах применяется метод, основанный на образовании эквивалентных количеств аммонийных и аминокислотных групп:

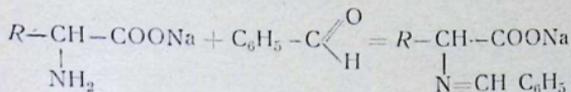


Количественное определение этих групп дает возможность определить общее содержание аминокислот и полипептидов

и следить за течением гидролитического расщепления. В применении к ферментативным реакциям этот метод может служить для изучения действия протеаз и пептидаз.

Работа 108. Выделение аргинина из белковых гидролизатов

Для выделения аргинина из гидролизата белка может служить или образование трудно растворимого бензилиденаргинина, при действии бензальдегида на соль аргинина:

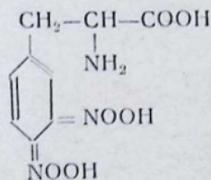


или же образование трудно растворимой соли аргинина с флавиановой кислотой (2,4-динитро-1-нафтол-7-сульфокислота).

Ход работы. Выделение в виде бензилиденаргинина. 100 г желатины смешать с 200 мл концентрированной соляной кислоты (уд. веса 1,19) и после десятичасового стояния кипятить с обратным холодильником в течение 8 ч. Жидкость обесцвечивать кипячением с животным углем и затем упарить при пониженном давлении при 50°С до состояния сиропа. Добавить равный объем воды и снова упаривать. К остатку добавить 50 мл воды и затем при охлаждении льдом и помешивании прибавить, избегая разогревания, 30%-ный едкий натр до нейтральной реакции. Добавить еще 10 мл 30%-ного раствора едкого натра и отфильтровать от выпавших загрязнений. К полученному фильтрату прибавить по частям 20—25 мл свежеперегнанного бензальдегида, хорошо перемешивая жидкость. При потирании палочкой или заражении кристаллами происходит быстрая кристаллизация бензилиденаргинина. После двух-трехчасового стояния при 0°С она закончена. Тогда отсосать осадок, промыть его холодной водой и затем смесью эфира и спирта для удаления остатков бензальдегида. Кристаллы, высушенные в эксикаторе, бесцветны и имеют температуру плавления 204°С. Выход 7—8 г.

Работа 109. Колориметрическое определение фенилаланина

При нитровании фенилаланина нитрующей смесью, после дальнейшего восстановления с гидросиламином в растворе аммиака образуется фиолетово-окрашенная соль соединения следующего строения:

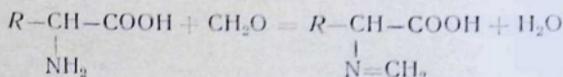


Эта цветная реакция в белковых гидролизатах специфична для фенилаланина.

Ход работы. Отмерить в две фарфоровые чашки для выпаривания объемы белкового фенилаланина. В две другие чашки отмерить 3 мл и 6 мл стандартного раствора фенилаланина, содержащего в 1 мл 0,25 мг аминокислоты. Выпарить досуха содержимое чашек на водяной бане. По охлаждении добавить по 2 мл нитрующей смеси (раствор 20 г KNO_3 в 100 мл концентрированной серной кислоты) и нагреть на водяной бане 20 мин. Перенести содержимое чашек, споласкивая водой, в мерные колбы на 25 мл, следя за тем, чтобы объем жидкости не был больше 10 мл. Охлаждать во льду. Теперь в колбу со стандартным образцом и в колбу с раствором неизвестной концентрации, близкой к этому стандарту, добавить по 2,5 мл 30%-ного раствора гидрохлорида гидроксилamina. Быстро охладить во льду и довести до 25 мл добавлением охлажденного льдом концентрированного раствора аммиака (уд. в. 0,9). Смешать, оставить при комнатной температуре и через 40 мин сравнить окраски в колориметре. Такой же обработке и колориметрированию подвергнуть два других параллельных опыта.

Работа 110. Формальное титрование

Алкалиметрическое титрование карбоксильных групп или ацидиметрическое титрование аминогрупп в водных растворах с применением обычных индикаторов у таких соединений как аминокислоты, полипептиды и белки не дает верных результатов. Однако алкалиметрическое титрование карбоксильных групп делается возможным, если его вести в присутствии избыточного формальдегида, связывающего аминогруппу:



В этих условиях аминогруппы аминокислот и полипептидов не препятствуют титрованию и карбоксильные группы могут быть количественно оттитрованы при добавлении щелочи до рН 9,0.

Для определения употребляют приготовленный непосредственно перед опытом нейтрализованный формалин (50 мл формалина, 1 мл 0,5%-ного водноспиртового раствора фенолфталеина и 0,1 н. едкого натра до очень слабой розовой окраски).

Ход работы. К 10 мл прокипяченной и охлажденной воды добавить 5 мл формалина и 5 мл 0,1 раствора едкого натра и затем 0,1 н. серной кислоты до слабо-розовой окраски. После этого добавить 2 капли 0,1 н. едкого натра. Появляется ярко-красная окраска, соответствующая рН 8,8. Потом к 10 мл 0,1 н. раствора гликоколла прибавить 5 мл формалина и титро-

вать смесь 0,1 н. раствором едкого натра до ярко-красной окраски — более сильной, чем окраска в контрольном опыте. Добавить 0,1 н. серной кислоты до слабо-розовой окраски и затем несколько капель 0,1 н. раствора едкого натра до ярко-красной окраски, — такой же, как в контрольном опыте (рН 8,8). Теперь к контрольному опыту добавить 4 капли 0,1 н. едкого натра, при этом появляется ярко-красная окраска, соответствующая рН 9,1, и добавить к основному опыту 0,1 н. едкого натра до появления такой же окраски.

Для расчета результатов определения вычесть из объема щелочи, пошедшей на основной опыт, объем затраченной в том же опыте 0,1 н. кислоты и избыток щелочи, пошедший на контрольный опыт. Например, если в контрольном опыте пошло всего 5,1 мл 0,1 н. едкого натра и 4,3 мл 0,1 н. серной кислоты, то избыток щелочи составляет 5,1—4,3—0,8 мл. При основном титровании затрачено всего 11,0 мл 0,1 н. раствора едкого натра и 0,3 мл 0,1 н. серной кислоты. Отсюда на титрование 10 мл 0,1 н. раствора гликоколла пошло 11,0—(0,3+0,8)=9,9 мл 0,1 н. раствора едкого натра.

При титровании описанным способом продуктов ферментативного расщепления белков результаты определений удобно выражать в миллиграммах формольнотитруемого азота. Так как при гидролизе белков amino- и карбоксильные группы образуются в равных количествах, то 1 мл 0,1 н. раствора едкого натра, затраченного при формольном титровании, соответствует 1,4 мг азота.

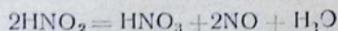
Работа 111. Газометрическое определение свободных аминокрупп по Ван-Слайку

Свободные первичные аминокруппы аминокислот, полипептидов и белков реагируют с азотистой кислотой по уравнению:

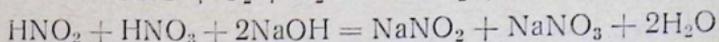
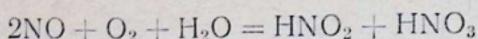


Эта реакция протекает количественно в течение 5—10 мин, если ее вести при обычной температуре в среде ледяной или 80%-ной уксусной кислоты. В нашей лаборатории установлено, что при тех же условиях такое же количественное протекание этой реакции наблюдается и при употреблении вместо уксусной кислоты 1,5 н. серной кислоты.

Одновременно с азотом выделяются и окислы азота, образующиеся при распаде азотистой кислоты:



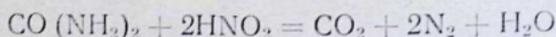
Выделившиеся азот и окислы азота собирают и поглощают окислы азота щелочным раствором перманганата



а оставшийся азот собирают и измеряют его объем. Очевидно, что $\frac{1}{2}$ найденного таким образом азота является азотом аминокрупп.

Вторичный азот триптофана, пролина и оксипролина, вторичный и третичный азот гистидина, гуанидиновая группа аргинина и амидная группа аспарагина не реагирует с азотистой кислотой. Первичная аминокруппа большинства аминокислот количественно реагирует с азотистой кислотой. Однако глицин и цистин образуют более теоретического количества аминоказота (103—107%). Глицинпептиды образуют 120% от рассчитанного теоретически количества азота. Лизин реагирует с азотистой кислотой α - и ϵ -аминокруппами, причем ϵ -аминокруппа реагирует медленнее.

Мочевина реагирует с азотистой кислотой с выделением азота



так же, как и аммиак, пуриновые основания и креатинин, и поэтому эти вещества не должны содержаться в заметных количествах в исследуемом растворе.

При определениях в растворах белков наблюдается иногда сильное вспенивание. Для устранения такого вспенивания жидкости добавить к ней каприловый спирт.

Ход работы. Определение аминоказота ведут в приборе (рис. 19). Прежде чем приступить к определению, наполнить гемпелевскую пипетку *II* прибора щелочным раствором перманганата (50 г KMnO_4 и 25 г KOH в 1000 мл воды) так, чтобы нижний шар был наполнен целиком, а верхний — на $\frac{1}{4}$ своего объема. Газовую бюретку *2* и грушу *3* заполнить водой, причем в капиллярах, соединяющих бюретку *2* с гемпелевской пипеткой *II* и с краном *9*, не должно оставаться воздуха. В воронку *1* налить до метки ледяной или 80%-ной уксусной кислоты, или 1,5 н. серной кислоты и перевести, повертывая кран *7*, 7 мл в сосуд для дезаминирования *4* при повернутом на соединение с наружной атмосферой кране *8*. После этого в сосуд *4* через воронку *1* ввести 20%-ный раствор нитрита натрия, так чтобы сосуд *4* был заполнен раствором до капилляра. Кран *8* закрыть. В сосуде *4* начинается выделение окислов азота, которое ускоряют встряхиванием сосуда. Несколько миллилитров газа выпустить через кран *8* наружу и так делать два-три раза для полного удаления остатков воздуха из сосуда *4*. Теперь, при открытом кране *7* и закрытом кране *8*, начать взбалтывать сосуд *4* для дезаминирования до тех пор, пока выделяющиеся окислы азота не вытеснят жидкость из сосуда *4* до метки *M*. Тогда закрыть кран *7* и поворачивать краны *8* и *9* так, чтобы сосуд *4* соединился

с бюреткой 2, и из градуированной воронки 5, поворачивая кран 10, перевести в сосуд 4 определенный объем исследуемого раствора. Сосуд для дезаминирования 4 взбалтывать с помощью мотора и эксцентрика с постоянной скоростью в течение 5—10 мин. Теперь, опустив грушу 3 и открыв кран, перевести весь газ из сосуда 4 в бюретку 2. При этом жидкость из сосуда 4 должна достигнуть отверстия двухходового крана 9. После этого поворотом двухходового крана 9 установить соединение газовой бюретки 2 с пипеткой Гемпеля 11 и, поднимая грушу 3, перевести газ в пипетку для поглощения окислов азота. Пипетку 11 встряхивать в течение одной минуты с помощью мотора и эксцентрика, оставшийся непоглощенный газ перевести снова в бюретку 2 и измерить его объем. Повторить операцию поглощения окислов азота еще два-три раза, пока объем газа не перестанет изменяться (полное поглощение окислов азота). Тогда измерить объем азота и отметить температуру и атмосферное давление.

Во время всех этих операций кран 7 поворачивать так, чтобы жидкость из сосуда 4 могла вытесняться образующимися в сосуде 4 газами в воронку 1.

Теперь, чтобы убедиться в том, что реакция дезаминирования закончена, выпустить азот из бюретки 2 наружу через кран 8 и, закрыв кран 7, встряхнуть 5 мин сосуд 4. Скопившийся в сосуде 4 газ перевести в бюретку 2, а затем, для поглощения окислов азота, в пипетку 11. После полного поглощения окислов азота измерить объем непоглощенного газа в бюретке 2. Если реакция дезаминирования прошла нацело, то при этом измеряется не более 0,1—0,2 мл азота, т. е. не более того количества его, которое выделяется из реактивов.

После окончания определения, открыв краны 7 и 6, слить жидкость из сосуда 4 и сполоснуть его водой. Открыть кран 10, слить остатки жидкости из воронки 1 и промыть ее водой. После этого прибор готов для нового определения.

Прежде чем вычислять по найденному объему азота аминокот азот взятой навески, необходимо сделать контрольный опыт,

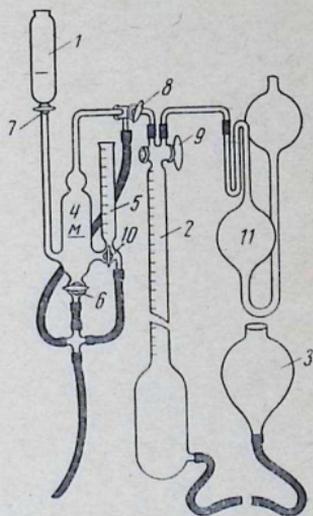


Рис. 19. Прибор для газометрического определения аминокот азота:

1 — воронка, 2 — газовая бюретка, 3 — груша, 4 — сосуд для испытаний, 5 — градуированная пробирка, 6, 7, 8, 9, 10 — краны, 11 — гемпелевская пипетка, М — метка

Количество миллиграммов аминокислота, отвечающее 1 мл газообразного азота, собранного над водой при t 11—30°С и давлении 728—770 ат.м

Температура, °С	Давление, ат.м												
	728	730	732	734	736	738	740	742	744	746	748		
11	0,5680	0,5695	0,5710	0,5725	0,5745	0,5760	0,5775	0,5790	0,5805	0,5820	0,5840		
12	0,5655	0,5670	0,5685	0,5700	0,5720	0,5735	0,5750	0,5765	0,5780	0,5795	0,5815		
13	0,5630	0,5645	0,5660	0,5675	0,5695	0,5710	0,5725	0,5740	0,5755	0,5770	0,5785		
14	0,5605	0,5620	0,5635	0,5650	0,5665	0,5680	0,5700	0,5715	0,5730	0,5745	0,5760		
15	0,5580	0,5595	0,5610	0,5625	0,5640	0,5655	0,5670	0,5685	0,5705	0,5720	0,5735		
16	0,5555	0,5570	0,5585	0,5600	0,5615	0,5630	0,5645	0,5660	0,5675	0,5690	0,5710		
17	0,5525	0,5540	0,5555	0,5575	0,5590	0,5605	0,5620	0,5635	0,5630	0,5665	0,5680		
18	0,5500	0,5515	0,5530	0,5545	0,5560	0,5580	0,5595	0,5610	0,5625	0,5640	0,5655		
19	0,5475	0,5490	0,5505	0,5520	0,5535	0,5550	0,5565	0,5580	0,5595	0,5610	0,5630		
20	0,5445	0,5460	0,5475	0,5495	0,5510	0,5525	0,5540	0,5555	0,5570	0,5585	0,5600		
21	0,5420	0,5435	0,5450	0,5465	0,5480	0,5495	0,5510	0,5525	0,5540	0,5555	0,5575		
22	0,5395	0,5410	0,5425	0,5440	0,5455	0,5470	0,5485	0,5500	0,5515	0,5530	0,5545		
23	0,5365	0,5380	0,5395	0,5410	0,5425	0,5440	0,5455	0,5470	0,5485	0,5500	0,5515		
24	0,5335	0,5350	0,5365	0,5380	0,5400	0,5415	0,5430	0,5445	0,5460	0,5475	0,5490		
25	0,5310	0,5325	0,5340	0,5355	0,5370	0,5385	0,5400	0,5415	0,5430	0,5445	0,5460		
26	0,5260	0,5295	0,5310	0,5325	0,5340	0,5355	0,5370	0,5385	0,5400	0,5415	0,5430		
27	0,5250	0,5265	0,5280	0,5295	0,5310	0,5325	0,5340	0,5355	0,5370	0,5385	0,5400		
28	0,5220	0,5235	0,5250	0,5265	0,5280	0,5295	0,5310	0,5325	0,5340	0,5355	0,5370		
29	1,5195	0,5210	0,5220	0,5235	0,5250	0,5265	0,5280	0,5295	0,5310	0,5325	0,5340		
30	0,5160	0,5175	0,5190	0,5205	0,5220	0,5235	0,5250	0,5265	0,5280	0,5295	0,5310		

Температура, °С	739	752	754	756	758	760	762	764	766	768	770
11	0,5855	0,5870	0,5885	0,5900	0,5915	0,5935	0,5950	0,5965	0,5980	0,5995	0,6010
12	0,5830	0,5845	0,5860	0,5875	0,5890	0,5905	0,5925	0,5940	0,5955	0,5970	0,5985
13	0,5805	0,5820	0,5835	0,5850	0,5865	0,5880	0,5895	0,5910	0,5930	0,5945	0,5960
14	0,5775	0,5790	0,5805	0,5825	0,5840	0,5855	0,5870	0,5885	0,5900	0,5915	0,5935
15	0,5750	0,5765	0,5785	0,5795	0,5810	0,5830	0,5845	0,5860	0,5875	0,5890	0,5905
16	0,5725	0,5740	0,5755	0,5770	0,5785	0,5800	0,5815	0,5830	0,5850	0,5865	0,5880
17	0,5695	0,5710	0,5730	0,5745	0,5760	0,5775	0,5790	0,5805	0,5820	0,5825	0,5850
18	0,5670	0,5685	0,5700	0,5715	0,5730	0,5745	0,5765	0,5780	0,5795	0,5810	0,5825
19	0,5645	0,5660	0,5675	0,5690	0,5705	0,5720	0,5735	0,5750	0,5765	0,5780	0,5795
20	0,5615	0,5630	0,5645	0,5660	0,5675	0,5690	0,5705	0,5725	0,5740	0,5755	0,5770
21	0,5590	0,5605	0,5620	0,5635	0,5650	0,5665	0,5680	0,5695	0,5710	0,5725	0,5740
22	0,5560	0,5575	0,5590	0,5605	0,5620	0,5635	0,5650	0,5665	0,5680	0,5695	0,5715
23	0,5530	0,5545	0,5560	0,5575	0,5595	0,5610	0,5625	0,5640	0,5655	0,5670	0,5685
24	0,5505	0,5520	0,5535	0,5550	0,5565	0,5580	0,5595	0,5610	0,5625	0,5640	0,5655
25	0,5475	0,5490	0,5505	0,5520	0,5535	0,5550	0,5565	0,5580	0,5595	0,5610	0,5625
26	0,5445	0,5460	0,5475	0,5490	0,5505	0,5520	0,5535	0,5550	0,5565	0,5580	0,5595
27	0,5415	0,5430	0,5445	0,5460	0,5475	0,5490	0,5505	0,5520	0,5535	0,5550	0,5565
28	0,5385	0,5400	0,5415	0,5430	0,5445	0,5460	0,5475	0,5490	0,5505	0,5520	0,5535
29	0,5355	0,5370	0,5385	0,5400	0,5415	0,5430	0,5445	0,5460	0,5475	0,5490	0,5505
30	0,5325	0,5340	0,5355	0,5370	0,5385	0,5400	0,5415	0,5430	0,5445	0,5460	0,5475

в котором вместо исследуемого раствора взять равный объем воды. Количество азота, выделяющееся в контрольном опыте, не должно быть больше 0,3—0,4 мл. Этот объем вычесть из найденного в основном опыте.

Пользуясь табл. 8, найти вес аминокислота в мг, отвечающий 1 мл газообразного азота, собранного при определенной температуре и определенном давлении, и найденную величину умножить на объем азота, найденный во время опыта. Деля на навеску в мг и умножая на 100, определить аминокислоту в процентах. Если определение велось для аминокислоты или полипептида, то теоретическое содержание аминокислоты известно. Если же определялся аминокислотный азот в растворе белка, то найденную величину отнести к величине общего азота.

Точность газометрического определения—0,1 мл газообразного азота или 0,05 мг аминокислоты.

Определить аминокислоту в растворах с известной концентрацией гликокола, тирозина и аспарагина.

Работа 112. Количественный анализ аминокислот путем хроматографирования. Определение значений R_f аминокислот

В практической работе наибольшее значение имеет величина R_f (коэффициент скорости движения) данного соединения, которая равна отношению расстояния пройденного данным веществом, к расстоянию, пройденному фронтом растворителя:

$$R_f = \frac{\text{скорость движения вещества}}{\text{скорость движения фронта растворителя}}$$

Величины R_f для всех веществ могут быть легко определены, так как пути, пройденные данным веществом и фронтом растворителя, доступны непосредственному измерению на хроматограмме.

Простейшим полукличесственным методом является визуальное сравнение интенсивности окраски и площади пятна данного соединения с окраской и плотностью пятен «метчиков», которые наносились на ту же хроматограмму в известной концентрации. Точность такого метода не превышает 20—30%.

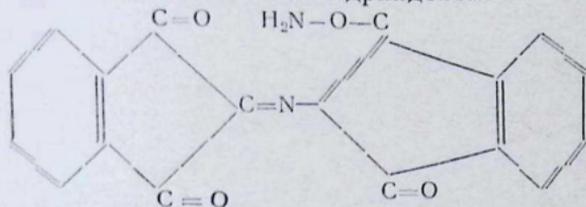
Ход работы. Приготовить стандартные растворы аминокислот (10 мг аминокислоты в 1 мл). Некоторые аминокислоты (тирозин, аспарагиновая кислота) в воде растворяются плохо, поэтому в растворитель добавить по несколько капель HCl. На листы или полосы (ширина 15—20 см) хроматографической бумаги на расстоянии 2,5—3 см нанести микропипеткой такое количество раствора каждой аминокислоты, чтобы содержание аминокислот в местах нанесения было не менее 15—20 мкг, а для триптофана, гистидина, тирозина, лизина и пролина не менее 20—30 мкг.

После подсыхания пятен, хроматограммы закрепить в камере и прилить растворитель. При хроматографировании аминокислот в качестве растворителей чаще всего используют *n*-бутиловый спирт — ледяная уксусная кислота — вода в соотношении 90:10:25 или насыщенный водой фенол. При приготовлении первого растворителя указанные реактивы в необходимых соотношениях тщательно перемешать, и если растворитель получается недостаточно прозрачным, то к нему добавить еще несколько капель уксусной кислоты. При приготовлении насыщенного водой фенола к 300 г перегнанного фенола добавить 105 мл воды и растворитель тщательно перемешать. Если фенол растворяется медленно, смесь можно слегка подогреть, а затем вновь охладить до комнатной температуры. На каждые 100 мл растворителя добавить 50 мк KCN. Хроматограммы выдержать в камере с растворителем в течение 25—30 ч, за этот срок фронт растворителя продвигается почти до нижнего края листа бумаги.

После соответствующей экспозиции бумагу осторожно (лучше в перчатках) вынуть из камеры, отметить карандашом расстояние, пройденное фронтом растворителя, и поместить в вытяжной или в специальный сушильный шкаф. Растворитель бутанол — уксусная кислота — вода полностью испаряется за несколько часов, а фенол — за 1—2 дня.

После удаления растворителя из бумаги, сухую бумагу опрыснуть из пульверизатора 0,2%-ным раствором нингидрина в ацетоне или в бутиловом спирте, поместить в термостат на 5—10 мин при температуре 90°C или оставить при комнатной температуре на 12—20 ч. При этом между аминокислотами и нингидрином происходит реакция (см. работу 97).

Аминокислоты окисляются и распадаются на соответствующие альдегиды, углекислоту и аммиак. Выделившийся аммиак конденсируется со второй молекулой нингидрина и с продуктом его восстановления — дикетоксигидриндиеном:



Интенсивность окраски дикетогидриндидилендикетогидриндинамина пропорциональна содержанию аминокислот.

Для вычисления значений R_F окрашенные пятна аминокислот обводят простым карандашом, определяют центры пятен и расстояние от места нанесения аминокислот, выраженное в миллиметрах, делят на расстояние, пройденное от этой же точки фронтом растворителя.

В табл. 9 приведены значения R_F аминокислот в различных растворителях при хроматографировании на бумаге ватман № 1.

Таблица 9
Значения R_F аминокислот при хроматографировании
(по Б. П. Плешкову)

Аминокислоты	Растворители		
	фенол—вода	бутанол—уксусная кислота—вода (4 : 1 : 1)	бутанол—этиловый спирт—вода (80 : 25, 5 : 60)
Фенилаланин	0,87	0,66	0,45
Цистин	0,03	0,13	0,10
Лизин	0,82	0,16	0,20
Аргинин	0,90	0,18	0,12
Гистидин	0,69	0,17	0,22
Серин	0,36	0,32	0,24
Аспарагиновая кислота	0,15	0,33	0,17
Глицин	0,41	0,34	0,20
Треонин	0,47	0,36	—
Глутаминовая кислота	0,25	0,37	0,16
α -Аланин	0,56	0,39	0,29
Тирозин	0,63	0,53	—
γ -Аминомасляная кислота	0,80	0,60	—
β -Аланин	0,70	0,40	—
Валин	0,76	0,56	—
Метионин	0,83	0,58	—
Триптофан	0,75	0,62	0,42
Пролин	0,89	0,50	0,35
Лейцин	0,87	0,72	0,55
Изолейцин	0,86	0,68	0,56

ОТДЕЛЬНЫЕ ПРЕДСТАВИТЕЛИ БЕЛКОВЫХ ВЕЩЕСТВ

Сложность химического строения белковых веществ не дает возможности в настоящее время построить такую классификацию этих соединений, которая была бы основана на тех или иных особенностях их структуры. Поэтому при всех попытках классификации белков, а также при характеристике каждого отдельно представителя этой группы веществ необходимо, привлекая, насколько это возможно, данные, касающиеся химического со-

става и свойств белкового вещества, пользоваться рядом других отличительных признаков. При характеристике белка таким образом, имеют значение как аминокислотный состав, так и его растворимость, границы осаждения (границы высаливания), положение изоэлектрической точки, отношение к ферментативным воздействиям, выделение белка из той или иной ткани или органа и его физиологическая функция. На основе этих данных может быть построена следующая классификация белков, представляющая скорее общий обзор важнейших групп этих соединений.

ПРОТЕИНЫ

При полном гидролизе дают почти исключительно аминокислоты.

Протамины и гистоны. Отличаются высоким содержанием диаминокислот, отсутствием серусодержащих аминокислот и ограниченным числом аминокислот, входящих в их состав. Белки основного характера с небольшим, сравнительно с другими белками, молекулярным весом. Они растворимы в воде и разбавленных кислотах и осаждаются из растворов при добавлении аммиака, щелочей или белков. К протаминам относятся белки, выделенные из спермы рыб (крупен, сальмин, стурин и др.), где они находятся в соединении с нуклеиновыми кислотами. Протамины, растворяясь в воде, дают щелочные растворы, не коагулирующие при нагревании; они содержат до 87% аргинина. Основной характер у них более резко выражен, чем у гистонов. Гистоны содержат около 20—30% диаминокислот, обладают ясно выраженным основным характером, в клетках животных находятся в виде соединений с нуклеиновыми кислотами или пигментами (в составе нуклеопротендов и хромопротендов).

Альбумины. Аминокислотный состав альбуминов разнообразен и характеризуется очень низким содержанием или полным отсутствием глицина и сравнительно высоким содержанием цистина и метионина. Растворимы в воде и осаждаются из растворов при нейтральной реакции лишь при полном насыщении сернокислым аммонием. Альбумины — белки преимущественно животного происхождения. К ним относятся: лактальбумин, овальбумин, серумальбумин, мнoальбумин и мнoген.

Глобулины. Близки по аминокислотному составу к альбуминам. Отличаются от альбуминов содержанием глицина и нерастворимостью в воде. Растворимы в разбавленных растворах солей. Коагулируют из нейтральных растворов легче, чем альбумины, при полунасыщении сернокислым аммонием или при полном насыщении хлористым натрием. Ввиду своей нерастворимости в воде, осаждаются из растворов при диализе. Встречаются как в животных, так и в растительных организмах. К растительным глобулинам относятся эдестин (конопля), тубе-

рин (картофель), эксцельсин, глицинин, легумин, фермент уреазы и другие; к животным глобулинам — фибриноген (плазма крови), глобулин X и миозин (мышцы), лактоглобулин, серумглобулин, гепатоглобулин, а также некоторые белки с действием ферментов и гормонов: пепсин, трипсин, фосфорилаза мышц, тиреоглобулин (гормон щитовидной железы), пролактин и тиреотропный гормон (гормоны гипофиза) и др.

Проламины и глютелины. Глютелины и проламины — растительные белки, нерастворимые в воде и растворимые в сильно разбавленных кислотах и щелочах. Проламины растворимы, кроме того, в 70—80%-ном спирте. Отличаются высоким содержанием пролина или глутаминовой кислоты. К проламинам относятся глиадин, горденин, секалин, папанин и другие растительные белки.

Склеропротейны (альбуминоиды). Эта группа фибриллярных белков, выполняющих в организме животных роль опорных и покровных веществ. Они практически нерастворимы и весьма устойчивы к химическим и ферментативным воздействиям. Склеропротейны характеризуются тем, что в них отсутствуют некоторые аминокислоты, но содержание других высокое. Например, много глицина в коллагене и фибрине, цистина в кератине). К склеропротейнам относятся коллаген, эластин, ретикулин, кератин, нейрокератин, фиброин шелка, конхиолин и спонгин.

Фосфопротейны. Белки кислого характера содержащие эфирносвязанную с остатком серина фосфорную кислоту. Фосфорная кислота отщепляется при нагревании в щелочных растворах. Содержание фосфора 0,5—0,9%. Фосфопротейны нерастворимы в воде, но растворимы в разбавленных щелочах. Осаждаются при полунасыщении сернистым аммонием. К фосфопротейнам относятся казеин молока и вителин яичного желтка.

ПРОТЕИДЫ

Состоят из двух компонентов: собственно белкового вещества и вещества небелкового характера, так называемой простетической группы. Простетическая группа протеидов в большинстве случаев может быть сравнительно легко отщеплена от белковой части молекулы. Некоторые из этих соединений по своему характеру сходны с солями.

Нуклеопротейды. Соединения нуклеиновых кислот (полинуклеотидов) с белками преимущественно основного характера (гистоны, протамины), содержат 3—6% фосфора, нерастворимы в воде и разбавленной уксусной кислоте, растворимы в разбавленных щелочах.

Нуклеиновые кислоты участвуют в важнейших процессах жизнедеятельности организма: синтез белков, рост и размножение и др.

Нуклеиновая кислота отщепляется при действии кислот и щелочей. К нуклеопротеидам, содержащим нуклеиновые кислоты, относятся, например, нуклеопротеиды зубной железы и дрожжей и вирусы.

Ферменты — протеиды, содержащие в качестве простетической группы динуклеотиды, фосфорный эфир рибофлавина, пиррофосфорный эфир тиаминна и родственные им соединения. Сюда относятся: дегидрогеназы, содержащие ди- и трифосфопиримидинуклеотиды (НАД и НАДФ), карбоксилазы, содержащие тиаминпиррофосфат и флавопротеиды, к которым принадлежат, например, флавиновые ферменты, ксантинооксидаза, содержащая в качестве простетической группы изоаллоксазин-адениндинуклеотид, глицинооксидаза и оксидазы *L*-аминокислот.

Глюкопротеиды. Белки, содержащие остаток полисахарида, гиалуроновой кислоты или эфиров серной кислоты и полиуронидов. Растворимы в воде или разбавленных щелочах. Углеводный компонент отщепляется при кипячении с щелочами. Сюда относятся: муцины, мукоиды, сульфомуцины, хондромукоиды, тромбин.

Липопротеиды. Соединения белков с фосфатидами и стероидами. Липидный компонент отщепляется действием спирта, желчных солей или растворов мочевины. Свойства различны в зависимости от свойств белкового компонента. Сюда относятся: эвглобулин сыворотки крови, лецитовителлин яичного желтка, тромбопластин.

Хромопротеиды. Протеиды, содержащие, наряду с белковым компонентом, окрашенное соединение (пигмент). Простетическая группа отщепляется при нагревании с щелочами или кислотами. К этой группе относятся красные дыхательные пигменты эритроцитов позвоночных животных, представляющие соединения гема с белками типа гистонов — глобинами. Гемоглобины растворимы в воде и осаждаются или при полном насыщении, или при полунасыщении серноокислым аммонием.

К хромопротеидам относятся также окрашенные геминные соединения с белками, такие как миоглобин (миохром) поперечнополосатых мышц, эритрокруорин беспозвоночных, каталаза и пероксидазы, цитохром *c*. Некоторые хромопротеиды представляют собой не содержащие железа или меди соединения желчных пигментов с белком. Кроме того, к хромопротеидам могут быть отнесены и окрашенные соединения белков с каротиноидами.

Металлопротеиды. Протеиды, содержащие в качестве простетической группы Cu , Fe , Zn . Сюда относятся такие ферменты, как фенолоксидазы (тирозины), и такие дыхательные пигменты беспозвоночных, как гемоцианины, представляющие собой Cu -протеиды. Инсулин — гормон поджелудочной железы, по многим свойствам сходный с альбуминами, но резко отличаю-

щийся от них по своей растворимости в водном алкоголе, содержит Zn и также может быть отнесен к этой группе белков.

Специфичность структуры различных белков значительно тоньше, чем это можно заключить на основании приведенной схематической классификации. Белки, как антигены, вызывают в условиях биологического опыта образование антител, строго специфичных по отношению только к данному белку. Но эта особенность, обнаруживаемая иммунными реакциями и имеющая в своей основе химическое строение белковой молекулы, не нашла еще достаточно точного структурного химического выражения.

Работа 113. Яичный альбумин (овальбумин)

Ход работы. Яичный белок смешать с пятикратным объемом воды и выпавший яичный глобулин отфильтровать. В полученном фильтрате определить наличие альбумина осаждением путем нагревания и применением алкалоидных реактивов, а затем для подтверждения альбуминового характера обнаруженного белка определить границы высаливания. Для этого в девять пробирок налить (в каждую!) по 1 мл раствора белка. После этого долить различное количество воды так, как это указано в приведенной форме, а затем в первые восемь пробирок добавить возрастающий объем насыщенного раствора сернокислого аммония, а в девятую твердой соли $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до полного насыщения.

Количественное содержание компонентов	Пробирки								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Раствор белка, мл	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Вода, мл	7,0	6,0	5,0	4,0	3,0	2,0	1,0	0,0	9,0
Насыщенный раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, мл	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	Твердая соль
Процент от полного насыщения	20	30	40	50	60	70	80	90	100

Пробирка, дающая заметную муть при минимальной (сравнительно с другими пробирками) концентрации сернокислого аммония, определяет нижнюю границу высаливания. Если, например, помутнение (выпадение белка в осадок) происходит,

начиная с пятой пробирки, то нижняя граница высаливания — 60% от полного насыщения серноокислым аммонием.

После некоторого стояния выпавшие осадки белка отфильтровать и к фильтратам добавить твердый серноокислый аммоний до насыщения. Пробирка с минимальной концентрацией серноокислого аммония (см. форму), в которой жидкость не дает при этом помутнения, определяет верхнюю границу высаливания белка.

Если необходимо более точно определить границы высаливания белка, взять большее число различных концентраций серноокислого аммония.

Работа 114. Сывороточный альбумин (серумальбумин)

Ход работы. Оксалатную кровь, т. е. кровь, стабилизированную добавлением щавелевокислого калия (удалены ионы кальция), отцентрифугировать и разделить плазму от форменных элементов. К 30 мл полученной плазмы добавить 20 мл воды, затем 50 мл насыщенного раствора серноокислого аммония. Выпавший осадок, состоящий из фибриногена и сывороточного глобулина, отфильтровать и фильтрат насытить добавлением твердого серноокислого аммония. Образовавшийся осадок альбумина отфильтровать и растворить, добавляя к осадку воды. Отделить на центрифуге прозрачный раствор альбумина и с этим раствором проделать реакции осаждения и цветные реакции.

Работа 115. Коллаген

Ход работы. I. Измельченные сухожилия настаивать несколько часов с водой для удаления растворимых в воде белков. Затем извлечь в течение суток полунасыщенным раствором гидрата окиси кальция глюкопротенд—тендомукоид. После этого осадок тщательно промыть в проточной воде до исчезновения щелочной реакции в промывных водах. Затем остаток подвергнуть нагреванию в воде в фарфоровой чашке в течение нескольких часов при постоянном кипении жидкости. Время от времени доливать воду взамен испарившейся. При извлечении горячей водой нерастворимый коллаген, подвергаясь очень неглубокому гидролизу, превращается в желатину (глутин), которая переходит в раствор. Слить раствор, несколько разбавить его водой и проделать реакции осаждения и цветные реакции на белки (этот раствор при охлаждении желатинирует). В противоположность альбуминам и глобулинам желатина не дает реакций на триптофан и тирозин и дает лишь слабую реакцию — на цистин.

II. Органическую часть кости, оставшуюся после удаления минеральных веществ (см. работу 4), хорошо отмыть водой от

кислоты до почти полного исчезновения реакции на Cl^- и извлечь горячей водой, как это было проделано с обработанными сухожилиями. Исследовать с обработанными полученный раствор желатины на отдельные аминокислоты.

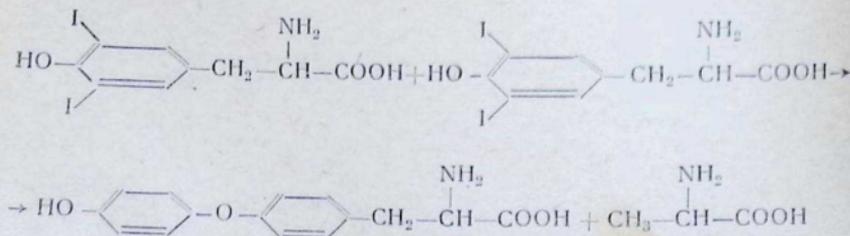
Работа 116. Казеин

Ход работы. I. Получение казеина. Дать молоку отстояться и тщательно снять верхний слой (жир). Снятое молоко разбавить двумя объемами воды и затем при помешивании по каплям осторожно добавить 0,1—0,5%-ную уксусную кислоту до прекращения выделения осадка белка (следует избегать значительного избытка уксусной кислоты). Осадок казеина отсосать, промыть два-три раза водой и затем спиртом, отжать на воронке под вакуумом и высушить на воздухе. В кислом фильтрате (молочная сыворотка) находятся молочный глобулин и альбумин. Их осадить насыщением фильтрата сернокислым аммонием или кипячением раствора после подкисления.

II. Реакции на аминокислоты. Высушенный казеин экстрагировать на холоду эфиром для освобождения от небольшого количества оставшегося жира. Жир слить, осадок отжать и высушить на воздухе. Полученный чистый казеин обладает ясно кислым характером. Определить его растворимость в разбавленных растворах едких щелочей и в растворе соды. С раствором казеина в растворе соды проделать реакции осаждения и цветные реакции.

III. Йодирование казеина. 10 г казеина растворить в 350 мл 5%-ного аммиака и добавить раствор, включающий 3 г йода и 6 г йодистого калия в 100 мл воды. Смесь оставить на час, затем подкислить. Выпавший йодированный казеин отделить и многократно промыть водой или диализировать до исчезновения реакции на йодиды. Отмытый осадок отсосать и высушить. В полученном продукте определить органически связанный йод по способу, описанному в работе 5.

При йодировании казеина тирозин образует моно- и дийодтирозин. Если реакция ведется с достаточным количеством йода, при достаточно высоком pH и при температуре 40—70°С, то дийодтирозин превращается в тироксин:

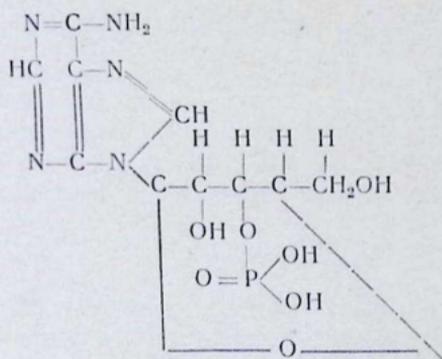


и получается препарат йодированного казеина, обладающий тиреостатической активностью (активностью гормона щитовидной железы).

Работа 117. Нуклеопроteid дрожжей

Ход работы. Прессованные дрожжи тщательно растереть с чистым песком, добавив несколько миллилитров эфира и воды. Растертые дрожжи залить трехкратным (к весу дрожжей) объемом 0,4%-ного раствора едкого натра, добавить 1—2 мл толуола и оставить на сутки. После этого щелочной экстракт, содержащий нуклеопроteid, отфильтровать через большой складчатый фильтр и из фильтрата осадить нуклеопроteid осторожным добавлением 5%-ной серной кислоты до прекращения выделения осадка. Осадок нуклеопротеида отделить центрифугированием, разбавив небольшим количеством воды, и снова отделить центрифугированием, разбавив небольшим количеством воды, и снова отделить. С полученным нуклеопроteidом проделать цветные реакции на белки, а затем часть его подвергнуть гидролизу, для чего в течение двух часов кипятить с 10—20-кратным объемом 5%-ной серной кислоты в небольшой колбе с обратным холодильником.

При этом происходит не только отщепление нуклеиновой кислоты, но и дальнейший ее гидролиз вначале до мононуклеотидов, среди которых обнаруживается дрожжевая адениловая кислота или *h*-адениловая кислота (9-аденил-3-фосфорибозид), отличающаяся от адениловой кислоты мышц (9-аденил-5-фосфорибозид) положением остатка фосфорной кислоты:



Затем мононуклеотиды гидролизуются в нуклеозиды с отщеплением фосфорной кислоты и, наконец, последние расщепляются, образуя пуриновые и пиримидиновые основания и *D*-рибозу или глюкозу. Дезоксирибоза разрушается при кислотном гидролизе.

I. Пробы на фосфорную кислоту, редуцирующий сахар и пуриновые основания. По охлаждении гидролизат нейтрализовать аммиаком и профильтровать. К части фильтрата добавить азотной кислоты и раствора молибденовокислого аммония и затем нагреть на водяной бане. Выпадает желтый осадок фосфорномолибденовокислого аммония (см. работу 3).

Другую часть фильтрата сильно подщелочить добавлением раствора едкого натра и проделать пробу Фелинга на редуцирующий сахар (см. работу 45).

К оставшейся части фильтрата добавить 5 мл аммиачного раствора азотнокислого серебра. При этом выпадает осадок соединений серебра аденина и гуанина.

II. Пробы на пентозу и на дезоксисахар. К небольшому количеству нуклеотида добавить равный объем концентрированной соляной кислоты и нагреть до кипения, прикрыв отверстие пробирки куском смоченной уксусом анилина, бумаги. Выделяющийся фурфурол окрашивает бумагу в розовый или красный цвет.

Небольшое количество нуклеопрогена (лучше чистой нуклеиновой кислоты) смешать с 4 мл ледяной уксусной кислоты и нагревать непродолжительное время. Затем постепенно добавить 10—15 капель концентрированной серной кислоты, содержащей 0,01% закисного сернокислого железа. При наличии дезоксисахара после осторожного нагревания раствор дает зеленоватое переходящее в пурпурно-синее окрашивание.

Работа 118. Гемоглобин

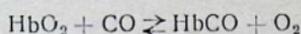
Гемоглобин (Hb) — окрашенный в красный цвет дыхательный протеид, входящий в состав эритроцитов крови позвоночных животных, представляет собой, как это впервые обнаружил в 1898 г. Д. Лавров, соединение белка глобина (с изоэлектрической точкой при pH 7,5) и окрашенного, содержащего двухвалентное железо, гема. Молекулярный вес гемоглобина ~ 70 000, а содержание в нем железа 0,33%, откуда очевидно, что на одну молекулу глобина приходится четыре молекулы гема.

Белковые компоненты обуславливают видовую специфичность гемоглобинов, но гем у различных позвоночных животных один и тот же.

Гемоглобин чрезвычайно легко образует непрочное и легко диссоциирующее соединение с молекулярным кислородом — оксигемоглобин (HbO₂). При таком присоединении не происходит изменения валентности Fe²⁺ гема. Оксигемоглобин образуется настолько легко, что в присутствии кислорода воздуха практически весь гемоглобин превращается в оксигемоглобин. С другой стороны, оксигемоглобин не только в присутствии восстановителей, поглощающих кислород, но и в вакууме при

пропускании индифферентного газа превращается в гемоглобин. Гемоглобин — очень слабая кислота с $K_{37^\circ} = 7,5 \cdot 10^{-9}$. Кислотные свойства повышаются при превращении в оксигемоглобин, у которого $K_{37^\circ} = 5 \cdot 10^{-7}$.

Гемоглобин дает соединения и с другими газами (СО, HCN, H₂S). С окисью углерода он образует карбоксигемоглобин (HbCO), соединение более прочное, чем оксигемоглобин. Сродство гемоглобинов различных животных к СО различно. Реакция превращения HbO₂ в HbCO обратима:



Гемоглобин дает непрочное соединение и с СО₂:



которое играет известную роль в переносе угольной кислоты кровью.

При действии на оксигемоглобин окислителей образуется метгемоглобин (МНб). При этом происходит окисление гема двухвалентного железа в трехвалентное и метгемоглобин теряет способность участвовать в переносе кислорода. Образование метгемоглобина может наблюдаться и *in vivo*, например, при отравлении КСlO₃, нитросоединениями, пирогаллом и другими соединениями. Компонентами метгемоглобина являются белок глобин и пигмент гематин, отличающийся от гема тем, что содержит F⁺³.

Гемоглобин, оксигемоглобин, карбоксигемоглобин и метгемоглобин могут быть качественно охарактеризованы присущими им спектрами поглощения.

Ход работы. Оксигемоглобин (HbO₂). Приготовить в четырех пробирках разведенную водой в 30, 60, 120 и 240 раз дефибрированную кровь и исследовать растворы в спектроскопе.

При одном из этих разведений совершенно отчетливо виден спектр поглощения оксигемоглобина — две полосы поглощения в желтой и зеленой части спектра (578,1 мк и 541,7 мк) между линиями D и E (рис. 20).

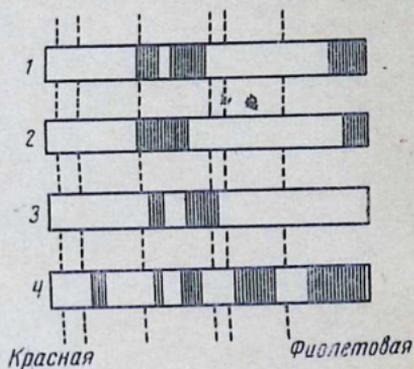


Рис. 20. Спектры некоторых производных гемоглобина в ручном спектроскопе:
1 — оксигемоглобин, 2 — гемоглобин, 3 — карбоксигемоглобин, 4 — метгемоглобин

Гемоглобин (Hb). К раствору крови, который дал в предыдущем опыте ясно видимую картину спектра оксигемоглобина, прибавить несколько капель реактива, содержащего 2 г FeSO_4 и 3 г винной кислоты в 100 мл воды. Происходит восстановление оксигемоглобина в гемоглобин и в спектроскопе видна характерная для гемоглобина одна широкая полоса поглощения (555—558 мμ) между линиями *D* и *E*. Полученный раствор гемоглобина встряхнуть для того, чтобы смешать с воздухом, и затем наблюдать в спектроскопе. Спектр гемоглобина переходит снова в спектр оксигемоглобина, т. е. появляются две полосы поглощения.

Метгемоглобин (МНб). К дефибринированной крови, разведенной в 30 раз, добавить несколько капель свежеприготовленного концентрированного раствора красной кровяной соли $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ и перемешать жидкость. При исследовании в спектроскопе виден спектр метгемоглобина — три полосы поглощения: две между линиями *D* и *E* и одна, наиболее резкая, при 630 мμ, между *C* и *D*. Добавить к раствору метгемоглобина несколько капель раствора сернистого аммония. При этом образуется гемоглобин и в спектроскопе видна одна широкая полоса поглощения между *D* и *E*.

Карбоксигемоглобин (HbCO). Насытить кровь светильным газом, который всегда содержит окись углерода. Кровь при этом приобретает ярко-розовый цвет. Разбавить ее водой в 30 раз и наблюдать в спектроскопе спектр карбоксигемоглобина — две полосы поглощения (572—537 мμ) между линиями *D* и *E*. Этот спектр очень сходен со спектром поглощения оксигемоглобина. Для того чтобы отличить спектр HbCO от спектра HbO₂, к раствору карбоксигемоглобина прибавить несколько капель реактива, содержащего 2 г FeSO_4 и 3 г винной кислоты в 100 мл воды. При этом в противоположность HbO₂ не происходит никакого изменения спектра, так как карбоксигемоглобин не переходит при действии реактива в гемоглобин.

ПРОДУКТЫ ГИДРОЛИТИЧЕСКОГО РАСЩЕПЛЕНИЯ БЕЛКОВ И ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ БЕЛКОВ И ПОЛИПЕПТИДОВ

Изучению физиологического акта пищеварения посвящены классические работы великого русского физиолога акад. И. П. Павлова и его учеников. Основные результаты этих исследований изложены И. П. Павловым в его замечательном сочинении «Лекции о работе главных пищеварительных желез».

Белки пищи подвергаются в желудочно-кишечном тракте животных действию ряда пищеварительных соков, содержащих протеолитические ферменты (пептид-пептидогидролазы). В ре-

зультате воздействия протеаз и полипептидаз желудочно-кишечного тракта белки пищи претерпевают полное гидролитическое расщепление с образованием аминокислот. В качестве промежуточных продуктов этого энзиматического гидролиза образуются пептоны, полипептиды и дипептиды. Только аминокислоты и, отчасти, полипептиды всасываются стенкой кишечника в кровь; нерасщепленные белки и продукты их начального гидролиза в норме не всасываются. Проникновение нерасщепленных белков через кишечную стенку, так же как и парэнтеральное введение белков, влечет за собой образование антител и анафилактические явления. Поэтому энзиматический гидролиз белков пищи не только подготавливает их к всасыванию в виде аминокислот, но имеет и значение защитной реакции организма, препятствующей проникновению чужеродных белков.

Энзиматический гидролиз белков пищи начинается в желудке млекопитающих под действием желудочного сока, содержащего соляную кислоту и пепсин. В период наиболее активного пищеварения содержимое желудка имеет рН 1,3—2,5. Пепсин — пептид-пептидогидролаза ускоряет гидролиз белков, находящихся в состоянии амфкатнонов. Оптимум активности пепсина лежит около рН 2 и несколько отличен для различных белков. При рН > 5,0 действие пепсина прекращается, а при рН > 8,0 пепсин необратимо инактивируется.

Пепсин — белковое вещество с молекулярным весом ~ 34 500 и изоэлектрической точкой при рН 2,7. Железистыми клетками слизистой желудка выделяется неактивный зимоген пепсина — пепсиноген, который при кислой реакции желудочного сока, создающейся в результате секреции соляной кислоты слизистой фундальной части желудка, превращается в активный пепсин (см. работу 29).

Продуктами пептического гидролиза белков являются преимущественно альбумозы и пептоны. При длительном воздействии пепсина при оптимальных условиях, в качестве продуктов гидролиза образуются в небольшом количестве аминокислоты. Не все белки одинаково легко подвергаются пептическому гидролизу. Сравнительно слабо расщепляются пепсином коллагены и эластины и совсем не расщепляются кератины, муцины, фибрин, овомукоид и некоторые другие белки.

Кроме протеолитической активности пепсину свойственна и коагулазная активность, т. е. способность ускорять свертывание молока, заключающееся в энзиматическом превращении казеина молока в параказеин и сывороточную альбумозу. В присутствии ионов кальция параказеин образует параказеинат кальция, выделяющийся в виде геля (см. работу 31). Оптимум коагулазного действия пепсина при рН 5,3.

Коагулазное действие еще более выражено у другого фермента — химозина (ренина), находящегося, наряду с пепсином,

в желудочном соке молодых млекопитающих. Оптимум активности химозина при рН 3,5—5,3. Химозин — некоагулирующая протеаза с изоэлектрической точкой при рН 4,5, в противоположность пепсину сохраняющая активность при рН > 9,0.

В кишечнике, где пищевая масса приобретает кислотность, близкую к рН 7,0, как белки пищи, так альбумозы и пептоны, образовавшиеся в результате желудочного пищеварения, подвергаются дальнейшему гидролизу при действии ферментов панкреатического сока: трипсина, химотрипсина и карбоксипептидазы.

Трипсин — протеаза, ускоряющая гидролиз белков, находящийся в состоянии амфанонов, с оптимумом активности при рН 8,0. Трипсин — белковое вещество с молекулярным весом ~ 23 000. В панкреатической железе образуется неактивный трипсиноген, который при действии специфического активатора — энтерокиназы, выделяемой слизистой двенадцатиперстной кишки и тонкого отдела кишечника, превращается в трипсин (см. работу 30). Трипсин ускоряет гидролиз пептидных связей белков, альбумоз и пептонов. Многие нативные белки лишь с трудом расщепляются трипсином. Триптический гидролиз таких белков идет значительно быстрее после их денатурации или после предварительного расщепления пепсином. Продуктами триптического гидролиза являются поли- и дипептиды и аминокислоты. Трипсину свойственно и коагулазное действие.

Химотрипсин — вторая протеаза панкреатического сока, обладающая более высоким, чем у трипсина, коагулазным действием. Клетками панкреатической железы образуется неактивный химотрипсиноген, который превращается в химотрипсин при действии трипсина. Химотрипсин, подобно трипсину, ускоряет при рН 7,6 гидролиз белков, альбумоз и пептонов, а также и протаминов.

Энзиматический гидролиз полипептидов и дипептидов, образовавшихся в результате триптического расщепления, заканчивается в кишечнике под действием карбоксипептидазы панкреатического сока и комплекса поли- и дипептидаз, выделяемых слизистой тонких кишок. Этот комплекс, носящий часто название эрепсина, включает аминополипептидазу, пролидазу, пролиназу и другие дипептидазы. Под воздействием всех этих ферментов поли- и дипептиды гидролизуются до аминокислот.

Большинство аминокислот, образовавшихся при переваривании белков пищи, всасывается в кровь стенкой кишечника, но некоторая часть их избегает всасывания, так как подвергается ряду превращений за счет действия ферментов микроорганизмов кишечной флоры. В этих процессах микробного разложения белков (так называемого гниения) в кишечнике существенную

роль играет реакция декарбоксилирования аминокислот, подробно исследованная советским исследователем С. Р. Мёрдашевым. Процессы гниения приводят к образованию из тирозина фенола и крезола, из триптофана — индола и скатола, из орнитина и лизина — путресцина и кадаверина. Соединения эти также частично всасываются в кровь, причем фенолы, индол и скатол обезвреживаются в печени путем превращения в гликозиды глюкуроновой кислоты или эфиры серной кислоты и в таком виде выделяются с мочой.

Протеазы и пептидазы обнаружены не только в составе пищеварительных соков, но и во многих животных и некоторых растительных тканях. Протеаза животных тканей — катепсин ускоряет гидролиз белков, находящихся в изоэлектрическом или близком к изоэлектрическому состояниях. Оптимум активности катепсина лежит при 4—5; при рН ~7,0 он неактивен. Поэтому действие катепсина становится особенно заметным при посмертном автолизе тканей, когда $[H^+]$ тканей повышается. Катепсин активируется соединениями, содержащими сульфгидрильные группы. Катепсин гидролизует белки с образованием альбумоз и пептонов. В тканях катепсин находится, обычно, вместе с пептидазами и дипептидазами. Он найден во многих животных тканях, но особенно богаты им ткани печени, почек и селезенки. По некоторым данным катепсин встречается также в составе желудочного сока.

Работа 119. Кислотные и щелочные альбуминаты

Кислотные альбуминаты, образующиеся при действии на белки кислот, нерастворимы в воде и солевых растворах, но легко растворимы в разбавленных кислотах и щелочах. Кислотные альбуминаты не коагулируют при нагревании их растворов и из кислых растворов выпадают при добавлении щелочей при слабокислой реакции, а из щелочных растворов — при добавлении кислот — при слабощелочной реакции.

Щелочные альбуминаты, образующиеся при действии на белки едких щелочей, также нерастворимы или очень мало растворимы в воде и солевых растворах, но легко растворимы в разбавленных кислотах и щелочах. При нагревании растворов щелочных альбуминатов их осаждения не происходит. Щелочные альбуминаты коагулируют из кислых растворов при нейтрализации, а из щелочных растворов — при добавлении кислот, при слабокислой реакции.

Как кислотные, так и щелочные альбуминаты осаждаются из кислых растворов при насыщении средними солями. Кислотные альбуминаты при осторожном нагревании в щелочных растворах переходят в щелочные альбуминаты, последние же не могут быть переведены в кислотные альбуминаты, так как

представляют собой продукты более глубокого изменения молекулы белка.

Ход работы. I. Кислотный альбуминат. 3 мл белка куриного яйца смешать с 1 мл ледяной уксусной кислоты. После некоторого стояния добавить воду, перемешать и отфильтровать раствор кислотного альбумината от незначительного количества нерастворимого осадка. Раствор разделить на три части. Первую нагреть до кипения, причем осаждения не произойдет. Ко второй части добавить несколько капель раствора лакмоида и по каплям разбавленный раствор едкого натра. Уже при слабокислой реакции образуется осадок кислотного альбумината. К жидкости с осадком добавить еще раствор едкого натра, при этом осадок растворяется. При добавлении кислоты к полученному щелочному раствору белка образуется осадок (реакция слабо-щелочная). К третьей части раствора кислотного альбумината добавить до насыщения хлористый натрий, при этом образуется осадок альбумината.

II. Щелочной альбуминат. К 3 мл белка куриного яйца добавить несколько капель 30%-ного раствора едкого натра при помешивании до образования студнеобразной массы. Затем добавить воды и полученный раствор нагреть до кипения. Коагуляции при этом не происходит. Охлажденный раствор разделить на две части. К первой части раствора прибавить несколько капель лакмоида и затем по каплям разбавленной уксусной кислоты. Щелочной альбуминат осаждается при слабокислой реакции. При дальнейшем добавлении уксусной кислоты образовавшийся осадок растворяется; к кислому раствору добавить разбавленный раствор щелочи до получения слабокислой реакции, при этом щелочной альбуминат снова коагулирует. Ко второй части раствора, после осторожной нейтрализации разбавленной уксусной кислотой добавить до насыщения хлористый натрий, при этом образуется осадок щелочного альбумината.

Работа 120. Альбумозы и пептоны

Для нижеследующих опытов по исследованию свойств альбумоз и пептонов пользуются раствором пептона в 3—5%-ном растворе хлористого натрия.

Ход работы. I. Нагреть раствор до кипения и наблюдать, будет ли коагуляция.

II. К раствору в нескольких пробирках добавить по каплям до осаждения азотной, уксусной и сульфосалициловой кислоты. Образующиеся осадки в растворе при нагревании растворяются и при охлаждении снова выпадают. Этим образовавшиеся осадки, обусловленные присутствием альбумоз, отличаются от подобных же осадков белков.

III. Раствор подкислить уксусной кислотой и добавить несколько капель раствора железистосинеродистого калия. Выпадает осадок, растворяющийся при нагревании и вновь появляющийся при охлаждении.

IV. Раствор подкислить уксусной кислотой и насытить, добавляя твердый сернокислый аммоний. При этом альбумозы выпадают в осадок. Осадок отфильтровать, растворить в 3—5%-ном растворе хлористого натрия и с полученным раствором проделать биуретовую реакцию (красноватый оттенок здесь сильнее выражен, чем у белков). В фильтрате остаются пептоны, которые открыты с помощью той же биуретовой реакции и осаждением с фосфорновольфрамовой и сульфосалициловой кислотой и с танином.

Работа 121. Продукты пептического гидролиза белков

Ход работы. К 1 мл разбавленного физиологическим раствором в два раза белка куриного яйца прибавить 10 мл 0,1%-ного раствора пепсина в 0,2%-ной соляной кислоте и поставить смесь в термостат при 37°С на 25—30 мин. После этого к жидкости добавить несколько капель раствора лакмонда и (осторожно!) разбавленный раствор едкого натра до слабокислой реакции; при этом выпадает осадок кислотного альбумината, который отфильтровать. Фильтрат нагреть до кипения, в осадок выпадает неизменный белок. Осадок отфильтровать от еще горячей жидкости и в полученном фильтрате открыть альбумозы и пептоны, как это описано в разделе IV работы 120.

Работа 122. Продукты триптического гидролиза белков

Ход работы. 20 мл 4—5%-ного раствора казеина в 0,5%-ном растворе соды смешать с 2—3 мл раствора трипсина и оставить в термостате при 37°С на 30—40 мин. После этого жидкость осторожно подкислить до слабокислой (на лакмонд) реакции и отфильтровать выпавший осадок щелочного альбумината. Фильтрат нагреть до кипения, при этом выпадает в осадок белок. Жидкость фильтровать еще горячей и в фильтре открыть альбумозы и пептоны (как в предыдущей работе), а затем открыть свободный триптофан, для чего 5—3 мл гидролизата нейтрализовать уксусной кислотой, добавить 1 мл амилового спирта, и затем по каплям свежеприготовленную бромную воду. Хорошо встряхнуть. В присутствии триптофана слой амилового спирта окрашивается в красно-фиолетовый цвет.

Избыток бромной воды обесцвечивает образующееся окрашенное соединение. Реакцию можно вести и не употребляя амилового алкоголя.

Работа 123. Действие комплекса ферментов эрепсина

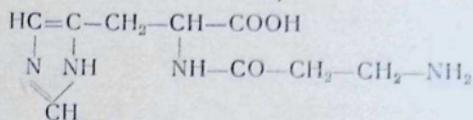
Для получения эрепсина снятую свежую слизистую оболочку кишечника извлечь пятикратным объемом 87%-ного глицерина. После двухдневного настаивания добавить три объема воды и жидкость отцентрифугировать, отделить от осадка. Таким образом получить экстракт, содержащий комплекс ферментов эрепсина (аминопептидазу и дипептидазу), наряду с некоторым количеством неактивного белка.

Ход работы. К раствору пептонов, полученному в результате гидролиза белка пепсином (см. работу 121), добавить экстракт, содержащий комплекс ферментов эрепсина, и поставить в термостат при 40° С. Время от времени брать пробу, в которой после осаждения белков кипячением делать биуретовую пробу. Проба дает фиолетово-красное окрашивание, постепенно исчезающее по мере гидролиза полипептидов. Параллельно поставить опыт с таким же количеством инактивированного кипячением экстракта эрепсина. В этом опыте не наблюдается исчезновения или ослабления окраски биуретовой реакции. С раствором, полученным после эрептического гидролиза, проделать цветные реакции на аминокислоты.

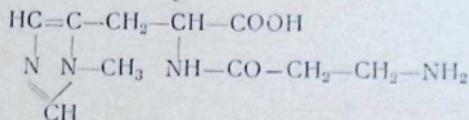
Работа 124. Действие дипептидазы слизистой тонких кишок

В качестве раствора дипептидазы служит глицериновый экстракт из слизистой оболочки тонких кишок (или почки собаки). Такой экстракт получить настаиванием в течение 5—10 дней 50 г измельченной ткани почки с 100 мл 87%-ного глицерина, подкисленного 0,5 мл 20%-ной уксусной кислоты. Лучше пользоваться очищенным от посторонних белков экстрактом, содержащим дипептидазу.

Изучить катализируемый дипептидазой гидролиз дипептида карнозина. Карнозин, открытый акад. В. С. Гулевиным, — единственный дипептид, выделенный из экстрактивных веществ скелетных мышц млекопитающих и других позвоночных животных (у птиц и рыб вместо карнозина находится метилкарнозин — ансерин, открытый Н. Толкачевской).



Карнозин



Ансерин

В скелетных мышцах собаки и кошки присутствуют как карнозин, так и ансерин. Карнозин отсутствует в составе крови, в органах, в сердечной и гладких мышцах. Содержание карнозина в скелетных мышцах быка около 460 мг%.

Ход работы. I. Для получения раствора, содержащего карнозин, 50 г хорошо измельченной мышечной ткани, взятой от только что убитого животного, трехкратно экстрагировать 250-ю мл воды при температуре 80°С (на водяной бане). Полученные экстракты соединить вместе, слабо подкислить уксусной кислотой и осадить белки кипячением, после чего отфильтровать осадок белков и слегка промыть водой. Экстракт и промывные воды довести осторожным добавлением 0,1 н. NaOH до нейтральной реакции (рН 7,0) и упаривать на водяной бане до объема 50 мл. Полученный концентрированный экстракт содержит все экстрактивные вещества мышечной ткани и среди них дипептид карнозин.

II. Взять три колбы. В первую поместить 10 мл полученного экстракта, 15 мл М/15 фосфатной буферной смеси с рН 7,8, 5 мл раствора дипептидазы и 3—4 капли хлороформа. Во вторую колбу — такую же смесь, но с 5 мл предварительно прокипяченного раствора фермента. В третью — контрольную колбу — такую же смесь, за исключением 10 мл экстракта мышечной ткани. Все колбы закрыть пробками и поставить в термостат при 38°С на 24 ч. После этого все колбы охладить. В третью, контрольную, добавить 10 мл экстракта мышц и сейчас же определить во всех трех аминокислот, пользуясь газометрическим методом (см. работу III).

Перед определением аминокислоты во всех пробах можно предварительно осадить белки добавлением 5 мл 10%-ной трихлоруксусной кислоты.

По разности между величиной аминокислоты в основном опыте (первая колба) и в контрольной колбе (третья) не только можно судить о наличии процесса гидролиза карнозина, ускоряемого дипептидазой, но и определить содержание последнего в исследуемом экстракте мышцы. Во второй колбе с ферментом, необратимо инактивированным нагреванием, гидролиза не наблюдается.

ОБМЕН БЕЛКОВ И КОНЕЧНЫЕ ПРОДУКТЫ АЗОТИСТОГО ОБМЕНА

В основе жизнедеятельности всякого организма лежат непрерывные процессы распада (диссимиляции) белков его клеток и тканей. Это непрерывное «изнашивание» клеточного белка требует столь же непрерывного пополнения путем синтеза новых количеств белковых веществ.

У животных, кроме того, происходят постоянные потери значительного количества белков при образовании различных секретов пищеварительного канала и при отторжении белков в виде слущенного эпителия поверхностных покровов, волос и т. д. Все эти потери белков компенсируются в организме непрерывным образованием их из аминокислот.

Для синтеза аминокислот автотрофные организмы используют азот неорганических соединений (аммонийных солей и нитратов). Гетеротрофные организмы не способны к синтезу части аминокислот, необходимых для образования клеточных белков. Такие организмы для синтеза собственных белков используют аминокислоты, входящие в состав белков пищи.

Согласно современным представлениям биосинтез белка проходит в четыре этапа.

I. Активирование аминокислот с образованием ацилфосфатидов и аденилатов аминокислот и взаимодействие их с ферментами.

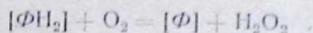
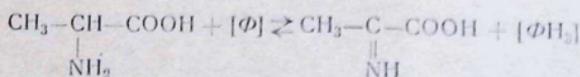
II. Соединение аминокислот с растворимой РНК (*p*-РНК), которая предварительно активизируется трифосфатами, содержащими цитозин и аденозин.

III. Перенос аминокислот на молекулы информационной РНК (*m*-РНК) в рибосомы клетки с образованием пептидных связей.

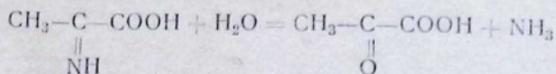
IV. Высвобождение пептидной цепи из рибосомы.

К числу аминокислот несинтезируемых или слишком медленно синтезируемых в организме высших животных относятся: валин, лейцин, изолейцин, треонин, метионин, фенилаланин, триптофан, аргинин, лизин и гистидин. Эти аминокислоты должны входить в состав пищевых белков, ценность которых определяется именно наличием в них незаменимых аминокислот.

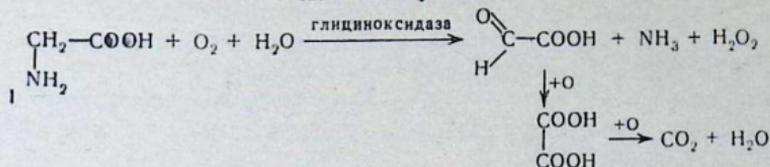
Пути распада и синтеза отдельных аминокислот в животном организме разнообразны. Наиболее общей является реакция окислительного дезаминирования, протекающая в тканях аэробно с образованием α -кетокислот из α -аминокислот. При этом оксидазы *L*- α -аминокислот катализируют реакцию аэробного дегидрогенирования *L*- α -аминокислот:



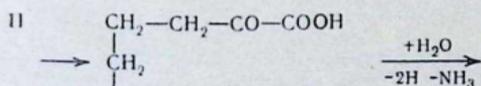
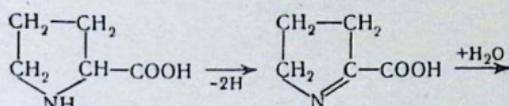
а образовавшиеся α -аминокислоты далее, с отщеплением аммиака, превращаются в α -кетокислоты:



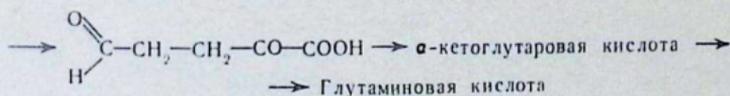
Пути окислительного распада отдельных аминокислот и их связь между собой



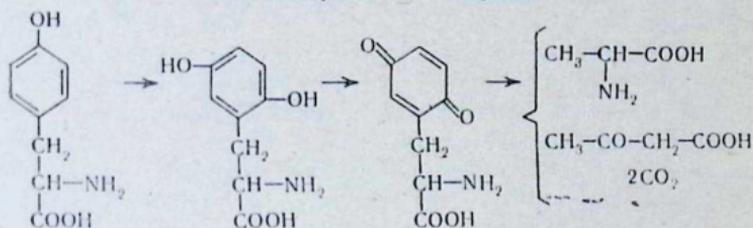
Окисление глицина



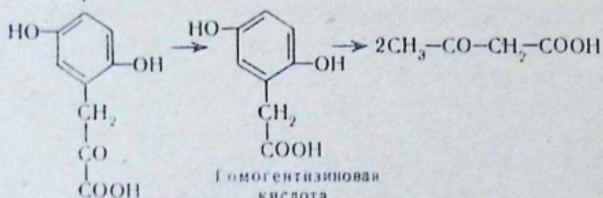
α -кето- δ -аминовалериановая кислота



Окисление пролина и оксипролина



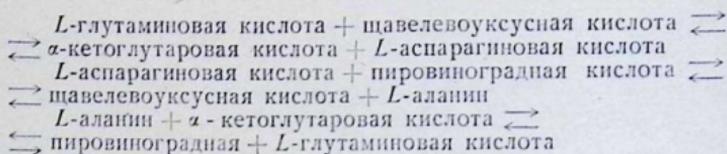
III



Окисление фенилаланина и тирозина

При окислительном дезаминировании из аланина образуется пировиноградная кислота, из глутаминовой кислоты — α -кетоглутаровая, а из аспарагиновой — щавелевоуксусная кислота, т. е. промежуточные продукты обмена, присущие обмену углеводов и жиров, связывающие обмен аминокислот с цепью реакций цикла трикарбоновых кислот (лимоннокислого цикла).

Особое место глутаминовой и аспарагиновой кислот, а также аланина в обмене аминокислот обусловлено тем, что они подвергаются в различных тканях при участии специфических аминотрансфераз быстрому переаминированию с соответствующими α -кетокислотами:



Этот процесс переаминирования, открытый и подробно изученный советскими учеными А. Браунштейном и М. Крицман, является важным этапом обмена аминокислот.

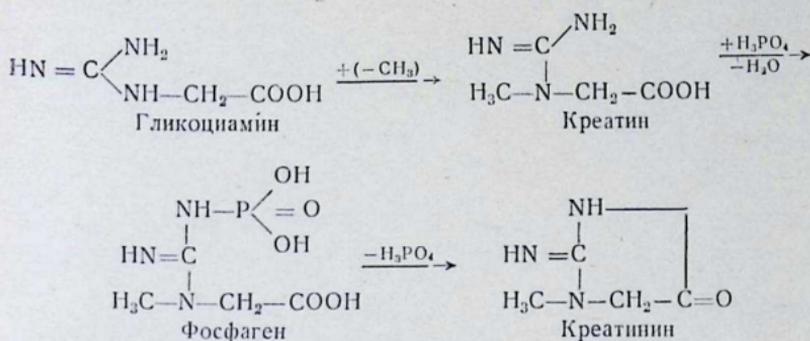
Реакции переаминирования и дезаминирования являются теми реакциями обмена, которые лежат как на пути окислительного распада аминокислот, так и синтеза некоторых из них из безазотистых продуктов обмена и аммиака.

Иной путь окислительного распада наблюдается для таких аминокислот как лейцин, изолейцин, фенилаланин, тирозин и триптофан. При окислении в печени лейцина и изолейцина, начинающемся также с окислительного дезаминирования, образуется ацетоуксусная кислота. Фенилаланин окисляется вначале в тирозин, который далее подвергается своеобразному окислительному распаду также с образованием ацетоуксусной кислоты или аланина и ацетоуксусной кислоты. Приводим путь окислительного распада некоторых аминокислот. Обмен этих аминокислот может быть связан как с реакциями цикла трикарбоновых кислот, так и с обменом жиров (через ацетоуксусную кислоту). Схемы приведены на стр. 193, 196, 197.

Обмен аминокислот, углеводов и жиров и связь этапов обмена представлены на схеме (см. стр. 198).

Из гистидина в организме образуются эрготионин, карнозин, ансерин, а путем декарбоксилирования — физиологически активный гистамин, который далее окисляется — при действии диаминооксидазы (гистаминазы). Тирозин декарбоксилируется в тирамин (окисляющийся далее при действии тираминоксидазы), превращается в надпочечниках в гормон адреналин, а при йодировании в щитовидной железе переходит в дийодтирозин и тироксин (см. работы 5 и 116). Цистин частью превращается

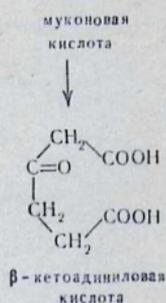
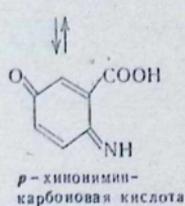
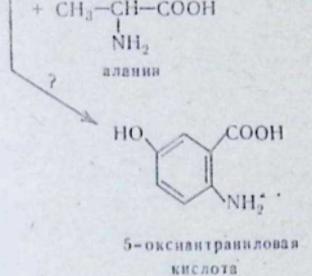
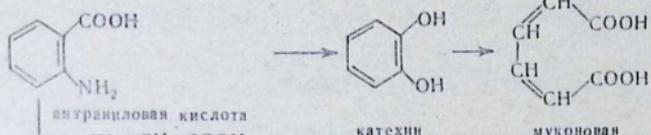
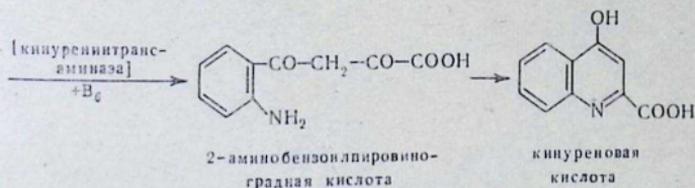
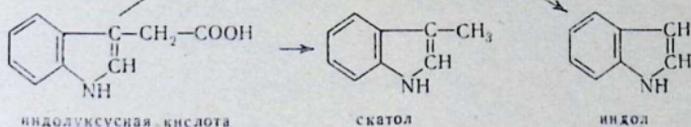
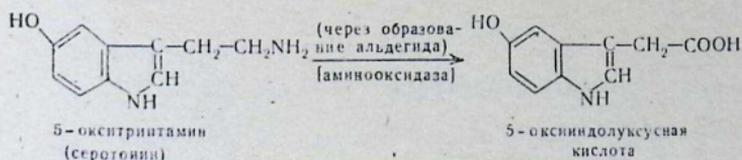
в таврин, который выделяется в состав желчи в виде парных соединений с желчными кислотами. Аргинин реагирует с глицином, причем образуются орнитин и гликоциамин. Гликоциамин метилируется (при участии метионина) в креатин, который превращается в фосфаген. При распаде фосфагена образуется креатинин, являющийся конечным продуктом обмена, выделяемым с мочой:



Наряду с обменом аминокислот в организме протекает и обмен пуриновых оснований, образующихся при расщеплении нуклеиновых кислот. Аминопурины — аденин и гуанин — дезаминируются в оксипурины — гипоксантин и ксантин, окисляющиеся далее в мочевую кислоту. Мочевая кислота является главным конечным продуктом пуринового обмена у человека и антропоидов. У большинства млекопитающих, в печени которых имеется активная уриказа, мочевая кислота в большей своей части окисляется в аллантоин, который у млекопитающих является главным конечным продуктом пуринового обмена (у человека аллантоин образуется и выделяется лишь в незначительных количествах).

Аммиак, образующийся при дезаминировании аминокислот (и, отчасти, дипептидов), при дезаминировании аминопуринов в оксипурины и при других реакциях обмена аминокислот и биогенных аминов у человека и млекопитающих животных в норме почти весь превращается в мочевины (см. работу 138), которая и выделяется как конечный продукт белкового обмена. Синтез мочевины из аммиака и угольной кислоты связан с затратой энергии и в организме сопряжен с окислительными реакциями, дающими необходимую для такого синтеза энергию. Синтез мочевины в организме млекопитающих, подробно изучавшийся М. Ненцким и И. П. Павловым, происходит главным образом в печени и осуществляется, по-видимому, несколькими путями. Одним из путей образования мочевины является орнитинный цикл (см. стр. 198).

L - триптофаны



Глава VII. ВИТАМИНЫ

Изучая жизненные явления, мы постоянно должны иметь в виду непрерывность, преемственность жизненных явлений, мы не в праве выхватывать жизнь неделимого, рассматривать ее независимо от общей жизни органического мира.

К. А. Тимирязев

Существеннейшей связью животного организма с окружающей природой является связь через известные химические вещества, которые должны постоянно поступать в состав данного организма, т. е. связь через пищу.

И. П. Павлов

Под названием витамины объединяется обширная группа весьма разнообразных по своему строению органических соединений, которым свойственна общая роль в обмене веществ животного организма. При полноценном питании необходимо, чтобы пища наряду с белками, липидами, углеводами и минеральными веществами, доставляющими организму энергетический и пластический материал, содержала витамины.

Действие витаминов открыто русским ученым Николаем Ивановичем Луниным в 1880 г.

Витамины — вещества высокой биологической активности — играют существенную роль в процессах обмена веществ. Участие витаминов в осуществлении важнейших биохимических процессов в организме животного делает их незаменимыми особенно для тех животных, в организме которых они полностью или частично не синтезируются.

Витамины необходимы как источник биосинтеза физиологически активных соединений. Так, например, пирофосфорный эфир

тиамина (витамин В₁) является частью каталитической системы обмена пировиноградной кислоты, а рибофлавин (витамин В₂) служит исходным веществом для биосинтеза различных коферментов (ксантин- и глицинооксидаз, желтых ферментов и ряда других).

Содержание витаминов в пище очень незначительно. Полное исключение витаминов и недостаточное содержание их в пище приводит к нарушению процессов обмена, расстройствам роста и разных физиологических функций организма. Это может привести к тяжелым заболеваниям. Заболевания, возникающие на почве полного или почти полного исключения того или иного витамина из пищи, носят общее название авитаминозов. Если витаминов в пище мало или они не покрывают физиологических потребностей животного, развивается особая форма витаминной недостаточности — гиповитаминоз. Разные виды животных нуждаются в различных по качеству витаминах, причем их количественное соотношение также бывает различным.

Витамины могут синтезироваться клетками растительных организмов. В них также могут образовываться и провитамины, которые уже в организме животного превращаются в витамины. Некоторые низшие растения, так же как и животные, не способны к самостоятельному синтезу отдельных витаминов, для нормального их развития необходимо вносить витамины в питательные среды. Подобного рода грибы, водоросли и бактерии реагируют на отсутствие в питательной среде соответствующего витамина резким прекращением роста, что может быть во многих случаях использовано в качестве метода определения витаминов.

Для определения содержания витаминов служат разнообразные химические, главным образом колориметрические и титриметрические методы.

Витаминное действие определяется в биологическом опыте на тех или иных животных и выражается в «единицах», представляющих собой ту наименьшую дозу витамина, которая бывает достаточной, чтобы при лечебном испытании устранить признаки начавшегося авитаминоза или в профилактическом опыте предохранить животное от развития авитаминоза.

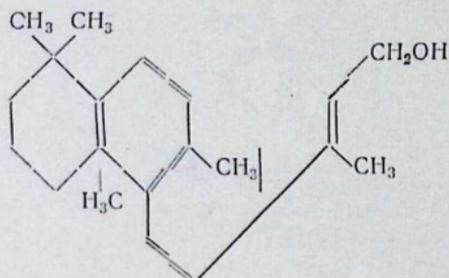
ГРУППА ВИТАМИНА А

При отсутствии в пище молодых животных витамина А явления авитаминоза выражаются прежде всего в остановке или задержке роста и потере веса. Витамин А участвует в образовании зрительного пурпура и поэтому недостаток у человека витамина А приводит к расстройству зрения (гемералопии). Кроме того, наблюдается расстройство ряда других физиологических функций и понижение сопротивляемости организма

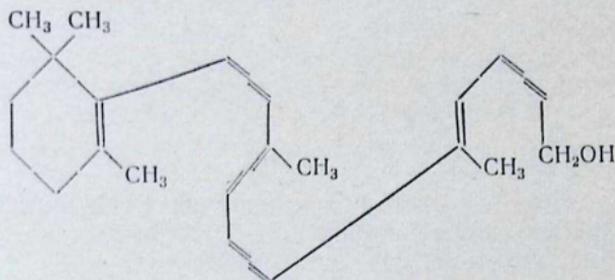
инфекциям. При зашедшем авитаминозе А развиваются ороговения эпителиальных клеток (гиперкератозы), изменения роговицы глаза (кератомалация) и, наконец, ксерофтальмия.

Витамин А — растворим в жирах и жирорастворителях, устойчив к действию щелочей и легко окисляется кислородом воздуха. Витамин А находится в основном в животных жирах. Почти у всех млекопитающих, за исключением некоторых плотоядных, витамин А образуется в печени под действием каротиназы. Каротиноиды же синтезируются только в растениях. Таким образом, содержание витамина А и каротиноидов в животном организме находится в зависимости от содержания в пище растительных каротиноидов.

Наибольшее количество витамина А (до 85—90% общего количества) накапливается в печени животных, поэтому жир печени содержит большое количество витамина А. Витамин А (аксерофтол, витамин А₁), выделенный из жира печени морских рыб и находящийся в организме млекопитающих, имеет строение β-апо-6-каротинола. В жирах пресноводных рыб наряду с витамином А содержится близкий к нему по свойствам и строению витамин А₂ (β-апо-5-каротинол) (открыт советскими исследователями):



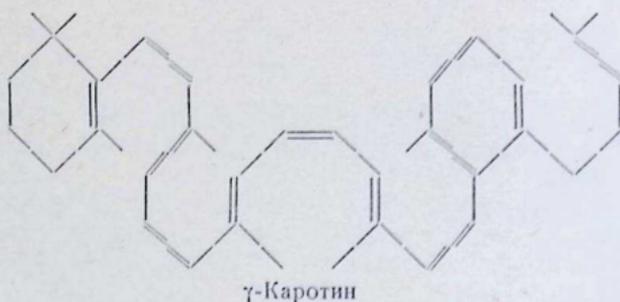
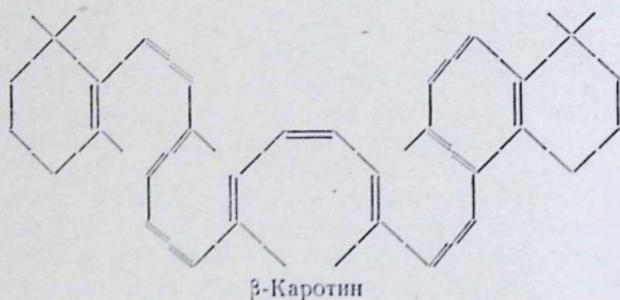
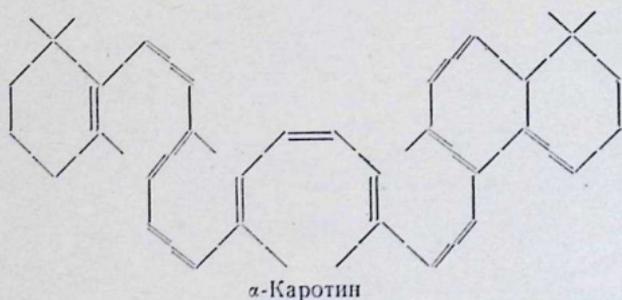
Витамин А₁ (аксерофтол)



Витамин А₂

Возможно существование и других природных веществ с активностью витамина А — витаминерия, явление распространенное среди жирорастворимых витаминов.

Провитамины А — каротиноиды — находятся во многих растительных организмах. Провитамином А может быть каротиноид, в молекуле которого есть хотя бы один β -иононовый цикл. Наиболее важными провитаминами А являются α -, β - и γ -каротины:



В растениях они часто находятся вместе. Например, из моркови получают смесь, состоящую из 85% β -каротина, 15% α -каротина и γ -каротина. Из всех провитаминов А наибольшей активностью в биологическом опыте обладает β -каротин: минимальная суточная доза, необходимая для роста крыс, для β -каротина, составляет 2,5 единицы, для других провитаминов А — 5 единиц, для афаницина — 10 единиц. Эта минимальная доза β -каротина отвечает одной «крысиной единице» (RE)

биологической активности. Суточная потребность человека 5000 интернациональных единиц (одна единица эквивалентна 0,6 мкг β-каротина). Обычно около 50—70% каротиноидов пищи выделяется с калом.

Работа 125. Цветные реакции на витамин А

Ход работы. I. Реакция с треххлористой сурьмой. Несколько капель рыбьего жира растворить в 2 мл сухого хлороформа в сухой пробирке и добавить 2 мл насыщенного при 20°С (33%-ного) раствора треххлористой сурьмы. При наличии витамина А быстро образуется синее окрашивание, постепенно бледнеющее. Каротин также дает цветную реакцию с треххлористой сурьмой с зелено-голубым окрашиванием раствора (см. работу 127).

II. К 1 мл раствора исследуемого жира в хлороформе добавить 0,5—1,0 мл концентрированной соляной кислоты или уксусного ангидрида и 4 мл 1,3-дихлоргидрина глицерина. Смесь нагреть несколько минут при 25°С до появления стойкого голубоватого окрашивания. Такую же реакцию дает и каротин. Витамины D₂ и D₃ дают зеленое окрашивание.

Работа 126. Определение суммы каротиноидов в сыворотке крови по Рачевскому

Каротиноиды крови экстрагируются петролейным эфиром. Интенсивность окраски сухого остатка экстракта пропорциональна количеству каротиноидов.

Ход работы. В делительную воронку внести 0,1 мл сыворотки и 2 мл спирта и перемешать. Добавить 2 мл петролейного эфира, встряхнуть и добавить затем по каплям около 2 мл воды до разделения двух слоев. После полного разделения отделить водный слой и объем петролейно-эфирного слоя довести точно до объема 2 мл. Отобрать раствор в микробюретку и медленно по каплям помещать в нагретую до 40°С сухую фарфоровую чашку. Добавление по каплям вести с такой скоростью, чтобы предыдущая порция раствора испарилась досуха. Такое добавление продолжать до тех пор, пока на дне чашки не будет заметно ясно окрашенного кольца. В этот момент содержание каротинов в осадке равно 0,05 мкг. Отметить спущенный из бюретки объем петролейно-эфирного раствора.

Если ясно видимое кольцо появилось на дне чашки после испарения 0,5 мл эфирного раствора, то содержание суммы каротинов в 100 мл сыворотки будет:

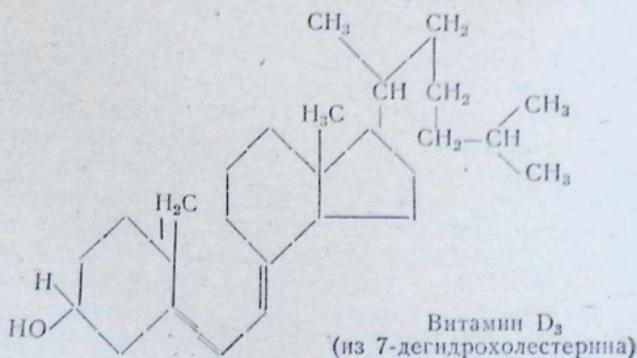
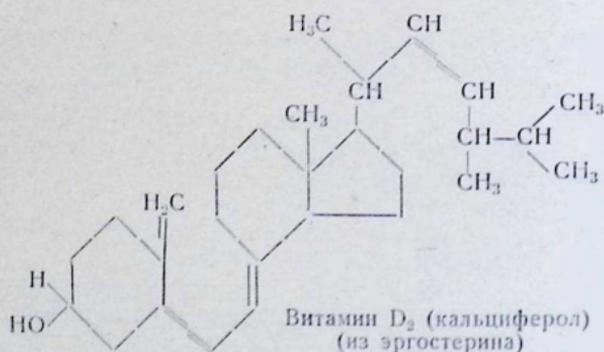
$$\frac{0,05 \cdot 2 \cdot 100}{0,5 \cdot 1,0} = 200 \text{ мкг (0,2 мг \%)}.$$

ГРУППА ВИТАМИНА D

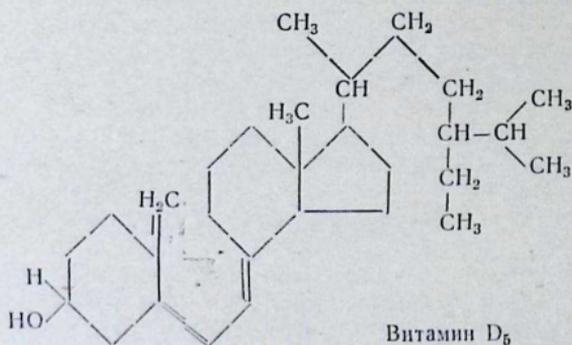
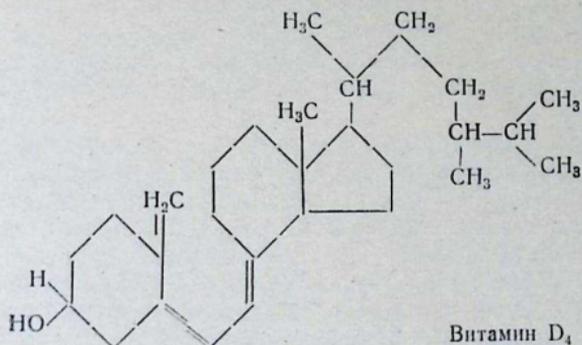
Витамины D принадлежат к группе антирахитических витаминов. Отсутствие в пище витаминов D ведет к нарушению фосфорно-кальциевого обмена и обызвествлению костей, вследствие чего в детском возрасте развивается рахит, а у взрослых — остеомаляция. Витамины D могут образоваться в организме животного лишь частично при облучении его ультрафиолетовыми лучами.

Витамины D относятся к жирорастворимым витаминам и находятся обычно в неомыляемой фракции жиров. Они образуются при облучении ультрафиолетовым светом некоторых стеридов, которые поэтому называются «провитаминами» D. В растениях не обнаружено витаминов D, в них находятся провитамины — стериды растительного происхождения, например эргостерин. Особенно богаты витамином D жиры печени различных морских рыб.

В настоящее время из жира печени рыб выделены в чистом виде два природных витамина D: витамин D₂, или кальциферол и витамин D₃. Они получены также синтетически при облучении эргостерина и 7-дегидрохолестерина:



Кроме того, при облучении 22-дегидроэргостерина и 7-дегидрофитостерина получены витамины D₄ и D₅.



Все витамины D как полученные из природных продуктов, так и синтетические имеют различную активность. Кроме того, один и тот же из витаминов D обладает разной активностью в опытах на различных животных.

За международную единицу витамина D принимается 0,025 μ кальциферола (витамина D₂) в 1 мг оливкового масла. Суточная потребность в витамине D у человека 400—800 инт. ед., у беременных в период лактации потребность выше — до 1000 инт. ед.

Провитамины D могут быть обнаружены обычными реакциями на стерин. Химические методы определения витамина D несколько ненадежны, так как реакции, предложенные для этого, не являются специфичными. Для суждения о недостаточности витамина D часто прибегают к косвенным способам. Так, например, падение содержания неорганического фосфора в сыворотке крови с 4—5 мг% в норме до 1—2 мг% может указывать на недостаточность витамина D.

Работа 127. Цветные реакции на витамин D

Ход работы. I. К 1 мл раствора витамина D в хлороформе добавить 0,5 мл концентрированной соляной кислоты и 4 мл 1,3-дихлоргидрина глицерина. Через некоторое время появляется зеленое окрашивание, которое можно колориметрировать. Витамин А в этих условиях дает голубое окрашивание.

II. В большой пробирке к 3 мл рыбьего жира, облученного масла или масляного раствора витамина D добавить смесь из 15 частей анилина и 1 части концентрированной соляной кислоты. Тщательно перемешать и нагреть до кипения, после чего кипятить еще 30 секунд. Желтая эмульсия делается вначале зеленой, а затем принимает красную окраску. Через две-три минуты происходит расслоение эмульсии, при этом нижний слой окрашен в интенсивный красный цвет.

III. К жиру, содержащему витамин D, или к раствору витамина D в хлороформе, добавить насыщенный раствор треххлористой сурьмы в хлороформе. Образуется желтое окрашивание с характерным максимумом адсорбции при 500 мкм.

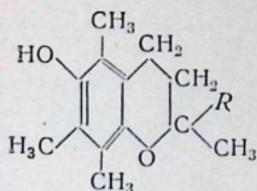
Провести цветные реакции на витамин D с различными маслами до и после облучения их ультрафиолетовым светом.

ГРУППА ВИТАМИНА E

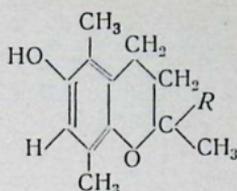
При отсутствии в пище витамина E у животных наблюдается отсутствие функций размножения. У самцов имеет место функциональная стерильность, а затем дегенерация зародышевого эпителия, у самок же при наличии нормального эструса, овуляции и оплодотворения происходит резорбция плода и прекращение беременности. Кроме того, отсутствие в пище витамина E приводит к нарушению физиологических функций и дегенерации скелетных мышц. Необходимость витамина E установлена экспериментально для мышей, крыс, кроликов, морских свинок, собак и цыплят.

Витамин E растворим в жирах, выделен из высших растений, особенно богаты им масла из зародышей пшеницы, ржи, кукурузы, хлопка, шиповника и других растений. В различных органах и тканях животных витамин E находится в малом количестве. В жире печени рыб отсутствует. В составе жиров и масел витамин E довольно стоек, но при очистке очень легко окисляется.

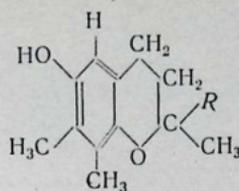
Из различных естественных источников выделены три физиологически активных соединения: α -токоферол (5,7,8,-триметилтокол), β -токоферол (5,8-диметилтокол) и γ -токоферол (7,8-диметилтокол):



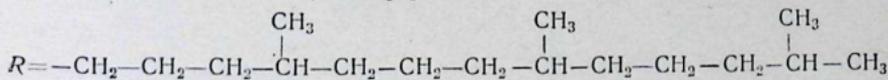
α-Токоферол



β-Токоферол



γ-Токоферол



Эти соединения входят в состав витамина Е, получаемого из разных источников. В масле из зародышей пшеницы находятся α- и β-токоферолы в различных пропорциях, а иногда в небольших количествах и γ-токоферол. Наоборот, в масле хлопчатника находится преимущественно γ-токоферол. Эти соединения различны по своей биологической активности, измеряемой в биологическом опыте на крысах и выраженной в «крысиных единицах» (RE). Так, активность 1 г α-токоферола — 400, 1 г β-токоферола — 200 и 1 г γ-токоферола — 200 крысиных единиц.

Для химического определения витамина Е служат некоторые реакции токоферолов, приводящие к образованию окрашенных продуктов. В отдельных случаях для суждения о недостаточности витамина Е пользуются и косвенными методами. Так, например, у кролика суточное выведение креатина с мочой составляет 10 мг. При недостаточности витамина Е количество выводимого креатина увеличивается в два и более раз.

Работа 128. Открытие витамина Е

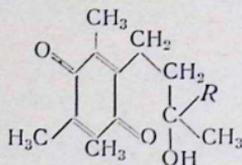
Токоферолы окисляются в спиртовом растворе хлорным железом, которое восстанавливается в хлористое. Последнее образует с α, α'-дипиридилем комплексную соль красного цвета.

Ход работы. I. 5 г исследуемого масла нагреть 5 мин на водяной бане с обратным холодильником с 10 мл 2 н. спиртового едкого калия. После омыления смесь растворить в 15 мл метилового спирта и 40 мл воды и трижды экстрагировать эфиром или петролейным эфиром. Эфирный экстракт промыть водой, высушить над хлористым кальцием, выпарить досуха и остаток растворить в спирте. К спиртовому раствору добавить двойной объем раствора 0,25 г хлорного железа и 0,5 г α, α'-дипиридила в 1000 мл ледяной уксусной кислоты. В присутствии витамина Е появляется красное окрашивание.

II. Для определения витамина Е в плазме крови 10 мл плазмы смешать с 5 мл 0,2 н. едкого калия, 15 мл формалина и 15 мл этилового спирта, нагреть и затем извлечь эфиром. С эфирным экстрактом делают то же самое. Этот способ может быть использован и для количественных определений.

Работа 129. Количественное определение витамина Е по Захаровой и Девятнину

При действии концентрированной азотной кислоты в спиртовом растворе α -токоферол окисляется через хинон в соединение



окрашенное в красный цвет. Сравнением в колориметре интенсивности окраски с окраской специально подобранного стандартного раствора можно определить количество α -токоферола.

Ход работы. В колбу с обратным холодильником поместить навеску исследуемого масла весом 5 г и 20 мл 10%-ного спиртового раствора едкого калия и кипятить на водяной бане 20 мин. Растворить мыло в четырехкратном объеме воды, перенести раствор в делительную воронку и экстрагировать четыре раза серным эфиром (по 50 мл каждый раз). Эфирный экстракт промыть водой для удаления щелочи, просушить безводным хлористым кальцием, профильтровать и отогнать эфир в токе углекислоты. К остатку после отгонки эфира добавить 5 мл спирта, нагреть на водяной бане до полного растворения. Прибавить 1 мл концентрированной азотной кислоты (уд. вес 1,4) и кипятить с обратным холодильником ровно 3 мин. После охлаждения окрашенный раствор профильтровать и сравнить в колориметре интенсивности окраски с окраской стандартного раствора, отвечающей содержанию 0,12 мг α -токоферола в 1 мл раствора.

Такой раствор готовят, смешивая 50 мл раствора 20 мл бромтимолблау в 96%-ном спирте с 2 мл раствора 1 мг основного фуксина в 5 мл 96%-ного спирта.

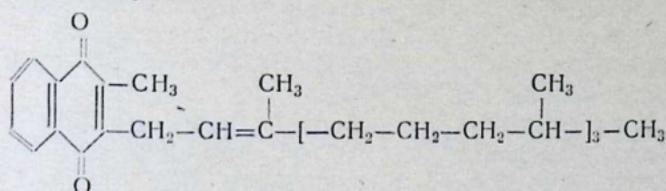
ГРУППА ВИТАМИНА К

У животных при недостаточности витамина К (коагуляционного витамина) наблюдается резкое замедление свертываемости крови. Это влечет за собой внутренние кровоизлияния в тканях и органах животного. Такие геморрагические явления связаны с падением содержания в крови протромбина. Введение витамина К повышает содержание протромбина, скорость свертывания крови и устраняет явление авитаминоза К. По-видимому, витамин К способствует синтезу протромбина в печени.

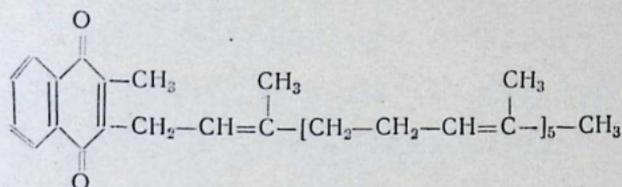
Витамин К встречается в зеленых частях высших растений и в микроорганизмах, особенно бактериях. Он практически отсутствует у дрожжей и других грибов. В органах и тканях животных витамин К находится в значительно меньших коли-

чествах, чем в растениях. Сравнительно большое количество витамина К содержится в печени свиньи.

Витамин К₁ из высших растений идентичен 2-метил-3-фитил-1,4-нафтохинону, а витамин К₂ идентичен 2-метил-3-дифарнезил-1,4-нафтохинону:



Витамин К₁

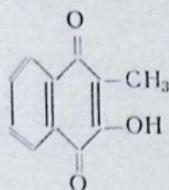


Витамин К₂

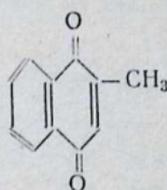
У животных встречается как витамин К₂, так и К₁. Биологическая активность витамина К₁ в полтора раза выше, чем витамина К₂. Витамины К₁ и К₂ неустойчивы при действии воздуха и щелочей, нерастворимы в воде, растворимы в жирорастворителях. При нагревании с водой расщепляются с образованием фталевой кислоты.

Кроме витаминов К₁ и К₂ многие другие производные 1,4-нафтохинона обладают в той или иной мере выраженной активностью витамина К. Сюда принадлежат природный фтиокол (2-метил-3-окси-1,4-нафтохинон) и синтетический метинон (2-метил-1,4-нафтохинон).

Фтиокол в 500 раз менее активен, чем витамин К₁, метинон же в два-три раза активнее его, поэтому находит применение в качестве синтетического заменителя природного витамина К.



Фтиокол



Метинон

Для качественного и количественного определения витаминов К применяются некоторые цветные реакции. В качестве методов, дающих возможность судить о недостаточности вита-

мина К, служит определение протромбина в крови или время свертывания крови.

Работа 130. Цветные реакции на витамин К

Ход работы. I. К 5 мл раствора метинона добавить 1 мл 1%-ного спиртового раствора диэтилмалонового эфира и 0,2 мл 1%-ного водного раствора едкого калия. Появляется фиолетово-красное окрашивание.

II. К 2 мл спиртового раствора добавить 2 мл 5%-ного раствора диэтилдитиокарбомата в 95%-ном спирте и 1 мл спиртовой щелочи, полученной растворением 2 г металлического натрия в 100 мл 95%-ного спирта. Витамин К дает кобальтоволуговое окрашивание, которое через 5 мин достигает максимальной интенсивности. Другие хиноны также дают окраску, но иного цвета.

Эти реакции пригодны и для количественных определений.

ВИТАМИН С (*L*-аскорбиновая кислота)

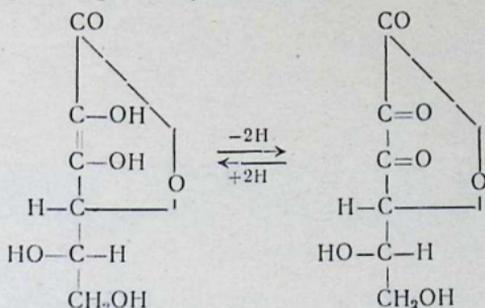
При отсутствии *L*-аскорбиновой кислоты (витамина С) в пище у человека, обезьян и морских свинок развивается авитаминоз — цинга. У других животных этого не бывает, что, возможно, зависит от способности их организма к синтезу аскорбиновой кислоты. Цинготные явления, в частности геморрагические, обусловлены, по-видимому, одновременным отсутствием и витамина Р, таким образом цинга является комплексным авитаминозом.

Содержание витамина С в тканях и органах человека и млекопитающих животных невелико: у человека в крови 0,2—2,0 мг%, в спинномозговой жидкости 3—5 мг%, в молоке 4—8 мг%. У млекопитающих наибольшее содержание аскорбиновой кислоты наблюдается в надпочечниках (160 мг%), печени (25 мг%) и почках (12 мг%). У человека в норме при содержании аскорбиновой кислоты в крови не ниже 0,5 мг%, часть введенной аскорбиновой кислоты выводится с мочой. Суточная потребность человека в аскорбиновой кислоте составляет 75—100 мг.

Аскорбиновая кислота обнаружена почти во всех высших растениях, причем во многих содержание ее весьма значительно. Наиболее богаты аскорбиновой кислотой листья и плоды растений. Аскорбиновая кислота отсутствует в дрожжах и других грибах.

Природная *L*-аскорбиновая кислота с температурой плавления 190—192°С (с разложением) и $[\alpha]_D = -23^\circ\text{C}$ (в воде) или $[\alpha]_D = +48^\circ\text{C}$ (в метиловом спирте) очень легко окисляется в растворах. Окисление протекает тем быстрее, чем выше рН раствора. В кислых растворах аскорбиновая кислота обратимо

окисляется, превращаясь в нестойкую и физиологически неактивную дегидроаскорбиновую кислоту:



Дальнейшее окисление, протекающее особенно быстро в щелочных растворах, необратимо и приводит к образованию щавелевой и *L*-треоновой кислот. Обратное восстановление дегидроаскорбиновой кислоты происходит, например, при действии сероводорода, причем наиболее полно при pH 4,5. Во многих растениях, наряду с аскорбиновой кислотой, находится специфический фермент — аскорбиноксидаза (Cu-протеид), ускоряющий реакцию обратимого окисления ее в дегидроаскорбиновую кислоту в присутствии молекулярного кислорода. Аскорбиновая кислота — часть окислительно-восстановительной системы растительной клетки. Она активирует катепсин, эстеразу и другие биохимические системы в животном организме.

Биологическая единица витамина С — единица «морской свинки» (МЕ) — соответствует 1 мг *L*-аскорбиновой кислоты.

Для качественного и количественного определения аскорбиновой кислоты пользуются ее свойствами восстановителя и другими реакциями. Аскорбиновая кислота, например, дегидрогенируется при освещении в присутствии метиленовой синей.

Работа 131. Качественное открытие витамина С

Ход работы. Добавить к нескольким миллилитрам картофельного сока или сока кислой капусты одну каплю свежеприготовленного насыщенного раствора железосинеродистого калия, а затем одну каплю разбавленного раствора хлорного железа. В присутствии аскорбиновой кислоты происходит восстановление $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ в $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, который с трехвалентным железом образует окрашенный в голубой цвет $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$. Появляется синее или зеленоватое окрашивание. В контрольном опыте, вместо сока берут дистиллированную воду, появляется буроватое окрашивание. В основном опыте к нескольким миллилитрам сока добавить осторожно по каплям свежеприготовленный 0,01%-ный раствор 2,6-дихлорфенолидофенола и наблюдать за обесцвечиванием красителя.

Глава VIII. БИОХИМИЯ ТКАНЕЙ И ЖИДКОСТЕЙ ОРГАНИЗМА

КРОВЬ

Кровь — жидкая ткань организма. Исследовать эту ткань довольно легко, так как удобно брать пробы крови. Через кровь осуществляется взаимосвязь между другими жидкостями и тканями организма.

Работа 132. Определение общего азота крови по Кьельдалю

Общий азот представляет сумму азота белковых веществ, азота полипептидов и аминокислот и азота других органических веществ, входящих в состав ткани.

Способ определения общего азота по Кьельдалю основан на том, что органические азотсодержащие вещества ткани окисляются серной кислотой в присутствии каталитически ускоряющих это окисление веществ (сернистая медь, ртуть, селен, Na_2SeO_3 и др.) и образовавшиеся вещества могут быть определены количественно. Азот окисляемых веществ при этом минерализуется и находится в серной кислоте в виде сернистого аммония. Добавлением избытка щелочи аммиак вытесняется, отгоняется и поглощается в избытке 0,1 н. серной кислотой. Избыток кислоты оттитровывается и по количеству связанной кислоты вычисляется количество поглощенного аммиака, или соответствующее ему количество азота.

Ход работы. I. 1 мл крови внести в колбу Кьельдаля емкостью 100 мл. Добавить в колбу 0,3 г сернистой меди, 2 г сернистого калия и 10 мл концентрированной серной кислоты и кипятить смесь до полного исчезновения буроватой, а затем желтоватой окраски. После того как жидкость приобрела чистый зеленовато-голубой цвет, нагревать еще 30 мин, охладить, разбавить в той же колбе водой и количественно перелить в колбу для отгонки. Два-три раза сполоснуть колбу Кьельдаля небольшим объемом воды и слить воду в ту же колбу для отгонки. Затем к совершенно холодной жидкости в колбе для отгонки прибавить немного талька в порошок (для равномерного кипения) и прилить избыточное, по сравнению с необходимым для нейтрализации 10 мл концентрированной серной кислоты, количество 30%-ного раствора едкого натра. Сразу

закрывать колбу пробкой с насадкой-предохранителем, соединенной с холодильником. Трубку с предохранительным шаром на конце холодильника погрузить в 30 мл 0,1 н. серной кислоты, которые заранее налить в коническую колбу-приемник и к ним же добавить несколько капель лакмоида, метилоранжа или метилрот (в качестве индикатора). Жидкость в колбе для отгонки перемешать и довести до кипения. При этом аммиак перегоняется в приемник и здесь поглощается кислотой. Перегонку продолжать до прекращения отгонки аммиака. Конец отгонки определяют, пробуя стекающую из холодильника жидкость красной лакмусовой бумагой. Отсутствие посинения бумаги указывает на конец отгонки. После этого опустить колбу-приемник таким образом, чтобы трубка, по которой стекает жидкость из холодильника, не касалась серной кислоты в приемнике, и через 5—10 мин после этого перегонку прекратить. Титровать жидкость в приемнике 0,1 н. раствором едкого натра до перехода розовой окраски в желтую (если был прибавлен метилоранж или метилрот). Пошедший на титрование объем 0,1 н. раствора едкого натра вычесть из всего объема взятой 0,1 н. серной кислоты и таким образом найти объем кислоты, отвечающий поглощенному аммиаку.

Вычислить содержание азота в исследуемой крови в процентах. Если, например, на титрование избытка кислоты пошло 5,0 мл 0,1 н. щелочи, то количество связанной кислоты будет $30 - 5 = 25$ мл. Так как каждый мл 0,1 н. кислоты отвечает 0,0017 г аммиака, или 0,0014 г азота, то содержание азота в крови будет $0,0014 \times 25 \times 100 = 3,5\%$.

У животного кровь в норме содержит 2,5—3,5% общего азота.

Сернистый калий в порошке для минерализации ввиду возможного содержания аммонийных солей предварительно прокаливается, а затем контролируется на отсутствие аммонийных солей с реактивом Несслера. Если же надо совершенно исключить возможную ошибку за счет нечистоты реактивов, то ставят контрольный опыт, который ведут так же, как описано выше, но без прибавления ткани. Количество 0,1 н. кислоты, оказавшееся связанным в контрольном опыте, вычитают из результата основного опыта.

II. Вместо обычной перегонки аммиака целесообразно вести отгонку с водяным паром пользуясь прибором Широкова-Пальмина (рис. 21). Для этого 0,1 г мышцы или крови минерализовать, как описано выше, по охлаждении содержимое кьельдалевской колбы количественно перенести в мерную колбу на 100 мл и довести водой до метки. Взять 10 мл жидкости и через воронку 1 ввести в колбу 3 прибора, смывая остатки с воронки дистиллированной водой.

В коническую колбу-приемник 4 налить 30—40 мл 0,01 н. раствора серной кислоты и опустить в нее тонкий конец холодильника. Закрывать нижнее отверстие предохранительного

сосуда 2 и пустить пар через колбу 3. После этого через воронку 1 налить в колбу 3 достаточное для полной нейтрализации кислоты количество раствора едкого натра и заменить воронку 1 стеклянной палочкой.

Отгонку с водяным паром продолжать до тех пор, пока в коническую колбу не поступит 50—60 мл жидкости. В этот момент, обычно, аммиак полностью отогнан. Отнять коническую колбу-приемник, сполоснуть в нее конец холодильника дистиллированной водой и титровать избыток кислоты 0,01 н. раствором едкого натра. Если при этом на титрование пошло 15 мл 0,01 н.

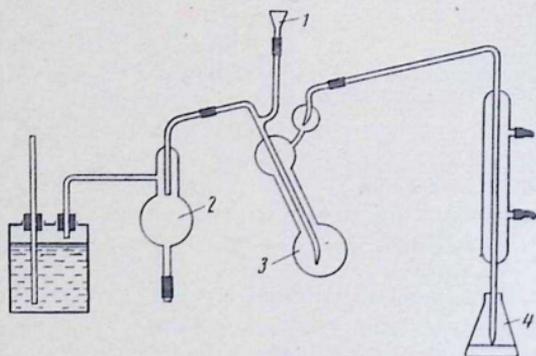


Рис. 21. Прибор Широкова — Пальмина для отгонки аммиака:

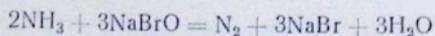
1 — воронка, 2 — предохранительный сосуд, 3 — колба для пропускания пара, 4 — колба-приемник

едкого натра, а взято было 0,01 н. кислоты 35 мл, то связано аммиаком 20 мл кислоты и, следовательно, содержание азота в исследуемой ткани $0,00014 \times 20 \times 10 \times 100 = 2,8\%$.

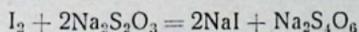
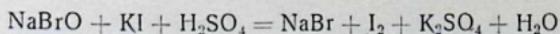
Для освобождения колбы 3 от остатков жидкости открыть нижнее отверстие предохранительного сосуда 2 и вытеснить жидкость из колбы 3 воздухом, присоединив резиновую грушу к концу холодильника. Затем колбу 3 промыть, наполняя ее через воронку 1 водой и снова вытеснить воду через сосуд 2.

Работа 133. Определение небелкового (остаточного) азота сыворотки крови по Энгельгардту и Любимовой

После осаждения белков сыворотки трихлоруксусной кислотой безбелковый центрифугат минерализуется нагреванием с серной кислотой, без добавки катализатора. Образовавшийся аммиак окисляют в щелочной среде избытком натрия:



Избыток гипобромита определяется подометрически по уравнениям:



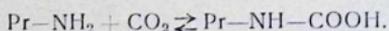
По количеству определяемого титрования с тиосульфатом йода находят количество пошедшего на окисление гипобромита, которое пересчитывается на азот. При этом необходим параллельный контрольный опыт без сыворотки (без крови) для определения всего количества взятого гипобромита.

Ход работы. В центрифужную пробирку отмерить точно 2,9 мл дистиллированной воды и затем 0,1 мл крови (или сыворотки) и 1,0 мл 30%-ной трихлоруксусной кислоты для осаждения белков. После центрифугирования взять 2,0 мл прозрачного центрифугата, которые соответствуют 0,05 мл взятой крови (или сыворотки) и перенести в микрокельдалевскую колбу или пробирку. В колбу для контрольного опыта внести 2 мл 10%-ной трихлоруксусной кислоты. Затем в обе колбы добавить по 1 мл 50%-ной H_2SO_4 и нагреть на пламени до полного испарения воды. После этого увеличить нагревание и продолжать минерализацию до полного обесцвечивания жидкости, на что надо 15—20 мин. По охлаждении добавить по каплям 5 мл дистиллированной воды. В обе колбы добавить по 2—3 капли 1%-ного раствора конго или метилрот и точно нейтрализовать, добавляя из бюретки 2 н. раствор едкого натра (расходуется около 9 мл). Смесь охладить и добавить точно 1 мл раствора гипобромита (готовится смешением при хорошем охлаждении 120 мл 5%-ного едкого натра, 1 мл брома и воды до 375 мл и из этого основного раствора перед опытом взять 5 мл и добавить 45 мл 0,1 н. едкого натра), оставить на 10 мин, после чего добавить 0,5 мл свежеприготовленного 5%-ного раствора йодистого калия и 1 мл 0,1 н. H_2SO_4 . Через 5 мин добавить по несколько капель раствора крахмала и титровать из микробюретки 0,005 н. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ до исчезновения синей окраски.

Из числа миллилитров $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, израсходованных в контрольном опыте, вычесть число миллилитров $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, пошедших на титрование в основном опыте. Разность эквивалентна количеству израсходованного на окисление аммиака гипобромита и ее можно пересчитать в мг аммиака или мг азота. Так как 1 мл 0,005 н. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ отвечает $14 : 3 \times 200 = 0,0233$ мг азота, то, умножив эту величину на число миллилитров $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, разделив на 0,05 и умножив на 100, можно узнать содержание остаточного азота в мг на 100 мл крови или сыворотки. Если, например, на окисление аммиака пошло количество гипобромита, эквивалентное 0,54 мл 0,005 н. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, со содержанием остаточного азота в исследуемой сыворотке будет $0,0233 \times 0,54 \times 100 / 0,05 = 31,6$ мг %.

Работа 134. Определение угольной кислоты, связанной в виде бикарбоната, в плазме крови

CO₂ в крови находится в виде свободной угольной кислоты, в виде бикарбонатов Na и K и связана с белками, главным образом гемоглобином, в виде остатка карбаминовой кислоты:



Относительное значение всех этих форм CO₂ крови видно из данных табл. 7 (см. приложение).

Наибольшая часть угольной кислоты находится в крови в виде бикарбонатов плазмы. Так как состав бикарбонатного буфера при pH крови $\approx 7,4$, то

$$\frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]} = 20$$

и эта величина указывает на главенствующую роль бикарбонатов в процессах нейтрализации поступающих в кровь кислот, вследствие чего содержание бикарбонатов крови или плазмы и носит название щелочных резервов.

Состояние бикарбонатного буфера может значительно измениться, если часть бикарбоната расходуется на нейтрализацию кислот. Такого рода изменения характерны для ацидоза, обусловленного накоплением в крови при нарушении окислительных процессов в тканях нелетучих органических кислот, главным образом ацетоуксусной и β -оксимасляной. В этом случае одним из механизмов нейтрализации накапливающихся в крови кислот является вытеснение ими углекислоты из бикарбоната. О состоянии бикарбонатного буфера судят не по содержанию в плазме оснований, но только по содержанию связанной в виде бикарбоната угольной кислоты или так называемой резервной щелочности¹.

Резервная щелочность плазмы крови, определяемая по методу, описываемому ниже, составляет в норме у человека 55—70 мл CO₂ (при 0°С и 760 мм давления), химически связанной в виде бикарбоната в 100 мл плазмы.

Ход работы. 5 мл свежеприготовленной оксалатной крови отцентрифугировать для получения плазмы. 3 мл полученной прозрачной оксалатной плазмы снять пипеткой и перенести через трубку I сделать глубокий выдох, при этом выдыхаемый в делительную воронку прибора, изображенного на рис. 22. Воздух, содержащий 5,5% CO₂ (парциальное давление 40 мм), пройдет через банку со стеклянными бусами, на которых оседает

¹ В крови крупного рогатого скота бикарбонат натрия (в пересчете на NaOH) составляет не больше 154 мг%.

влага, и наполнит делительную воронку. Затем закрыть притертую пробку воронки и кран и отъединить воронку. Некоторое время вращать воронку для скорейшего достижения равновесия между CO_2 во введенном в воронку воздухе и в плазме. Таким образом получить плазму, насыщенную CO_2 , при

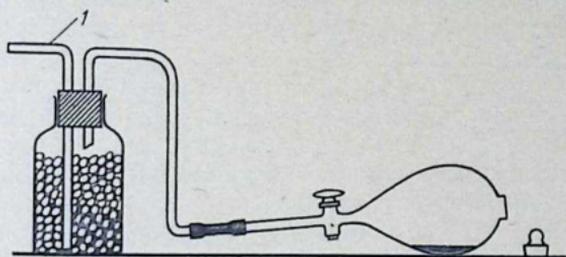


Рис. 22. Прибор для насыщения крови углекислотой:
1 — трубка для выдоха в прибор углекислоты

условиях, близких к тем, которые имеют место в организме, и эту плазму использовать для дальнейшего определения.

Поднимая грушу 3 аппарата (рис. 23), заполнить измерительную трубку и просвет верхнего двухходового крана, соединяющего измерительную трубку с воронкой, ртутью. После этого в воронку прибора внести 0,5 мл воды, не содержащей CO_2 , и затем с помощью микропипетки под слой воды внести 1,0 мл приготовленной для исследования плазмы. Опустить грушу прибора и поворотом верхнего крана перевести почти всю жидкость из воронки в прибор. Затем в воронку поместить 0,5 мл воды маленькую каплю октилового или амиллового спирта и также ввести в прибор, после чего таким же образом через воронку в прибор ввести 0,5 мл 10%-ной H_2SO_4 . Теперь, при хорошо закрытом верхнем кране, опустить грушу так, чтобы ртуть в приборе опустилась до нижнего крана, но введенная в прибор смесь осталась выше нижнего крана. Нижний кран закрыть и прибор сильно встряхнуть или несколько раз опрокинуть. Этим достигается полное выделение CO_2 из жидкости, находящейся в приборе под вакуумом.

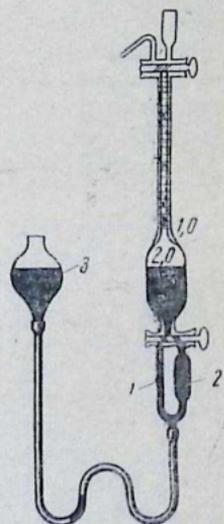


Рис. 23. Прибор для определения резервной щелочности:

1 — нижний нерасширенный канал, 2 — нижний расширенный канал, 3 — груша

После этого нижний кран повернуть так, чтобы главный резервуар прибора соединился с нижним расширенным каналом 2, и перевести туда всю жидкость из прибора. Затем нижний кран повернуть так, чтобы главный резервуар соединился с другим нерасширенным нижним каналом 1, и поднимать грушу прибора до тех пор, пока ртуть в груше и в приборе (измерительной трубке) не окажется на одном уровне. После этого отсчитать объем CO_2 в трубке и одновременно отметить температуру и барометрическое давление.

Открыть верхний кран на соединение с отводной трубкой и опускать грушу прибора до тех пор, пока ртуть не достигнет нижнего крана, тогда последний повернуть на соединение расширенного, наполненного отработанным раствором, канала 2 с прибором и, поднимая грушу, вытолкнуть всю жидкость из прибора, после чего верхний кран закрыть. Теперь прибор готов для следующего определения.

Зная атмосферное давление P в момент опыта, найденный объем CO_2 — V привести к объему при 760 мм давления:

$$V_0 = \frac{V \cdot P}{760}$$

а по объему V_0 , пользуясь готовой таблицей Ван-Слайка (табл. 10), найти для данной температуры соответствующий объем CO_2 (в см^3 при 0°C и 760 мм давления), который связан в 100 мг плазмы крови в виде бикарбоната. При вычислении цифр этой таблицы сделана поправка на угольную кислоту, находящуюся в исследуемой плазме в растворенном состоянии, а не в виде бикарбоната.

Работа 135. Свертывание крови под действием тромбина (фибрин-фермент, пептид-пептидогидролаза)

Начало изучению химии процесса свертывания крови было положено русским исследователем А. Шмидтом.

При свертывании крови растворимый глобулиноподобный белок плазмы крови — фибриноген (изоэлектрическая точка при pH 5,4) превращается в нерастворимый белок — фибрин (изоэлектрическая точка при pH 6,6). В норме в плазме крови около 0,3% фибриногена. Его превращение в фибрин, по-видимому, сходно с реакциями гидролитического расщепления и происходит при участии фермента тромбина. В плазме крови, циркулирующей в сосудах, находится неактивная форма тромбина — протромбин (тромбоген, протромбин не применяется). Для образования активного тромбина необходимо взаимодействие, по крайней мере, трех компонентов: 1) неактивного протромбина (тромбогена), 2) тромбокиназы, находящейся

Таблица для определения в плазме связанной в виде бикарбоната CO_2 (резервной щелочности)

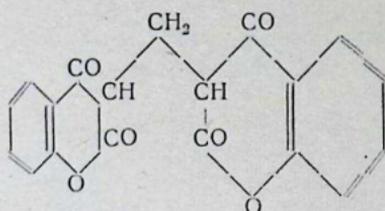
V · P	10 мл плазмы связывают в виде бикарбоната см ³ CO ₂ (при 0°С и 760 мм)				V · P	100 мл плазмы связывают в виде бикарбоната см ³ CO ₂ (при 0°С и 760 мм)			
	760	15°	20°	25°		30°	760	15°	20°
0,20	9,1	9,9	10,7	11,8	0,60	47,7	48,1	48,5	48,6
0,21	10,1	10,0	11,7	12,6	0,61	48,7	49,0	49,4	49,5
0,22	11,0	11,8	12,6	13,5	0,62	49,7	50,0	50,4	50,4
0,23	12,0	12,8	13,6	14,3	0,63	50,7	51,0	51,3	51,4
0,24	13,0	13,7	14,5	15,2	0,64	51,6	51,9	52,2	52,3
0,25	13,9	14,7	15,5	16,1	0,65	52,6	52,8	53,2	53,2
0,26	14,9	15,7	16,4	17,0	0,66	53,6	53,8	54,1	54,1
0,27	15,9	16,6	17,4	18,0	0,67	54,5	54,8	55,1	55,1
0,28	16,8	17,6	18,3	18,9	0,68	55,5	55,7	56,0	56,0
0,29	17,8	18,5	19,2	19,8	0,69	56,5	56,7	57,0	56,9
0,30	18,8	19,5	20,2	20,8	0,70	57,4	57,6	57,9	57,9
0,31	19,7	20,4	21,1	21,7	0,71	58,4	58,6	58,9	58,8
0,32	20,7	21,4	22,1	22,6	0,72	59,4	59,5	59,8	59,7
0,33	21,7	22,3	23,0	23,5	0,73	60,3	60,5	60,7	60,7
0,34	22,6	23,3	24,0	24,5	0,74	61,3	61,4	61,7	61,6
0,35	23,6	24,2	24,9	25,4	0,75	62,3	62,4	62,6	62,5
0,36	24,6	25,2	25,8	26,3	0,76	63,2	63,3	63,6	63,4
0,37	25,5	26,2	26,8	27,3	0,77	64,2	64,3	64,5	64,3
0,38	26,5	27,1	27,7	28,2	0,78	65,2	65,3	65,5	65,3
0,39	27,5	28,1	28,7	29,1	0,79	66,1	66,2	66,4	66,2
0,40	28,4	29,0	29,6	30,0	0,80	67,1	67,2	67,3	67,1
0,41	29,4	30,0	30,5	31,0	0,81	68,1	68,1	68,3	68,0
0,42	30,3	30,9	31,5	31,9	0,82	69,0	69,1	69,2	69,0
0,43	31,3	31,9	32,4	32,8	0,83	70,0	70,0	70,2	69,9
0,44	32,3	32,8	33,4	33,8	0,84	71,0	71,0	71,1	70,8
0,45	33,2	33,8	34,3	34,7	0,85	71,9	72,0	72,1	71,8
0,46	34,2	34,7	35,3	35,6	0,86	72,9	72,9	73,0	72,7
0,47	35,2	35,7	36,2	36,5	0,87	73,9	73,9	74,0	73,6
0,48	36,1	36,6	37,2	37,4	0,88	74,8	74,8	74,9	74,5
0,49	37,1	37,6	38,1	38,4	0,89	75,8	75,8	75,8	75,4
0,50	38,1	38,5	39,0	39,3	0,90	76,8	76,7	76,8	76,4

V · P 760	10 мл плазмы связывают в виде бикарбоната см ³ СО ₂ (при 0°С и 760 мм)				V · P 760	100 мл плазмы связывают в виде бикарбоната см ³ СО ₂ (при 0°С и 760 мм)			
	15°	20°	25°	30°		15°	20°	25°	30°
0,51	39,1	39,5	40,0	40,3	0,91	77,8	77,7	77,7	77,3
0,52	40,0	40,4	40,9	41,2	0,92	78,7	78,6	78,7	78,2
0,53	41,0	41,4	41,9	42,1	0,93	79,7	79,6	79,6	79,2
0,54	42,0	42,4	42,8	43,0	0,94	80,7	80,5	80,6	80,1
0,55	42,9	43,3	43,8	43,9	0,95	81,6	81,5	81,5	81,0
0,56	43,9	44,3	44,7	44,9	0,96	82,6	82,5	82,4	82,0
0,57	44,9	45,3	45,7	45,8	0,97	83,6	83,4	83,4	82,9
0,58	45,8	46,2	46,6	46,7	0,98	84,5	84,4	84,3	83,8
0,59	46,8	47,1	47,5	47,6	0,99	85,5	85,3	85,2	84,8
					1,00	86,5	86,2	86,2	85,7

в тромбоцитах или клетках тканей, и 3) ионов кальция. Таким образом, присутствие ионов кальция необходимо и здесь так же, как и при свертывании молока, однако, механизм их действия в этих двух случаях совершенно различен. При свертывании крови ионы кальция участвуют в предварительной реакции образования активной формы фермента (тромбина) и, следовательно, без них ферментативная реакция превращения фибриногена в фибрин невозможна.

Известен целый ряд различных веществ, ускоряющих или, наоборот, замедляющих свертывание крови. Среди них отличают активаторы и ингибиторы реакции превращения протромбина в тромбин и активаторы и ингибиторы реакции превращения фибриногена в фибрин, т. е. реакции собственно свертывания крови. Первый из упомянутых процессов ускоряется трипсином и замедляется гепарином, солями желчных кислот, нуклеиновыми кислотами, оксалатами, связывающими кальций в нерастворимой форме, цитратами, фтористыми и другими солями. Реакция превращения фибриногена в фибрин ускоряется папанном, ядами некоторых змей и угнетается некоторыми клеточными белками, ядом кобры и гирудином. В физиологических условиях свертывание крови ускоряется или угнетается воздействием веществ, влияющих на содержание протромбина в плазме крови. К веществам, вызывающим гиперпротромбинэмию, относятся: витамин К, фтикокол, 2-метил-1,4-нафтохинон и другие антигеморрагические реагенты. Наоборот, уровень протромбина в плазме

крови падает (гипопротромбинэмия) при воздействии таких соединений, как дикумарол:



Ход работы. I. Для получения оксалатной крови и плазмы собрать свежесобранную из кровеносного сосуда кровь в колбу, в которую налить по 1 мл 10%-ного раствора щавелевокислого аммония на каждые 100 мл крови (или же по 0,1 г сухого оксалата аммония) так, чтобы собранная кровь содержала около 0,1—0,2% оксалата. Колбу осторожно вращать для полного перемешивания, в результате этого весь кальций осаждается в виде щавелевокислого кальция, и кровь теряет способность свертываться. Оксалатную кровь центрифугировать и отобрать находящуюся над осевшими форменными элементами плазму.

Для получения дефибринированной крови и сыворотки свежесобранную кровь помещивать в стакане стеклянной палочкой, при этом нити выделяющегося фибрина собираются на палочке. Собранный фибрин завернуть в марлю и промыть в токе воды до обесцвечивания. Жидкую дефибринированную кровь профильтровать через марлю и центрифугировать. Форменные элементы оседают на дно и остается прозрачная сыворотка, которую снять пипеткой.

II. Для исследования свертывания крови взять пять пробирок. В пробирки 1 и 2 поместить по 3 мл оксалатной плазмы, в пробирку 3 — 3 мл дефибринированной крови, в пробирку 4 — 3 мл сыворотки и в пробирку 5 — 3 мл оксалатной крови. Затем во все пробирки, кроме 1, добавить по 0,3 мл 3%-ного раствора хлористого кальция и поставить в термостат при температуре 37—38°С. Через 15—20 мин пробирки вынуть из термостата. Свертывание наблюдается только в пробирках 2 и 5.

Работа 136. Электрофорез белков сыворотки крови на агар-агаре

Цель работы — разделить белки на фракции. Эксперимент проводится на приборе, специально выполненном из плексигласа (по Цынкаловской).

Ход работы. I. Приготовить 2%-ный раствор агар-агара, расплавить его на водяной бане (оставить немного этого раствора

для смазывания стекла и последующего приготовления пасты). Из 2%-ного раствора приготовить 1%-ный разбавлением 2%-ным веронал-мединаловым буфером (рН 8,0 ионная сила 0,05 м). Этот буфер готовят так: 18,18 г веронала, 540 мл 0,4 н. NaOH, ледяной уксусной кислоты 7—8 мл и 3800 мл дистиллированной воды.

II. Кювету прибора тщательно закленить по бокам лейкопластырем, установить строго горизонтально по уровню и поместить в нее заранее приготовленное (смазанное 2%-ным агар-

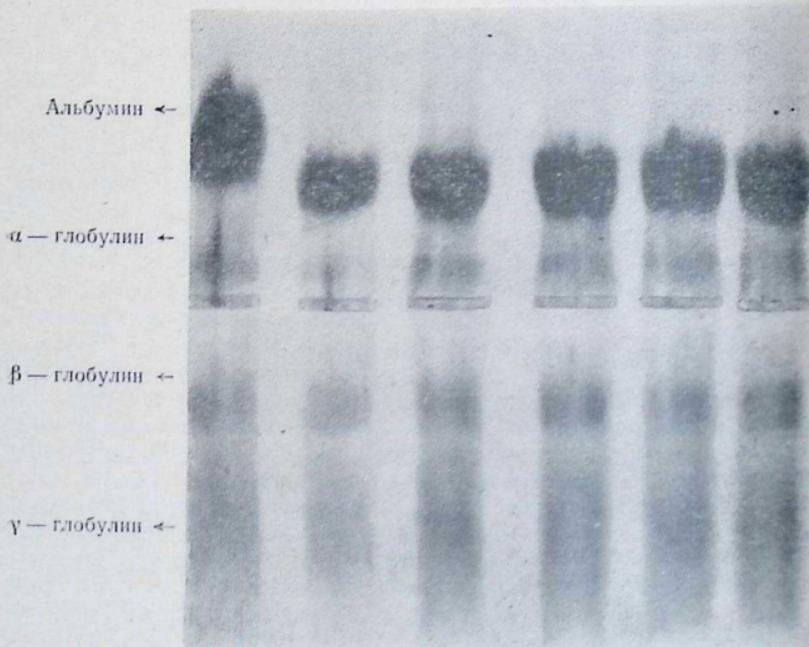


Рис. 24. Электрофореграмма белков сыворотки крови

агаром) стекло. Далее кювету залить агар-агаром (1%-ным) так, чтобы слой агар-агара над стеклом составлял 4—5 мм, после чего залитая кювета должна постоять не менее часа. Через час, по заранее размеченной линии (с нижней стороны кюветы) сделать не более пяти лунок (число лунок зависит от их длины). Дно каждой лунки залить 1%-ным раствором агар-агара, по две капли на каждую лунку, и снять лейкопластырь, который был прикреплен по бокам кюветы.

За 30 мин до погружения кюветы в ванночки включить выпрямитель для подогрева, который заранее должен быть подключен проводами к электродам ванночки. Напряжение в источнике тока должно быть 100—120 в, что дает силу тока (при данной толщине слоя) около 50 а. Подготовку кюветы перед погружением в ванночки произвести следующим образом: приготовить пасту из сыворотки крови с агар-агаром и нанести ее шпателем в лунки, для чего две капли 2%-ного раствора агар-агара растереть в ступке до гомогенной массы и уже к остывшему раствору добавить две капли сыворотки крови. Таким же образом заполнить и остальные лунки, одну из которых сделать контрольной — она окрашивается краской Эванса.

III. Кювету с заполненными лунками и освобожденную от лейкопластыря погрузить в ванночку с протекающим буфером, где в течение 3—4 ч происходит электрофорез, т. е. сыворотка разгоняется на ряд фракций, содержащих определенные белки (альбумины, α -, β - и γ -глобулины). Следить по окрашенной пробе, чтобы белки не попали за пределы стекла.

После окончания опыта кювету вынуть из ванночек, а затем выключить выпрямитель. Слой агар-агара по краям стекла разрезать скальпелем и осторожно вынуть стеклянную пластинку, покрытую агар-агаром, представляющую собой электрофореграмму, дальнейшая обработка которой сводится уже к закреплению этой электрофореграммы (рис. 24, 25).

IV. Стеклянную пластинку фиксировать 2%-ной уксусной кислотой в течение трех часов, после чего сушить или на воздухе, или в шкафу при температуре 37°. Во время сушки пластинка должна быть покрыта фильтровальной бумагой, смоченной уксусной кислотой, сверху положить еще сухой слой фильтровальной бумаги. Необходимо следить за тем, чтобы между бумагой, смоченной уксусной кислотой, и слоем агар-агара не было пузырьков воздуха. После того как слой агар-агара на пластинке полностью высохнет, бумага сама отделяется от агар-агара, или легко снимается с него; пластинку погрузить

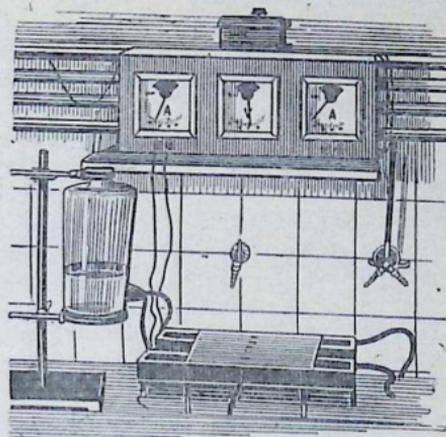


Рис. 25. Прибор для электрофореза в геле

в раствор краски амидо-шварц на 3 ч. После окрашивания амидо-шварцем пластинку промыть два раза в 2%-ной уксусной кислоте. Промывать не менее 30 мин.

МОЧА

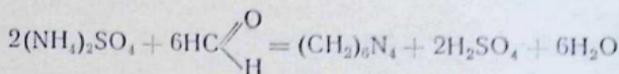
Высшие животные выделяют азотистые продукты обмена главным образом с мочой через почки. Кроме того азот в незначительном количестве выделяется кожей и с калом. Изменения в интенсивности азотистого обмена сказываются преимущественно на выделении азота с мочой, и поэтому определение общего количества азота, выводимого с мочой, дает представление об интенсивности белкового обмена в организме. С другой стороны, определение отдельных фракций азота мочи, т. е. отдельных азотистых веществ, составляющих общий азот мочи, имеет существенное значение для суждения о направлении и интенсивности отдельных фаз азотистого обмена.

В табл. 8 (см. приложение) дано среднее суточное выведение общего азота и отдельных фракций азота в нормальной моче человека.

Нормальная моча практически свободна от белков. Строго говоря, во всякой нормальной моче содержатся следы белка в количестве, не обнаруживаемом обычными реактивами. Присутствие в свежевыпущенной моче муциноподобных веществ бывает заметно по образованию в ней при стоянии легкого «облачка».

Работа 137. Определение общего азота мочи по Иохельсону

Метод основан на минерализации органических веществ мочи, в результате чего весь азот, превращаясь в аммиак, связывается в виде сернокислого аммония. Полученный таким способом раствор обрабатывается нейтрализованным раствором формальдегида, при этом протекает следующая реакция:



Вытесненная из сернокислого аммония в результате образования гексаметилентетрамина серная кислота титруется 0,1 н. едкой щелочью, и количество пошедшей на титрование щелочи пересчитывается на азот.

Ход работы. 1 мл исследуемой мочи поместить в колбу Кьельдаля на 100 мл, добавить 1 г сернокислого калия и 1 мл концентрированной серной кислоты (уд. вес 1,84) и нагреть при умеренном кипении до полного обесцвечивания жидкости.

Полное окисление обычно заканчивается в 15—20 мин. По охлаждении содержимое колбы перенести в колбу для титрования, споласкивая 20 мл воды. Добавить 5 капель смешанного индикатора (0,05 г метилрот и 1 г фенолфталеина растворить в 60 мл спирта и довести водой до 100 мл) и избыток серной кислоты нейтрализовать, добавляя по каплям 10%-ный раствор едкого натра (свободного от карбонатов) до перехода окраски от розовой к желтой (рН 4,4—6,2). На эту операцию расходует-ся примерно 12—13 мл раствора едкой щелочи. Затем точно до-титровать жидкость 0,1 н. раствором едкого натра (свободного от карбонатов) до слабо-розового (фиолетового) окрашивания от фенолфталеина (рН 8,3—10,0). После этого к нейтрализован-ной жидкости добавить 10 мл 30—40% формалина, пред-варительно нейтрализованного добавлением 0,1 н. едкого натра до розовой окраски по фенолфталеину. При добавлении форма-лина выделяется свободная серная кислота, розовая окраска раствора от фенолфталеина исчезает и жидкость окрашивается уже в розовый цвет метилротом. Титровать жидкость 0,1 н. рас-твором едкого натра до розовой (слабофиолетовой) окраски по фенолфталеину. Израсходованное на это титрование количество 0,1 н. щелочи пересчитать на азот, имея в виду, что каждый миллилитр точно 0,1 н. раствора щелочи отвечает 0,0014 г азота. Вычислить содержание азота в 100 мл мочи и во всем объеме суточной мочи.

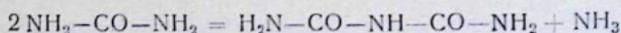
Если, например, на титрование после добавления формалина пошло 6,0 мл 0,1 н. едкого натра, то в 1 мл исследуемой мочи содержится $6,0 \cdot 0,0014$ г, а в 100 мл мочи $6,0 \cdot 0,14 = 0,84$ г азота. Если объем суточной мочи 1500 мл, то за сутки выводится 12,6 г азота.

Работа 138. Выделение мочевины из мочи

Мочевина составляет главную часть экскретируемого с мочой азота. Азот мочевины у человека составляет около 85% общего азота мочи и даже при бедной белками пище не спускается ниже 65%. Суточное выведение мочевины у человека около 25 г, а содержание ее в моче около 2%. Содержание мочевины в крови 0,01—0,03%. Высокая концентрация мочевины в моче достигается лишь в результате сложного процесса ультрафильтрации и обратного всасывания, происходящих в почечных канальцах.

Ход работы. 100 мл мочи упарить на водяной бане до конси-стенции сиропа, после чего добавить 20 мл спирта и перемешать. Горячий спиртовой экстракт профильтровать, фильтрат хорошо охладить льдом и при помешивании добавить к нему азотную кислоту (2:1) до прекращения выпадения осадка азотнокислой мочевины. Через один-два часа фильтрат отсосать на фарфоро-

вой воронке и осадок отжать на листе фильтровальной бумаги. Затем в фарфоровой чаше осадок смешать с 10 мл спирта и добавить сухого углекислого бария до прекращения выделения CO_2 при нагревании на водяной бане. После разложения азотнокислой соли добавить животный уголь и выпарить досуха. Сухой остаток извлечь 10 мл горячего спирта, профильтровать и фильтрат упарить и охладить. Фильтрат отсосать, а выпавшие кристаллы мочевины отжать и высушить. Определить температуру плавления (132°C) и проделать биуретовую пробу, для чего кристаллы мочевины нагреть в сухой пробирке до плавления и нового затвердевания. При этом выделяется газообразный аммиак и образуется биурет:



Для обнаружения биурета сплав растворить по охлаждении в 10%-ном растворе NaOH и прибавить 1—2 капли 1%-ного раствора CuSO_4 . Появляется фиолетовое окрашивание, характерное для биуретовой пробы.

Работа 139. Открытие креатинина в моче

Креатинин — один из конечных продуктов азотистого обмена как у человека, так и у многих животных и поэтому является постоянной составной частью мочи. В норме его выделение довольно постоянно. При мясной пище, богатой креатином, количество выводимого с мочой креатинина повышается, и в моче, кроме того, появляется креатин (креатинурия). В некоторых случаях креатинурия наблюдается и при безмясной пище и свидетельствует об усиленном распаде тканевых белков. В щелочных растворах, особенно при нагревании, креатинин частично переходит в креатин, а под действием кислот креатин может быть превращен в креатинин. Частичное превращение креатинина в креатин может происходить при стоянии щелочной мочи, поэтому при определении не следует употреблять давно стоявшую мочу.

Для открытия креатинина в моче может служить реакция с нитропруссидом натрия.

Ход работы. К 2—3 мл мочи прибавить несколько капель свежеприготовленного 3%-ного раствора нитропрусида натрия $[\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$ и затем подщелачивать жидкость несколькими каплями 10%-ного раствора едкого натра. Жидкость окрашивается вследствие образования изонитрозокреатинина в красный цвет, быстро переходящий в желтый. В отличие от пробы на ацетон подкисление уксусной кислотой здесь не вызывает образования вишнево-красного окрашивания. Если же подкисленную

уксусной кислотой жидкость кипятить, то она приобретает зеленовато-синеватую окраску, вследствие образования железисто-синеродистой соли окиси железа.

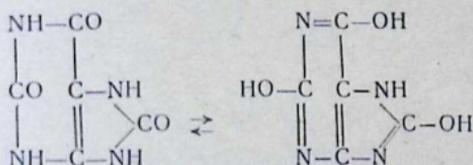
Работа 140. Выделение мочевой кислоты из мочи

Ход работы. 100 мл не содержащей белка мочи упарить на водяной бане до половины объема, по охлаждении добавить 10 мл концентрированной соляной кислоты и оставить стоять сутки. Выпавшие на дне и стенках сосуда темно-бурые, окрашенные пигменты мочекристаллы мочевой кислоты — отфильтровать и употребить для следующих качественных проб.

К нескольким кристаллам мочевой кислоты в маленькой фарфоровой чашке добавить 1—2 капли концентрированной азотной кислоты и осторожно выпарить на пламени под тягой досуха. По охлаждении добавить 1—2 капли концентрированного раствора аммиака, при этом появляется интенсивное пурпурно-красное окрашивание за счет образования мурексида. Такую же пробу проделать, добавляя не аммиак, а раствор едкого кали; появляется красивое сине-фиолетовое окрашивание.

Работа 141. Исследование некоторых свойств мочевой кислоты

Ход работы. Оставшиеся от предыдущей пробы кристаллы мочевой кислоты нагреть с водой, при этом растворения не происходит. При добавлении к жидкости раствора едкой щелочи мочевая кислота переходит в раствор в виде соли, что связано с реакцией таутомерной формы мочевой кислоты:



С небольшим количеством полученных и высушенных кристаллов мочевой кислоты проделать мурексидную пробу, которая основана на том, что при окислении мочевой кислоты азотной кислотой среди продуктов окисления образуются аллоксантин, перегруппировывающийся в пурпуровую кислоту, аммонийная соль которой (мурексид) окрашена в пурпурно-красный цвет.

Калийная соль пурпуровой кислоты также ярко окрашена в сине-фиолетовый цвет.

I. К части полученного щелочного раствора мочевой кислоты прибавить несколько капель разбавленного раствора CuSO_4 .

Выпадает грязно-зеленый осадок мочекислрой соли окиси меди. Этот осадок уже при стоянии, а еще быстрее при нагревании переходит благодаря окислению части мочево́й кислоты в белый осадок мочекислрой закиси меди.

II. К разбавленному щелочному раствору мочево́й кислоты добавить по каплям раствора CuSO_4 до начинающегося выпадения голубого осадка гидрата окиси меди. Смесь кипятить одну-две минуты, при этом выпадает, благодаря восстановлению окисной меди, красный осадок закиси меди.

Этот опыт показывает, что при открытии редуцирующих сахаров нагреванием в щелочных растворах с окисной медью при достаточно длительном нагревании обнаруживается и мочево́я кислота. Это следует иметь в виду при пробах на присутствие сахара в моче.

Работа 142. Определение мочево́й кислоты осаждением в виде кислого мочекислрого аммония

Мочево́я кислота трудно растворима в воде (1:40 000). Ее однозамещенные соли щелочных металлов (первичные ураты) трудно растворимы в воде, легче растворимы вторичные ураты (двузамещенные соли). Растворимость мочево́й кислоты и первичных уратов повышается в присутствии коллоидов. Этим обусловлена растворимость мочево́й кислоты в биологических жидкостях. Кислая аммонийная соль мочево́й кислоты мало растворима в воде и поэтому в моче часто образует белый осадок. Эта соль может также служить для осаждения мочево́й кислоты при ее количественном определении.

Ход работы. К 2 мл щелочного раствора мочево́й кислоты, оставшимся от предыдущей задачи, добавить 4 мл насыщенного раствора хлористого аммония. Выпадает осадок кислого мочекислрого аммония.

Работа 143. Количественный метод определения мочево́й кислоты в моче

Определение основано на осаждении мочево́й кислоты в виде мочекислрого аммония и дальнейшем титрометрическом окислении мочево́й кислоты перманганатом. Во избежание осаждения вместе с мочево́й кислотой других окисляющихся перманганатом веществ предварительно осаждают их, обрабатывая мочу раствором уксуснокислого уранила. Так как само окисление мочево́й кислоты перманганатом не следует стехиометрическому уравнению, то при расчетах анализов пользуются эмпирически найденной величиной, дающей количество мочево́й кислоты в мг или г, окисляемое в 1 мл раствора KMnO_4 . Если пользуются 0,02 н. раствором KMnO_4 , то имеют в виду, что 1 мл такого

раствора эквивалентен 1,5 мг мочевой кислоты, а при употреблении 0,05 н. раствора $KMnO_4$ расчет ведут, считая, что 1 мл раствора $KMnO_4$ эквивалентен 3,75 мг мочевой кислоты.

Ход работы. К 16 мл исследуемой мочи добавить 4 мл уранилового реактива и через 15 мин выпавший осадок фосфорнокислого уранила и муциноподобных веществ мочи отфильтровать. Из прозрачного фильтрата отобрать две пробы по 7,5 мл, что отвечает 6 мл исходной мочи, перенести в две центрифужных пробирки и, добавив по 10—15 капель 25%-ного аммиака, оставить стоять, закрыв пробкой. Мочевая кислота осаждается в виде мочекислого аммония. Пробирки, уравнив, центрифугировать, прозрачную жидкость слить. К осадку добавить по 5 мл раствора сернокислого аммония (600 г сернокислого аммония в 600 мл воды и после добавки 10 мл 25%-ного аммиака довести до 1000 мл), взмучивать осадок, снова центрифугировать и слить прозрачный центрифугат. К осадку в каждую пробирку добавить 4 мл дистиллированной воды и осторожно 1 мл концентрированной серной кислоты, при этом жидкость разогревается. Горячую жидкость при температуре не ниже 50°С титровать из микробюретки до появления не исчезающего за 10 сек розового окрашивания 0,05 н. раствором перманганата. Взять среднее из результатов двух параллельных определений.

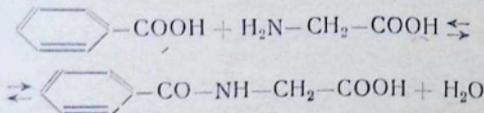
Если, например, на титрование было израсходовано 0,8 мл 0,05 н. раствора $KMnO_4$, каждый миллилитр которого отвечает 3,75 мг мочевой кислоты, то количество мочевой кислоты, выводимой за сутки, при объеме суточной мочи 1200 мл будет:

$$\frac{0,8 \cdot 3,75 \cdot 1200}{6} = 600 \text{ мг, или } 0,6 \text{ г.}$$

Если нужно выразить полученный результат определения в виде азота мочевой кислоты, то полученную цифру разделить на три, так как молекулярный вес мочевой кислоты 168, а вес содержащегося в ней азота 56 ($168 : 56 = 3$).

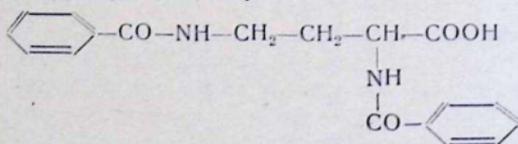
Работа 144. Определение гиппуровой кислоты в моче

Гиппуровая кислота образуется в организме почти всех позвоночных животных (кроме птиц) из бензойной кислоты и гликокола в результате энзиматического процесса:

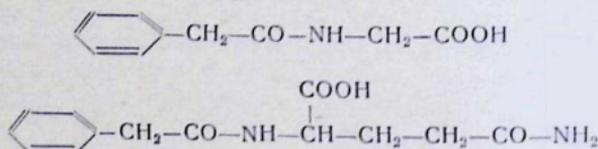


происходящего в клетках почек, печени и отчасти мышц. Образование ее связано с обезвреживанием бензойной кислоты, проникающей из кишечника или образующейся при окислении

в организме. Количество выводимой с мочой из организма гиппуровой кислоты находится в зависимости от состава пищи. Особенно много гиппуровой кислоты образуется при употреблении растительной пищи, поэтому ее много в моче растительноядных животных. Например, в моче лошади и коровы содержание ее достигает 2,5%, в то время как в моче человека гиппуровой кислоты всего около 0,05% или немногим более. Некоторое незначительное количество гиппуровой кислоты образуется в организме независимо от состава пищи. Выведение с мочой гиппуровой кислоты возрастает при введении животному с пищей бензойной кислоты или ее натриевой соли. Птицы при введении бензойной кислоты выделяют вместо гиппуровой кислоты орнитуровую кислоту:



Аналогично бензойной кислоте фенилуксусная кислота выделяется в виде фенацетуровой или, у человека, в виде фенацетилглутамина:

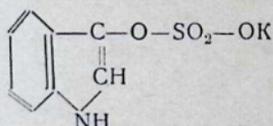


Упражнение работы. Растворить при нагревании 45 г хлористого аммония в 150 мл исследуемой мочи. По охлаждении добавить 10 мл серной кислоты и оставить на сутки для полного растворения кристаллов гиппуровой кислоты. Выпавший осадок промыть до полного удаления серной кислоты 30%-ным раствором хлористого кальция (раствором BaCl_2) 30%-ным раствором хлористого кальция. Из осадка гиппуровую кислоту извлечь горячей водой. Перенести перенести в колбу для титрования, добавить 10 мл нольфталейна и горячий раствор титровать раствором NaOH . По титрованию гиппуровой кислоты в мг% и определить количество ее. Суточное количество гиппуровой кислоты, выделяемое с мочой человека, колеблется в зависимости от характера пищи от 0,1 до 2,0 г.

Работа 145. Открытие индикана в моче

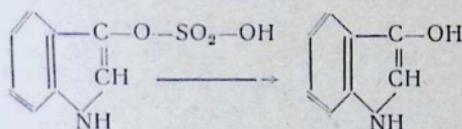
В результате гнилостных процессов, протекающих в кишечнике животных под действием микрофлоры, образуется ряд соединений, проникающих из кишечника в кровь. К числу таких

соединений относятся: фенол, паракрезол, пирокатехин, гидрохинон и индол со скатолом. Все эти соединения обезвреживаются главным образом в печени, где фенолы превращаются в кислые эфиры серной кислоты или гликозиды глюкуроновой кислоты. Индол и скатол окисляются в индоксил и скатоксил, которые затем образуют эфиры с серной кислотой. Таким образом, образование и выведение с мочой как эфирсерных кислот фенолов, так и индикана (калиевой или натриевой соли индоксилсерной кислоты):

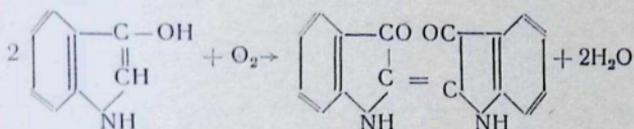


находятся в прямой связи с интенсивностью гнилостных процессов в кишечнике. По этой причине выведение с мочой эфирсерных кислот фенолов и индикана значительно выше у растительноядных животных, у которых гнилостные процессы в кишечнике протекают значительно интенсивнее, чем у плотоядных. Так например, у лошади выведение индикана с мочой за сутки составляет около 2,0 г, в то время как у человека за сутки выводится в норме всего лишь 0,01—0,3 г индикана. Повышенное выведение индикана свидетельствует об увеличении гнилостных процессов, выходящих за пределы нормы.

В основе качественного открытия индикана лежит омыление сернокислого эфира с образованием индоксила:



и дальнейшее окисление индоксила в индиготин (синее индиго):



(окраска становится заметней при экстрагировании синего индиго в слой хлороформа).

Ход работы. Взять 10 мл не содержащей белка мочи, подкислить уксусной кислотой, добавить 1—2 мл 10%-ного раствора уксуснокислого свинца $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ для осаждения пигментов мочи, перемешать и отфильтровать. К 2—3 мл фильтрата добавить равный объем реактива, представляющего собой 0,2%-ный раствор FeCl_3 * в концентрированной соляной кислоте,

и хорошо встряхнуть. При наличии индикана в исследуемой моче слой хлороформа окрашивается в синий цвет за счет экстрагируемого индиго.

МЫШЕЧНАЯ ТКАНЬ

Мясо, являющееся важнейшим продуктом питания человека, представляет собой комплекс различных тканей. В состав мяса входят мышечная, соединительная, жировая и костная ткани в следующих относительных количествах (в %):

Мышечная ткань	60—50
Жировая ткань	20—3
Костная ткань	22—15
Соединительная ткань	14—9

Морфологический состав мяса, однако, сложнее, так как мясо содержит, кроме перечисленных, еще небольшие количества нервной ткани и ткани кровеносных сосудов, и, наконец, поскольку обескровливание животного не бывает совершенно полным, мясо содержит также и следы крови.

Главная составная часть мяса — мышечная ткань (скелетные мышцы крупного рогатого скота) — содержит 70—75% воды, 3—15% жира и 1% золы. Содержание общего азота 2,4—3,8% и содержание белка 15,0—22,0%.

Скелетные мышцы (поперечно-полосатые мышцы), образующие мышечную мякоть, построены из пучков мышечных волокон (клеток), наполненных полужидкой саркоплазмой, в которой параллельно одна другой и параллельно оси мышечного волокна расположены миофибриллы с диаметром около 1 мк. Эти миофибриллы оптически неоднородны и состоят из чередующихся изотропных и анизотропных участков (полос). Ширина таких полос около 1,5 мк. Поверхность мышечного волокна состоит из клеточной оболочки (сарколеммы).

Начало исследованию химического состава мышц, в частности мышечных белков, было положено работами А. Я. Данилевского и его учеников. Крупный вклад в изучение мышечных белков сделан Т. Барановским, В. Энгельгардтом и М. Любимовой. Экстрактивные вещества мышц исследовались акад. В. С. Гулевичем и его учениками, а также Н. Толкачевской, И. А. Смородинцевым, А. В. Палладиным, С. Севериным, Д. Фердманом и другими советскими исследователями.

В составе мышечных клеток находятся следующие растворимые белки: миоген, глобулин X, миозин, актин, миохром, или миоглобин (растворимый в воде и сходный по своим свойствам с гемоглобином хромопротеид мышцы), нуклеопротеиды клеточ-

* Употреблять свежеприготовленный раствор!

ных ядер и ферменты: цитохромы, желтый фермент, комплекс ферментов гликолиза, дегидрогеназы, каталаза и другие.

Миоген — белок, растворимый в воде, с изоэлектрической точкой при рН 6,5, составляет около 10—20% белков мышцы.

Глобулин X — белок, извлекаемый соевыми растворами, не выпадающий из раствора при разбавлении водой (при низких концентрациях солей), извлекаемый из мышцы водой и имеющий изоэлектрическую точку при рН 5,2, составляет около 20% всех белков.

Миозин (актомиозин) — белок, извлекаемый из мышцы соевыми растворами, выпадающий при диализе или разведении водой этих экстрактов и имеющий изоэлектрическую точку при рН 5,5, составляет около 55% всех белков мышцы.

Актин — белок, растворимый в воде, образующий комплекс с миозином (актомиозин), составляет около 15% всех белков. Актиномиозин, образование которого характеризуется высокой вязкостью растворов, диссоциирует в присутствии солей и АТФ, причем миозин переходит в раствор. Чистый миозин растворим в воде, обладает аденозинтрифосфатазным действием и составляет около 40% всех белков мышцы.

Остальные мышечные белки находятся в незначительных количествах. Приведенное распределение основных фракций мышечных белков не является постоянным и значительно меняется в процессах посмертных изменений мышечной ткани, сопровождающихся переходом части растворимых белков в нерастворимое состояние. В живой мышце миоген и глобулин X входят в состав саркоплазмы, а миозин и актин — в состав миофибрилл.

В мышце находятся коллаген и эластин, которые в противоположность собственно мышечным белкам не содержат достаточного количества незаменимых аминокислот и трудно перевариваются при действии пищеварительных ферментов. В табл. 9 (см. приложение) приведено сопоставление аминокислотного состава белков, соединительной ткани мышц и полноценного белка молока — казеина. Содержание отдельных аминокислот дано в процентах при содержании в белке 16,0 г азота.

Из сопоставления видно (табл. 10, см. приложение), что повышенное содержание в мясе белков соединительной ткани снижает его пищевую ценность и поэтому определение в мясе собственно мышечных белков и белков соединительной ткани (коллаген и эластин) важно для установления питательной ценности мяса. В разных мышцах это отношение различно.

Мышцы содержат около 90% белкового и около 10% остаточного азота (в % к общему азоту мышцы). Остаточный азот представляет сумму азота различных азотистых экстрактивных веществ: аммиака, карнозина и ансерина, креатина и креатинфосфорной кислоты (фосфагена), креатинина, карнитина, АТФ,

АДФ и адениловой кислот, пуриновых оснований, инозиновой кислоты, таурина, мочевины, метилгуанидина, холина, глутатиона, некоторых аминокислот и других соединений.

Кроме азотистых экстрактивных веществ мышцы содержат и безазотистые экстрактивные вещества: гликоген, молочную кислоту, инозит и различные фосфорные соединения, представляющие промежуточные продукты обмена углеводов. Большая часть определяемого в мышце фосфора входит в состав фосфагена, АТФ, адениловой кислоты, гексозомонофосфата и неорганических фосфатов (ортофосфатов). Содержание гликогена в мышечной ткани около 0,5—1,0%, а общее содержание редуцирующих сахаров около 30 мг%. Содержание в мышце всех этих соединений зависит от состояния мышцы.

Прижизненные биохимические процессы в мышце, изучавшиеся А. В. Палладиным, В. Энгельгардтом и М. Любимовой, Д. Фердманом, В. А. Белицером и другими советскими исследователями, связаны с физиологическим актом мышечного сокращения и заключаются в реакциях гликолиза, ресинтеза мышечного гликогена, распада и ресинтеза креатинфосфата и АТФ и изменениях сократительного белкового вещества мышцы. При этом молочная кислота, образующаяся при утомлении мышцы, в результате реакций гликолиза при отдыхе мышцы в аэробных условиях частью (около одной пятой) подвергается полному окислительному распаду, а в большей своей части превращается снова в гликоген за счет энергии реакций аэробного окисления. Одновременно с реакциями гликолиза наблюдается распад АТФ и АДФ и затем креатинфосфата, что приводит к накоплению неорганических фосфатов. При отдыхе мышцы происходит ресинтез этих соединений, требующий энергии. Таким образом, наблюдается тесная связь между реакциями анаэробного и аэробного обмена в мышце, выражающаяся в том, что в аэробных условиях в мышце анаэробный распад углеводов замедлен.

При плюсовых температурах посмертные изменения в мышцах животных исследовались И. А. Смородиным с сотрудниками (табл. 11, см. приложение) и В. И. Соловьевым, а при низких температурах изучались С. С. Дроздовым и Н. С. Дроздовым с сотрудниками.

Изменения, происходящие в мышцах при плюсовых температурах уже в течение первых часов после убоя животного, приводят к посмертному окоченению мышцы, вслед за которым наступает разрешение окоченения. При дальнейшем хранении мяса при $+1^{\circ}$ — $+5^{\circ}$ С в течение нескольких суток заканчивается процесс «созревания» мяса, в результате которого мясо приобретает мягкость, легкую усвояемость, необходимые вкусовые качества и достаточную стойкость при хранении. В основе всех этих изменений лежат ферментативные реакции, протекающие здесь, в противоположность живой мышце, в анаэробных усло-

виях. Ввиду исключения реакций окислительного распада исключаются реакции ресинтеза гликогена и органических фосфорных соединений и уже в первые часы накапливается значительное количество молочной кислоты и ортофосфатов, что, в свою очередь, приводит к резкому изменению нейтральной реакции живой мышцы (близкой к рН 7,0—7,2) в кислую сторону (рН 6,0—6,2), большему, чем то, которое наблюдается при утомлении живой мышцы. Одновременно с этим наблюдается переход значительной части фракции соластворимых белков в нерастворимое состояние. В дальнейшем, при разрешении ооченения и собственно «созревании» мяса, наблюдается последующее изменение активной реакции в кислую сторону, достигающее к концу созревания рН 5,7—5,8. При этом происходит дальнейшее уменьшение содержания гликогена и прогрессивное накопление неорганического фосфата и редуцирующих сахаров. Содержание молочной кислоты, хотя и медленно, нарастает. Одновременно происходит переход части нерастворимых белков в растворимое состояние, однако сколько-нибудь глубокого распада белков не наблюдается. Аммиачный азот лишь медленно нарастает от 5—6 до 8—9 мг%. Резкое же увеличение содержания аммиачного азота свидетельствует о начавшихся процессах микробной порчи мяса.

Таким образом, начиная с момента прекращения жизни животного, в мясе происходят непрерывные изменения вначале за счет тканевых ферментов, а позже, при начавшейся порче мяса — за счет ферментов гнилостных микроорганизмов. Эту непрерывную изменяемость состава и свойств мяса следует иметь в виду при всех работах.

Благодаря высокому содержанию полноценных, легко усвояемых белков мясо является одним из наиболее ценных белковых продуктов питания. Пищевая ценность белков мяса по сравнению с белками других пищевых продуктов может быть оценена следующими относительными величинами:

Белки мяса крупного рогатого скота . . .	105
Белки молока	99,6
Казени	70
Белки картофеля	79
Белки пшеницы	39,6

Однако по содержанию витаминов мясо не может покрыть потребности человека, как это видно из данных табл. 12 (см. приложение), в которой сопоставлено содержание витаминов в мышце, печени и молоке.

Значительное влияние на пищевую ценность мяса оказывает также содержание в нем жира, которое в различных сортах мяса колеблется от 3 до 20%. Жир, прежде всего, обладает высокой калорийностью. Если при полном окислении в организме 1 г белков или 1 г углеводов образуется 4,1 ккал, то при таком

же окислении 1 г жира выделяется 9,3 ккал. Кроме того, жир мяса содержит ряд жирорастворимых витаминов и вещества, участвующие в образовании вкуса и аромата при варке мяса.

Содержание жира, увеличивая пищевую ценность мяса, в то же время приводит к своеобразным явлениям, происходящим в мясе при хранении, когда под действием клеточных ферментов и ферментов плесеней и бактерий, а также и при действии света и кислорода воздуха в жире начинаются изменения, приводящие к его порче. К такого рода изменениям относится прежде всего появление в жире свободных жирных кислот благодаря действию на жир клеточных липаз (табл. 13, см. приложение). Кроме того, в мясе некоторых животных, например, свиньи, можно обнаружить липоксигеназную активность. Под действием липоксигеназы и других ферментов в присутствии кислорода воздуха в жире образуются перекиси, после чего начинается дальнейшая окислительная порча жира, при этом образуются низкомолекулярные кислоты, альдегиды и кетоны, сообщающие жиру неприятный вкус и запах.

Работа 146. Качественное исследование химического состава мышцы

Для работы лучше всего пользоваться мышцами какого-либо лабораторного животного, еще не подвергшимися посмертному окоченению. Для открытия креатинина и молочной кислоты лучше пользоваться мышцами, которые были предварительно подвергнуты раздражению; наоборот, для открытия гликогена следует брать мышцы, находившиеся в покое.

Ход работы. Тщательно измельчить мышцу и экстрагировать двойным объемом воды при встряхивании в течение 30 мин. Экстракт отделить фильтрованием через марлю, экстракцию повторить два раза. Водные экстракты соединить.

Остаток после третьей экстракции водой экстрагировать при встряхивании тройным объемом 10%-ного раствора хлористого аммония (или 5%-ного раствора сернистого магния) в течение 30 мин и отделить солевой экстракт мышцы фильтрованием. Остаток ткани сохранить.

Водный экстракт мышцы разделить на две части. В первой части водного экстракта открыть присутствие белка (в водный экстракт переходят: миоген, глобулин X и миохром), определить высаливаемость белка и проделать цветные реакции на белковые аминокислоты. Затем установить присутствие в водном экстракте каталазы и пероксидазы (с реактивом «наді») и отсутствие цитохромоксидазы (с реактивом «наді»; см. работы 35 и 36). Цитохромоксидазу открыть в остатке мышечной ткани после извлечения водой.

Вторую часть водного экстракта мышцы освободить от белка. Для этого белок осадить кипячением при слабокислой реакции и осадок белка удалить фильтрованием. В фильтрате, свободном от белков, открыты молочную кислоту, креатинин, фосфаты, хлориды и сульфаты.

I. Для открытия молочной кислоты нижнюю часть пробирки заполнить реактивом, который приготовить добавлением к 3 мл 2%-ного раствора фенола нескольких капель 2%-ного раствора хлорного железа до появления фиолетовой окраски. Затем в пробирку прилить исследуемый экстракт. Окраска изменяется из фиолетовой в желтую в присутствии молочной кислоты.

II. Для открытия креатинина пользуются реакцией с пикриновой кислотой. К 1—2 мл исследуемого фильтрата добавить 3 капли насыщенного раствора пикриновой кислоты и подщелочить раствор добавлением раствора едкого натра. Через несколько минут появляется оранжево-красная окраска. Нагревание ускоряет реакцию.

Открываемый таким способом креатинин образуется в значительной своей части из мышечного креатина, превращающегося в креатинин при нагревании подкисленного экстракта (при осаждении белков водного экстракта мышцы). Поэтому, если при открытии креатинина реакция не получается достаточно отчетливой, исследуемый фильтрат нужно слабо подкислить разбавленной серной или соляной кислотой и нагреть около часа на водяной бане (при этом креатин переходит в креатинин; см. работу 139) и по охлаждению проделать цветную реакцию, как указано выше.

III. Для открытия карнозина (β -аланилгистидина) пользуются реакцией с диазобензолсульфокислотой (см. работу 102—реакция на гистидин).

Для получения diazo-реактива к 3 мл 0,5%-ного раствора сульфаниловой кислоты в 2%-ной соляной кислоте (охлажденной льдом!) добавить равный объем 0,5%-ного раствора нитрита натрия и оставить стоять две-три минуты на льду. Затем 1 мл полученного раствора добавить к 1 мл исследуемого экстракта из мышцы. Смешать и добавить 10%-ный раствор соды до ясной щелочной реакции, при этом появляется красное окрашивание.

IV. Для открытия фосфатов, хлоридов и сульфатов пользуются указаниями, сделанными в работе 3.

V. В солевом экстракте мышцы открыть присутствие белка (миозина или актомиозина). Установить границы высаливания миозина (см. работу 148), осаждаемость миозина при диализе солевого экстракта и при разведении его водой, установить границы высаливания хлористым натром. Провести с раствором миозина цветные реакции на белковые аминокислоты. Остаток ткани после извлечения солевым раствором содержит белки стромы мышечного волокна и белки соединительной ткани.

VI. Для открытия коллагена остаток ткани смешать с трехкратным объемом воды и кипятить около 30 мин, добавляя испаряющуюся воду. Затем горячий раствор отделить фильтрованием и в фильтрате открыть реакциями осаждения и цветными реакциями присутствие желатины (см. работу 115). Результат получается особенно ясным с мышцами, содержащими большое количество соединительной ткани.

Для открытия гликогена извлечение мышцы необходимо вести достаточно быстро и в условиях, исключающих энзиматический распад гликогена. Достигают этого путем извлечения измельченной мышцы четырьмя объемами кипящей воды. Кипячение продолжают 5—10 мин, после чего по охлаждении отфильтровывают жидкость. При добавлении к жидкости нескольких капель раствора йода в йодистом калии появляется красно-фиолетовое окрашивание. Окраска не появится, если гликоген экстракта подвергнуть гидролизу кипячением в слабокислом растворе или действием амилазы.

Работа 147. Определение коллагена и эластина в мясе по Воловинской

Ход работы. 10 г измельченного мяса растереть с 50 мл 0,6%-ного раствора хлористого натра и смесь перенести в центрифужную пробирку смыванием ступки и пестика 50 мл того же раствора хлористого натра. Смесь настаивать в течение часа, а затем центрифугировать 15 мин при 2000—3000 об/мин. Жидкость слить с осадка, а осадок залить 100 мл 0,2%-ного едкого натра; на другой день, после тщательного перемешивания, жидкость отделить на центрифуге. Обработку остатка ткани щелочью произвести еще два раза, при этом для каждой обработки взять по 50 мл 0,2%-ного NaOH.

Остаток мяса из пробирки перенести количественно в стакан, смывая его 0,1%-ным едким натром; количество 0,1%-ного раствора едкого натра 100 мл. стакан поставить на сетку и жидкость нагреть на водяной бане при умеренном кипении в течение 30 мин, по возможности сохраняя объем жидкости в стакане периодическим добавлением горячей воды.

Затем стакан снять с сетки, дать возможность частичкам ткани осесть на дно стакана и еще в горячем виде жидкость осторожно слить с осадка в колбу на 200 мл через воронку с небольшим количеством ваты, предварительно проверенной на содержание азота. Остаток в стакане вместе с ватой, через которую производилось фильтрование, обработать водой. Для этого в стакан налить 100 мл горячей дистиллированной воды и при умеренном кипении раствор сгущается до 1/3 объема за 1,5—2 ч. Сгущенный раствор некоторое время оставить в покое и затем жидкость слить с осадка через вату в ту же колбу на 200 мл. Аналогичным путем обработка остатков мясной

ткани водой при кипении проводится еще два раза. После последней экстракции вату промыть водой и промывные воды присоединить к общему объему экстракта.

Собранный в мерную колбу экстракт подкислить 20%-ной уксусной кислотой до рН 4,8, нагреть до 50° С и после охлаждения довести водой до метки. При подкислении выпадет небольшое количество белков, от которых освободиться фильтрованием через бумажный фильтр. Из фильтрата взять 20 мл и после минерализации определить азот.

Азот коллагена вычислить следующим образом:

$$N\% = \frac{a \cdot 200 \cdot 100}{20 \cdot B},$$

где a — количество азота в 20 мл фильтрата; B — навеска мяса. Полученную величину азота пересчитать на коллаген умножением на коэффициент 5,55.

Для определения эластина остаток мясной ткани, оставшийся после щелочной и водной экстракции, кельедализируется вместе с ватой. Полученный здесь азот является азотом эластина. Количество эластина в мясе вычисляется умножением найденного количества азота на коэффициент 6,25.

Работа 148. Получение миозина

Ход работы. Мышцы только что убитого животного тщательно измельчить, охлаждая льдом. 100 г измельченной мышцы экстрагировать 300 мл 0,15 М фосфатного буфера с рН 6,5 содержащего хлористый калий в 0,3 М концентрации. Экстрагирование вести при перемешивании при $\pm 1^\circ \text{C}$ в течение 10 мин. Смесь развести добавлением 1000 мл воды комнатной температуры, сразу профильтровать и отжать через марлю. Фильтрат перемешать мешалкой до тех пор, пока не произойдет выпадение осадка актомиозина (один-два часа). Выпавший осадок удалить центрифугированием, после чего к опалесцирующей жидкости при постоянном перемешивании в течение 10 мин добавить 1500 мл воды, охлажденной до 0° С. После двухчасового стояния при 0° С часть жидкости слить декантацией и затем осадок миозина отделить центрифугированием. Исследовать растворимость полученного миозина и определить его изоэлектрическую точку (см. работу 94).

Работа 149. Фракционирование белков водного экстракта мышцы

При фракционировании белков водного экстракта мышц пользуются метиловым спиртом, осаждение ведут при $\pm 1^\circ \text{C}$.

Ход работы. Измельчить и проэкстрагировать поперечно-полосатые мышцы 4-х кратным объемом дистиллированной воды при соотношении 1:2 (через час после убоя животного!). Через 40—60 мин жидкость отфильтровать через марлю и остаток слегка отжать. В полученном прозрачном экстракте определить рН и изоэлектрическую точку (см. работу 94), а затем в 10 мл экстракта определить содержание общего азота и белкового азота (осаждением с трихлоруксусной кислотой). Для 10 мл экстракта находят около 36 мг общего и 23 мг белкового азота (при отношении 1:4 в 10 мл водного экстракта содержится около 15 мг общего и около 9,5 мг белкового азота). Обычно азот водного экстракта состоит из 60—70% белкового и 30—40% остаточного азота.

Полученный водный экстракт охладить в холодной камере до $\pm 1^\circ\text{C}$ и затем смешать с охлажденными до той же температуры метиловым спиртом и водой по следующему расчету:

$$10 \text{ мл водного экстракта} + (90 - A) \text{ мл} \\ \text{воды} + A \text{ мл метилового спирта}$$

Таким образом получить ряд смесей с содержанием метилового спирта от 10 до 90 объемных %. Полученные смеси оставить в холодной камере при $\pm 1^\circ\text{C}$ на два часа, после чего белковые осадки отфильтровать при той же температуре, промыть соответствующей смесью метилового спирта и воды и определить после минерализации содержание азота в полученных осадках. Это осаждение белкового азота полезно контролировать определением содержания азота в соответствующих фильтратах.

Полученные результаты отнести к белковому азоту в 10 мг исходного экстракта и, таким образом, получить количество осажденного белка (при той или иной концентрации метилового спирта) в процентах общего содержания белкового азота.

Метиловый спирт (объемные %)	10	15	20	25	30	35	45	50	60	70	80	90
Осаждено белкового N в % к исходному	23	24	29	31	32	33	43,51	78	92	97	99	

Цифровые результаты изобразить графически, откладывая по оси абсцисс содержание метилового спирта в объемных процентах, а по оси ординат—осажденный белковый азот в процентах ко всему белковому азоту экстракта. Получить кривую, показывающую, что водные экстракты скелетных мышц содержат две основных белковых фракции: легче осаждаемую и полностью выпадающую до 25—30 объемных % метилового спирта (глобулин X) и труднее осаждаемую, выпадающую до 80 объемных % спирта (миоген).

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1

Среднее содержание главных элементов минеральных соединений различных тканей, органов и жидкостей организма человека, мг %

Исследуемый объект	Na	K	Mg	Ca	Cl (хлоридов)	P (фосфатов)	S (сульфатов)
Кровь	175	210	4,3	5	280	2—4	1
Плазма	335	20	2,4	10,3	365	3,7	1,3
Эритроциты	23	420	6,6	0	190	—	—
Лимфа	290	14	3	10	420	3,6	—
Цереброспинальная жид- кость	325	20	3	5	440	1,6	—
Скелетные мышцы	70	280	21	7	60	18	6
Сердечная мышца	170	230	16	9	125	—	—
Почки	165	165	20	19	210	—	7
Печень	150	170	17	10	125	—	20
Легкие	245	150	7,5	16	255	—	10
Панкреатическая железа	80	200	17	15	160	—	—
Мозг	150	290	14	10,5	130	7	10
Костная ткань	160	55	95	9900	170	4550	—
Хрящ	550	235	11	40	250	10	—
Кожа	200	60	6	11	260	—	—
Слона	20	100	2	6	42	18	—
Желчь	320	19	0,5	10	350	14	—
Молоко (коровье)	60	150	14	125	115	85	—

Кислоты, входящие в состав жиров и сложных липидов

1. Насыщенные кислоты

Название	Химическая формула	Число атомов углерода
Масляная	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	4
Капроновая	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	6
Каприловая	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	8
Каприновая	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$	10
Лауриновая	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	12
Миристиновая	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	14
Пальмитиновая	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	16
Стеариновая	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	18
Арахидиновая (эйкоза- новая)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	20
Бегеновая	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$	22
Лигноцеридиновая	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$	24
Церотиновая	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{24}\text{COOH}$	26

2. Ненасыщенные кислоты

Название	Химическая формула	Число атомов углерода
Деценивая	$\text{CH}_2 = \text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	10
Стиллининовая	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH} = \text{CH} - \text{CH} = \text{CH} \cdot \text{COOH}$ (<i>цис-транс</i>)	10
Додециленовая	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH} = \text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	12
Миристолеиновая	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH} = \text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	14
Пальмитиленовая (гексадеценивая)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH} = \text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ (<i>цис</i>)	16
Олеиновая	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH} = \text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ (<i>цис</i>)	18
Петроселиновая	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH} = \text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$ (<i>цис</i>)	18

Название	Химическая формула	Число атомов углерода
Вакценовая	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_5 \text{CH} = \text{CH} (\text{CH}_2)_9 \text{COOH}$ (цис-транс)	18
Линолевая	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_4 \text{CH} = \text{CHCH}_2 \text{CH} = \text{CH} (\text{CH}_2)_7 \text{COOH}$	18
Линоленовая	$\text{CH}_3 \text{CH}_2 \text{CH} = \text{CHCH}_2 \text{CH} = \text{CHCH}_2 \text{CH} = \text{CH} (\text{CH}_2)_7 \text{COOH}$	18
Элеостеариновая	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_3 (\text{CH} = \text{CH})_3 (\text{CH}_2)_7 \text{COOH}$ (цис-транс-транс)	18
Паринаровая	$\text{CH}_3 \text{CH}_2 (\text{CH} = \text{CH})_4 (\text{CH}_2)_7 \text{COOH}$	18
Таририновая	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_7 \text{C} \equiv \text{C} (\text{CH}_2)_7 \text{COOH}$	18
Гадоленовая	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_9 \text{CH} = \text{CH} (\text{CH}_2)_7 \text{COOH}$	20
Арахидоновая	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_4 (\text{CH} = \text{CHCH}_2)_4 (\text{CH}_2)_2 \text{COOH}$	20
Цетолениновая	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_9 \text{CH} = \text{CH} (\text{CH}_2)_9 \text{COOH}$	22
Эруковая	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_7 \text{CH} = \text{CH} (\text{CH}_2)_{11} \text{COOH}$ (цис)	22
Клупанодоновая	$\text{CH}_3 \text{CH}_2 (\text{CH} = \text{CHCH}_2 \text{CH}_2)_3 (\text{CH} = \text{CHCH}_2)_2 \text{CH}_2 \text{COOH}$	22
Нервоновая (селахолениновая)	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_7 \text{CH} = \text{CH} (\text{CH}_2)_{13} \text{COOH}$ (цис)	24

3. Насыщенные и ненасыщенные окси- и оксокислоты

Название	Химическая формула	Число атомов углерода
Рицинолевая	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_5 \text{CH} (\text{OH}) \text{CH}_2 \text{CH} = \text{CH} (\text{CH}_2)_7 \text{COOH}$ (цис)	18
Диоксистеариновая	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_7 \text{CH} (\text{OH}) \text{CH} (\text{OH}) (\text{CH}_2)_7 \text{COOH}$	18
Ликановая	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_3 (\text{CH} = \text{CH})_3 (\text{CH}_2)_4 \text{CO} (\text{CH}_2)_2 \text{COOH}$	18
Оксинервоновая	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_7 \text{CH} = \text{CH} (\text{CH}_2)_{12} \text{CH} (\text{OH}) \text{COOH}$	24
Цереброновая	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{21} \text{CH} (\text{OH}) \text{COOH}$	24

Таблица 3

Жирные кислоты некоторых жиров, %

Название	Говяжий жир	Свиной жир	Жир молока	Касторовое масло	Соевое масло
Масляная	—	—	3,0	—	—
Капроновая	—	—	1,4	—	—
Каприловая	—	—	1,5	—	—
Каприновая	—	—	2,7	—	—
Лауриновая	—	—	3,7	—	—
Миристиновая	2,0	1,2	12,1	—	0,1
Пальмитиновая	27,0	30,4	25,3	—	9,8
Стеариновая	24,0	16,0	9,2	2,0	2,4
Арахидовая	—	—	1,3	—	0,9
Лаврелевая (додеценая)	—	—	0,4	—	—
Миристолоевая	—	0,3	1,6	—	0,1
Пальмитолоевая	—	3,0	4,0	—	0,4
Олеиновая	43,0	41,0	29,6	8,0	28,9
Вакценовая	1,4	—	—	—	—
Линолевая	2,6	5,6	3,6	3,0	50,7
Линоленовая	—	—	—	—	6,5
Рицинолевая	—	—	—	87,0	—
Диоксистеариновая	—	—	—	0,6	—

Таблица 4

Аминокислоты, входящие в состав белков

Название	Формула
Гликокол (глицин)	$\text{NH}_2\text{—CH}_2\text{—COOH}$
(+)-Аланин	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{—CH—COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
(+)-Валин	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{CH—CH—COOH} \\ / \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \end{array}$

Название	Формула
(-)-Лейцин	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array} \quad \begin{array}{c} \\ \text{NH}_2 \end{array}$
(+) -Норлейцин	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH}$ $\quad \quad \quad \quad \quad $ $\quad \quad \quad \quad \quad \text{NH}_2$
(+) -Изолейцин	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}_2 \\ \diagdown \\ \text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array} \quad \begin{array}{c} \\ \text{NH}_2 \end{array}$
(-)-Серин	$\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH}$ $\quad \quad \quad $ $\quad \quad \quad \text{NH}_2$
(+) -Треонин	$\text{CH}_3-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}-\text{COOH}$ $\quad \quad \quad \quad \quad $ $\quad \quad \quad \quad \quad \text{NH}_2$
(-)-Цистеин и (-)-цистин	$\text{HS}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH}$ $\quad \quad \quad $ $\quad \quad \quad \text{NH}_2$ <p>и $[-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH}]_2$</p> $\quad \quad \quad $ $\quad \quad \quad \text{NH}_2$
(-)-Метионин	$\text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH}$ $\quad \quad \quad \quad \quad $ $\quad \quad \quad \quad \quad \text{NH}_2$
(-)-Фенилаланин	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH}$ $\quad \quad \quad $ $\quad \quad \quad \text{NH}_2$
(-)-Тирозин	$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH}$ $\quad \quad \quad \quad \quad $ $\quad \quad \quad \quad \quad \text{NH}_2$
(-)-Тироксин	$\begin{array}{c} \text{J} \quad \quad \quad \text{J} \\ \quad \quad \quad \\ \text{HO}-\text{C}_6\text{H}_3-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_3-\text{CH}_2- \\ \quad \quad \quad \\ \text{J} \quad \quad \quad \text{J} \end{array}$ $-\text{CH}-\text{COOH}$ $\quad \quad \quad $ $\quad \quad \quad \text{NH}_2$

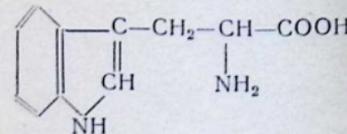
Название	Формула
(-)-Пролин	$ \begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{CH}_2 \quad \text{CH} - \text{COOH} \\ \diagdown \quad / \\ \text{NH} \end{array} $
(-)-Оксипролин	$ \begin{array}{c} \text{HO} - \text{CH} - \text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{CH}_2 \quad \text{CH} - \text{COOH} \\ \diagdown \quad / \\ \text{NH} \end{array} $
(-)-Триптофан	
(-)-Аспарагиновая кислота	$ \text{HOOC} - \text{CH}_2 - \underset{\text{NH}_2}{\text{CH}} - \text{COOH} $
(+) - Глутаминовая кислота	$ \text{HOOC} - \text{CH}_2 - \underset{\text{NH}_2}{\text{CH}} - \text{CH}_2 - \text{COOH} $
(+) - β-Оксиглутаминовая кислота	$ \text{HOOC} - \text{CH}_2 - \underset{\text{OH}}{\text{CH}} - \underset{\text{NH}_2}{\text{CH}} - \text{COOH} $
(+) - Аргинин	$ \begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{H} - \text{N} = \text{C} \\ \\ \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \\ \\ \text{NH}_2 \\ \\ \text{CH} - \text{COOH} \end{array} $
(+) - Орнитин	$ \text{H}_2\text{N} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \underset{\text{NH}_2}{\text{CH}} - \text{COOH} $
(+) - Лизин	$ \begin{array}{c} \text{H}_2\text{N} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \\ \\ \text{NH}_2 \\ \\ \text{CH} - \text{COOH} \end{array} $
(+) - Гистидин	$ \begin{array}{c} \text{CH} = \text{C} - \text{CH}_2 - \underset{\text{NH}_2}{\text{CH}} - \text{COOH} \\ \quad \\ \text{N} \quad \text{NH} \\ \\ \text{CH} \end{array} $

Таблица 5

Молекулярный вес некоторых белков

Название белка	Молекулярный вес	Название белка	Молекулярный вес
Клупейн	4450	Гемоглобин	69 000
Сальмин	5600	Фибрин	69 300
Цитохром с	13 000—15 000	Серумальбумин	70 000
Гистон	17 000	Желатина	10 000—150 000
Лактальбумин	12 000—25 000	Миоген	150 000
Глиадин	27 000	Глобулин X	160 000
Папаин	27 000	Серумглобулин	165 000
Химотрипсиноген	30 000	Пероксидаза	35 000—175 000
Трипсин	34 000	Псевдоглобулин	142 000—177 000
Инсулин	35 500	Фиброин шелка	217 000
Пепсин	38 000	Каталаза	225 000—248 000
Трипсиноген	40 000	Желтый фермент	38 000—280 000
Лактоглобулин	42 000	Элестин	310 000
Пепсиноген	42 000	Казеин	75 000—375 000
Овальбумин	44 500	Уреаза	483 000
Зеин	45 000	Фибриноген	500 000
Овомуконд	49 300	Тиреоглобулин	650 000
Миоглобин	16 900—68 000	Миозин	3 900 000
Кератин (шерсти)	68 000	Гемоцианины	387 000—9 660 000

Таблица 6

Изоэлектрическая точка некоторых белков (pH)

Название белка	pH	Название белка	pH
Фибриноген	5,4	Желатина	4,8
Серумальбумин	4,8	Гемоглобин	6,8
Серумглобулин — α	5,05	Оксигемоглобин	6,65
Серумглобулин — β	5,1	Гистон	8,0—10,0
Серумглобулин — γ	6,0	Протамин	9,7—12,2
Миоген	6,5	Сальмин	12,0
Миоальбумин	3,3	Тиреоглобулин	4,5
Миозин	5,5	Инсулин	5,35
Миоглобин	7,0	Цитохром с	10,65
Глобулин X	5,2	Папаин	9,0
Коллаген	7,7	Пепсин	2,75
Кератины	3,4—4,8	Нуклеиновая кислота	0,7
Эластин	6,9		

Таблица 7

Формы углекислоты крови (в объемных %) при 38° С

Формула углекислоты	Венозная кровь		Артериальная кровь	
	плазма	форменные элементы	плазма	форменные элементы
Свободная CO ₂	1,8	0,9	1,6	0,8
Связанная в виде бикарбонатов CO ₂	35,2	10,5	33,1	9,8
Остальная связанная CO ₂	1,1	2,6	1,0	1,9
Вся CO ₂	38,1	14,0	35,7	12,5

Таблица 8

Главные фракции азота мочи

Фракции азота мочи	N, г	К общему азоту, %	Вещество, г
Общий азот	12,5	100	—
Мочевина	10,5	85	22
Креатинин	0,55	4,5	1,3
Аммиак	0,57	4,5	0,7
Аминокислоты	0,50	4,0	—
Мочевая кислота	0,23	2,0	0,7
Пурины	—	—	0,02
Гиппуровая кислота	0,055	0,4	0,7
Гистидин и другие производные имидазола	—	—	0,3
Гликоциамин	0,01	0,08	0,03
Аллантоин	0,01	0,08	0,03
Индикан	—	—	0,01

Таблица 9

Аминокислотный состав белков
соединительной ткани, %

Аминокислоты	Коллаген	Эластин	Мышцы быка	Сердечная мышца	Казеин
Аргинин	8,8	0,9	7,7	7,4	4,2
Гистидин	1,0	—	2,9	2,7	2,5
Лизин	4,5	—	8,1	7,4	7,9
Тирозин	0,3	1,5	3,4	4,4	6,9
Триптофан	0,1	—	1,3	1,4	1,4
Фенилаланин	2,1	3,1	4,9	5,1	5,2
Цистин	0,1—0,2	0,2	1,3	1,2	0,3
Метионин	1,0	0,4	3,3	3,2	3,5
Треонин	1,5	2,5	4,6	4,7	4,1
Лейцин	3,7	—	7,7	8,4	9,9
Изолейцин	1,7	—	6,3	—	6,5
Валин	2,1	—	5,8	6,3	6,7
Глицин	23,6	27,5	5,0	—	0,6
Аланин	9,2	—	4,0	—	2,8
Серин	3,3	—	5,4	5,9	7,5
Глутаминовая кислота	10,3	2,5	15,4	13,3	24,2
Аспарагиновая кислота	5,9	—	6,0	6,9	6,3
Оксипролин	13,0	1,9	—	—	—
Пролин	15,3	14,2	6,0	—	8,0

Таблица 10

Различные фракции белкового азота мяса

Мясо	Азот			
	общий, %	белковый, % к общему	мышечных белков, % к белковому	коллагена и эластина, % к белковому
С небольшим содержанием соединительной ткани	3,0	88	82	18
С большим содержанием соединительной ткани	3,6—3,8	93	28	72

Таблица 11

Изменения в водном экстракте из мяса, «созревающего» при температуре +4°C
(по И. А. Смородинцеву)¹

Время после убоя, ч	pH	Гликоген, мг%	Общая редуцирующая способность, мг% глюкозы	Молочная кислота, мг%	Фосфор неорганический, мг% Р	Азот вытяжки, мг%	Коагулируемый азот, мг. %	Аминоазот, мг%	Аммиачный азот, мг%
1	6,21	633,7	187,2	319,2	70,5	735,1	516,2	44,13	5,3
3	6,0	—	198,9	314,7	—	706,2	—	49,7	—
6	6,04	—	119,0	465,5	—	736,9	—	51,6	—
9	5,75	—	99,0	512,8	—	847,5	—	51,3	—
12	5,94	462,0	217,0	609,16	77,7	721,6	451,9	48,0	6,65
24	5,56	274,9	249,0	700,6	75,3	800,0	443,5	44,9	8,12
48	5,68	183,1	242,6	692,6	75,4	693,5	476,9	43,7	7,08
72	5,82	189,4	246,1	567,8	91,5	665,0	427,8	41,15	7,31
120	5,68	121,7	289,4	661,3	90,7	123,0	420,2	34,5	6,90
240	5,75	152,4	273,2	650,7	88,1	922,2	446,9	54,0	8,02

¹ Гликоген определялся непосредственно в мясе.

Таблица 12

Содержание витаминов
(по Букину)

Исследуемый объект	Витамины (в 100 г)				
	А, мг	Д, мг	С, мг	В ₁ , мг	В ₂ , мг
Мясо крупного рогатого скота	0,12—1,25	—	0,9	0,12—0,24	0,15
Печень	7—12	1,12	20—40	0,3	1—2,5
Молоко коровы	0,4—0,45	0,01—0,25	0,7—2,6	0,04—0,08	0,1
Молоко женское	0,18—0,5	0,05—0,25	3,5—7,0	0,04	—

Таблица 13

Состав говяжьего (температура плавления 44—50° С)
и бараньего (температура плавления 48—52° С) жиров, %

Компоненты жира	Жир	
	говяжий	бараний
Миристиновая кислота	2,0—2,5	2,0—4,6
Пальмитиновая „	27—29	24—27
Стеариновая „	24,5	25—30
Олеиновая „	43—44	36
Линолевая „	2,6	2,7—4,3
Вакценовая „	0,76—1,84	—
Стерины	0,08	0,09
Фосфатиды	Следы	Следы
Витамины	А+Д	А+Д

ОГЛАВЛЕНИЕ

Стр.

Предисловие	3
Глава I. Элементарный и общий химический состав организма	
Работа 1. Определение содержания воды и сухого остатка в крови	8
Работа 2. Определение содержания воды и сухого остатка в мышечной ткани	8
Работа 3. Качественное открытие важнейших элементов, входящих в состав тканей	9
Работа 4. Качественное исследование состава кости	11
Работа 5. Качественное открытие йода в ткани щитовидной железы	11
Работа 6. Качественное открытие роданистых солей в слюне человека	12
Работа 7. Определение кальция в мышечной ткани по Ретинскому	13
Работа 8. Определение малых количеств йода в животных организмах по Драгомировой	14
Работа 9. Определение малых количеств марганца в животных организмах по Лаврухиной	17
Глава II. Физико-химические факторы биохимических процессов	
<i>Осмотическое давление</i>	
Работа 10. Определение осмотического давления при помощи осмометра	20
Работа 11. Изменение эритроцитов под действием гипертонического и гипотонического растворов	20
Работа 12. Изменение эритроцитов в растворах хлористого натрия различных концентраций	20
Работа 13. Определение величины осмотического давления криоскопическим методом	21
Активная реакция среды и буферные системы организма	
<i>Колориметрия</i>	
Работа 14. Колориметрическое определение концентрации водородных ионов безбуферным методом	27
Работа 15. Колориметрическое определение концентрации водородных ионов окрашенной жидкости	29
Работа 16. Приготовление буферных смесей и изучение их свойств	30
Работа 17. Колориметрическое определение концентрации водородных ионов с помощью буферных смесей	31
Работа 18. Потенциометрический метод определения pH	32
Глава III. Ферменты	
<i>Общая характеристика ферментативных реакций</i>	
Работа 19. Специфичность ферментативного действия	40
Работа 20. Термостабильность ферментов и влияние $[H^+]$ на ферментативные реакции	41

Работа 21. Влияние температуры на скорость ферментативной реакции	41
Работа 22. Зависимость скорости ферментативной реакции от количества фермента	42
Работа 23. Определение $[H^+]$ оптимальной для амилазной активности амилазы слюны	42
Работа 24. Влияние хлористого натрия и фенилтиомочевины на амилазную активность амилазы слюны	43

Отдельные представители ферментов и получение ферментных препаратов

Работа 25. Получение препарата, содержащего панкреатическую амилазу (α -1,4-глюкоп-4-глюкоаногидролаза)	49
Работа 26. Гидролитическое расщепление жира при действии панкреатической липазы (гидролаза эфиров глицерина)	50
Работа 27. Кинетика гидролитического расщепления жира под действием липазы	51
Работа 28. Получение препарата уреазы из бобов сои (карбамид-амидогидролаза)	51
Работа 29. Получение препарата пепсина (пептид-пептидогидролаза)	52
Работа 30. Трипсин и триптический гидролиз белка (пептид-пептидогидролаза)	54
Работа 31. Коагулирующее действие химозина и других протеаз (пептид-пептидогидролаза)	55
Работа 32. Цитохромоксидаза (индофеноксидаза) (цитохром-с: O_2 -оксидоредуктаза)	56
Работа 33. Альдегидоксидаза (ксантинооксидаза) молока (альдегид: O_2 -оксидоредуктаза)	58
Работа 34. Феноксидаза (катехолоксидаза, о-дифенол: O_2 -оксидоредуктаза)	60
Работа 35. Пероксидаза (донор: H_2O_2 -оксидоредуктаза)	63
Пероксидаза хрена	64
Пероксидаза молока	65
Пероксидаза мышц	65
Пероксидаза крови	65
Работа 36. Каталаза (H_2O_2 : H_2O_2 -оксидоредуктаза)	65

Количественное определение ферментативного действия и активности ферментов

Работа 37. Определение амилазной активности амилазы слюны	68
Работа 38. Определение активности химозина	70
Работа 39. Определение активности тромбина (фибрин-фермент, пептид-пептидогидролаза)	71
Работа 40. Определение активности пепсина по Метту	72
Работа 41. Определение активности каталазы по Ваху и Зубковой	73

Глава IV. Углеводы

Моносахариды

Работа 42. D(+)-глюкоза (декстроза, виноградный сахар)	75
Работа 43. Определение угла вращения плоскости поляризации и удельного вращения D-глюкозы	79
Работа 44. Наблюдение мутаротации с раствором D-глюкозы	81
Работа 45. Определение глюкозы по Фелингу	81
Работа 46. Определение глюкозы по Бертрану	83
Работа 47. Определение глюкозы с гипойодитом	86
Работа 48. D(-)-фруктоза (левулоза)	87
Работа 49. Реакция Селиванова	88
Работа 50. Цветная реакция с ванилином на фруктозу	88

Дисахариды

Работа 51. Мальтоза (4-[α -D-глюкозидо-(1,5)]-D-глюкоза (1,5) и лактоза (4-[β -D-галактозидо-(1,5)]-D-глюкоза (1,5))	89
Работа 52. Качественный анализ смеси углеводов методом распределительной хроматографии на фильтровальной бумаге	90
Работа 53. Сахароза [α -D-глюкозидо-(1,5)]- β -D-фруктозид (2,5)	92
Работа 54. Получение препарата сахарозы из дрожжей	93

Полисахариды

Работа 55. Получение крахмала и растворимого крахмала	95
Работа 56. Реакция крахмала с йодом	96
Работа 57. Промежуточные ступени гидролиза крахмала	96
Работа 58. Гидролиз целлюлозы (клетчатка)	97
Работа 59. Получение гликогена	98

Ферментативный гидролиз углеводов

Работа 60. Определение осахаривающего действия панкреатической амилазы	100
--	-----

Обмен углеводов

Работа 61. Открытие сахара в моче	106
Работа 62. Определение гликогена в печени	107
Работа 63. Определение гликогена в мышечной ткани по Журавской и Крылову	108
Работа 64. Определение молочной кислоты	110

Глава V. Липиды

Жиры

Работа 65. Качественное исследование жира	115
Работа 66. Щелочное омыление жира и получение жирных кислот	116
Работа 67. Определение температуры плавления жира	117
Работа 68. Определение кислотного числа жира	117
Работа 69. Проба на появление кислотности в жире с нейтральной краской	118
Работа 70. Определение числа омыления и эфирного числа жира	118
Работа 71. Определение йодного числа жира	119
Работа 72. Определение жира в мясе	121

Изменения жиров при окислении

Работа 73. Открытие перекисей в прогорклом жире	123
Работа 74. Определение перекисей в присутствии третичного амина по Дроздову и Стариковой	124
Работа 75. Определение кислорода эпоксигрупп (оксирановый кислотород) по Дроздову и Матеранской	124
Работа 76. Открытие эпигидринового альдегида	125
Работа 77. Количественное колориметрическое определение эпигидринового альдегида по Дроздову и Матеранской	126
Работа 78. Открытие альдегидов в прогорклом жире	127
Работа 79. Липоксигеназа	127
Работа 80. Определение активности липоксигеназы	128

Обмен жиров

Работа 81. Открытие ацетоновых тел в моче	132
Работа 82. Количественное определение ацетона в моче	133

Стероиды

Работа 83. Получение холестерина из мозга	139
Работа 84. Цветные реакции на холестерин	139
Работа 85. Открытие холестерина в желчи	140
Работа 86. Свойства и реакции желчных кислот	140

Фосфолипиды

Работа 87. Выделение и исследование фосфатидов	143
--	-----

Глава VI. Белки (протеины)

Адсорбция

Работа 88. Измерение адсорбции уксусной кислоты на поверхности животного угля	149
Работа 89. Вытеснение с поверхности адсорбента одного вещества другим	150

Реакция осаждения

Работа 90. Осаждение при нагревании, кислотами и солями тяжелых металлов	150
Работа 91. Осаждение алкалоидными реактивами	151
Работа 92. Осаждение спиртом и нейтральными солями щелочных и щелочноземельных металлов (высаливание)	151
Работа 93. Очистка белков диализом	152

Изоэлектрическая точка

Работа 94. Определение изоэлектрической точки белков (желатина) методом коагуляции	154
--	-----

Электрофорез

Работа 95. Метод электрофореза на бумаге	156
--	-----

Цветные реакции

Работа 96. Биуретовая реакция (реакция Пиотровского)	156
Работа 97. Нингидриновая реакция	159
Работа 98. Ксантопротеиновая реакция (на тирозин, триптофан, фенилаланин)	159
Работа 99. Реакция на тирозин (реакция Миллона)	160
Работа 100. Реакция на тирозин с нитрозо- β -нафтолом	160
Работа 101. Реакция на триптофан (реакции конденсации с альдегидами)	161
Работа 102. Реакция с бромом на гистидин	162
Работа 103. Реакция на серусодержащие аминокислоты	162
Работа 104. Реакция на метионин	163
Работа 105. Реакция на аргинин	163
Работа 106. Реакция на гликокол (глицин)	164
Работа 107. Реакция Подобедова	164

Методы количественного исследования аминокислот, полипептидов и белков

Работа 108. Выделение аргинина из белковых гидролизатов	165
Работа 109. Колориметрическое определение фенилаланина	165
Работа 110. Формольное титрование	166
Работа 111. Газометрическое определение свободных аминогрупп по Ван-Слайку	167
Работа 112. Количественный анализ аминокислот путем хроматографирования. Определение значений R_F аминокислот	172

Отдельные представители белковых веществ

Протенны

Протеиды

Работа 113.	Яичный альбумин (овальбумин)	178
Работа 114.	Сывороточный альбумин (серумальбумин)	179
Работа 115.	Коллаген	179
Работа 116.	Казеин	180
Работа 117.	Нуклеопротенд дрожжей	181
Работа 118.	Гемоглобин	182

*Продукты гидролитического расщепления белков
и ферментативный гидролиз белков и полипептидов*

Работа 119.	Кислотные и щелочные альбуминаты	187
Работа 120.	Альбумозы и пептоны	188
Работа 121.	Продукты пептического гидролиза белков	189
Работа 122.	Продукты триптического гидролиза белков	189
Работа 123.	Действие комплекса ферментов эрепсина	190
Работа 124.	Действие дипептидазы слизистой тонких кишок	190

Обмен белков и конечные продукты азотистого обмена

Глава VII. Витамины

Группа витамина А

Работа 125.	Цветные реакции на витамин А	203
Работа 126.	Определение суммы каротиноидов в сыворотке крови по Рачевскому	203

Группа витамина D

Работа 127.	Цветные реакции на витамин D	206
-------------	--	-----

Группа витамина Е

Работа 128.	Открытие витамина Е	207
Работа 129.	Количественное определение витамина Е по Захаро- вой и Девятину	208

Группа витамина К

Работа 130.	Цветные реакции на витамин К	210
-------------	--	-----

Витамин С (L-аскорбиновая кислота)

Работа 131.	Качественное открытие витамина С	212
-------------	--	-----

Глава VIII. Биохимия тканей и жидкостей организма

Кровь

Работа 132.	Определение общего азота крови по Кьельдалю	212
Работа 133.	Определение небелкового (остаточного) азота сыворо- тки крови по Энгельгардту и Любимовой	214
Работа 134.	Определение угольной кислоты, связанной в виде бикар- боната, в плазме крови	216
Работа 135.	Свертывание крови под действием тромбина (фибрин- фермент, пептид-пептидогидролаза)	218
Работа 136.	Электрофорез белков сыворотки крови на агар-агаре	221

Моча

Работа 137.	Определение общего азота мочи по Иохельсону	224
Работа 138.	Выделение мочевины из мочи	225
Работа 139.	Открытие креатина в моче	226

Работа 140. Выделение мочевой кислоты из мочи	227
Работа 141. Исследование некоторых свойств мочевой кислоты	227
Работа 142. Определение мочевой кислоты осаждением в виде кис- лого мочекислового аммония	228
Работа 143. Количественный метод определения мочевой кисло- ты в моче	228
Работа 144. Определение гиппуровой кислоты в моче	229
Работа 145. Открытие индикана в моче	230

Мышечная ткань

Работа 146. Качественное исследование химического состава мышцы	236
Работа 147. Определение коллагена и эластина в мясе по Волонинской	238
Работа 148. Получение миозина	239
Работа 149. Фракционирование белков водного экстракта мышцы	239

Николай Сергеевич Дроздов

Наталья Петровна Матеранская

Практикум по биологической химии

Редактор М. М. Нефедова
Переплет художника В. М. Лукьянова
Художественный редактор В. П. Бабикова
Технический редактор Л. А. Григорчук
Корректор М. М. Малниовская

Сдано в набор 16/1—1970 г. Подп. к печати 5/VIII—1970 г. Формат 60×90¹/₁₆. Объем
16 печ. л. Уч.-изд. л. 14,44. Изд. № Е-151. Тираж 15000 экз. Цена 66 коп. Зак. 592.
План выпуска литературы издательства «Высшая школа» (вузы и техникумы)
на 1970 г. Позиция № 108.

Москва, К-51, Неглинная ул., д. 29/14, Издательство «Высшая школа».

Типография им. Аюхина Управления по печати при Совете Министров Карельской
АССР, г. Петрозаводск, ул. «Правды», 4.