



**ПРАКТИКУМ
ПО
БИОХИМИИ
СЕЛЬСКО-
ХОЗЯЙСТВЕННЫХ
ЖИВОТНЫХ**



ПРАКТИКУМ ПО БИОХИМИИ

5771
П-691

СЕЛЬСКО- ХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

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



МОСКВА «ВЫСШАЯ ШКОЛА» 1980

ББК 45.2
П 69

А. В. Четкин, В. И. Воронянский, Г. Г. Покусай,
Н. И. Карташов, Н. Л. Докторович, И. В. Кириченко

Рецензенты:

Кафедра химии и биохимии Курского сельскохозяйственного
института (зав. кафедрой проф. С. И. Вишняков);
кафедра кормления, физиологии и биохимии Кубанского
сельскохозяйственного института (зав. кафедрой
проф. К. Г. Сухомлин)

**Практикум по биохимии сельскохозяйственных
П69 животных: Учеб. пособие для зооинженерных и ве-
теринарных фак. с.-х. вузов / А. В. Четкин, В. И.
Воронянский, Г. Г. Покусай и др. -- М.: Высш. школа,
1980. — 303 с., ил.**

В пер.: 90 к.

В разделах практикума, посвященных углеводам, липидам, витаминам, биохимии тканей, биологическим жидкостям и др., предусмотрена определенная детализация проведения опытов, что облегчает самостоятельную работу студентов.

Пособие содержит элементы теории и методов практической работы по физической и коллоидной химии. Многие методы имеют прямое отношение к работе промышленных комплексов животноводства и птицеводства, химических отделов ветеринарных бактериологических лабораторий и санитарной службы.

Предназначается для студентов зооинженерных и ветеринарных вузов и факультетов. Может быть полезно специалистам и практикам сельского хозяйства.

П $\frac{40701-440}{001(01)-80}$ 58-80 3804010300

ББК 45.2
636.02

ПРЕДИСЛОВИЕ

Решениями XXV съезда КПСС на десятую пятилетку (1976—1980) предусматривается довести среднегодовое производство мяса в убойной массе до 15—15,6 млн. т, молока — до 94—96 млн. т и яиц — до 58—61 млрд. шт. Такой рост производства продукции животноводства базируется на дальнейшей интенсификации отрасли путем повышения продуктивности скота и птицы, роста их поголовья, эффективного использования кормов, совершенствования племенной работы, механизации труда и внедрения прогрессивной технологии.

Главное направление развития — дальнейшая специализация, концентрация и индустриализация всех отраслей животноводства. Эти условия требуют подготовки качественно новых специалистов (зооинженеров и ветеринарных врачей) для выполнения сложных задач, стоящих перед животноводством.

Промышленные комплексы по производству мяса, молока и яиц, как правило, имеют хорошо оснащенные лаборатории, выполняющие зоотехнические и ветеринарные исследования. Подготовка специалистов к работе в новых условиях начинается в лабораториях институтов, что предусматривает наличие соответствующей литературы.

Настоящий практикум предназначен для студентов зооинженерных и ветеринарных факультетов. По своему содержанию практикум отвечает программе курса биологической химии для этих специальностей. Перед практическими работами каждого раздела приводятся краткие теоретические предпосылки по химии и метаболизму этих веществ, а к каждому методу предлагается разбор его сущности и назначения, что даст возможность студенту работать самостоятельно и, как мы считаем, с интересом.

После некоторых работ студенту представляется возможность оформить свой фактический материал в виде таблиц с целью его обобщения и написания выводов.

Практикум изложен с определенной детализацией проведения опытов, что является одной из важных задач пособия подобного характера. Такой порядок написания дает возможность работающему выполнить ту или иную задачу без устных разъяснений и указаний со стороны преподавателя.

Количество опытов и методов рассчитано на большее время, чем предусматривается тематическими планами кафедр. Это дает возможность выбора методов в зависимости от технической оснащённости лаборатории учебного заведения.

Данное пособие может быть использовано не только для обязательных занятий, но и при выполнении студентам учебно-исследовательской работы (УИР), предусмотренной учебным планом по биохимии или другому предмету, а также при проведении занятий в научных кружках.

Многие методы имеют прямое отношение к работе современных лабораторий промышленных комплексов животноводства и птицеводства или же химических отделов ветеринарных баклабораторий, имея в виду их диагностическое значение.

Настоящий практикум содержит элементы теории и методы практических работ по физической и коллоидной химии, что существенно отличает его от аналогичных руководств других авторов.

Коллектив авторов выражает благодарность профессорам С. И. Вишнякову, К. Г. Сухомлин и доценту С. А. Леваптовскому за ценные замечания и пожелания, высказанные в рецензиях на данное руководство.

Проф. А. В. Четкин

ГЛАВА I

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

МОЛЕКУЛЯРНО-КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РАЗБАВЛЕННЫХ РАСТВОРОВ

Диффузия

Разбавленные растворы обладают способностью к самопроизвольному выравниванию концентрации во всем их объеме. Этот процесс осуществляется благодаря тепловому движению молекул растворенного вещества и растворителя, приводящему к взаимному проникновению молекул. Такое явление получило название *диффузии*. Ее можно наблюдать при погружении в чистый растворитель кристаллов окрашенных веществ.

Приборы. Цилиндры из бесцветного стекла на 250 мл. Пинцет.

Реактивы. Крупные кристаллы марганцевокислого калия, дихромовокислого калия, кристаллики или другие окрашенные вещества. Жидкий силикатный клей.

Ход работы. Кристаллик окрашенного вещества на несколько секунд погружают в силикатный клей и переносят в цилиндр с водой. По мере растворения клея частички вещества постепенно распространяются по всему объему растворителя в цилиндре, окрашивая равномерно раствор в соответствующий цвет. Скорость диффузии при этом обратно пропорциональна размерам молекул растворенного вещества.

Влияние температуры на скорость диффузии

Причина диффузии — тепловое движение молекул. С повышением температуры раствора скорость диффузии обычно возрастает.

Приборы. Электроплитка. Химические стаканы на 250—500 мл. Штатив с лапками. Стекланые трубки диаметром 3—5 мм и длиной 30—40 мм. Белые подставки для стаканов.

Реактивы. Кристаллы марганцевокислого калия или другого окрашенного вещества.

Ход работы. В два химических стакана наливают по 250—300 мл воды. Один стакан помещают на электроплитку и нагревают до кипения. Затем в оба стакана,

помещенные на белые подставки, вставляют стеклянные трубки так, чтобы они находились в центре стакана, не доходя до дна на 10—12 мм. Трубки закрепляют в штативе и одновременно в каждый стакан (с горячей и холодной водой) по ним опускают кристаллики $KMnO_4$. В стакане с горячей водой $KMnO_4$ очень быстро растворяется, образуя равномерно окрашенный раствор. Диффузия в стакане с холодной водой идет очень медленно.

Опыт служит доказательством теплового движения молекул, лежащего в основе диффузии, и наглядно иллюстрирует, как с повышением температуры раствора скорость движения молекул значительно возрастает и диффузия становится более выраженной.

Осмоз и осмотическое давление

Диффузия в растворах может быть прямая и непрямая. При непрямой диффузии частички растворенного вещества и растворителя встречают провищаемую органическую перегородку, например перегородку из коллодия, и свободно проникают через нее. Однако если между чистым растворителем и раствором поместить так называемую полупроницаемую перегородку, то через нее могут проникать только молекулы растворителя. Односторонняя диффузия растворителя через полупроницаемую перегородку называется *осмосом*. Молекулы растворителя при своем движении, встречая полупроницаемую перегородку, свободно проникают через нее, молекулы же растворенного вещества, находясь в состоянии теплового движения, наталкиваются на полупроницаемую перегородку, ударяются о нее, создавая при этом определенное давление. Такое давление называют осмотическим. Осмотическое давление складывается из суммы ударов, которые приходятся на определенную площадь полупроницаемой перегородки в единицу времени. Величина осмотического давления выражается в паскалях (Па)¹.

Осмотические явления играют большую роль в физиологических процессах растительных и животных организмов. Только в условиях изотонии в крови, межтканевых жидкостях и клетках возможно нормальное течение биохимических и физиологических процессов. Повы-

¹ 1 Па = 1 н/м². 1 атм = 101 325 Па = 0,101 МПа.

шение осмотического давления в тканях приводит к отекам, уменьшение осмотического давления в крови вызывает гемолиз эритроцитов. Многие заболевания внутренних органов — почек, сердца, легких — сопровождаются повышением осмотического давления в крови. При повышении осмотического давления в почвенных водах значительно ухудшается водоснабжение растений и они быстро увядают и гибнут.

Обнаружение осмотического давления растворов

Приборы. Осмометр. Штатив с лапкой. Химический стакан.
Реактивы. 30—50%-ный раствор глюкозы (подкрашенный).

Явление осмоса проще всего наблюдать с помощью осмометра (рис. 1). Для изготовления осмометра берут

стеклянный цилиндр с обрезанным дном или стеклянную трубку диаметром 2—3 см и длиной 10—15 см. Одно из отверстий цилиндра или трубки плотно затягивают полупроницаемой мембраной (мочевой пузырь животных, пергамент или целлофан), которую укрепляют на цилиндре шелковой ниткой или резиновым кольцом. Идеальная полупроницаемая мембрана — перегородка из железистосинеродистой меди. Для ее изготовления в пористый глиняный цилиндр наливают раствор желтой кровяной соли и погружают в стакан с раствором сернистой меди. Проникая в поры цилиндра, растворы реагируют друг с другом с образованием железистосинеродистой меди, которая и выполняет роль идеальной полупроницаемой перегородки. В цилиндр наливают доверху 30—50%-ный

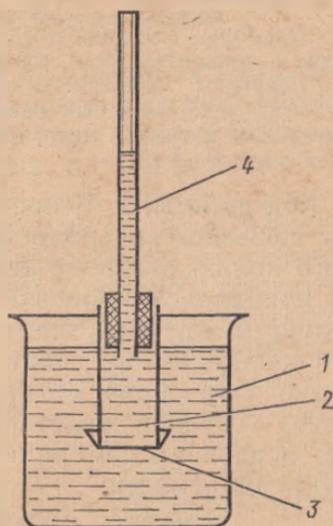


Рис. 1. Осмометр:

1 — вода, 2 — исследуемый раствор, 3 — полупроницаемая мембрана, 4 — капилляр

раствор глюкозы, закрывают пробкой, в которую вставлена тонкая стеклянная трубка. Раствор в цилиндре для лучшей видимости подкрашивают органическим краси-

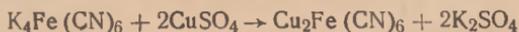
телем. Изготовленный осмометр помещают в стакан с дистиллированной водой и закрепляют в штативе. Так как молекулы растворителя свободно проникают через полупроницаемую перегородку, то после определенного промежутка времени наблюдается постепенное поднятие жидкости в стеклянной трубке осмометра. Оно будет происходить до тех пор, пока гидростатическое давление раствора в осмометре не станет равным его осмотическому давлению, т. е. установится равновесие между скоростью проникновения молекул растворителя в осмометр и из осмометра в растворитель. Если измерить гидростатическое давление жидкости в этот момент в осмометре ртутным манометром, то оно будет отвечать и величине осмотического давления раствора в осмометре.

Искусственные полупроницаемые мембраны

Приборы. Проекционный фонарь. Штатив с пробирками. Пипетка с тонкооттянутым кончиком. Химический стакан на 100 мл.

Реактивы. Железистосинеродистый калий, 2%-ный раствор. Сульфат меди, 16%-ный раствор на 10%-ном растворе сахарозы. Кристаллы хлоридов меди, кобальта, марганца, железа. Силикатный клей (1 : 3).

Ход работы. 1. В пробирку наливают 3—4 мл раствора железистосинеродистого калия и пипеткой вносят в него каплю раствора сернокислой меди так, чтобы капля находилась у поверхности жидкости. В результате реакции между железистосинеродистым калием и сернокислой медью на границе растворов возникает тонкая, резко очерченная мембрана в виде ячейки коричневого цвета — осадок железистосинеродистой меди. Это и будет осадочная мембрана с присущими ей свойствами полупроницаемости:



Вода из окружающего раствора, который имеет меньшее осмотическое давление, чем давление внутри ячейки, через мембрану будет поступать внутрь. Ячейка увеличивается в размере и лопаается. При соприкосновении железистосинеродистого калия, вытекающего из лопнувшей ячейки, с сернокислой медью вновь образуются осадочные мембраны железистосинеродистой меди.

2. В водный раствор силикатного клея (1 : 3), который предварительно наливают в химический стакан, опускают кристаллы хлористых солей меди, кобальта,

марганца, железа. В результате реакции между растворимым стеклом и солями вокруг кристаллов образуются полупроницаемые мембраны кремневокислых солей меди, кобальта, железа, марганца в виде ячеек с заключенными в них солями. Внутри ячеек осмотическое давление более высокое, чем в окружающем растворе, и вода из раствора всасывается в ячейки. Возникают новые ячейки, которые вновь лопаются, и т. д. В результате в стакане можно наблюдать причудливой формы образования, напоминающие деревца, водоросли, травы разного цвета.

Все эти явления можно видеть невооруженным глазом непосредственно в пробирке или стакане, а еще лучше — на экране при отражении их проекционным фонарем.

Влияние растворов с разным осмотическим давлением на эритроциты и растительные клетки

В зависимости от величины осмотического давления разбавленные растворы подразделяют на *изотонические*, *гипотонические* и *гипертонические*. В изотоническом растворе животные и растительные клетки физически не изменяются. В них происходит двусторонний осмос и клетки не набухают и не сморщиваются. В гипотонических растворах растворитель осмотически всасывается в клетки — происходит эндосмос, который у растительных клеток вызывает *тургор*, а у эритроцитов — *гемолиз*. Гемолиз является следствием чрезмерного растяжения оболочек эритроцитов, в результате чего увеличивается их пористость, и содержимое эритроцитов переходит в окружающий раствор. Возможен гемолиз эритроцитов и другого порядка. Так, если кровь смешать с эфиром, спиртом или щелочью, происходит растворение липидов, участвующих в формировании оболочки эритроцитов, разрушенная оболочка становится проницаемой, и содержимое клетки также переходит в окружающий раствор. Подобное явление происходит и при действии на эритроциты некоторых органических ядов.

В гипертонических растворах эритроциты и растительные клетки подвергаются экзосмосу, что приводит к сморщиванию клеток. Такое явление получило название *плазмолиза*.

Приборы. Микроскоп. Предметные и покровные стекла. Тигельки или пробирки. Стеклянные палочки. Препаровальные иглы.

Реактивы. Хлорид натрия, 0,1—0,8%-ный и 10%-ный растворы. Цитратная кровь. Лук.

Ход работы. 1. В три пробирки наливают по 2—3 мл раствора хлористого натрия (в пробирку 1—10%-ный, в пробирку 2—0,8%-ный, в пробирку 3—0,1%-ный) и в каждую из них добавляют по 1—2 капли крови. Содержимое каждой пробирки перемешивают и сразу берут стеклянной палочкой каплю из пробирки 3 на предметное стекло, покрывают ее покровным стеклом и рассматривают под микроскопом при большом увеличении. Когда опыт выполняется быстро, то в поле зрения микроскопа можно наблюдать отдельные эритроциты, быстро увеличивающиеся в объеме и постепенно теряющие свои очертания в связи с гемолизом.

После наблюдения за эритроцитами в гипотоническом растворе (0,1%-ный раствор хлористого натрия по отношению к эритроцитам гипотоничен) изучают действие на них изотонического и гипертонического растворов, для чего капли из пробирок 1 и 2 помещают на предметное стекло, накрывают покровным и рассматривают под микроскопом при большом увеличении.

2. В три другие пробирки наливают по 2—3 мл раствора хлористого натрия разной концентрации, как и в предыдущем опыте. В каждую из них помещают по кусочку тонкой пленки лука, отирепарированного иглой. Спустя 10 мин после погружения пленок лука в растворы, их извлекают, помещают на предметное стекло, накрывают покровными стеклами и рассматривают под микроскопом при большом увеличении.

Наблюдаемые под микроскопом изменения эритроцитов и растительных клеток под влиянием растворов хлористого натрия, имеющих разные концентрации, а следовательно, и разные осмотические давления, зарисовать в тетрадь с указанием характера изменений.

Определение осмотической резистентности эритроцитов (ОРЭ)

Под *осмотической резистентностью* эритроцитов понимают устойчивость эритроцитов к гемолизу при действии на них гипотонических растворов хлористого натрия. Известно, что в образовании оболочки эритроцитов наряду с другими веществами принимают участие лецитин и холестерин. В оболочке молодых эритроцитов пре-

обладает лецитин, тогда как в оболочке старых — холестерин. В связи с этим молодые эритроциты более подвержены гемолизу, чем старые. Если в организме процессы кроветворения проходят нормально и эритроциты не разрушаются преждевременно, то при определении ОРЭ крови такого организма начало и конец гемолиза очень растянуты. В случае, когда кроветворение нарушено и молодые эритроциты в кровь не поступают, ОРЭ такой крови начинается при сравнительно низких концентрациях растворов хлористого натрия, а если эритроциты в организме из-за каких-либо причин быстро разрушаются, т. е. в крови содержатся только молодые эритроциты, ОРЭ такой крови начинается и заканчивается при сравнительно высоких концентрациях хлористого натрия в растворе (0,7—0,6%).

Приборы. Центрифуга. Центрифужные пробирки. Градуированная пипетка на 1 мл. Пипетка на 5 мл.

Реактивы. Раствор хлорида натрия, 1%-ный. Цитратная кровь.

Ход работы. Предварительно готовят растворы хлористого натрия разной концентрации. В заранее пронумерованных пробирках смешивают 1%-ный раствор хлористого натрия и воду по схеме

Номер пробирки . . .	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
NaCl, 1%-ный (мл)	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
Вода дистиллированная (мл)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Полученная концентрация NaCl (%)	1	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1

Затем в каждую из пробирок добавляют по 0,2 мл крови. Содержимое пробирок перемешивают и оставляют на 10 мин в штативе, далее центрифугируют в течение 5—10 мин при 1,5 тыс. об/мин. По окончании центрифугирования определяют пробирки, где гемолиз только начался и где он прошел до конца. Показателем начала гемолиза служит окрашивание надосадочной жидкости в красный цвет при наличии осадка негемолизированных эритроцитов. Полный гемолиз эритроцитов произошел в пробирке, где осадок эритроцитов отсутствует, а жидкость окрашена в красный цвет.

Этот опыт может быть использован в клинической практике для дополнительных диагностических исследований (табл. 1).

Таблица 1. Резистентность эритроцитов крови домашних животных

Вид животного	Резистентность эритроцитов		Пределы резистентности
	минимальная	максимальная	
Крупный рогатый скот	0,74—0,64	0,46—0,42	0,74—0,42
Лошадь	0,66—0,52	0,44—0,38	0,66—0,38
Верблюд	0,44—0,38	0,24—0,20	0,44—0,20
Як	0,60—0,56	0,48—0,42	0,60—0,42
Овца	0,80—0,76	0,50—0,46	0,80—0,46
Коза	0,76—0,64	0,60—0,48	0,76—0,48
Свинья	0,72—0,60	0,46—0,42	0,72—0,42
Собака	0,58—0,54	0,42—0,36	0,58—0,36
Кошка	0,68—0,60	0,46—0,42	0,68—0,42
Кролик	0,46—0,42	0,34—0,32	0,46—0,32
Курица	0,60	0,38	0,60—0,38

Определение осмотического давления растворов неэлектролитов криоскопическим методом

В основу криоскопического метода положено определение понижения точки замерзания раствора по сравнению с температурой замерзания чистого растворителя. Разницу между температурой замерзания растворителя и раствора называют депрессией раствора (Δt). Известно, что каждый растворитель имеет строго определенную моляльную депрессию, т. е. при содержании в 1000 г растворителя одной граммолекулы любого неэлектролита моляльная депрессия будет всегда определенной.

Ниже даны криоскопические постоянные (K) для отдельных растворителей:

Растворитель	Температура замерзания	K
Вода	0,0	1,86
Бензол	5,5	5,1
Уксусная кислота	16,6	3,6
Диоксан	11,7	4,7
Нафталин	80,1	7,1
Камфора	178,4	37,7

По закону Рауля температура замерзания растворов неэлектролитов прямо пропорциональна концентрации растворенного вещества:

$$\Delta t = K \cdot m,$$

где Δt — депрессия раствора, m — моляльная концентрация раствора, т. е. количество молей вещества, нахо-

дящихся в 1000 г растворителя, K — криоскопическая постоянная, или моляльная депрессия раствора.

На основании найденной опытным путем депрессии раствора можно высчитать осмотическое давление раствора, молекулярную массу вещества, концентрацию растворенного вещества.

Непосредственное измерение осмотического давления осмометром связано с рядом затруднений: длительностью опыта, подбором подходящей полупроницаемой мембраны и т. д. Поэтому в практике пользуются косвенными методами определения осмотического давления, одним из которых является метод криоскопии. Этот метод основан на законах Вант-Гоффа и Рауля. Согласно теории Вант-Гоффа, физические явления в разбавленных растворах неэлектролитов подчиняются простейшим газовым законам, из которых следует, что осмотическое давление раствора ($P_{\text{осм}}$) прямо пропорционально концентрации раствора (C), газовой постоянной (R) и абсолютной температуре (T): $P_{\text{осм}} = CRT$.

По закону Рауля, как об этом было сказано выше, $\Delta t = K \cdot m$, где m — моляльная концентрация раствора, которая для разбавленных растворов практически соответствует молярной концентрации (C), т. е. концентрации молей вещества в 1 л раствора. Следовательно, $C = m$, а так как $\Delta t = K \cdot m$, то $C = \Delta t / K$, отсюда

$$P_{\text{осм}} = \frac{\Delta t}{K} RT.$$

Если вместо букв в уравнение подставить цифровые значения, характерные для водных растворов, то

$$P_{\text{осм}} = \frac{\Delta t}{1,86} \cdot 8,31 \cdot 10^3 \cdot 273 = \Delta t \cdot 12,25 \text{ МПа}.$$

Используя метод криоскопии, можно вычислить осмотическое давление на основании закона Авогадро — Жерара, согласно которому моль вещества, заключенный в 1 л раствора, создает осмотическое давление в 2,26912 МПа. Депрессия молярного водного раствора составляет $1,86^\circ \text{C}$, отсюда

$$P_{\text{осм}} = \frac{\Delta t \cdot 2,26912 \cdot T_1}{1,86 \cdot T_0},$$

где $\Delta t - t$ — замерзания исследуемого раствора, T_1 — температура раствора (по Кельвину), T_0 — абсолютная температура (273°C).

Исходя из закона Авогадро — Жерара можно найти и молекулярную массу вещества при известной его концентрации и найденной в процессе криоскопии депрессии раствора. Молекулярная масса в данном случае вычисляется по следующей формуле:

$$M. m. = \frac{c \cdot 1,86 \cdot T_1}{\Delta t \cdot T_0}$$

где $M. m.$ — молекулярная масса вещества, c — навеска вещества (г), растворенная в 1000 г воды, Δt — депрессия приготовленного раствора.

Описание прибора для криоскопических исследований. Для измерения температуры замораживания растворителя и разбавленного раствора с целью определения его депрессии пользуются специальным прибором, который состоит из небольшого стеклянного сосуда с крышкой (рис. 2). В центре крышки имеется отверстие, служащее для укрепления специального сосуда для замораживания исследуемого раствора. Во второе отверстие вставляется мешалка и в третье — обыкновенный термометр для определения температуры охлаждающей смеси. Сосуд для замораживания состоит из двух пробирок, вставленных одна в другую. Наружная пробирка служит футляром для внутренней, предохраняя ее от повреждения кусками льда, а также создает условия для более равномерного охлаждения жидкости во внутренней пробирке. Внутренняя пробирка укрепляется во внешней с помощью пробки и сама тоже закрыта пробкой, через которую в нее вставляются термометр Бекмана и мешалка из проволоки. Термометр Бекмана позволяет измерять температуру в пределах 6°C (рис. 3). Однако, благодаря наличию в верхней части термометра дополнительного резервуара с ртутью, его можно настраивать для определения как низких, так и высоких температур. Каждый градус в термометре разбит на 100 делений, поэтому экспериментатор, вооруженный лупой, может отсчитывать показатели температуры с точностью до тысячных долей градуса, что необходимо при измерении депрессии разбавленных растворов.

Настройка термометра Бекмана осуществляется следующим образом. При определении температуры замораживания воды и водных растворов в стакане готовят смесь воды со льдом, чтобы ее температура была в пределах от $+2,5$ до $+3^\circ \text{C}$ (по обычному термометру).

Термометр Бекмана переворачивают верхним концом вниз и встряхивают до соединения столбика ртути в капилляре со ртутью в верхнем резервуаре. Затем термометр осторожно переворачивают в нормальное положение (стараться, чтобы столбик ртути при этом не разор-

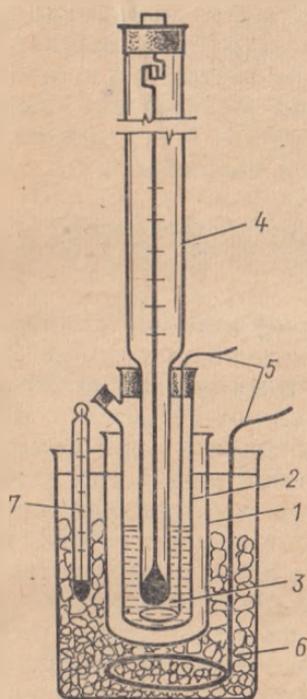


Рис. 2. Прибор для криоскопических исследований:

- 1 — наружная пробирка,
- 2 — внутренняя пробирка,
- 3 — исследуемый раствор,
- 4 — термометр Бекмана,
- 5 — мешалка, 6 — охлаждающая смесь, 7 — термометр

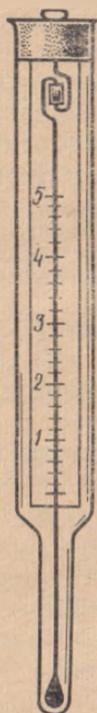


Рис. 3. Термометр Бекмана

вался) и опускают его нижний конец в стакан с ранее приготовленной смесью воды со льдом. Выдерживают 3—5 мин, пока ртуть примет температуру жидкости.

Затем термометр вынимают из смеси и, держа его в правой руке, энергично, но не сильно ударяют по нему левой рукой для того, чтобы разорвать соединение ртутного столбика в верхней части капилляра с дополнитель-

ным резервуаром. Все это надо производить быстро, иначе количество ртути в нижнем резервуаре не будет соответствовать той температуре, при которой производилась настройка прибора. Если после этого термометр поместить снова в воду со льдом (температура около 0°C) и мениск ртутного столбика в капилляре не будет выходить за пределы шкалы, то прибор считается правильно настроенным. Если мениск ртутного столбика выйдет за пределы шкалы, то настройку термометра надо повторить в той последовательности, как это указано выше. Настроенный термометр надо держать в вертикальном положении и охранять от ударов и сотрясений.

Приборы. Прибор для определения температуры замерзания.

Реактивы. Охлаждающая смесь (измельченный лед с хлоридом натрия). Исследуемый раствор.

Ход работы. В среднюю пробирку прибора наливают исследуемую жидкость в таком количестве, чтобы она полностью покрывала нижний ртутный резервуар термометра Бекмана. В пробирку вставляют термометр Бекмана и проволочную мешалку, укрепляя их при помощи пробки. Затем пробирку с исследуемой жидкостью вставляют в пустую наружную пробирку и закрепляют пробкой. Собранный прибор помешают в сосуд с охлаждающей смесью. По мере охлаждения исследуемого раствора ртутный столбик в термометре Бекмана опускается до определенного уровня, а через некоторое время резко поднимается на несколько делений, затем вновь начинает опускаться. Происходит это оттого, что жидкость во внутренней пробирке под действием охлаждающей смеси переохлаждается, а в момент перехода ее в кристаллики льда из нее выделяется скрытая тепловая энергия замерзания. Отсчеты на термометре Бекмана производят в тот момент, когда после опускания ртутного столбика он поднимается на несколько делений. Точка подъема ртутного столбика на шкале термометра в момент образования кристалликов льда и является истинной температурой замерзания. Для получения точных данных определение температуры замерзания проводят 2—3 раза и из найденных показателей находят среднее арифметическое. Определение считается правильным, если расхождения между отдельными показателями не превышают $0,005^{\circ}\text{C}$. Для повторного определения пробирку с исследуемой жидкостью вынимают из охлаждающей сме-

си и расплавляют кристаллики льда в ней теплом руки, далее опыт повторяют по вышеописанной методике.

Для определения осмотического давления раствора криоскопическим методом узнают температуру замерзания растворителя, а затем температуру замерзания раствора. По разнице между этими величинами находят депрессию раствора и производят расчет его осмотического давления по формуле

$$P_{\text{осм}} = CRT \quad \text{или} \quad P_{\text{осм}} = \frac{\Delta t}{K} RT,$$

где Δt — депрессия раствора, найденная опытным путем, K — криоскопическая постоянная растворителя (1,86), R — универсальная газовая постоянная ($R = 8,31 \cdot 10^3$), T — абсолютная температура ($273^\circ + t$); следовательно,

$$P_{\text{осм}} = \frac{\Delta t}{1,86} \cdot 8,31 \cdot 10^3 \cdot (273^\circ + t).$$

Если температура исследуемого раствора 37°C , то

$$P_{\text{осм}} = \frac{\Delta t}{1,86} \cdot 8,31 \cdot 10^3 \cdot 310.$$

Допустим, что найденная при исследовании $\Delta t = 1,634^\circ \text{C}$, тогда

$$P_{\text{осм}} = \frac{1,634}{1,86} \cdot 8,31 \cdot 10^3 \cdot 310 = 2,258 \text{ МПа.}$$

Расчет можно произвести и по формуле

$$P_{\text{осм}} = \frac{\Delta t \cdot 2,26912 \cdot T_1}{K \cdot T_0},$$

где Δt — найденная депрессия раствора; 2,26912 МПа — осмотическое давление грамм-молекулы вещества, растворенной в 1000 г растворителя, K — криоскопическая постоянная. Если $\Delta t = 1,634^\circ \text{C}$, то

$$P_{\text{осм}} = \frac{1,634 \cdot 2,26912 \cdot 310}{1,86 \cdot 273} = 2,258 \text{ МПа.}$$

В практике часто прибегают к определению депрессии сыворотки крови, мочи и других биологических жидкостей, а на основании депрессии, как это показано выше, можно высчитать осмотическое давление. Осмотическое давление крови животных довольно постоянно и выражается следующими величинами:

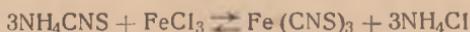
Вид животного	Депрессия	Осмотическое давление (МПа)
Лошадь	0,558	0,67—0,74
Корова	0,611	0,70—0,80
Овца	0,618	0,71—0,75
Свинья	0,618	0,71—0,77
Собака	0,597	0,68—0,70

Осмотическое давление мочи значительно выше, чем осмотическое давление крови. Объясняется это тем, что при попадании в кровь избытка осмотически активных веществ почки немедленно выделяют эти вещества в мочу и осмотическое давление крови практически остается неизменным. При некоторых заболеваниях, когда поражаются почки и перестают выполнять свою функцию, наблюдается снижение осмотического давления мочи (обычно ее осмотическое давление колеблется в пределах 16—28 МПа) и одновременно повышается осмотическое давление крови.

В практике криоскопический метод используется также для выявления фальсификации молока.

Константа равновесия обратимых реакций

Обратимыми называются реакции, идущие в прямом и обратном направлениях. Все обратимые реакции характеризуются константой равновесия, т. е. отношением произведения из концентраций продуктов прямой реакции к произведению из концентраций продуктов обратной реакции. Так, константа равновесия для реакции между хлорным железом и роданистым аммонием следующая:



$$K = \frac{[\text{Fe}(\text{CNS})_3] \cdot [\text{NH}_4\text{Cl}]^3}{[\text{NH}_4\text{CNS}]^3 \cdot [\text{FeCl}_3]}$$

Приборы. Штатив с 4 пробирками. Колба на 500 мл. Пипетка. Мерный цилиндр на 250 мл.

Реактивы. Роданид аммония, 1 н. раствор. Хлорид железа (II) 1 н. раствор. Хлорид аммония в порошке.

Ход работы. В колбу наливают 100 мл дистиллированной воды и добавляют по 5 мл раствора роданистого аммония и хлорного железа. Содержимое колбы хорошо размешивают и разливают в четыре пробирки по 5—6 мл в каждую. Затем в первую пробирку добавляют 1 мл

роданистого аммония, во вторую — 1 мл хлорного железа, в третью — щепотку порошка хлористого аммония, четвертая остается контрольной. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и сравнивают с окраской содержимого контрольной пробирки. Нужно объяснить причину изменения окраски растворов.

Электролитическая диссоциация

Электролитическая диссоциация — это самопроизвольный распад электролита на электрически заряженные частички (ионы) в растворе. Электролитическая диссоциация наиболее хорошо выражена в растворе, когда растворитель обладает наибольшей диэлектрической постоянной, т. е. когда растворитель может уменьшать взаимодействие между противоположно заряженными частичками (ионами) с наибольшей силой. Таким растворителем является вода. Следовательно, в воде электролитическая диссоциация протекает в наибольшей степени. Под степенью электролитической диссоциации понимают отношение диссоциированных молекул к недиссоциированным. Степень диссоциации зависит от природы растворителя, природы растворенного вещества, концентрации раствора, температуры, от наличия в растворе других электролитов с аналогичным ионом.

Образующиеся в процессе электролитической диссоциации ионы увеличивают общую концентрацию частичек растворенного вещества и тем самым повышают осмотический эффект растворов. Кроме этого, ионы придают растворам более высокую химическую активность и наделяют их биологической активностью, т. е. растворы электролитов при действии на клетки, органы и целые организмы могут повышать или понижать их физиологическую активность. Изолированное действие некоторых ионов на одноклеточные организмы обычно заканчивается быстрой гибелью последних за счет перевозбуждения или чрезмерного угнетения. Так, ионы, возникающие при диссоциации калиевых и натриевых солей, вызывают сильное возбуждение клеток и последующую их гибель в результате перевозбуждения; ионы, возникающие при диссоциации кальциевых и магниевых солей, угнетают функции клетки, а при продолжительном действии вызывают их гибель. Смесь одновалентных и двухвалентных ионов, взятых в строго определенном

соотношении, не вызывает отклонений в физиологическом состоянии клетки. В такой смеси происходит взаимное подавление ядовитого действия ионов вследствие полного антагонизма. Изотонические растворы, содержащие соли одно- и двухвалентных металлов, взятых в определенном соотношении, не обладающие ядовитым действием на организм, получили название эквilibрированных или физиологических растворов. Примером таких растворов может служить раствор Рингера, Рингера — Локка, Рингера — Тирроде (табл. 2).

Таблица 2. Солевой состав физиологических растворов (на 1 л раствора)

Компоненты	Количество компонентов в растворе, г		
	Рингера	Рингера — Локка	Рингера — Тирроде
NaCl	6,5	9,0	8,0
KCl	0,14	0,42	0,2
CaCl ₂	0,12	0,24	0,2
MgCl ₂	—	—	0,1
NaHCO ₃	0,2	0,15	0,1
NaH ₂ PO ₄	—	—	0,05
Глюкоза	—	1,0	1,0

Физиологические растворы используются при постановке опытов с переживающими органами и тканями для изучения биохимических и физиологических процессов в них, а также при изготовлении питательных сред в бактериологической практике, для внутривенных введений при значительных кровопотерях, при обезвоживании организма. Их можно использовать также при диспепсиях у молодняка вместо питьевой воды.

Особую роль играют водородные и гидроксильные ионы, определяющие активную реакцию (кислотность или щелочность) растворов. Внутренняя среда организма характеризуется довольно постоянным соотношением между водородными и гидроксильными ионами. Активная реакция среды выражена единицами pH.

Электролитическая диссоциация солей

Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. Хлорид кобальта и хлорид меди (I), безводные; спирт абсолютный; соляная кислота, концентрированная.

Ход работы. 1. В пробирку наливают 2—3 мл безводного спирта и прибавляют небольшое количество (на кончике скальпеля) безводной хлористой меди или хлористого кобальта. Раствор окрашивается в желтый цвет (окраска молекул хлористой меди) или темно-фиолетовый (окраска молекул хлористого кобальта). К полученному раствору добавляют 1—2 мл воды. Раствор становится зеленоватым и быстро переходит в голубой (окраска ионов меди) или становится розовым (окраска ионов кобальта). К полученному раствору добавляют концентрированную HCl. Раствор при этом приобретает зеленовато-желтую окраску или темно-фиолетовую при добавлении хлористого кобальта. В данном случае соляная кислота подавляет диссоциацию хлористых солей меди или кобальта, а вновь образовавшиеся из ионов молекулы придают раствору соответствующую окраску.

2. Нумеруют три пробирки. В пробирку 1 наливают 2—3 мл воды, в пробирку 2 — 2—3 мл безводного спирта, в пробирку 3 — 2—3 мл смеси спирта с водой (1 : 1). В каждую пробирку добавляют по 2 капли метилового оранжевого красителя. Окраска его во всех пробирках желтая.

Затем во все пробирки добавляют по 2 капли концентрированной уксусной кислоты. В пробирке, где идет диссоциация уксусной кислоты, окраска метилового оранжевого красителя из желтой переходит в розовую.

Физиологическое действие ионов

Приборы. Чашка Петри. Лягушка. Пинцет. Ножницы. Скальпель.

Реактивы. Раствор Рингера. Хлорид натрия, 0,8%-ный раствор. Хлорид калия, 1%-ный раствор. Хлорид кальция, 0,7%-ный раствор.

Ход работы. В четыре чашки Петри наливают отдельно растворы Рингера, хлористого натрия, хлористого калия, хлористого кальция (все растворы изотоничны). Быстро обезглавливают четыре лягушки, вскрывают грудную полость, извлекают сердце, промывают его в 0,8%-ном растворе хлористого натрия и помещают в чашки с соответствующими растворами. Наблюдают за поведением сердца (сокращение сердечной мышцы) в разных растворах. Наблюдения записывают в тетрадь.

Можно провести опыт и с изолированным сердцем кролика или кошки. Для этого животное фиксируют, вскрывают грудную полость, извлекают сердце, промывают его в подогретом до 37—39° С растворе Рингера — Локка. В отрезок аорты вставляют стеклянную канюлю с тройником. Канюлю соединяют с каучуковой трубкой, через которую подают под небольшим давлением подогретый до 38—39° С исследуемый раствор. Для контроля за температурой подаваемого раствора через тройник к канюле присоединяют термометр. В случае если сердце не сокращается, его надо помассировать. При сокращениях сердца избыток жидкости должен вытекать через надрезы в области ушек. Для создания давления поступающей жидкости (физиологический раствор, изотонические растворы хлористого калия, хлористого натрия и хлористого кальция) баллон с ней устанавливают на 1,0—1,5 м выше фиксированного сердца. Жидкость подогревают, пропускают ее через водяную баню при помощи змеевика, и насыщают кислородом из кислородной подушки. При смене поступающей в сердце жидкости сердце необходимо промывать раствором Рингера — Локка.

Определение общей кислотности растворов

Общая кислотность раствора выражается количеством грамм-эквивалентов щелочи, идущих на титрование одного литра исследуемого раствора. Она показывает общее количество кислотореагирующих веществ, находящихся в растворе, и не зависит от степени их диссоциации. Эквивалентные по концентрации растворы любых кислот имеют одинаковую общую кислотность.

Приборы. Пипетки на 5 и 10 мл. Колбы на 50—100 мл.

Реактивы. Соляная кислота, 0,1 н. раствор. Уксусная кислота, 0,1 н. раствор. Гидроксид натрия, 0,1 н. раствор. Фенолфталеин.

Ход работы. В колбу отмеряют точно 5 или 10 мл соляной кислоты, добавляют 2—3 капли фенолфталеина и титруют из бюретки раствором щелочи до появления розовой окраски. Титрование повторяют и для расчета берут среднearифметическую величину. Расхождения между результатами титрования не должны составлять больше 0,1 мл.

Таким же путем определяют общую кислотность раствора уксусной кислоты. Расчет общей кислотности производят по формуле

$$x = \frac{N_{\text{щ}} \cdot V_{\text{щ}}}{V_{\text{к}}}$$

исходя из уравнения $N_{\text{к}} \cdot V_{\text{к}} = N_{\text{щ}} \cdot V_{\text{щ}}$, где $N_{\text{щ}}$ — количество грамм-эквивалентов щелочи, $V_{\text{щ}}$ — объем щелочи, $N_{\text{к}}$ — грамм-эквивалент кислоты и $V_{\text{к}}$ — объем кислоты.

В процессе определения общей кислотности двух эквивалентных по концентрации растворов сильной и слабой кислот убеждаются, что она не зависит от природы кислоты, а зависит от ее концентрации в растворе.

Общая кислотность обычно определяется параллельно с определенным активной кислотности раствора.

Определение активной кислотности раствора (рН)

Под *активной кислотностью* понимают кислотность, обусловленную концентрацией свободных ионов водорода в растворе. Активная кислотность зависит от степени диссоциации находящихся в растворе кислот или других кислореагирующих веществ и характеризуется величиной рН. Для биологических процессов в первую очередь имеет значение активная кислотность среды, в которой протекают те или иные биохимические процессы, кровь, тканевая жидкость, содержимое клеточной протоплазмы, а для простейших организмов — окружающая их внешняя среда.

Активная кислотность определяется двумя способами (способы могут иметь разновидности) — колориметрическим и потенциометрическим (электрометрическим).

Колориметрический способ определения рН

Способ основан на использовании *индикаторов* — слабодиссоциирующих кислот или оснований, которые в зависимости от концентрации водородных ионов в растворе могут изменять либо характер своей окраски, либо ее интенсивность. Пользуясь образцами окраски каждого индикатора при том или ином рН, на основании окраски индикатора, добавляемого к исследуемому раствору, можно судить о рН последнего (табл. 3).

Таблица 3. Индикаторы

Индикатор	Зона перехода	Цвет	
		в кислоте	в щелочи
Двухцветные			
Метилловый фиолетовый	0,1—3,2	Желтый	Синий
Тимоловый синий (I переход)	1,2—2,8	Красный	Желтый
Тропеолин 00	1,3—3,0	»	»
Метилловый желтый	2,9—4,0	»	»
Конго красный	3,0—5,2	Сине-фиолетовый	Красный
Бромфеноловый синий	3,0—4,6	Желтый	Пурпурный
Метилловый оранжевый	3,2—4,4	Красный	Желтый
Ализариновый красный (I переход)	3,7—5,2	Желтый	Сиренево-розовый
Бромкрезоловый зеленый	3,8—5,4	»	Синий
Метилловый красный	4,2—6,2	Красный	Желтый
Хлорфеноловый красный	4,8—6,4	Желтый	Красный
Лакмус (азолитмин)	5,0—8,0	Красный	Синий
Бромкрезоловый пурпурный	5,2—6,8	Желтый	Фиолетово-красный
Бромтимоловый синий	6,0—7,6	»	Синий
Феноловый красный	6,4—8,0	»	Красный
Нейтральный красный	6,8—8,0	Красный	Желто-коричневый
Крезоловый пурпурный	7,4—9,0	Желтый	Пурпурный
Тимоловый синий (II переход)	8,0—9,0	»	Синий
α -Нафтолфталеин	8,0—9,7	Зеленый	»
Ализариновый желтый	9,8—12,0	Желтый	Фиолетовый
Одноцветные			
α -Динитрофенол	2,3—4,5	Бесцветный	Желтый
γ -Динитрофенол	4,0—5,4	»	»
<i>p</i> -Нитрофенол	5,2—7,0	»	»
<i>m</i> -Нитрофенол	6,8—8,4	»	»
Фенолфталеин	8,0—9,8	»	Красно-фиолетовый
Тимолфталеин	9,3—10,5	»	Синий
Нитрамин	10,8—13,5	»	Оранжево-коричневый

Область между двумя значениями рН, в пределах которой происходит заметное на глаз изменение окраски индикатора, называют зоной перехода окраски индикатора (зона виража). Обычно эта зона виража индикатора лежит в пределах двух единиц рН, т. е. на единицу выше и на единицу ниже точки перехода. Точка перехода определяет значение рН раствора, при котором половина молекул индикатора находится в диссоциированном состоянии.

За пределами зоны перехода окраска индикатора практически не меняется, и он непригоден для определения рН.

Для определения рН раствора колориметрическим способом прежде всего необходимо подобрать требуемый для этого индикатор, зона перехода окраски которого находится в пределах значения рН исследуемого раствора. Для этого значение рН исследуемого раствора предварительно определяется приблизительно с помощью универсального индикатора (табл. 4).

Универсальный индикатор представляет собой смесь нескольких индикаторов, благодаря чему в зависимости от рН раствора он может принимать характерные окраски, по которым приблизительно судят о значении рН раствора.

Таблица 4. Состав универсальных индикаторов I и II

Индикатор	■Количество, граммы	
	I	II
Тимоловый синий	1	—
Бромтимоловый синий	0,8	0,4
Диметиламиноазобензол	0,6	—
Метилловый красный	0,4	0,2
Фенолфталеин	0,2	0,8
Этиловый спирт	1000,0	1000,0

Примечание. I — зона перехода рН 1—10; II — зона перехода рН 4—10.

В раствор добавляется несколько капель 0,1 н. едкого натра до окрашивания смеси в желтый цвет.

Для приближенного измерения рН к небольшому количеству жидкости (0,5—1,0 мл) добавляют 2 капли универсального индикатора, перемешивают и по окраске,

Таблица 5. Окраска универсальных индикаторов I и II

Индикатор I		Индикатор II	
pH	окраска	pH	окраска
2	Красная	4	Красная
4	Оранжевая	5	Оранжевая
6	Желтая	6	Желтая
8	Зеленая	7	Зеленая
10	Синяя	8,5	Синяя
		10	Фиолетовая

согласно данным табл. 5, определяют pH исследуемого раствора. Допустим, если окраска универсального индикатора I в исследуемом растворе будет оранжевая, то это соответствует pH 4. Двухцветным индикатором, у которого зона виража находится в пределах pH 4, является конго красный или бромфеноловый синий, или одноцветный индикатор α -динитрофенол и γ -динитрофенол (см. табл. 3).

Определение pH с одноцветным индикатором

При использовании двухцветных индикаторов для определения pH критерием служит характер окраски, а в случае одноцветных индикаторов за основу берется интенсивность окраски индикатора. Растворы, в которых данный индикатор имеет одинаковую интенсивность окраски, характеризуются одинаковым pH.

Приборы. Набор стандартных эталонов с одноцветными индикаторами (набор Михаэлиса). Компаратор. Штатив с пробирками. Градуированные пипетки на 1 и 10 мл. Фарфоровая чашечка. Глазная пипетка.

Реактивы. Универсальный индикатор. Набор одноцветных индикаторов с разными зонами перехода окраски. Исследуемые растворы.

Ход работы. Определяют pH раствора универсальным индикатором, как было описано выше. После этого отмеряют точно 6 (3) мл исследуемой жидкости и к ней добавляют 1 (0,5) мл одноцветного индикатора, у которого зона виража находится в пределах приближенного pH исследуемого раствора. Содержимое пробирки тщательно перемешивают и подбирают эталон, соответствующий интенсивности окраски ее содержимого. При этом эталон должен содержать такой же индикатор, как и индикатор,

добавленный к раствору. Подбор эталона с соответствующей интенсивностью окраски производят при помощи компаратора, помещая пробирку с опытным раствором в среднем гнезде, а эталоны в правом и левом гнездах рядом с исследуемым раствором. Заменяя последовательно один эталон другим, подбирают такой, у которого интенсивность окраски индикатора одинакова с исследуемой жидкостью.

В качестве исследуемых растворов рекомендуется брать водопроводную воду, дистиллированную воду, 0,1 н. раствор соляной кислоты, 0,1 н. раствор уксусной кислоты, 0,1 н. раствор хлористого натрия или другой соли.

Объяснить, почему растворы сильных и слабых кислот при одинаковой их концентрации имеют разные значения рН.

Определение рН с двухцветными индикаторами

Приборы. Штатив с пробирками. Фарфоровая чашечка. Пипетки на 2 мл. Глазная пипетка.

Реактивы. Набор стандартных растворов с известным рН (приготовление см. на с. 24). Универсальный индикатор. Набор двухцветных индикаторов. Исследуемые растворы (вода, растворы разных кислот).

Ход работы. Определяют рН раствора универсальным индикатором, после чего в семь пробирок наливают по 2 мл стандартных растворов с известными значениями рН, а в восьмую пробирку — 2 мл исследуемого раствора. В каждую пробирку добавляют по 2 капли индикатора, у которого зона виража находится в пределах рН, найденного для исследуемого раствора с помощью универсального индикатора.

Сравнивают окраску индикатора в исследуемом растворе с его окраской в стандартных растворах. Известно, что при одинаковой окраске индикатора в двух растворах рН этих растворов будет одинаковым.

Определение рН мутных и окрашенных растворов

Приборы и реактивы те же, что и в предыдущей работе.

Ход работы. Определяют приближенное значение рН, на основании этого подбирают необходимый одноцветный индикатор. Если раствор очень мутный или интен-

сивно окрашен, его можно предварительно разбавить дистиллированной водой в 2—5 раз (молоко разбавляют в 20 раз). Отмеряют в пробирку 3 (6) мл исследуемого раствора, к нему добавляют 0,5 (1) мл индикатора, после тщательного перемешивания помещают в среднее гнездо компаратора, а рядом с ним слева и справа ставят эталоны для сравнения. Для устранения погрешностей, связанных с мутностью или окраской самого раствора, против эталонов во второй ряд ставят пробирки



Рис. 4. Схема расположения пробирок в компараторе при определении рН окрашенных и мутных жидкостей

с 3 (6) мл исследуемого раствора, к которому добавляют 0,5 (1) мл воды, а против исследуемого раствора помещают пробирку с водой (рис. 4).

В качестве мутных и окрашенных жидкостей для колориметрического определения рН можно взять мочу, сыворотку крови, молоко, слюну, пищеварительные соки.

Потенциометрическое определение рН растворов

Потенциометрический, или электрометрический, метод определения рН основан на измерении электродвижущих сил (э. д. с.) гальванических элементов, приготовленных из исследуемых растворов и специальных электродов. Метод характеризуется боль-

шой точностью при определении рН любых жидкостей (в том числе и биологических).

Гальваническим элементом называется прибор, в котором химическая энергия превращается в электрическую. Обязательное условие для электродов гальванического элемента — возможность протекания окислительно-восстановительного процесса на их поверхности.

Максимальная разность потенциалов между электродами гальванического элемента при обратимых условиях его работы называется электродвижущей силой (э. д. с.).

При определении электродных потенциалов или концентрации ионов в растворе пользуются стандартными электродами с известной величиной электродного потенциала. В качестве таких электродов-эталонов применяются водородный, каломельный и хингидронный электроды.

Водородный электрод. Водородный электрод состоит из платиновой пластинки, насыщенной молекулярным водородом и погруженной в раствор, содержащий ионы водорода: $(Pt) H_2/H^+$.

Платина в этой системе выполняет роль проводника электронов и носителя водородов. Часть молекул водорода, находящихся в платиновой пластинке, в растворе диссоциирует с отдачей в раствор катионов водорода.

Если концентрация ионов водорода в растворе равна 1 г-ион/л и давление молекулярного водорода 0,101 МПа, то такой водородный электрод называют нормальным. Потенциал нормального водородного электрода равен нулю.

Каломельный электрод. Он представляет собой систему из ртути в контакте с раствором каломеля и хлористого калия: $Hg|Hg_2Cl_2, KCl$ (рис. 5).

Так как каломель является труднорастворимым соединением, то концентрация ионов ртути в растворе крайне мала. К тому же в растворе присутствует и сильно диссоциированный хлористый калий, который подавляет и без того слабую диссоциацию каломеля.

Таким образом, диссоциация каломеля, а значит, и концентрация ионов ртути в растворе будет зависеть от концентрации хлористого калия. Обычно в каломельном электроде применяется его насыщенный раствор, и в таком случае потенциал каломельного электрода составляет 0,2503 В при 18° С.

Хингидронный электрод. Он состоит из платиновой проволоки, опущенной в раствор, содержащий хингидрон и водородные ионы: $(Pt) \text{ хингидрон} | H^+$ (рис. 6).

Он относится к окислительно-восстановительным электродам органической природы, т. е. таким, у которых металл не принимает участия в электродной реакции, а является лишь проводником электронов.

Хингидрон — эквимолекулярное соединение хинона и гидрохинона. Он трудно растворим в воде, но при растворении диссоциирует на хинон и гидрохинон. Хинон в

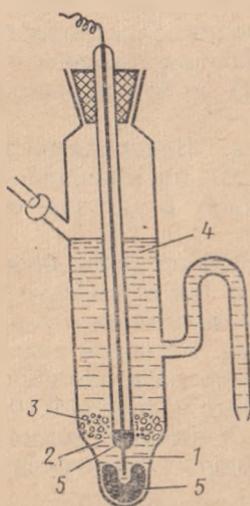


Рис. 5. Каломельный электрод:

1 — платина, 2 — раствор каломеля, 3 — кристаллы хлорида калия, 4 — насыщенный раствор хлористого калия, 5 — ртуть

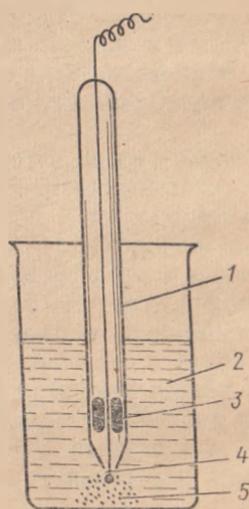


Рис. 6. Хингидронный электрод:

1 — стеклянная трубка, 2 — исследуемый раствор, 3 — ртуть, 4 — платиновая проволока, 5 — хингидрон

этом электроде является источником электронов, а гидрохинон — источником ионов водорода. Стандартный потенциал хингидронного электрода при $18^\circ C$ составляет 0,7044 В.

Хингидронным электродом не рекомендуется исследовать растворы с рН выше 8, так как в таких растворах хингидрон образует соли. Его не рекомендуют также ис-

пользовать для определения рН растворов, в которых есть окислительно-восстановительные системы.

Стеклянный электрод состоит из стеклянной мембраны, изготовляемой из специального легкоплавкого стекла (рис. 7). Шаровидный резервуар электрода заполняется раствором электролита (0,1 н. раствор HCl или буферный раствор с известным значением рН). Стеклянная мембрана служит источником водородных ионов и обменивается ими с раствором подобно водородному электроду. Основные преимущества данного электрода по сравнению с другими — это быстрое установление потенциала, отсутствие зависимости величины потенциала от наличия в растворе окислителей, восстановителей, поверхностно-активных веществ, радиоактивных веществ, простота в обращении, отсутствие влияния на величину потенциала внешней радиации. Все это позволяет использовать стеклянный электрод для исследования разнообразных растворов, когда не могут быть применены другие электроды. Поскольку стеклянный электрод имеет большое сопротивление и пропускает ток очень малой силы, его можно применять только с помощью усилительной системы.

В настоящее время в лабораторной практике применяются различные системы потенциометров (рН-метров), принцип определения рН которыми основан на измерении э. д. с. гальванических элементов, составной частью которых является исследуемый раствор.

Описание устройства приборов и последовательность операций при определении рН растворов изложены в соответствующих инструкциях, прилагаемых к потенциометрам (рН-метрам).

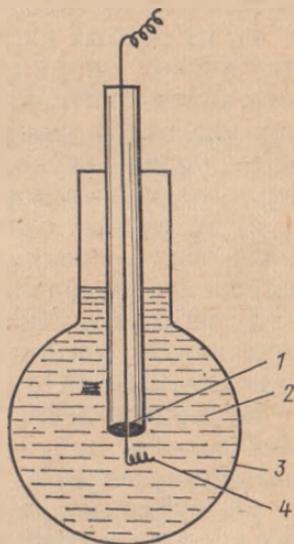


Рис. 7. Стеклянный электрод:

1 — ртуть, 2 — стандартный раствор соляной кислоты, 3 — стеклянная мембрана, проницаемая для электронов, 4 — серебряная проволока

БУФЕРНЫЕ РАСТВОРЫ

Растворы, способные стойко удерживать постоянство концентрации водородных ионов (рН) при действии на них небольшим количеством сильной кислоты или щелочи, а также при разбавлении, называются *буферными*. Такое свойство растворы приобретают из-за наличия в их составе буферных веществ, роль которых могут выполнять смеси, состоящие:

1) из слабых кислот и сильнодиссоциирующих солей этих кислот, например ацетатный буфер — уксусная кислота/ацетат натрия, гидрокарбонатный буфер — угольная кислота/гидрокарбонат натрия, борноборатный буфер — борная кислота/борат натрия, барбитуратный буфер — мединал/веронал и др.;

2) из слабых оснований и сильнодиссоциирующих солей этих оснований, например аммонийный буфер — гидроокись аммония/хлорид аммония;

3) из однозамещенных и двузамещенных солей многоосновных кислот, например фосфатный буфер — $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$.

Буферным действием обладают также амфотерные электролиты, например аминокислоты, белки и некоторые другие вещества.

рН буферных растворов зависит от соотношения в них кислоты и соли и при данном соотношении всегда будет одинаковым. Исходя из этого при приготовлении буферных растворов можно теоретически рассчитать их рН по формуле

$$[\text{H}^+] = \frac{C_{\text{кислота}}}{C_{\text{соль}}} \cdot K \quad \text{или} \quad [\text{OH}^-] = \frac{C_{\text{основание}}}{C_{\text{соль}}} \cdot K,$$

где $C_{\text{кислота}}$ — концентрация кислоты, $C_{\text{соль}}$ — концентрация соли, $C_{\text{основание}}$ — концентрация основания, K — константа электролитической диссоциации кислоты (основания). Из приведенной формулы следует, что, изменяя соотношение концентрации компонентов буферных смесей, можно приготовить растворы с различным рН в пределах, определяемых константой диссоциации кислот (оснований).

Разведение буферных растворов не сопровождается изменением их рН, так как в этом случае соотношение компонентов, составляющих буферную смесь, остается постоянным.

Каждый буферный раствор характеризуется определенной буферной емкостью. Буферная емкость — мера силы буферного действия раствора и выражается количеством грамм-эквивалентов кислоты или щелочи, которые необходимо добавить к 1 л буферного раствора, чтобы сместить его рН на единицу. Буферная емкость растворов зависит от их абсолютной концентрации и с разведением уменьшается прямо пропорционально степени разведения.

Приготовление буферных растворов

Выше было указано, что рН буферных растворов зависит от природы химических веществ, образующих буферную смесь, и от соотношения этих веществ в растворе. Исходя из этого можно приготовить ряд буферных растворов с разными, но известными рН.

Приборы. Штатив с пробирками. Градуированные пипетки на 10 мл. Глазная пипетка.

Реактивы. Фосфат калия однозамещенный, 0,15 н. раствор, фосфат натрия, двухзамещенный, 0,15 н. раствор. Уксусная кислота, 0,1 н. раствор. Ацетат натрия, 0,1 н. раствор. Универсальный индикатор.

Ход работы. 1. В предварительно пронумерованные шесть пробирок наливают растворы уксусной кислоты и ацетата натрия в следующих соотношениях:

Раствор	Номер пробирки					
	1	2	3	4	5	6
Количество 0,1 н. раствора уксусной кислоты	9	8	5	3	2	1
Количество 0,1 н. раствора ацетата натрия	1	2	5	7	8	9
Значение рН рассчитанное	3,7	4,0	4,6	5,0	5,2	5,6
Значение рН, найденное экспериментально						
<i>Вывод:</i>						

К приготовленным смесям добавляют по 2 капли универсального индикатора и по характеру окраски определяют значения рН для каждой смеси. При наличии потенциометра рН приготовленных смесей определяют электрометрически.

2. Нумеруют восемь пробирок, наливают в них 0,15 М растворы KH_2PO_4 и Na_2HPO_4 в следующем соотношении:

Раствор	Номер пробирки							
	1	2	3	4	5	6	7	8
0,15 М раствор KH_2PO_4	9,5	9,0	8,0	7,0	6,0	5,0	4,0	3,0
0,15 М раствор Na_2HPO_4	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0
Значение рН рассчитанное	5,59	5,91	6,24	6,47	6,64	6,81	6,98	7,17
Значение рН, найденное экспериментально								

Содержимое каждой пробирки тщательно размешивают. В другие восемь пробирок, заранее пронумерованные, отмеряют по 6 мл приготовленных буферных растворов. Оставшиеся в пробирках 1 и 8 растворы используют для определения приближенного рН с помощью универсального индикатора и на основании этого определения подбирают соответствующий одноцветный индикатор из группы нитрофенолов для точного определения рН приготовленных буферных растворов. По 1 мл индикатора добавляют в каждую из восьми пробирок, в которые были налиты по 6 мл приготовленных буферных смесей. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и на основании развившейся окраски определяют рН каждой буферной смеси, используя для этого стандартные эталоны с тем же индикатором. Результаты определения рН вносят в таблицу, приведенную выше.

СВОЙСТВА БУФЕРНЫХ РАСТВОРОВ

Приборы. Штатив с пробирками. Колбы на 50 мл. Бюретки. Пипетки градуированные разные. Пипетки глазные.

Реактивы. Уксусная кислота, 0,1 н. раствор. Ацетат натрия, 0,1 н. раствор. Универсальный индикатор. Раствор фенолфталеина. Раствор конго красного. Гидроксид натрия, 0,1 н. раствор. Вода, дистиллированная. Соляная кислота, 0,1 н. раствор.

Буферное действие раствора

В колбочку отмеряют 4 мл уксусной кислоты и 16 мл уксуснокислого натрия. Содержимое колбочки тщательно перемешивают. Нумеруют четыре пробирки. В про-

бирки 1 и 3 отмеряют по 5 мл приготовленной буферной смеси, а в пробирки 2 и 4 — по 5 мл дистиллированной воды. В пробирки 1 и 2 добавляют по 1—2 капли фенолфталеина и их содержимое титруют из бюретки щелочью, ведя счет каплям до появления розового окрашивания.

В пробирки 3 и 4 добавляют по 1—2 капли конго красного и титруют соляной кислотой, отсчитывая капли до появления синего окрашивания.

Объяснить, почему для изменения реакции в пробирку 1 надо добавить больше щелочи, чем в пробирку 2, а в пробирку 3 больше кислоты, чем в пробирку 4.

Влияние разведения на рН буферного раствора и буферную емкость

Берут три пробирки. В каждую из них отмеряют по 2 мл раствора уксусной кислоты и по 2 мл раствора уксуснокислого натрия. Содержимое пробирки 1 оставляют неразбавленным, содержимое пробирки 2 разбавляют в 2 раза, добавляя к полученной буферной смеси равный объем воды (4 мл), содержимое пробирки 3 — в 4 раза, добавляя в нее 12 мл воды. Растворы в каждой пробирке перемешивают и используют для опыта.

1. Нумеруют три пробирки, соответственно отмеряют по 2 мл буферных растворов: неразбавленный, разбавленный в 2 раза и разбавленный в 4 раза. Затем добавляют по 3 капли универсального индикатора и по окраске учитывают реакцию (рН) каждого буферного раствора. Изменяется ли рН при разведении буферного раствора? Если нет, то почему?

2. Нумеруют три пробирки и в них отмеряют по 2 мл соответственно: неразбавленного, разбавленного в 2 раза и разбавленного в 4 раза буферных растворов. В каждую пробирку добавляют по 2—3 капли фенолфталеина и титруют из бюретки щелочью, ведя счет каплям до появления розового окрашивания. Как влияет разведение на буферную емкость раствора?

Буферная емкость биологических жидкостей

Приборы. Бюретка. Штатив с пробирками. Пипетки градуированные. Чашка фарфоровая. Пипетка глазная.

Реактивы. Гидроксид натрия, 0,1 н. раствор. Соляная кислота, 0,1 н. раствор. Фенолфталеин. Конго красный. Универсальный индикатор. Вода, молоко, сыворотка крови, моча, слюна.

Ход работы. При помощи универсального индикатора сначала в фарфоровой чашке приближенно определяют рН исследуемых жидкостей, чтобы убедиться, что все они имеют практически нейтральную реакцию, т. е. их рН находится около 7.

Отмеряют в отдельные пробирки по 5 мл исследуемых жидкостей, к каждой добавляют по 2—3 капли фенолфталеина и титруют из бюретки щелочью, ведя счет каплям, до появления розового окрашивания. Результаты записывают в тетрадь. После этого еще раз отмеряют по 5 мл исследуемых жидкостей в отдельные пробирки, добавляют к каждой по 2—3 капли конго красного и титруют из бюретки соляной кислотой, ведя счет каплям, до перехода красной окраски в синюю. Результаты записывают в тетрадь. Какая исследуемая жидкость обладает наибольшей буферной емкостью? По отношению к каким веществам (кислоте или щелочи) буферная емкость у биологических жидкостей выражена больше? Какие буферные системы содержатся в сыворотке крови?

Для получения абсолютных данных о буферной емкости биологических жидкостей ведут точный учет количества кислоты или щелочи, пошедшей на титрование до смещения рН исследуемой жидкости на единицу (контроль ведут с помощью потенциометра). На основании полученных данных рассчитывают буферную емкость жидкости по формуле

$$C = \frac{N \cdot a \cdot 1000}{(pH_1 - pH_0) \cdot b}$$

где C — буферная емкость; N — нормальность кислоты (щелочи); a — количество кислоты (щелочи), идущей на титрование пробы; b — количество исследуемой жидкости, взятое для титрования; pH_0 — водородный показатель исследуемого раствора до титрования; pH_1 — водородный показатель исследуемого раствора в конце титрования.

КОЛЛОИДНАЯ ХИМИЯ

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ КОЛЛОИДНЫХ РАСТВОРОВ

Коллоидные растворы, или золи, представляют собой микрогетерогенные дисперсные системы с определенной степенью дисперсности коллоидного вещества — от 1 до 150 нм. Следовательно, при получении коллоидных растворов исходное вещество необходимо диспергировать или ассоциировать.

Дисперсионные методы

Размельчение вещества до размеров коллоидных частиц можно осуществить механическим путем при помощи коллоидных (шаровых) мельниц. Этим способом можно получить золи серы, окислов металлов, различных красок. К дисперсионным методам относится также электрическое распыление металла в растворителе в зоне электрической дуги.

Получение золя серебра

Приборы. Выпрямитель, позволяющий получить силу тока в 5—10 А с напряжением в 100—150 В. Серебряные электроды. Штатив с лапкой. Стеклянная колба на 250—500 мл с верхним и нижним отверстиями.

Реактивы. Гидроксид натрия, 0,001 н. раствор с небольшим количеством восстановителя (формальдегид или танин).

Ход работы. Через нижнее отверстие колбы с помощью пробки вставляют серебряный электрод, который соединяют с анодом. В колбу наливают раствор едкого натра и через верхнее отверстие вставляют второй электрод, соединенный с катодом. Электроды сближают между собой до соприкосновения и включают электрический ток, затем электроды немного разводят. Между ними создается электрическая дуга, которая приводит к распылению обычно катодного электрода, поэтому его необходимо постепенно сближать с нижним электродом, чтобы не прерывать прохождение электрического тока. В зоне электрической дуги образуется коричневое или зеленовато-серое облако из распыленного металла. Таким же путем получают золи платины, угля, золота.

Конденсационные методы

Конденсационные методы имеют в своей основе образование коллоидных частичек из более мелких растворенных частичек. Коллоиды можно получить путем замены растворителя и химическими методами конденсации.

Получение коллоидного раствора канифоли, фенолфталеина, серы

Канифоль и фенолфталеин сравнительно хорошо растворимы в спирте и очень плохо растворяются в воде. Вода же в свою очередь хорошо растворяет спирт — исходный растворитель для канифоли и фенолфталеина. Если смешать спиртовой раствор канифоли или фенолфталеина с водой, то молекулы этих веществ будут конденсироваться между собой, образуя частички, соответствующие размерам золя. Аналогичное явление происходит с серой, которая растворима в горячем спирте и нерастворима в воде.

Приборы. Штатив с пробирками. Спиртовка.

Реактивы. Канифоль, 1%-ный спиртовой раствор. Вода. Серный цвет. Фенолфталеин, 1%-ный спиртовой раствор. Спирт этиловый.

Ход работы. 1. В две пробирки наливают по 3—4 мл воды и в одну из них добавляют 2—3 капли канифоли, а во вторую — фенолфталеина.

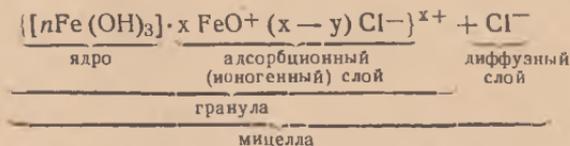
2. В пробирку наливают 3—4 мл этилового спирта, добавляют щепотку серного цвета и нагревают до полного растворения серы. В другую пробирку наливают 3—4 мл воды и добавляют небольшое количество полученного спиртового раствора серы.

Для полученных растворов характерно явление опалесценции, а так как подобное явление присуще только коллоидно-дисперсным системам, то есть полное основание считать, что в пробирках были получены коллоидные растворы — золи.

Получение золя гидроокиси железа

Хлорное железо — соль сильной кислоты и слабого основания и как все соли подобного состава гидролизуются в воде с образованием гидроокиси металла и сильной кислоты. Гидроокислы металлов в воде практически

нерастворимы, поэтому в момент образования их молекулы конденсируются между собой в коллоидные частички, адсорбируя на своей поверхности из раствора избыток ионов электролита и приобретая, благодаря этому, агрегативную устойчивость:



Приборы. Штатив с пробирками. Спиртовка.

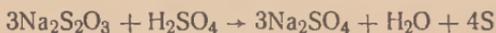
Реактивы. Хлорное железо, концентрированный раствор. Вода.

Ход работы. В две пробирки наливают по 3—4 мл воды. В одной из них воду нагревают до кипения, затем в обе пробирки добавляют по несколько капель хлорного железа и прекращают нагревание.

Наблюдения записать в тетрадь, а полученный золь гидроокиси железа оставить для последующих опытов.

Получение золя серы

При взаимодействии тиосульфита натрия с серной кислотой происходит выделение свободной серы, которая конденсируется в коллоидные частички, стабилизируемые анионами серной кислоты:



Приборы. Химический стакан на 250—500 мл. Пипетка.

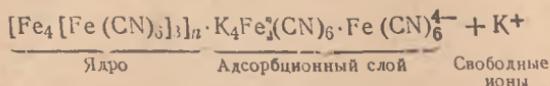
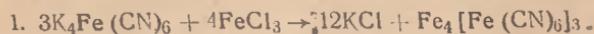
Реактивы. Тиосульфит, 6%-ный раствор. Серная кислота, концентрированная.

Ход работы. В стакан наливают 200—250 мл раствора тиосульфита и добавляют 1—2 капли серной кислоты. Через некоторое время раствор изменяет свой внешний вид — появляется характерная для коллоидных растворов опалесценция.

Получение золя берлинской лазури

При взаимодействии желтой кровяной соли (железистосинеродистого калия) с хлорным железом образуется новое вещество — берлинская лазурь (железистосинеродистое железо). Берлинская лазурь конденсируется в

коллоидные частички и стабилизируется в растворе молекулами железистосинеродистого калия:



Приборы. Штатив с пробирками. Пипетка.

Реактивы. Желтая кровяная соль, 0,1%-ный раствор. Хлорное железо, 2%-ный раствор.

Ход работы. В пробирку наливают 4—5 мл раствора желтой кровяной соли и добавляют 1—2 капли раствора хлористого железа. Образуется золь берлинской лазури синего цвета.

Полученный золь оставляют для следующих опытов.

Получение золя серебра

При смешивании щелочного раствора азотнокислого серебра с танином (или другим восстановителем) соль восстанавливается до металлического серебра с образованием коллоидного раствора.

Приборы. Штатив с пробирками. Пипетка на 1 мл. Глазная пипетка. Спиртовка (газовая горелка).

Реактивы. Раствор азотнокислого серебра, 0,1 н. Раствор танина, 1%-ный. Раствор углекислого натрия, 1%-ный.

Ход работы. В пробирку к 10 мл дистиллированной воды добавляют 0,1 мл азотнокислого серебра, 1—2 капли раствора танина, 1—2 капли раствора углекислого натрия. Образуется золь желто-коричневого цвета. При нагревании окраска усиливается.

Диализ и ультрафильтрация

Золи, как и истинные растворы, проходят через обычные бумажные фильтры, но они не способны проходить через органические проницаемые мембраны, например, они не проходят через мембраны из коллодия. На этом свойстве и основаны методы очистки коллоидных растворов от электролитов и других веществ. К таким методам относятся диализ и ультрафильтрация.

Приготовление коллодиевых мембран

Для приготовления коллодиевых мешочков предварительно чисто вымытую и высушенную пробирку или колбочку ополаскивают коллодием (4%-ный раствор нитроклетчатки на спиртово-эфирной 1:3 смеси), избыток которого сразу же выливают, а колбочку или пробирку медленно вращают для равномерного распределения оставшегося коллодия по стенкам сосуда. После этого сосуд оставляют в опрокинутом положении для высыхания на 5—10 мин; повторяют 2—3 раза в зависимости от того, какой толщины и с какими размерами пор надо получить пленку. По высыхании сосуд ополаскивают дистиллированной водой для удаления остатков спирта. Отделяют край мешочка у горлышка сосуда и между мешочком и стенкой сосуда вливают воду для равномерного осторожного отделения мешочка от стенок сосуда. Мешочек затем закрепляют на пробке с просверленным отверстием или на стеклянном патроне при помощи резинового кольца.

Для приготовления ультрафильтров берут гладкий фильтр из фильтровальной бумаги, плотно вкладывают его в чистую воронку и наливают на фильтр горячую дистиллированную воду. Когда вода стечет, на мокрый фильтр наливают 10—15 мл слегка подогретого (на водяной бане) коллодия и быстрыми вращательными движениями добиваются равномерного распределения коллодия по фильтру. Избыток коллодия сливают, а оставшемуся дают высохнуть. Для получения более мелкопористой мембраны манипуляцию можно повторить. После высушивания коллодия фильтр помещают на 20—30 мин в дистиллированную воду, после чего его можно использовать для отделения коллоидного вещества от дисперсионной среды.

Диализ золя гидрата окиси железа

Приборы. Мешочек из коллодия. Штатив с лапкой. Химический стакан на 250—500 мл. Спиртовка (электроплитка). Плоскодонная колба на 500 мл. Пипетка на 10 мл. Штатив с пробирками.

Реактивы. Хлорное железо, концентрированный раствор. Азотно-кислое серебро, 1%-ный раствор. Дистиллированная вода.

Ход работы. Нагревают 200 мл воды до кипения и, не переставая нагревать, вливают в нее 10 мл раствора хлористого железа. Образуется гидрозоль гидроокиси

железа. Дают раствору остыть. В это время в штативе с помощью лапки укрепляют коллодиевый мешочек. В химический стакан наливают дистиллированную воду и эту же воду наливают в пробирку. К воде в пробирке добавляют несколько капель раствора азотнокислого серебра для того, чтобы убедиться в отсутствии в воде ионов хлора. В коллодиевый мешочек наливают приготовленный гидрозоль гидроокиси железа и заполненный мешочек погружают в стакан с водой, не содержащий ионов хлора. Через 1 ч можно видеть, что коллоид из мешочка не проник в дистиллированную воду — она осталась бесцветной, но если к воде в стакане добавить раствор азотнокислого серебра, то образуется осадок хлористого серебра. Это свидетельствует о появлении в стакане с водой ионов хлора, которые поступили туда в процессе диализа из коллодиевого мешочка. В коллодиевом мешочке наряду с коллоидными частичками содержалась и соляная кислота, образовавшаяся при гидролизе хлористого железа в процессе превращения его в гидрозоль гидрата окиси железа. Таким образом, опыт показывает, что стенки коллодиевого мешочка проницаемы для истинных растворов и непроницаемы для коллоидных растворов, на чем и основан метод диализа. Если коллодиевый мешочек с коллоидным раствором, загрязненным электролитами и кристаллоидами, поместить в проточную воду, то путем диализа такой коллоид очень быстро очищается от низкомолекулярных примесей.

Определение заряда коллоида W

Электрический заряд на коллоидных частичках возникает за счет достройки их ядра родственными ионами электролита, находящегося в коллоидном растворе. Так, например, ядра гидрата окиси железа дестраиваются избытком молекул хлорного железа. Молекулы хлорного железа, участвующие в достройке ядра, диссоциируют, образуя двойной электрический слой, который состоит из прочно адсорбированных ионов железа и частично противоионов хлора и диффузных противоионов хлора. Прочно адсорбированный слой определяет знак электрического заряда коллоидной частички. Электрический заряд коллоидных частичек является фактором стабилизации коллоидных растворов — наделяет коллоидные растворы агрегативной устойчивостью.

Знак электрического заряда коллоидных частичек можно определить простым опытом. Известно, что поверхность капилляров фильтровальной бумаги в воде приобретает отрицательный заряд. Если к воде добавить электрически заряженный коллоид и в этот раствор опустить полосу фильтровальной бумаги, то вода будет подниматься по капиллярам бумаги и увлекать за собой коллоидные частички, имеющие такой же заряд, как и бумага. Если же коллоидные частички имеют заряд, противоположный заряду поверхности капилляров, то они будут адсорбироваться стенкой капилляра и не смогут подниматься по капиллярам вместе с водой. Этот опыт хорошо наблюдать в случае окрашенных коллоидов.

Приборы. Химические стаканы на 100 мл. Стеклянные палочки. Скрепки.

Реактивы. Гидрозоль гидрата окиси железа и берлинской лазури (приготовление см. выше). Полоски фильтровальной бумаги 2×15.

Ход работы. В химические стаканчики наливают небольшие количества исследуемых коллоидов (каждый отдельно). На стеклянной палочке фиксируют при помощи скрепки полосу фильтровальной бумаги и свободным концом погружают ее на 2—3 мм в исследуемый коллоидный раствор. Учет результатов опыта производят через 20—30 мин. Объяснить наблюдаемые явления.

Электрофорез коллоидных растворов

Если коллоидные частички, несущие на своей поверхности электрический заряд, поместить в электрическое поле, то они будут передвигаться к одному из полюсов. Такое явление называют электрофорезом.

Электрофорез гидрозоля берлинской лазури

Приборы. Выпрямитель, позволяющий получить электрический ток напряжением в 100—120 В и силой до 10 мА. Штатив с лапкой. Медные электроды. U-образная трубка на 100—200 мл. Химический стакан на 250 мл. Стеклянная палочка. Пипетки градуированные.

Реактивы. Желтая кровяная соль, 1%-ный раствор. Хлорное железо, 2%-ный раствор. Хлорид натрия, 10%-ный раствор.

Ход работы. В штативе при помощи лапки укрепляют U-образную трубку. Приготавливают гидрозоль берлинской лазури так: в 150 мл воды растворяют 2 мл желтой

кровяной соли и 1 мл хлористого железа. К этому раствору добавляют 1 мл 10%-ного раствора хлористого натрия (для увеличения ионной силы коллоидного раствора) (Приготовленный раствор наливают в U-образную трубку, погружают в него электроды, которые подключают к клеммам выпрямителя, и включают электрический ток силой до 10 мА и напряжением до 100—110 В. Через некоторое время наблюдают осветление раствора в одном колене трубки и значительное усиление окраски раствора в другом колене трубки.

Дать объяснение наблюдаемым явлениям.

Электрофорез белков на бумаге

Одним из примеров практического использования электрофореза может служить разделение смеси белков. Так, белки сыворотки крови и отдельных тканей гетерогенны по своему составу, строению и функциям. Для их разделения на отдельные фракции используют различные методы, в том числе и электрофорез на бумаге.

В основу этого метода положен следующий принцип. Каждый белок несет на себе свободный электрический заряд и может перемещаться с различной скоростью в электрическом поле. Величина электрического заряда является индивидуальной характеристикой каждого белка, но она зависит и от окружающей среды, в первую очередь от pH, ионной силы раствора.

Если полюсу фильтровальной бумаги смочить буферным раствором, укрепить между полюсами электрического поля, нанести на нее смесь белков и подключить источник электрического тока, то молекулы белка будут мигрировать по фильтровальной бумаге в сторону полюса, заряд которого противоположен заряду белка. Скорость миграции молекул белка пропорциональна величине их свободного заряда и градиенту потенциала электрического поля.

Картина, полученная в результате разделения белков на бумаге, обычно выявляется при помощи красителей, специфически соединяющихся с белками (кислый синерный, бромфеноловый синий и др.).

Приборы. Камера для электрофореза на бумаге. Источник постоянного тока силой до 20 мА и напряжением до 300 В. Электрофотокolorиметр. Штатив с пробирками. Микропипетка. Сушильный шкаф. Кювета 25×30 см. Пинцет.

Реактивы. Хроматографическая бумага, полосы 3×26 см (30 см). Буферные растворы: а) вероналовый буфер рН 8,6 (10,32 г мединала растворяют в 300 мл дистиллированной воды, добавляют 1,84 г веронала и нагревают на водяной бане до полного растворения веронала, после чего объем раствора доводят дистиллированной водой до 1 л); б) борно-боратный буфер рН 8,6 (5,57 г борной кислоты и 10,49 г буры растворяют в 700 мл дистиллированной воды и доводят водой до 1 л); в) трис-буфер рН 8,9 (60,5 г триоксиметиламинометана, 6,02 г этилендиаминотетрауксусной кислоты и 4,6 г борной кислоты растворяют в 1 л дистиллированной воды). Краситель для обработки электропротейнограмм; а) кислый сине-черный (0,2 г), ледяная уксусная кислота (100 мл), метанол (900 мл); б) бромфенол синий (0,5 г), сулема (10 г), ледяная уксусная кислота (20 мл), дистиллированная вода (980 мл); в) бромфенол синий (0,1 г), сульфат цинка водный (50 г), ледяная уксусная кислота (50 мл), вода дистиллированная (900 мл). Растворы для отмывания избытка краски, не связанной с белком: а) уксусная кислота, 2%-ный раствор; б) уксусная кислота 10%-ная с 4% расплавленного фенола; в) этанол 50%-ный. Растворы для элюции краски: а) гидроксид натрия, 0,01 н. раствор (для бромфенолового синего); б) гидроксид натрия, 0,1 н. раствор (для кислого синего).

Ход работы. Электродные кюветы камеры заполняют буферным раствором и их отделения соединяют между собой кусочками фильтровальной бумаги. Смачивают полосы хроматографической бумаги в буфере, удаляя избыток последнего промоканием между листами фильтровальной бумаги, затем концы полос хроматографической бумаги опускают в противоположные электродные камеры. Укрепляют их при помощи грузиков в строго горизонтальном положении. Бумажные полосы можно устанавливать и сухими, давая им возможность пропитаться буферным раствором.

На установленные полосы хроматографической бумаги при помощи микропипетки наносят 0,01—0,03 мл сыворотки, отступя на 8—9 см от катодного конца полосы. После этого камеру герметически закрывают и подключают к источнику постоянного тока. Электрофорез осуществляется при градиенте потенциала от 3 до 8 В на 1 см полосы. При длине полос 26—30 см это составляет 180—200 В. Сила тока при этом не должна превышать 0,3 мА на каждый сантиметр поперечного сечения бумажной полосы. В зависимости от вида камеры, используемого буфера, вида и возраста животного, от которого бралась сыворотка, электрофорез продолжается от 6 до 18 ч (время устанавливается в опыте).

По окончании электрофореза камеру отключают от блока питания, извлекают из нее полосы фильтроваль-

ной бумаги и высушивают их в сушильном шкафу при температуре 102—105° С в течение 15—20 мин. Высушенные электрофореграммы окрашивают, погружая их на 30 мин в бромфеноловый синий краситель с сулемой или на 8—20 ч в бромфеноловый синий с серноокислым цинком. Избыток краски отмывают 2%-ным раствором уксусной кислоты, сменяя ее 4—5 раз.

Для определения соотношения между фракциями белков полосу разрезают по границам окрашенных участков, каждую фракцию помещают в отдельную пробирку и заливают раствором щелочи. Через 30 мин элюаты колориметрируют на ФЭКе. Контролем при этом служит элюат из неокрашенных участков электрофореграмм. Значения экстинкций по каждой фракции суммируют и сумму принимают за 100%, далее вычисляют процентное содержание каждой фракции.

Электрофорез белков на агар-агаре

В геле агар-агара размеры пор относительно большие, что позволяет белкам свободно мигрировать в нем под действием электрического тока. При этом как носитель он лучше бумаги: из него меньше испаряется вода в процессе электрофореза, не наблюдаются капиллярные явления, что устраняет возможность искажения картины электрофореграмм. Из агар-агара можно готовить блоки различной толщины и плотности, они довольно прочные и прозрачные, что позволяет их фотометрировать без предварительного элюирования краски.

Приборы. Камера для электрофореза с блоком питания. Стекло-лянные пластинки (25×180 мм). Микропипетка. Сушильный шкаф. Кювета 25×30 см. Ножницы. Пинцет.

Реактивы. Раствор агар-агара на буфере, 1%-ный. (Выпускаемый промышленностью агар-агар отмывают дистиллированной водой в течение суток, растворяют в горячем буферном растворе, фильтруют, разливают тонким слоем на предварительно вымытые и обезжиренные стеклянные пластинки, подкладывая на короткие края последних полосы фильтровальной бумаги по ширине стекла и длиной 60—70 мм.) Мединал-вероналовый буфер с рН 8,6. Раствор уксусной кислоты в 60%-ном этаноле, 2%-ный. Бромфеноловый синий краситель. Раствор уксусной кислоты, 26%-ный. Раствор ацетата натрия в 10%-ном растворе уксусной кислоты, 2%-ный.

Ход работы. После нанесения агар-агара на пластинки дают ему застыть в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем их помещают в камеру для электрофореза, опуская полосы фильтровальной бумаги, подло-

женные под гель, в электродные кюветы. Раствор белка (сыворотка крови) в количестве 0,01—0,05 мл предварительно наносят на полосы фильтровальной бумаги (2××20 мм), которые пинцетом помещают на агар-агар по центру пластинки. Камеру закрывают и подключают к блоку питания. Электрофорез проводят при напряжении 150—170 В и силе тока 1,3—1,6 мА на каждый сантиметр поперечного сечения агар-агаровых блоков в течение 6 ч. По окончании электрофореза пластинку освобождают от фильтровальной бумаги, фиксируют в спиртовом растворе уксусной кислоты в течение 6 ч. Высушивают при 37° С и окрашивают в течение 18 ч. Окрашенные пластинки промывают трижды в 2%-ном растворе уксусной кислоты по 5—10 мин и один раз в растворе ацетата натрия в 10%-ной уксусной кислоте. Снова высушивают и фотометрируют в денситометре для расшифровки электрофореграмм.

Коагуляция коллоидных растворов

Под коагуляцией понимают процесс агрегации коллоидных частичек с последующим выпадением их в осадок, т. е. этот процесс еще можно рассматривать как переход золя в гель. Минеральные коллоиды коагулируют, если их лишить электрического заряда. Так, если к минеральному коллоиду добавить электролит, то ионы последнего будут адсорбироваться на коллоидных частичках, поэтому их электрический заряд исчезает. Они агрегируются между собой, что в итоге и приводит к коагуляции коллоида. Коагулирующая сила электролита возрастает с увеличением электрического заряда его ионов.

Коагуляция гидрозолей гидроокиси железа

Приборы. Бюретка на 50 мл. Пипетки на 5—10 мл.

Реактивы. Свежеприготовленный раствор гидрата окиси железа. Хлорид натрия, 5 М раствор. Сульфат натрия, 0,01 М раствор. Железистосинеродистый калий, 0,001 М раствор.

Ход работы. В три колбочки наливают по 5 мл свежеприготовленного гидрозоля гидрата окиси железа. Содержимое первой колбочки титруют из бюретки раствором хлористого натрия до помутнения раствора; во второй колбочке коллоидный раствор титруют серноокислым

натрием и в третьей колбочке раствор титруют железистосинеродистым калием. Результаты титрования записывают в тетрадь и производят перерасчет на 0,001 М раствор.

✓ Коагуляция минерального и органического коллоида серноокислым аммонием

Приборы. Штатив с пробирками. Бюретка. Пипетки на 5—10 мл.

Реактивы. Свежеприготовленный гидрозоль гидрата окиси железа.

Ход работы. В две пробирки наливают по 5 мл гидрозоля гидрата окиси железа и золя белка (раздельно). Содержимое каждой пробирки титруют из бюретки раствором серноокислого аммония. В процессе титрования устанавливают, что для коагуляции органического коллоида требуется значительно больше электролита, чем для коагуляции минерального коллоида. Если после коагуляции коллоидов в каждую из пробирок добавить по 5—10 мл воды, то в пробирке с белком коагулированный коллоид переходит в растворенное состояние и раствор снова станет прозрачным. Добавление такого же количества воды к коагулированному минеральному коллоиду не приводит к его растворению — раствор остается мутным. Таким образом, осаждение минеральных коллоидов серноокислым аммонием является необратимым процессом, а в случае органического коллоида — обратимым.

✓ Коллоидная защита

Большинство органических коллоидов — белки, сложные углеводы — более устойчивы, чем минеральные. Объясняется это тем, что органические коллоиды помимо электрического заряда имеют еще и гидратационную оболочку, и для того чтобы вызвать коагуляцию таких коллоидов, необходимо лишать их не только заряда, но и гидратационной оболочки, тогда как для коагуляции минеральных коллоидов достаточно подавить их электрический заряд. Органические коллоиды, добавленные к минеральным, могут повысить устойчивость и последних. Такое явление получило название коллоидной защиты.

Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. Азотнокислое серебро, 2%-ный раствор. Желатин, 2%-ный раствор, подогретый до 30—40° С. Хлорид натрия, 1%-ный раствор. Хромовокислый калий, 0,5%-ный раствор.

Ход работы. 1. В две пробирки наливают по 2—3 мл раствора азотнокислого серебра. В одну из них добавляют 4—5 мл раствора желатина, а во вторую — такое же количество воды. Затем в обе пробирки по каплям добавляют раствор поваренной соли. В пробирке, где был взят раствор азотнокислого серебра с водой, сразу же выпадает осадок хлористого серебра, так как образуются довольно крупные агрегаты из молекул хлористого серебра, ничем не защищенные, и наступает их коагуляция. В пробирке, где был добавлен желатин, образуется довольно стойкий золь хлористого серебра с характерной для коллоидных растворов опалесценцией. Объясняется это тем, что агрегаты из молекул хлористого серебра, соответствующие по размерам коллоидным частичкам, соединяются с молекулами желатина, которые придают этим частичкам более высокую агрегативную устойчивость.

2. В две пробирки наливают по 2—3 мл раствора азотнокислого серебра. В одну из них добавляют 3—4 мл раствора желатина, а во вторую — такое же количество воды. Затем в обе пробирки добавляют по 1—2 мл хромовокислого калия. **В пробирке без желатина** образуется красный объемистый осадок хромовокислого серебра, а в пробирке с желатином, играющим роль защитного коллоида, — устойчивый золь хромовокислого серебра.

Необратимая коагуляция органических коллоидов

При действии на органические коллоиды электролитов, ионы которых адсорбируются на коллоидных частичках, образуя с ними нерастворимые осадки, происходит необратимая коагуляция коллоидных растворов.

Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. Яичный белок, 2%-ный раствор. Сульфат меди, 5%-ный раствор. Нитрат ртути, 5%-ный раствор. Ацетат свинца, 5%-ный раствор.

Ход работы. В три пробирки наливают по 2—3 мл раствора белка и добавляют равные объемы растворов солей (меди, ртути, свинца). Золь белка переходит в гель. В пробирки с осажженным белком добавляют 5—8 мл воды и тщательно перемешивают. Осадок белка при этом не исчезает, так как произошло необратимое осаждение коллоида.

Поверхностные явления в растворах

Слой молекул, расположенных на поверхности фазы, носит название поверхностного слоя. В поверхностном слое молекулы находятся в определенном напряжении, так как силы молекулярного сцепления у них не уравновешены — они испытывают одностороннее притяжение внутрь фазы. С другой стороны силы молекулярного сцепления молекул, расположенных в поверхностном слое, направленные вне фазы, остаются неиспользованными и составляют так называемую свободную поверхностную энергию. Чем больше суммарная поверхность раздела в системе, тем большим запасом свободной поверхностной энергии обладает данная система. К системам с большой суммарной поверхностью раздела, а следовательно, и с наибольшим запасом свободной поверхностной энергии относятся коллоидные системы.

Наличие поверхностного натяжения на поверхности раздела фаз, а также свободной поверхностной энергии придает гетерогенным системам определенные свойства.

Поверхностно-активные вещества

Поверхностное натяжение можно измерить прямым путем и выразить его в эргах работы, которую надо затратить для создания мономолекулярного слоя данной жидкости площадью в 1 см^2 (дж/м^2). В практике поверхностное натяжение исследуемой жидкости чаще определяют относительно к поверхностному натяжению растворителя непрямыми методами, например методом сталагмометрии (метод отсчета капель). В его основе лежит определение количества капель, образующихся из определенного объема растворителя и такого же объема исследуемого раствора при свободном их вытекании из сталагмометра. Сталагмометр представляет собой прибор, напоминающий пипетку, которая заканчивается отшлифованной площадкой (рис. 8). Капли жидкости, образующиеся на площадке сталагмометра, отрываются в тот момент, когда масса капли на какую-то величину превзойдет поверхностное натяжение жидкости. Чем меньше поверхностное натяжение жидкости, тем меньшая масса капли может его преодолеть, тем большее количество капель будет образовываться из одного и того же объема жидкости. Вычисляют, во сколько раз больше

капель образует данный объем исследуемой жидкости, чем такой же объем чистого растворителя, во столько раз и поверхностное натяжение исследуемого раствора будет меньше поверхностного натяжения чистого растворителя, принятого за единицу.

В природе встречаются вещества, способные понижать и повышать поверхностное натяжение жидкости. Они названы поверхностно-активными веществами. К ним относятся такие вещества, у которых молекула имеет дипольный характер, т. е. одна часть молекулы лиофильная, а вторая лиофобная. Такие молекулы лиофильным концом вступают в молекулярное взаимодействие с растворителем, а лиофобный конец стремится уйти из растворителя. В результате этого поверхностно-активные вещества скопляются в поверхностном слое раствора. Их лиофобный конец будет направлен вне фазы. Все это приводит к уменьшению поверхностного натяжения раствора. Поверхностно-активные вещества играют громадную роль в природе. Они способствуют лучшему смешиванию обычно несмешивающихся жидкостей, например воды и жира, и используются как эмульгаторы. К поверхностно-активным веществам относятся мыла, высшие жирные кислоты, спирты, аминокислоты, желчные кислоты и др. У всех этих веществ функциональные группы играют роль лиофильных (гидрофильных) концов молекулы, а углеводородные радикалы — лиофобных (гидрофобных).

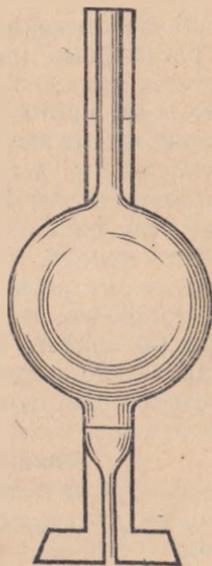


Рис. 8. Сталагмометр

Определение поверхностного натяжения методом сталагмометрии

Приборы. Сталагмометр. Химические стаканы на 100 мл.

Реактивы. Профилированный мыльный раствор. Амиловый спирт. Раствор яичного белка, 1—2%-ный. Раствор хлорида натрия, 5—10%-ный.

Ход работы. Берут пять стаканчиков, последовательно наливают в них: в 1-й — воду, во 2-й — мыльный раствор, в 3-й — насыщенный водный раствор амилового спирта, в 4-й — раствор хлористого натрия, в 5-й — раствор белка.

Насасывают в сталагмометр воду до метки и дают ей свободно вытекать, ведя счет каплям. Так же поступают с растворами из стаканчиков 2, 3, 4 и 5. Результаты отсчета капель заносят в тетрадь. Поверхностное натяжение воды принимают за единицу, а поверхностное натяжение исследуемых растворов рассчитывают по формуле $\delta = V_1/V_2$, где δ — поверхностное натяжение относительно воды; V_1 — количество капель, которое образуется при вытекании из сталагмометра воды; V_2 — количество капель, которое образуется при вытекании из сталагмометра исследуемых растворов.

Например, вода при ее вытекании из сталагмометра дает 20 капель, а такой же объем раствора амилового спирта — 28 капель. Поверхностное натяжение водного раствора спирта будет: $\delta = 20/28 = 0,71$.

Влияние желчи (желчных кислот) на поверхностное натяжение воды

Приборы. Химические стаканы на 250—500 мл. Стеклянная палочка.

Реактивы. Камфора. Серный цвет. Желчь. Дистиллированная вода.

1. **Проба с камфорой.** В широкий стакан наливают 200—250 мл воды и осторожно опускают в воду несколько кусочков камфоры. Кусочки камфоры быстро передвигаются на поверхности воды. Это объясняется тем, что отдельные участки кусочка камфоры растворяются в воде с разной скоростью, поэтому вокруг кусочка камфоры создается неравномерное поверхностное натяжение и она перемещается в сторону, где оно выше.

Вносят в воду стеклянную палочку, предварительно смоченную желчью. Движение кусочков камфоры после этого на поверхности воды прекращается, так как желчь понижает поверхностное натяжение воды.

2. **Проба с серным цветом.** В одну пробирку наливают 3—4 мл воды, а в другую — такое же количество воды с несколькими каплями желчи. Затем на поверхность жидкости в обе пробирки добавляют небольшое количество серного цвета. В пробирке с водой серный

цвет будет плавать на поверхности, а в пробирке, где была вода с желчью, вследствие понижения желчью поверхностного натяжения воды серный цвет медленно опускается на дно пробирки, не задерживаясь на поверхности.

Адсорбция твердых веществ на поверхности раздела фаз

Адсорбция — поглощение одного вещества поверхностью другого (адсорбента) за счет свободной поверхностной энергии. Наибольшей способностью к адсорбции обладают системы с большим запасом свободной поверхностной энергии — коллоидные системы. Адсорбция может быть молекулярной и ионной. При молекулярной адсорбции на адсорбенте осаждаются целые молекулы другого (адсорбируемого) вещества, тогда как при ионной — только ионы (анионы или катионы). По этому признаку адсорбенты делят на аниониты и катиониты. Роль анионитов и катионитов могут выполнять специальные искусственные смолы, несущие на своей поверхности определенный электрический заряд.

Нередко адсорбированные вещества могут проникать в глубину адсорбента, такое явление называют абсорбцией. Если адсорбированное вещество вступает в химическую реакцию с адсорбентом, явление носит название хемосорбции. При хемосорбции образуются новые вещества с отличными от исходных свойствами.

Адсорбция широко представлена в окружающей нас природе, а также очень часто используется человеком во всех областях его деятельности. Так, усвоение питательных веществ из окружающей среды начинается с адсорбции этих веществ на поверхности простейших организмов, усвоение питательных веществ клетками высших организмов начинается адсорбцией этих веществ из внутренней среды поверхностью клеточной протоплазмы. На явлении избирательной адсорбции основано применение многих лекарственных веществ в медицине и ветеринарии, например применение активированного угля внутрь при метеоризме. Многие технологические процессы в промышленности и сельском хозяйстве имеют в своей основе адсорбцию одних веществ другими — крашение тканей, протравливание семян. Разделение смеси близких по строению и свойствам веществ также осуществляется

на основе адсорбции. Этот очень краткий перечень использования адсорбции указывает на громадное значение данного явления в практической деятельности человека, в окружающей нас природе.

Адсорбция фуксина на стекле

Приборы. Стеклянная колба на 50 мл.

Реактивы. Фуксин, 1%-ный водный раствор. Этиловый спирт. Вода дистиллированная.

Ход работы. Колбу наполняют доверху раствором фуксина и оставляют на 10—15 мин, затем раствор сливают и колбу многократно ополаскивают до тех пор, пока промывная вода станет совершенно бесцветной. В колбу наливают 15—20 мл спирта и встряхивают ее в течение 1,5—2 мин. Спирт окрашивается в розово-красный цвет за счет перехода в него ранее адсорбированного на стенках колбы фуксина.

Адсорбция на осажденном сульфате бария

Адсорбированное вещество настолько прочно связывается адсорбентом, что оно не вступает в характерные для него реакции, даже если эти реакции протекают в системе, где находится адсорбент с адсорбированным веществом.

Приборы. Цилиндры с пробкой на 300—500 мл.

Реактивы. Марганцевокислый калий, 1%-ный раствор. Гидроксид натрия, 20%-ный раствор. Сульфат натрия, 10%-ный раствор. Хлорид бария, 10%-ный раствор. Перекись водорода, 2—3%-ный раствор.

Ход работы. В цилиндр наливают 50 мл марганцевокислого калия, добавляют несколько миллилитров раствора щелочи, 50 мл раствора сернокислого натрия и 100 мл раствора хлористого бария. Цилиндр закрывают пробкой, тщательно перемешивают и оставляют на некоторое время для осаждения образовавшегося сернокислого бария. После осаждения сернокислого бария к надосадочной жидкости добавляют раствор перекиси водорода до обесцвечивания жидкости. Содержимое перемешивают. Надосадочная жидкость в цилиндре полностью обесцвечивается, а осадок сохраняет окраску адсорбированного на частичках сернокислого бария марганцевокислого калия, не вступающего в реакцию с перекисью водорода.

Адсорбция ализарина окисью алюминия

Приборы. Спиртовка. Мензурка на 50 мл. Штатив с пробирками. Стеклянная палочка.

Реактивы. Алюмокалиевые квасцы, 10%-ный раствор. Аммиак, концентрированный. Серная кислота, 15%-ный раствор. Ализарин, 0,5%-ный раствор. Вода дистиллированная.

Ход работы. В мензурку наливают 25 мл квасцов и 5 мл аммиака. Содержимое мензурки доводят до 50 мл водой и размешивают стеклянной палочкой. Образуется студень гидроокиси алюминия.

В две пробирки наливают по 3—4 мл полученного студня. В одну из них добавляют 1—2 мл ализарина и кипятят, при этом студень окрашивается в розовый цвет адсорбированным на нем ализарином. Затем в обе пробирки добавляют по 3—4 мл серной кислоты. Студень гидроокиси алюминия во второй пробирке растворяется, тогда как студень с адсорбированным ализарином в кислой среде изменяет свою окраску из розовой на желтую, но не растворяется. Следовательно, адсорбция представляет собой не только физический процесс, но также в какой-то мере и химическое явление, приводящее к образованию комплекса с новыми свойствами.

Полярная адсорбция красящих веществ

Адсорбция вещества зависит от заряда поверхности адсорбента и адсорбтива: при одноименных зарядах адсорбция не наблюдается, при разноименных адсорбция происходит.

Приборы. Штатив с пробирками. Воронки с фильтрами.

Реактивы. Эозин, 0,2%-ный раствор. Метиленовая синь, 0,1%-ный раствор. Гидроксид натрия, 0,1 н. раствор. Соляная кислота, 0,1 н. раствор. Силикагель (порошковидный). Окись алюминия или окись цинка.

Ход работы. В две пробирки вносят примерно по 0,5 г силикагеля, а в две другие — по 0,5 г окиси алюминия (окиси цинка). В одну из пробирок с силикагелем добавляют эозин, а в другую метиленовую синь. Аналогичным образом поступают и с пробирками, содержащими окись металла. После непродолжительного встряхивания сравнивают цвета адсорбентов во всех четырех пробирках. Силикагель окрашивается в синий цвет метиленовой синью, а окись металла — в красный цвет эозином.

В двух других пробирках адсорбенты не изменяют своей первоначальной окраски.

Окрашенные адсорбенты переносят на фильтры ватонит и промывают дистиллированной водой. Окраска их в результате промывки не изменяется. Затем силикагель промывают небольшим количеством едкого натра, а окись металла — соляной кислотой. При этом адсорбенты обесцвечиваются в результате вытеснения метиленовой сини более сильным основанием (едкий натр), а озонина — более сильной кислотой (соляная кислота). Наблюдаемое явление можно назвать еще гетерополярной адсорбцией. Данный вид адсорбции играет очень важную роль в красильном производстве, а также при дублении кож.

Хроматографическое разделение растительных пигментов на бумаге

Явление адсорбции нашло применение в распределительной хроматографии смесей, состоящих из нескольких близких по строению и свойствам веществ. Метод распределительной хроматографии был разработан М. С. Цветом в начале XX в. В качестве адсорбента он использовал окись алюминия, крахмал и другие вещества, которыми заполнялись стеклянные трубки (хроматографические колонки), и через них пропускал растворы со смесью веществ, которые надо разделить.

Разделение веществ основано на неодинаковом коэффициенте распределения каждого из них (коэффициент распределения — это отношение скорости движения вещества к скорости движения растворителя). Обладая характерными коэффициентами распределения, каждое вещество, продвигаясь вместе с растворителем через слой адсорбента, адсорбируется на разной высоте этого слоя — происходит разделение смеси веществ. В настоящее время в качестве адсорбента при хроматографии применяется специальная фильтровальная бумага, по капиллярам которой продвигается растворитель, увлекая за собой растворенные вещества, но так как коэффициент распределения у разных веществ будет неодинаковым, каждое вещество откладывается на разных участках бумаги. В случае хроматографии окрашенных веществ участки их адсорбции будут видимые, а в случае бесцветных веществ бумагу после хроматографии

обрабатывают специальными реактивами, дающими с исследуемыми веществами цветные комплексы. По образующейся окраске обнаруживают участки отложения исследуемых веществ.

На первый взгляд кажется, что в листьях содержится только один зеленый пигмент, но при хроматографии ацетоновой вытяжки из листьев обнаруживают несколько индивидуальных пигментов.

Приборы. Ступка фарфоровая. Химический стакан на 250 мл. Стеклянная палочка. Полосы фильтровальной бумаги размером 4×25 мм. Штатив с кольцом. Воронка с бумажным фильтром.

Реактивы. Стеклянный песок. Свежие зеленые листья. Ацетон, 85%-ный водный раствор. Мел.

Ход работы. Берут 2,0 г мелкоизмельченных свежих листьев, помещают их в фарфоровую ступку и добавляют небольшое количество стеклянного песка и щепотку мела (для нейтрализации органических кислот, находящихся в растительных соках). К полученной смеси небольшими порциями добавляют 10 мл ацетона, непрерывно растирая содержимое ступки. Когда в ступке образуется однородная масса, ее фильтруют через бумажный фильтр в химический стакан. В отфильтрованный ацетоновый экстракт из листьев опускают на 2—3 мм полосу фильтровальной бумаги, укрепленную при помощи скрепки на стеклянной палочке. Полоска бумаги не должна касаться стенок стакана. Спустя 20—30 мин наблюдают зональное разделение разноокрашенных растительных пигментов на полосе фильтровальной бумаги.

Распределительная хроматография аминокислот

Принцип основан на неодинаковом коэффициенте распределения разных аминокислот в определенном растворителе при прохождении раствора аминокислот по фильтровальной бумаге. Распределительная хроматография может быть нисходящая, восходящая и круговая. При нисходящей хроматографии каплю раствора из смеси аминокислот наносят на полосу фильтровальной бумаги, отступая от ее края на 8—10 см, высушивают и конец полосы погружают в ванночку с растворителем, находящуюся в верхней части герметически закрывающейся камеры. Полоса бумаги при этом свободно свисает из ванночки, и растворитель по ней движется сверху

вниз, увлекая за собой аминокислоты. При восходящей хроматографии полоса бумаги с нанесенной на нее каплей раствора аминокислот погружается в ванночку с растворителем, находящуюся на дне камеры. Растворитель при этом движется снизу вверх, увлекая с собой аминокислоты. При круговой распределительной хроматографии капля раствора аминокислот наносится по центру круглого листа фильтровальной бумаги, растворитель по специальному фитильку подается к центру листа, а от центра движется радиально к его периферии, увлекая за собой аминокислоты. Для обнаружения аминокислот на фильтровальной бумаге после их хроматографического распределения бумагу обрабатывают раствором нингидрина, с которым аминокислоты образуют комплексы, окрашенные в лиловый цвет.

Нисходящая хроматография

Приборы. Герметически закрывающаяся камера из фанеры со стеклянными окошками (внутри покрытая парафином) размерами $20 \times 30 \times 60$ (высота) см. Можно взять стеклянный баллон высотой в 50—60 см с пришлифованной стеклянной крышкой. Ванночка (по длине камеры) — стеклянная трубка, запаянная с концов и имеющая продольный разрез шириной в 2—3 мм. Сушильный шкаф. Микропипетка на 0,1 мл. Хроматографическая бумага. Электропаяльник. Предметные стекла. Пульверизатор с шарами. Делительная воронка на 500 мл.

Реактивы. Набор аминокислот. Растворитель: смесь бутилового спирта, уксусной кислоты и воды (4 : 1 : 5). Нингидрин, 0,5%-ный раствор на ацетоне с добавлением уксусной кислоты и воды (95 : 1 : 4).

Ход работы. 1. Готовят смесь из нескольких аминокислот, имеющих разные коэффициенты распределения. Можно взять следующие сочетания аминокислот:

а) гистидин солянокислый—22,7 мг; глицин—7,5 мг; валин—11,7 мг; изолейцин—13,1 мг;

б) аргинин солянокислый—21,0 мг; глутаминовая кислота—14,7 мг; аланин—8,9 мг; метионин—14,9 мг;

в) лизин солянокислый—18,1 мг; серин—10,5 мг; тирозин—9 мг; фенилаланин—15,1 мг;

г) цистин—23,8 мг; аспарагиновая кислота—13,3 мг; треонин—11,9 мг; триптофан—20,4 мг;

д) аспарагиновая кислота—13,3 мг; серин—10,5 мг; аланин—8,9 мг;

е) глутаминовая кислота—14,7 мг; глицин—7,5 мг; треонин—11,9 мг.

Для приготовления раствора одну из смесей, приведенных выше, растворяют в 10 мл 50%-ного раствора муравьиной кислоты или в 10 мл дистиллированной воды, к которой добавляют несколько капель бутилового спирта.

2. Готовят растворитель, для чего берут 4 части бутилового спирта, одну часть ледяной уксусной кислоты и 5 частей дистиллированной воды. Жидкости наливают в делительную воронку, встряхивают в течение нескольких минут и оставляют для разделения слоев. Нижний слой сливают и используют для насыщения камеры его парами, в которой производится хроматография. Верхний насыщенный водой бутилово-уксуснокислый слой используют для хроматографии.

3. Готовят камеру для хроматографии. На дно камеры наливают небольшое количество растворителя, который при испарении насыщает камеру парами, что предотвращает высыхание фильтровальной бумаги. В верхней части камеры укрепляют ванночку в строго горизонтальном положении и наливают в нее растворитель.

4. Берут полосу хроматографической бумаги шириной 5 см и, отступая от ее края на 8—10 см, при помощи микропипетки наносят 0,005—0,01 мл приготовленной смеси аминокислот. Образовавшееся пятно быстро просушивают над электроплиткой. Конец полосы бумаги, ближе к которому нанесена капля смеси, опускают в ванночку с растворителем, а второй конец должен свободно свисать через отверстие ванночки в камеру. Полоса бумаги должна свисать строго вертикально, не касаясь своим свободным концом ни к стенкам, ни ко дну камеры, а также к растворителю на дне камеры. В ванночке полоса бумаги фиксируется предметным стеклом или стеклянной пластинкой.

Подготовленная камера герметически закрывается стеклянной крышкой. В процессе хроматографии растворитель должен пройти вдоль всей полосы бумаги, увлекая за собой аминокислоты. Ввиду разного коэффициента распределения смесь разделяется на отдельные аминокислоты, адсорбирующиеся на фильтровальной бумаге на разных расстояниях от стартовой точки. Когда растворитель пройдет до конца полосы, ее извлекают из камеры и высушивают на воздухе в вытяжном шкафу. Для лучшего разделения смеси пропускание растворите-

ля можно повторить. Высушенную полосу опрыскивают раствором нингидрина и помещают в сушильный шкаф при температуре 60°C на 10—15 мин для развития окраски. На высушенной полосе обнаруживают отдельные лиловые пятна, соответствующие расположению адсорбированных аминокислот из взятой смеси.

Круговая хроматография

Приборы. Эксикатор диаметром 20—30 см. Чашка Петри. Лист хроматографической бумаги диаметром 18—28 см (в зависимости от размеров эксикатора). Фитилек из фильтровальной бумаги (неплотно скрученная трубочка из фильтровальной бумаги). Остальные приборы и реактивы, как и в опыте с нисходящей хроматографией.

Ход работы. На дно эксикатора помещают чашку Петри с растворителем для насыщения эксикатора парами.

На круглый лист хроматографической бумаги строго по центру наносят 0,005—0,01 мл раствора смеси аминокислот. Каплю быстро высушивают над электроплиткой и пипеткой с заостренным концом делают отверстие, соответствующее центру ранее нанесенной и высушенной капли раствора аминокислот. В отверстие вставляют фитилек из фильтровальной бумаги и подготовленную для хроматографии бумагу помещают в эксикатор с таким расчетом, чтобы края круглого листа ложились на выступы в средней части эксикатора, а свободный конец фитилька был погружен в растворитель.

Хроматография считается законченной, когда растворитель пройдет от центра листа к его периферии. Затем лист бумаги извлекают из эксикатора, высушивают в вытяжном шкафу, опрыскивают из пульверизатора раствором нингидрина, высушивают в сушильном шкафу при 60°C в течение 15 мин.

На листе бумаги будут видны четко обозначенные радиальные кольца лилового цвета — участки, где адсорбировались отдельные аминокислоты.

Распределительную хроматографию аминокислот на фильтровальной бумаге можно использовать как для качественного, так и для количественного определения аминокислотного состава индивидуальных белков или суммарных белков в том или ином веществе. Для этого

исследуемый материал гидролизуют, затем гидролизат очищают от примесей — получают смесь чистых аминокислот, которые разделяют методом хроматографии¹.

Вязкость и методы ее определения

Вязкость, или внутреннее трение раствора, — это сопротивление, которое возникает в текучих телах при передвижении в них одного слоя относительно другого. Величина, обратная вязкости, называется текучестью. Отсюда вязкость можно определить по скорости передвижения (текучести) жидкости в капиллярной трубке.

Отношение вязкости исследуемой жидкости к вязкости воды называется *относительной вязкостью*.

Приборы для измерения вязкости называют вискозиметрами. Чаще применяются капиллярные вискозиметры, с помощью которых вязкость определяют по скорости истечения жидкости, измеряя время истечения определенного объема жидкости или объем жидкости, протекающей через капилляр за определенное время.

Вязкость зольей зависит от многих факторов, а именно: от концентрации зольей, природы и строения коллоидных частичек, температуры золья, рН среды и др.

Определение вязкости с помощью капиллярного вискозиметра

В практике вязкость определяют по отношению к вязкости воды, измеряя время истечения под собственным давлением одинаковых объемов исследуемой жидкости и воды в одном и том же вискозиметре.

Описание прибора. Вискозиметр представляет собой U-образную трубку с двумя расширениями, соединенными капилляром, через который вытекает определенный объем жидкости из расширения колена *А* в более низкорасположенное расширение колена *Б* (рис. 9).

Приборы. Вискозиметр. Штатив с лапкой. Резиновая трубка. Секундомер.

Реактивы. Вода дистиллированная. Исследуемые растворы: раствор глюкозы, 1%-ный; раствор желатина, 1%-ный; раствор крахмала, 1%-ный.

¹ Подробное описание методики количественного определения аминокислот см. в специальной литературе.

Ход работы. Вискозиметр укрепляют строго вертикально в штативе. В широкое колено *Б* наливают воду в таком количестве, чтобы она поместилась в расширении колена *А*. С помощью резиновой трубки, надетой на конец колена *А*, воду засасывают в расширение колена

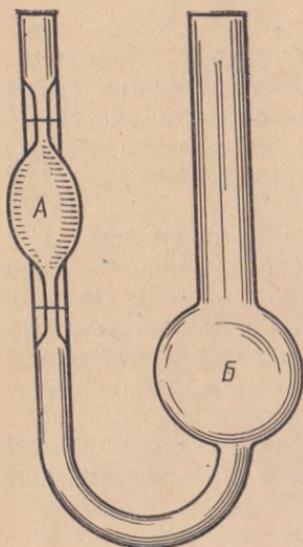


Рис. 9. Капиллярный вискозиметр: *А* — расширение первого колена; *Б* — расширение второго колена

А до верхней метки и дают свободно вытекать в расширение колена *Б* через капилляр, включая секундомер. Записывают время, за которое вода по капилляру переместилась в вискозиметре из колена *А* в колено *Б*. В такой же последовательности определяют время, за которое перемещаются через капилляр вискозиметра одинаковые объемы исследуемых растворов. По окончании вискозиметрии находят отношение между временем истечения исследуемого раствора и временем истечения воды через капилляр вискозиметра. Это отношение и показывает относительную вязкость исследуемых растворов по сравнению с водой, вязкость которой принимается за единицу.

Допустим, что вода переходила из одного колена вискозиметра в другое за 15 с, а исследуемый раствор — за 25 с. Отсюда вязкость $L = 25/15 = 1,66$ единиц, т. е. вязкость раствора в 1,66 раза выше, чем вязкость воды. Вязкость растворов кристаллоидов мало чем отличается от вязкости чистой воды.

Влияние концентрации раствора на его вязкость

Реактивы: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0%-ные растворы желатина. Все остальное, как и в предыдущем опыте.

В той же последовательности, как и в вышеприведенном опыте, определяют вязкость перечисленных растворов желатина по отношению к воде. На основании най-

денных величин вычерчивают график, откладывая на оси абсцисс концентрацию раствора, а на оси ординат — вязкость раствора. На основании вычерченного графика можно сказать, что вязкость раствора желатина прямо пропорциональна его концентрации.

Влияние температуры на вязкость

Приборы. Вискозиметр. Секундомер. Штатив с лапкой. Водяная баня. Стакан со льдом. Термометр.

Реактивы. Желатин, 0,5%-ный раствор. Вода.

Ход работы. Вискозиметр помещают в стакан со льдом и укрепляют в штативе. В широкое колено прибора наливают воду, туда же вставляют термометр и охлаждают воду до 4°C . Определяют скорость перемещения воды в вискозиметре при 4°C , как было описано выше. После этого вискозиметр переносят в водяную баню и производят те же определения при температуре 20 и 40°C . Аналогично проводят исследование раствора желатина, выражая его вязкость относительно вязкости воды, которую принимают за единицу. Как и в предыдущем опыте, вычерчивают график зависимости вязкости от температуры раствора. Из графика видно, что вязкость раствора будет обратно пропорциональна температуре раствора.

Оптические свойства коллоидных растворов

В отличие от других систем в коллоидных растворах наблюдают опалесценцию и явление Фарадея — Тиндаля. Эти свойства обусловлены наличием в коллоидных системах частичек определенных размеров. Диаметр коллоидных частичек меньше, чем длина волны красной части спектра светового луча, но больше, чем длина волны синей части спектра луча. Благодаря этому лучи частично рассеиваются коллоидными частичками, что приводит к возникновению в растворах коллоидных веществ явления Фарадея — Тиндаля. Под явлением Фарадея — Тиндаля следует понимать рассеивание светового луча коллоидными частичками в затемненном растворе, создающего впечатление, что частички сами излучают свет. Внешне явление Фарадея — Тиндаля проявляется в образовании светового конуса в затемненном растворе коллоида при попадании в него светового луча через уз-

кое отверстие. Несмотря на частичное рассеивание светового луча, коллоидный раствор остается прозрачным в отличие от суспензий, которые полностью рассеивают световые лучи, в результате чего остаются непрозрачными. Явление опалесценции обусловлено дифракцией луча коллоидными частичками при пропускании его через коллоидный раствор. Как было сказано выше, диаметр коллоидных частиц превышает длину волны синей части спектра, поэтому эти волны отражаются коллоидным раствором, в отраженном свете коллоидный раствор приобретает синий оттенок. Длина волн красной части спектра больше диаметра коллоидных частичек, благодаря чему эти волны проходят через коллоидный раствор и становятся видимыми. Если рассматривать раствор в проходящем луче, коллоидный раствор приобретает желтовато-красный оттенок.

Опалесценция раствора канифоли и фенолфталеина

Приборы. Штатив с пробирками. Пипетки.

Реактивы. Канифоль, 1%-ный спиртовой раствор. Фенолфталеин, 1%-ный спиртовой раствор. Вода, дистиллированная.

Ход работы. В две пробирки наливают по 3—4 мл воды. В одну из них добавляют 2—3 капли раствора канифоли, а во вторую — 2—3 капли раствора фенолфталеина. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и наблюдают явление опалесценции, которое сводится к следующему: спиртовые растворы фенолфталеина и канифоли бесцветные, водные растворы этих веществ в отраженном луче имеют синеватую окраску, а в проходящем луче — желтовато-красную.

Наблюдение явления Фарадея — Тиндаля

Приборы. Проекционный фонарь. Можно взять матовую лампу большого накала или карманный фонарик с сильным лучом. Фанерный ящик, внутри выкрашенный черным лаком, имеющий в центре боковой стенки отверстие диаметром 1—2 мм (размеры ящика: длина 25 см, ширина 20 см, высота 30 см). Передняя стенка ящика открыта. Плоские сосуды размером 20×5×20. Штатив с лапкой.

Реактивы. Канифоль, 1%-ный спиртовой раствор. Марганцево-кислый калий, 1%-ный раствор. Вода. Взвесь глины в воде.

Ход работы. Устанавливают осветитель как можно ближе к отверстию в боковой стенке ящика. В ящик поочередно помещают стеклянные сосуды с растворами

исследуемых веществ — раствор марганцевокислого калия, коллоидный раствор канифоли (несколько капель спиртового раствора канифоли в 300—400 мл воды), чистая вода и взвесь глины в воде. Сосуды должны плотно прилегать к боковой стенке ящика, а отверстие в ящике, через которое в раствор пропускают свет, должно приходиться по центру боковой стенки стеклянного сосуда. В сосуд пропускают свет и через переднюю открытую стенку наблюдают световой конус, явление Фарадея — Тиндаля, в коллоидном растворе. В воде и растворе марганцевокислого калия это явление отсутствует. Взвесь глины в воде световых лучей совсем не пропускает.

Студни лиофильных коллоидов

Коллоидные вещества в природе могут находиться в трех переходных формах: золи, студни и гели.

Золи — подвижные коллоидные системы, в которых дисперсная фаза равномерно распределена в дисперсионной среде, образуя с ней устойчивую дисперсную систему.

Гели — такая форма коллоида, когда в силу определенных причин дисперсная фаза потеряла связь с дисперсионной средой и образовала осадок. Таким образом, гель — это осадок коллоидного вещества, образующийся при коагуляции зольей. Гели могут образовывать как лиофобные, так и лиофильные коллоиды. Гели лиофобных коллоидов не способны к набуханию, а гели лиофильных коллоидов могут набухать при погружении их в соответствующие растворители.

Студни — промежуточная форма между золями и гелями. В отличие от гелей студни относятся к дисперсным системам, которые состоят из дисперсной фазы и дисперсионной среды, устойчиво связанных между собой. От зольей студни отличаются отсутствием у них подвижности (текучести). Химические процессы в студнях протекают с той же скоростью, что и в золях. Студни могут быть образованы коллоидными веществами, мицеллы которых имеют фибриллярную форму. При образовании студней мицеллы коллоидных веществ объединяются между собой гидрофобными участками, образуя ячеистую структуру, которая удерживает в себе растворитель (дисперсионную среду). Гидрофильные участки мицелл прочно

связаны с растворителем за счет гидратации. Таким образом, студень можно рассматривать как структуризованный золь, т. е. потерявший свою мобильность (подвижность). При старении студней их структура уплотняется, за счет чего из студней выжимается дисперсионная среда. Этот процесс назван синерезисом. В случае кровяного сгустка, который при старении выжимает сыворотку и уменьшается в объеме, процесс синерезиса называют ретракцией кровяного сгустка.

При высыхании студни переходят в гидрофильные гели. Гидрофильный гель, помещенный в воду, набухает. Процесс набухания — это поглощение воды гидрофильным гелем, сопровождающийся увеличением массы и объема набухающего коллоида (геля). Механизм набухания, очевидно, сводится к осмотическому всасыванию растворителя коллоидом, а также гидратацией коллоида, о чем свидетельствует тот факт, что объем набухшего коллоида меньше суммарного объема геля и растворителя, поглощенного гелем при набухании. Следовательно, при набухании молекулы растворителя располагаются вокруг коллоидных частичек упорядоченно, более плотно, чем в массе растворителя, поэтому объем растворителя, связанного коллоидом, будет меньше объема чистого растворителя.

Набухание сопровождается увеличением как массы, так и объема коллоида. Если набухающий коллоид ограничить оболочкой, то коллоид будет создавать давление на эту оболочку, названное *давлением набухания*. Давление набухания нередко исчисляется десятками и сотнями паскалей и может вызвать разрыв даже толстостенных металлических бомб, в которые помещают набухающие гели. Это явление показывает, что процесс набухания — не механическое впитывание воды гелем, а довольно сложный физико-химический процесс.

Получение зелей и студней желатина

Приборы. Кристаллизатор с водой. Электроплитка. Химический стакан на 250—500 мл. Стеклянная палочка. Штатив с пробирками. Весы роговые с разновесом. Мерный цилиндр.

Реактивы. Желатин сухой. Вода.

Ход работы. Отвешивают 1 г желатина, высыпают в стакан и заливают 50 мл холодной воды. Выдерживают в течение 20—30 мин для набухания желатина, после че-

го содержимое стакана нагревают на электроплитке, непрерывно помешивая стеклянной палочкой до полного растворения желатина. Образуется золь, его наливают в пробирку и помещают в кристаллизатор со льдом. По мере охлаждения раствора подвижность молекул растворителя и частичек растворенного вещества уменьшается, постепенно возрастает вязкость раствора; затем он полностью теряет подвижность и золь переходит в студень.

Диффузия в студнях

Так как студни являются дисперсными системами, в которых имеется достаточное количество дисперсионной среды, то скорость химических и некоторых физических явлений в них будет такая же, как и в подвижных жидких системах. Известно, что растворы способны к диффузии. В студнях, как и в золях, диффузия кристаллоидов выражена достаточно хорошо.

Приборы. Круглодонные колбы на 50 мл с широким горлышком. Электроплитка. Кристаллизатор со льдом. Химический стакан на 250 мл. Стеклянная палочка. Мерный цилиндр на 250 мл. Весы роговые с разновесом. Скальпель. Стеклянные трубки диаметром 5 мм.

Реактивы. Желатин сухой. Кристаллы марганцевокислого и хромовокислого калия, кристаллвиолета и других окрашенных веществ.

Ход работы. Готовят 2%-ный раствор желатина: отвешивают 5 г желатина и заливают в стакане 250 мл холодной воды, выдерживают 20—30 мин для набухания и нагревают на электроплитке, постоянно помешивая стеклянной палочкой до полного растворения. Полученный золь наливают доверху в 3—4 колбочки и охлаждают сначала водой, а затем в кристаллизаторе со льдом до образования студня. Скальпелем делают разрез в студне до середины колбочки, в разрез вставляют стеклянную трубку и через нее в студень вводят кристаллик окрашенного вещества. Стеклянную трубку вынимают из студня. К месту разреза прикладывают горячую стеклянную палочку для расплавления желатина в месте разреза, затем колбочку снова помещают в кристаллизатор со льдом для застывания расплавленного желатина. Когда желатин снова превратится в студень, колбочки вынимают из кристаллизатора и в перевернутом виде оставляют на лабораторном столе. Через 1—2 ч наблюдают достаточно хорошо выраженную диффузию (распространение окраски от кристаллика во все стороны

студия) в колбочке, где в студень был помещен кристаллик низкомолекулярного вещества, и отсутствие диффузии в колбочке, где в студень был помещен кристаллик высокомолекулярного вещества. Следовательно, можно сделать вывод, что скорость диффузии зависит от величины молекул кристаллоидов.

Набухание желатина

Анионы солей серной, лимонной, уксусной кислот понижают скорость набухания, тогда как анионы солей азотной, иодистой, роданистой кислот повышают набухание желатина по сравнению с его набуханием в чистой воде. Понижают степень набухания также вещества, богатые группами OH.

Приборы. Штатив с пробирками. Пипетки. Полоски миллиметровой бумаги. Скальпель.

Реактивы. Соляная кислота, 0,025 н. Гидроксид натрия, 0,025 н. Хлорид натрия, 0,1 н. Сульфат натрия, 0,1 н. Роданистый калий, 0,1 н. Сахароза, 10%-ная. Мочевина, 5%-ная. Вода, дистиллированная.

Ход работы. В 8 пробирок одинакового диаметра наливают по 5 мл следующих растворов:

Раствор	Номер пробирки							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	H ₂ O	HCl	NaOH	NaCl	Na ₂ SO ₄	KCNS	Сахароза	Мочевина
Концентрация	—	0,025н.	0,025н.	0,1 н.	0,1 н.	0,1 %-ный	10 %-ный	5 %-ный
Высота осадка до набухания (мм)								
Высота осадка после набухания (мм)								
Степень набухания (% к исходной высоте)								

В каждую пробирку при помощи скальпеля вносят приблизительно по 0,3 г измельченного желатина, осторожно встряхивают и дают желатину опуститься на дно,

Миллиметровой бумагой определяют высоту осадка. Затем несколько раз встряхивают содержимое пробирок. Через 1—2 ч пробирки снова встряхивают и после оседания желатина на дно измеряют высоту осадка. Результаты первого и второго измерений вносят в таблицу и высчитывают степень набухания желатина в процентах к исходной высоте.

Местное набухание под влиянием кислоты

Приборы. Кристаллизатор диаметром 15 см. Пипетка с тонкооттянутым концом.

Реактивы. Желатин, 6%-ный золь. Уксусная или муравьиная кислота, концентрированная.

Ход работы. В кристаллизатор наливают золь желатина толщиной слоя в 1—2 см. После того как он застынет в студень, делают несколько уколов пипеткой, конец которой заполнен кислотой. На поверхность студня наливают воду и оставляют в покое. Через 1—2 ч воду сливают и в местах уколов в студне обнаруживают набухание желатина в виде бугорков. Объясняется это тем, что кислота повышает заряд частичек желатина и они больше гидратируются, т. е. набухают.

Периодические осаждения в гелях

Реакции, протекающие в студнях, могут давать растворимые продукты или твердые осадки. Образование твердых осадков зависит от рода студня, его концентрации, а также от природы и концентрации вводимых в студень реагирующих веществ. Так, если приготовить золь желатина на слабом растворе хромпика, дать ему застыть в студень и на него нанести раствор азотнокислого серебра, то в результате реакции образуется осадок двуххромовокислого серебра внутри студня, который будет откладываться в виде периодических колец. Эти осадки образуются не из любой пары реагирующих веществ и только при определенной концентрации веществ в растворе. Образующиеся периодические кольца носят название колец Лезеганга (по имени ученого, впервые наблюдавшего это явление).

Приборы. Штатив с пробирками. Чашки Петри.

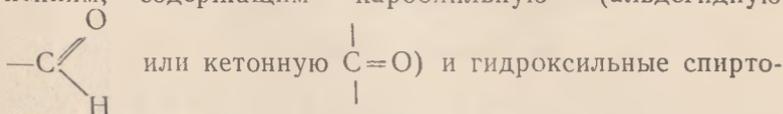
Реактивы. Желатин, 3,5%-ный раствор на 0,1%-ном растворе двуххромовокислого калия. Нитрат серебра, 8,5%-ный раствор.

Ход работы. На дно чашки Петри и в пробирку на $\frac{2}{3}$ ее объема наливают золь желатина и оставляют на ночь при температуре не выше 20°C для застывания. На поверхность студня по центру чашки Петри и в пробирку наносят раствор азотнокислого серебра. Чашку Петри и пробирку накрывают, чтобы избежать испарения воды и высыхания студня, и оставляют в темном месте. Через 2—3 дня в пробирке наблюдают образование горизонтальных слоев красно-бурого осадка двуххромовокислого серебра, чередующихся с участками чистого студня. В чашке Петри на студне образуются расходящиеся концентрические кольца красно-бурого цвета — кольца Лезеганга.

ГЛАВА III

УГЛЕВОДЫ

Углеводы относятся к полифункциональным соединениям, содержащим карбонильную (альдегидную



ые группы. Поэтому они одновременно обладают свойствами альдегидов или кетонов и многоатомных спиртов. Углеводы — обширная группа природных соединений, подразделяемых на моносахариды, олигосахариды и полисахариды.

Моносахариды в зависимости от числа углеродных атомов в молекуле, подразделяются на триозы, тетрозы, пентозы, гексозы, гептозы и т. д. Общая формула моносахаридов — $\text{C}_n\text{H}_{2n}\text{O}_n$. Все природные моносахариды, имея в своих молекулах асимметрические атомы углерода, оптически активны и вращают плоскость поляризованного луча.

Олигосахариды и полисахариды — сложные углеводы и при нагревании с разведенными кислотами или при гидролизе ферментами они расщепляются на моносахариды. Олигосахариды при этом распадаются с образованием нескольких молекул моносахаридов (двух — дисахариды, трех — трисахариды, четырех — тетрасахариды и т. д.). Полисахариды при гидролизе образуют большое число молекул моносахаридов. Они имеют большую молекулярную массу, нерастворимы в воде или дают коллоидные растворы.

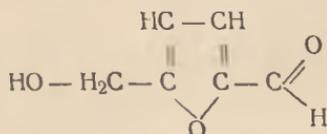
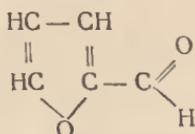
Углеводы широко распространены в природе, особенно в растительном мире. Они являются конечными продуктами фотохимического синтеза у зеленых растений. Животные, не обладающие способностью к подобной аккумуляции солнечной энергии, используют вещества, накопленные растениями. Углеводы участвуют в построении живых структур, служат материалом для биосинтеза соединений других классов. Им принадлежит важная роль в биоэнергетике клетки. Углеводы входят в состав нуклеиновых кислот, гликопротеидов, гликолипидов, некоторых витаминов и коферментов. Как составные ком-

поненты гликопротеидов углеводы участвуют в образовании внешнего примембранного слоя, играющего большую роль в защите клеток от проникновения в них микроорганизмов и вирусов. С ними связаны иммунохимические свойства тканей.

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА УГЛЕВОДЫ

Реакция с α -нафтолом

Эта реакция является общей для углеводов, и ее используют для открытия углеводов в биологическом материале. Химизм реакции сводится к тому, что при действии концентрированной серной кислоты из пентоз образуется фурфурол, а из гексоз — 5-оксиметилфурфурол:



При взаимодействии последних с α -нафтолом возникает характерное фиолетовое окрашивание, в случае с тимолом — красное.

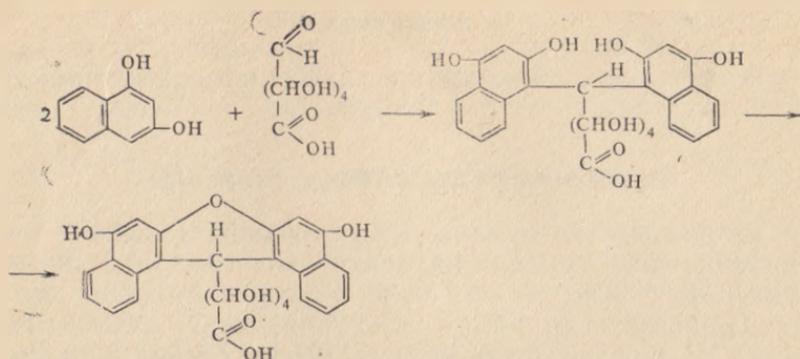
Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. α -Нафтол, 0,2%-ный раствор (приготовление см. на с. 147). Тимол, 1%-ный раствор в этиловом спирте. Серная кислота, концентрированная. Сахароза, 1%-ный раствор.

Ход работы. В две пробирки наливают по 2 мл раствора сахарозы. В первую пробирку добавляют 4—6 капель раствора α -нафтола, а в другую — столько же раствора тимола. В обе пробирки осторожно по стенкам наливают по 1—2 мл концентрированной серной кислоты, не смешивая ее с водным слоем. На границе слоев появляется фиолетовое (в случае α -нафтола) и красное (в случае тимола) окрашивание.

Нафторезорциновая проба

Реакция основана на способности сахаров конденсироваться с ароматическими системами с образованием окрашенных веществ. Так, глюкуроновая кислота, конденсируясь с нафторезорцином, образует производные динатилметана или ксантина:



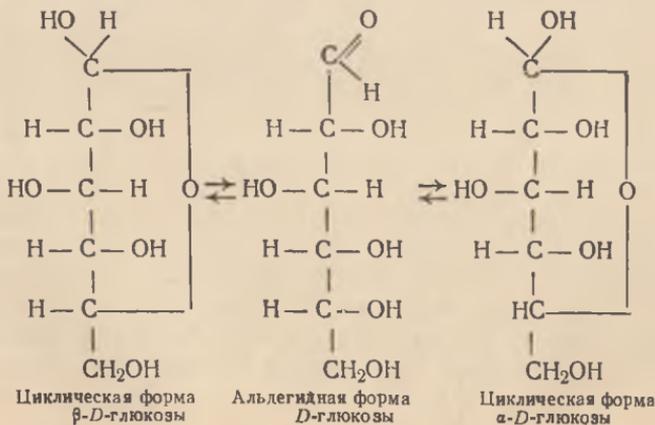
Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. Глюкоза, 5%-ный раствор. Нафторезорцин, 1%-ный спиртовой раствор. Соляная кислота, концентрированная. Эфир. Бензол.

Ход работы. В пробирку наливают 5—6 мл раствора глюкозы, прибавляют 1 мл раствора нафторезорцина и 1 мл концентрированной соляной кислоты. Смесь осторожно нагревают и кипятят 1 мин. Затем охлаждают, прибавляют 1—2 мл эфира или бензола и взбалтывают. Эфирный (бензольный) слой окрашивается в сине-зеленый цвет. Такое же окрашивание дают галактоза и манноза, ксилоза и арабиноза — темно-синее, уруновые кислоты — фиолетовое.

МОНОСАХАРИДЫ

В водных растворах моносахариды находятся в разных таутомерных формах, между которыми устанавливается динамическое равновесие:



Альдогексозы

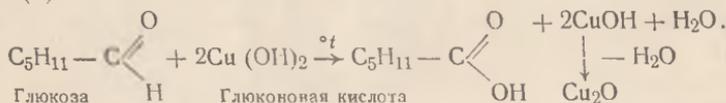
В организме животных и человека наиболее часто встречаются глюкоза и галактоза.

Реакции на редуцирующие углеводы

Углеводы, молекула которых содержит свободную карбонильную группу, называют *восстанавливающими* (редуцирующими). Эти сахара в щелочной среде способны окисляться, при этом восстанавливая соли оксида меди (II) в соли оксида меди (I), соли серебра — до металлического серебра, соли оксида висмута — до металлического висмута. На этом основан ряд методов качественного и количественного определения углеводов.

Проба с гидроксидом меди (II) — реакция Троммера

В щелочном растворе редуцирующие моно- и дисахариды восстанавливают гидроксид меди (II) в оксид меди (I):



Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. Глюкоза, 1%-ный раствор. Гидроксид натрия, 10%-ный раствор. Сульфат меди, 1%-ный раствор.

Ход работы. В пробирку наливают 1—2 мл раствора глюкозы, равный объем раствора гидроксида натрия, и при встряхивании добавляют по каплям раствор сульфата меди. В присутствии глюкозы образующийся осадок гидроксида меди (II) растворяется, окрашивая жидкость в голубой цвет. Верхний слой жидкости нагревают до кипения. Появление желтого (гидроксид меди I), а затем красного (оксид меди I) осадка указывает на положительную реакцию Троммера.

В другой пробирке смешивают 2—3 мл раствора гидроксида натрия с несколькими каплями раствора сульфата меди. Раствор глюкозы не добавляют. Получается осадок гидроксида меди (II) голубого цвета. При нагревании этого раствора выпадает черный осадок оксида меди (II). Поэтому при реакции Троммера следует избегать излишка сульфата меди, так как реакция между

редуцирующим углеводом и гидроксидом меди (II) идет количественно. Избыток последнего при нагревании теряет воду и переходит в черный оксид меди (II), что затемняет основную реакцию и является недостатком метода: $\text{Cu}(\text{OH})_2 \rightarrow \text{CuO} + \text{H}_2\text{O}$.

Реакция с жидкостью Фелинга

Реакция с жидкостью Фелинга основана на том же принципе, что и реакция Троммера. Стличие заключается в том, что в реакции используется не свободный гидроксид меди (II). Последний находится в связанном состоянии и входит в состав реактива Фелинга. Жидкость Фелинга представляет собой натрий-, калий-тарtrat — комплексное соединение меди, окрашенное в синий цвет. В его составе ион меди в степени окисления «+2» находится в виде комплексного соединения с тартратами. Поэтому даже при избытке данного реактива при нагревании осадок CuO черного цвета не образуется и не затемняет реакцию при малых количествах глюкозы.

Приборы. Штатив с пробирками.

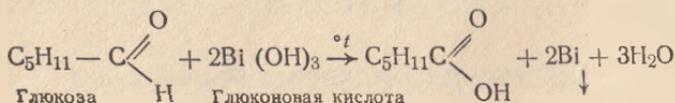
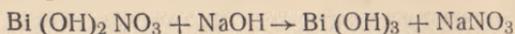
Реактивы. Глюкоза, 1%-ный раствор. Реактив Фелинга (приготовление: раствор 1. 34,65 г невыветренных кристаллов медного купороса ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) растворяют в колбе на 500 мл сначала в небольшом количестве дистиллированной воды, а после растворения кристаллов доводят до метки. Раствор 2. 173 г сегнетовой соли (калий-натрий-тарtrat) растворяют в колбе на 500 мл в небольшом количестве дистиллированной воды, прибавляют 62,5 г гидроксида натрия, растворенного в 100 мл дистиллированной воды, хорошо перемешивают и доводят до метки. Перед употреблением растворы 1 и 2 смешивают в равных объемах).

Ход работы. К 1—2 мл раствора глюкозы прибавляют равный объем реактива Фелинга и перемешивают. Верхний слой жидкости нагревают до кипения. Появляется, как и в реакции Троммера, желтый осадок гидроксида меди (I) — CuOH или же красный осадок оксида меди (I) — Cu_2O .

Реакция с солями висмута

Для обнаружения редуцирующих сахаров часто применяют соли висмута. В состав реактива Ниландера, аналогичного реактиву Фелинга, входит дважды основной азотнокислый висмут, который в присутствии гидроксида натрия образует гидроксид висмута. Последний находится в связанном состоянии с калий-натрий-тарtratом.

При взаимодействии с глюкозой гидроксид висмута восстанавливается до металлического висмута, окрашивая жидкость в черный цвет.



Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. Глюкоза, 1%-ный раствор. Реактив Ниландера (приготовление: 2 г дважды основного азотнокислого висмута и 4 г калий-, натрий-тартрата (сегнетовая соль), растворяют в 100 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия и кипятят, пока растворится большая часть соли висмута. Охлаждают и отфильтровывают от выпавшего осадка).

Ход работы. К 2 мл раствора глюкозы прибавляют 1 мл реактива Ниландера и кипятят 2—3 мин. Жидкость темнеет в связи с образованием черного осадка металлического висмута.

Реакция с фенилгидразином

Важная особенность моносахаридов — способность их вступать в реакцию с фенилгидразином и образовывать фенилгидразоны и озоны. Реакция образования озонов протекает в три стадии. При взаимодействии моносахаридов с фенилгидразином на первой стадии образуются растворимые в воде фенилгидразоны (реакция замещения). Во второй стадии на образовавшийся фенилгидразон действует вторая молекула фенилгидразина и, окисляя его, переводит спиртовую группу в карбонильную. Третья молекула фенилгидразина вступает в реакцию замещения с вновь образовавшейся карбонильной группой, и образуются трудно растворимые в воде соединения — озоны, дающие характерные по форме кристаллы желтого цвета. Форма кристаллов озонов различна и зависит от структуры моносахаридов, из которых они образуются.

Озоны различных моносахаридов отличаются по форме кристаллов, температуре плавления, растворимости и оптической деятельности, а поэтому эти свойства используют для выделения моносахаридов из раствора, а также для того, чтобы отличить одни сахара от других (рис. 10).

Приборы. Штатив с пробирками. Водяная баня. стакан со льдом. Предметные и покровные стекла. Пипетка. Микроскоп.

Реактивы. Глюкоза, 1%-ный раствор. Смесь кристаллического солянокислого фенилгидразина и безводного ацетата натрия (2:3).

Ход работы. В пробирку наливают 1—2 мл раствора глюкозы, добавляют 0,5 г смеси солянокислого фенилгидразина и ацетата натрия, перемешивают и прогрева-ют в течение 5 мин на кипящей водяной бане. Затем про-



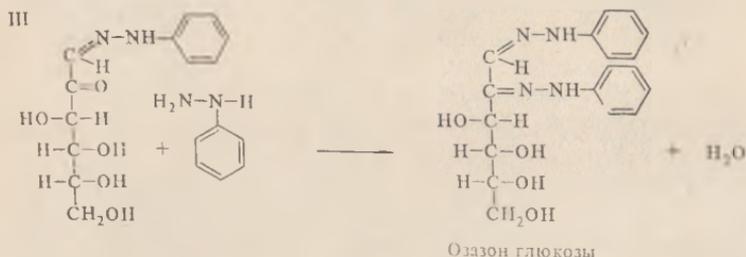
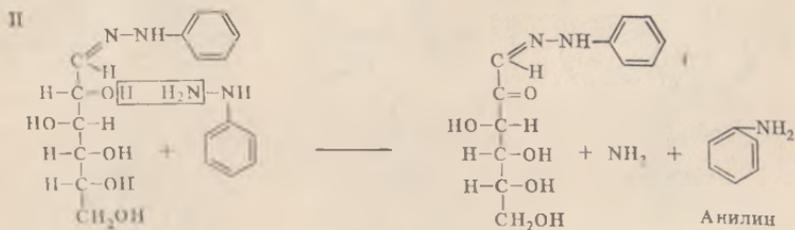
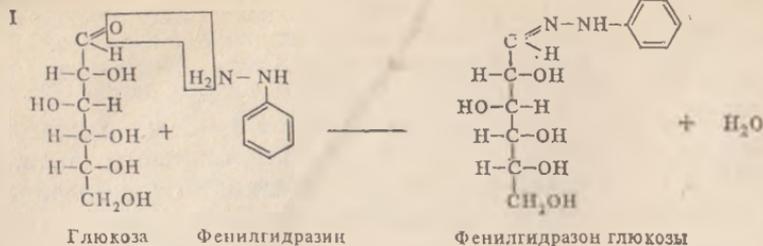
Рис. 10. Кристаллы озазонов моно- и дисахаридов:

верхний ряд — глюкоза, галактоза, арабиноза; нижний ряд — лактоза, мальтоза, ксилоза

бирку помещают в стакан со льдом. При медленном охлаждении из раствора выпадают кристаллы озазона. Выделившиеся кристаллы озазона рассматривают под микроскопом. При образовании глюкозоозазона под микроскопом наблюдают характерные тонкие пучки и снопы, образующиеся из тонких кристаллов озазона, а также отдельные кристаллы в виде тонких иголок. Точка плавления их 208°C . Если жидкость очень концентрированная, она приобретает интенсивно красную окраску, и кристаллы выделяются только после разбавления дистиллированной водой.

Кетогексозы

Кетогексозы — это моносахариды, содержащие в своем составе кетонную группу (кетоспирты). Типичным представителем кетогексоз является фруктоза. Так же,



как и глюкоза, фруктоза содержится в растворе в виде ациклической кетонной и циклической полуацетальной формах. В животном организме фруктоза встречается в виде фосфорных эфиров — промежуточных продуктов окисления углеводов в тканях — фруктозо-6-фосфата и фруктозо-1,6-дифосфата. В свободном состоянии фруктоза содержится во фруктах и меде. Она входит в состав дисахарида сахарозы (свекловичный или тростниковый сахар).

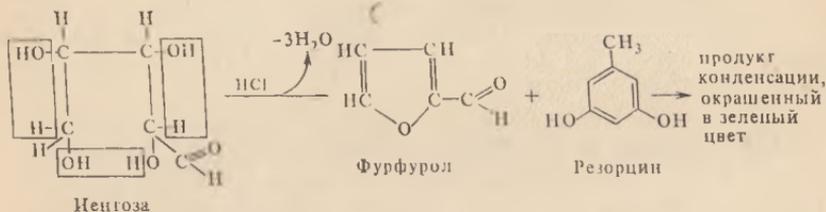
Под влиянием дрожжей фруктоза бродит, но медленнее глюкозы. С фенилгидразином образует озозон, идентичный с кристаллами глюкозоозона.

весине, отрубях, а также растительных камедей. Пентозы (арабиноза, ксилоза, рибоза) в значительном количестве (10—25%) содержатся в древесине, соломе. В животном организме рибоза и 2-дезоксирибоза входят в состав свободных мононуклеотидов, нуклеозидтрифосфатов (АТФ, ГТФ, ЦТФ, УТФ, ТТФ) и нуклеиновых кислот.

Пентозы — вещества кристаллические, сладкого вкуса, дают, как и гексозы, реакции восстановления металлов, образуют озаоны. Однако некоторые виды микроорганизмов, например пивные и винные дрожжи, легко сбраживающие гексозы, не сбраживают пентозы.

Реакция на пентозы с орцином

Под влиянием концентрированной соляной кислоты при нагревании пентозы, дегидратируясь, превращаются в фурфурол. Последний конденсируется с орцином (метил-диоксибензол) в присутствии следов хлорида железа (III) и образует соединение, дающее зеленую окраску:



Приборы. Штатив с пробирками.

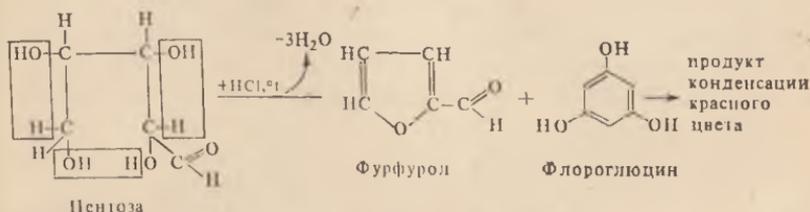
Реактивы Пентоза (арабиноза или ксилоза), 1%-ный раствор. Орциновый реактив, который готовят путем растворения 0,2 г орцина в 100 мл 30%-ного раствора соляной кислоты и добавления 0,1 г хлорида железа (III).

Ход работы. В пробирку наливают 1 мл раствора пентозы, равный объем орцинового реактива. Смесь нагревают на кипящей водяной бане в течение 20 мин. Появляется зеленое окрашивание раствора.

Зеленое окрашивание дают также уроновые кислоты, но после более продолжительного нагревания.

Реакция с флороглюцином

При нагревании с HCl пентозы превращаются в фурфурол, который, конденсируясь с флороглюцином (триоксибензолом), дает вишнево-красное окрашивание:



Приборы. Штатив с пробирками. Пипетка. Шпатель. Водяная баня.

Реактивы. Пентоза (арабиноза или ксилоза), 1-%ный раствор. Соляная кислота, концентрированная, Флороглюцин, кристаллический.

Ход работы. В пробирку наливают 1—2 мл раствора пентозы или немного древесных опилок, прибавляют равный объем концентрированной соляной кислоты и несколько кристаллов флороглюцина. Пробирку ставят в горячую водяную баню. При нагревании возникает красное окрашивание.

Реакция на дезоксирибозу

2-Дезоксипентозы, в частности дезоксирибоза, при нагревании с кислотой в мягких условиях образуют фурфуроловый спирт, оксилевулиновый альдегид и родственные им хромогены, которые конденсируются с ароматическими аминами и образуют соединения, окрашенные в синий цвет.

Приборы. Штатив с пробирками. Водяная баня. Пипетки.

Реактивы. Дезоксирибоза, 1%-ный раствор. Раствор дифениламина (приготовление: 1 г дифениламина, дважды перекристаллизованного из 70%-ного спирта или петролейного эфира, растворяют в смеси 2,75 мл концентрированной серной кислоты и 100 мл ледяной уксусной кислоты).

Ход работы. В пробирку наливают 1 мл раствора дезоксирибозы, приливают 2 мл раствора дифениламина. Содержимое пробирки кипятят на водяной бане в течение 10 мин. Развивается синяя окраска, устойчивая в течение нескольких часов.

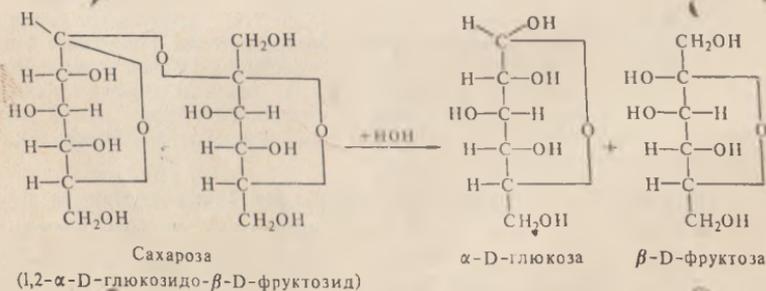
ДИСАХАРИДЫ

Дисахариды — это сложные углеводы, молекула которых при гидролизе распадается на два моносахарида. Дисахариды имеют общую формулу $C_{12}H_{22}O_{11}$. Они построены по типу глюкозидов: их молекула представляет собой производное циклической формы моносахаридов, у которого атом водорода в полуацетальном гидроксиле замещен остатком другой молекулы моносахарида. Одна молекула моносахарида всегда участвует в построении дисахариды своим полуацетальным гидроксилем. Другая молекула моносахарида может участвовать в реакции двойным образом: или своим полуацетальным гидроксилем, или каким-либо спиртовым гидроксилем. В первом случае обе молекулы моносахарида тратят на образование глюкозидной связи свои полуацетальные гидроксилы, у них альдегидная группа образоваться не может. Такой дисахарид не будет обладать восстанавливающими свойствами. Невосстанавливающие дисахариды — сахароза и трегалоза.

Во втором случае при образовании дисахариды вторая молекула моносахарида сохраняет свой полуацетальный гидроксил. У таких дисахаридов имеется альдегидная форма, а поэтому они обладают восстанавливающими свойствами (лактоза, мальтоза и целлобиоза).

✓ Реакция на сахарозу

Сахароза — восстанавливающий дисахарид, при гидролизе (кислотном или ферментативном) ее молекула распадается на глюкозу и фруктозу:



Сахароза с сульфатом кобальта в щелочной среде дает комплекс, окрашенный в фиолетовый цвет.

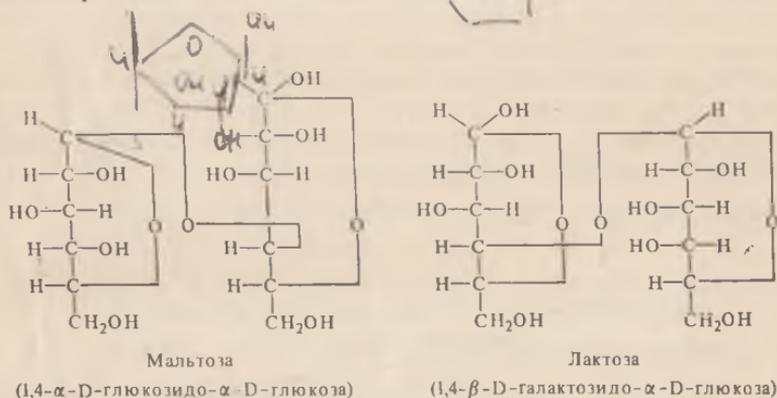
Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. Сахароза, 1%-ный раствор. Сульфат кобальта, 2%-ный раствор. Гидроксид натрия, 10%-ный раствор.

Ход работы. В пробирку наливают 2—3 мл раствора сахарозы, приливают несколько капель раствора сульфата кобальта. При приливании избытка раствора щелочи (1 мл) жидкость окрашивается в фиолетовый цвет.

Реакции на мальтозу и лактозу 2

Мальтоза и лактоза являются восстанавливающими дисахаридами:



Реакции восстановления металлов 3

Положительный характер реакции с гидроксидом меди (II), с жидкостью Фелинга, солями висмута (ход работы см. с. 74—76) объясняется наличием в молекулах мальтозы и лактозы свободной альдегидной группы. Реакции восстановления металлов у дисахаридов протекают несколько медленнее, чем с моносахаридами.

Реактивы. Мальтоза, 1%-ный раствор. Лактоза, 1%-ный раствор. Остальное то же, что для моносахаридов.

Реакция с фенилгидразином

Лактоза образует с фенилгидразином озазоны, кристаллы которых имеют форму игл, образующих сферические скопления (см. рис. 10).

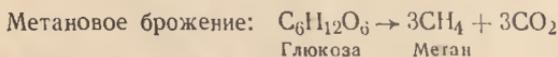
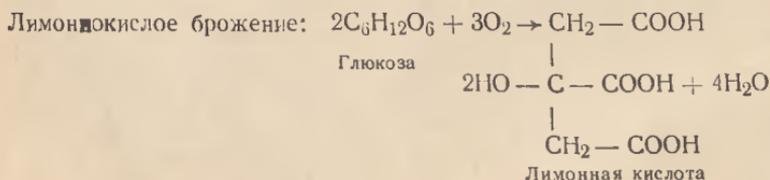
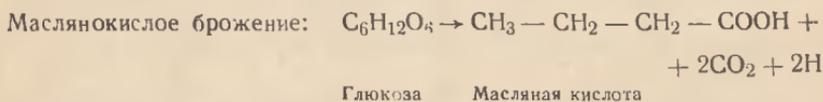
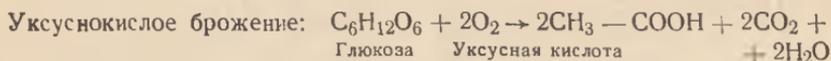
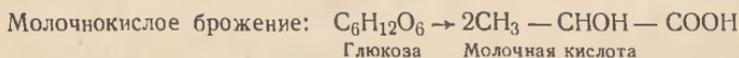
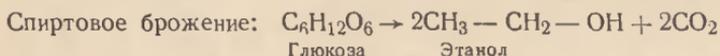
Мальтоза также дает характерные озазоны (см. рис. 10), которые имеют форму пластинок, образующих розетки.

Кристаллы озазонов мальтозы и лактозы растворяются в горячем растворе и выпадают только при охлаждении.

Реактивы и ход работы см. на с. 76—77.

Реакции брожения углеводов

Брожение — сложный процесс расщепления углеводов под влиянием ферментов, выделяемых различными микроорганизмами, в большинстве случаев сопровождающийся выделением газообразных продуктов (CO_2 , H_2 и др.) и приводящий в конечном итоге к образованию таких веществ, как этиловый спирт, молочная кислота и т. д. В зависимости от вида микроорганизмов и конечных продуктов различают несколько видов брожения:



Спиртовое брожение используется в промышленности с целью получения этилового спирта, молочнокислое брожение — в пищевой промышленности для получения разнообразных молочнокислых продуктов и в животноводстве при силосовании кормов.

Уксуснокислое, пропионовокислое, маслянокислое, молочнокислое брожения имеют место в преджелудках жвачных. Метановое брожение вызывает тимпанию (вздутие) у животных с многокамерным желудком.

Спиртовому брожению подвергаются только гексозы в отличие от других моносахаридов, например пентоз. Этим пользуются для отличия гексоз от пентоз. Мальтоза и сахароза легко сбраживаются дрожжами, а лактоза ими не сбраживается. В дрожжах есть ферменты — мальтаза и сахараза, но нет фермента лактазы. Лактоза под влиянием бактерий, расщепляющих ее, может давать спиртовое, молочно- и маслянокислое брожения.

Трудами многих ученых (Л. А. Иванов, А. В. Палладин и др.) было установлено, что между процессами брожения и обменом углеводов в тканях высших животных существует много общего. В частности, оказалось, что соли фосфорной кислоты (фосфаты) оказывают стимулирующее действие на процессы брожения, а также на образование гексозофосфорных эфиров при гликолизе и гликогенолизе в тканях.

Использование неорганического фосфата в процессе брожения

Приборы. Штатив с пробирками. Пипетки. Фарфоровая ступка с пестиком. Термостат (или водяная баня с термометром). Воронки, фильтры. Мерные пробирки на 10 мл.

Реактивы. Дрожжи. Сахароза, кристаллическая. Дистиллированная вода. Смесь фосфорнокислых солей (приготовление: в мерной колбе на 1 л растворяют 60 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 20 г KH_2PO_4). Трихлоруксусная кислота (ТХУ), 5%-ный раствор. Молибдат аммония, 2,5%-ный раствор в 5 н. растворе серной кислоты (приготовление см. на с. 118). Аскорбиновая кислота, 0,4%-ный раствор. Гидроксид натрия, 10%-ный раствор. Раствор иода в иодиде калия.

Ход работы. 1 г дрожжей растирают в ступке с 1 г сахарозы, добавляют 5 мл дистиллированной воды и 5 мл раствора фосфатов, тщательно перемешивают. 1 мл полученной взвеси переносят пипеткой в пробирку и добавляют 3 мл раствора трихлоруксусной кислоты для инактивации ферментов брожения. Это контрольная проба,

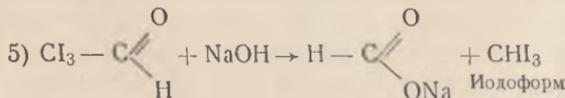
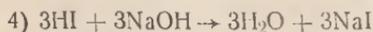
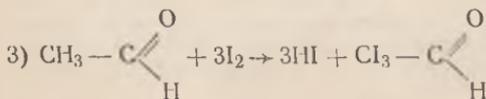
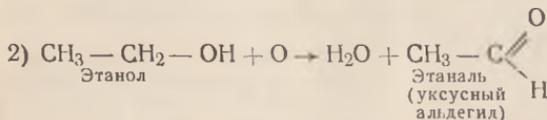
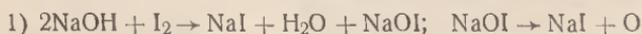
показывающая исходное количество неорганического фосфата в начале брожения.

Остальную взвесь переносят в пробирку, помещают в термостат (или водяную баню) при 37° С и отмечают время. Контрольная проба также помещается в термостат.

Через 30 мин, а затем еще через 30 мин отбирают по 1 мл взвеси и каждую пробу осаждают добавлением 3 мл раствора ТХУ. Все три пробы отфильтровывают через складчатый фильтр, предварительно смоченный дистиллированной водой, в мерные пробирки и добавляют по 3 мл дистиллированной воды.

Затем в каждую пробирку добавляют по 1 мл раствора молибдата аммония, по 1 мл раствора аскорбиновой кислоты, доводят водой до метки, перемешивают и оставляют стоять 15 мин. Пробы окрашиваются в синий цвет. Интенсивность окраски тем слабее, чем позже была взята проба, что указывает на уменьшение концентрации неорганического фосфата по мере развития процесса брожения. Концентрация фосфата может быть определена количественно методом колориметрии.

Чтобы установить присутствие спирта, к 3 мл подогретого фильтрата, полученного из инкубируемой взвеси, прибавляют 3 капли раствора иода в иодиде калия и по каплям до обесцвечивания раствор гидроксида натрия. В зависимости от количества образовавшегося спирта тотчас или спустя некоторое время жидкость мутнеет, и проявляется запах иодоформа. Химизм процесса следующий:



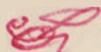
ПОЛИСАХАРИДЫ

Это высокомолекулярные сложные углеводы, которые при гидролизе расщепляются на большое число остатков моносахаридов. Каждый остаток моносахарида связан с соседними остатками гликозидными связями. Поэтому полисахариды можно рассматривать как полигликозиды. Полигликозидные цепи, образующие молекулы полисахаридов, могут быть неразветвленными (клетчатка) и разветвленными (гликоген). Остатки моносахаридов, входящие в состав молекулы полисахарида, могут быть одинаковыми (гомополисахариды) или разными (гетерополисахариды). Типичные гомополисахариды — клетчатка, крахмал, гликоген.

Крахмал

Это конечный продукт фотохимического синтеза, идущего в зеленых листьях, запасной полисахарид. Для животного организма крахмал является важным пищевым веществом.

Крахмал — неоднородное вещество. Он состоит из двух фракций: амилозы (10—20%) и амилопектина (80—90%). Амилоза включает 1000—6000 остатков α -D-глюкозы, соединенных 1-4-гликозидными связями. Она имеет вытянутую линейную неветвящуюся форму молекулы, растворима в воде. Амилопектин также построен из большого числа остатков α -D-глюкозы, соединенных, как и в амилозе, 1-4-гликозидными связями. Однако цепи амилопектина сильно разветвлены, и в точках ветвлений имеются 1-6-гликозидные связи. Амилопектин в воде набухает и дает клейстер.



Цветные реакции на крахмал

Характерная реакция на крахмал — появление синего окрашивания от раствора иода в иодиде калия. Иодная реакция полисахаридов, в частности крахмала, — сложный процесс. Возникающая окраска зависит от строения полисахарида. В ходе реакции образуется комплексное соединение полисахарида с иодом. Этот процесс отчетливо выражен у амилозы. Для полисахаридов с разветвленными цепями, например амилопектина и гликогена, наряду с процессом образования комплексного соединения

большое значение имеет и процесс адсорбции иода на поверхности ветвистых молекул. Показана связь между длиной боковых цепей и окраской иодной реакции (Б. Н. Степаненко).

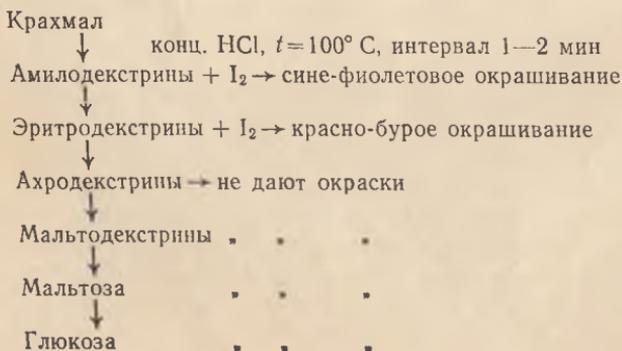
Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. Крахмал, 1%-ный раствор. Раствор Люголя (приготовление: в 100 мл воды растворяют 20 г иодида калия и 10 г иода. Для реакции с крахмалом полученный раствор разводят дистиллированной водой 1 : 5). Гидроксид натрия, 10%-ный раствор. Этиловый спирт.

Ход работы. В пробирку наливают 2—3 мл раствора крахмала, приливают 1 каплю раствора Люголя. Жидкость окрашивается в синий цвет. Содержимое пробирки делят на три части: к первой части прибавляют 1—2 мл раствора гидроксида натрия, ко второй — 2—3 мл этилового спирта, третью часть нагревают. Во всех случаях окраска исчезает. В третьей пробе окраска вновь появляется при охлаждении, что свидетельствует о том, что пробу с иодом необходимо проводить только с холодным раствором крахмала. Благодаря непрочности адсорбционного комплекса иода с крахмалом эта реакция чувствительна к присутствию спирта, к нагреванию и действию едких щелочей, с которыми иод образует гипоиодиты.

Кислотный ступенчатый гидролиз крахмала

При нагревании крахмала с концентрированной соляной кислотой он расщепляется с образованием «обломков» разной величины декстринов. Они различаются между собой молекулярной массой и характером окраски при действии на них раствора иода. Ниже дана схема кислотного гидролиза крахмала:



Приборы. Штатив с пробирками. Пипетка.

Реактивы. Крахмал, 1%-ный раствор. Соляная кислота, концентрированная. Раствор Люголя (приготовление см. на с. 88). Лакмусовая бумага. Гидроксид натрия, 10%-ный раствор. Реактив Фелинга (приготовление см. на с. 75).

Ход работы. В пробирку наливают 3—5 мл раствора крахмала и несколько капель концентрированной соляной кислоты. Тщательно перемешивают и кипятят на открытом огне. Через 1—2 мин после начала кипения берут пробу для реакции с иодом. Для этого несколько капель раствора берут пипеткой и выливают в пробирку, в которую налито 5—6 мл дистиллированной воды, затем приливают 1—2 капли раствора Люголя. Появившееся синевато-фиолетовое окрашивание указывает на наличие в растворе амилодекстринов. Пробирку с раствором крахмала кипятят еще 1—2 мин и снова проводят такую же пробу с иодом; появляется красно-бурое окрашивание от присутствия эритродекстринов. Снова кипятят и через 2—3 мин повторяют пробы с иодом. Крахмал через ахродекстрины, мальтодекстрины и мальтозу расщепляется до глюкозы. Реакция с иодом будет отрицательная — жидкость окрашивается в желтый цвет за счет окраски раствора Люголя.

Гидролизат крахмала нейтрализуют по лакмусовой бумаге раствором гидроксида натрия, прибавляют реактив Фелинга и нагревают. Выпадет желтый осадок гидроксида меди (I) или же красный — оксида меди (I), что указывает на присутствие в растворе продуктов гидролиза, обладающих восстанавливающими свойствами.



Ферментативный гидролиз крахмала

Под влиянием фермента амилазы крахмал расщепляется с образованием дисахарида — мальтозы, а затем мальтаза расщепляет ее до глюкозы.

Приборы. Штатив с пробирками. Пипетки. Водяная баня с термометром.

Реактивы. Препарат слюны (1—2 мл слюны собирают в стакан и разводят дистиллированной водой в 5 раз, хорошо перемешивают). Остальные реактивы те же, что и в предыдущем опыте.

Ход работы. В пробирку наливают 3—5 мл раствора крахмала и добавляют 0,5—1 мл слюны, хорошо перемешивают и ставят в водяную баню на 10—15 мин при 37—40° С, повторяют пробы с иодом; отсутствие характерной

окраски свидетельствует о завершении гидролиза. Наличие глюкозы подтверждают положительной реакцией Фелинга.

Гликоген

Гликоген служит основной запасной формой углеводов в животном организме. Он откладывается почти во всех органах и тканях. Главное депо гликогена — печень (2—5%) и мышцы (0,5—2%), в которых сосредоточено до 60% его содержания в организме.

Гликоген представляет собой полимер α -D-глюкозы, в котором глюкозные остатки соединены между собой 1-4- и 1-6-гликозидными связями, и по химическому строению сходен с амилопектином. Как и крахмал, гликоген при гидролизе дает ряд промежуточных продуктов — декстринов, затем дисахарид мальтозу и, наконец, моносахарид глюкозу. От прибавления иода раствор гликогена окрашивается в красно-бурый цвет различной интенсивности и оттенков, что зависит от структуры гликогена, которая неодинакова у разных видов животных и определяется степенью ветвления макромолекулы.

Реакция гликогена с иодом

Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. Гликоген, 1%-ный раствор. Раствор Люголя (приготовление см. на с. 88). Хлорид натрия, кристаллический. Гидроксид натрия, 10%-ный раствор.

Ход работы. В пробирку наливают 2—3 мл раствора гликогена, добавляют 1—2 капли раствора Люголя, перемешивают, появляется красно-бурое окрашивание. Окраска усиливается при добавлении нескольких кристалликов хлорида натрия, но исчезает при добавлении раствора гидроксида натрия или нагревании.

Обнаружение гликогена в животных тканях

Приборы. Штатив с центрифужными и обычными пробирками. Пипетки. Стеклянные палочки. Стакан со льдом. Центрифуга. Водяная баня.

Реактивы. Гидроксид калия, 15%-ный и 60%-ный растворы. Навеска печени 1,5—2 г. Этанол. Соляная кислота, 2,5%-ный раствор. Гидроксид натрия, 10%-ный раствор. Фелингова жидкость (приготовление см. на с. 75).

Ход работы. В центрифужную пробирку помещают 1,5—2 г печени, заливают 2 мл 60%-ного раствора гидроксида калия. Пробирку ставят на 1 ч в кипящую водяную баню, содержимое пробирки часто перемешивают стеклянной палочкой. Затем пробирку вынимают из бани, охлаждают и добавляют в нее 8—10 мл этанола. Пробирку помещают в стакан со льдом на 20—30 мин. Выпадает осадок гликогена. Его отделяют центрифугированием в течение 5—10 мин при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость сливают, а осадок растворяют в 2 мл 15%-ного раствора гидроксида калия, добавляют 8—10 мл этанола и охлаждают полученную смесь. Выпавший осадок гликогена отделяют центрифугированием. Затем осадок гликогена гидролизуют и доказывают наличие в его составе глюкозы. Для этого к осадку добавляют 3—4 мл раствора соляной кислоты и кипятят 15—20 мин на водяной бане. Далее содержимое охлаждают, нейтрализуют раствором гидроксида натрия, добавляют равный объем фелинговой жидкости и кипятят. Образуется красный осадок оксида меди (I).

Клетчатка, или целлюлоза

Это основной структурный полисахарид растений. В листьях содержится 15—30% клетчатки, в древесине — 50—70%, а волокно хлопка — почти чистая клетчатка.

Молекула клетчатки построена из остатков β -D-глюкозы, соединенных 1-4- β -гликозидными связями. При полном гидролизе клетчатки образуется глюкоза, при неполном — дисахарид целлобиоза. От крахмала и гликогена клетчатка отличается тем, что не дает окрашивания с иодом, значительно труднее гидролизуется в кислых растворах и не гидролизуется под действием амилаз. Ферменты, которые расщепляют крахмал и гликоген, на клетчатку не действуют, поэтому клетчатка кормов у плотоядных практически не усваивается. У травоядных животных происходит частичное расщепление клетчатки в пищеварительном тракте при помощи ферментов микроорганизмов, населяющих преджелудки у жвачных, слепую кишку у лошадей, кроликов и свиней.

Гидролиз клетчатки

Клетчатка нерастворима в воде и в подавляющем большинстве агентов. Устойчивость клетчатки к действию растворителей объясняется тем, что ее длинные нитевидные молекулы, взаимодействуя друг с другом, образуют прочные мицеллы. Последние в свою очередь собраны в фибриллы, располагающиеся вдоль оси волокна. Отрыв индивидуальных молекул клетчатки от этих устойчивых агрегатов затруднен, и только немногие вещества, способные нарушать межмолекулярные связи в мицеллах, растворяют клетчатку.

Приборы. Штатив с пробирками. Лакмусовая бумага.

Реактивы. Вата. Серная кислота, 72%-ный раствор. Гидроксид натрия, 40%-ный раствор. Сульфат меди, 1%-ный раствор.

Ход работы. В пробирку берут кусочек ваты, заливают его раствором серной кислоты (3 : 1). После полного растворения (примерно через 15—20 мин) раствор осторожно разводят водой раз в 10—15 и кипятят. После окончания гидролиза раствор нейтрализуют крепким раствором щелочи до явно выраженной щелочной реакции (по лакмусовой бумаге) и по каплям добавляют раствор сульфата меди. При нагревании получается желтый осадок гидроксида меди (I) или красный осадок оксида меди (I), что доказывает наличие редуцирующих углеводов, в частности глюкозы.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ УГЛЕВОДОВ И ИХ МЕТАБОЛИТОВ.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ ПО МЕТОДУ ХАГЕДОРНА — ИЕНСЕНА

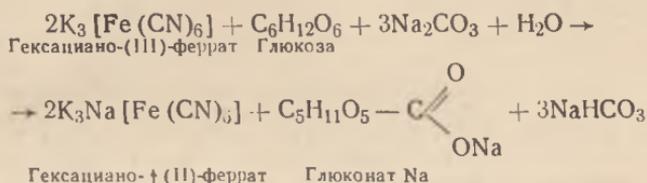
Глюкоза — постоянная составная часть крови. У человека нормальное содержание глюкозы в крови колеблется от 80 до 120 мг%. Концентрация глюкозы в крови у различных сельскохозяйственных животных составляет, мг%:

Лошади	90—100	Свиньи	80—100
Коровы	60—80	Кролики	100—200
Овцы и козы	40—65	Птицы	130—260

Микрометод Хагедорна — Иенсена был предложен для количественного определения глюкозы в крови. Однако он не специфичен и может быть использован также для

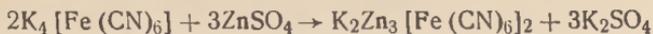
определения других моносахаридов (и некоторых дисахаридов), хотя в этом случае вводятся некоторые поправки при расчетах.

Этот метод основан на восстановлении глюкозой гексациано-(III)-феррата (красной кровяной соли — $K_3[Fe(CN)_6]$) до гексациано-(II)-феррата (желтой кровяной соли — $K_4[Fe(CN)_6]$) при нагревании в щелочной среде с безбелковым фильтратом крови. Гексациано-(III)-феррат берется в избытке, и остаток его определяют иодометрически. Химизм реакции можно представить так:

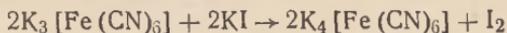


Глюкоза крови, окисляясь до глюконовой кислоты, восстанавливает железо: $Fe^{+3} \xrightarrow{+e} Fe^{+2}$.

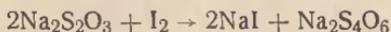
Но реакция эта обратима, и для того, чтобы она шла до конца, ее ведут в присутствии сульфата цинка, благодаря которому образующийся гексациано-(II)-феррат калия $K_4Fe(CN)_6$ выходит из круга реакции, выпадая в осадок в виде цинкового соединения:



Остаток гексациано-(III)-феррата калия определяют иодометрически в кислой среде:



Освободившийся иод оттитровывают тиосульфатом:



Если глюкозы в крови много, то неиспользованного $K_3[Fe(CN)_6]$ остается мало и, следовательно, мало выделяется свободного иода. Соответственно мало тиосульфата идет и на титрование этого иода. Следовательно, между количеством глюкозы и количеством тиосульфата, израсходованного на титрование, существует обратная зависимость.

Количество глюкозы в крови определяют по результатам титрования при помощи специальной таблицы по количеству использованного на титрование тиосульфата (табл. 6).

Приборы. Штатив с пробирками обычными и широкими (сахарными). Микропипетки на 0,1 мл, сухие. Водяная баня. Воронка диаметром 3—4 см. Пипетки на 1, 2, 3 и 5 мл. Микробюретки на 2 мл. Вата, прокипяченная в дистиллированной воде, отжатая и затем высушенная (для фильтрования жидкости).

Реактивы. Для осаждения белков. Сульфат цинка, 0,45%-ный раствор. Гидроксид натрия, 0,1 н. раствор. Их готовят перед опытом из основных растворов. Смесь этих двух реактивов служит для осаждения белков. Оксалат натрия, 5%-ный раствор (для промывания микропипетки).

Для определения глюкозы. Гексациано-(III)-феррат, раствор (приготовление: 1,65 г перекристаллизованного $K_3[Fe(CN)_6]$ и 10,6 г безводного карбоната натрия растворяют в мерной колбе на 1 л и доводят водой до метки. Раствор хранят в темной посуде на холоде, титр его не изменяется в течение двух месяцев). Тройной хлорцинк-иодистый раствор (приготовление: 10 г сульфата цинка, 50 г хлорида натрия и 5 г иодида калия растворяют в мерной колбе на 200 мл). Иодид калия лучше прибавлять к нужному количеству реактива непосредственно перед опытом (из расчета 2,5%). Уксусная кислота, 3%-ный раствор (приготовление: 3 мл ледяной уксусной кислоты отмеривают в колбу на 100 мл и доводят дистиллированной водой до метки. Готовится каждый раз свежим). Тиосульфат натрия, 0,005 н. раствор (приготовление: 0,3566 г тиосульфата натрия (точно!) растворяют в мерной колбе и доводят водой до метки 2 л. Титр этого раствора устанавливают по титрованному раствору иодата калия — KIO_3 . Раствор тиосульфата натрия и раствор гексациано-(III)-феррата калия должны соответствовать друг другу — при титровании на 1 мл раствора гексациано-(III)-феррата калия должен идти 1 мл раствора тиосульфата натрия). Крахмал, 1%-ный раствор в насыщенном растворе хлорида натрия.

Ход работы. Первый этап — удаление белков. Белки крови осаждаются гидроксидом цинка и кипячением. Для этого предварительно готовят гидроксид цинка. В четыре пронумерованные пробирки наливают по 5 мл раствора сульфата цинка и по 1 мл раствора гидроксида натрия. При этом образуется белый студенистый осадок гидроксида цинка. Затем в две пробирки с помощью микропипетки, предварительно сполоснутой раствором оксалата натрия, вносят по 0,1 мл крови. Кончик микропипетки после взятия крови тщательно вытирают фильтровальной бумагой и кровь выдувают непосредственно в раствор гидроксида цинка. Пипетку двукратно промывают этим раствором, набирая и выпуская обратно в пробирку. Эти две пробирки (параллельные) — опытные пробы, две другие — контрольные (реактивы без крови) — служат для определения редуцирующих свойств реактивов. Все пробирки ставят на 3 мин в кипящую водяную баню. Белки осаждаются в виде серых сгустков, а жидкость становится бесцветной и прозрачной. Содержимое пробирок

фильтруют через заранее промытую горячей водой вату в широкие пробирки. Осадок дважды промывают водой по 3 мл. Промывные воды фильтруют через ту же вату.

Второй этап — определение глюкозы. К безбелковому фильтрату крови и контрольным пробам прибавляют по 2 мл (точно!) щелочного раствора гексациано-(III)-феррата калия. Все пробирки ставят на 15 мин в кипящую водяную баню. Затем пробы охлаждают и в каждую из них прибавляют по 3 мл тройного хлор-цинк-йодистого раствора и по 2 мл раствора уксусной кислоты. Жидкость желтеет от выделившегося йода. В пробы прибавляют по 2 капли крахмала и титруют из микробюретки раствором тиосульфата натрия до исчезновения синей окраски.

Расчет. Содержание глюкозы в крови вычисляют по приводимой ниже табл. 6, составленной исходя из условий применения для титрования точно 0,005 н. раствора тиосульфата натрия. В первой вертикальной колонке указаны целые и десятые доли миллилитров раствора тиосульфата натрия, а в верхней горизонтальной — сотые доли миллилитров. Пересечение вертикальной и гори-

Таблица 6. Данные для вычисления количества глюкозы в крови по Хагедорну — Иенсену

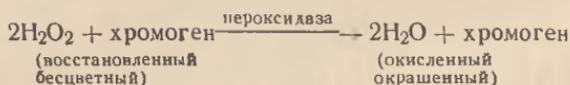
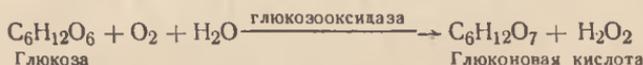
Тиосульфат натрия, мл	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
0,0	385	382	379	376	373	370	367	364	361	358
0,1	355	352	350	348	345	343	341	338	336	333
0,2	331	329	327	325	323	321	318	316	314	312
0,3	310	308	306	304	302	300	298	296	294	292
0,4	290	288	286	284	282	280	278	276	274	272
0,5	270	268	266	264	262	260	259	257	255	253
0,6	251	249	247	245	243	241	240	238	236	234
0,7	232	230	228	226	224	222	221	219	217	215
0,8	213	211	209	208	206	204	202	200	199	197
0,9	195	193	191	190	188	186	184	182	181	179
1,0	177	175	173	172	170	168	166	164	163	161
1,1	159	157	155	154	152	150	148	146	145	143
1,2	141	139	138	136	134	132	131	129	127	125
1,3	124	122	120	119	117	115	113	111	110	108
1,4	106	104	102	101	099	097	095	093	092	090
1,5	088	086	084	083	081	079	077	075	074	072
1,6	070	068	066	065	063	061	059	057	056	054
1,7	052	050	048	047	045	043	041	039	038	036
1,8	034	032	031	029	027	025	024	022	020	019
1,9	017	015	014	012	010	008	007	005	003	002

горизонтальной линией дает количество глюкозы в миллиграммах на 100 мл крови (мг%).

Например, на титрование первой опытной пробы пошло 1,30 мл раствора тиосульфата натрия, второй пробы — 1,34 мл, а в среднем — 1,32 мл. В первой вертикальной колонке находят 1,3, а в первом горизонтальном ряду 0,02. На месте пересечения вертикальной и горизонтальной линий, идущих от этих цифр, стоит 120. Из этой величины вычитают то количество миллиграммов «глюкозы» (редуцирующих веществ), которое соответствует контрольной пробе. Например, при титровании контрольных проб в среднем пошло 1,86 мл тиосульфата натрия, что по таблице соответствует значению 0,24. Эту величину вычитают из 120 и получают 095, т. е. 95 мг% глюкозы в крови.

Определение количества глюкозы оксидазным методом

Ферментативный метод определения количества глюкозы имеет ряд преимуществ перед другими методами. Он позволяет определять содержание глюкозы в биологических жидкостях после удаления белков в присутствии других сахаров и редуцирующих веществ неуглеводной природы. Метод основан на том, что глюкоза в присутствии кислорода воздуха в водной среде и участии фермента глюкозооксидазы окисляется до глюконовой кислоты. Образующаяся в процессе реакции перекись водорода разлагается пероксидазой. Выделившийся при этом атомарный кислород реагирует с хромогеном (о-толуидин), окрашивающимся при окислении. Интенсивность окраски окисленного хромогена пропорциональна концентрации глюкозы. Химизм реакций сводится к следующему:



Приборы. Штатив с обычными и центрифужными пробирками. Пипетки градуированные на 0,1; 1; 2 и 5 мл. Центрифуга. Фотоэлектроколориметр. Секундомер.

Реактивы. Хлорид натрия, 0,9%-ный раствор. Сульфат цинка, 5%-ный раствор. Гидроксид натрия, 0,3 н. раствор. о-Толуидин, 1%-ный раствор (предварительно перекристаллизованный из горячего абсолютного этилового спирта). Ацетатный буфер, 0,25 н. раствор, рН 4,8 (приготовление: 0,25 н. раствор уксусной кислоты смешивают с 0,25 н. раствором ацетата натрия в соотношении 4 : 6). Пероксидаза, 20 мг%-ный раствор кристаллического препарата в ацетатном буфере. Глюкозооксидаза (приготовление: к 80 мл ацетатного буфера добавляют 2 мг препарата глюкозооксидазы и 1 мг сухой пероксидазы. Смесь перемешивают, прибавляют 1 мл раствора о-толуидина и конечный объем доводят до 100 мл ацетатным буфером. Этот реактив готовят не позже чем за 2 ч до употребления, но в холодильнике в темной склянке он может храниться 1—1,5 месяца). Стандартные растворы глюкозы (50, 100 и 200 мкг/мл), приготовленные на насыщенном водном растворе бензойной кислоты.

Ход работы. 1. Осаждение белка исследуемой жидкостью.

В две центрифужные пробирки вносят по 0,4 мл раствора сульфата цинка, по 0,4 мл раствора гидроксида натрия и по 1,1 мл раствора хлорида натрия. Смесь взбалтывают и добавляют по 0,1 мл биологической жидкости. После перемешивания содержимое пробирок центрифугируют в течение 10—15 мин при 5000 об/мин.

2. Определение глюкозы. Из центрифужных пробирок отбирают по 1 мл надосадочной жидкости и переносят в пробирки (это опытные параллельные пробы). В две другие пробирки, служащие контролем, вместо надосадочной жидкости берут по 1 мл дистиллированной воды. В следующие 6 пробирок вносят по 1 мл стандартных растворов глюкозы (50, 100 и 200 мкг/мл и по две параллельные пробы для каждой концентрации). Затем в каждую пробирку в строгой последовательности с точным интервалом в 2 мин приливают по 3 мл рабочего реактива. Эту последовательность необходимо соблюдать при измерении оптической плотности растворов.

В ходе реакции развивается синяя окраска, интенсивность которой нарастает и достигает своего максимума при комнатной температуре через 10—15 мин после прибавления рабочего реактива. Оптическую плотность растворов измеряют с помощью фотоэлектроколориметра при красном светофильтре. На основании полученных величин экстинкции для стандартных растворов глюкозы строят стандартную кривую. Ее рекомендуют строить для каждого опыта. Количество глюкозы в пробах рассчитывают по стандартной кривой.

Количественное определение пентоз в тканях (по Мейбаум)

Метод основан на образовании окрашенного в зеленый цвет соединения в результате взаимодействия пентоз с орцином. Интенсивность окраски при этом пропорциональна количеству пентоз в растворе.

Приборы. Штатив с пробирками. Обратные воздушные холодильники для пробирок. Пипетки на 3 и 5 мл. Мерная колба на 500 мл. Водяная баня. Фотоэлектрочелюстиметр.

Реактивы. Орциновый реактив (приготовление см. на с. 80). Стандартный водный раствор рибозы или арабинозы (приготовление: 0,2 г растворяют в мерной колбе на 200 мл).

Ход работы. Накануне опыта готовят разбавленный стандартный раствор пентозы. Для этого в мерную колбу на 500 мл вносят пипеткой 5 мл исходного стандартного раствора рибозы или арабинозы и доводят водой до метки. Перемешивают. Нумеруют 5 пробирок с обратными воздушными холодильниками. В первые две пробирки пипеткой вносят по 3 мл разбавленного стандартного раствора пентозы (в этом объеме содержится 30 мкг пентозы). В пробирки 3 и 4 вносят по 3 мл исследуемых растворов (опытные пробы). В пробирку 5 наливают 3 мл дистиллированной воды (контроль). Во все пять пробирок прибавляют по 3 мл орцинового реактива и ставят в кипящую водяную баню на 20 мин, охлаждают и фотометрируют против контроля с красным светофильтром (660 нм).

Количество пентоз в пробе вычисляют по формуле

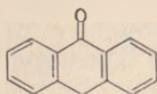
$$c = \frac{a \cdot E}{E_1}$$

где c — количество пентозы, мкг; a — количество пентоз в пробе стандартного раствора, мкг; E — экстинкция исследуемого раствора; E_1 — экстинкция стандартного раствора. Величины экстинкции являются среднеарифметическими из двух проб.

Определение концентрации гликогена антроновым реактивом

Метод основан на способности гексоз, дегидратируясь в присутствии концентрированной серной кислоты, конденсироваться с антроном и образовывать соедине-

ния, окрашивающие раствор в синий цвет. Данный метод позволяет определять гликоген без предварительного его гидролиза, что значительно экономит время.



Антрон (9,10 -дигидро-9-оксо-антрацен)

Приборы. Штатив с пробирками. Пипетки градуированные на 1 и 5 мл. Водяная баня. Термометр. Фотоэлектроколориметр.

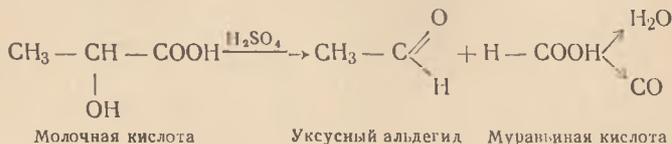
Реактивы. Антроп перекристаллизованный (1 г антрона растворяют в 9 мл горячего бензола; к полученному раствору прибавляют 3 мл холодного петролейного эфира. Выпавшие светло-желтые кристаллы отсасывают на воронке Бюхнера и высушивают в эксикаторе с краном над хлоридом кальция). Серная кислота, 66%-ный раствор. Тиомочевина, кристаллическая. Антроновый реактив (приготовление: к 100 мл 66%-ного раствора серной кислоты добавляют 1 г тиомочевины и 50 мг перекристаллизованного антрона. Смесь помещают в водяную баню и нагревают при помешивании до 80—90° С. Полученный прозрачный раствор охлаждают и хранят в холодильнике в темной склянке с притертой пробкой не более 2—3 недель). Насыщенный раствор бензойной кислоты. Стандартные растворы глюкозы (готовят навески 50, 100 и 200 мг глюкозы. Каждую навеску отдельно растворяют в 500 мл насыщенного раствора бензойной кислоты).

Ход работы. Нумеруют 10 пробирок. В первые две пробирки наливают по 0,5 мл исследуемого раствора гликогена, в пробирки 3, 4, 5, 6, 7, 8— по 0,5 мл стандартных растворов глюкозы (50, 100 и 200 мкг в пробе, по две параллельные на каждую концентрацию), в пробирки 9 и 10— по 0,5 мл дистиллированной воды (контрольные пробы). Во все пробирки приливают по 0,5 мл антронового реактива. Добавлять реактив необходимо быстро и так, чтобы реактив попадал в центр проб. Для этого лучше использовать пипетку с широким носиком. Смесь сразу тщательно перемешивают и помещают на 10—15 мин в водяную баню при комнатной температуре, а затем переносят в кипящую водяную баню на 15 мин. При нагревании следят, чтобы в пробирки не попала вода, которая мешает колориметрированию (раствор мутнеет). После охлаждения в проточной воде пробирки оставляют в темном месте на 30 мин. Окрашенные в синий цвет растворы колориметрируют на ФЭКе против контроля с красным светофильтром (620 нм). По экстинкции стандартных растворов глюкозы строят стандартную кривую, по которой определяют количество

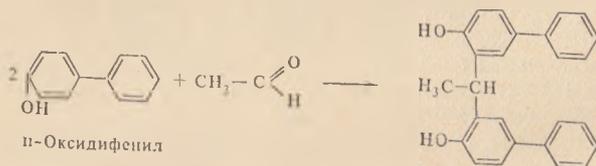
глюкозы в опытных пробах. Для пересчета на содержание гликогена полученное количество глюкозы умножают на коэффициент 0,9.

Количественное определение молочной кислоты (по Баркеру и Саммерсону)

Принцип метода заключается в том, что молочная кислота при кипячении с концентрированной серной кислотой разлагается с образованием уксусного альдегида:



Уксусный альдегид при взаимодействии с п-оксиdifенилом образует 1,1-ди-(оксиdifенил)-этан:



Последний в растворе серной кислоты медленно окисляется в фиолетовоокрашенный продукт.

Приборы. Штатив с центрифужными и обычными пробирками. Стекланные палочки. Микропипетка на 0,1 мл. Пипетки градуированные на 1, 3 и 5 мл. Стакан со льдом. Центрифуга. Фарфоровая ступка с пестиком. Водяная баня. Термометр. Фотоэлектроколориметр.

Реактивы. Трихлоруксусная кислота (ТХУ), 10%-ный раствор. Сульфат меди, 4%-ный и 20%-ный растворы. Оксид кальция в виде тонко расертого порошка. Серная кислота, концентрированная, выдерживающая пробу Савалля с $d=1,84$. п-Оксиdifенил, 1,5%-ный раствор в 5%-ном растворе гидроксида натрия (можно хранить 2—3 недели). Стандартные растворы молочнокислого лития для построения стандартной кривой (приготовление: 106,65 мг лактата лития растворяют в 100 мл дистиллированной воды). Этот раствор содержит 100 мг% молочной кислоты. Из него готовят разбавленные растворы, содержащие 5, 10, 20, 40, 60, 80 мг% молочной кислоты. Растворы должны быть использованы сразу после приготовления.

Ход работы. 1. Осаждение белков. В две центрифужные пробирки вносят по 0,5 мл дистиллированной воды,

а затем с помощью микропипетки непосредственно в воду выпускают по 0,1 мл крови. Микропипетку промывают той же водой. Затем добавляют по 1 мл охлажденного раствора ТХУ, перемешивают и помещают на 10—15 мин в стакан со льдом для лучшего осаждения белков. Пробы центрифугируют 5 мин при 3000 об/мин.

2. Осаждение углеводов. Надосадочную жидкость сливают в новые центрифужные пробирки, добавляют по 0,5 мл раствора сульфата меди и по 0,5 г тонко растертого порошка оксида кальция. Содержимое пробирок тщательно перемешивают стеклянными палочками — развивается голубое окрашивание. Реакция осаждения углеводов заканчивается через 30 мин, затем содержимое пробирок центрифугируют в течение 5 мин при 3000 об/мин.

3. Постановка цветной реакции. Надосадочную жидкость сливают в чистые пробирки и осторожно насливают по 3 мл концентрированной серной кислоты, погружив при этом пробирки в лед, непрерывно помешивая стеклянной палочкой. Тщательно перемешав содержимое пробирок, их помещают в кипящую водяную баню на 5 мин. Молочная кислота превращается в уксусный альдегид.

Пробирки охлаждают до комнатной температуры (20°С) и добавляют по 1 капле (0,05 мл) щелочного раствора п-оксидифенила. Последний добавляют непосредственно в раствор, а не на стенки пробирки, к которым он прилипает. Пробирки ставят в водяную баню (или термостат) при температуре 30°С на 30 мин, периодически помешивая их содержимое для растворения хлопьевидного осадка, образовавшегося после добавления п-оксидифенила. В пробирках за это время развивается голубое окрашивание. После этого пробирки ставят на 90 с в бурно кипящую водяную баню. (Нагревание больше 2 мин изменяет спектральную характеристику цвета и делает невозможным его измерение). Во время кипячения голубая окраска раствора переходит в стойкую фиолетовую. Пробирки охлаждают и фотометрируют при длине волны 574 нм (красный светофильтр) против серной кислоты.

Количество молочной кислоты определяют по стандартной кривой, построенной на основании экстинкции стандартных растворов лактата лития с известной концентрацией.

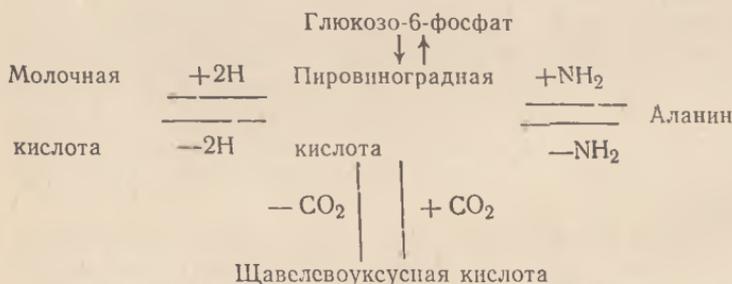
Расчет количества молочной кислоты ведут по формуле

$$x = \frac{a \cdot 100}{0,1}$$

где x — содержание молочной кислоты, мг%; a — количество молочной кислоты, соответствующее экстинкции пробы по стандартной кривой; 0,1 — количество мл крови, взятое на анализ; 100 — пересчет, мг%.

Количественное определение пировиноградной кислоты

Пировиноградная кислота занимает центральное положение в ходе метаболических реакций, что иллюстрируется следующей схемой:



Она служит связующим звеном обмена белков, липидов и углеводов. Содержание пировиноградной кислоты в крови, печени и мозге составляет 1,0—1,5 мг%, в мышцах — 3,0—3,5 мг%. Количество ее значительно варьирует при изменении гормональной ситуации в организме, при авитаминозах, в частности авитаминозе В₁, при поражениях печени.

Пировиноградную кислоту осаждают в виде 2,4-динитрофенилгидразона. Осадок гидразона очищают от примесей гидразонов других кетокислот последовательной экстракцией толуолом и раствором гидрокарбоната натрия (соды). В содовом экстракте определяют пировиноградную кислоту колориметрическим методом.

Приборы. Штатив с центрифужными пробирками. стакан со льдом. Пробирки с прилифованными пробками. Фильтровальная бумага. Центрифуга. Водяная баня. Пипетки на 3 мл с грушей. Фотоэлектроколориметр.

Реактивы. Трихлоруксусная кислота (ТХУ), 5%-ный раствор. 2,4-динитрофенилгидразин (2,4-ДНФГ), 0,2%-ный раствор. Толуол.

Гидрокарбонат натрия, 10%-ный раствор. Гидроксид натрия, 1,5 н. раствор. Стандартный раствор пирувата натрия, содержащий 20 мкг пировиноградной кислоты в 1 мл раствора.

Ход работы. В две центрифужные пробирки вносят по 1 мл сыворотки крови, затем по 3 мл охлажденного раствора ТХУ кислоты. Смесь тщательно перемешивают и ставят в стакан со льдом на 10—15 мин. После осаждения белков пробы центрифугируют в течение 5 мин при 4000 об/мин. Надосадочную жидкость переносят в пробирки с шлифованными пробками, добавляют по 1 мл раствора 2,4-ДНФГ. После 10—15-минутного стояния при комнатной температуре (для лучшего образования гидразона пировиноградной кислоты) смесь помещают в водяную баню при 35—37°C на 10—15 мин. Затем пробы охлаждают, в каждую добавляют по 4 мл толуола, закрывают пробками. Содержимое пробирок регулярно встряхивают в течение 7—10 мин. Этим достигается полнота экстракции 2,4-ДНФГ кетокислот из раствора. После расслоения смеси нижний водный слой, свободный от гидразонов, осторожно отсасывают. К оставшемуся толуоловому экстракту прибавляют 4 мл раствора гидрокарбоната натрия. При энергичном перемешивании смеси раствор соды избирательно экстрагирует из толуола 2,4-ДНФГ пировиноградной кислоты. После расслоения смеси верхний толуоловый слой отсасывают, остатки толуола удаляют фильтровальной бумагой. Для полноты извлечения гидразона пировиноградной кислоты экстракцию можно повторить. К содовому экстракту прибавляют 4 мл раствора гидроксида натрия (конечная концентрация щелочи должна быть не менее 0,75 н). Развивается красно-бурое окрашивание. Через 20 мин пробы фотометрируют при светофильтре с длиной волны 465 нм.

С помощью стандартной кривой на основании величин экстинкции определяют количество пировиноградной кислоты в пробах. Стандартную кривую строят по данным фотометрирования растворов пирувата натрия различной концентрации. *Расчет:*

$$x = \frac{a \cdot 100}{1 \cdot 1000},$$

где x — количество пировиноградной кислоты, мг%; a — количество пировиноградной кислоты (мкг), найденное на основании экстинкции по стандартной кривой.

ЛИПИДЫ И ИХ МЕТАБОЛИТЫ

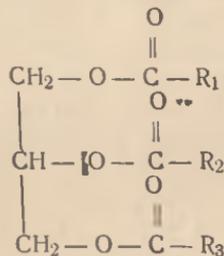
Липидами называют многочисленную группу веществ, построенных по принципу сложных эфиров и характеризующихся растворимостью в органических растворителях и нерастворимостью в воде. К ним относятся глицериды (жиры), воска, стеролы и стериды, фосфолипиды и гликолипиды (цереброзиды, ганглиозиды).

Липиды играют очень важную роль в качестве структурных компонентов клеточных мембран, источника энергии, растворителя органических веществ и предшественника других компонентов клетки (витамины группы D, желчные кислоты и гормоны стероидной природы).

В организме животных почти все липиды находятся в комплексе с белками, углеводами и другими соединениями. Комплексам придается большое значение в осуществлении ряда важнейших функций. Так, липопротеидами богаты митохондрии — структурные элементы клеток, в которых протекают процессы свободного и фосфорилирующего окисления и значительная часть процессов промежуточного обмена.

ГЛИЦЕРИДЫ (ЖИРЫ)

Жиры представляют собой сложные эфиры трехатомного спирта глицерина и остатков высших жирных кислот, которые имеют нижеследующее общее строение:



В состав молекулы естественного жира обычно входят остатки насыщенных и ненасыщенных жирных кислот (пальмитиновая, стеариновая, олеиновая, линолевая и др.). В организме животных глицериды преимущественно

но смешанные и только 2—3% их являются простыми (трипальмитат, тристеарат, триолеат).

Как правило, все природные жиры (свиное сало, коровье масло, растительные масла и т. п.) являются сложной смесью различных глицеридов, белков, свободных жирных кислот, витаминов, каротиноидов и пигментов.

Жиры имеют большое значение для организма как один из источников энергии (резервный жир). Кроме того, они служат структурными компонентами протоплазмы клеток (структурный жир), участвуют в теплорегуляции организма, предохраняют органы, нервы и сосуды от механических повреждений, способствуют усвоению жирорастворимых витаминов А, D, E и К и других биологически активных веществ.

Содержащиеся в жирах ненасыщенные жирные кислоты — линолевая, линоленовая, арахионовая — необходимы для регулирования окислительно-восстановительных процессов в клетках, а также для биосинтеза простагландинов — большой группы гормонов, обладающих широким биологическим действием.

Качественные реакции на жиры

Реакция жира и масла с суданом III

Приборы. Часовое стекло или пластинки стеклянные.

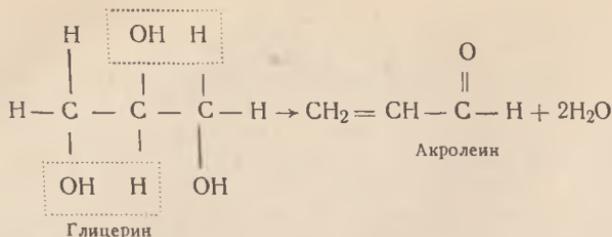
Реактивы. Судан, 0,2%-ный раствор (приготовление: к 200 мг судана III добавляют 100 мл 70%-ного этилового спирта, нагретого на водяной бане, перемешивают и оставляют стоять не менее суток). Растительное масло.

Ход работы. На часовое стекло наносят каплю масла, добавляют каплю судана III и размешивают. Наблюдают появление оранжевого цвета смеси.

Краситель судан III применяется в гистологических исследованиях для выявления жиров в тканях.

Определение глицерина в жирах

При нагревании жира в присутствии водоотнимающих реагентов, в частности гидросульфатов калия или натрия, от глицерина легко отщепляются две молекулы воды и он превращается в непредельный альдегид акролеин:



Акролеиновую реакцию проводят с целью открытия свободного глицерина или связанного в молекуле жира. Липиды, не содержащие глицерина (воска, стериды, инозитфосфолипиды и сфинголипиды) дают отрицательную реакцию на акролеин.

Приборы. Штатив с пробирками. Горелка газовая или спиртовка.

Реактивы. Жир растительный или животный. Воск. Гидросульфат калия (натрия), кристаллический.

Ход работы. Опыт следует проводить в вытяжном шкафу. В одну пробирку наливают 8—10 капель масла, а в другую помещают 0,3—0,5 г воска. В обе пробирки добавляют около 1 г гидросульфата калия. Смесь в пробирках осторожно, но сильно нагревают и обнаруживают образование акролеина в пробирке с жиром по появлению характерного, очень едкого запаха. Во второй пробирке акролеин не образуется.

Растворимость жиров

Работу выполняют с растительным маслом и различными растворителями.

Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. Подсолнечное масло. Этиловый спирт. Бензол. Хлороформ.

Ход работы. В четыре пробирки помещают 5—7 капель подсолнечного масла. В первую пробирку добавляют 2 мл воды, во вторую — 2 мл спирта, в третью — 2 мл бензола и в четвертую — 2 мл хлороформа. Смесь в пробирках хорошо встряхивают, отмечая наблюдаемые изменения. В первой пробирке образуется нестойкая, быстро расслаивающаяся эмульсия, во второй — мутный раствор, что указывает на плохую растворимость масла в спирте; в третьей и четвертой пробирках образуются прозрачные растворы в результате хорошей растворимости масла в бензоле и хлороформе.

Определение констант жира

О природе и качестве жира можно судить по его физическим и химическим константам или числам. Среди физических констант жира наибольшее значение имеют его температура плавления, застывания и вязкость, а среди химических — кислотное число, иодное число, эфирное число и число омыления.

Определение температуры плавления

Температура плавления жира — один из показателей, по которому можно, в известной степени, судить об усвояемости жира. Легкоплавкие жиры легче эмульгируются, а следовательно, и легче усваиваются.

Температура плавления глицеридов определяется их жирокислотными компонентами. Как правило, чем выше содержание кислот с короткой цепью или ненасыщенных, тем ниже точка плавления жира. Жиры растительного происхождения представляют собой жидкости при обычной температуре, поскольку в их составе количество ненасыщенных жирных кислот достигает 95—97%. В составе твердых и более тугоплавких жиров животного происхождения преобладают предельные кислоты с длинными углеродными цепями.

Природные жиры определенной точки плавления не имеют, поскольку являются не индивидуальными химическими соединениями, а смесью различных глицеридов, свободных жирных кислот, пигментов, витаминов и других веществ. Температура плавления жиров зависит от вида животных и колеблется в следующих пределах, °С: овец — 49—54, оленей — 48—52, крупного рогатого скота — 48—50, коз — 46—48, верблюдов — 36—48, свиней — 37—45, лошадей — 28—32, собак — 23—27, кроликов — 22—25.

Приборы. Стекланный капилляр диаметром 1,5—2 мм. Термометр. Пробирка стеклянная. Химический стакан. Лупа.

Реактивы. Жир, животный (расплавленный и профильтрованный).

Ход работы. Чистый сухой капилляр заполняют жиром на высоту около 2 см и выдерживают в течение 1 ч на льду или в холодной проточной воде. После охлаждения конец капилляра, заполненный жиром, отрезают, оставляя столбик жира высотой 0,5 см. Капилляр при-

крепляют резиновым кольцом к нижней части термометра так, чтобы конец его, наполненный жиром, был обращен вверх, а свободный вниз. Термометр с капилляром помещают в пробирку и закрепляют в ней с помощью пробки. Пробирку опускают в стакан с водой и укрепляют вертикально в лапке штатива. Воду в стакане, уровень которой должен быть выше верхнего конца капилляра, медленно нагревают при частом помешивании и наблюдают через лупу за повышением температуры и состоянием столбика жира в капиллярах. Показание термометра в тот момент, когда жир начнет стекать по капилляру и в верхней части капилляра образуется свободное пространство, отмечают как температуру плавления жира.

Между началом и концом перехода жира из твердого состояния в жидкое проходит некоторое время. Поэтому температуру плавления жира, во избежание ошибок, определяют не менее двух раз и о результате судят по среднему показателю.

Определение кислотного числа ✓

Кислотное число характеризует наличие в жире свободных жирных кислот. Выражают кислотное число количеством миллиграммов гидроксида калия, необходимых для нейтрализации свободных жирных кислот в 1 г жира.

Это число является одним из важнейших показателей, характеризующих качество жира. Кислотное число свежего жира разных сортов обычно не превышает 1,2—3,5. В процессе хранения жира происходит гидролиз глицеридов и накопление свободных жирных кислот. Повышенная кислотность жира указывает на снижение его качества.

Приборы. Колба коническая. Бюретка. Пипетка на 1 и 10 мл.

Реактивы. Подсолнечное масло. Нейтрализованная спиртовая эфирная смесь (смесь спирта и эфира 1:2, которую нейтрализуют 0,1 н. раствором гидроксида калия по фенолфталеину). Гидроксид калия, 0,1 н. раствор. Фенолфталеин, 0,1%-ный раствор.

Ход работы. В коническую колбу помещают 1 г подсолнечного масла, добавляют 10 мл смеси спирта с эфиром и хорошо перемешивают. После добавления 2—3 капель фенолфталеина раствор быстро титруют 0,1 н.

раствором гидроксида калия при встряхивании до появления розовой окраски, не исчезающей в течение 1 мин.

Кислотное число вычисляют по формуле

$$x = \frac{a \cdot 5,6 \cdot K}{c},$$

где x — кислотное число, мг; a — объем 0,1 н. раствора гидроксида калия, израсходованного на титрование исследуемой пробы, мл; 5,6 — количество мг гидроксида калия, содержащееся в 1 мл 0,1 н. раствора гидроксида калия; K — коэффициент поправки на 0,1 н. раствор гидроксида калия; c — навеска масла, г.

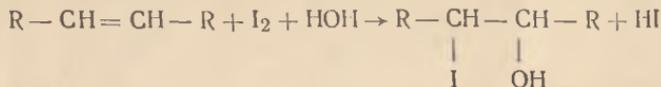
Определение иодного числа

Иодным числом называют количество граммов иода, которое может прореагировать со 100 г жира.

Это число позволяет оценить степень непредельности жира, обусловленную наличием в нем глицеридов, кислоты которых содержат двойные связи, способность его к окислению, восстановлению и другим реакциям. Чем больше в жире ненасыщенных жирных кислот, тем выше его иодное число.

Иодное число некоторых жиров и масел колеблется в следующих пределах: говяжий — 27—47, бараний — 31—46, свиной — 46—66, собачий — 56—67, подсолнечное масло — 129—136, конопляное масло — 145—162, льняное масло — 175—201.

Принцип метода. Определение иодного числа основано на реакции присоединения иода по месту разрыва двойных связей у ненасыщенных жирных кислот, которая протекает количественно по схеме:



Непрореагировавший иод оттитровывают тиосульфатом натрия.

Приборы. Колбы конические на 50 мл с пробками. Бюретка. Пипетка на 10 мл.

Реактивы. Подсолнечное масло. Хлороформ. Иод, 0,1 н. спиртовой раствор (приготовление: 12,691 г свежезоженного иода растворяют в 1 л 96%-ного этилового спирта). Тиосульфат натрия, 0,1 н. раствор. Крахмал, 1%-ный раствор.

Ход работы. В одну колбу (опытная проба) помещают 0,1 г подсолнечного масла (отвешивают на аналитических весах), в другую (контрольная проба) — 0,1 мл воды и добавляют из бюретки по 5 мл хлороформа.

После растворения навески масла в колбы добавляют пипеткой (точно!) по 10 мл 0,1 н. спиртового раствора иода, закрывают их пробками, перемешивают содержимое встряхиванием и выдерживают в темном месте.

Через 5 мин пробы титруют при постоянном взбалтывании 0,1 н. раствором тиосульфата натрия сначала до появления светло-желтого окрашивания, а затем, добавив 1 мл 1%-ного раствора крахмала, — до исчезновения синего окрашивания.

Иодное число (x , г) вычисляют по формуле

$$x = \frac{(b - a) \cdot K \cdot 0,01269 \cdot 100}{c},$$

где b — объем 0,1 н. раствора тиосульфата натрия, израсходованного на титрование контрольной пробы, мл; a — объем 0,1 н. раствора тиосульфата натрия, израсходованного на титрование опытной пробы, мл; K — коэффициент поправки на титр 0,1 н. раствора тиосульфата натрия; 0,01269 — количество граммов иода, эквивалентное 1 мл 0,1 н. раствора тиосульфата натрия; 100 — коэффициент перерасчета на 100 граммов; c — навеска жира, г.

Определение числа омыления

Числом омыления называют количество миллиграммов гидроксида калия, необходимое для нейтрализации всех жирных кислот (свободных и связанных в форме глицеридов), содержащихся в 1 г жира.

Число омыления некоторых доброкачественных жиров и масел имеет следующие величины; говяжий жир — 190—200, бараний — 192—198, свиной — 193—200, коровье масло — 212—247, льняное масло — 187—195.

Приборы. Баня водяная. Колбы конические на 50 мл с обратными холодильниками. Бюретка. Пипетка на 1 мл с делениями.

Реактивы. Подсолнечное масло. Гидроксид калия, 0,5 н. спиртовой раствор (приготовление: 30 г химически чистого гидроксида калия растворяют в 30 мл дистиллированной воды, доводят объем до 1 л 96%-ным этиловым спиртом и через сутки фильтруют). Соляная кислота, 0,5 н. раствор. Фенолфталеин, 0,1%-ный раствор.

Ход работы. В одну колбу (опытная проба) помещают 0,5 г подсолнечного масла, в другую (контрольная проба) — 0,5 мл воды и в каждую добавляют из бюретки по 15 мл 0,5 н. спиртового раствора гидроксида калия. К колбам присоединяют обратный холодильник и нагревают смесь при осторожном встряхивании на водяной бане до слабого кипения в течение 30—40 мин.

После омыления в колбы добавляют по 4 капли фенолфталеина и содержимое их титруют 0,5 н. раствором соляной кислоты до исчезновения розового окрашивания.

Число омыления определяют по формуле

$$x = \frac{(b - a) \cdot K \cdot 28,05}{c},$$

где x — число омыления, г; b — объем 0,5 н. раствора соляной кислоты, израсходованного на титрование контрольной пробы, мл; a — объем 0,5 н. раствора соляной кислоты, израсходованного на титрование опытной пробы, мл; 28,05 — количество мг гидроксида калия, соответствующее 1 мл 0,5 н. раствора соляной кислоты; K — коэффициент поправки на титр 0,5 н. раствора соляной кислоты; c — навеска жира, г.

Определение эфирного числа

Эфирным числом называют количество миллиграммов гидроксида калия, необходимое для нейтрализации жирных кислот, образующихся при омылении 1 г жира.

Это число определяют по разности между числом омыления жира и его кислотным числом.

Эмульгирование жиров

Действию ферментов желудочно-кишечного тракта и тканей доступны жиры, находящиеся в эмульгированном состоянии. В желудочно-кишечном тракте есть условия для превращения жиров в эмульсию, а основными ее стабилизаторами (эмульгаторами) являются соли желчных кислот, белки, фосфолипиды, мыла и гидрокарбонаты щелочных металлов. Молекулы эмульгаторов адсорбируются в наружном слое жировых капелек и резко понижают поверхностное натяжение на границе раздела фаз, в результате чего увеличивается устойчивость эмульсии. При этом гидрофильные группы эмуль-

гаторов находятся в водной фазе, а гидрофобные растворяются в жире, способствуя его дроблению на мелкие капли — эмульгированию.

Приборы. Штатив с пробирками.

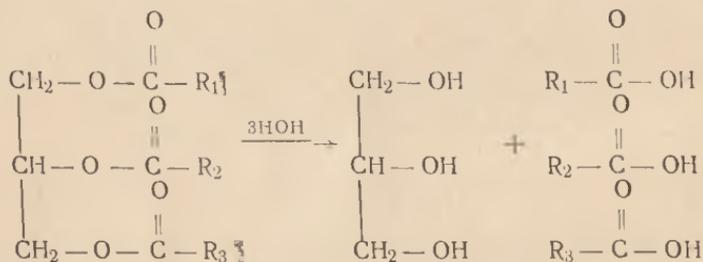
Реактивы. Подсолнечное масло. Желчь, разведенная в два раза. Раствор белка (приготовление см. на с. 127). Мыло, 1%-ный раствор. Гидрокарбонат натрия, 1%-ный раствор. Лецитин (получение см. на с. 116).

Ход работы. Берут шесть пробирок. В первую и во вторую пробирки наливают по 1 мл воды, в третью — 1 мл желчи, в четвертую — 1 мл раствора белка, в пятую — 1 мл раствора мыла и в шестую — 1 мл раствора карбоната натрия. Во вторую пробирку вносят кусочек лецитина. В каждую пробирку добавляют по 5 капель подсолнечного масла, энергично их встряхивают и оставляют на 5 мин. Во всех пробирках, кроме первой, образуется стойкая эмульсия.

Гидролиз глицеридов липазой

В организме жиры перевариваются под действием фермента липазы, которая содержится в соках желудка, поджелудочной железы и кишечника.

Липаза катализирует гидролитическое расщепление жиров на глицерин и свободные жирные кислоты:



При этом важную роль играют желчные кислоты, которые участвуют не только в процессах эмульгирования и всасывания жира, но и активируют липазу.

Принцип метода. Об активности фермента судят по приросту в инкубационной среде свободных жирных кислот, освобождающихся в результате расщепления жира поджелудочной липазой. Концентрацию свободных жирных кислот определяют путем титрования гидроксидом натрия по фенолфталеину.

Приборы. Стаканы химические по 50 мл. Колбы конические на 50 мл. Пипетки на 1,2 и 10 мл. Термостат на 38° С. Бюретка.

Реактивы. Молоко, прокипяченное и разведенное в два раза. Вытяжка из поджелудочной железы (приготовление: 1 г промышленного панкреатина растворяют в 100 мл 0,4%-ного раствора гидрокарбоната натрия). Желчь, разведенная в два раза. Фенолфталеин, 0,1%-ный раствор. Гидроксид натрия, 0,01 н. раствор.

Ход работы. В два стакана помещают по 10 мл молока и 1 мл вытяжки липазы, добавляют в один из них 1 мл воды, в другой 1 мл желчи (для активирования липазы) и жидкость быстро перемешивают путем втягивания и выпускания ее из пипетки.

Затем из каждого стакана отбирают по 2 мл смеси и переносят в колбы для титрования, добавляют по 2 капли фенолфталеина и смесь титруют 0,01 н. раствором гидроксида натрия до слабо-розовой окраски.

Оставшуюся в стаканах смесь инкубируют в термостате при 38°С. Через каждые 15 мин из стаканов отбирают по 2 мл смеси и титруют, как описано выше.

Результаты титрований могут быть записаны в таблице.

Время взя- тия проб для титрования	Количество 0,01 н. гидроксида натрия, мл.			
	Проба без желчи		Проба с желчью	
	израсходо- вано на титрование	нейтралि- зовано жирными кислотами	израсходо- вано на титрование	нейтрали- зовано жирными кислотами

Количество щелочи, пошедшей на нейтрализацию свободных жирных кислот, образовавшихся в результате гидролиза жира, определяют по разности между результатами первого и последующих титрований.

На основании полученных данных составляют график действия липазы во времени при наличии и отсутствии желчи. На графике по оси абсцисс откладывают время, а по оси ординат — количество миллилитров 0,01 н. раствора гидроксида натрия, израсходованного на титрование свободных жирных кислот, образовавшихся за определенный промежуток времени.

Количественное определение жира в печени и мышцах

Жир определяют экстрагированием навески исследуемых тканей в аппарате Сокслетта. Аппарат состоит из трех частей: колбы (1), экстрактора (2) и обратного холодильника (3), плотно соединенных с помощью шлифов (рис. 11).

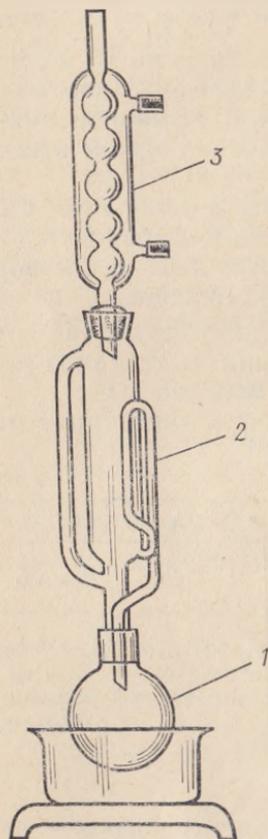


Рис. 11. Аппарат Сокслетта

Принцип метода. Метод основан на определении массы тканей до и после экстракции из них жиров растворителем.

Приборы. Аппарат Сокслетта. Весы аналитические. Шкаф сушильный на 106°C . Баня водяная. Экстракционные пакетики из обезжиренной плотной фильтровальной бумаги (пакетики высушивают, взвешивают и хранят в эксикаторе). Ножницы кривые. Фарфоровая ступка. Часовые стекла. Бюксы.

Реактивы. Печень и мышцы свежие. Эфир диэтиловый.

Ход работы. Берут навески печени и мышцы до 3 г (каждой ткани), измельчают ножницами на часовом стекле, помещают в бюксы и сушат в сушильном шкафу при температуре $102\text{--}106^{\circ}\text{C}$ до постоянной массы.

Высушенные навески измельчают в ступке и переносят в пакетики из фильтровальной бумаги. Пакетики с исследуемым материалом взвешивают и помещают в экстрактор аппарата Сокслетта.

Все части аппарата герметически соединяют, прибор помещают на водяную баню. Через верх холодильника экстрактор и колбу заполняют эфиром в количестве, равном двум объемам экстрактора. Затем в холодильник пускают воду, а колбу нагревают на водяной бане.

Во время экстракции следят за тем, чтобы количество растворителя в колбе не превышало $\frac{2}{3}$ ее объема и не запотевал холодильник.

Экстрагирование проводят в течение 5—6 ч. Полноту извлечения жира из тканей устанавливают по отсутствию жирового пятна на фильтровальной бумаге после испарения нескольких капель эфира, взятого из экстрактора.

После экстракции пакетики с материалом вынимают из аппарата Сокслетта и высушивают сначала в вытяжном шкафу, а после испарения эфира — в сушильном шкафу при 102—106°C до постоянной массы в течение 4—5 ч. Затем пакетики взвешивают на аналитических весах и по разнице между массой пакетика до экстракции и после нее определяют количество жира в навесках.

Количество жира (x , %) вычисляют по формуле

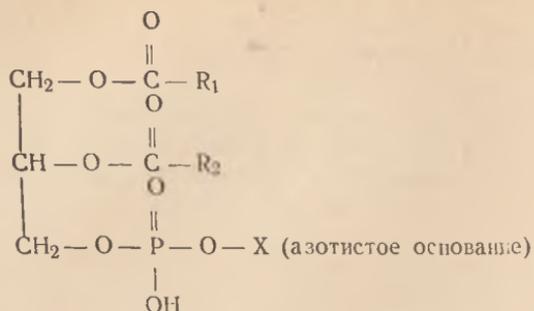
$$x = \frac{(a - b) \cdot 100}{c},$$

где a — масса пакетика с навеской до экстракции, г;
 b — масса пакетика с навеской после экстракции, г;
 c — навеска исследуемого материала, г; 100 — коэффициент перевода в проценты.

ФОСФОЛИПИДЫ

Фосфолипиды — одна из важных групп жироподобных веществ, широко распространенных в клетках тканей животного организма. Они представляют собой высокомолекулярные сложные эфиры, в состав которых входят спирты разных классов, предельные и непредельные жирные кислоты, фосфорная кислота и азотистое основание.

В зависимости от азотистого основания и спирта их разделяют на следующие подгруппы: холинфосфолипиды (лецитины), коламинфосфолипиды (кефалины), серинфосфолипиды, ацетальфосфолипиды, сфингомиелины и инозитфосфолипиды. Первые четыре фосфолипида построены из спирта глицерина, остатков предельных и непредельных жирных кислот (альдегида кислоты, например стеаральдегида), фосфорной кислоты и какого-либо азотистого основания. Общая формула их следующая:



Фосфолипиды наряду с белками являются главными компонентами мембран клеток и их органелл (плазмалемма, митохондрии, цитоплазматическая сеть, пластинчатый комплекс, лизосомы и др.). Они принимают участие в обмене веществ (транспорт через мембраны, субстраты тканевого дыхания). Фосфолипиды корма и технические фосфатиды повышают коэффициент использования азотистых веществ и фосфора рациона животных.

Фосфолипиды различаются способностью растворяться в органических растворителях. Из клеток и тканей фосфолипиды лучше всего экстрагируются смесью хлороформа со спиртом. Большинство фосфолипидов плохо растворимо в ацетоне, что используется при препаративном выделении их из биологических объектов.

Выделение фосфолипидов

Удобными объектами для выделения и изучения химического состава фосфолипидов служат нервная ткань, яичный желток, печень, молоко, в которых они присутствуют в значительном количестве.

Выделение лецитинов из яичного желтка

Приборы. Химический стакан. Штатив с пробирками. Воронки. Фильтры бумажные. Палочка стеклянная.

Реактивы. Яичный желток. Спирт этиловый, 96%-ный. Ацетон.

Ход работы. В стакан помещают половину яичного желтка, добавляют 20 мл горячего спирта и перемешивают стеклянной палочкой. Смесь охлаждают и фильтруют в сухую пробирку. Если фильтрат непрозрачный, фильтрование повторяют.

Для выявления в фильтрате лецитина в сухую пробирку наливают 5 мл ацетона и к нему каплями добав-

ляют полученный фильтрат. Появление мути свидетельствует об осаждении лецитина.

В другую сухую пробирку наливают 3 мл фильтрата и добавляют к нему каплями воду. Образуется стойкая эмульсия. Остальной фильтрат используют для других реакций на лецитины.

Выделение фосфолипидов из нервной ткани

Приборы. Весы торзионные. Ступка фарфоровая. Песок кварцевый. Колба коническая. Воронки. Фильтры бумажные. Эксикатор.

Реактивы. Мозг животного. Эфир диэтиловый. Ацетон.

Ход работы. Мозговую ткань (3—4 г) гомогенизируют в ступке с кварцевым песком, приливают пятикратный объем эфира и на холоде экстрагируют фосфолипиды в течение 24—48 ч. После этого эфирный раствор фильтруют в коническую колбу и к прозрачному фильтрату приливают трехкратный объем ацетона. Выпавший в осадок лецитин отделяют фильтрованием, промывают ацетоном и высушивают в эксикаторе над серной кислотой. Полученный лецитин сохраняют от окисления в запаянных стеклянных пробирках.

Качественная реакция на холинфосфолипиды

Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. Кадмий хлористый, насыщенный спиртовый раствор (приготовление: 1,5 г порошка хлористого кадмия, высушенного до постоянной массы, растворяют в 100 мл 96%-ного этилового спирта). Лецитин, спиртовый раствор (получение см. на с. 116).

Ход работы. В сухую пробирку помещают 2 мл спиртового раствора лецитина и добавляют 1 мл раствора хлористого кадмия. Выпадает белый хлопьевидный осадок комплексного соединения кадмия с лецитином.

Гидролиз лецитина и определение продуктов гидролиза

При нагревании со щелочью лецитин расщепляется на глицерин, высшие жирные кислоты, фосфорную кислоту и холин. Продукты гидролиза лецитина можно обнаружить с помощью ряда реакций.

Приборы. Штатив с пробирками. Воронки. Фильтры бумажные. Баня водяная. Стеклянная палочка.

Реактивы. Лецитин, спиртовый раствор (получение см. на с. 116). Гидроксид натрия, 10%-ный раствор. Соляная кислота,

10%-ный раствор. Гидросульфат калия, кристаллический. Фенолфталеин, 0,1%-ный раствор. Нитрат калия, кристаллический. Карбонат натрия, кристаллический. Азотная кислота, концентрированная. Молибденовый реактив (приготовление: 7,5 г молибдата аммония растворяют в 100 мл воды и добавляют 100 мл 32%-ного раствора азотной кислоты).

Ход работы. В пробирку наливают 5 мл спиртового раствора лецитина, 3 мл 10%-ного гидроксида натрия и кипятят в течение 5 мин. Холин, отщепившийся в результате гидролиза, в щелочной среде распадается с образованием триметиламина. Последний обладает запахом селедочного рассола и легко обнаруживается по этому признаку.

Обнаружение высших жирных кислот

Ход работы. Полученный щелочной гидролизат разбавляют 2 мл воды и к нему по каплям добавляют 10%-ный раствор соляной кислоты до выделения свободных высших жирных кислот, которые всплывают в виде жидкого слоя. Выделяющиеся жирные кислоты отфильтровывают.

Прозрачный фильтрат нейтрализуют 10%-ным раствором гидроксида натрия при наличии фенолфталеина до слабой розовой окраски и упаривают на водяной бане досуха. В сухом остатке устанавливают наличие глицерина и фосфорной кислоты.

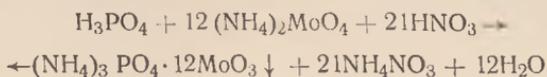
Обнаружение глицерина

Ход работы. Половину сухого остатка переносят в другую пробирку, добавляют 0,5 г гидросульфата калия и смесь нагревают на пламени горелки, держа пробирку горизонтально. При этом ощущается резкий, характерный запах акролеина (см. с. 105).

Обнаружение фосфорной кислоты

Ход работы. Вторую половину остатка сплавляют в тигле с небольшим количеством нитрата калия и карбоната натрия (1:2) до полного обесцвечивания смеси. Затем тигель охлаждают и содержимое его растворяют в 2 мл концентрированной азотной кислоты. Раствор из тигля сливают в пробирку, добавляют двойной объем молибденового реактива и нагревают. Образование жел-

того осадка фосфомолибдата аммония указывает на присутствие в растворе фосфорной кислоты:



Обнаружение азота

Принцип метода. При прокаливании азотсодержащего органического вещества с металлическим натрием образуется цианид натрия, который с гидроксидом железа (II) дает гексациано-(II)-феррат натрия. Это вещество при взаимодействии с солями оксида железа (III) образует синий осадок комплексного цианида — берлинской лазури:



Приборы. Штатив с пробирками. Химический стакан. Воронка. Фильтры бумажные.

Реактивы. Лецитин (получение см. на с. 116). Натрий металлический. Сульфат железа (II), 1%-ный раствор. Хлорид железа (III), 1%-ный раствор. Соляная кислота, 10%-ный раствор.

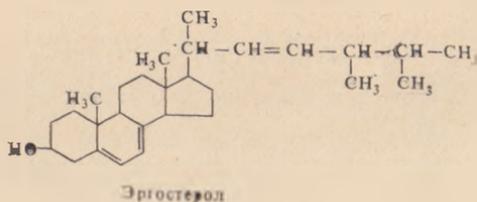
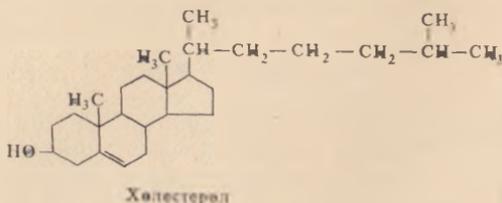
Ход работы. В сухую пробирку помещают небольшое количество лецитина вместе с кусочком металлического натрия и осторожно прокалывают на пламени горелки до полного разложения. Раскаленную пробирку опускают в стакан с 5 мл дистиллированной воды. Пробирка лопаается, содержимое ее растворяется в воде. Раствор фильтруют в пробирку, прибавляют к фильтрату 3 капли 1%-ного раствора сульфата железа (II) и кипятят 2 мин. После охлаждения смеси в пробирку добавляют по 3 капли 1%-ного раствора хлорида железа (III) и 10%-ного раствора соляной кислоты. В пробирке выпадает синий осадок берлинской лазури. Если в исходном материале было мало азота, то раствор окрашивается в зеленый цвет, а синий осадок выделяется спустя некоторое время.

СТЕРОЛЫ И СТЕРИДЫ

Стеро́лы и стериды составляют большую группу соединений, широко распространенных в животном организме.

Стеро́лы — одноатомные вторичные циклические спирты, структурную основу которых составляет циклопента-

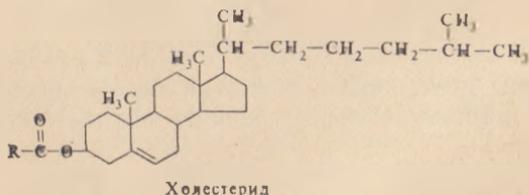
нопергидрофенантрен. К ним относятся холестерол, эргостерол, копростерол и другие вещества, различающиеся преимущественно строением боковой цепи и наличием двойных связей в ядре фенантрена:



Из стеролов в тканях животных наиболее распространен холестерол. Много его содержится в нервной ткани, особенно в белом веществе головного мозга, а также в желчи, сперме, ланолине.

Холестерол — важнейший структурный компонент клеток; он служит исходным веществом при биосинтезе стероидных гормонов, витаминов группы D, желчных кислот и других биологически важных соединений.

Холестерол содержится в тканях преимущественно в форме сложных комплексов с белками и фосфолипидами, а также в форме сложных эфиров пальмитиновой, стеариновой, олеиновой и других кислот. Сложные эфиры холестерола и высших жирных кислот называют **стеридами** (холестеридами):



Подобно жирам холестерол нерастворим в воде, но легко экстрагируется из клеток хлороформом, эфиром, бензолом, сероуглеродом или горячим спиртом. Холестерол кристаллизуется из спирта в виде тонких бесцветных пластинок, а из эфира — в виде игл. Плавится он при 150° С.

Выделение холестерина из нервной ткани

Приборы. Шкаф сушильный. Штатив с пробирками. Ступка фарфоровая. Пластинка стеклянная (10×10 см). Шпатель. Скальпель. Воронки. Фильтры бумажные.

Реактивы. Мозг животного, измельченный в мясорубке. Хлороформ. Гипс.

Ход работы. В ступке тщательно растирают около 3 г измельченного мозга с двумя весовыми частями гипса. Полученную густую массу с помощью шпателя наносят тонким слоем на стеклянную пластинку и высушивают в сушильном шкафу при 40° С или над пламенем горелки. Высушенную массу очищают скальпелем в сухую ступку и растирают в порошок. Порошок переносят в пробирку, приливают 6 мл хлороформа, тщательно взбалтывают в течение 5 мин и фильтруют. Полученный фильтрат используют для проведения цветных реакций на холестерол.

Цветные реакции на холестерол

Принцип метода. При действии водоотнимающих средств холестерол превращается в неопредельный углеводород с сопряженными двойными связями — холестерилен, образующий с серной кислотой и уксусным ангидридом интенсивно окрашенные комплексные соединения. Подобные реакции характерны и для других стеролов.

Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. Холестерол, хлороформный экстракт (получение см. на с. 121). Уксусная кислота, ледяная. Уксусный ангидрид. Серная кислота, концентрированная.

Реакция с серной кислотой (реакция Шиффа)

Ход работы. В сухую пробирку наливают 1 мл хлороформного экстракта холестерина и осторожно, по стен-

ке, подслаивают 1 мл концентрированной серной кислоты. На границе двух жидкостей наблюдают появление кольца красного цвета.

Реакция с серной кислотой (реакция Сальковского)

Ход работы. В сухую пробирку наливают по 1 мл хлороформного экстракта холестерина и серной кислоты и жидкость перемешивают путем встряхивания пробирки. После расслоения жидкости верхний хлороформный слой ее окрашивается в красный цвет, нижний — в желто-красный с зеленой флюоресценцией. При добавлении к нижнему слою жидкости 1 мл ледяной уксусной кислоты появляется розово-красная окраска, флюоресценция сохраняется.

Реакция с уксусным ангидридом и серной кислотой (реакция Либермана — Бурхарда)

Ход работы. В пробирку наливают 2 мл хлороформного экстракта холестерина, добавляют 10 капель уксусного ангидрида, 2 капли концентрированной серной кислоты и хорошо перемешивают. Жидкость принимает сначала красную, затем фиолетовую, синюю и, наконец, зеленую окраску.

Количественное определение холестерина в сыворотке крови (по Ильку)

Приборы. Фотоэлектроколориметр. Баня водяная. Штатив с пробирками. Микропипетка на 0,2 мл. Пипетка на 5 мл с делениями.

Реактивы. Сыворотка крови, негемолизированная. Реактив на холестерол (приготовление: в колбе при постоянном взбалтывании и охлаждении смешивают одну часть ледяной уксусной кислоты, пять частей уксусного ангидрида и одну часть концентрированной серной кислоты. Серную кислоту приливают малыми порциями в последнюю очередь).

Ход работы. При проведении этой работы пользуются сухими пробирками и пипетками.

В пробирку помещают 4,2 мл реактива на холестерол и добавляют 0,2 мл негемолизированной сыворотки крови таким образом, чтобы она стекала по стенке пробирки. Пробирку сразу часто и сильно встряхивают не менее 10 раз и затем ставят в темное место на 20 мин при комнатной температуре для развития окраски смеси.

Интенсивность зеленого окрашивания опытной пробы измеряют с помощью фотоэлектроколориметра с красным светофильтром в кювете с рабочей длиной 5 мм.

Концентрацию холестерина в сыворотке крови находят по стандартной кривой, на которой каждому значению экстинкции опытного раствора соответствует определенное содержание холестерина в мг%.

Для построения стандартной кривой в пробирки вносят соответственно 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 и 3,0 мл стандартного раствора, содержащего 0,09 мг холестерина в 1 мл хлороформа, выпаривают его досуха на водяной бане и затем проводят те же операции, что и с опытным раствором. Полученные данные оптической плотности растворов холестерина известной концентрации используют для построения стандартной кривой.

ПРОСТЫЕ БЕЛКИ (ПРОТЕИНЫ)

Белки — высокомолекулярные биологические полимеры; построены из 20 остатков аминокислот и двух амидов (аспарагин, глутамин); обладают многочисленными физико-химическими и биологическими свойствами.

Белки — наиболее важная составная часть клеток всех животных тканей. Они выполняют различные функции в организме, служат основным структурным материалом клетки, катализируют все реакции тканевого обмена (ферменты, гормоны), играют защитную роль (антитела), вместе с нуклеиновыми кислотами участвуют в передаче признаков по наследству, при окислении аминокислот выделяют энергию и т. д.

Из клеток, тканей и органов, животных, растений и микроорганизмов выделено очень много белков, обладающих неодинаковой структурной организацией, физико-химическими и биологическими свойствами.

Обширный класс белков разделяют на две большие группы: простые белки, или протеины, и сложные белки, или протеиды.

Простыми называют те белки, которые при кислотном или щелочном гидролизе распадаются только на аминокислоты. К простым белкам относят альбумины, глобулины, гистоны, протамины, протеиноиды, белки-ферменты, белки-антитела, а также растительные — глютелины и проламины.

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ**

Белки обладают высокой молекулярной массой, чем особенно выделяются среди других органических веществ. Молекулярная масса белков, определенная различными методами, составляет от нескольких сотен тысяч и до нескольких миллионов водородных единиц. Так, молекулярная масса рибонуклеазы 13 700, альбумина сыворотки крови 69 000, глобулина сыворотки крови 176 000, миоглобина 17 000, фибриногена 450 000, актомиозина 5 000 000, гемоцианина улиток 6 700 000 и т. д.

Большая молекулярная масса белков обуславливает выраженный коллоидный характер их водных растворов.

Водные растворы белков дают даже в молекулярно-дисперсном состоянии коллоидные системы. Это означает, что диаметр белковых молекул в растворе превышает 0,001 мкм.

Белки как высокомолекулярные коллоидные вещества обладают большим сродством к воде, что и обуславливает их хорошую растворимость в ней.

Белки как коллоиды обладают всеми свойствами последних. Растворы белков опалесцируют, им характерно явление Фарадея—Тиндаля, броуновское движение, они не проходят через ультрафильтры, обладают низким осмотическим давлением и т. д.

Важное свойство белков — растворимость их в воде, водно-солевых растворителях и в водных растворах полярных веществ (спирт).

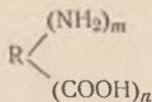
Процесс растворения белков тесно связан с гидратацией их макромолекул, и любой фактор, нарушающий это свойство, будет в то же время понижать растворимость белков в воде и способствовать выпадению их в осадок.

Уменьшение гидратации коллоидных частиц белков легко достигается прибавлением к их растворам водоотнимающих веществ, к которым относятся спирт, ацетон, растворы нейтральных солей щелочных металлов и др. Эти вещества осаждают белки без явления денатурации, а соли тяжелых металлов, наоборот, осаждают белки с денатурацией, сущность которой сводится к потере белками гидрофильных и приобретению гидрофобных свойств с утратой электрического заряда.

Из практики известно, что при определенных условиях гидрофобный и денатурированный коллоид может устойчиво сохраняться в виде золя. Причиной такой устойчивости является одноименный электрический заряд, который препятствует сближению и агрегации коллоидных мицелл, устраняя тем самым возможность образования более крупных агрегатов, способных выпасть в осадок. Снятие заряда мицеллы или уменьшение его до критической величины неизбежно приводит к понижению устойчивости взвеси и создает предпосылки для коагуляции и осаждения взвешенных частиц.

Белки являются не только коллоидами, но и амфотерными электролитами, т. е. обладают в одно и то же время свойствами кислот и оснований. В присутствии избытка кислоты они ведут себя как основания, в при-

сутствии щелочей — как кислоты. Строение белковой молекулы как амфолита схематично можно представить так:



Такие соединения являются амфотерными электролитами, так как у них к диссоциации способны как карбоксильные, так и аминные группы.

Белковые частицы в растворе могут менять свой заряд в зависимости от рН среды: в кислой среде белок при электрофорезе передвигается к катоду, в щелочной — к аноду.

Следовательно, основными факторами агрегативной устойчивости белковых коллоидов служат гидратация частиц и возникновение одноименного электрического заряда в результате диссоциации основных и кислотных групп.

Реакции на белки

Все реакции на белки основаны на наличии в них определенных химических групп, связей и на физико-химических свойствах.

Реакции на белки можно разделить на две самостоятельные группы: реакции осаждения белков и цветные реакции.

Реакции осаждения белков можно разделить на две подгруппы: осаждение белков без денатурации (соли нейтральных щелочных металлов) и с денатурацией (соли тяжелых металлов, температура, минеральные и органические кислоты, реактивы на алкалоиды).

Реакции осаждения белков

Высаливание белков

При этих реакциях осажденные белки не подвергаются глубоким изменениям и полученные осадки белков (гель) снова могут быть растворены в исходном растворе (превращение в золь). Макромолекулы белков при этом, как правило, сохраняют свои первоначальные (нативные) свойства и не подвергаются существенным изменениям (денатурации).

Обратимое осаждение белков достигается добавлением к водным растворам нейтральных солей щелочных металлов. К таким солям относят следующие вещества: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl , Na_2SO_4 , NaCl , KCl и др. Механизм действия этих солей на коллоидную частицу сводится к адсорбции на последней ионов с противоположным зарядом, таким образом белковая частица становится электронейтральной (происходит подавление заряда), в результате понижается ее устойчивость в растворе. Кроме того, соли щелочных металлов, растворяясь, связывают большие количества воды, что при достаточно высоких концентрациях ведет к дегидратации коллоидных частиц и лишает последние второго фактора агрегативной устойчивости — гидратационной оболочки. Белки при этом выпадают в осадок.

Такой метод осаждения белков, т. е. осаждение по нами солей щелочных металлов, носит название высаливания. Осадки белков (гель), полученные высаливанием, могут быть вновь растворены после уменьшения концентрации солей диализом или разбавлением водой. Высаливание белков таким образом — процесс обратимый. Как известно, белки тканей по молекулярной массе неоднородны, имеют разную степень дробления (дисперсность), что используется для фракционного разделения их путем применения солей разной концентрации.

Концентрированные растворы сернокислого аммония высаливают почти все белки. Например, все фракции глобулинов выпадают в осадок при полунасыщении раствора белков сернокислым аммонием, а альбумины выпадают при полном насыщении.

Хлористые натрий, калий и сернокислый магний осаждают глобулины при полном насыщении, а при слабом подкислении (в изопункте) эти соли осаждают и альбумины, причем растворы используют более слабой концентрации.

Осаждение белков сернокислым аммонием

Приборы. Штатив с пробирками. Воронка с фильтром.

Реактивы. Сыворотка крови или раствор яичного белка (от трех куриных яиц), который готовят смешиванием белков с 700 мл дистиллированной воды и 300 мл насыщенного раствора хлорида натрия с последующим фильтрованием через несколько слоев марли. Сернокислый аммоний (насыщенный раствор). Сернокислый аммоний в виде тонко измельченных кристаллов. Едкий натр, 10%-ный раствор. Сернокислая медь, 1%-ный раствор.

Ход работы. В пробирку наливают 2—3 мл сыворотки крови или разбавленного яичного белка, прибавляют равный объем насыщенного раствора сернокислого аммония и взбалтывают. В осадок выпадают белки — глобулины.

Через 5—7 мин отфильтровывают содержимое пробирок. В фильтрате остаются альбумины, а на фильтре — глобулины.

Для осаждения альбуминов в фильтрат добавляют кристаллический сернокислый аммоний до полного насыщения, т. е. пока порошок останется нерастворенным. В осадок выпадают альбумины, которые отфильтровывают.

С 2—3 мл фильтрата проводят биуретовую реакцию (см. с. 138). Отрицательная реакция указывает на отсутствие белков в фильтрате и полноту осаждения.

Осадок альбуминов вместе с фильтром переносят в пробирку и растворяют в 4—5 мл воды, взбалтывая пробирку.

Раствор альбуминов отфильтровывают и проводят с ним биуретовую реакцию.

Обратимое осаждение белков сернокислым аммонием ✓

Оборудование и реактивы те же, что и в предыдущем опыте.

Ход работы. В пробирку наливают 2—3 мл сыворотки крови или разбавленного яичного белка. Добавляют равный объем дистиллированной воды, хорошо перемешивают и наблюдают постепенное исчезновение осадка белков.

И Осаждение белков хлористым натрием и сернокислым аммонием ✓

Приборы. Те же, что и в опыте по осаждению сернокислым аммонием (см. с. 127).

Реактивы. Хлорид натрия, кристаллический. Сульфат магния, кристаллический. Уксусная кислота, 1%-ный раствор.

Ход работы. В две пробирки наливают по 2—3 мл сыворотки крови или разбавленного яичного белка.

В одну пробирку прибавляют до полного насыщения кристаллический хлорид натрия, в другую — сернокислый магний. Через 2—3 мин в обеих пробирках появляется осадок глобулинов.

Содержимое пробирок отфильтровывают. В фильтрате остаются альбумины, которые в нейтральных растворах не выпадают в осадок от этих солей даже при полном насыщении.

Прибавляют к фильтрату 4—6 капель 1%-ный раствор уксусной кислоты, при этом альбумины осаждаются. Через 5 мин их отфильтровывают. Затем проверяют фильтрат на отсутствие белка при помощи биуретовой реакции (см. с. 138).

✓ Очистка белков от кристаллоидов методом диализа

Диализ — метод отделения коллоидов от кристаллоидов с помощью диффузии последних через специальные мембраны, не проницаемые для коллоидов.

Белки, как высокомолекулярные коллоидные вещества, не диффундируют через поры полупроницаемой мембраны. Это свойство белковых частиц положено в основу очистки белков от низкомолекулярных органических и минеральных примесей.

Приборы. Диализатор — коллодиевый мешочек, опущенный в стакан с дистиллированной водой (рис. 12). Штатив с пробирками.

Реактивы. Раствор белка, содержащий хлорид натрия (приготовление см. на с. 127). Азотнокислое серебро, 1%-ный раствор. Азотная кислота, 10%-ный раствор. Едкий натр, 10%-ный раствор. Сульфат меди, 1%-ный раствор.

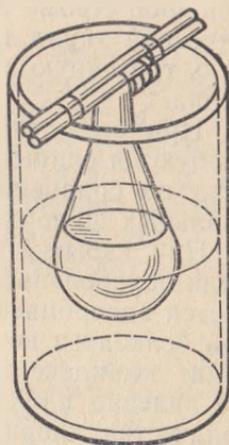


Рис. 12. Простейший диализатор

Ход работы. С раствором белка проводят биуретовую реакцию (см. с. 138).

В коллодиевый мешочек наливают 10—15 мл раствора белка и укрепляют его с помощью деревянных зажимов в стакане с дистиллированной водой так, чтобы край мешочка выступал над поверхностью воды.

Через 40—60 мин из стакана берут 2—3 мл воды в пробирку и проводят реакцию с азотнокислым серебром путем добавления 3—5 капель его с целью обнаружения

ионов хлора. В другую пробирку берут 1—2 мл жидкости из стакана и проводят биуретовую реакцию, которая при правильной постановке опыта должна быть отрицательная.

Воду в стакане можно менять через каждые 15—20 мин до появления в растворе осадка глобулинов, который появляется в результате понижения концентрации хлорида натрия в коллодиевом мешочке. В растворе, бедном солями, глобулины выпадают в осадок.

Осаждение белков ионами тяжелых металлов

Под влиянием ионов солей тяжелых металлов (свинца, меди, серебра, ртути и др.) белки из состояния золя необратимо коагулируют в гель. Ионы солей тяжелых металлов с белками образуют прочные комплексные соединения. Кроме того, тяжелые металлы снимают электрический заряд и, очевидно, глубоко изменяют вторичную, третичную и четвертичную структуру макромолекул белка.

При осаждении белков солями тяжелых металлов требуются слабые их концентрации и небольшие количества по сравнению с осаждением белков солями нейтральных щелочных металлов.

При избытке уксуснокислого свинца и серноокислой меди образованный ими осадок растворяется, что объясняется адсорбцией избытка ионов металла и перезарядкой белкового комплекса, в результате в раствор переходит комплекс измененного белка с металлом. Такое же явление наблюдается при добавлении достаточного количества хлорида натрия, который вызывает растворение осадка ртутного соединения белка.

Осадки белков, полученные при действии солей тяжелых металлов, нерастворимы в первоначальном растворе, т. е. в воде или слабых растворах солей, даже после удаления солей диализом или разбавления водой.

Свойством белков связывать тяжелые металлы широко пользуются в медицинской и ветеринарной практике как противоядием при отравлении солями ртути, меди, свинца и др.

Реакции осаждения белков солями тяжелых металлов идут полно и ими пользуются не только для выделения белков из растворов и биологических жидкостей, но и для освобождения их от белков.

Приборы. Штатив с пробирками. Стеклянные палочки.

Реактивы. Раствор яичного белка, который растворяют в 20-кратном объеме воды и фильтруют через несколько слоев марли. Уксуснокислый свинец, 0,5%-ный раствор. Сернокислая медь, 5%-ный раствор. Азотнокислое серебро, 3%-ный раствор. Насыщенный раствор хлорида натрия.

Ход работы. В три пробирки наливают по 1—2 мл раствора белка. Прибавляют по каплям в первую пробирку раствор уксуснокислого свинца, во вторую — сернокислой меди и в третью — азотнокислого серебра. Во всех пробирках образуются осадки белков.

В пробирку с осадками от уксуснокислого свинца и сернокислой меди добавляют избыток этих солей, наблюдая при этом растворение осадков.

iv Осаждение белков минеральными кислотами

Концентрированные минеральные кислоты (кроме фосфорной кислоты) вызывают необратимое осаждение белков из раствора. Это осаждение объясняется явлениями дегидратации коллоидных частиц белка, подавлением заряда, образованием солей из белка и кислот и др. Избытком минеральных кислот (за исключением азотной) растворяют выпавший осадок белков (гидролиз).

Реакция с азотной кислотой широко используется для диагностических исследований.

Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. Соляная кислота, концентрированная. Серная кислота, концентрированная. Азотная кислота, концентрированная. Раствор белка для реакций осаждения (приготовление см. на с. 127).

Ход работы. В три пробирки осторожно наливают по 1 мл кислот: в первую — соляной, во вторую — серной и в третью — азотной.

Во все пробирки осторожно наливаают на кислоту приблизительно по 1 мл раствора белка. На границе двух жидкостей появляется осадок белков в виде небольшого белого кружочка (кольца).

Каждую пробирку осторожно встряхивают. Осадок растворяется в первой и второй пробирках, где имеется избыток соляной и серной кислот; в третьей пробирке с азотной кислотой осадок не исчезает при встряхивании, так как при избытке азотной кислоты он не растворяется.

Осаждение белков органическими кислотами

Из растворов белки могут осаждаться также и органическими кислотами, но разные кислоты действуют на белок неодинаково. Трихлоруксусная кислота (CCl_3COOH) и сульфосалициловая кислота [$\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})\text{COO}-\text{HSO}_3\text{H}$] являются очень специфическими и сильными реактивами на белок и широко применяются в исследовательской практике.

Осаждение белков с помощью трихлоруксусной кислоты в конечной концентрации 2,5—5% применяется для полного удаления белков из биологических жидкостей или гомогенатов тканей, так как трихлоруксусная кислота осаждает только белки, а продукты их распада (обмена) — мочевины, мочевая кислота, амиды аминокислот, аминокислоты, низкомолекулярные полипептиды и др. — остаются в растворе. Это имеет важное значение для раздельного определения белкового и небелкового (остаточного) азота в тканях.

Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. Трихлоруксусная кислота, 5%-ный раствор. Сульфосалициловая кислота, 20%-ный раствор. Раствор белка для осаждения (приготовление см. на с. 127).

Ход работы. В две пробирки наливают по 1—2 мл раствора белка и добавляют в первую пробирку несколько капель 5%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, а во вторую — несколько капель сульфосалициловой кислоты. Пробирки встряхивают и наблюдают осаждение белка.

Осаждение белков спиртом, ацетоном и хлороформом

Органические растворители осаждают белки из нейтрального или слабокислого раствора. Они вытесняют белки из водных растворов. Механизм действия спирта и других органических растворителей можно объяснить дегидратацией мицелл белка, что ведет к понижению устойчивости их в растворе. Если в растворе белка присутствуют соли (NaCl), осадок образуется быстрее вследствие сжатия заряда с коллоидной частицы. Это явление еще больше снижает устойчивость раствора белка.

Если осаждение проводить на холоде и осадок быстро отделить от спирта (хлороформа), то белок опять может раствориться в воде, т. е. свойства его при этом не

изменяются, денатурация не успевает произойти, и осаждение обратимо. При длительном стоянии со спиртом белок денатурирует и становится нерастворимым в первоначальном растворителе.

Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. Раствор белка для реакций осаждения (приготовление см. на с. 127). Этиловый спирт, 96%-ный. Ацетон. Хлороформ. Хлорид натрия, кристаллический.

Ход работы. В три пробирки наливают по 1—2 мл раствора белка, ложечкой добавляют немного (0,2—0,3 г) хлорида натрия и энергично встряхивают.

В первую пробирку постепенно (каплями) приливают 2—3 мл спирта, во вторую — 2—3 мл ацетона и в третью — хлороформа. Энергично встряхивают и через 3—6 мин наблюдают выпадение мелкого осадка белков.

Осаждение белков алкалоидами и реактивами на алкалоиды

Реакции осаждения белков обуславливаются тем, что белки, как и алкалоиды, имеют аминогруппы. Большая часть реактивов на алкалоиды (красная кровяная соль, сульфосалициловая кислота, пикриновая кислота, соли: KI, NaI, HgI₂, BiI₃ и др.) реагирует только в кислой среде.

При действии реактивами на алкалоиды образуются нерастворимые солеобразные соединения с основными азотистыми группами. В этом соединении белок служит катионом, а алкалоидный реактив — анионом. Следовательно, осаждение белков реактивами на алкалоиды необходимо проводить в кислой среде (частицы белка перезаряжаются и переходят в состояние катионов). В щелочной среде осадки растворяются.

Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. Раствор белка для осаждения (приготовление см. на с. 127). Пикриновая кислота, насыщенный раствор. Танин, насыщенный раствор. Уксусная кислота, 1%-ный раствор. Уксусная кислота, 10%-ный раствор. Иодная ртуть в иодистом калии, которая готовится путем растворения в 50 мл дистиллированной воды 5 г иодистого калия с последующим насыщением этого раствора 12 г иодной ртути и доведением объема до 100 мл. Железистосинеродистый калий, 5%-ный раствор. Насыщенный раствор фенола.

Ход работы. В две пробирки наливают по 2 мл раствора белка и подкисляют их 2—3 каплями 1%-ного раствора уксусной кислоты.

В одну пробирку прибавляют 2—3 капли раствора таннина, в другую 5—6 капель раствора пикриновой кислоты. Наблюдают выпадение белка в осадок.

В третью пробирку наливают 2 мл раствора белка, подкисляют 2—3 каплями 10%-ного раствора уксусной кислоты и добавляют 3 капли железистосинеродистого калия, взбалтывая после добавления каждой капли. Белок выпадает в осадок.

В четвертую пробирку наливают 1—2 мл раствора белка и добавляют 2—3 капли иодной ртути в иодистом калии. Наблюдают выпадение белка в осадок.

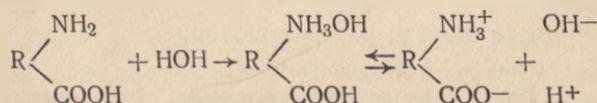
В пятую пробирку наливают 1—2 мл раствора белка и добавляют 5—8 капель насыщенного раствора фенола, встряхивая пробирку после каждой капли. Наблюдают осаждение белка.

Определение изоэлектрической точки белков ✓

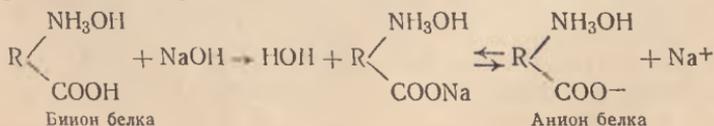
Белки по химическим свойствам являются амфотерными веществами, так как в их молекуле имеются свободные карбоксильные и аминные группы. Кислотные свойства белков обуславливаются за счет концевых карбоксильных групп и дикарбоновых аминокислот. Кислую среду помогают создавать фенольные гидроксилы в составе тирозина и сульфгидрильные группы серусодержащих аминокислот.

Щелочными свойствами белки обязаны аминным, иминным и гуанидиновым группам диаминомонокарбоновых кислот.

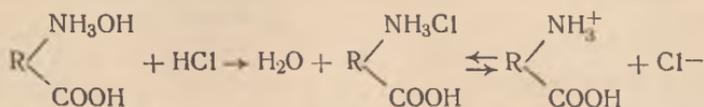
Присутствие одновременно кислых и основных групп в белках в водной среде обуславливает образование двойных ионов:



В щелочной среде белки играют роль аниона. При потере протона из группы $-\text{NH}_3^+$, например при действии гидроксида натрия, образуется натриевая соль белка (протеинат натрия):



В кислой среде белок играет роль катиона: например, с соляной кислотой получается хлористоводородная соль (протеинхлорид):



Следовательно, концентрация водородных ионов — определяющий фактор поведения белка в растворе. В кислой среде уменьшается диссоциация карбоксильных групп белка и он переходит в катион; в щелочной среде подавляется диссоциация основных групп и белок переходит в анион.

При определенном значении рН (для каждого белка неодинаковое) диссоциация карбоксильных групп становится равной основной: число положительных зарядов белковой молекулы сравнивается с числом отрицательных и в целом заряд белковой частицы становится равным нулю.

Белок, лишенный электрического заряда, находится в изоэлектрическом состоянии и в электрическом поле не будет передвигаться ни к катоду, ни к аноду, а рН раствора, при котором белок находится в изоэлектрическом состоянии, называется изоэлектрической точкой белка или изопунктом белка.

Растворы белков в изоэлектрическом пункте проявляют наименьшую устойчивость, в качестве стабилизирующего фактора остается только гидратационная оболочка.

У большинства белков изоэлектрическая точка (ИЭТ) близка к нейтральной реакции среды, но несколько сдвинута в кислую сторону, что объясняется преобладанием кислых свойств над щелочными, и в нейтральном растворе они ведут себя как слабые кислоты.

Небольшое число белков организма (гистоны, протамины) содержат больше аминных групп, они богаче диаминокислотами. В нейтральной среде они ведут себя как слабые основания и их изоэлектрическая точка лежит в слабощелочной среде.

Приборы. Штатив с пробирками. Пипетка на 2 мл с делениями. Пипетка на 10 мл с делениями.

Реактивы. Уксуснокислый натрий, 0,1 н. раствор. Уксусная кислота, 0,1 н. раствор. Желатин, 1%-ный раствор. Этиловый спирт, 96%-ный.

Ход работы. Готовят серию буферных растворов.

Раствор	Номер пробирки					
	1	2	3	4	5	6
	Количество, мл					
CH ₃ COONa, 0,1 н.	2	2	2	2	2	2
CH ₃ COOH, 1 н.	0,25	0,5	1	2	4	—
CH ₃ COOH, 0,1 н.	—	—	—	—	—	0,8
Дистиллированная вода	3,75	3,50	3	2	—	3,2
Желатин, 1%-ный	2	2	2	2	2	2

Содержимое пробирок взбалтывают.

В пробирку 4 прибавляют из пипетки медленно и при помешивании столько спирта, чтобы спустя некоторое время оставалась едва заметная муть. Для этой цели расходуется, как правило, 2—3 мл спирта.

Во все остальные пробирки добавляют, помешивая, столько же спирта, сколько добавлялось в пробирку 4.

Через 20—30 мин наблюдают помутнение, которое обозначают по нижеприведенной схеме (+ — слабая коагуляция; ++ — средняя коагуляция; +++ — сильная коагуляция):

рН	Номер пробирки					
	1	2	3	4	5	6
	5,6	5,3	5,0	4,7	4,4	4,1
Коагуляция	—	—	++	+++	+-	—

Следовательно, ИЭТ желатина соответствует рН 4,7. В зависимости от сорта желатина ИЭТ может колебаться в небольших пределах.

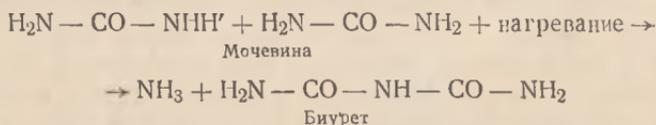
✓ ↘ Качественные реакции на белки

Качественное обнаружение белков основано на двух типах реакций: а) по пептидным связям белковой молекулы; б) по аминокислотным радикалам в ее структуре. Все они еще называются цветными реакциями на белки.

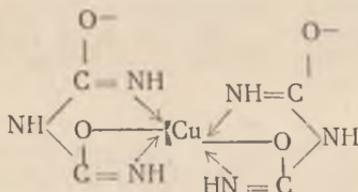
Обнаружение в молекулах белков пептидных связей (биуретовая реакция)

В щелочном растворе при добавлении сульфата меди такие вещества, как биурет, оксамид, полипептиды и белки, образуют комплексные соли, окрашенные в фиолетовый цвет. Эта реакция обусловливается наличием пептидной связи (—NH—C—).

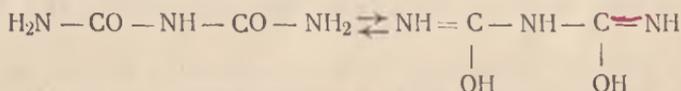
Название «биуретовая реакция» происходит от производного мочевины — биурета, который дает эту реакцию в соответствующих условиях. Биурет образуется при нагревании мочевины с отщеплением от нее аммиака:



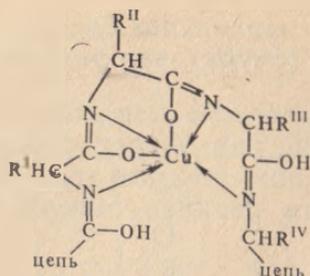
Строение окрашенной комплексной соли Cu—Na-биурета , образующейся в щелочной среде, можно представить так:



Как видно из приведенной выше формулы, биурет в щелочной среде претерпевает полную енолизацию по схеме



Две молекулы диенольной формы биурета взаимодействуют с гидроксидом меди и образуют комплексное соединение, в котором координационные связи образованы за счет электронных пар азота иминных групп.



Аналогично построено комплексное соединение меди с енолизированными пептидными группами любого белка или полипептида:

Комплексы такого типа обладают преимущественно красной окраской (максимум поглощения 520—535 нм). В случае образования медных комплексов при участии трех или двух атомов азота окраска их преимущественно фиолетовая и синяя (максимумы поглощения 540—580 нм и 615—670 нм). Поэтому окраска растворов при проведении биуретовой реакции варьирует от синей до красной с преобладанием фиолетовой.

Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. Мочевина кристаллическая. Гидроксид натрия, 10%-ный и 30%-ный растворы. Сульфат меди, 1%-ный раствор. Раствор белка (белок двух яиц смешивают с литром дистиллированной воды).

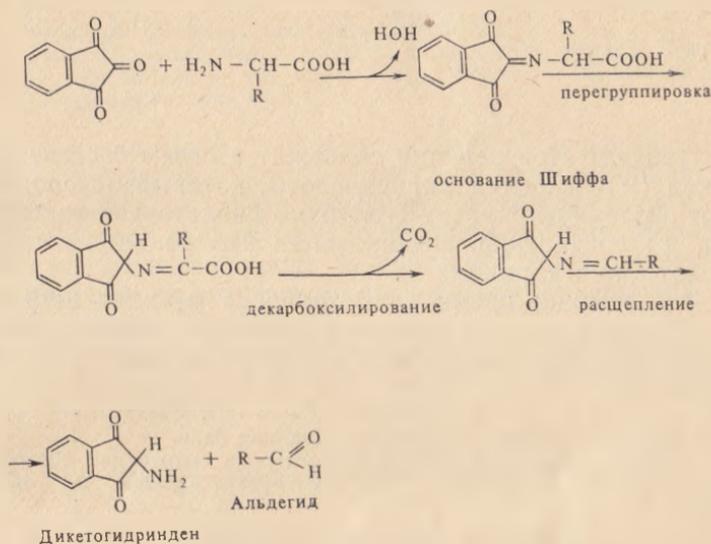
Ход работы. Реакция с биуретом. В сухую пробирку берут немного (0,5 г) мочевины и осторожно прокалывают в пламени газовой горелки. Мочевина вначале плавится, при дальнейшем нагревании выделяется аммиак. По охлаждению к сплавленной массе приливают 1—2 мл 10%-ного гидроксида натрия и добавляют несколько капель 1%-ного раствора сульфата меди. После перемешивания развивается сине-фиолетовое окрашивание раствора.

Реакция с белком. К 1—2 мл раствора белка прибавляют двойной объем 30%-ного раствора гидроксида натрия, хорошо перемешивают и добавляют 2—3 капли 1%-ного раствора сульфата меди. Снова тщательно перемешивают. Развивается красно-фиолетовое окрашивание. При малом содержании белка чувствительность реакции можно повысить, наслаивая на раствор белка в щелочи

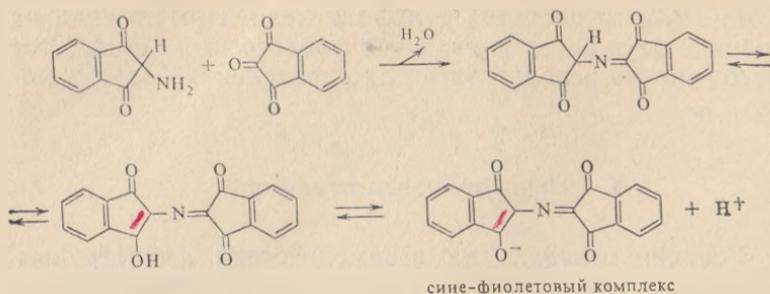
1 мл 1%-ного раствора сульфата меди. При стоянии на границе двух слоев появляется фиолетовое кольцо. Этот метод можно использовать для определения белка в моче. \checkmark

\checkmark Нингидриновая реакция

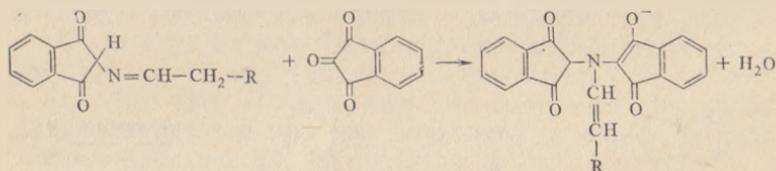
Реакция основана на взаимодействии аминогруппы свободных аминокислот и аминных групп белковой молекулы с нингидрином. Этот процесс протекает в несколько этапов. Сначала в результате взаимодействия аминокислоты с нингидрином возникает основание Шиффа. Затем оно претерпевает перегруппировку, декарбоксилируется и расщепляется на альдегид и аминокетогидринден:



Аминокетогидринден конденсируется еще с одной молекулой нингидрина, и образовавшееся соединение, енолизируясь, переходит в окрашенную форму сине-фиолетового цвета. Эта реакция протекает по нижеприведенной схеме:



В присутствии органических растворителей (аcetона, этанола и др.), на которых готовят раствор нингидрина, реакция протекает так:



Продукт этой реакции содержит в своем составе радикал (R) исходной аминокислоты, который обуславливает различную окраску (голубую, фиолетовую, красную и т. д.) соединений, возникающих при реакции аминокислот с нингидрином.

В настоящее время нингидриновая реакция широко используется как для открытия отдельных аминокислот, так и для определения их количества в биологических объектах.

▣ *Приборы.* Штатив с пробирками. Водяная баня.

Реактивы. Нингидрин, 0,2%-ный раствор в спирте или ацетоне. Раствор белка (приготовление см. на с. 127). Границ, 0,1%-ный раствор.

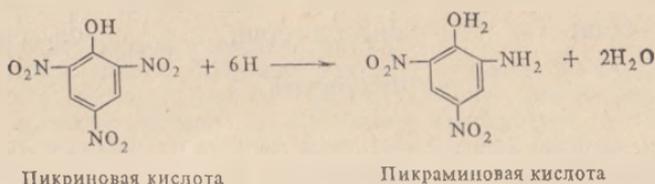
Ход работы. Сначала реакцию проводят с глицином или другой аминокислотой. Наливают в пробирку 2 мл раствора глицина, добавляют 6—8 капель раствора нингидрина и нагревают. Появляется фиолетовое окрашивание.

В другую пробирку наливают 2—3 мл раствора белка, приливают 10—12 капель раствора нингидрина. Рас-

твор перемешивают и подогревают на несколько минут на водяной бане. Наблюдают сине-фиолетовое окрашивание.

✓ Реакция с пикриновой кислотой

Пикриновая кислота при нагревании с белком в щелочной среде восстанавливается в пикраминовую кислоту (красного цвета). Эту реакцию можно проделать и с другими восстановителями, например с глюкозой:



✓ *Приборы.* Штатив с пробирками. Шпатель.

Реактивы. Пикриновая кислота, насыщенный раствор. Раствор белка (приготовление см. на с. 138). Глюкоза, 0,1%-ный раствор. Гидрокарбонат натрия, сухой.

Ход работы. В пробирку наливают 2 мл раствора белка и прибавляют 0,3—0,5 г порошка гидрокарбоната натрия, добавляют 1 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты и нагревают в пламени горелки несколько минут. Желтая окраска раствора постепенно переходит в красную вследствие восстановления пикриновой кислоты в пикраминовую.

В другой пробирке проводят эту же реакцию с 0,1%-ным раствором глюкозы вместо белка. Наблюдают те же явления, что и с белком.

Качественные реакции на аминокислоты

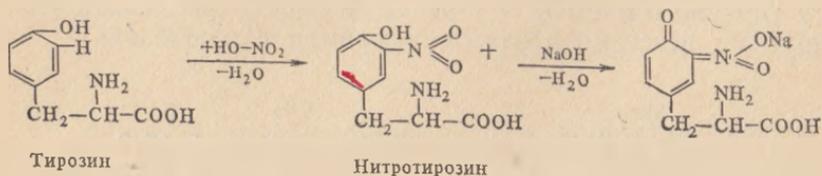
✓ Ксантопротеиновая реакция

Ксантопротеиновая реакция (греч. «ксантос» — желтый) дает возможность обнаружить присутствие в молекуле белка циклических аминокислот — фенилаланина, тирозина и триптофана. Реакцию обуславливают находящиеся в молекуле белков названные аминокислоты, ароматические кольца которых подвергаются нитрова-

нию, в результате образуются нитропроизводные белков, окрашенные в желтый цвет.

Ксантопротеиновую реакцию дают простые ароматические соединения — бензол и его гомологи, фенол и др.

Тирозин при нитровании переходит в нитротирозин, из которого под влиянием щелочи образуется аммонийная соль, имеющая хиноидную группировку:



Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. Фенол, 0,1%-ный раствор. Азотная кислота, концентрированная. Раствор белка (приготовление см. на с. 138). Гидрокарбид натрия, 20%-ный раствор или аммиак.

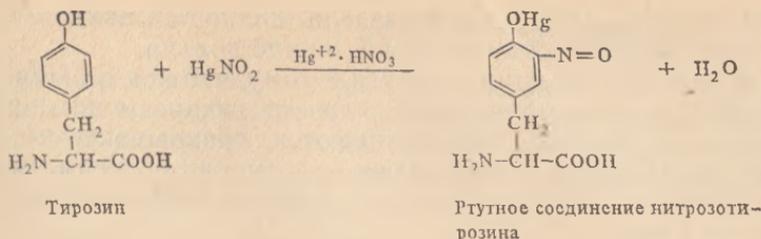
Ход работы. Вначале проводят реакцию с фенолом. В пробирку наливают 2 мл раствора фенола и прибавляют 1—2 мл концентрированной азотной кислоты. При осторожном нагревании появляется желтое окрашивание.

В другую пробирку наливают около 2 мл раствора белка и прибавляют 6—10 капель концентрированной азотной кислоты. Под влиянием кислоты появляется осадок белка, который при нагревании окрашивается в желтый цвет. Затем пробирке дают остыть и осторожно прибавляют избыток гидроксида натрия или аммиака. При этом желтая окраска переходит в оранжевую.

Реакция на тирозин

Реакция обусловлена наличием в молекуле белка тирозина, имеющего в своем составе фенольную группу, которая при нагревании с реактивом Миллона (смесь нитратов и нитритов ртути (1) и (2), растворенных в концентрированной азотной кислоте) дает красную окраску сгустка.

Химизм реакции сводится к образованию нитрозотирозина, который, присоединяя ртуть при нагревании, превращается в ртутную соль красного цвета.



Почти все белки дают миллоновую реакцию, так как в их состав входит аминокислота тирозин, являющаяся одновременно фенолом.

Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. Фенол, 0,1%-ный раствор. Реактив Миллона, который готовят растворением 40 г ртути в 57 мл концентрированной азотной кислоты сначала при комнатной температуре, а затем при слабом нагревании на водяной бане. Полученный раствор разбавляют двумя объемами воды, дают отстояться и сливают с осадка (готовить под тягой!). Раствор белка (приготовление см. на с. 138). Желатин, 1%-ный раствор.

Ход работы. Сначала работу проводят с фенолом. В пробирку наливают 2 мл раствора фенола и 1 мл реактива Миллона и медленно нагревают. Появляется розовое окрашивание.

Затем проводят реакцию с белком. В другую пробирку наливают 2 мл раствора белка и добавляют 6—8 капель реактива Миллона. Вначале появляется осадок белка, а при подогревании он окрашивается в кирпично-красный цвет.

Надо избегать избытка реактива Миллона, так как азотная кислота может дать желтое окрашивание (ксантопротеиновая реакция), маскирующее реакцию на тирозин.

Аналогичным образом проводят реакцию с раствором желатина. Как правило, реакция Миллона с желатином отрицательная.

Реакция на триптофан

Приборы. Штатив с пробирками. Пипетки на 1 мл.

Реактивы. Раствор белка (приготовление см. на с. 138). Сахароза, 10%-ный раствор. Серная кислота, концентрированная.

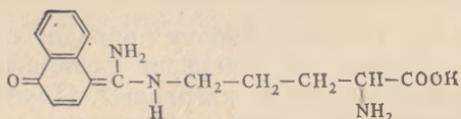
Ход работы. В пробирку наливают около 1 мл раствора белка и добавляют 2 капли раствора сахарозы. Затем пипеткой подслаивают 1 мл концентрированной сер-

ной кислоты. На границе раздела жидкостей появляется вишнево-красное окрашивание в виде кольца.

Сущность реакции сводится к тому, что под влиянием серной кислоты происходит гидролиз сахарозы до моносахаридов, которые обезвоживаются, превращаясь в оксиметилфурфурол. Триптофан, реагируя с оксиметилфурфуолом, образует комплекс, окрашенный в вишнево-красный цвет.

✓ Реакция на аргинин

Аргинин в присутствии α -нафтола окисляется гипобромитом, теряя при этом одну иминогруппу. Окисленный аргинин, соединяясь с α -нафтолом, образует вещество красного цвета, которое, предположительно, имеет следующее строение:



Белки, имеющие в своем составе аргинин, дают красное окрашивание с гипобромитом или гипохлоридом и α -нафтолом в щелочной среде.

Приборы. Штатив с пробирками.

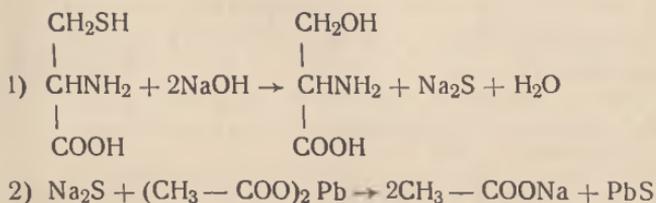
Реактивы. Гидроксид натрия, 10%-ный раствор, α -нафтол, 0,2%-ный раствор, который готовят путем растворения 0,5 г α -нафтола в 50 мл этилового спирта. Перед использованием 5 мл названного основного раствора разводят в 5 раз водой. Бромноватистокислый натрий (гипобромит), который готовят путем растворения 300 г гидроксида натрия в 1 л воды, затем охлаждают и прибавляют (под тягой), осторожно и постоянно помешивая, 50 г чистого брома (около 16 мл). Раствор хранят в темной склянке в течение трех месяцев. Аргинин, 0,01%-ный раствор в 0,1 н. серной кислоте. Раствор белка (приготовление см. на с. 138).

✓ **Ход работы.** В пробирку наливают 2 мл раствора белка. Добавляют 2—3 капли раствора гидроксида натрия и 2 капли α -нафтола. Содержимое пробирки перемешивают и прибавляют каплю гипобромита. Появляется малиново-красное окрашивание.

В таком же порядке проводят реакцию с раствором аргинина. Появляется кирпично-красное окрашивание.

Реакция на серосодержащие аминокислоты ✓

В состав молекул большинства белков входят серосодержащие аминокислоты — цистеин, цистин и метионин. При нагревании со щелочью от этих аминокислот отщепляется сера в виде сероводорода, который обнаруживают в реакции с ацетатом свинца:



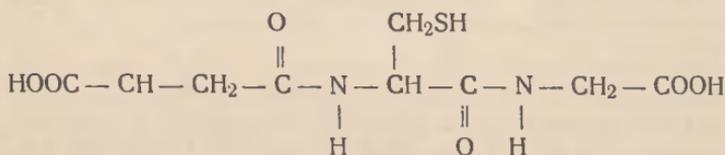
Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. Белок яйца, неразбавленный. Гидроксид натрия, 20%-ный раствор. Свинец уксуснокислый, 05%-ный раствор.

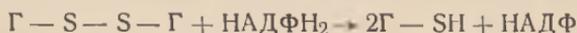
Ход работы. В пробирку наливают 1—2 мл белка и добавляют равный объем гидроксида натрия, нагревают до кипения и прибавляют 1—2 капли уксуснокислого свинца. Наблюдают постепенное потемнение раствора.

Качественная реакция на глутатион

Глутатион представляет собой трипептид, построенный из остатков глутаминовой кислоты, цистеина и глицина:

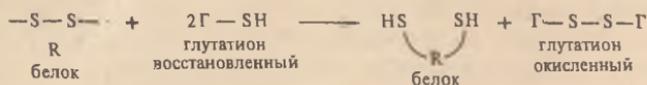


В тканях и клетках животного организма глутатион встречается в восстановленной форме (в виде трипептида — Г—SH) и окисленной (в виде гексапептида — Г—S—SG). Восстановление глутатиона происходит в результате реакции с НАДФН₂:



В организме глутатион окисляется, взаимодействуя с аминокислотами белков. Наиболее важная функция глутатиона — поддержание в белках сульфгидрильных

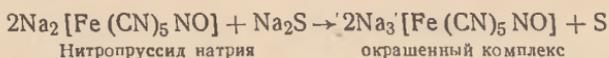
групп цистеина в восстановленном состоянии. Эта реакция идет по следующему уравнению:



Глутатион может служить промежуточным переносчиком атомов водорода в реакциях окисления фосфоглицеринового альдегида и активатором ряда ферментов (протеиназ). На каталазу, фосфатазу и некоторые другие ферменты глутатион оказывает парализующее действие.

Глутатион содержится в крови, печени, мышцах, почках, надпочечниках и других органах. В крови здоровых животных содержится 4,4—32,3 мг% глутатиона, а в крови, например, коров, больных кетозом, — 22,5—23,2 мг%. Эти показатели отражают нарушение окислительно-восстановительных процессов в тканях животного.

Принцип метода. В щелочной среде от глутатиона отщепляется сульфид натрия, который, реагируя с нитропруссидом натрия, образует окрашенное в малиновый цвет соединение:



Приборы. Ступка с пестиком. Стекланный песок. Штатив с пробирками. Пипетки. Спиртовка.

Реактивы. Печень свежая. Сульфат аммония, насыщенный раствор. Нитропруссид натрия, 2%-ный раствор. Аммиак, концентрированный.

Ход работы. В ступке растирают около 1 г печени с небольшим количеством стеклянного песка и 3—4 мл насыщенного раствора сульфата аммония. Содержимое ступки разливают поровну в 2 пробирки. Пробирка 1 служит контролем, ее нагревают до кипения для денатурации белка и глутатиона. В пробирке 2 (опыт) глутатион не разрушен. В обе пробирки добавляют по 2 мл аммиака и по 1 мл раствора нитропруссида натрия. В пробирке 2 наблюдают появление малинового окрашивания.

Диазореакция на тирозин, триптофан и гистидин

Белки с диазореактивом дают оранжево-красное окрашивание. Окраска зависит от образования окрашенных азосоединений с остатками аминокислот — тирозина,

триптофана и гистидина, которые входят в состав белковой молекулы.

Диазореакция используется для количественного и качественного определения тирозина и гистидина в белковых гидролизатах.

Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. Диазореактив: его готовят путем растворения 0,9 г сульфаниловой кислоты в 9 мл концентрированной соляной кислоты и доводят водой до 100 мл. Это основной раствор, который может храниться длительно. Берут 1,5 мл основного раствора сульфаниловой кислоты и наливают в стоящую во льду мерную колбу на 50 мл; добавляют 1,5 мл свежеприготовленного раствора азотистокислого натрия. Спустя 5 мин добавляют при взбалтывании еще 6 мл 5%-ного раствора азотистокислого натрия. Через минуту постепенно добавляют (при охлаждении) воду до метки. Взбалтывают и оставляют раствор на льду на 15 мин. Раствор может сохраняться на льду в течение суток. Тирозин, 0,01%-ный раствор в 0,1 н. серной кислоте. Раствор белка (приготовление см. на с. 138). Карбонат натрия, 10%-ный раствор.

Ход работы. Наливают в пробирку 2 мл раствора тирозина, 0,5 мл раствора соды и 1 мл диазореактива. Появляется оранжево-красное окрашивание.

Аналогично проводят реакцию с белком, пользуясь раствором белка вместо тирозина. При этом также получается оранжево-красное окрашивание.

Обнаружение углеводного компонента в белках

Некоторые белки (гликопротеиды, нуклеопротеиды и др.) в своем составе содержат углеводные компоненты. Также белки в присутствии концентрированной серной кислоты дают характерное для углеводов фиолетовое окрашивание с α -нафтолом или красное с тимолом. Эта окраска появляется в результате взаимодействия фурфурола и оксиметилфурфурола с α -нафтолом или тимолом, которые образуются под влиянием концентрированной серной кислоты (дегидратация моносахаридов).

Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. α -Нафтол, 0,2%-ный раствор, который готовят растворением 0,5 г α -нафтола в 50 мл этилового спирта. Тимол, 1%-ный раствор в спирте. Кислота серная, концентрированная. Глюкоза, 0,1%-ный раствор. Раствор белка (приготовление см. на с. 138).

Ход работы. В две пробирки наливают по 2 мл раствора глюкозы. В первую пробирку добавляют 4—6 капель раствора α -нафтола, а в другую пробирку — 4—6 капель раствора тимола. В обе пробирки осторожно подслаивают по 1—2 мл концентрированной серной кислоты. Наблюдают фиолетовое (в случае α -нафтола) и красное (в случае тимола) окрашивание на границе раздела серной кислоты и раствора глюкозы.

Проводят те же реакции с раствором белка. Отмечают положительную реакцию на углеводный компонент белков.

СЛОЖНЫЕ БЕЛКИ (ПРОТЕИДЫ)

Сложные белки построены из простых белков и небелковых компонентов (простетическая группа). В зависимости от природы простетической группы (нуклеиновая кислота, красящее вещество, углевод, липиды, витамин, металл и др.) сложные белки разделяются на следующие группы: неуклеопротеиды, хромопротеиды, гликопротеиды, липопротеиды, металлопротеиды, фосфопротеиды и белки-ферменты.

НУКЛЕОПРОТЕИДЫ

Это сложные белки, состоящие из простых белков типа гистонов и протаминов, реже альбуминов и глобулинов, соединенных с нуклеиновой кислотой. Различают два вида нуклеиновых кислот: рибонуклеиновую и дезоксирибонуклеиновую.

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) входит в состав хромосом ядра клеток, а рибонуклеиновая кислота (РНК) существует в виде трех типов (информационная, транспортная и рибосомная), которые сосредоточены как в ядре, так и цитоплазме. В химическом отношении нуклеиновые кислоты представляют собой полинуклеотиды. Каждый мононуклеотид состоит из пуринового или пиримидинового основания, углевода пентозы (рибоза, дезоксирибоза) и фосфорной кислоты.

В состав РНК в качестве углевода входит рибоза, а из пуриновых и пиримидиновых оснований — аденин, гуанин, цитозин и урацил.

В состав ДНК вместо рибозы входит дезоксирибоза, а вместо урацила — тимин.

ДНК — двухцепочный полинуклеотид, а РНК — одноцепочный.

Нуклеопротеиды растворимы в щелочной среде и хорошо осаждаются кислотами. Дезоксирибонуклеопротеиды осаждаются при малых концентрациях солей, но растворимы в крепких солевых растворах.

При кипячении нуклеопротеидов с разбавленными кислотами происходит их гидролитический распад: сначала отщепляется белок, а нуклеиновые кислоты деполимеризуются, затем гидролизуются мононуклеотиды, отщепляя углевод пентозу и фосфорную кислоту. Пиримидиновые основания отщепляются только при глубоком гидролизе нуклеиновых кислот.

Выделение дезоксирибонуклеопротеида

Дезоксирибонуклеопротеиды — главная составная часть клеточных ядер. Их еще называют ядерными белками или нуклеопротеидами. Лучше всего получать дезоксирибонуклеопротеид из тканей, богатых клеточными ядрами (лейкоциты, тимоциты, сперматозоиды, лимфоузлы, селезенка, печень, молочная железа и белковый отдел яйцевода птиц). Характерное свойство ядерных белков — способность их образовывать очень вязкие растворы в крепких растворах солей (хлорид натрия и др.) и нерастворимость в разведенных солевых растворах.

При осаждении из солевых растворов ядерные белки выпадают в виде нитей. Они составляют главную часть так называемых структурных белков различных тканей.

Приборы. Ступка с пестиком. Центрифуга на 2500—3000 оборотов. Мерные центрифужные пробирки (10 мл). стакан на 300—400 мл. Цилиндр на 100 мл. Палочка деревянная с насечками. Часовое стекло. Весы технические или роговые.

Реактивы. Селезенка, лимфоузел, тимус или печень (кролика, быка). Хлорид натрия, 1 н. раствор.

Ход работы. 2 г ткани предварительно измельчают ножницами на часовом стекле, затем растирают в ступке.

Небольшими порциями в ступку добавляют 70—80 мл 1 н. раствора хлористого натрия, тщательно растирая содержимое 10—15 мин.

Полученный вязкий раствор разливают в мерные центрифужные пробирки (по 10 мл) и центрифугируют в течение 10 мин при 2500—3000 об/мин. Затем центрифугат сливают в цилиндр и измеряют его объем.

Отмеривают шестикратный объем воды (по отношению к центрифугату), наливают ее в стакан и, медленно вращая в ней деревянную палочку, вливают центрифугат.

Наматывают на палочку образующиеся нити ядерного нуклеопротеида. Осторожно переносят их в другую пробирку и используют для реакции на ДНК.

Реакция на ДНК

ДНК дает ряд цветных реакций, по которым ее можно отличить от РНК. Эти реакции обусловлены наличием в молекуле ядерной нуклеиновой кислоты дезоксирибозы. Для обнаружения ДНК наиболее широко используют реакции с дифениламином ($C_6H_5-NH-C_6H_5$), который дает с дезоксирибозой и ДНК синее окрашивание. Рибоза и РНК с дифениламином дают зеленую окраску.

Приборы. Штатив с пробирками. Водяная баня.

Реактивы. Дифениламиноновый реактив, который готовится растворением 1 г дифениламина в ледяной уксусной кислоте, с последующим добавлением 2,75 мл концентрированной серной кислоты. Гидроксид натрия, 0,4%-ный раствор.

Ход работы. Немного осадка дезоксирибонуклеопро-теида переносят в пробирку и растворяют в 1 мл едкого натрия. Добавляют равный объем дифениламинового реактива (до растворения осадка) и ставят в кипящую водяную баню на 15—20 мин. Наблюдается синее окрашивание.

Получение нуклеопро-теида из дрожжей

Дрожжи богаты нуклеопро-теидами рибозного типа. Нуклеопро-теид можно извлечь из разрушенных клеток дрожжей при щелочной реакции раствора и осадить подкислением.

Приборы. Ступка с пестиком. стакан или колба на 50—100 мл. Цилиндр на 100 мл. Центрифуга на 2500—3000 оборотов. Пробирки центрифужные, мерные (на 10 мл). Пипетка на 10 мл. Стеклопалочка.

Реактивы. Дрожжи прессованные. Эфир диэтиловый. Песок стеклянный. Гидроксид натрия, 0,4%-ный раствор. Уксусная кислота, 5%-ный раствор.

Ход работы. В ступку помещают 5 г дрожжей, добавляют 10 капель эфира и 10 капель воды. Вносят щепотку песка и тщательно растирают. К гомогенату приливают 30 мл раствора гидроксида натрия и продолжают растирание в течение 15 мин.

Содержимое ступки разливают в три центрифужные пробирки, доводят объем до 10 мл. Центрифугируют в течение 5—10 мин при 2500 об/мин.

Центрифугат из всех пробирок сливают в один стакан, постоянно помешивая палочкой, приливают ра-

створ уксусной кислоты (12 мл) до полного осаждения нуклеопротеида.

Осадок нуклеопротеида собирают при помощи повторного центрифугирования и используют для реакции гидролиза.

Гидролиз нуклеопротеида

Эту реакцию можно осуществить путем кипячения нуклеопротеидов с 5%-ной серной кислотой в течение 1 ч. Нуклеопротеид при этом расщепляется на белок и нуклеиновую кислоту, которая распадается на отдельные мононуклеотиды, а затем отщепляются пуриновые основания (аденин, гуанин) и фосфорная кислота. Белок за это время также подвергается частичному гидролизу до низкомолекулярных полипептидов и аминокислот. В гидролизате последовательно можно определить белок, пуриновые основания, пентозу и фосфорную кислоту.

Приборы. Штатив с пробирками. Колба с обратным холодильником. Воронка с фильтром. Стакан химический на 100 мл.

Реактивы. Серная кислота, 5%-ный раствор.

Ход работы. Нуклеопротеид, полученный из дрожжей, переносят в колбочку для гидролиза и добавляют 15 мл 5%-ного раствора серной кислоты. Колбочку закрывают пробкой с обратным холодильником и осторожно кипятят в течение 1 ч.

После охлаждения гидролизат отфильтровывают в химический стакан и используют для анализа продуктов гидролиза.

Обнаружение простых белков

Для этой цели можно провести две реакции — биуретовую и на обнаружение тирозина (реакция Миллона).

Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. Гидроксид натрия, 10%-ный раствор. Сульфат меди, 1%-ный раствор. Реактив Миллона (приготовление см. на с. 143).

Ход работы. В пробирку наливают 0,5 мл профильтрованного гидролизата, нейтрализуют по лакмусу едким натрием и добавляют еще 0,5 мл, затем 2—3 капли сернокислой меди. Пробирку встряхивают и наблюдают положительную биуретовую реакцию (розовая или фиолетовая окраска).

В другую пробирку наливают 1 мл гидролизата и добавляют 0,3 мл реактива Миллона и подогревают. Осадок окрашивается в розовый или кирпично-красный цвет.

Обнаружение пентоз

Проводят одну из реакций окисления альдопентоз. Для этого удобно пользоваться реакцией с фелинговой жидкостью.

Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. Гидроксид натрия, 10%-ный раствор. Реактив Фелинга (приготовление см. на с. 75).

Ход работы. В пробирку наливают 0,5 мл гидролизата и нейтрализуют по лакмусу раствором щелочи.

К нейтрализованному гидролизату добавляют равный объем реактива Фелинга, пробирку встряхивают и нагревают верхний слой. Наблюдают появление желто-красного осадка закиси и окиси меди.

Обнаружение пуриновых оснований

Сущность реакции сводится к образованию серебряных солей пуриновых оснований, которые выпадают на дно пробирки в виде осадка.

Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. Аммиак, концентрированный. Аммиачный раствор серебра (приготовление см. на с. 75).

Ход работы. В пробирку наливают 2 мл гидролизата нуклеопотеида, добавляют 5—6 капель концентрированного аммиака до щелочной реакции на лакмус, затем приливают 0,5 мл аммиачного раствора серебра. Образуется хлопьевидный осадок серебряных солей пуриновых оснований, который постепенно оседает на дно.

Обнаружение фосфорной кислоты

Приборы. Штатив с пробирками. Пипетка на 5 мл с делениями.

Реактивы. Молибденовокислый аммоний, который готовят путем растворения 12,5 г $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ в 250 мл в колбе на 500 мл. К полученному раствору добавляют 250 мл 10 н. серной кислоты. Аскорбиновая кислота, 0,04%-ный раствор, который готовится перед занятиями.

Ход работы. В пробирку наливают 2 мл кислого гидролизата, добавляют 3 мл молибденовокислого аммония

и 1 мл раствора аскорбиновой кислоты. Хорошо перемешивают и наблюдают появление синего окрашивания смеси, которое можно ускорить подогреванием на водяной бане до 40°C .

ХРОМОПРОТЕИДЫ

Хромопротеиды — сложные белки, состоящие из простого белка типа глобулинов и простетической группы, которая является окрашенным веществом — пигментом. Простетические группы хромопротеидов отличаются по своему строению. Многие из них представляют собой металлопорфирины, содержащие в своем составе железо, медь и другие металлы.

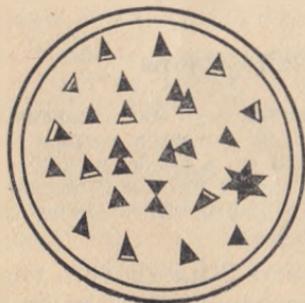
Представителями хромопротеидов являются: гемоглобин крови, миоглобин красных скелетных мышц и ряд ферментов (цитохромы митохондрий, каталаза, рибофлавопротеиды или аэробные дегидрогеназы и др.).

Получение кристаллов оксигемоглобина

Гемоглобин представляет собой хромопротеид, в составе которого имеется белок глобин и окрашенное вещество — гем. Последний является протопорфирином, в кольцо которого включен атом железа.

Приборы. Штатив с пробирками. Микроскоп. Центрифуга. Стекланный стакан на 100 мл. Воронка диаметром 6—8 см. Банка с притертой пробкой на 50 мл. Пипетка градуированная на 2 мл. Предметные и покровные стекла.

Реактивы. Свежая или стабилизированная кровь кролика, лошади или другого вида животных. Эфир диэтиловый. Сульфат аммония, насыщенный раствор. Хлорид натрия, 0,9%-ный раствор. Этанол, 96%-ный. Уксусная кислота ледяная с хлоридом натрия (в 100 г кислоты 0,1 г хлорида натрия).



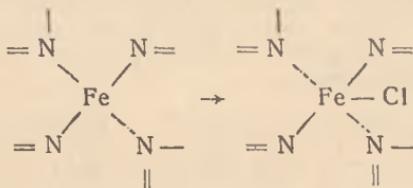
Ход работы. К 5 мл крови прибавляют 1 мл смеси воды и эфира (1:1) и перемешивают до полного гемолиза. Красную прозрачную жидкость называют гемолизированной кровью. К жидкости прибавляют равный объем (6 мл) насы-

Рис. 13. Кристаллы гемоглобина морской свинки

щенного раствора сульфата аммония, перемешивают и тотчас центрифугируют или отфильтровывают от выпавшего осадка белков. Фильтрат оставляют на холоде в закрытой стеклянной бане на 1 ч или на сутки. По истечении этого срока каплю фильтрата наносят на предметное стекло, накрывают покровным и рассматривают под микроскопом. Кристаллы оксигемоглобина в виде призм или пластинок разной формы (в зависимости от вида животного) красного цвета. Форма кристаллов оксигемоглобина морской свинки представлена на рис. 13.

Реакция получения гемина

Гемоглобин при нагревании в кислой среде распадается, и под влиянием хлорида натрия гем превращается в гемин, атом железа которого связан с хлором. При этом железо из двухвалентного превращается в трехвалентное:



Приборы. Предметное и покровное стекла. Иглы пункционные. Микроскоп.

Реактивы. Хлорид натрия, кристаллический. Уксусная кислота, ледяная.

Ход работы. На предметное стекло наносят каплю крови и высушивают при температуре не выше 60° С. К подсушенной крови прибавляют несколько кристаллов хлористого натрия и 1—2 капли ледяной уксусной кислоты, перемешивают, затем прикрывают покровным стеклом и осторожно нагревают до начала кипения.

По мере охлаждения выделяются кристаллы гемина в виде коричневых ромбоидальных табличек, которые рассматривают под микроскопом и зарисовывают.

Эта реакция может быть использована для исследования старых кровавых пятен с целью подтверждения наличия крови в объекте.

ГЛИКОПРОТЕИДЫ

Это сложные белки, состоящие из простых белков и простетической группы, в состав которой входят углеводы типа гомополисахаридов и гетерополисахаридов. Простетические группы некоторых гликопротеидов называются мукополисахаридами. К мукополисахаридам относят гепарин, гиалуроновую, хондроитинсерную и сиаловые кислоты.

Выделение муцина из слюны

Муцины находят в слюне, в слизи пищеварительного тракта и других органов.

Муцин — белок с кислыми свойствами, нерастворим в воде, но хорошо растворим в щелочах и соляной кислоте. Из щелочного раствора муцин осаждается уксусной кислотой, избыток которой не растворяет муцин.

Приборы. Штатив с пробирками. Стеклянные палочки.

Реактивы. Уксусная кислота, 1%-ный раствор. Гидроксид натрия, 10%-ный раствор. Соляная кислота, 0,1%-ный раствор. Сульфат меди, 1%-ный раствор, α -нафтол, 0,2%-ный раствор. Серная кислота, концентрированная.

Ход работы. В три пробирки собирают по 1—2 мл слюны и добавляют в каждую по каплям 1%-ный раствор уксусной кислоты до появления сгустков муцина. Осадок муцина в пробирках осторожно промывают водой, придерживая сгусток палочкой.

После промывания к сгустку муцина в первой пробирке добавляют 1 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия, размешивают и после растворения проводят биуретовую реакцию. Для этой цели добавляют еще 5—6 капель гидроксида натрия и 1—2 капли сульфата меди. Пробирку встряхивают и наблюдают появление розовой или фиолетовой окраски.

Во вторую пробирку прибавляют 1 мл 0,1%-ного раствора соляной кислоты и наблюдают растворение осадка.

В третью пробирку к сгустку муцина добавляют 5—6 капель α -нафтола, перемешивают и осторожно добавляют концентрированную серную кислоту. На границе двух слоев жидкости появляется фиолетовое окрашивание. Реакция обусловлена наличием в простетической группе муцина моносахаридов и их производных, кото-

рые под влиянием серной кислоты превращаются в фурфурол и оксиметилфурфурол, а последние с α -нафтолом дают окрашенные соединения.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА БЕЛКОВ В ТКАНЯХ И НЕКОТОРЫХ ПРОДУКТОВ ИХ ОБМЕНА

Ряд методов количественного учета белков основан на определении в навеске ткани количества общего азота. Общий азот в белках животных тканей и органов — величина довольно постоянная и составляет 15—17% или в среднем 16%. Исходя из этого показателя 16 г азота соответствуют 100 г белка, а 1 г азота — 6,25 г белка ($100:16 = 6,25$). Последняя цифра есть средний белковый коэффициент. Умножая найденное процентное содержание азота в ткани на 6,25, узнают процент белка в ней.

Определение белка по азоту методом Кьельдаля

Метод определения азота по Кьельдалю в тканях, органах, биологических жидкостях и водных экстрактах применяется в трех модификациях: макрометод, полумакрометод и микрометод. Эти методы используются в зависимости от количества белка и небелковых азотистых веществ в исследуемом объекте, количества материала и целей анализа.

Принцип метода. Белок или ткань с белком сжигают в присутствии концентрированной серной кислоты и катализаторов, в результате содержащийся в нем аминный, амидный, иминный и другие виды азота превращаются в аммиак, а последний — в сульфат аммония. Образовавшуюся аммиачную соль разлагают едкой щелочью и выделившийся аммиак отгоняют в титрованную серную кислоту, взятую в избытке. Оставшуюся серную кислоту оттитровывают щелочью и по количеству серной кислоты, связавшейся аммиаком, рассчитывают процентное содержание азота в исследуемом материале.

Приборы. Ножницы. Скальпель. Пипетка на 1 мл с делениями. Торзионные весы. Битые стекла размером 1—1,5 см². Колбы Кьельдаля на 50 мл (для минерализации). Колбы Кьельдаля на 150—200 мл (для отгонки). Бюретка на 20 мл. Перегонный аппарат Кьельдаля (рис. 14). Кусочки пемзы или стеклянные трубочки.

Реактивы. Серная кислота, концентрированная. Серная кислота, 0,1 н. раствор. Гидроксид натрия, 0,1 н. раствор. Гидроксид натрия, 33—40%-ный раствор. Катализаторы (пергидроль или селен). Индикатор метилрот.

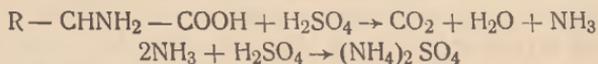
Ход работы. Работу по определению общего азота в тканях можно разделить на три этапа.

Первый этап. Минерализация. В колбу Кьельдаля на 50 мл вносят 0,2 мл сыворотки крови или отвешивают 150—250 мг ткани (печень, мышца, почка и др.) и при помощи кусочка стекла навеску опускают на дно колбы.

Добавляют 1—2 мл концентрированной серной кислоты и колбу ставят на огонь (плитка или газовая горелка с песочной баней) в вытяжном шкафу и нагревают.

Когда смесь приобретает коричневую окраску и исчезнут кусочки ткани, колбу снимают с огня, дают немного остыть и добавляют 5—6 капель пергидроля, встряхивая содержимое колбы, и ставят снова на огонь. Пергидроль добавляют еще 1—2 раза до получения бесцветного минерализата.

Если в качестве катализатора используют селен, то небольшое количество его добавляют после внесения 1—2 мл серной кислоты, т. е. в начале сжигания. Схема химизма первого этапа:



Второй этап. Отгонка аммиака. Вторая часть работы выполняется в перегонном аппарате, схема которого дана на рис. 14.

Жидкость из колбы для сжигания разбавляют водой и переносят количественно в перегонную колбу 1 путем 3—4-кратного смывания дистиллированной водой. Далее доводят общий объем до половины колбы, затем вносят несколько кусочков пемзы или стеклянных трубочек для равномерного кипения.

Вносят 2—4 капли индикатора — метилрот (реакция кислая), отверстие колбы закрывают пробкой, в которую вставлены воронка и каплеуловитель 2, соединенный с холодильником 3. Одновременно с этим в приемник 5 отмеривают 20 мл (точно!) 0,1 н. раствора серной кислоты и прибавляют 2—4 капли индикатора метилрота. В этот раствор кислоты опускают конец удлинителя (форштосс) 4, который другим своим концом присоединен к холодильнику 3. Через воронку в перегонную колбу добавляют 33—40%-ный раствор едкого натра по каплям до тех пор, пока жидкость не приобретет желтой окраски (реакция щелочная).

Включают холодильник и, нагревая колбу, начинают отгонку аммиака. Жидкость в перегонной колбе 1 кипятят до полной отгонки аммиака, что узнают по отсутствию изменения цвета красной лакмусовой бумажки при нанесении на нее капли жидкости, вытекающей из холодильника 3. Схема химизма второго этапа:

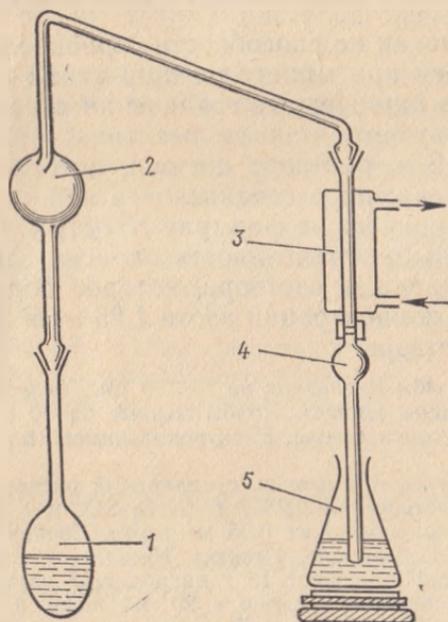


Рис. 14. Схема перегонного аппарата Кьельдаля:

1 — перегонная колба, 2 — насадка с каплеуловителем, 3 — холодильник, 4 — удлинительная приставка, 5 — приемная колба

Третий этап. Титрование и расчет. Прекращают нагревание отгонной колбы и разъединяют приемник с холодильником.

В бюретку наливают 0,1 н. раствор едкого натра и оттитровывают остаток серной кислоты в колбе-приемнике, не связанной с аммиаком. Расчет азота ведут по следующей формуле:

$$x = \frac{(a - b) \cdot 1,4 \cdot 100}{a},$$

где x — количество азота в мг% в исследуемом объекте; a — количество 0,1 н. раствора серной кислоты, находившейся в приемнике; b — количество 0,1 н. раствора гидроксида натрия, пошедшее на нейтрализацию серной кислоты, не связавшейся с аммиаком; 1,4 — мг азота, которому соответствует 1 мл 0,1 н. раствора серной кислоты; c — навеска ткани, мг; 100 — для пересчетов в мг%.

Колориметрическое определение азота в тканях

Метод основан на способности серноокислого аммония, образующегося при минерализации ткани с серной кислотой, давать окрашенные соединения с реактивом Несслера. Действующее начало реактива Несслера — иодная ртуть в 2 н. растворе щелочи, которая образует с аммиаком окрашенное соединение в коллоидной форме, имеющее эмпирическую формулу NH_2HgI_3 . Цвет раствора буро-красный, интенсивность окраски зависит от количества аммиака в растворе, которое подчиняется закону Бера до концентрации азота 1,25 мг в 50 мл анализируемого раствора.

Приборы. Колбы Кьельдаля на 25—30 мл. Торзионные весы. Колориметр. Ножницы. Пинцет. Колбы мерные на 50 мл. Пипетки на 1 мл и 5 мл. Кусочки стекла. Электроколориметр или фотоэлектроколориметр.

Реактивы. Сульфат аммония, стандартный раствор, который готовится путем растворения 0,2357 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в 1 л воды. Один мл такого раствора содержит 0,05 мг азота. Серная кислота, концентрированная. Пергидроль. Реактив Несслера, который готовят так: в один стакан помещают 15 г двуиодистой ртути, а в другом растворяют 10 г иодистого калия в 20 мл воды и выливают его в стакан с двуиодистой ртутью. Размешивают стеклянной палочкой до растворения ртути.

В мерной колбе на 500 мл растворяют 40 г едкого натра в 250—300 мл воды. Раствор охлаждают и вливают в него раствор двуиодистой ртути в иодистом калии. Доводят до метки водой и ставят в темное место на 2—3 суток. После отстаивания прозрачный, слегка желтоватый раствор декантированием освобождают от желтого осадка — избытка солей ртути.

Ход работы. На торзионных весах отвешивают навеску ткани в 100—150 мг. При помощи кусочка стекла помещают в колбу Кьельдаля, заливают концентрированной серной кислотой в количестве 0,5 мл и ставят на песочную баню для сжигания. Сыворотку крови можно брать 0,2—0,3 мл.

Когда содержимое колбы приобретает однородную коричневую окраску, снимают с огня, немного охлажда-

ют, добавляют 3—4 капли пергидроля и снова ставят на плитку для сжигания, повторяя эту процедуру 1—2 раза, до получения прозрачной смеси.

В таких условиях сжигают и холостую пробу, т. е. 0,5 мл серной кислоты и катализатор — 3—4 капли пергидроля. Эта проба служит контролем.

После минерализации содержимое колбы количественно переносят в мерные колбы на 50 мл и доливают водой до $\frac{2}{3}$ объема колбы. В колбу с холостой пробой добавляют 5 мл стандартного раствора серноокислого аммония, а затем в обе колбы добавляют по 5 мл реактива Несслера, стараясь не лить по стенке колбы. Раствор приобретает желтый или буро-красный цвет. Затем доводят до метки водой и колориметрируют¹.

В случае использования фотоэлектроколориметра в холостую пробу стандартный раствор не заливают, а используют его при фотоколориметрии в качестве растворителя с реактивом Несслера. Для фотоколориметрии заранее готовят стандартную кривую, как и в других случаях. Берут ряд колб (до 15), вносят в них по 2 капли концентрированной серной кислоты, а затем стандартный раствор сульфата аммония с интервалом в 1 мл, добавляют воды до $\frac{2}{3}$ объема и 5 мл реактива Несслера. Одна колба готовится холостой и против нее фотометрируют.

Дальше поступают в соответствии с правилами фотоэлектроколориметрии.

Расчет азота в случае визуальной электроколориметрии ведется по формуле

$$x = \frac{0,25 \cdot h_1 \cdot 50 \cdot 100}{c \cdot h_2 \cdot 5}$$

где x — общий азот в мг%, 0,25 — количество (мг) азота, которому соответствует взятое количество стандарта, 1 мл которого содержит 0,05 мг азота; h_1 — высота столба стандарта в колориметре; h_2 — высота столба исследуемой жидкости; 50 — количество жидкости, в которой растворен весь азот навески, 100 — для пересчета азота в мг%; c — навеска ткани, мг; 5 — количество жидкости, взятое из общего объема для исследования на азот.

Колориметрическое определение небелкового (остаточного) азота в тканях

Небелковый азот тканей представлен низкомолекулярными азотистыми соединениями, являющимися продуктами промежуточного и конечного обмена белков. К таким веществам относятся свободные аминокислоты, низкомолекулярные полипептиды, мононуклеотиды, креатин, креатинин, аммиак, мочевина, мочевоая кислота, гиппуровая и орнитуровая кислоты, аллантаин, парные азотистые соединения и др. В крови сельскохозяйственных животных эти вещества в пересчете на азот составляют 20—40 мг%, в печени — 150—200 мг%, в мышцах — 300—500 мг%. Цифры меняются в зависимости от возраста животного, физиологического состояния организма и функциональной активности ткани.

Приборы. Штатив с пробирками. Колбы Кьельдаля на 25 мл. Электроколориметр или фотоэлектроколориметр. Воронка с фильтром. Микропипетка на 0,2 мл. Пипетка на 1 мл с делениями. Пипетка на 1, 2 и 5 мл. Пипетка на 5 мл с делениями. Мерные колбы на 25 мл. Игла для взятия крови. Часовое стекло. Ножницы кривые. Конические колбы на 50 или 100 мл.

Реактивы. Этиловый спирт, 96%-ный. Трихлоруксусная кислота, 20%-ный раствор. Серная кислота, концентрированная. Пергидроль. Сульфат аммония, стандартный раствор (приготовление см. на с. 160). Реактив Несслера (приготовление см. на с. 160).

Определение остаточного азота крови

Ход работы. В пробирку отмеривают 1,8 мл дистиллированной воды. Берут из уха кролика микропипеткой 0,2 мл крови (можно брать цитратную или оксалатную кровь), обтирают кончик микропипетки кусочком ваты от приставшей снаружи крови и выдувают кровь в пробирку с водой. Микропипетку для полного смыва крови трижды промывают, осторожно набирая и выпуская обратно в пробирку ее содержимое.

В пробирку приливают 2 мл 20%-ной трихлоруксусной кислоты, перемешивают палочкой и оставляют стоять 5 мин. Жидкость приобретает коричневый оттенок.

Содержимое пробирки отфильтровывают от выпавших в осадок белков через складчатый, смоченный водой фильтр в другую сухую пробирку.

Отмеривают 2 мл фильтрата (что соответствует 0,1 мл крови) в колбу Кьельдаля или жаростойкую пробирку,

добавляют две капли концентрированной серной кислоты и нагревают до появления белых паров.

Затем колбу снимают с огня, охлаждают и добавляют две капли пергидроля, затем нагревают до обесцвечивания и просветления жидкости.

По охлаждении колбы содержимое ее разбавляют 2—3 мл воды и количественно переносят в мерную колбу (или пробирку), смывая остаток со стенок колбы небольшими порциями воды. Доводят общий объем водой до $\frac{2}{3}$ колбы, добавляют 3 мл реактива Несслера и воду до метки.

В другую мерную колбу отмеривают 1 мл стандартного раствора сернистого аммония, одну каплю концентрированной серной кислоты, приливают воду до $\frac{2}{3}$ объема, затем добавляют 3 мл реактива Несслера и доводят до метки водой. Содержимое колбочек перемешивают и колориметрируют в электроколориметре или фотоэлектроколориметре.

Если колориметрия проводилась электроколориметром, то расчет ведут по формуле

$$x = \frac{0,05 \cdot h \cdot 1000}{h_1}$$

где x — остаточный азот, мг%; 0,05 — содержимое азота в 1 мл стандартного раствора сульфата аммония; h — высота столба стандартной жидкости; h_1 — высота столба исследуемой жидкости; 1000 — для перевода в мг%.

Определение небелкового азота в тканях

Кусочек ткани измельчают на часовом стекле, можно дополнительно растереть в ступке.

На торзионных весах отвешивают навеску для печени до 1000 мг, для мышц 500 мг, помещают в коническую колбу на 50—100 мл и заливают 20 мл (точно!) дистиллированной воды. Хорошо перемешивают и оставляют на 25—30 мин.

После этого добавляют 5 мл 20%-ной трихлоруксусной кислоты и оставляют на 5—10 мин, затем фильтруют через складчатый бумажный фильтр. 2 мл фильтрата помещают в колбу Кьельдаля, добавляют 0,1 мл концентрированной серной кислоты и минерализуют в песочной бане.

Далее, с появлением тяжелых белых паров колбу снимают с огня, дают немного остыть и добавляют 1—2 кап-

ли пергидроля. Затем снова ставят на песочную баню и продолжают сжигание до обесцвечивания жидкости.

В аналогичных условиях сжигают и холостую пробу, т. е. пробу с 0,1 мл серной кислоты и 2 мл воды.

По окончании минерализации содержимое колб количественно переносят в мерные колбы на 25 мл путем многократных смывов небольшими порциями воды, количество которой в колбе доводят до $\frac{2}{3}$ ее объема.

В холостую пробу добавляют 2 мл стандартного раствора сернокислого аммония, а в обе колбы наливают по 5 мл реактива Несслера, доводят водой до метки, перемешивают и колориметрируют или фотоколориметрируют.

В случае определения при помощи электроколориметра расчет ведут по следующей формуле:

$$x = \frac{0,10 \cdot h \cdot 25 \cdot 100}{c \cdot h_1 \cdot 2}$$

где x — количество небелкового азота, в мг%; 0,10 — количество (мг) азота, которому соответствует концентрация стандарта в 2 мл; h — высота столба стандарта в колориметре; 25 — общее количество тканевого экстракта; h_1 — высота столба исследуемой жидкости в колориметре, 100 — для пересчета в мг%; c — навеска ткани, мг; 2 — количество фильтра, взятое для минерализации.

Зная количество общего азота в ткани и количество небелкового азота, можно определить белковый азот: общий азот — небелковый азот = белковый азот.

Количественное определение белка биуретовой реакцией

Метод основан на способности белков в щелочной среде давать с раствором сульфата меди фиолетовое окрашивание, интенсивность которого зависит от количества белка (пептидных связей) в исследуемой ткани.

Приборы. Штатив с пробирками. Воронки с фильтрами. Электроколориметр. Пипетки на 1 и 10 мл.

Реактивы. Желатин, 10%-ный раствор. Гидроксид натрия (калия), 30%-ный раствор. Сульфат меди, 1%-ный раствор. Белок яйца, разбавленный водой в 4 раза.

Ход работы. В одну пробирку наливают 10 мл стандартного раствора желатина, в другую — 10 мл разбавленного яичного белка. В обе пробирки добавляют по 1

мл 30%-ного раствора щелочи и по 1 мл 1%-ного раствора сернистой меди, хорошо перемешивают, фильтруют и колориметрируют.

Количество белка (%) в растворе неизвестной концентрации вычисляется по формуле

$$x = \frac{1 \cdot h \cdot 4}{h_1},$$

где x — количество белка, %; 1 — коэффициент; h — толщина слоя стандартного раствора белка; h_1 — толщина слоя исследуемого раствора; 4 — степень разведения яичного белка.

Количественное определение белка с азотной кислотой в биологических жидкостях

Метод основан на свойстве концентрированной азотной кислоты осаждать белок за 2 мин — при наличии белка в растворе не менее чем 0,0033%.

Приборы. Штатив с пробирками. Пипетки на 1 и 2 мл.

Реактивы. Азотная кислота, концентрированная. Раствор белка, приготовленный путем отделения белка от двух куриных яиц и растворения их в 500 мл воды, который нужно профильтровать через вчетверо сложенную марлю.

Ход работы. Нумеруют 5 или 6 пробирок. В первую пробирку наливают 1 мл раствора белка, а в остальные по 1 мл дистиллированной воды. Во вторую пробирку добавляют 1 мл раствора белка, перемешивают с водой, набирают 1 мл смеси и переносят в третью пробирку, перемешивают; набирают 1 мл из третьей пробирки и переносят в четвертую, перемешивают; набирают 1 мл из четвертой пробирки и переносят в пятую, перемешивают; из пятой пробирки набирают 1 мл и выливают в стакан для слива.

Таким образом, получают следующий ряд разведений:

Номер пробирки	1	2	3	4	5
Разведение	1,0	0,5	0,25	0,125	0,0625

В другие пять пробирок наливают по 2 мл концентрированной азотной кислоты. Затем 1 мл раствора белка из первой пробирки осторожно переносят на азотную кислоту в первой пробирке, отмечают время; из второй пробирки 1 мл раствора белка также переносят на азотную

кислоту второй пробирки, отмечают время и т. д. То разведение белка, где белое кольцо образуется в конце второй и в начале третьей минуты, будет содержать 0,0033% белка.

Количество белка в исследуемом растворе равняется: $x = 0,0033 \cdot n$, где n — разведение в пробирке. *

Этот метод можно использовать для определения количества белка в моче и других биологических жидкостях, что находит применение в практике ветеринарии и медицины.

Количественное определение белка по методу Лоури

Из методов, основанных на количественном определении белков по цветным реакциям, наиболее распространен и обладает высокой чувствительностью метод Лоури.

Метод Лоури основан на измерении интенсивности окраски раствора, в котором одновременно осуществляются по меньшей мере две цветные реакции — биуретовая реакция (см. с. 137) и реакция с тирозиновым и цистеиновым радикалами белковой молекулы. Последняя состоит в восстановлении смеси фосфорно-вольфрамовой и фосфорно-молибденовой кислот (реактив Фолина) с образованием комплексного соединения синего цвета. Вторая реакция не очень специфична, но зато весьма чувствительна. Поэтому метод Лоури позволяет вести определения белков в сильно разбавленных растворах, где количество их выражается от одного и выше десятков микрограмм. Как правило, этот метод применяется для учета белков в элюатах с колонок при фракционировании на ионообменных смолах и сефадексах, а также в сыворотке крови, лимфе и обезжиренных гомогенатах тканей.

Приборы. Штатив с пробирками. Мерные цилиндры на 10 и 50 мл. Пипетки градуированные на 1, 5 и 10 мл. Фотоэлектроколориметр.

Реактивы. Раствор А: карбонат натрия (2%-ный) в гидроксиде натрия (1%-ном растворе). Готовится из такого расчета, чтобы хватило на работу со всеми группами растворов. После приготовления раствор фильтруется через стеклянную вату и хранится в сосуде, плотно закрытом резиновой пробкой. Раствор В: сульфат меди, 1%-ный раствор; тартрат калия, 2%-ный раствор. Перед использованием растворы смешивают в соотношении 1:1 и получают реактив В.

Раствор С — смесь 50 мл раствора А и 1 мл раствора В (объемы выдерживают точно!), которая готовится перед работой.

Реактив Фолина, или раствор Е, который готовят так: 100 г вольфрамвокислого натрия ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) и 25 г молибденово-кислого натрия ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) растворяют в 700 мл воды, прибавляют 50 мл 85%-ного раствора ортофосфорной кислоты и 100 мл концентрированной соляной кислоты. Эта смесь кипятится с обратным холодильником в течение 10—12 ч. После кипячения прибавляют 150 г сульфата лития, 50 мл воды и несколько капель брома. Для удаления избытка брома смесь кипятят в вытяжном шкафу (без холодильника) в течение 10—15 мин. После охлаждения смесь доводят водой до 1 л, фильтруют через стеклянную вату, которая предварительно промывается дистиллированной водой. Реактив Фолина титруют 1 н. раствором гидроксида натрия по фенолфталеину. На основании титрования реактив разводят водой, делая его однонормальным. Хранить в темной посуде. Яичный альбумин, четырежды перекристаллизованный.

Ход работы. В пробирку помещают 0,1 мл сыворотки крови или раствора другого белка, прибавляют 9 мл реактива С, хорошо перемешивают и оставляют на 10 мин

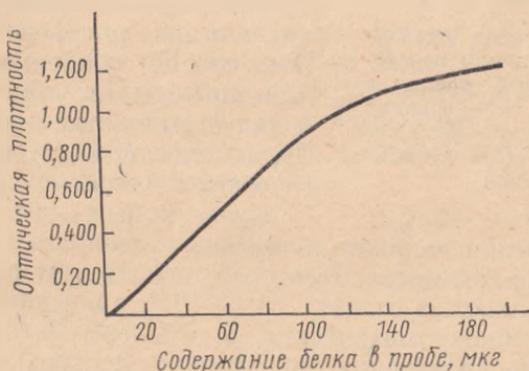


Рис. 15. Калибровочная кривая для определения концентрации белка

при комнатной температуре. Затем добавляют 0,9 мл реактива Е и немедленно перемешивают (!). Пробы оставляют на 30 мин, после чего фотоколориметрируют с красным светофильтром. Расчет ведут при помощи калибровочного графика, который готовят заранее (рис. 15).

Рефрактометрическое определение белков в сыворотке крови

Из физических методов определения концентрации белков в биологических жидкостях широкое распростра-

нение получил рефрактометрический способ, основанный на показателях преломления света белковыми растворами и чистым растворителем (водой).

Коэффициентом рефракции (показатель преломления n) называют отношение синуса угла падения луча света к синусу угла его преломления (рис. 16): $n = \sin \alpha / \sin \beta$.

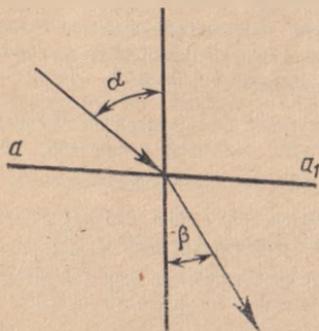


Рис. 16. Схема преломления света при переходе из одной среды в другую: a, a_1 — граница двух сред; α — угол падения; β — угол преломления

Между показателем преломления (n) и концентрацией вещества в растворе для многих соединений характерна прямая зависимость. Пользуясь специальными таблицами, можно найти содержание вещества в растворе по его показателю преломления, в том числе и для растворов белка. Этот способ особенно удобен для определения концентрации белка в сыворотке крови, лимфе, экссудатах и других биологических жидкостях.

Коэффициент преломления раствора белка находят с помощью специального прибора — рефрактометра. Для этого используют рефрактометры с точностью отсчета 10^{-4} — 10^{-5} , допускающие работу не с монохроматическим, а с белым светом и требующие для проведения определения несколько капелек раствора. В современных лабораториях широко используется рефрактометр ИРФ-22 отечественного производства.

Приборы. Рефрактометр. Бумага, фильтровальная. Вата. Стекл. палочки.

Реактивы. Смесь спирта с эфиром (1 : 1). Сыворотка крови. Вода, дистиллированная.

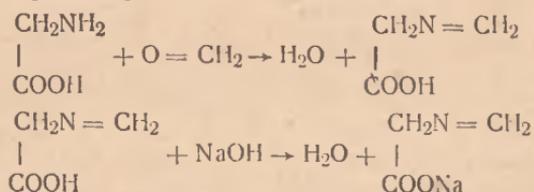
Техника работы и расчет концентрации белка в сыворотке крови проводятся в соответствии с инструкциями к рефрактометру и специальными таблицами. Метод требует тщательной настройки прибора и соблюдения сложных технологических приемов исследования.

Определение азота аминных групп формальным титрованием

Аминным азотом называют азот свободных аминокислот, полипептидов и белков. Знание количества аминного азота имеет важное значение для изучения состава и структуры белковой молекулы, а также продуктов ее гидролиза. По приросту аминного азота можно следить за скоростью гидролиза белка и изучать активность протеолитических ферментов (катепсинов). Определение аминокислот в биологических объектах служит дополнительной характеристикой обмена белков и аминокислот в организме.

Известно, что аминокислоты являются амфотерными электролитами, т. е. обладают кислотными и основными свойствами. Поэтому непосредственное титрометрическое определение аминных или карбоксильных групп в молекуле аминокислот или белка невозможно.

Названный метод основан на способности формальдегида связывать свободные аминокислоты с образованием метиленовых производных аминокислот (Шиффовы основания), после этого карбоксильные группы можно оттитровать раствором щелочи:



По количеству карбоксильных групп, нейтрализованых щелочью, вычисляют количество свободных аминокислот, находящихся в растворе аминокислот. Большинство аминокислот содержит эквивалентное количество аминных и карбоксильных групп в молекуле.

Приборы. Коническая колба на 50 мл. Пипетка на 5 мл с делениями. Пипетка на 20 мл. Бюретка на 10 мл.

Реактивы. Глицин, 0,25%-ный раствор. Фенолфталеин, 0,1%-ный раствор. Гидроксид натрия, 0,1 н. раствор. Формольная смесь, которую готовят перед началом работы. К 6 мл 20%-ного раствора формальдегида добавляют 1 каплю фенолфталеина и прибавляют из бюретки каплями 0,1 н. раствор гидроксида натрия до покраснения раствора.

Ход работы. В коническую колбу отмеривают 3 мл 0,25%-ного раствора глицина, добавляют 1 каплю фе-

нолфталеина и 0,1 н. раствор едкого натра до покраснения жидкости.

Затем в нейтрализованный раствор глицина отмеривают пипеткой 2 мл формольной смеси (красная окраска раствора исчезает). В бюретку наливают 0,1 н. раствор гидроксида натрия и титруют до появления красной окраски. Отмечают количество 0,1 н. раствора едкого натра, израсходованного на титрование, и производят вычисления.

Расчет. Предположим, что количество 0,1 н. раствора щелочи, израсходованного на титрование 3 мл 0,25%-ного нейтрализованного раствора глицина, оказалось равным 0,98 мл, а 1 мл 0,1 н. раствора щелочи соответствует 1,4 мг азота. Умножив количество миллилитров 0,1 н. раствора щелочи, пошедшей на титрование, на 1,4, узнаем количество аминного азота, находящегося в 3 мл 0,25%-ного раствора глицина:

$$0,98 \cdot 1,4 = 1,37 \text{ мг, или } 0,00137 \text{ г.}$$

Это количество азота содержится в 3 мл 0,25%-ного раствора глицина или в 0,0075 г аминокислоты.

Если в 0,075 г глицина содержится 0,00137 г азота, то в 100 г глицина содержится x г азота. Откуда

$$x = \frac{100 \cdot 0,00137}{0,0075}; \quad x = 18,2 \text{ г азота.}$$

Следовательно, количество аминного азота в исследуемом глицине составляет 18,2%.

Аналогично проводят исследование гидролизата белка. Для этой цели в коническую колбу *точно* отмеривают 3 мл 0,25%-ного раствора гидролизата и проводят с ним все операции, как это описано для глицина.

Примечание. Метод формольного титрования в сущности прост, но надо помнить, что точные цифры можно получить только с моноаминокарбоновыми кислотами жирного ряда. Диаминокислоты дают заниженные данные, а дикарбоновые аминокислоты и тирозин, наоборот, завышенные.

Выделение и раздельное определение нуклеиновых кислот методом Шмидта и Таннгаузера

Метод основан на определении фосфора рибонуклеиновой кислоты (РНК) и дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) после освобождения гомогената ткани от во-

дорастворимых и кислоторастворимых соединений фосфорной кислоты (органический и неорганический фосфат) и экстракции фосфолипидов.

Отделение РНК от ДНК основано на способности РНК гидролизываться в щелочном растворе на мононуклеотиды. ДНК при этом остается в полимеризованном состоянии и из гидролизата осаживается трихлоруксусной кислотой.

Приборы. Центрифужные пробирки с делениями. Ступка. Пипетки на 1, 2, 5 и 10 мл. Стекланные палочки. Центрифуга на 2500—3000 об/мин. Водяная баня. Фотоэлектроколориметр или электроколориметр. Мерные колбы на 25 мл. Колбы Кьельдаля с насадками. Торзионные весы. Термостат.

Реактивы. Серная кислота, 5 н. раствор. Соляная кислота, 6 н. раствор. Трихлоруксусная кислота, 7%-ный раствор. Трихлоруксусная кислота, 5%-ный раствор. Гидроксид калия, 1 н. раствор. Молибденовокислый аммоний (приготовление см. на с. 153). Эфир. Спирт — эфир 60 : 40. Эфир — хлороформ 95 : 5. Абсолютный спирт. Охлажденная вода. Аскорбиновая кислота; готовится перед употреблением из расчета 4 мг аскорбиновой кислоты на 1 мл воды. Свежая, охлажденная печень. Стандартный раствор однозамещенного фосфата калия (приготовление: 0,0549 г KH_2PO_4 растворяют в 500 мл воды. 1 мл этого раствора содержит 0,025 мг фосфора).

Ход работы. Предварительно охлаждают растворы трихлоруксусной кислоты, ступки и воду.

В ступку наливают 2 мл 7%-ной трихлоруксусной кислоты, на торзионных весах отвешивают навеску печени до 500 мг и растирают в ступке до однородной массы.

Содержимое ступки переносят в мерную центрифужную пробирку. Ступку и пестик трижды промывают трихлоруксусной кислотой по 2 мл, доводят объем до 10 мл и ставят в холодильник или в лед на 10 мин.

После 10-минутного охлаждения пробирки центрифугируют в течение 5—7 мин при 2500 об/мин. Надосадочную жидкость сливают, а к осадку прибавляют 5 мл 7%-ной трихлоруксусной кислоты, хорошо размешивают, центрифугируют 5—7 мин, жидкость сливают. Эту процедуру повторяют еще дважды. Этой операцией отмывают кислоторастворимый фосфор.

Осадок дважды промывают охлажденной водой. К осадку приливают 5 мл воды, размешивают и центрифугируют, как и с трихлоруксусной кислотой. При этом отмывается водорастворимый фосфор.

После промывания осадка кислотой и водой к нему добавляют 5 мл абсолютного спирта, размешивают и кипятят на водяной бане в течение 10—15 мин при 84°С.

Затем центрифугируют в течение 10 мин. Надосадочную жидкость сливают в мерный цилиндр.

К осадку приливают 5 мл смеси спирта с эфиром, размешивают и кипятят в течение 10 мин при 65—70° С и центрифугируют. Надосадочную жидкость снова сливают.

К осадку приливают 5 мл эфира, размешивают и кипятят в течение 10 мин при 40° С. Центрифугируют в течение 5 мин.

Осадок еще раз заливают 5 мл эфира, размешивают и составляют при комнатной температуре на 10 мин, периодически помешивая, затем центрифугируют, надосадочную жидкость сливают, а осадок высушивают на водяной бане при 37° С.

Таким образом, органическими растворителями экстрагируются фосфолипиды. Высушенный белый осадок — нуклеопротеид, который можно хранить длительное время в закрытых пробирках в прохладном месте.

К высушенному осадку нуклеопротеида добавляют 3 мл 1 н. раствора гидроксида калия и ставят в термостат на 15 ч при 37—38° С. За это время под влиянием щелочи происходит гидролиз РНК, а ДНК остается в полимеризованном состоянии.

К гидролизату добавляют воды до 5 мл, перемешивают и 1 мл переносят в колбу Кьельдаля, добавляют 2 мл 5 н. серной кислоты и ставят на сжигание для определения фосфора суммы нуклеиновых кислот. К осадку гидролизата добавляют 0,4 мл 6 н. соляной кислоты и 5 мл 5%-ного раствора охлажденной трихлоруксусной кислоты, перемешивают и ставят в холодильник или на лед на 10—15 мин для осаждения ДНК. После этого центрифугируют в течение 10 мин при 2500 об/мин, затем надосадочную жидкость сливают в мерную центрифужную пробирку.

К осадку приливают 1 мл 5%-ной трихлоруксусной кислоты, хорошо размешивают, центрифугируют, надосадочную жидкость снова сливают в ту же пробирку. В осадке находится ДНК, а в надосадочной жидкости — мононуклеотиды РНК.

Берут 4 мл надосадочной жидкости в колбу Кьельдаля, добавляют 2 мл 5 н. серной кислоты и сжигают для определения фосфора РНК.

Осадок количественно переносят в колбу Кьельдаля при помощи воды и стеклянной палочки, добавляют 2 мл

5 н. серной кислоты и также сжигают для определения фосфора ДНК.

Сжигание. Вначале колбы Кьельдаля ставят на слабый огонь (песочная баня) для выпаривания воды. Когда появятся тяжелые белые пары, колбы снимают, добавляют 1—2 капли пергидроля, вставляют насадки и ставят на сильный огонь. Сжигают до появления бесцветного, прозрачного минерализата.

После сжигания минерализат количественно переводят в мерную колбу на 25 мл путем 3—4-кратного смывания дистиллированной водой со стенок колбы.

В эту колбу добавляют 3 мл молибденовокислого аммония и 1 мл раствора аскорбиновой кислоты, водой доводят до метки и ставят на водяную баню на 5 мин при 37° С.

В тех же условиях готовят стандартный раствор KN_2PO_4 . Для этого используют холостую пробу, т. е. пробу с 2 мл 5 н. серной кислоты, сжигаемой наряду с опытными пробами.

После перевода холостого минерализата в колбу на 25 мл добавляют 4 мл стандартного раствора, затем 3 мл молибденовокислого аммония, 1 мл аскорбиновой кислоты и доводят водой до метки.

Через 30 мин пробы колориметрируют с помощью электроколориметра или фотоэлектроколориметра.

При использовании электроколориметра расчеты ведут по следующим формулам:

$$1) P_1 = \frac{0,1 \cdot h \cdot 5 \cdot 1000}{h_1 \cdot c \cdot 1}$$

где P_1 — фосфор суммы нуклеиновых кислот; 0,1 — фосфор (мг) в стандартном растворе ($4 \cdot 0,025 = 0,1$); h — высота столба стандартного раствора; h_1 — высота слоя исследуемой жидкости, c — навеска ткани, мг; 5 — общее количество гидролизата; 1 — количество гидролизата, взятое для минерализации; 1000 — для пересчета фосфора, мг %:

$$2) P_2 = \frac{0,1 h \cdot 10 \cdot 5 \cdot 1000}{c \cdot h_1 \cdot 4 \cdot 4}$$

где P_2 — фосфор РНК, мг %; 4 — количество надосадочной жидкости, взятое для минерализации; 4 — количество щелочного гидролизата, из которого осаждалась ДНК.

Остальные обозначения те же, что и для фосфора суммы нуклеиновых кислот;

$$3) P_3 = \frac{0,1 \cdot h \cdot 5 \cdot 1000}{c \cdot h_1 \cdot 4},$$

где P_3 — фосфор ДНК, мг %; остальные обозначения те же, что и для фосфора суммы нуклеиновых кислот и РНК;

$$4) P_4 = P_1 - (P_2 + P_3),$$

где P_4 — фосфор фосфолипидов.

Выделение и количественное определение нуклеиновых кислот по Н. Ваннемахеру

Метод основан на количественном учете азотистых оснований мононуклеотидов РНК и ДНК, которые определяются спектрофотометрически после выделения, разделения и гидролиза этих биологических полимеров.

Приборы. Штатив с центрифужными мерными пробирками. Пипетки на 1, 5 и 10 мл. Пипетка на 2 мл, градуированная. Центрифуга на 3000 об/мин. Спектрофотометр СФ-4 или СФ-16. Гомогенизатор с тефлоновым пестиком.

Реактивы. Трихлоруксусная кислота, 10%-ный раствор. Хлорная кислота, концентрированная, 5%-ный и 0,5 н. растворы. Спирт этиловый, 96%-ный насыщенный ацетатом натрия. Спирт — эфир, 3:1. Эфир для наркоза. Гидроксид натрия, 0,3 н. раствор. Биуретовый реактив. Сахароза, 0,25 н. раствор. Печень свежая.

Ход работы. Берут 2 г печени и гомогенизируют в 18 мл 0,25 н. раствора сахарозы. Затем к 1 мл гомогената добавляют 5 мл 10%-ной трихлоруксусной кислоты, перемешивают и центрифугируют в течение 10 мин при 2500 об/мин.

К полученному осадку приливают 5 мл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, размешивают и центрифугируют 10 мин при 2500 об/мин.

К осадку добавляют 5 мл этилового спирта с ацетатом натрия, размешивают и оставляют на 15 мин для экстракции липидов. Затем центрифугируют, надосадочную жидкость сливают и добавляют 5 мл смеси спирт —

эфир 3:1, размешивают и оставляют на 10 мин. Далее центрифугируют, надосадочную жидкость сливают, а к осадку приливают 5 мл эфира, размешивают и оставляют на 10 мин.

После экстракции липидов эфиром смесь центрифугируют в течение 5 мин при 3000 об/мин и осадок высушивают на водяной бане при 37° С.

К высушенному осадку добавляют 4 мл 0,3 н. раствора гидроксида натрия и ставят в термостат на 18 ч при 37° С. За это время РНК гидролизуеться до мононуклеотидов, а белок — до аминокислот.

Определение белка. К 1 мл гидролизата добавляют 2 мл биуретового реактива и через 30—40 мин спектрофотометрируют при 540 нм с применением лампы накаливания.

Расчет концентрации белка проводят по калибровочной кривой.

Определение РНК. К 3 мл гидролизата добавляют 1,5 мл холодной 42%-ной хлорной кислоты (2,3 мл — 30% и 1,1 мл — 58% хлорной кислоты), размешивают и центрифугируют в течение 10 мин при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость сливают в другую пробирку для определения РНК. К осадку приливают 5 мл 5%-ной хлорной кислоты, центрифугируют и надосадочную жидкость сливают в ту же пробирку, что и первый супернатант.

В пробирке для определения РНК объем доводят до 10 мл, откуда берут 1 мл жидкости и переносят в другую пробирку, и добавляют 9 мл 0,5 н. хлорной кислоты, перемешивают и спектрофотометрируют при 260 и 286 нм.

Определение ДНК. После отмывания РНК к осадку добавляют 5 мл 0,5 н. хлорной кислоты, размешивают и гидролизуют при 96° С в течение 45 мин. Затем центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин, надосадочную жидкость сливают в мерную пробирку.

К осадку добавляют еще раз 5 мл 0,5 н. хлорной кислоты и гидролизуют в течение 20 мин на водяной бане при 96° С. Смесь центрифугируют, надосадочную жидкость сливают в ту же пробирку, что и после первого гидролиза.

Содержимое пробирки доводят 0,5 н. хлорной кислотой до метки и спектрофотометрируют при 268—284 нм.

Расчет концентрации нуклеиновых кислот (мг % фосфора РНК, мг % фосфора ДНК) проводят соответственно по следующим формулам:

$$\frac{561 \cdot (E_{260} - E_{285}) \cdot V}{W \cdot L};$$

$$\frac{800 \cdot (E_{268} - E_{284}) \cdot V}{W \cdot L};$$

где E — величина экстинкции; V — объем экстракта; L — толщина слоя при спектрофотометрии; W — масса материала в сыром виде; 561 и 800 — соответствующие коэффициенты.

Для перевода массы фосфора в массу нуклеиновых кислот пользуются коэффициентами: для РНК — 10,5 и ДНК — 10,1.

ФЕРМЕНТЫ

Ферментами называют специфические белки, обладающие каталитической функцией. С участием ферментов осуществляются многочисленные химические процессы, совокупность которых составляет сущность обмена веществ. Влияя на скорость метаболических реакций, ферменты способны эффективно регулировать процессы жизнедеятельности. Подобно неорганическим катализаторам ферменты повышают скорость химических реакций за счет понижения энергии активации. Однако биологические катализаторы обладают более высокой эффективностью в снижении энергии активации и, как правило, осуществляют свою функцию в условиях умеренной температуры, низкого давления и значений pH, близких к нейтральному. Вместе с тем ферменты чувствительны к изменению условий среды, в которой они функционируют, и имеют ряд особенностей, связанных с их белковой природой.

ОБЩИЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ

Характерные особенности ферментов, их специфичность, чувствительность к изменению температуры и pH среды, а также к наличию активаторов и ингибиторов обусловлены белковой природой биологических катализаторов.

Каталитическая активность фермента связана с наличием в его молекуле особых участков, ответственных за связывание и активирование субстрата, — субстратный и активный центры. Это уникальное сочетание аминокислотных остатков, расположенных в полипептидной цепи на большом расстоянии друг от друга. Сближаясь, они образуют каталитический центр при формировании третичной структуры молекулы. В ферментах-протеидах в образовании каталитических центров участвуют также небелковые компоненты, непосредственно прилегающие к активному участку глобулы. Любое внешнее воздействие, нарушающее нативную конформацию белковой молекулы, приводит к инактивации фермента.

Термолабильность ферментов

Температура среды сильно влияет на активность ферментов. Оптимальная температура для действия фермента — температура тела животных, колеблющаяся в диапазоне 36—41° С. При некотором повышении температуры среды происходит ускорение реакции вследствие повышения энергии активации молекул субстрата. Вместе с тем даже небольшое повышение температуры вызывает ослабление связей, которые поддерживают конформацию молекулы фермента, необходимую для проявления его каталитической активности. Постепенно начинается денатурация фермента, которая резко прогрессирует при температуре, превышающей 50° С. Инактивация фермента при повышении температуры среды необратима. При понижении температуры фермент также уменьшает свою активность. Механизм этого явления неясен. Однако денатурации фермента при охлаждении не происходит, поскольку инактивация фермента в этом случае может быть обратимой.

Принцип метода. Исследуется влияние изменения температуры внешней среды на активность фермента амилазы слюны.

Приборы. Штатив с пробирками. Стакан (50 мл). Спиртовка. Термостат (37° С). Стакан со льдом.

Реактивы. Разбавленная слюна (ополаскивают рот дистиллированной водой, а затем, набрав в рот 20—25 мл воды, собирают ее в стаканчик). Хлорид натрия, 0,3%-ный раствор. Крахмал, 1%-ный раствор на 0,3%-ном растворе хлорида натрия. Реактив Люголя (см. с. 88).

Ход работы. В три пробирки наливают по 2—3 мл разбавленной слюны (амилаза). Слюну в пробирке 1 кипятят в течение 1—2 мин. Затем во все пробирки добавляют по 4—5 мл крахмала. Пробирки 1 и 2 ставят в термостат (37° С) на 10 мин. Пробирку 3 погружают на 10 мин в лед. По истечении указанного времени во все пробирки добавляют по 1 капле реактива Люголя. Результаты опыта заносят в таблицу термолабильности ферментов и делают выводы:

Номер пробирки	Фермент	Условия опыта	Субстрат	Инкубация	Окраска с иодом
1	Амилаза	Фермент денатурирован	Крахмал	10 мин, 37° С	
2	Амилаза	Фермент нативный	Крахмал	10 мин, 37° С	
3	Амилаза	Фермент нативный	Крахмал	10 мин, 0° С	

Выводы:

Влияние pH на активность ферментов

Для каждого фермента существует оптимум pH, при котором создаются наиболее благоприятные условия для поддержания функционально активной конформации молекулы. Ионизированные при определенном значении pH аминокислотные группы и карбоксильные группы аминокислотных остатков участвуют в поддержании конформации белковой молекулы, необходимой для образования каталитических центров фермента, и способствуют его связыванию с субстратом. При ином значении pH ионизация соответствующих групп изменяется, в результате разрываются связи, обеспечивающие образование каталитических центров, и фермент инактивируется. При очень высоких и очень низких значениях pH ферменты денатурируют.

Принцип метода. Исследуется активность фермента амилазы слюны при различных значениях pH среды.

Приборы. Штатив с пробирками. Пипетки. Термостат (37° С).

Реактивы. Двухзамещенный фосфат натрия, 0,2 М раствор (А). Лимонная кислота ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$), 0,1 М раствор (Б). Буферные растворы (pH 5,0: 515 мл раствора А смешать с 485 мл раствора Б; pH 6,8: 772,5 мл раствора А смешать с 227,5 мл раствора Б; pH 8,0: 972,5 мл раствора А смешать с 27,5 мл раствора Б). Разбавленная слюна (см. с. 178). Крахмал, 1%-ный раствор. Реактив Люголя. (см. с. 88).

Ход работы. В три пробирки приливают по 2—3 мл буферных растворов с различными pH (5,0; 6,8; 8,0). Во все пробирки добавляют по 2—3 мл разбавленной слюны (амилаза) и по 4—5 мл раствора крахмала, перемешивают и инкубируют 10 мин в термостате (37° С). Затем в каждую пробирку добавляют по 1 капле реактива

Люголя. Результаты наблюдения заносят в таблицу, показывающую влияние рН на активность амилазы слюны:

Номер пробирки	Фермент	рН среды	Субстрат	Инкубация	Окраска с иодом
1	Амилаза	5,0	Крахмал	10 мин, 37° С	
2	Амилаза	6,8	Крахмал	10 мин, 37° С	
3	Амилаза	8,0	Крахмал	10 мин, 37° С	

Выводы:

Специфичность ферментов

Ферменты отличаются от неорганических катализаторов необычайно высокой специфичностью. Начальным этапом каталитического акта является образование фермент-субстратного комплекса, т. е. связывание субстрата с каталитическим центром фермента. Пространственная конформация субстратного центра должна находиться в точном геометрическом соответствии со структурой молекулы субстрата. Только в этом случае возможно образование фермент-субстратного комплекса и осуществление каталитической функции фермента. Таким образом, сущность специфичности ферментов состоит в том, что субстрат подходит к ферменту, как ключ к замку.

Принцип метода. Исследуется воздействие ферментов амилазы и сахаразы на различные субстраты — крахмал и сахарозу.

Приборы. Штатив с пробирками. Пипетки. Термостат (37° С). Спиртовка.

Реактивы. Крахмал, 1%-ный раствор. Сахароза, 2%-ный раствор. Разбавленная слюна (см. с. 178). Сахароза, раствор (10 г дрожжей гомогенизируют в 100 мл воды). Реактив Люголя (см. с. 88). Реактив Фелинга (см. с. 75).

Ход работы. В пробирки 1 и 2 наливают по 4—5 мл раствора крахмала, в пробирки 3 и 4 — по 4—5 мл раствора сахарозы. В пробирки 1 и 3 добавляют по 2—3 мл разбавленной слюны (амилаза), в пробирки 2 и 4 — по 2—3 мл раствора сахаразы. Содержимое пробирок пере-

мешивают и инкубируют 10 мин в термостате (37° С). Затем в пробирки 1 и 2 добавляют по 1 капле реактива Люголя, в пробирки 3 и 4 — по 1—2 мл реактива Фелинга и нагревают. Наблюдения записывают в таблицу специфичности ферментов амилазы и сахаразы:

Номер пробирки	Субстрат	Фермент	Инкубация	Окраска с иодом	Реакция Фелинга
1	Крахмал	Амилаза	10 мин, 37° С		
2	Крахмал	Сахараза	10 мин, 37° С		
3	Сахароза	Амилаза	10 мин, 37° С		
4	Сахароза	Сахараза	10 мин, 37° С		

Выводы:

Влияние активаторов и ингибиторов

Регуляция деятельности ферментов осуществляется как в клетке, так и вне ее путем присоединения к молекуле фермента ряда низкомолекулярных веществ. Такие вещества могут служить положительными или отрицательными эффекторами. Положительные эффекторы, или активаторы, присоединяясь к молекуле неактивного предшественника, способны изменять ее конформацию с образованием соединения, обладающего каталитической активностью. Функцию активаторов часто выполняют ионы металлов и некоторые анионы. Угнетающее действие отрицательных эффектов (ингибиторов) реализуется путем изменения нативной конформации фермента. Ингибиторами могут быть неорганические соли, метаболиты, гормоны. Место прикрепления эффектора к молекуле фермента называется аллостерическим центром.

Принцип метода. Исследуется активность амилазы слюны в присутствии соединений, обладающих свойствами положительных и отрицательных эффекторов.

Приборы. Штатив с пробирками. Пипетки. Термостат (37° С).

Реактивы. Разбавленная слюна (см. с. 178). Крахмал, 1%-ный раствор. Хлорид натрия, 1%-ный раствор. Сульфат меди, 1%-ный раствор. Реактив Люголя (см. с. 88).

Ход работы. В 2 пробирки наливают по 4—5 мл раствора крахмала, в пробирку 1 добавляют 1—2 мл раствора хлорида натрия, в пробирку 2 — 1—2 мл раствора сульфата меди. В обе пробирки приливают по 1—2 мл

разбавленной слюны, содержимое пробирок перемешивают и пробирки инкубируют 10 мин в термостате (37° С). Затем в обе пробирки добавляют по 1 капле реактива Люголя. Наблюдения записывают в таблицу, показывающую влияние хлорида натрия и сульфата меди на активность амилазы:

Номер пробирки	Фермент	Эффектор	Субстрат	Инкубация	Окраски с иодом
1	Амилаза	NaCl	Крахмал	10 мин, 37° С	
2	Амилаза	CuSO ₄	Крахмал	10 мин, 37° С	

Выводы:

Определение активности ферментов

Согласно классификации, разработанной Международной комиссией по ферментам, все ферменты подразделяются на шесть главных классов в соответствии с характером катализируемой ими реакции: оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы, лигазы.

ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ

Оксидоредуктазы — класс ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные реакции.

Определение активности дегидрогеназы янтарной кислоты

Дегидрогеназа янтарной кислоты (сукцинатдегидрогеназа) — фермент, катализирующий окисление янтарной кислоты. Коферментом является флавинаденидинуклеотид (ФАД). В клетках фермент прочно связан с мембраной митохондрий. Восстановленный фермент легко отдает водород, акцептором которого могут быть восстанавливающиеся красители.

Принцип метода. Водород, отщепляемый от янтарной кислоты под влиянием фермента дегидрогеназы, восстанавливает метиленовую синь (М. С.), превращая ее в бесцветное соединение (М.С.Н₂).

Доброшение ферментов



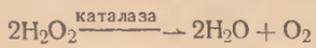
Приборы. Ступка с пестиком. Стекланный песок. Штатив с пробирками. Пипетки. Водяная баня (50° С). Термометр.

Реактивы. Мышца свежая (измельченная в мясорубке). Гидроксид натрия, 10%-ный раствор. Янтарная кислота, 3%-ный раствор (3 г янтарной кислоты растворяют при нагревании в 97 мл воды и нейтрализуют по индикаторной бумаге 10%-ным раствором гидроксида натрия до рН 7,4). Метиленовая синь, 0,001%-ный водный раствор. Вазелиновое или растительное масло. Трихлоруксусная кислота, 20%-ный раствор.

Ход работы. В ступке со стекляннм песком тщательно растирают около 1 г измельченной мышечной ткани, добавляя 3—4 мл раствора янтарной кислоты, и полученный гомогенат переносят поровну в 2 пробирки. В пробирку 1 (контроль) добавляют 1 мл раствора трихлоруксусной кислоты для разрушения фермента. В пробирке 2 (опыт) фермент активен. В обе пробирки добавляют по 1—2 капли раствора метиленовой сини, перемешивают и заливают поверхность жидкости 0,5—1 мл масла для изоляции от кислорода воздуха. Обе пробирки инкубируют в водяной бане (50° С) в течение 10 мин. По истечении указанного времени наблюдают обесцвечивание метиленовой сини в пробирке 2.

Определение активности каталазы крови

Некоторая часть водорода, передаваемого по системе окислительно-восстановительных ферментов, может непосредственно соединяться с кислородом, образуя перекись водорода — ядовитого соединения для клеток. Фермент каталаза, расщепляя перекись водорода, предохраняет клетки от вредного воздействия этого соединения:



Особенно чувствителен к окисляющему действию перекиси водорода гемоглобин, поэтому каталаза эритроцитов имеет особое значение в организме.

Количество каталазы резко повышается у больных пернициозной анемией. Снижение активности каталазы крови наблюдается у больных, страдающих вирусным гепатитом, злокачественными новообразованиями, брюшным тифом, малярией, туберкулезом легких, а также при лейкозе и тейлериозе крупного рогатого скота. Изменение активности каталазы происходит во время беременности: в начальный период — снижение, в последние месяцы — повышение.

Принцип метода. Показателем активности фермента является выделение молекулярного кислорода, образующегося при расщеплении перекиси водорода каталазой крови.

Приборы. Штатив с пробирками. Пипетки. Спиртовки.

Реактивы. Кровь цельная, цитратная. Перекись водорода, 3% - ный раствор.

Ход работы. В две пробирки наливают по 2—3 мл дистиллированной воды, добавляют по 1—2 капли крови и содержимое пробирки 1 (контроль) нагревают до кипения для разрушения фермента. В пробирке 2 (опыт) фермент активен. В обе пробирки добавляют по 1 мл раствора перекиси водорода. В пробирке 2 наблюдают бурное выделение кислорода.

ТРАНСФЕРАЗЫ

Трансферазы катализируют перенос атомных группировок с одного субстрата на другой. В соответствии с характером транспортируемых групп различают 8 подклассов трансфераз, среди которых имеются аминотрансферазы и гликозилтрансферазы.

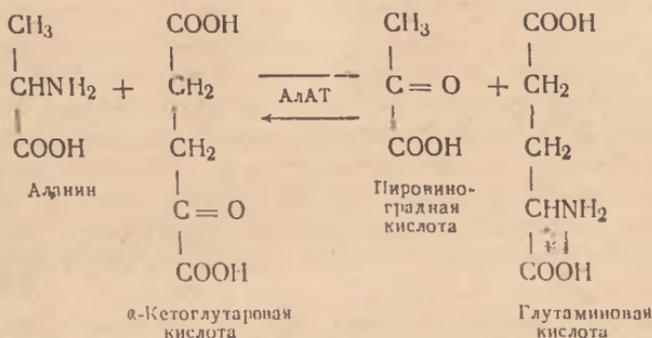
Определение активности аланинаминотрансферазы

К подклассу аминотрансфераз относят ферменты, которые катализируют обратимый перенос аминогруппы с аминокислот на кетокислоты (реакция трансаминирования). Коферментом аминотрансфераз служит пиридоксальфосфат (производное витамина В₆).

Определение активности аланинаминотрансферазы (АлАТ) имеет клиническое значение, так как увеличение активности фермента отмечено при заболевании инфекционным гепатитом, инфарктом миокарда, при лейкозе крупного рогатого скота, пневмонии и диспепсии телят.

Активность АлАТ в крови сельскохозяйственных животных и птиц имеет следующие значения (ед/мл): коровы — 35,0; телята — 34,5; свиньи — 11,1; овцы — 8,8; куры — 23,8.

АлАТ катализирует обратимую реакцию переноса аминогруппы с аланина на α -кетоглутаровую кислоту:



Принцип метода. Метод основан на определении оптической плотности растворов динитрофенилгидразонов пировиноградной кислоты, образующейся в результате деятельности сывороточной АлАТ.

Приборы. Штатив с пробирками. Центрифужные пробирки с притертыми пробками. Пипетки. Водяная баня (25° С). Термометр. Центрифуга электрическая. Шприц медицинский с резиновой трубкой вместо иглы. ФЭК-М или ФЭКН-57.

Реактивы. Сыворотка крови свежая, без признаков гемолиза. Гидроксид натрия, 10%-ный раствор. Смесь субстратов, раствор (в мерной колбе на 50 мл в 10 мл воды растворяют 0,89 г D, L-аланина или 0,445 г L-аланина, 0,073 г α -кетоглутаровой кислоты, 0,4 г двузамещенного фосфата натрия, 0,07 г однозамещенного фосфата калия, добавляют 0,4 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия, 0,2 мл хлороформа, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают). Полученный раствор можно хранить в холодильнике в замороженном виде до 5 дней (перед употреблением замороженный раствор должен полностью оттаять). 2,4-динитрофенилгидразин, 0,1%-ный раствор (0,2 г 2,4-динитрофенилгидразина растворяют в 100 мл воды в мерной колбе на 200 мл, добавляют 40 мл концентрированной соляной кислоты, нагревают на кипящей водяной бане в течение 1—2 мин для растворения реактива и после охлаждения раствора доводят по объему водой до метки). Толуол водонасыщенный (250 г толуола в делительной воронке тщательно перемешивают с 20 мл воды, затем отделяют слой толуола). Гидроксид калия, 2,5%-ный спиртовой раствор (25 г гидроксида калия растворяют в 1 л спирта. Раствор хранить в склянке, защищенной от углекислого газа воздуха. При появлении мути раствор фильтруют через сухой фильтр).

Ход работы. В 2 центрифужные пробирки с притертыми пробками вносят по 0,5 мл раствора смеси субстратов и помещают их на 5 мин в водяную баню (25° С), затем в пробирку 1 (опыт) добавляют 0,5 мл сыворотки крови, а в пробирку 2 (контроль)—0,5 мл воды. Обе пробирки снова помещают в водяную баню (25° С) и инкубируют в течение 10 мин, затем добавляют по 0,5 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина, перемешивают и оставляют на 5 мин при комнатной температуре. Далее в обе пробирки добавляют по 2,5 мл толуола. Пробирки закрывают пробками и энергично встряхивают в течение 0,5 мин. Для лучшего расслаивания жидкостей полученные эмульсии центрифугируют при 2000 об/мин в течение 5 мин. С помощью сухой градуированной пипетки, соединенной резиновой трубкой со шприцем, осторожно отбирают 1,5 мл толуолового экстракта (верхний слой) и переносят его в чистую сухую пробирку. Добавляют 4,5 мл спиртового раствора гидроксида калия, тщательно перемешивают и оставляют для развития окраски на 10 мин при комнатной температуре. Колориметрируют на ФЭК-М или ФЭКН-57 относительно контрольной пробы с синим светофильтром (470 нм) в кюветах толщиной 1 см между рабочими гранями.

Активность аланинаминотрансферазы выражают числом единиц фермента в 1 мл сыворотки крови (ед/мл). За одну единицу принимают количество фермента, образующее 1 мкг пировиноградной кислоты в стандартных условиях (т. е. при строгом соблюдении метода). 1 мкг пировиноградной кислоты соответствует оптической плотности 0,015. Расчет ведут по формуле

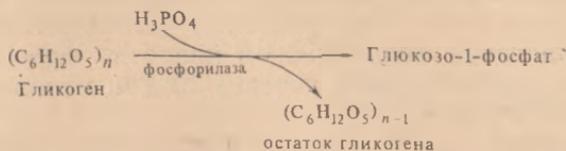
$$E = \frac{A}{0,5 \cdot 0,015},$$

где E — единицы активности фермента АлАТ; A — оптическая плотность раствора в опытной пробирке (показания ФЭК); 0,5 — количество мл сыворотки, взятой для исследования; 0,015 — оптическая плотность, соответствующая одной единице активности фермента.

Определение активности фосфоорилазы

Фосфоорилаза является представителем гликозилтрансфераз. Расщепляя глюкозидную связь в молекуле гликогена, фосфоорилаза переносит освободившийся оста-

ток глюкозы на неорганический фосфат с образованием глюкозо-1-фосфата. Коферментом фосфорилазы служит пиридоксальфосфат (производное витамина В₆).



Определение активности фосфорилазы позволяет судить об интенсивности гликогенолиза в животных тканях.

Принцип метода. Показателем активности фермента является убыль неорганического фосфата, используемого для расщепления гликогена под влиянием фосфорилазы.

Приборы. Гомогенизатор. Весы торзионные. Пробирки с меткой 20 мл. Пипетки. Термостат (37° С). Воронки. Штатив с пробирками. Фильтры бумажные.

Реактивы. Печень свежая. Фосфат калия однозамещенный, М/15 раствор (А). Фосфат натрия двузамещенный, М/15 раствор (Б). Фосфатный буфер, рН 7,2 (смешивают 140 мл раствора А с 360 мл раствора Б; рН раствора проверяют по индикаторной бумаге). Хлорид натрия, 0,9%-ный раствор. Сульфат магния, 0,8%-ный раствор. Реактив С (смешать 60 мл фосфатного буфера, 100 мл раствора хлорида натрия и 1 мл раствора сульфата магния). Трихлоруксусная кислота, 20%-ный раствор. Гликоген, 1%-ный раствор (растворяют в горячей воде). Фторид натрия, 0,1 М раствор. Серная кислота, 5 н. раствор. Молибдат аммония, 2,5%-ный раствор в 5 н. серной кислоте. Аскорбиновая кислота, 0,4%-ный раствор свежеприготовленный. Фосфат калия однозамещенный (0,1099 г растворяют в воде, в мерной колбе емкостью 1 л; 1 мл раствора содержит 0,025 мг Р). Для построения стандартной кривой в 6 пробирок с меткой 20 мл наливают по 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 мл стандартного раствора, добавляют по 2,0 мл раствора молибдата аммония, по 1 мл раствора аскорбиновой кислоты, доводят водой до метки и через 30 мин колориметрируют на ФЭКе относительно воды с красным светофильтром в кюветах с расстоянием 1 см между рабочими гранями. На основании полученных данных строят стандартную кривую.

Ход работы. Гомогенизируют 100 мг печени с 5 мл реактива С. В 2 пробирки с меткой на 20 мл переносят по 2 мл полученного гомогената и в пробирку 1 (контроль) добавляют 1 мл раствора трихлоруксусной кислоты. Пробирка 2 — опытная. В обе пробирки добавляют по 1 мл раствора гликогена и по 1 мл раствора фторида натрия. Обе пробирки инкубируют в течение 30 мин в

термостате (37° С). Затем в пробирку 2 добавляют 1 мл трихлоруксусной кислоты, содержимое обеих пробирок доводят водой до метки 20 мл, перемешивают и фильтруют. В мерные пробирки на 20 мл переносят 1 мл фильтра, добавляют 2 мл раствора молибдата аммония и 1 мл раствора аскорбиновой кислоты, доводят водой до метки, перемешивают и через 30 мин колориметрируют на ФЭКе (см. с. 153).

Активность фосфорилазы выражают количеством микромолей глюкозо-1-фосфата, образуемого за 1 мин ферментом, содержащимся в 1 г ткани (единица активности E). Расчет ведут по формуле

$$E = \frac{(b - a) \cdot 20 \cdot 5}{0,031 \cdot 2 \cdot c \cdot 30}$$

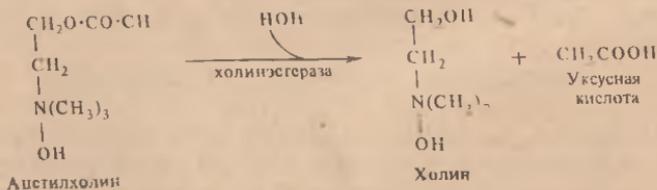
где E — активность фосфорилазы; b — количество фосфора (мг) в контрольной пробирке, найденное по стандартной кривой; a — количество фосфора (мг) в опытной пробирке, найденное по стандартной кривой; 20 — общий объем фильтра, мл; 5 — общий объем гомогената, мл; 2 — количество гомогената (мл), взятое для исследования; 0,031 — количество фосфора (мг), содержащееся в 1 мкмолье глюкозо-1-фосфата; c — навеска ткани, г; 30 — время инкубации, мин.

ГИДРОЛАЗЫ

Гидролазами называют большой класс ферментов, катализирующих процессы расщепления различных химических связей с участием воды (реакции гидролиза).

Определение активности холинэстеразы

Холинэстераза (подкласс эстераз) катализирует гидролитическое расщепление ацетилхолина с образованием холина и уксусной кислоты:



В крови основная масса холинэстеразы содержится в эритроцитах и значительно меньше — в плазме крови и в сыворотке. Уровень холинэстеразы в сыворотке крови уменьшается при заболеваниях печени; повышается у животных, больных ящуром.

Принцип метода. Показателем активности холинэстеразы является нарастание в среде свободной уксусной кислоты, отщепившейся от ацетилхолина за счет деятельности фермента, содержащегося в сыворотке крови. Количество уксусной кислоты определяют титрованием.

Приборы. Штатив с пробирками. Пипетки. Микропипетки (0,1 мл). Термостат (37° С). Микробюретка.

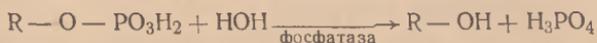
Реактивы. Гидроксид натрия, 0,1 н. раствор. Гидроксид натрия, 0,005 н. раствор (разбавляют 0,1 н. раствора в 20 раз; годен в течение одного дня). Хлорид натрия, 0,9%-ный раствор (рН раствора доводят до 7,6 по индикаторной бумаге при помощи 0,005 н. раствора гидроксида натрия). Бромтимолблау, 0,05%-ный водный раствор свежеприготовленный (индикатор в кислой среде — желтый, в слабощелочной — голубой). Ацетилхолин, 2%-ный раствор (содержимое одной ампулы промышленного препарата ацетилхолина, 0,2 г, растворяют в 10 мл свежekiпяченой дистиллированной воды). Сыворотка крови свежая без признаков гемолиза.

Ход работы Берут две пробирки. В пробирку 1 (контроль) переносят 1,9 мл, а в пробирку 2 (опыт) — 1,8 мл раствора хлорида натрия (рН 7,6). В опытную пробирку добавляют 0,1 мл раствора ацетилхолина. В обе пробирки переносят по 0,1 мл сыворотки крови и по 1 мл раствора бромтимолблау. Жидкость в пробирках должна быть окрашена в одинаковый голубой цвет. В случае необходимости в пробирку 2 добавляют 1—2 капли 0,005 н. раствора гидроксида натрия для выравнивания окраски в пробирках. Обе пробирки помещают в термостат (37° С), где инкубируют в течение 30 мин. Раствор в пробирке 2 окрашивается в желтый цвет вследствие изменения рН раствора (освобождается уксусная кислота). Содержимое пробирки 2 оттитровывают из микробюретки 0,005 н. раствором гидроксида натрия до перехода желтой окраски в голубую (одинаковую с окраской раствора в пробирке 1).

Активность холинэстеразы выражают количеством мл 0,005 н. раствора гидроксида натрия, пошедшего на титрование уксусной кислоты, освободившейся из ацетилхолина в течение 30 мин за счет деятельности фермента, содержащегося в 0,1 мл сыворотки крови.

Определение активности щелочной фосфатазы

Щелочная фосфатаза катализирует гидролиз моноэфиров ортофосфорной кислоты (оптимум рН 9,2—9,6):



Повышение активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови наблюдается при заболеваниях печени и поджелудочной железы, а также костной системы (при рахите, остеомалации и других нарушениях, которые могут быть вызваны гиперпаратиреоидизмом или гиповитаминозом D). У здоровых кур повышение активности фермента наблюдается в период яйцекладки и патологическое повышение — при заболевании желточным перитонитом. Активность щелочной фосфатазы понижается при диспении телят в лейкозе. Ниже приведены данные об активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови у здоровых животных (ед. Боданского):

Телята (4—8 дн.)	3,87	Поросята	4,26
Телята (12 мес.)	2,48	Свиньи	3,90
Коровы	1,57	Куры	9,00

Принцип метода. Показателем активности фермента является прирост неорганического фосфата, отщепляемого от глицерофосфата под действием щелочной фосфатазы сыворотки крови.

Приборы. Пробирки мерные 10 мл. Штатив с пробирками. Пипетки. Термостат (37° С). Фильтры бумажные. Воронки. Фотоэлектроколориметр.

Реактивы. Сыворотка крови свежая без признаков гемолиза. Гидроксид натрия, 0,1 н. раствор. Глицерофосфат, раствор (0,85 г медиала и 10 г патентованного препарата глицерофосфата в гранулах, содержащего 10 частей глицерофосфата кальция, 2 части глицерофосфата натрия и 88 частей сахара, растворяют в 150 мл воды в мерной колбе емкостью 200 мл за день до опыта. Затем добавляют 5,6 мл 0,1 н. раствора гидроксида натрия и доводят водой до метки. Раствор перемешивают и фильтруют. рН раствора доводят до величины 9,2—9,6 по индикаторной бумаге с помощью 0,1 н. раствора гидроксида натрия, консервируют 3 мл петролейного эфира и хранят в холодильнике). Трихлоруксусная кислота, 10%-ный раствор. Хлороформ. Молибденовокислый аммоний, 2,5%-ный раствор в 5 н. серной кислоте. Аскорбиновая кислота, 0,4%-ный раствор. Фосфат калия, однозамещенный, раствор (0,025 мгР/мл) для построения стандартной кривой (в 5 пробирок с меткой 10 мл переносят по 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 стандартного раствора, проводят цветную реакцию на фосфор и колориметрируют, как указано на с. 88).

Ход работы. В две пробирки переносят по 1 мл сыворотки крови. В пробирку 1 (контроль) тотчас же приливают 4 мл раствора трихлоруксусной кислоты. Пробирка 2 — опытная. В обе пробирки добавляют по 5 мл раствора глицерофосфата и помещают их в термостат (37° С) на 30 мин. По истечении указанного времени в пробирку 2 добавляют 4 мл раствора трихлоруксусной кислоты. Содержимое пробирок перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр. В мерные пробирки с меткой 10 мл переносят по 5 мл фильтрата, проводят цветную реакцию на фосфор и колориметрируют (см. с. 188).

Активность щелочной фосфатазы выражают количеством фосфора (мг), которое способен отщепить в течение 1 ч фермент, содержащийся в 100 мл сыворотки крови. Расчет ведут по формуле

$$E = \frac{(a - b) \cdot 10 \cdot 100 \cdot 60}{5 \cdot 30}$$

где E — активность щелочной фосфатазы; a — количество фосфора (мг) в опытной пробирке, найденное по стандартной кривой; b — количество фосфора (мг) в контрольной пробирке, найденное по стандартной кривой; 5 — количество фильтрата (мл), взятого для цветной реакции; 10 — общий объем фильтрата, мл; 100 — количество сыворотки (мл); 30 — время инкубации, мин; 60 — время в минутах для пересчета активности фермента за 1 ч.

Определение активности амилазы

Амилаза катализирует гидролитическое расщепление крахмала и гликогена в животном организме. Активность амилазы особенно высока в поджелудочной и слюнных железах, состояние которых до некоторой степени определяет уровень активности фермента в крови. При остром панкреатите активность фермента повышается, а при некрозе поджелудочной железы — понижается. Активность сывороточной амилазы может повышаться также вследствие воспаления слюнных желез. Гиперамилаземия наблюдается при прободении язвы двенадцатиперстной кишки и острой непроходимости кишечника. Амилазная активность снижается при нарушениях функционального состояния печени и желчного пузыря, у больных пневмонией, декомпенсированным

пороком сердца, при токсикозах беременности. У больных с обширными ожогами кожи наблюдается гипер-амилаземия. Уменьшение активности амилазы наблюдается в сыворотке крови у коров, больных лейкозом. Активность амилазы в сыворотке крови здоровых животных, например у коровы, 2,1 мг %, у свиньи — 1,2 мг %.

Принцип метода. Показателем активности фермента является убыль крахмала, расщепляемого под действием сывороточной амилазы.

Приборы. Штатив с центрифужными пробирками. Пипетки. Микропипетки (0,1 мл). Термостат (37°С). Центрифуга электрическая. Мерные колбы (50 мл). Фотоэлектроколориметр.

Реактивы. Крахмал растворимый, 1%-ный раствор. Хлорид натрия, 0,5 М раствор. Смесь 1%-ного раствора крахмала с 0,5 М раствором хлорида натрия (4:1). Фосфатный буфер, рН 7,2 (см. с. 187). Сыворотка крови свежая без признаков гемолиза. Соляная кислота, 1 н. раствор. Иод, 0,3%-ный раствор в 3%-ном растворе иодистого калия (3 г иодистого калия растворяют в 70 мл воды в мерной колбе емкостью 100 мл добавляют 0,3 г. растертого в ступке иода и после растворения иода доводят водой до метки. Раствор хранят в темной склянке).

Для построения стандартной кривой в 5 мерных колбочек емкостью 50 мл наливают по 30—40 мл воды, переносят по 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 мл раствора крахмала, добавляют по 0,5 мл раствора соляной кислоты, по 0,1 мл раствора иода, доводят водой до метки и перемешивают. Колориметрируют через 5 мин на ФЭКе с красным светофильтром относительно воды в кюветках с расстоянием 1 см между рабочими гранями.

Ход работы. В 2 центрифужные пробирки наливают по 0,5 мл смеси растворов крахмала и хлорида натрия и по 0,3 мл фосфатной буферной смеси. В пробирку 1 (опыт) добавляют 0,1 мл сыворотки крови, в пробирку 2 (контроль) — 0,1 мл дистиллированной воды. Обе пробирки инкубируют в термостате (37°С) в течение 30 мин. Затем в обе пробирки добавляют по 0,1 мл 1 н. раствора соляной кислоты и центрифугируют в течение 10 мин при 1500 об/мин. В мерные колбы (50 мл) наливают по 30—40 мл воды, переносят по 0,2 мл центрифугата и проводят цветную реакцию, как это описано для построения стандартной кривой (см. с. 192).

Активность амилазы (E) выражают количеством крахмала (мг), которое может расщепить за 30 мин фермент, содержащийся в 100 мл сыворотки. Расчет ведут по формуле

$$E = \frac{(b - a) \cdot 100}{0,2 \cdot 0,1},$$

где a — количество мг крахмала в опытной пробирке, найденное по стандартной кривой; b — количество мг крахмала в контрольной пробирке, найденное по стандартной кривой; 100 — пересчет на 100 мл сыворотки; 0,1 — количество мл сыворотки, взятое для исследования; 0,2 — количество центрифугата (мл), взятое для цветной реакции.

Определение активности протеиназ

Протеиназы, или пептидазы, катализируют гидролитическое расщепление пептидных связей в полипептидах и белках, в результате чего отщепляются свободные аминокислоты. Уровень активности протеиназ служит показателем интенсивности белкового обмена в тканях.

Принцип метода. Показателем активности протеиназ является прирост небелкового азота за счет протеолитической деятельности ферментов.

Приборы. Гомогенизатор. Штатив с пробирками. Центрифужные пробирки. Пилетки. Центрифуга. Термостат (37° С). Колбы Кьельдаля (25 мл). Фотоэлектрорекордметр.

Реактивы. Печень свежая. Уксусная кислота, 0,2 н. раствор (11,3 мл ледяной уксусной кислоты растворяют в воде в мерной колбе емкостью 1 л). Уксуснокислый натрий, 0,2 н. раствор (27,22 г уксуснокислого натрия растворяют в воде в мерной колбе емкостью 1 л). Ацетатный буфер, рН 4,6 (520 мл раствора уксусной кислоты смешивают с 480 мл раствора уксуснокислого натрия). Трихлоруксусная кислота, 20%-ный раствор. Серная кислота концентрированная. Пергидроль. Реактив Несслера (см. с. 160). Сернокислый аммоний, раствор (0,05 мгN/мл) для построения стандартной кривой (см. с. 160).

Ход работы. 100 мг ткани печени гомогенизируют в 5 мл ацетатного буфера. В 2 центрифужные пробирки переносят по 2 мл гомогената и в пробирку 1 (контроль) тотчас добавляют 2 мл раствора трихлоруксусной кислоты. Пробирку 2 (опыт) инкубируют в термостате (37° С) в течение 1 ч. Затем в пробирку 2 добавляют 2 мл раствора трихлоруксусной кислоты и обе пробирки центрифугируют. Из опытной и контрольной пробирок отбирают по 2 мл центрифугата, переносят в колбы Кьельдаля и проводят минерализацию и цветную реакцию с реактивом Несслера (см. с. 160).

Активность тканевых протеиназ выражают количеством небелкового азота (мг), которое нарастает в течение

ние 1 мин за счет деятельности ферментов, содержащихся в 1 г ткани. Расчет ведут по формуле

$$E = \frac{(a - b) \cdot 4 \cdot 5}{2 \cdot 2 \cdot c \cdot 60}$$

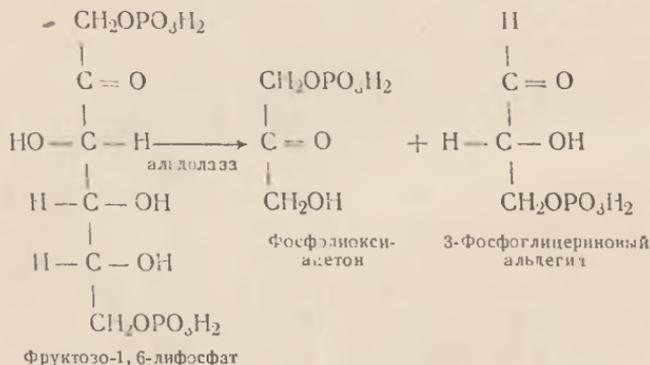
где E — активность протеиназ; a — количество мг азота в опытной пробирке, найденное по стандартной кривой; b — количество азота (мг) в контрольной пробирке, найденное по стандартной кривой; 2 — количество центрифугата, взятое для минерализации и цветной реакции; 4 — общее количество центрифугата, мл; 2 — количество гомогената (мл), используемого в опыте и контроле; 5 — общее количество гомогената, мл; c — навеска ткани, г; 60 — время инкубации, мин.

ЛИАЗЫ

Лиазами называют ферменты, которые катализируют негидролитическое расщепление органических соединений.

Определение активности альдозазы

Альдозаза катализирует процесс расщепления фруктозо-1,6-дифосфата на две фосфотриозы:



Активность альдозазы в сыворотке крови повышается у больных раком, прогрессирующей мышечной дистрофией, при заболеваниях сердца, кровоизлияниях в мозг, при болезни Боткина. В сыворотке крови коров альдозазная активность резко повышается при заболевании тейлерозом.

Принцип метода. Показателем активности фермента является увеличение концентрации фосфотриоз, образующихся при расщеплении фруктозо-1,6-дифосфата, катализируемом сывороточной альдолазой.

Приборы. Штатив. Пробирки центрифужные градуированные (10 мл). Пипетки. Микропипетки (0,1 мл). Термостат (37° С). Фотоэлектроколориметр.

Реактивы. Сыворотка крови свежая, без признаков гемолиза. Гидроксид натрия, 1 н. раствор. Гидроксид натрия, 0,6 н. раствор. Фруктозо-1,6-дифосфат, 0,005 М раствор в 0,056 М растворе солянокислого гидразина (250 мг бариевой соли фруктозо-1,6-дифосфата растворяют в 70 мл воды в мерной колбе емкостью 100 мл, добавляют 410 мг солянокислого гидразина, доводят до pH 8,2 с помощью 1 н. раствора гидроксида натрия, доливают водой до метки и перемешивают). Соляная кислота, 2 н. раствор, 2,4-динитрофенилгидразин, 0,1% раствор в 2 н. соляной кислоте.

Ход работы. В 2 градуированные центрифужные пробирки переносят по 0,1 мл сыворотки крови и в пробирку 1 (контроль) тотчас добавляют 0,1 мл раствора соляной кислоты. Пробирка 2 — опытная. В обе пробирки добавляют по 0,5 мл раствора фруктозо-1,6-дифосфата и инкубируют 30 мин в термостате (37° С). Затем в пробирку 2 добавляют 0,1 мл раствора соляной кислоты. В обе пробирки добавляют по 0,5 мл 0,6 н. раствора гидроксида натрия и оставляют при комнатной температуре на 30 мин. Затем добавляют по 0,5 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина и снова оставляют на 30 мин при комнатной температуре. По истечении указанного времени в пробирки наливают по 4,5 мл 0,6 н. раствора гидроксида натрия, доводят водой до метки 7 мл, перемешивают и через 5 мин после добавления щелочи колориметрируют на ФЭКе с зеленым светофильтром относительно воды в кюветах с расстоянием 1 см между рабочими гранями.

Активность альдолазы выражают в условных единицах экстинкции, которые косвенно отражают прирост фосфотриоз за счет активности фермента, содержащегося в 0,1 мл сыворотки крови. Расчет ведут по формуле

$$E = (a - b) \cdot 100,$$

где E — активность альдолазы; a — показания ФЭКа, полученные при колориметрии опытной пробы (экстинкция); b — показания ФЭКа, полученные при колориметрии контрольной пробы (экстинкция); 100 — коэффициент для перевода дробных величин экстинкции в целые числа.

ГЛАВА VIII

ВИТАМИНЫ

Витамины — низкомолекулярные органические вещества, выполняющие в животном организме функцию биологических катализаторов как в свободном виде, так и в составе ферментов. Витамины являются соединениями, разнообразными по составу, строению и свойствам. Они необходимы организму в минимальных количествах, однако лишь немногие витамины синтезируются тканями высших животных. Основная масса витаминов синтезируется микроорганизмами и растениями. В организм моногастрических животных витамины поступают с пищей, а у жвачных потребности в витаминах главным образом удовлетворяет продукция микрофлоры преджелудков. Витамины необходимы для поддержания интенсивного обмена веществ, физиологической активности и сопротивляемости заболеваниям. Обеспеченность организма витаминами является залогом высокой продуктивности сельскохозяйственных животных.

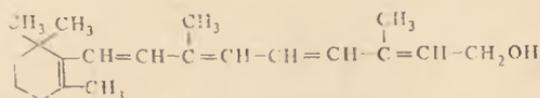
ЖИРОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ

Жирорастворимые витамины — группа соединений, растворимых в жирах и органических растворителях. К этой группе принадлежат витамины А, D, E, K. Жирорастворимые витамины участвуют главным образом в процессах биосинтеза белков.

Витамин А (антиксерофтальмический, ретинол)

Витамин А — важнейший витамин роста, необходимый для всех млекопитающих и птиц. Основными признаками гиповитаминоза А являются остановка роста, ксерофтальмия и кератомалация, ороговение эпителиальных клеток, чрезмерное отложение солей в надкостнице спинномозгового канала, куриная слепота, нарушения беременности и появление потомства с врожденными уродствами; у птиц — снижение яйценоскости. Витамин А является структурным компонентом биологических мембран, стимулирует биосинтез белка в печени;

участвует в синтезе мукополисахаридов, в формировании костной ткани и в процессах светоощущения.



Витамин А

Витамин А встречается только в продуктах животного происхождения.

✓ Качественные реакции на витамин А

Реакция с треххлористой сурьмой

Принцип метода. Витамин А взаимодействует с раствором треххлористой сурьмы в хлорсформе. В результате реакции присоединения образуется окрашенный в синий цвет продукт, природа которого не изучена.

Приборы. Штатив с пробирками (посуда должна быть сухой!).

Реактивы. Раствор витамина А в масле (промышленный препарат). Треххлористая сурьма, раствор в хлороформе (при приготовлении раствора избегать попадания воды! Кристаллы треххлористой сурьмы промывают в небольшой воронке хлороформом до тех пор, пока не будет стекать бесцветная жидкость, а затем в течение нескольких дней высушивают в эксикаторе над серной кислотой. 30 г треххлористой сурьмы переносят в колбочку с 100 мл нагретого на водяной бане до кипения хлороформа и продолжают нагревать еще некоторое время до максимального растворения реактива. Охлажденный раствор готов к употреблению. В темной склянке в холодильнике раствор сохраняется в течение недели).

Ход работы. В пробирку наливают 3 капли масляного раствора витамина А и добавляют 2 мл раствора треххлористой сурьмы. В пробирке появляется темно-синее окрашивание.

✓ Реакция с серной кислотой

Принцип метода. Для витамина А характерна цветная реакция с серной кислотой. Полученное соединение окрашено в сине-фиолетовый цвет. Химизм реакции окончательно не выяснен.

Приборы. Штатив с пробирками (посуда должна быть сухой!).

Реактивы. Серная кислота, концентрированная. Раствор витамина А в масле (промышленный препарат).

Ход работы. В пробирку наливают 3 капли масляного раствора витамина А и добавляют 1 каплю серной кислоты. В пробирке появляется сине-фиолетовое окрашивание.

Количественное определение витамина А в желтке яиц

Витамин А содержится в желтке куриных яиц. До 70% витамина А, депонируемого в желтке, поступает в организм цыпленка и используется им в течение первых дней жизни. Поэтому количество витамина А в желтке является важным фактором, определяющим жизнеспособность цыплят.

Содержание ретинола в желтке зависит от обеспеченности организма кур-несушек этим витамином и от породы кур. Желток яиц, полученных от кур юбилейной курчинской породы, содержит 11,3 мкг/г, а от загорских кур — 6,8 мкг/ витамина А.

Принцип метода. Витамин А, выделенный из желточной массы, определяют колориметрическим методом по цветной реакции с треххлористой сурьмой (см. с. 197). Полученное в результате реакции окрашенное соединение обладает максимумом поглощения при длине волны 620 нм.

Приборы. Колбы конические (100—200 мл). Обратный холодильник (с пробкой для конической колбы). Весы техникохимические с разновесом. Пипетки. Водяная баня. Цилиндры градуированные (50 мл). Делительная воронка (250 мл). Колба Вюрца (50 мл). Перегонный аппарат (для отгонки эфира). Пробирки с притертыми пробками (10 мл). Фотоэлектроколориметр. Стеклопалочки тонкие.

Реактивы. Желток яйца свежий. Гидроксид натрия, 60%-ный раствор. Этиловый спирт. Диэтиловый эфир. Фенолфталеин, 0,1%-ный спиртовой раствор. Сульфат натрия безводный. Хлороформ очищенный безводный. Уксусный ангидрид. Треххлористая сурьма, раствор в хлороформе (см. с. 197). Раствор витамина А в хлороформе (20 мкг/мл) используют для построения стандартной кривой (в кювету ФЭКа с расстоянием 0,5 см между рабочими гранями вносят последовательно по 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 мл раствора витамина А в хлороформе, добавляют непосредственно перед колориметрией хлороформ до общего объема 0,5 мл, 2—3 капли уксусного ангидрида, 2 мл раствора треххлористой сурьмы, осторожно перемешивают тонкой палочкой и тотчас колориметрируют, так как окраска сохраняется в течение 10—20 с, относительно хлороформа с красным светофильтром).

Ход работы. В конусную колбу переносят 10—15 г желточной массы, приливают 4—6 мл гидроксида натрия

и 10 мл этилового спирта, перемешивают, колбу закрывают пробкой с обратным холодильником, помещают в водяную баню (85—95°С) на 2 ч до образования однородной массы. К охлажденному содержимому колбы добавляют 10—15 мл этилового спирта, 40—50 мл воды, 30 мл диэтилового эфира, перемешивают и количественно переносят в делительную воронку. После расслоения жидкостей водный (нижний) слой переносят в другую делительную воронку и трижды промывают эфиром (по 15 мл). Порции эфира каждый раз переносят в первую делительную воронку, в которой оставался первоначально отделенный от воды эфирный экстракт витамина А. В этой же делительной воронке эфирный экстракт промывают несколько раз водой (по 20—30 мл) до полного удаления щелочи (до тех пор, пока промывные воды не перестанут окрашиваться фенолфталеином). В конусную колбу переносят промытую эфирную вытяжку и высушивают ее путем добавления 6—8 г безводного сернокислого натрия. Колбу в течение 30 мин периодически встряхивают. Обезвоженный эфирный экстракт переносят в колбу Вюрца, осадок сернокислого натрия 2—3 раза промывают эфиром (по 5—10 мл), каждый раз добавляя порции эфира в колбу Вюрца. Колбу Вюрца затем соединяют с перегонным устройством, погружают в водяную баню (35°С) и отгоняют эфир, после чего в колбе остаются желтые кристаллы витамина А. Кристаллы растворяют в 5 мл хлороформа, полученный раствор переносят в сухую пробирку с притертой пробкой и используют для колориметрического определения концентрации витамина А. Цветную реакцию проводят в кюветах ФЭКа непосредственно перед колориметрией. В кювету (0,5 см) переносят 0,2 мл полученного раствора витамина А, добавляют 0,3 мл хлороформа, проводят цветную реакцию и колориметрируют (см. с. 198). Содержание витамина А (х) выражают в мкг/г желтка. Расчет ведут по формуле

$$x = \frac{a \cdot 5}{0,2 \cdot c},$$

где a — количество витамина А (мкг), найденное по стандартной кривой; 0,2 — количество хлороформного раствора витамина А (мл), взятое для цветной реакции; 5 — общий объем хлороформного раствора витамина А, мл; c — навеска желтка, г.

Количественное определение каротина в желтке яиц

Каротины — желтые пигменты, широко распространенные в растительном мире, являются провитаминами А и во многом определяют питательную ценность желтка яиц. Количество каротина в желтке непостоянно и колеблется в зависимости от ряда факторов, многие из которых не поддаются учету. Содержание каротина в желтке зависит от вида птицы, ее возраста, генетических особенностей, сезона года, интенсивности яйцекладки (к концу цикла яйцекладки количество каротина в яйцах истощается). В среднем этот показатель колеблется у кур одного возраста и породы от 4 до 17 мкг/г желтка.

Принцип метода. Каротин извлекается из денатурированного спиртом желтка петролейным эфиром. Концентрацию каротина определяют колориметрически, измеряя оптическую плотность окрашенных растворов каротина в петролейном эфире.

Приборы. Пробирка емкостью 14—15 мл с притертой пробкой. Стеклянная палочка. Водяная баня с термометром. Весы с разновесом. Пипетки. Штутель-аппарат. Воронка Шотта, с помощью пробки соединенная со специальной пробиркой с отростком в верхней части для соединения с насосом. Вакуумный или водоструйный насос. Делительная воронка (15—20 мл). Хроматографическая колонка (состоит из стеклянной трубки длиной 12—15 см и диаметром 1 см, нижний конец которой сужен и заканчивается шарообразным расширением, заполненным ватным тампоном. Колонку на 4—5 см заполняют суспензией оксида алюминия в бензоле, который затем отсасывают. Верхний слой колонки высотой 3 см заполняют безводным сульфатом натрия. Хроматографическая колонка с помощью пробки соединяется со специальной пробиркой с отростком в верхней части для соединения с насосом). Специальные пробирки с пробкой размером 200×30 мм с отростком в верхней части для соединения с насосом. Цилиндр (25 мл). Фотоэлектроколориметр.

Реактивы. Желток яйца свежий. Хлорид натрия, 0,85%-ный раствор. Этиловый спирт. Петролейный эфир. Оксид алюминия безводный. Сульфат натрия безводный. Азобензол, спиртовой раствор (0,0145 г кристаллического х. ч. азобензола растворяют в 100 мл этилового спирта в мерной колбе. 1 мл полученного раствора по оптической плотности соответствует концентрации каротина в растворе 2,35 мкг/мл). Раствор азобензола используют для построения стандартной кривой (в 4 мерные пробирки с меткой 10 мл переносят по 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 мл раствора азобензола, добавляют этиловый спирт до метки и перемешивают. В 5-ю пробирку наливают неразбавленный раствор азобензола. Приготовленные таким образом растворы по оптической плотности соответствуют содержанию каротина 0,47; 0,94; 1,31; 1,88; 2,35 мкг/мл. Растворы колориметрируют на ФЭКе против этилового спирта с синим светофильтром, в кюветках с расстоянием 1 см между рабочими границами).

Ход работы. В заранее взвешенную пробирку с притертой пробкой переносят 1—2 г желтка и снова взвешивают пробирку с желтком. По разности результатов двух взвешиваний находят массу желтка. К желтку добавляют 3 мл раствора хлорида натрия, слегка подогревают на водяной бане (40°С) и перемешивают палочкой до получения гомогенной массы. В пробирку добавляют 3 мл этилового спирта, перемешивают и приливают 4 мл петролейного эфира. Пробирки закрывают притертыми пробками и встряхивают в шуттель-аппарате в течение 10 мин. Затем содержимое пробирок количественно переносят в воронку Шотта, соединенную с отсасывающим устройством, и продолжают экстракцию каротина путем добавления в воронку небольших порций (3—5 мл) петролейного эфира до тех пор, пока стекающие капли не станут бесцветными. На эту процедуру обычно расходуют 15—20 мл петролейного эфира. Полученный экстракт переносят в делительную воронку, с помощью которой отделяют нижний слой (водный). Экстракт каротина в петролейном эфире пропускают через хроматографическую колонку для того, чтобы высушить и удалить сопутствующие каротину пигменты. После прохождения экстракта через колонку пропускают небольшое количество петролейного эфира до тех пор, пока стекающие капли не станут бесцветными. Экстракт переносят в цилиндр, доводят объем петролейным эфиром до метки, перемешивают и записывают объем экстракта. Полученный экстракт затем колориметрируют на ФЭКе против петролейного эфира с синим светофильтром в кюветах с расстоянием 1 см между рабочими гранями. Содержание каротина в желтке (x) выражают в мкг/г. Расчет ведут по формуле

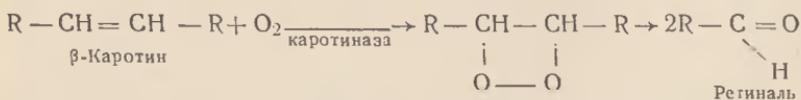
$$x = \frac{a \cdot V}{c},$$

где a — количество каротина в 1 мл экстракта (мкг), найденное по стандартной кривой; V — объем экстракта, мл; c — навеска желтка, г.

Определение витамина А и каротина в сыворотке крови

Витамин А образуется в животном организме из каротина, который синтезируется зелеными растениями, мик-

роорганизмами и простейшими. Содержание витамина А и каротина в животном организме зависит от их поступления с кормом. Биосинтез ретиналя происходит в печени и слизистой оболочке кишечника путем окислительного расщепления каротина под влиянием фермента каротиныазы. Разрыв цепи происходит по месту центральной двойной связи. Каротиныаза относится к липооксидазам, в реакции участвуют молекулярный кислород и ионы железа:



Не все животные одинаково способны к такому превращению каротина: лучше всего процесс идет в организме цыплят, хуже — у коров и овец; у хищников каротиныаза отсутствует. Ниже приведены видовые различия животных в использовании β-каротина для синтеза витамина А (мкг, образующегося из 1 мг β-каротина):

Птица	500	Корова	120
Свинья	160	Лошадь	167
Овца	174	Норка	0

Содержание как каротина, так и витамина А в сыворотке крови служит показателем обеспеченности организма животного витамином А.

Ниже приведены данные по содержанию каротина и витамина А в сыворотке крови животных (мг %):

Каротин		Витамин А	
Коровы		Коровы	
август	1,21	сентябрь	0,050
октябрь	0,84	март	0,009
декабрь	0,47		
Телята		Телята	
30 дн.	0,38	Овцы	0,018
365 дн.	1,05		

Принцип метода. Концентрацию экстрагируемых из сыворотки крови витамина А и каротина определяют спектрофотометром: каротин при длине волны 460 нм, витамин А (до и после ультрафиолетового облучения) при длине волны 328 нм.

Приборы. Штатив для пробирок. Пробирки центрифужные. Пететки. Стекланные палочки тонкие. Водяная баня (60° С). стакан со льдом. Центрифуга электрическая. Пастеровская пипетка, соеди-

пенная со шприцем. Спектрофотометр. Кварцевые кюветы к спектрофотометру толщиной 1 см. Пробирки (55×8 мм) с притертыми пробками из стекла, пропускающего ультрафиолетовые лучи. Кварцевая лампа ПРК-4. Настольный вентилятор. Шуттель-аппарат.

Реактивы. Сыворотка крови свежая, без признаков гемолиза. Гидроксид калия, 1 н. раствор в 90%-ном этиловом спирте, свежеприготовленный (готовят смесь из 11 н. раствора гидроксида калия и абсолютного этилового спирта в соотношении 1:10. Годный к употреблению реактив бесцветный). Ксилоло-лигроиновая или ксилоло-октановая смесь (1:1), свежеприготовленная.

Ход работы. В центрифужную пробирку переносят 2 мл сыворотки, добавляют 2 мл 1 н. спиртового раствора гидроксида калия, перемешивают стеклянной палочкой до образования однородной смеси и ставят для гидролиза в водяную баню (60° С) на 20 мин. Пробирку охлаждают в воде со льдом в течение 10 мин и добавляют 2 мл ксилоло-лигроиновой (или ксилоло-октановой) смеси. Пробирку энергично встряхивают в шуттель-аппарате в течение 5 мин, охлаждают и центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин. Пастеровской пипеткой, соединенной со шприцем, осторожно отсасывают верхний слой (экстракт витамина А и каротина) и переносят его в кварцевую кювету спектрофотометра. Спектрофотометрируют против ксилоло-лигроиновой (или ксилоло-октановой) смеси. Содержание каротина (x) в мкг% определяют при длине волны 460 нм и расчет ведут по формуле

$$x = E_{460} \cdot 480,$$

где E_{460} — показание спектрофотометра, получаемое путем измерения раствора при длине волны 460 нм в кювете толщиной 1 см; 480 — коэффициент Бесселя для определения содержания каротина.

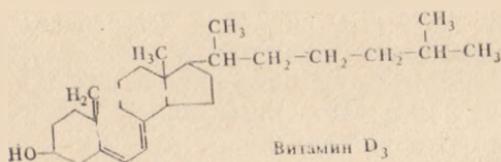
Количество витамина А определяют по разности данных, полученных путем двукратного спектрофотометрирования. После первого определения (при длине волны 328 нм) содержимое кювет с помощью чистой пипетки переносят в специальные пробирки с притертыми пробками из стекла, пропускающего УФ-лучи, и облучают кварцевой лампой ПРК-4 с расстояния 15—19 см в течение 45—60 мин. Для охлаждения облучаемых пробирок используют настольный вентилятор. После облучения жидкость снова количественно переносят в кюветы и повторно спектрофотометрируют (при длине 328 нм). Расчет содержания витамина А (x) в мкг% ведут по формуле

$$x = (E_{328}^1 - E_{328}^2) \cdot 637,$$

где E_{328} — показания спектрофотометра, получаемые путем измерения растворов при длине волны 328 нм в кювете толщиной 1 см до E^1 и после E^2 ультрафиолетового облучения; 637 — коэффициент Бесселя для определения содержания витамина А.

Витамин D (антирахитический, кальциферол)

Основным проявлением гиповитаминоза D у молодых животных является рахит, для которого характерно нарушение процесса формирования скелета, в результате чего наблюдаются искривления конечностей, запаздывание сращения костей черепа, потеря тонуса мышц, особенно брюшного пресса. У взрослых животных при недостатке витамина D в организме развиваются остеомаляция, размягчение костей, вызванное вымыванием кальция из уже сформировавшейся костной ткани. У кур образуются яйца с тонкой скорлупой, снижается яйценоскость, и из яиц, полученных от несушек с признаками гиповитаминоза D, развиваются эмбрионы с уродствами конечностей. D-гиповитаминоз у сельскохозяйственных животных развивается в осенне-зимний период, когда солнечная радиация минимальна, а также при недостатке витамина D в рационе.



Витамин D синтезируется в животном организме из стеролов под влиянием ультрафиолетовых лучей. Поэтому для предупреждения рахита и остеомаляции животных необходимо подвергать естественной (солнечной) или искусственной радиации, а также давать с кормами витамин D, который содержится только в продуктах животного происхождения и в облученных дрожжах. В животном организме витамин D стимулирует биосинтез кальцийсвязывающего белка, играющего важную роль в транспорте кальция через мембраны клеток слизистой тонкого кишечника, костей и скорлуповой железы птиц. Кальциферол стимулирует также обратное всасывание

фосфора в почках, синтез лимонной кислоты в тканях и отложение в жировой ткани непредельных жирных кислот.

✓ **Качественная реакция на витамин D с треххлористой сурьмой**

Принцип метода. Витамин D реагирует с раствором треххлористой сурьмы в хлороформе с образованием окрашенного в оранжево-красный цвет соединения, природа которого не изучена.

Приборы. Штатив с пробирками (посуда должна быть сухой!).

Реактивы. Треххлористая сурьма, раствор в хлороформе (см. с. 197). Хлороформ. Раствор витамина D в масле (промышленный препарат).

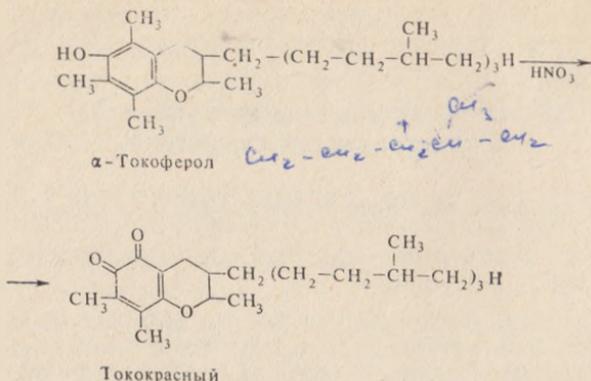
Ход работы. В две пробирки наливают по 3 капли раствора витамина D. В первую пробирку добавляют 2 мл хлороформа, во вторую — 2 мл раствора треххлористой сурьмы. Во второй пробирке появляется оранжево-красное окрашивание, интенсивность которого со временем нарастает.

Витамин E (антистерильный, токоферол)

Признаками отсутствия или недостатка витамина E в организме женских особей являются бесплодие, самопроизвольные аборт, рассасывание плода; у мужских особей — нарушение сперматогенеза. При гиповитаминозе E наблюдается также дистрофия мышц и нервные расстройства. В природе витамин E синтезируется только растениями. Витамин E участвует в окислительно-восстановительных реакциях в мышечной ткани, является антиоксидантом непредельных жирных кислот, предотвращая тем самым появление токсических продуктов их окисления, вызывающих гибель эмбрионов, участвует в стабилизации лизосомальных мембран. Витамин E применяют как лечебный препарат при лечении мышечной дистрофии, коронарного склероза, бесплодия.

W **Качественная реакция на витамин E с азотной кислотой**

Принцип метода. Витамин E, взаимодействуя с концентрированной азотной кислотой, окисляется с образованием о-хинона, окрашенного в оранжево-красный цвет соединения — тококресного.



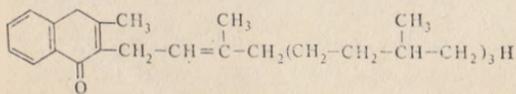
Приборы. Штатив с пробирками. Водяная баня.

Реактивы. Азотная кислота концентрированная. Витамин Е, масляный раствор (промышленный препарат).

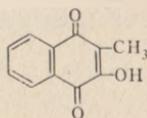
Ход работы. В 2 пробирки наливают по 2—3 капли масляного раствора витамина Е. В первую пробирку добавляют 1—2 мл воды, во вторую — такое же количество концентрированной азотной кислоты. Обе пробирки нагревают на кипящей водяной бане 10 мин. В пробирке с азотной кислотой масляный слой витамина окрашивается в оранжево-красный цвет.

Витамин К (антигеморрагический, филлохинон)

При недостатке витамина К в организме кровь теряет способность свертываться, и при повреждении ткани возникают кровотечения (геморрагии). К недостатку витамина К особенно чувствительны птицы. Витамин К в животном организме не образуется; к синтезу его способны только растения и микроорганизмы. Витамин К регулирует процесс свертывания крови, участвуя в синтезе некоторых белков, необходимых для образования сгустка (протромбин). Особенно богаты витамином К зеленые корма и соответствующие им виды травяной муки.



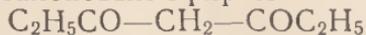
Витамин К



Филлокол

✓ Качественная реакция на витамин К

Принцип метода. В щелочной среде витамин К гидролизуется с образованием фтиокола, взаимодействующего с диэтилмалоновым эфиром



Продукт конденсации диэтилмалонового эфира с карбонильными группами фтиокола окрашен в красно-фиолетовый цвет.

Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. Витамин К, спиртовой раствор (промышленный препарат). Диэтилмалоновый эфир, 1%-ный спиртовой раствор. Гидроксид калия, 1%-ный раствор.

Ход работы. В пробирку наливают 2 мл раствора витамина К, добавляют 1 мл раствора диэтилмалонового эфира и 0,2 мл раствора гидроксида калия. В пробирке появляется красно-фиолетовое окрашивание.

ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ

Витамины группы В и витамин С — органические вещества, хорошо растворимые в воде. Соединения эти различны по составу и свойствам, однако общим для них является сходная биологическая роль — все они, являясь составной частью ферментов, влияют на процессы внутриклеточного обмена белков, углеводов, липидов.

Витамин В₁ (антиневритный, тиамин)

Признаками гиповитаминоза В являются: полиневрит, нарушение сердечной деятельности, пищеварения и водного обмена. Витамин В₁ в виде пиродифосфорного эфира (тиаминпиродифосфата) входит в состав ферментов декарбоксилаз кетокислот, катализирующих процесс декарбоксилирования пировиноградной и α-кетоглутаровой кислот. Витамин В₁ синтезируется зелеными растениями и микроорганизмами.

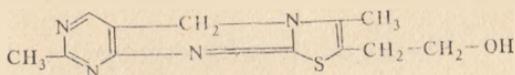
✓ Качественная реакция на витамин В₁

Витамин В₁, который содержится в молоке и молозиве различных видов животных, можно открыть с помощью качественной реакции.

Количественное определение витамина В₁ в моче

Содержание тиаминна в моче непостоянно и отражает обеспеченность животного витамином В₁. Авитаминоз В₁ может быть обнаружен при внутривенном введении тиаминна. В этом случае в моче обнаруживаются незначительные количества введенного витамина В₁.

Принцип метода. В щелочной среде под влиянием сильных окислителей, к числу которых относится гексацианоферрат (III) калия, тиамин окисляется, образуя тиохром:



Тиохром

Водный раствор тиохрома в ультрафиолетовых лучах дает сине-голубую флуоресценцию, интенсивность которой пропорциональна концентрации тиаминна.

Приборы. Штатив. Пробирки с притертыми пробками (20 мл). Пипетки. Шуттель-аппарат. Флуорометр.

Реактивы. Моча свежая. Тиамин, стандартный раствор (0,2 мкг/мл). Гидроксид натрия, 1 М раствор. Гидроксид натрия, 40%-ный раствор. Бензолсульфонилхлорид. Гексацианоферрат (III) калия, 2%-ный раствор. Окисляющий реактив (смесь 2%-ного раствора гексацианоферрата (III) калия и 40%-ного раствора гидроксида натрия в соотношении 1:2). Перекись водорода, 3%-ный раствор. Изобутиловый спирт.

Ход работы. В пробирку 1 переносят 2 мл стандартного раствора тиаминна, в пробирки 2 и 3 — по 2 мл мочи. В пробирки 1 (стандарт) и 2 (опыт) добавляют по 3 мл воды, в пробирку 3 (контроль) — 2 мл воды, 1 мл 1 М раствора гидроксида натрия и 2 капли бензолсульфонилхлорида (агент, разрушающий тиамин). Пробирки энергично встряхивают и оставляют на 5 мин. Затем во все пробирки добавляют по 2,5 мл окисляющего реактива, а через 1 мин — по 2 капли перекиси водорода, перемешивают и приливают по 10 мл изобутилового спирта. Все пробирки интенсивно встряхивают в течение 2 мин в шуттель-аппарате. После расслоения жидкостей прозрачные изобутиловые экстракты переносят в кюветы флуорометра. Вначале по стандартному раствору, содержащему 0,4 мкг тиаминна (пробирка 1), калибруют прибор, а затем измеряют интенсивность флуоресценции витамина В₁

в пробирках 2 (опыт) и 3 (контроль — нетиохромная флуоресценция раствора). Количество витамина В₁ выражают в мкг/мл мочи. Количество тиамин (x, мкг/мл) высчитывают по формуле

$$x = \frac{a - b}{2},$$

где a — количество тиамин (мкг), соответствующее флуоресценции раствора в опытной пробирке; b — количество тиамин (мкг), соответствующее нетиохромной флуоресценции раствора в контрольной пробирке; 2 — количество мочи (мл), взятое для исследования.

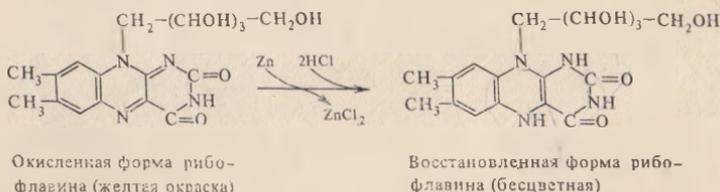
Витамин В₂ (рибофлавин)

При недостатке витамина В₂ наблюдается остановка роста животных, дерматиты, поражение слизистой оболочки ротовой полости, воспаление глазного яблока; у птиц — судорожные искривления пальцев ног, паралич, снижение яйценоскости. Витамин В₂ синтезируется зелеными растениями и микроорганизмами. Рибофлавин принимает участие в окислительно-восстановительных реакциях обмена веществ, являясь составной частью (ФАД) аэробных дегидрогеназ.

Реакция восстановления витамина В₂

Биологическая роль рибофлавина как переносчика водорода связана с его способностью обратимо переходить из окисленной формы в восстановленную.

Принцип метода. Витамин В₂ восстанавливается водородом, который выделяется при взаимодействии металлического цинка с соляной кислотой:



Приборы. Штатив с пробирками. Пипетки. Пробки к пробиркам.

Реактивы. Витамин В₂, 0,005%-ный водный раствор. Соляная кислота, разбавленная (1:1). Цинк металлический (в гранулах).

Ход работы. В пробирку наливают 2 мл раствора витамина В₂, добавляют 1 мл соляной кислоты, перемешивают и отливают равный объем в другую пробирку. В одну из пробирок бросают кусочек металлического цинка и обе пробирки закрывают пробками. В пробирке с цинком обесцвечивание раствора наступает в течение 5—10 мин.

Количественное определение витамина В₂ в яйцах

Нормальная яйценоскость кур-несушек обеспечивается наличием 3 мг витамина В₂ в 1 кг корма. Недостаток рибофлавина в яйцах ухудшает выводимость и жизнеспособность цыплят.

Принцип метода. Метод основан на способности растворов рибофлавина давать в ультрафиолетовых лучах желто-зеленую флуоресценцию, которая связана с наличием в молекуле витамина В₂ изоаллоксазиновой структуры. Интенсивность флуоресценции пропорциональна концентрации рибофлавина.

Приборы. Градуированный цилиндр с притертой пробкой (200 мл). Шуттель-аппарат. Воронка. Бумажные фильтры. Колба. Флуорометр.

Реактивы. Желток и белок из свежих яиц. Этиловый спирт, 96%-ный раствор. Этиловый спирт, 55%-ный раствор. Рибофлавин, стандартный раствор (основной раствор готовят растворением 10 мг рибофлавина в воде в мерной колбе емкостью 250 мл. Рабочий раствор готовят перед опытом путем разбавления основного раствора в 10 раз). Гидрокарбонат натрия. Гидросульфит натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

Ход работы. Рибофлавин экстрагируют из желтка (а) и белка (б): а) в мерный цилиндр с притертой пробкой наливают 50 мл 55%-ного этилового спирта, осторожно переносят 10 г желтка, стараясь не попасть на стенки, и добавляют в цилиндр еще 50 мл 55%-ного этилового спирта; цилиндр закрывают пробкой, жидкость в цилиндре перемешивают и через несколько минут записывают объем жидкости в цилиндре; б) в мерный цилиндр с притертой пробкой осторожно переносят около 25 г белка, избегая образования пены, добавляют 75 мл 96%-ного этилового спирта, закрывают цилиндр пробкой, перемешивают содержимое и через несколько минут записывают объем жидкости в цилиндре. В дальнейшем определение витамина в экстрактах из желтка и белка ведут одинаково. Цилиндры встряхивают в шуттель-аппарате

в течение 2 ч, содержимое фильтруют через сухой бумажный фильтр и затем измеряют флуоресценцию полученных экстрактов. Флуорометр калибруют по рабочему стандартному раствору рибофлавина (4 мкг/мл), после чего определяют концентрацию витамина в полученных экстрактах. Чтобы избежать получения завышенных результатов, определяют также перифлавиновую флуоресценцию, возникающую за счет примесей, путем гашения флуоресценции витамина В₂. Для этого к исследуемой на флуорометре части экстракта после измерения флуоресценции дважды в течение 5 мин добавляют приблизительно по 0,1 г гидрокарбоната натрия и гидросульфита натрия и затем снова измеряют флуоресценцию раствора, выражая ее, как и при первом измерении в мкг рибофлавина в 1 мл раствора. Содержание рибофлавина (x) выражают количеством витамина В₂ (мкг) в 1 г желтка или белка. Расчет ведут по формуле

$$x = \frac{(a - b) \cdot V}{c},$$

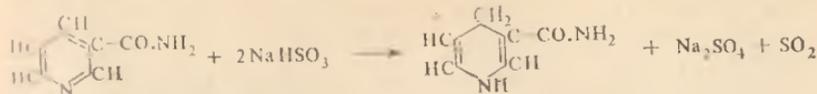
где a — количество рибофлавина (мкг/мл), соответствующее флуоресценции исследуемого экстракта; b — количество рибофлавина (мкг/мл), соответствующее перифлавиновой флуоресценции исследуемого раствора (после гашения флуоресценции рибофлавина); V — общий объем экстракта рибофлавина, мл; c — навеска желтка или белка, г.

Витамин В₅ (витамин РР, никотинамид)

Признаками недостатка витамина В₅ в организме могут являться дерматиты, поражения слизистых оболочек ротовой полости, расстройства пищеварения и нервной системы. Витамин В₅ синтезируется растениями и микроорганизмами, а также в тканях некоторых животных (из аминокислоты триптофана). Амид никотиновой кислоты служит составной частью (НАД) окислительно-восстановительных ферментов — анаэробных дегидрогеназ.

Качественная реакция на витамин В₅

Принцип метода. Под действием гидросульфита натрия происходит частичное восстановление никотинома (никотиновой кислоты) с образованием 1,4-дигидропиридинпроизводного, окрашенного в желтый цвет:



Никотинамид

1,4-Дигидропиридинпро-
изводное никотинамида

Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. Никотиновая кислота или амид никотиновой кислоты (в порошке). Гидрокарбонат натрия, 10%-ный раствор. Гидросульфит натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 5%-ный раствор, свежеприготовленный.

Ход работы. В пробирку помещают немного порошка витамина В₅ никотиновой кислоты или ее амида, добавляют 1—2 мл раствора гидрокарбоната натрия и после перемешивания добавляют 1—2 мл раствора гидросульфита натрия. Жидкость в пробирке окрашивается в желтый цвет.

Витамин В₁₂ (антианемический, цианкобаламин)

Признаками гиповитаминоза В₁₂ могут быть остановка роста, дерматиты, нарушение функции размножения, высокая смертность животных, у человека — злокачественная пернициозная анемия (в крови снижается количество эритроцитов). Этот витамин не синтезируется зелеными растениями и дрожжами. Потребности моногастрических и жвачных животных в витамине В₁₂ удовлетворяются за счет деятельности кишечной и рубцовой микрофлоры. Витамин В₁₂ осуществляет свою биологическую роль, являясь составной частью ряда ферментов, которые участвуют в биосинтезе нуклеиновых кислот и белков, а также в обмене метильных групп.

✓ Качественная реакция на кобальт, содержащийся в витамине В₁₂

Витамин В₁₂ — единственный из известных витаминов, который содержит в своем составе металл кобальт, который очень прочно связан в цианкобаламиновом комплексе. Определение кобальта возможно только после разрушения всей молекулы витамина.

Принцип метода. После минерализации цианкобаламина концентрированной серной кислотой кобальт открывают путем нагревания минерализата с раствором тиомочевины. При этом образуется окрашенное в синие

зеленый цвет комплексное соединение следующего состава: $[\text{CO}_2(\text{CSN}_2\text{H}_4)_3](\text{SO}_4)_2$.

Приборы. Штатив с пробирками. Песочная баня. Спиртовка. Асбестовая сетка. Беззольный фильтр.

Реактивы. Витамин В₁₂ в ампулах (200 мкг/мл). Серная кислота, концентрированная. Пергидроль. Тиомочевина, 10%-ный раствор.

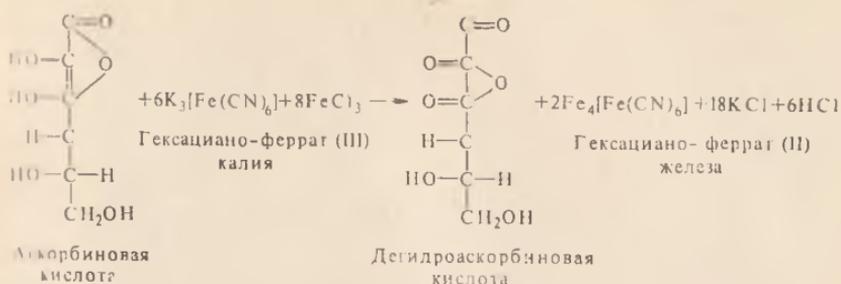
Ход работы. В пробирку переносят содержимое одной ампулы витамина В₁₂, добавляют 10 капель концентрированной серной кислоты и нагревают на песочной бане в течение 15—20 мин, затем добавляют 1 каплю пергидроля. После обесцвечивания жидкости в колбе и охлаждения ее добавляют 1 мл воды. На беззольный фильтр наносят 3—4 капли раствора тиомочевины и подсушивают фильтр над спиртовкой с асбестовой сеткой. Затем на фильтр на то же место наносят 3—4 капли полученного минерализата. После повторного подсушивания над спиртовкой на фильтре появляется сине-зеленое окрашивание, свидетельствующее о наличии кобальта.

Витамин С (антицинготный, аскорбиновая кислота)

Недостаток витамина С в животном организме вызывает нарушение обмена белков, пониженную сопротивляемость к заболеваниям желудочно-кишечного тракта и дыхательных путей, кровоизлияния на коже и внутренних органах, кровотечение из десен и выпадение зубов (цинга). Витамин С синтезируется в растениях и в животных тканях большинства животных (исключения составляют человек, обезьяна и морская свинка). Биологическая роль витамина С связана с его участием в окислительно-восстановительных процессах, регуляции биосинтеза ДНК, белка, углеводов, стероидных гормонов.

Качественная реакция на витамин С

Принцип метода. Аскорбиновая кислота восстанавливает железо в комплексном ионе — гексацианоферрате (III), превращая его в гексацианоферрат (II). В присутствии хлорного железа образуется гексацианоферрат (II) железа, окрашенный в синий цвет (берлинская лазурь):



Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. Гексацианоферрат (III) калия, 1%-ный раствор. Хлорное железо, 1%-ный раствор. Витамин С, 0,5%-ный раствор.

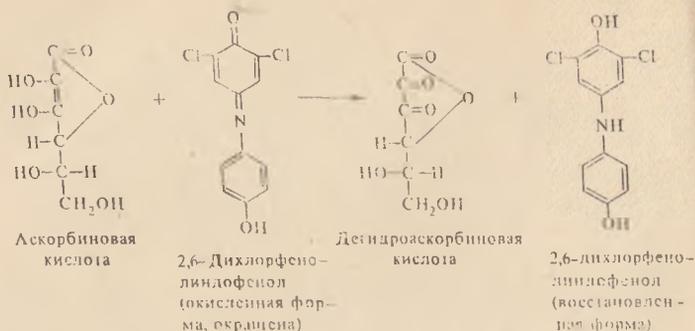
Ход работы. В одну пробирку наливают 2—3 мл воды, в другую — 2—3 мл раствора витамина С. В обе пробирки добавляют по несколько капель растворов гексацианоферрата (III) калия и хлорного железа. В пробирке с витамином С появляется синее окрашивание.

Количественное определение витамина С в кормах

Витамин С — важная составная часть рациона животных и человека. Ниже приводится содержание витамина С в продуктах растительного происхождения (мг%):

Свежескошенный клевер	100	Смородина черная . . .	300
Капуста	30	Лимоны	40
Укроп	135	Картофель молодой . . .	35
Лук зеленый	60	Морковь	5
Лук репчатый	10	Шиповник (плоды) . . .	3000

Принцип метода. Реагентом, с которым взаимодействует аскорбиновая кислота, является 2,6-дихлорфенолиндофенол — соединение, окрашенное в синий (в нейтральной среде) или в розовый (в кислой среде) цвет. Продукт восстановления 2,6-дихлорфенолиндофенола окраски не имеет. Аскорбиновая кислота, извлеченная из растительного материала соляной кислотой, восстанавливает 2,6-дихлорфенолиндофенол с образованием бесцветного соединения. Содержание витамина С определяют титрованием. В эквивалентной точке избыточная капля 2,6-дихлорфенолиндофенола окрашивает раствор в розовый цвет:



Приборы. Фарфоровая ступка. Стекланный песок. Воронка. Бумажный фильтр. Колба коническая (100 мл). Мерный цилиндр с пробкой (100 мл). Бюретка. Пипетки.

Реактивы. Растительный материал свежий. Соляная кислота, 2%-ный раствор. Щавелевая кислота, 0,01 н. раствор (готовят из фиксанала). Серная кислота, разбавленная (1:2). Серная кислота, 0,02 н. раствор. Перманганат калия, 0,01 н. раствор (титр устанавливают через 10—14 дней после приготовления раствора путем титрования 10 мл 0,01 н. раствора щавелевой кислоты 0,01 н. раствором перманганата калия). Щавелевокислый аммоний, насыщенный раствор. Соли Мора, 0,01 н. раствор (3,92 г соли Мора растворяют в 0,02 н. растворе серной кислоты в мерной колбе емкостью 1 л. Хранят в темной склянке. Титр соли Мора устанавливают по титрованному 0,01 н. раствору перманганата калия: к 10 мл 0,01 н. раствора соли Мора добавляют 1,5 мл раствора серной кислоты, разбавленной 1:2, и титруют 0,01 н. раствором перманганата калия до появления стойкого розового окрашивания). Реактив Тильманса (натриевая соль 2,6-дихлорфенолиндофенола, 0,001 н. раствор, 0,2 г натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола растворяют в 700 мл воды и оставляют на ночь, затем фильтруют в мерную колбу емкостью 1 л, доводят водой до метки и перемешивают. Раствор годен в течение недели. Титр полученного раствора устанавливают по 0,01 н. раствору соли Мора: к 10 мл 0,001 н. раствора натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола добавляют 5 мл насыщенного раствора щавелевокислого аммония и титруют 0,01 н. раствором соли Мора до изменения голубого цвета раствора в желтый. Поправку к нормальности реактива Тильманса вычисляют по формуле:
$$K = \frac{a \cdot b}{c}$$
 где a — количество мл 0,01 н. раствора соли Мора,

израсходованное на титрование 10 мл 0,001 н. раствора натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола; b — количество мл 0,01 н. раствора перманганата калия, потраченное на титрование 10 мл 0,01 н. раствора соли Мора; c — количество мл 0,01 н. раствора перманганата калия, израсходованное на титрование 10 мл 0,01 н. раствора щавелевой кислоты. 1 мл 0,001 н. раствора натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола соответствует 0,088 мг аскорбиновой кислоты).

Ход работы. Навеску свежего растительного материала (20 г) тщательно растирают в ступке с 10 мл раствора соляной кислоты, небольшими порциями добавляя стеклянный песок. Полученный гомогенат переносят в цилиндр, ступку и пестик смывают водой, которую также сливают в цилиндр. Объем жидкости доводят водой до метки и перемешивают. Содержимое цилиндра фильтруют через складчатый фильтр. В коническую колбу отбивают определенный объем фильтрата и титруют реактивом Тильманса до появления розового окрашивания, исчезающего в течение 0,5 мин. Количество витамина С (x) рассчитывают по формуле (мг%)

$$x = \frac{a \cdot K \cdot 0,088 \cdot 100 \cdot 100}{V \cdot c}$$

где a — количество реактива (мл) Тильманса, пошедшее на титрование фильтрата; K — поправка к нормальности реактива Тильманса; 0,088 — количество аскорбиновой кислоты (мг), эквивалентное 1 мл реактива Тильманса; 100 — общий объем солянокислого экстракта витамина С, мл; V — объем фильтрата (мл), взятый для титрования реактивом Тильманса; 100 — пересчет на 100 г растительной массы; c — навеска растительного материала, г.

ГЛАВА IX

ГОРМОНЫ

Наряду с витаминами и ферментами гормоны относят к биологически активным органическим веществам. Клетки желез внутренней секреции продуцируют гормоны, которые кровью транспортируются к органам-мишеням. Гормоны оказывают мощное воздействие на биохимические процессы путем регуляции активности многих ферментных систем. Гормональные факторы вместе с нервной системой регулируют физиологические функции организма, способствуя его адаптации к меняющимся условиям внешней среды.

Инсулин

Инсулин вырабатывается β -клетками островкового аппарата поджелудочной железы и является гормоном белковой природы, в молекуле которого полипептидные цепи соединены дисульфидными мостиками. Поэтому инсулин дает биуретовую реакцию, характерную для всех белков, и реакцию на серосодержащие аминокислоты.

Принцип метода. Биуретовая реакция (см. с. 137); реакция на серосодержащие аминокислоты (см. с. 145).

Приборы. Штатив с пробирками. Пипетки. Спиртовка.

Реактивы. Инсулин, раствор (патентованный препарат инсулина в ампулах с концентрацией 40 ЕД/мл разбавляют двойным количеством воды). Гидроксид натрия, 10%-ный раствор. Сульфат меди, 1%-ный раствор. Свинец уксуснокислый, 0,5%-ный раствор.

Ход работы. 1. Биуретовая реакция. К 1—2 мл раствора инсулина добавляют равный объем раствора гидроксида натрия и 1—2 капли раствора сульфата меди. В пробирке появляется фиолетовое окрашивание.

2. Реакция на серосодержащие аминокислоты. К 1—2 мл раствора инсулина добавляют равный объем раствора гидроксида натрия и нагревают до кипения. Затем добавляют 2—3 капли раствора уксуснокислого свинца. В пробирке появляется коричневое окрашивание.

Влияние инсулина на содержание глюкозы в крови

Инсулин оказывает влияние на процессы углеводного обмена несколькими путями. Этот гормон способствует переходу глюкозы из крови в ткани, активируя процессы транспорта в клеточных мембранах; стимулирует фосфорилирование глюкозы в реакциях с АТФ путем усиления синтеза гексокиназы; ингибирует деятельность фермента глюкозо-6-фосфатазы, тем самым предохраняя от расщепления глюкозо-6-фосфат. Таким образом, под влиянием инсулина уменьшается количество глюкозы в крови и повышается использование этого сахара клетками.

Принцип метода. Содержание глюкозы в крови кролика определяют по методу Хагедорна-Иенсена (см. с. 93) до и после подкожной инъекции инсулина.

Приборы. Весы с разновесом. Вата. Иглы для взятия крови. Шприцы (1—2 мл и 10 мл). Стерилизатор. Приборы для определения содержания глюкозы в крови (см. с. 94).

Реактивы. Ксилол. Вода теплая. Хлорид натрия, 0,9%-ный изотонический раствор (в ампулах). Инсулин, раствор (в стерильных условиях к 1 мл раствора промышленного препарата инсулина, содержащему в ампуле 40 ЕД, добавляют 9 мл изотонического раствора хлорида натрия и перемешивают. Концентрация полученного раствора 4 ЕД/мл). Спирт. Иод, настойка. Глюкоза, раствор (в ампулах). Реактивы для определения содержания сахара в крови (см. с. 94).

Подопытное животное. Кролик.

Ход работы. Взвешивают кролика, предварительно голодавшего в течение суток, и рассчитывают количество раствора инсулина (мл), которое необходимо для инъекции (1,5—2,0 ЕД/кг массы). Ухо кролика протирают ватой, смоченной ксилолом, смывают ксилол теплой водой и вытирают ухо сухой ватой. Делают укол в ушную вену и набирают сухой микропипеткой 0,1 мл крови для определения содержания глюкозы. Затем кролику вводят подкожно необходимое количество инсулина и через 1 ч повторно берут кровь из ушной вены (0,1 мл) для определения сахара (см. с. 93). После этого кролику вводят подкожно глюкозу для предотвращения инсулинового шока. Результаты опыта заносят в таблицу и делают вывод о влиянии инсулина на уровень глюкозы в крови.

Время взятия крови для исследования	Содержание глюкозы в крови (мг%)
До инъекции инсулина После инъекции инсулина	

Вывод:

Адреналин

Гормон адреналин вырабатывается клетками мозгового слоя надпочечников.

Реакция адреналина с иодом

Адреналин способен легко окисляться с образованием ряда биологически активных соединений.

Принцип метода. При нагревании раствора адреналина с иодом образуются продукты окисления адреналина, окрашенные в красный цвет.

Приборы. Штатив с пробирками. Пипетки. Спиртовка.

Реактивы. Адреналин, раствор (патентованный препарат адреналина в ампулах с концентрацией 1:1000 разбавляют двойным количеством воды). Иод, 0,1 н. спиртовой раствор.

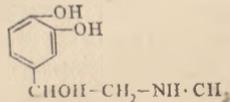
Ход работы. В одну пробирку наливают 1—2 мл воды, в другую — 1—2 мл раствора адреналина. В обе пробирки добавляют по 2 капли раствора иода и слегка подогревают. В пробирке с адреналином появляется красное окрашивание.

Реакция адреналина с хлорным железом

Адреналин является низкомолекулярным соединением, содержащим в молекуле структуру двухатомного фенола — пирокатехина:



Пирокатехин



Адреналин

Принцип метода. При добавлении к раствору адреналина раствора хлорного железа развивается зеленое окрашивание, появление которого обусловлено наличием остатка пирокатехина в молекуле адреналина.

Приборы. Штатив с пробирками. Пипетки.

Реактивы. Раствор адреналина (см. с. 220). Хлорное железо, 1% -ный раствор.

Ход работы. В одну пробирку наливают 1—2 мл воды, в другую — 1—2 мл раствора адреналина. В обе пробирки добавляют по 2—3 капли раствора хлорного железа. В пробирке с адреналином появляется зеленое окрашивание.

Влияние адреналина на содержание глюкозы в крови

Адреналин оказывает влияние на обмен углеводов, усиливая расщепление гликогена путем активирования фермента фосфорилазы в тканях. Результат такого воздействия — повышение уровня глюкозы в крови животного.

Принцип метода. Содержание глюкозы в крови кролика определяют по методу Хагедорна — Нейсена (см. с. 93) до и после подкожной инъекции адреналина.

Приборы. Весы с разновесом. Вата. Иглы для взятия крови. Шприц (1—2 мл). Стерилизатор. Приборы для определения глюкозы в крови (см. с. 94).

Реактивы. Ксилол. Вода теплая. Хлорид натрия, 0,9%-ный изотонический раствор (в ампулах). Адреналин, раствор (содержимое одной ампулы промышленного препарата адреналина с концентрацией 1:1000 в стерильных условиях разбавляют равным количеством 0,9%-ным раствором хлорида натрия). Спирт. Иод, настойка. Реактивы для определения содержания глюкозы в крови (см. с. 94).

Подопытное животное. Кролик.

Ход работы. Кролика подготавливают к опыту (см. с. 900). Раствор адреналина вводят подкожно из расчета 0,8 мл/кг массы тела кролика. Для анализа на содержание глюкозы (см. с. 219) из ушной вены берут кровь до и через 30 мин после инъекции адреналина. Результаты опыта заносят в таблицу и делают вывод о влиянии адреналина на уровень глюкозы в крови:

Время взятия крови для исследования	Содержание глюкозы в крови (мг%)
До инъекции адреналина После инъекции адреналина	

Вывод:

Тироксин

Тироксин и триодтиронин — гормоны, вырабатываемые клетками щитовидной железы. Эти гормоны многообразно влияют на обменные процессы в организме: стимулируют окислительные процессы, регулируют обмен белков, липидов, углеводов, воды и минеральных веществ, а также процессы роста, развития и дифференцировки тканей.

Обнаружение иода в тиреоидине

Гормоны щитовидной железы являются низкомолекулярными веществами — иодированными производными аминокислоты тирозина.

Принцип метода. При нагревании тиреоидина (препарат сухой щитовидной железы) с азотной кислотой происходит освобождение органического иода в виде иодистоводородной кислоты, которая окисляется иодноватокислым калием до свободного иода, экстрагируемого хлороформом:



Приборы. Ступка с пестиком. Штатив с пробирками. Пипетки. Водяная баня. Стакан с водой.

Реактивы. Тиреоидин в таблетках (промышленный препарат, одна таблетка массой 0,1 г содержит 0,17—0,23 мг иода). Азотная кислота, разбавленная (1:1). Калий иодноватокислый, 10%-ный раствор. Хлороформ.

Ход работы. Таблетку тиреоидина растирают в ступке и переносят полученный порошок в пробирку. Добавляют 2 мл раствора азотной кислоты и нагревают на кипящей водяной бане 3—4 мин. Затем пробирку немного охлаждают, добавляют 2 мл раствора иодноватокислого калия, несколько раз энергично встряхивают и оставляют в стакане с водой для охлаждения. Через несколько минут

добавляют 1,0—1,5 мл хлороформа и снова энергично встряхивают несколько раз. Нижний хлороформенный слой окрашивается в розово-фиолетовый цвет.

Фолликулин

Фолликулин — женский половой гормон (эстроген). Половые гормоны вырабатываются интерстициальными клетками половых желез и обуславливают формирование вторичных половых признаков, а также реализацию репродуктивной функции женских и мужских особей. Половые гормоны стимулируют окислительные процессы в организме, регулируют биосинтез белков и обмен липидов.

Реакция фолликулина с реактивом Фолина

По своей химической природе все половые гормоны являются стероидами. К эстрогенам относят фолликулин (эстрон), эстрадиол и эстриол, отличающиеся количеством гидроксильных групп в молекуле.

Принцип метода. С помощью реактива Фолина обнаруживают наличие фенольной группировки в молекуле фолликулина.

Приборы. Штатив с пробирками. Пипетки.

Реактивы. Реактив Фолина (см. с. 166). Гидроксид натрия, 10% ный раствор. Фолликулин, спиртовой раствор (4—5 ампул промышленного препарата фолликулина растворить в 200 мл спирта).

Ход работы. В пробирку к 1—2 мл раствора фолликулина добавляют равный объем раствора гидроксида натрия и несколько капель реактива Фолина. Появляется фиолетовое окрашивание.

Реакция фолликулина с серной кислотой

Принцип метода. При взаимодействии фолликулина с серной кислотой образуется сложный эфир, окрашенный в желтый цвет.

Приборы. Штатив с пробирками. Пипетки. Водяная баня.

Реактивы. Фолликулин, спиртовой раствор (см. с. 223). Серная кислота, концентрированная.

Ход работы. В пробирку к 1—2 мл спиртового раствора фолликулина осторожно добавляют 5—6 капель серной кислоты и нагревают на водяной бане до появления желтого окрашивания.

Кровь представляет собой непрозрачную жидкость красного цвета со слабощелочной реакцией (рН 7,3—7,5) плотностью 1,050—1,060, своеобразным запахом и солоноватым вкусом. Постоянно циркулируя в артериях, венах и капиллярах тела, кровь разносит в органы и ткани кислород, питательные вещества и освобождает их от углекислоты и конечных продуктов распада. Она выполняет также важную функцию защиты организма от инфекций и токсинов, а также обладает способностью свертываться при ранении.

У животных в среднем количество крови — около 10% от массы тела. Кровь состоит из плазмы (50—55%) и форменных элементов: эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов (45—50%). В состав крови входят белки, жиры, углеводы, различные промежуточные и конечные продукты обмена, гормоны, витамины и минеральные соли. Несмотря на непрерывное поступление в кровь и выделение из нее различных веществ, в норме морфологический и химический состав крови довольно постояен. В здоровом организме все случайные колебания в составе крови быстро выравниваются. Однако всякие нарушения характера метаболических процессов в тканях отражаются на составе крови, поэтому определение количественного содержания ряда составных частей крови имеет исключительно важное значение для оценки здоровья организма.

Техника получения сыворотки крови

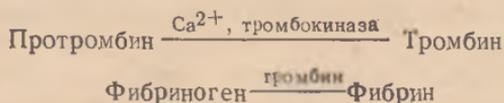
Кровь берется перед кормлением, у крупных животных ее обычно берут иглой из яремной, у свиней из хвостовой, у птиц из подкрыльцовой вены, а у кролика из вены уха в сухую стерильную пробирку. Для получения сыворотки кровь ставят в термостат при температуре 37° С. Через 1 ч ее переносят на холод. Для лучшего отделения сгустка крови от сыворотки необходимо обвести сгусток по краям пробирки стеклянной или деревянной палочкой. Через 4—5 ч стояния на холоде сыворотка в виде прозрачной жидкости отделяется от кровавого сгустка и может быть использована для исследования. Отстояв

шуюся сыворотку осторожно сливают, придерживая ступок или отсасывают шариковой пипеткой в чистую пробирку.

Для быстрого получения сыворотки свернувшуюся кровь центрифугируют при 2500—3000 об/мин. В этом случае кровь набирают сразу в центрифужную пробирку. Прозрачную сыворотку сливают в чистую пробирку и хранят на холоде при $+4—+7^{\circ}\text{C}$.

Свертывание крови представляет собой очень сложный процесс, в котором важную роль играют ферментативные реакции. Детали этого процесса все еще остаются неясными. Схематически этот процесс сводится к следующему.

В плазме крови растворен белок фибриноген. Под действием фермента тромбина фибриноген превращается в нерастворимый фибрин. Фибрин, выпадая в виде нитей, захватывает форменные элементы крови и образует ступок. Фермент тромбин образуется в крови из недействительного профермента — протромбина (тромбогена) под действием ионов кальция и тромбокиназы:



Тромбокиназа — липопротеид и содержится в клетках всех тканей, особенно много ее в тромбоцитах. При повреждении ткани и тромбоцитов выделяется тромбокиназа и происходит свертывание крови. Образование протромбина в организме возможно лишь при участии витамина К.

Различные вещества (антикоагулянты), действующие на тот или иной этап описанного выше сложного процесса, нарушают свертывание крови. Так, щавелевокислые и фтористые соли осаждают кальций, а лимоннокислые соли образуют с кальцием прочный комплекс. Под действием этих агентов концентрация ионов кальция в плазме крови снижается и свертывание становится невозможным. Гирудин (вещество, выделяемое слюнными железами пиявок) тормозит действие тромбина на фибриноген и тем нарушает последнюю фазу свертывания крови. Гепарин — гетерополисахарид, получаемый из печени, препятствует взаимодействию ионов кальция и тромбогена, нарушая фазу образования активного тромбина.

Получение плазмы крови

Для получения плазмы кровь выпускают в коническую колбу в 10%-ный раствор оксалата калия, натрия или аммония, взятый с таким расчетом, чтобы содержание оксалатной соли составляло 0,1% к взятой крови. Если требуется кровь неразбавленная, то вместо раствора соли берут ее навеску в порошке. Выпускаемая кровь осторожно взбалтывается в сосуде круговыми движениями, чтобы быстрее смешать соль или раствор соли с кровью. Плазма может быть отделена от форменных элементов отстаиванием или центрифугированием (15—20 мин при 2500—3000 об/мин), плазма отсасывается пипеткой.

Щавелевокислые соли можно заменить фтористым натрием, добавляя его в количестве 0,3%. Лимоннокислый натрий применяется в растворе или в порошке из расчета 0,1—0,2%. Гепарин и гирудин применяются в виде порошка в количестве 1 мг на 5—10 мл крови. Оксалатная кровь не может самопроизвольно свертываться, и поэтому ее можно сохранять в холодильнике продолжительное время.

Получение дефибринированной крови

Собирают вытекающую из сосуда кровь в стакан и осторожно перемешивают ее деревянной или стеклянной палочкой, стараясь не касаться стенок стакана, чтобы не разрушать эритроциты и избежать гемолиз.

Через несколько минут начинает выделяться в виде волокон фибрин, который наматывают на палочку. Кровь, из которой удален фибрин, называют дефибринированной: такая кровь уже не способна к свертыванию. Дефибринирование крови можно произвести с помощью другого метода. В стакан или колбу кладутся стеклянные шарики (бусы), на которые и собирают кровь, вытекающую из кровеносного сосуда. В процессе взятия крови содержимое стакана (колбы) помешивают круговыми движениями, при этом фибрин оседает на шариках. Жидкую кровь сливают через двойной слой марли и центрифугируют ранее описанным способом. Форменные элементы крови оседают на дно, а сыворотка отсасывается пипеткой.

Определение скорости свертывания крови

Скорость свертывания крови может изменяться при ряде заболеваний в связи с изменением ее состава. Поэтому определение скорости ее свертывания имеет большое практическое значение.

Приборы. Игла для взятия крови. Вата. Марля. Водяная баня. Термометр. Часовое стекло. Вытянутая стеклянная палочка с шариком на конце. Секундомер.

Реактивы. Спирт этиловый, 96%-ный. Эфир диэтиловый.

Ход работы. Кровь берется из вены уха животного, предварительно протертого ватным тампоном, смоченным смесью спирта с эфиром. Взятую каплю крови помещают на часовое стекло, которое возможно быстрее ставят на водяную баню (30°С). Время взятия крови регистрируется с помощью секундомера с точностью до секунды.

Через 1 мин в капле крови с помощью стеклянной палочки производят спиралеобразные движения, стремясь как бы захватить эту каплю.

Затем палочку быстро извлекают из капли, обмывают и высушивают. Спустя 0,5 мин операцию, описанную выше, вновь повторяют, и так до тех пор, пока на вытянутой из крови палочке не появятся ниточки фибрина. Это время и будет началом свертывания крови. Отмечается время образования сплошного сгустка, что считается концом свертывания крови.

Определение протромбина

Принцип метода. В качестве источника протромбина берут свежую сыворотку крови, из которой готовят ряд разведений. В качестве фибриногена используют свежую плазму крови, инактивированную нагреванием до 50—60°С в течение 30 мин. За единицу принимается минимальное количество протромбина, вызывающее свертывание белка.

Приборы. Штатив с пробирками. Пипетки на 1 и 5 мл. Холодильник. Водяная баня. Термометр.

Реактивы. Хлорид натрия, 1%-ный раствор.

Ход работы. Берут 11 пробирок. Во все пробирки, кроме первой, наливают по 1 мл 1%-ного NaCl. В первую и вторую пробирки наливают по 1 мл неразведенной сыворотки (раствор протромбина). Содержимое второй про-

бирки хорошо перемешивают, втягивая жидкость в пипетку и выпуская ее обратно. 1 мл смеси из второй пробирки переносят в третью. Содержимое третьей пробирки перемешивают таким же образом и 1 мл смеси переносят в четвертую пробирку, и так вплоть до 10 пробирки, из которой 1 мл жидкости выбрасывают. Одиннадцатая пробирка содержит 1 мл NaCl (контроль).

Во все 11 пробирок добавляется по 2 мл плазмы, разведенной в 10 раз (раствор фибрина). Штатив с пробирками ставят в холодильник на 24 ч.

Через 24 ч, осторожно наклоняя пробирки, определяют, где произошло свертывание. Количество тромбина вычисляется в той пробирке, где образовался еле заметный сгусток. В контрольной пробирке свертывания не должно произойти. Результаты исследований заносятся в таблицу:

Номер пробирки	1	2	3	4	5	6	7
Количество тромбина	1,0	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0312	0,0156
Осадок фибрина (+ —)	+	+	+	+	+	+	+

Номер пробирки	8	9	10
Количество тромбина	0,0078	0,0039	0,0019
Осадок фибрина (+ —)	+	—	—

Расчет: предположим, что свертывание произошло в первых восьми пробирках. В девятой пробирке и дальше свертывания не произошло. В восьмой пробирке содержание сыворотки составляет 0,0078 мл:

$$0,0078 \text{ мл} - 1 \text{ единица} \quad x = \frac{1,0}{0,0078} = 128 \text{ единиц.}$$

$$1,0 \text{ мл} - x$$

В норме 1 мл сыворотки крови содержит 62,5—250 единиц.

Электрофорез белков сыворотки крови

Состав и свойства белков (табл. 7) сыворотки крови зависят от вида, возраста и породы животных, их продуктивности, условий кормления, сезона года, физиологического состояния организма и т. д.

Таблица 7. Белковый состав сыворотки крови у различных видов животных

Вид животного	В процентах от общего количества белков			
	Альбумины	Глобулины		
		α	β	γ
Коровы	45	18	16	21
Телята:				
новорожденные	57	28	15	—
2—4-дневные	37	19	14	30
10-месячные	44	17	13	26
Лошади	30	21	22	27
Свиньи	40	23	8	29
Овцы	51	15	17	17
Собаки	40	25	13	22
Кролики	63	12	13	12
Куры	30	20	6	44
Утки	43	17	17	23
Гуси	49	13	16	22
Индейки	48	20	15	17

У больных животных соотношение белков сыворотки крови иное, чем у здоровых. Например, при бруцеллезе у коров альбумины составляют 31,3%, α -глобулины — 8,8%, β -глобулины — 8,6% и γ -глобулины — 51,3%.

Принцип метода, приборы, реактивы и ход работы см. на с. 234.

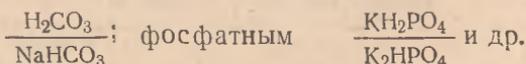
Определение резервной щелочности крови

Концентрация водородных ионов в крови у человека равна 7,36. У сельскохозяйственных животных она поддерживается на относительно постоянном уровне. рН крови у различных животных определяется в следующих величинах:

Крупный рогатый скот	7,24—7,47
Лошади	7,32
Овцы	7,82

Козы	7,65
Кролики	7,93
Собаки	7,35
Свиньи	7,97

Относительное постоянство рН крови обеспечивается буферами: гемоглобином, на долю которого приходится до $\frac{3}{4}$ буферной емкости крови, белками, аминокислотами плазмы крови, бикарбонатным буфером



Буферная емкость плазмы зависит главным образом от наличия бикарбоната, способного связывать то или иное количество угольной кислоты. Вот почему практически очень важно определять щелочной резерв крови, от которого зависит постоянство рН последней.

Резервная щелочность плазмы крови определяется различными методами. За последнее время широкое распространение получил метод Еременко с использованием чашек Конвея.

Принцип метода. Определение щелочных резервов крови. Один из способов нейтрализации образующихся в организме кислот заключается в том, что эти кислоты вытесняют более слабую — CO_2 и соединяются с теми основаниями, с которыми была соединена углекислота. Последняя в соответствующих количествах выделяется из организма и, таким образом, реакция крови не изменяется.

Приборы. Чашка Конвея (рис. 17). Пипетки на 1 и 2 мл. Микробюретка.

Реактивы. Серная кислота, 0,01 н. раствор. Гидроксид натрия, 0,02%-ный раствор Фенолфталеин, 1%-ный спиртовой раствор. Серная кислота, 10%-ный раствор.

Технику взятия и приготовления плазмы см. на с. 226.

Ход работы. В наружную борозду чашки Конвея вводят 0,5 мл исследуемой плазмы крови. В центральное углубление наливают (точно) 2 мл 0,01 н. раствора гидроксида натрия. Затем в наружную бороздку наливают (так, чтобы вылитая жидкость не соприкасалась с плазмой крови) 1 мл 10%-ного раствора серной кислоты. После этого чашку закрывают стеклом, которое плотно притирают. Для обеспечения герметизации осторожными колебаниями чашки плазму крови в наружной бороздке смешивают с серной кислотой. Чашку оставляют стоять

1 ч (лучше сутки, если позволяет время). В течение этого срока полностью выделяется CO_2 и поглощается раствором щелочи, который имеется в центральном углублении чашки Конвея.

Через 1 ч (или сутки) чашку Конвея открывают, в среднее углубление — непосредственно в раствор щелочи — опускают каплю фенолфталеина и содержащее титруют с помощью 0,01 н. раствора серной кислоты.

Параллельно ставят контрольный опыт, который проводится аналогичным образом с той лишь разницей, что вместо плазмы крови берут 0,5 мл дистиллированной воды.

Расчет: $x = (a - b) \times 0,224 \cdot 200$, где x — количество CO_2 в 100 мл крови; a — количество 0,01 н.

серной кислоты, которое пошло на титрование (опыт); b — количество 0,01 н. раствора серной кислоты, пошедшее на титрование (контроль); 0,224 — фактор пересчета 0,01 н. раствора гидроксида натрия на CO_2 ; 200 — чтобы перевести взятые для опыта 0,5 мл сыворотки крови на 100 мл.

Например, если в нашем опыте на титрование опытной пробы пошло 1,60 мл 0,01 н. раствора серной кислоты и на контроль — 0,40 мл, а количество взятой крови было равно 0,5 мл, то в этом случае содержание CO_2 в 100 мл плазмы составит:

$$x = (1,60 - 0,40) \cdot 0,224 \cdot 200 = 53,76 \text{ об. \% } \text{CO}_2.$$

Давление и температура при такой постановке опыта не учитывается.

Ниже приводится величина резервной щелочности различных животных:

Корова	52,0—80,0 об% CO_2
Лошадь	55,8—80,0 » CO_2
Свинья	68,4—72,4 » CO_2
Кролик	48,0—68,0 » CO_2

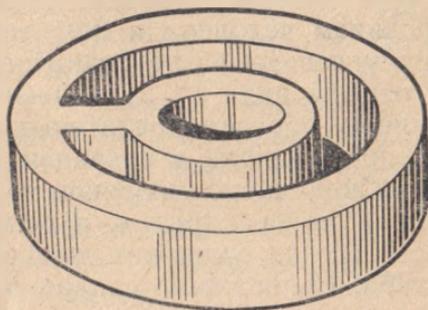


Рис. 17. Чашка Конвея для определения резервной щелочности

Определение концентрации сахара по Хагедорну — Иенсену

В организме человека и животных углеводы играют важную роль, выполняя разнообразные функции. Они служат источником энергии и пластическим материалом клеток, а также используются в качестве исходных продуктов синтеза липидов, белков и нуклеиновых кислот. Организм человека и животных не способен синтезировать углеводы из неорганических веществ и получает их в готовом виде с различными пищевыми продуктами главным образом растительного происхождения. Углеводы, поступившие в организм, подвергаются перевариванию в желудочно-кишечном тракте и всасываются в кровь в виде моносахаридов, в основном глюкозы. В норме кровь всегда содержит довольно постоянное количество сахара. Содержание сахара в крови у взрослого здорового человека составляет в среднем 100 мг% и колеблется от 80 до 120 мг%.

При некоторых заболеваниях, например при диабете, акромегалии, гипертиреозе, гепатите, циррозе печени и гликогеновой болезни содержание сахара в крови увеличивается до 220—400 мг%, такое состояние называют гипергликемией. После принятия пищи, богатой углеводами, также имеет место повышение содержания глюкозы в крови — алиментарная гипергликемия, которая в отличие от патологической гипергликемии непродолжительна. Может наблюдаться и снижение содержания сахара ниже 70 мг%, тогда говорят о гипогликемии. Установление гипер- и гипогликемии имеет большое диагностическое значение в клинических анализах.

Принцип метода, приборы, реактивы и ход работы см. на с. 92—94.

Определение небелкового азота

Об интенсивности обмена белков в организме можно судить по небелковому азоту крови. Количество небелкового азота в крови животных невелико и находится в пределах 20—60 мг%.

Лошадь	30—50	Поросята	15—28
Корова	30—60	Собака	20—45
Овца	25—45	Куры	30—47
Свинья	25—40		

В состав небелкового азота входят азотистые вещества, транспортируемые из кишечника к тканям, а также вещества, переносимые от клеток и тканей организма к почкам. Из них наибольшее количество приходится на долю мочевины и меньше на другие конечные продукты азотистого обмена: креатин, креатинин, мочевая кислота, аммонийные соли, гиппуровая кислота и др. При ряде инфекционных заболеваний с прогрессирующим распадом тканей, пневмониях, перитонитах, тяжелой форме диспепсии у телят, почечной недостаточности, некоторых авитаминозах, патологических явлениях количество небелкового азота может увеличиваться (уремия). Пониженные величины наблюдаются при печеночной недостаточности, острой дистрофии печени, циррозе, беременности. Поэтому определение небелкового азота является важным диагностическим методом. Принцип метода, приборы, реактивы и ход работы см. на с. 163.

Определение мочевой кислоты

Принцип метода. Мочевая кислота определяется в освобожденных от белка фильтратах по интенсивности синей окраски, развивающейся при взаимодействии с реактивом Фолина.

Приборы. Фотоэлектроколориметр. Центрифуга. Центрифужные пробирки. Колба с обратным холодильником на 300 мл. Микропипетки на 0,1 и 0,2 мл. Пипетки на 1 и 2 мл с делениями.

Реактивы. Уранилацетат, 0,75%-ный раствор. Реактив Фолина. Карбонат натрия, насыщенный раствор.

Ход работы. 1. Определение мочевой кислоты в крови. В центрифужные пробирки вносят по 0,1 мл сыворотки крови, прибавляют 0,4 мл раствора уранилацетата и тщательно перемешивают. Через 10 мин осажденный белок удаляют центрифугированием. В 0,08 мл центрифугата прибавляют 0,04 мл раствора карбоната натрия и 0,04 мл реактива Фолина, перемешивают и через 5 мин колориметрируют с помощью микрокувет и оптической приставки с красным светофильтром.

Расчет содержания мочевой кислоты в сыворотке крови производят по формуле $x = a \cdot K$, где x — содержание мочевой кислоты в сыворотке крови, мг%; a — количество мочевой кислоты в пробе, мг, найденное по калибровочной кривой. Для построения калибровочной кривой используют растворы мочевой кислоты, содержащие от

0,005 до 0,035 мг в 1 мл. Техника такая же, что и для сыворотки крови; K — коэффициент пересчета для выражения полученных данных в мг%, в данном случае равный 100.

Содержание мочевой кислоты в сыворотке крови в норме у человека колеблется от 2 до 5 мг%.

2. Определение мочевой кислоты в моче. В микропробирки вносят 0,08 мл мочи, предварительно разведенной в 20—25 раз. В дальнейшем пробы обрабатывают так же, как и при определении в крови.

Расчет содержания мочевой кислоты в моче производят по формуле $x = a \cdot b \cdot c$, где x — количество мочевой кислоты, выделенное с мочой за сутки, мг; a — количество мочевой кислоты в пробе, мг, найденное по калибровочной кривой; b — разведение мочи, c — количество мочи, выделенное за сутки, мл. В норме с мочой за сутки выделяется 400—1000 мг мочевой кислоты.

Определение концентрации свободных аминокислот в сыворотке крови

Аминокислотный состав сыворотки крови является одним из показателей, характеризующих состояние белкового обмена в организме и аминокислотного питания животного.

Содержание аминокислот в сыворотке крови здоровых животных достаточно постоянно, однако уровень аминокислот в крови может меняться при ряде патологических состояний, связанных с нарушением белкового обмена, а также при поражениях печени различной этиологии и при белковом голодании.

Принцип метода. Метод основан на реакции аминокислот с нингидрином в слабокислой среде с последующим превращением полученного синего производного в стабильное медное производное оранжево-красного цвета, имеющее максимум поглощения при 530 нм.

Приборы. Фотоэлектроколориметр. Автоматические микропипетки. Плавающий штатив из термоустойчивого пенопласта. Хроматографические стеклянные камеры небольшого размера. Хроматографическая бумага марки «быстрая» (Б).

Реактивы. Раствор солянокислого ацетона (1 мл концентрированной соляной кислоты на 100 мл ацетона). Эфир. Растворительная смесь I: н-бутиловый спирт, ледяная уксусная кислота, дистиллированная вода (4:1:5); смесь II: н-бутиловый спирт, ледяная уксусная кислота, дистиллированная вода (40:15:5). Раствор 8-оксихинолина для освобождения хроматографической бумаги от

катионов металлов. Раствор нингидрина (готовят перед работой путем смешивания 95 частей нингидрина 0,5%-ного раствора в ацетоне с 1 частью ледяной уксусной кислоты и 4 частями дистиллированной воды). Сульфат меди, насыщенный раствор, в 75%-ном этиловом спирте. Набор аминокислот.

Ход работы. 1. Получение концентрированного безбелкового экстракта сыворотки крови. К 0,2 мл сыворотки крови добавляют 1 мл солянокислого ацетона. Спустя 30 мин осадок белков удаляют центрифугированием, промывают его дважды 0,5 мл солянокислого ацетона. Собранные фугаты упаривают досуха на водяной бане при 40° С в стеклянных микрочашках, используя плавающий штатив. Сухой остаток растворяют в 0,3 мл дистиллированной воды и обрабатывают 0,3 мл эфира для удаления липидов. После удаления эфира слой сгущают досуха на водяной бане при 40° С. Сухой остаток растворяют в 0,05—0,10 мл дистиллированной воды.

2. Получение одномерных хроматограмм сыворотки крови. 0,02 мл полученного экстракта наносят на бумагу размером 2×27 см с помощью автоматической микропипетки порциями по 0,005 мл. Хроматографирование проводят восходящим методом 2—3 раза в одном направлении сначала в смеси I, затем в смеси II. Время прохождения растворителя в одном направлении 7 ч. Высушенную хроматограмму проявляют раствором нингидрина в ацетоне.

3. Количественное определение свободных аминокислот сыворотки крови. Фиолетовые пятна аминокислот вырезают, разрезают на мелкие кусочки и помещают в микропробирки, содержащие 0,25 мл раствора сульфата меди в 75%-ном этиловом спирте. Фиолетовая окраска аминокислот переходит в оранжево-красную в результате образования медного производного аминокислот с нингидрином. Экстракцию продолжают в течение 1 ч при комнатной температуре. Интенсивность окраски измеряют на ФЭКе при зеленом светофильтре в кювете с толщиной слоя 5 мм относительно контрольной пробы на бумагу. Расчеты по содержанию аминокислот проводят по калибровочным графикам, полученным со стандартными растворами аминокислот.

4. Построение стандартной кривой. Готовят растворы аминокислот: 0,01; 0,005 и 0,0025 М. На бумагу наносят 0,002 мл 0,01 М, 0,002 мл 0,005 М и 0,002 мл 0,0025 М растворов аминокислот. Каждая точка графика будет со-

ответствовать 0,02, 0,01 и 0,005 мкМ аминокислоты. Разделение смеси стандартных аминокислот проводят при соблюдении всех условий хроматографирования.

Расчеты проводят по формуле

$$x = \frac{a \cdot c \cdot 5}{b},$$

где x — количество аминокислоты в 1 мл, мкМ; a — количество аминокислоты, найденное по графику, мкМ; b — количество экстракта, взятое для хроматографирования, мл; c — общее количество экстракта, мл, соответствующее 0,2 мл сыворотки.

Эта методика позволяет определить в сыворотке 9 аминокислот. Содержание аминокислот в сыворотке крови коровы составляет в среднем (мг%) для аланина 1,31 мг%, валина — 2,06, тирозина — 0,59, фенилаланина — 0,79, лейцина + изолейцин — 2,88, аргинина — 0,42, лизина — 0,45, серина + глицин — 1,61, глутаминовой кислоты + треонин — 1,22.

Гравиметрическое определение общих липидов в сыворотке крови

Метод основан на извлечении липидов алкогально-эфирной смесью с последующим испарением растворителя и определения массы сухого остатка.

Приборы. Водяная баня. Воронка. Пипетки на 1 и 2 мл. Фильтровальная бумага. Стаканчик. Мерные колбы на 25 мл.

Реактивы. Смесью эфира и этилового спирта 1 : 3. Петролейный эфир. Хлороформ. Свежая сыворотка крови.

Ход работы. К 20 мл эфирно-алкогальной смеси прибавляют каплями из пипетки 1,25 мл сыворотки крови и нагревают в течение 5 мин на кипящей водяной бане. Фильтруют в мерную колбу. Фильтр промывают эфирно-алкогальной смесью и объем доводят до 25 мл, 20 мл этой смеси, равной 1 мл сыворотки, испаряют на водяной бане. Остаток растворяют в петролейном эфире или хлороформе и фильтруют в предварительно взвешенный стаканчик. Промывают фильтр три раза небольшими количествами петролейного эфира или хлороформа. Снова испаряют досуха, высушивают при 70° С и взвешивают стаканчик. Разница между результатом двух взвешиваний, умноженная на 100, показывает концентрацию жиров в крови.

Определение холестерина в сыворотке крови

Холестерол содержится во всех клетках животного организма в свободном состоянии и в виде эфиров с высшими жирными кислотами — холестериды. Особенно много холестерина в нервной ткани, желчи, сперме, кожном сале. Лучший материал для получения холестерина — желчные камни, состоящие иногда на 90% из холестерина. Близки по своему строению к холестеролу желчные кислоты, половые гормоны и витамины группы D.

Метод основан на способности холестерина давать изумрудно-зеленое окрашивание под действием концентрированной серной кислоты, уксусного ангидрида и ледяной уксусной кислоты. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию холестерина в пробе и используется для колориметрического определения.

Преимущество данного метода — возможность проведения определения без предварительной экстракции других липидов, что значительно сокращает время анализа.

Приборы. Фотоколориметр. Водяная баня. Термометр. Штатив с пробирками. Пипетки на 0,1 и 5 мл. Колба мерная на 100 мл.

Реактивы. Смесь ледяной уксусной кислоты, уксусного ангидрида и концентрированной серной кислоты (1:5:1) (реактив 1). При смешивании ингредиентов избегают нагревания смеси. Для этого колбу, где готовится реактив, постоянно охлаждают (помещая колбу в сосуд со льдом), серную кислоту добавляют в последнюю очередь каплями и при постоянном помешивании. Смесь должна быть бесцветной или слегка желтого цвета и может длительно сохраняться в холодильнике. Стандартный раствор холестерина (реактив 2). Хлороформ.

Ход работы. К 2 мл реактива 1 добавляют 0,1 мл негемолизированной сыворотки, встряхивают короткими энергичными движениями раз 10 и помещают в темное место на 20 мин. Окрашенную в зеленый цвет жидкость колориметрируют в фотоэлектроколориметре, применяя красный светофильтр (длина волны 650—660 нм) и кюветы диаметром 0,5 см.

При постановке реакции нужно пользоваться абсолютно чистыми и сухими пробирками и пипетками. Соотношение ингредиентов реактива рассчитано так, что белки сыворотки не выпадают в осадок. Появление мути может быть вызвано только наличием воды в реактиве или посуде.

Расчет производят по общим правилам с учетом концентрации стандартного раствора. Для приготовления стандартного раствора 90 мг холестерина растворяют в 100 мл хлороформа. Рабочий раствор получают растворением стандартного раствора в 10 раз (10 мл стандартного раствора растворяют в хлороформе, доводя до метки 100 мл). 1 мл стандартного раствора соответствует 0,9 мг холестерина.

Построение калибровочного графика на холестерол:

1. 0,5 мл рабочего раствора соответствует	45 мг%
2. 1,0 » » » »	90 »
3. 1,5 » » » »	135 »
4. 2,0 » » » »	180 »
5. 2,5 » » » »	225 »
6. 3,0 » » » »	270 »

Все пробирки с рабочим раствором различной концентрации выпаривают досуха на водяной бане, затем прибавляют 2,2 мл реактива 1. Колориметрируют на ФЭКе при красном светофильтре с кюветой 0,5 см через 20 мин после прибавления реактива и стояния в темноте.

На основании данных колориметрирования рабочих растворов строят калибровочную кривую по обычному способу. Зная оптическую плотность исследуемого раствора сыворотки крови, находят по калибровочной кривой соответствующую ей концентрацию.

Определение концентрации кальция

Кальций в организме играет исключительно важную роль. Основная его масса содержится в костях в форме фосфорнокислых и отчасти углекислых и фтористых солей. Костная ткань — основное депо кальция. При понижении его уровня в крови кальций поступает в кровь из костной ткани. Около 40% кальция сыворотки крови связано с альбуминами в виде сложных комплексных соединений. Кальций, как двухвалентный катион, понижает возбудимость нервной системы, уплотняет клеточную мембрану, возбуждает сердце, активирует актомиозин, специфическую АТФ-азу, лецитиназу и тормозит функцию дегидратаз, депептидаз и других ферментов, способствует свертыванию крови.

Содержание кальция в сыворотке крови служит объективным показателем состояния его обмена и степени обеспеченности животного этим катионом. Все это гово-

рит о необходимости постоянного контроля за содержанием кальция в сыворотке крови животных.

Содержание кальция в сыворотке крови разных видов животных (мг %):

Лошадь	12—14	Коза	23—26
Корова	10—13	Свинья	12—14
Верблюд	11—12	Собака	10—12
Овца	11—12,5	Курица	12—22

Обмен кальция в организме зависит от целого ряда причин. На него влияет количество кальция и фосфора, поступающее с кормом, и отношение этих элементов в рационе, обеспеченность витамином D, состояние паращитовидных и надпочечных желез, продуктивность животных и физиологическое состояние организма. При некоторых заболеваниях изменяется уровень кальция в сыворотке крови, что имеет важное вспомогательное диагностическое значение. Так, снижение количества кальция в крови (гипокальцемия) наблюдается при недокорме, рахите, остеомаляции, родильном парезе, нефрозах и др. Количество кальция в крови (гиперкальцемия) увеличивается при чрезмерных дозах витамина D, гиперпаратиреозах, опухолях костной ткани.

Принцип метода. Кальций осаждается из сыворотки в виде оксалата. Осадок промывают, затем растворяют его в серной кислоте и освободившуюся щавелевую кислоту титруют раствором марганцевокислого калия.

Реакции протекают в следующей последовательности:

- 1) $\text{CaCl}_2 + (\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \rightarrow \text{CaC}_2\text{O}_4 + 2\text{NH}_4\text{Cl}$
- 2) $\text{CaC}_2\text{O}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow \text{CaSO}_4 + \text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$
- 3) $5\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 + 2\text{KMnO}_4 + 3\text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow 2\text{MnSO}_4 + \text{K}_2\text{SO}_4 + 8\text{H}_2\text{O} + 10\text{CO}_2$

Из приведенных реакций видно, что количество марганцевокислого калия, пошедшее на окисление щавелевой кислоты, эквивалентно количеству кальция.

Приборы. Центрифуга. Центрифужные весы. Штатив с центрифужными пробирками. Пипетки на 2 мл — 2 шт. Пипетки на 10 мл с делениями. Стекланные палочки. Микробюретка. Водяная баня.

Реактивы. Оксалат аммония, 4%-ный раствор. Аммиак, 2%-ный раствор. Серная кислота, 1 н. раствор. Марганцевокислый калий, 0,01 н. раствор.

Ход работы. В две центрифужные пробирки наливают по 1 мл сыворотки крови и 1 мл дистиллированной воды, и третью (контрольную) — 2 мл дистиллированной воды.

Во все пробирки добавляют по 0,5 мл раствора щавелевокислого аммония. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и оставляют на 30 мин.

Через 30 мин содержимое пробирок центрифугируют 10 мин при 2500—3000 об/мин. Надосадочную жидкость сливают, к осадку добавляют 4 мл 2%-ного раствора аммиака и содержимое пробирки центрифугируют вновь. Надосадочную жидкость сливают в том же порядке. Промывание осадка аммиаком повторяют еще раз. Последняя порция надосадочной жидкости сливается возможно полнее, а осадок используется в дальнейших реакциях.

Осадок растворяют в 2 мл 1 н. раствора серной кислоты, затем пробирки ставят в горячую водяную баню и через 3—5 мин горячий раствор титруют 0,01 н. раствором перманганата при постоянном помешивании стеклянными палочками до появления бледно-розовой окраски, не исчезающей в течение 1 мин.

Расчет: $x = 0,2 \cdot (a - b) \cdot 100$, где x — содержание кальция, мг%; 0,2 — количество кальция, мг, соответствующее 1 мл 0,01 н. перманганата; a — количество перманганата (мл), пошедшего на титрование пробы (опыт); b — то же (контроль); 100 — пересчет в мг%.

Например: на титрование опытных проб пошло в среднем 0,72 мл 0,01 н. раствора перманганата, на титрование контроля — 0,15 мл, тогда

$$x = 0,2 \cdot (0,72 - 0,15) \cdot 100; \quad x = 11,4 \text{ мг \%}.$$

Комплексометрический метод определения общего кальция в сыворотке крови

Принцип метода. Непосредственное титрование ионов кальция в сильно щелочной среде двуназиевой солью этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) в присутствии мурексида в качестве индикатора. Ионы кальция, соединенные с индикатором (розовый цвет), реагируют с помощью ЭДТА, выделяя индикатор, вследствие чего последний окрашивает раствор в фиолетовый цвет.

Приборы. Пипетка на 2 мл с делениями. Бюретка. Колбы конусные на 50 мл.

Реактивы. Гидроксид натрия, 9 н. раствор. Индикатор мурексид (пурпурат аммония). Используют только размельченную соль мурексида и нитрата калия в соотношении 1:800. ЭДТА, 0,01 н. раствор. (В мерной колбе на 1000 мл растворяют 1,861 г сухого веще-

ства в 200 мл дистиллированной воды, подщелачивая 10%-ным едким натром, пока раствор не станет вполне прозрачным, затем доводят до метки дистиллированной воды.) 1 мл 0,01 н. раствора ЭДТА эквивалентен 0,2 мг кальция.

Ход работы. Разбавляют 2 мл сыворотки крови в 48 мл дистиллированной воды, добавляют 0,4 мл 9 н. раствора гидроксида натрия и шпателем немного мурексида. Титруют 0,01 н. раствором ЭДТА до тех пор, пока окраска смеси не станет фиолетовой. Параллельно титруют контрольную пробу, используя вместо сыворотки дистиллированную воду. Значение, полученное при титровании контрольной пробы (*B*), вычитается из значения опытной пробы (*A*).

Расчет: $x = 0,2 \cdot (a - b) \cdot 50$, где *x* — содержание кальция, мг%; 0,2 — количество мг кальция, соответствующее 1 мл 0,01 н. раствора ЭДТА; *a* — количество мл 0,01 н. раствора ЭДТА, пошедшего на титрование опытной пробы; *b* — контроля; 50 — пересчет на мг%.

Определение фосфора в крови

Фосфор служит структурным элементом для построения тканей. Около 80% фосфора организма входит в состав костей. Фосфор является необходимым компонентом для синтеза нуклеопротеидов, нуклеотидов, фосфопротеидов, фосфорных эфиров, углеводов и др. В присутствии фосфора происходит синтез и распад гликогена, реакции гликолиза и гликогенолиза, а также окислительного фосфорилирования, осуществляемого в цикле трикарбоновых кислот. Соли фосфора, образуя фосфатный буфер, поддерживают рН тканей организма на относительно постоянном уровне.

Содержание неорганического фосфора в сыворотке крови животных изменяется в зависимости от возраста, характера кормления, физиологического состояния животного организма (беременность, лактация и др.).

Значительное падение уровня неорганического фосфора наблюдается у животных при гиповитаминозе D, рахите и остеомалации. При определении неорганического фосфора наиболее стабильные и достоверные результаты получаются при исследовании плазмы, выделенной из гепарированной крови сразу после ее взятия. При исследовании сыворотки, выделяемой из крови при ее длительном стоянии, резко завышаются результаты за счет

распада нестабильных органических фосфорных соединений.

Ниже показано содержание неорганического фосфора в сыворотке крови различных животных, мг %:

Коровы	4,0—5,0	Овцы	3,5—5,0
Лошади	3,5—5,0	Телята	6,5—7,0
Свиньи	3,0—4,0	Кролики	4,0—5,0

Принцип метода заключается в образовании комплексной фосфорномолибденовой кислоты, которая после восстановления дает продукты, окрашенные в синий цвет (молибденовая синь). Интенсивность получаемой окраски пропорциональна содержанию фосфора в исследуемом объекте.

В качестве восстановителя могут использоваться эйконоген, гидрохинон, аскорбиновая кислота и др.

Приборы. Штатив с пробирками. Пипетка на 10 мл с делениями. Пипетка на 1, 2 и 5 мл. Воронка с бумажным фильтром. Пробирка с меткой на 10 мл. Колбы Кьельдаля на 25 мл. Водяная баня. Фотоколориметр.

Реактивы. Трихлоруксусная кислота, 20%-ный раствор. Молибденовокислый аммоний, 2,5%-ный раствор в 5 н. серной кислоте, (приготовление см. на с. 153). Аскорбиновая кислота, 0,04%-ный раствор. Фосфорнокислый калий, стандартный раствор, содержащий 0,04 мг в 1 мл. Приготовление: 0,1757 г $\text{KН}_2\text{PО}_4$ растворяют в дистиллированной воде и разводят общий объем в мерной колбе до 1 л. Серная кислота, концентрированная. Пергидроль.

Ход работы. В сухую чистую пробирку наливают 2 мл сыворотки крови, 6 мл дистиллированной воды и 2 мл 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Содержимое пробирки тщательно перемешивают, через 5 мин фильтруют через бумажный складчатый фильтр, который предварительно смачивают водой. Прозрачный фильтр используют для определения неорганического фосфора, 5 мл фильтрата (что соответствует 1 мл сыворотки крови) переносят в мерную пробирку с меткой на 10 мл, добавляют по 1 мл молибденовокислого аммония и 0,5 мл аскорбиновой кислоты, затем содержимое пробирки доводят водой до метки, перемешивают и ставят в водяную баню на 5 мин при температуре 37° С. Охлаждают в воде при комнатной температуре и колориметрируют на ФЭКе с красным светофильтром в кюветах с рабочей длиной 10 мм.

Определение общего фосфора. В микрокьельдалевскую колбу вносят 0,05 мл цельной крови, прибавляют 0,2 мл 5 н. серной кислоты и минерализуют

до полного обесцвечивания. Количество фосфора определяют так же, как и неорганический фосфат (см. выше).

Определение кислоторастворимого фосфора. 0,25—0,5 мл трихлоруксусного фильтрата, полученного, как указано для неорганического фосфора, переносят в микрокельдалевскую колбу, минерализуют и определяют фосфор аналогично неорганическому.

Расчет. Количество фосфора определяют по заранее построенной калибровочной кривой. Из основного стандартного раствора фосфорнокислого калия готовят серию разведений от 0,016 до 0,048 мг фосфора в 5 мл раствора, которые обрабатывают и колориметрируют аналогично опытным пробам. Показания прибора наносят на миллиметровую бумагу по оси ординат, а по оси абсцисс наносят содержание фосфора в миллиграммах.

Определение концентрации калия

Обмен калия вместе с натрием и кальцием — важное звено водно-солевого обмена в организме. Если натрий — основной катион внеклеточной жидкости, где концентрация его ионов в 6—12 раз выше, чем внутри клеток, то калий, наоборот, содержится преимущественно в клетках и здесь его в 20—30 раз больше, чем во внеклеточной жидкости. В организме соли калия и натрия полностью ионизированы. Излишки обоих катионов выводятся преимущественно с мочой, а также с калом (калий) и частично с потом. Физиологическое значение калия и натрия заключается в поддержании осмотического давления (главным образом это относится к натрию) и рН во внутри- и внеклеточных пространствах, во влиянии на процессы нервной деятельности, на состояние мышечной и сердечно-сосудистой системы и способность тканевых коллоидов к набуханию. Калий также оказывает действие на перистальтику кишечника.

В связи с тем что концентрация калия в эритроцитах выше, чем в плазме крови, исследование уровня калия в последней следует проводить, используя плазму крови, отделенную от форменных элементов не позже 1 ч после взятия крови и без следов гемолиза.

Принцип метода. Ионы калия в присутствии ионов Pb^{2+} , Cu^{2+} и NO_2^- образуют нерастворимый в воде осадок $K_2Pb[Cu(NO_2)_6]$ — купрогекса нитрит калия — свинца, который растворяют в смеси риванола и ледяной

укусной кислоты. Определяют оптическую плотность полученного раствора, прямо пропорциональную количеству ионов NO_2^- . Для вычисления уровня калия используют постоянный коэффициент, рассчитанный из соотношения NO_2^- и K^+ в образовавшемся соединении.

Приборы. Центрифужные пробирки. Пипетки на 0,2, 1 и 2 мл. Стеклянные палочки. Мерная колба на 25 мл. Фотоэлектроколориметр. Центрифуга.

Реактивы. Ацетат натрия, 5%-ный раствор. Смесь растворов ацетата меди и ацетата свинца (отвешивают в колбу 7,5 г ацетата меди и 2 г ацетата свинца, добавляют 150 мл дистиллированной воды; смесь нагревают до 100°C и после охлаждения отфильтровывают). Нитрит натрия (кристаллический). Смесь нитрита натрия и растворов ацетата меди и ацетата свинца. К 2 мл смеси растворов ацетата меди и ацетата свинца добавляют 0,25 мг нитрита натрия. Риванол, 0,5%-ный раствор. Уксусная кислота, ледяная.

Ход работы. В центрифужную пробирку вносят 0,5 мл раствора ацетата натрия, 0,1 мл исследуемой плазмы крови и 0,5 мл смеси ацетата меди, ацетата свинца и нитрата натрия. Содержимое пробирок хорошо перемешивают стеклянной палочкой и оставляют на 1 ч, затем центрифугируют в течение 10 мин при 1500 об/мин. Прозрачную надосадочную жидкость сливают, а в пробирку добавляют 1 мл раствора ацетата натрия, перемешивают стеклянной палочкой, центрифугируют и тщательно сливают надосадочную жидкость. Аналогичное промывание осадка раствором ацетата натрия повторяют еще один раз. Затем к осадку добавляют 1 мл раствора риванола и 2 мл ледяной уксусной кислоты. Хорошо перемешивая той же палочкой, раствор с помощью дистиллированной воды количественно переносят в мерную колбу емкостью 25 мл, доводят до метки водой, перемешивают и колориметрируют при зеленом светофильтре в кюветах толщиной 10 мм относительно воды.

Расчет: $x = E \cdot 36$, где x — содержание калия, мг%; E — показатель экстинкции; 36 — постоянный коэффициент.

Нормальное содержание калия в сыворотке 18—22 мг%.

Определение концентрации хлоридов

В организме содержание хлоридов составляет 1,5 г на 1 кг массы тела, причем $\frac{1}{3}$ общего количества хлоридов связана с подкожной клетчаткой, кожей и соответствующей межклеточной жидкостью. В жидкостях орга-

низма содержание хлоридов выше, чем в плотных тканях. В крови хлориды встречаются главным образом в виде хлористого натрия. Их содержание в эритроцитах в 2 раза меньше, чем в плазме крови: это соотношение изменяется при ацидозах и алкалозах. Хлориды выводятся в основном (на 90%) с мочой, а также с потом и калом. Хлориды участвуют в поддержании кислотно-щелочного равновесия (между плазмой крови и эритроцитами), осмотического равновесия (между кровью и тканями) и баланса воды в организме. Они также служат активаторами амилазы. У здоровых животных содержание хлоридов составляет от 320 до 430 мг%. Величина отношения хлоридов эритроцитов к хлоридам плазмы при этом равна 0,4—0,5. Выведение хлоридов с мочой с возрастом увеличивается и максимума достигает у взрослых животных. Гиперхлоремия может иметь место при снижении выведения хлоридов из организма (закупорке мочеточников, при нефрозах, повышенном кровяном давлении), при приеме больших доз хлоридов. Гипохлоремия отмечается при повышенной потере хлоридов (понос, рвота, нефроз, сахарный диабет и др.).

Принцип метода. Хлориды дают с азотнокислым серебром нерастворимое хлористое серебро. Безбелковый фильтрат крови, содержащий хлориды, титруют раствором азотнокислого серебра в присутствии 2%-ного раствора хромовокислого калия. Первая капля избытка азотнокислого серебра после осаждения всего хлора в виде хлористого серебра образует осадок хромовокислого серебра коричневого цвета. Появление коричневой окраски на фоне белой мути хлористого серебра указывает на окончание титрования.

Приборы. Центрифуга. Центрифужные пробирки. Стаканы для титрования. Пипетки на 1 и 5 мл.

Реактивы. Этиловый спирт, 96%-ный. Раствор азотнокислого серебра: растворяют 2,9060 г в 1 л дистиллированной воды; 1 мл этого раствора соответствует 1 мг хлористого натрия. Хромовокислый калий, 2%-ный раствор.

Ход работы. К 0,1 мл крови добавляют 4,9 мл 96%-ного этилового спирта и перемешивают. Через 20 мин центрифугируют, затем 2,5 мл центрифугата титруют раствором азотнокислого серебра в присутствии двух-трех капель 2%-ного раствора хромовокислого калия до появления коричневого цвета.

Расчет. Чтобы узнать содержание хлористого натрия в крови в мг%, количество мл азотнокислого серебра, затраченное на титрование, умножают на 2000 для приведения взятых на анализ 0,5 мл крови к 100 мл.

Определение концентрации фосфокреатина

Принцип метода. Фосфокреатин определяется по неорганической фосфорной кислоте, образующейся при распаде этого вещества в кислой среде в присутствии молибдата. Преобразованный неорганический фосфор предварительно осаждается магниезиальной смесью или хлористым кальцием.

Приборы. Фотозлектроколориметр. Штатив с мерными пробирками на 10 мл. Пипетки на 1, 2, 5 и 10 мл. Центрифуга. Центрифужные пробирки.

Реактивы. Используются те же, что и при определении неорганического фосфора (см. с. 242).

Ход работы. Осаждение белков проводится на холоде равным объемом 5%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Необходимо иметь в виду, что конечная концентрация трихлоруксусной кислоты не должна превышать 2,5%. Удаление неорганического фосфора магниезиальной смесью производится следующим образом: из полученного безбелкового центрифугата быстро отбирают по 1—1,5 мл раствора и выливают его в равный объем магниезиальной смеси, предварительно налитой в центрифужные пробирки, стоящие в снегу. Содержимое пробирок перемешивают, добавляют 1 каплю фенолфталеина и 10%-ного раствора аммиака до бледно-розовой окраски. Содержимое пробирок тщательно перемешивают палочкой и через 15 мин центрифугируют. Центрифугат сливают в мерные пробирки, осадок неорганического фосфата промывают 1—2 мл разведенного раствора магниезиальной смеси, центрифугируют и промывную жидкость сливают в те же мерные пробирки, куда был слит и основной центрифугат. Для колориметрического определения фосфокреатина (лабильного фосфора) содержимое мерных пробирок нейтрализуют разведенной соляной кислотой до исчезновения розовой окраски по фенолфталеину, добавляют 2,5 мл раствора молибденовой смеси и 0,5 мл аскорбиновой кислоты. Содержимое пробирок доводят до 10 мл и ставят в термостат при 37° С на 30 мин. Затем охлаждают при комнатной температуре и колори-

метрируют на ФЭКе с красным светофильтром в кюветах с рабочей длиной 10 мм. Количество фосфора определяют по заранее построенной калибровочной кривой.

Реакции на обнаружение билирубина

Эритроциты млекопитающих функционируют до 90—110 дней, а затем разрушаются в клетках ретикуло-эндотелиальной системы. Освободившийся гемоглобин расщепляется на белок и гем. Гем теряет железо и подвергается дальнейшим превращениям в организме. При этом образуется ряд веществ, молекулы которых представляют собой открытые цепи. Наименее восстановленным из них является пигмент желчи биливердин, который, восстанавливаясь, переходит в билирубин.

Билирубин образуется в селезенке, печени, а также, по-видимому, в эритроцитах. Билирубин обычно содержится в крови в небольших количествах — 0,2—0,8 мг%. При различных поражениях печени и желтухе часто наблюдается гипербилирубинемия, когда концентрация в крови достигает 30—35 мг%. В сыворотке имеется два билирубина: свободный, нерастворимый в воде, и билирубин, связанный с глюкуроновой кислотой, хорошо растворимый в воде. Оба вида билирубина связаны с альбуминами. Свободный билирубин дает розовое окрашивание с диазореактивом только после обработки сыворотки этиловым или метиловым спиртом. Эта реакция на билирубин называется непрямой. Связанный с глюкуроновой кислотой билирубин дает прямую диазореакцию.

Приборы. Бюретка. Штатив с пробирками. Воронки. Фильтры бумажные. Пипетки на 1 и 2 мл. Часовое стекло. Стеклянные палочки.

Реактивы. Диазореактив, готовится смешиванием двух растворов: нитрита натрия, 0,5%-ного раствора, и сульфаниловой кислоты, 0,1%-ного раствора. Спирт этиловый. Сыворотка крови. Свежая желчь.

Ход работы. Непрямая реакция. В пробирку отмеривают 1 мл сыворотки и 2 мл этилового спирта, фильтруют. К фильтрату добавляют 5 капель свежеприготовленного диазореактива — появляется красно-розовое окрашивание.

Прямая реакция. На часовое стекло, под которое подложен лист белой бумаги, наносят каплю желчи, добавляют 3 капли свежеприготовленного диазореактива, пе-

ремешивают стеклянной палочкой. Образуется характерное для билирубина красное окрашивание.

Определение концентрации аденозинтрифосфорной кислоты

Принцип метода. Определение аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) по фосфорной кислоте основано на нарастании неорганического фосфора в безбелковом фильтрате после 7 мин гидролиза в растворе кислоты при 100°С.

В присутствии глюкозо-1-фосфата, полностью расщепляющейся при гидролизе нормальной кислотой (подобно АТФ) с образованием неорганической фосфорной кислоты, определение АТФ ведут после осаждения ее в виде бариевой соли. При обработке исследуемого раствора гидроокисью бария образуется нерастворимый осадок бариевых солей АТФ, фруктозодифосфата, орто- и пирофосфорной кислот и фосфоглицериновой кислоты. Бариевые же соли фосфокреатина, адениловой, инозиновой кислот, гексозомонофосфатов и трехуглеродных фосфатных соединений бария растворимы в воде и при обработке гидроокисью бария остаются в растворе. В тех случаях, когда глюкозо-1-фосфат практически отсутствует, определение АТФ лучше производить без выделения ее в виде бариевой соли. При одновременном присутствии больших количеств неорганического фосфата АТФ отделяют в виде ртутной соли. При обработке раствора уксуснокислой ртутью АТФ осаждается в виде ртутного соединения, увлекающая за собой только следы неорганического фосфора. Глюкозо-1-фосфат остается при этом в растворе.

Приборы. Фотоэлектроколориметр. Центрифуга. Центрифужные пробирки. Штатив с пробирками. Мерная колба на 10 мл. Пипетки на 1, 2, 5 и 10 мл. Водяная баня.

Реактивы. Все реактивы для определения фосфора (см. с. 242). Соляная кислота, 2 н. раствор. Гидроксид натрия, 2 н. раствор. Барий уксуснокислый, 25%-ный раствор. Фенолфталеин, 0,2%-ный раствор. Ртуть уксуснокислая, 20%-ный раствор.

Ход работы. 1. Определение АТФ после отделения ее в виде бариевых солей. В центрифужную пробирку помещают 5—10 мл безбелкового фильтрата, добавляют 1—2 капли фенолфталеина и подщелачивают слабым раствором едкого натра до слабо-розового окрашивания. При тщательном встряхивании добавляют по каплям

25 %-ный раствор уксуснокислого бария до полноты осаждения, следя за тем, чтобы раствор после добавления уксуснокислого бария оставался щелочным на фенолфталеин, хорошо перемешивают и отстаивают. Образовавшийся осадок бариевых солей не раньше чем через 30 мин отделяют центрифугированием и центрифугат сливают. Осадок растворяют в 1—2 мл 0,7 н. раствора соляной кислоты, небольшой нерастворившийся осадок удаляют центрифугированием, центрифугат сливают в мерную пробирку, осадок промывают 0,1 н. раствором соляной кислоты, промывную жидкость присоединяют к основному центрифугату, добавляют туда каплю фенолфталеина, подщелачивают едким натром и снова осаждают АТФ уксуснокислым барием. Осадок бариевых солей в центрифужной пробирке растворяют в небольшом количестве соляной кислоты и удаляют барий, добавляя 2—3 капли насыщенного раствора сульфата натрия. Осадок сульфата бария удаляют центрифугированием, центрифугат сливают в мерную пробирку, осадок промывают водой, центрифугируют, промывную жидкость сливают в ту же мерную пробирку, куда был слит основной раствор, и все доводят до 5 мл.

Из полученного раствора отбирают 1—2 мл, добавляют равный отобранному объем 2 н. раствора соляной кислоты и, закрыв пробирки стеклянными колпачками или маленькими воронками, обеспечивающими стекание внутрь пробирок конденсирующейся жидкости, ставят пробирки в кипящую водяную баню на 7 мин. Затем пробирки охлаждают, добавляют каплю фенолфталеина и нейтрализуют 2 н. раствором щелочи. Добавляют 2,5 мл молибденовой смеси, 0,5 мл аскорбиновой кислоты, доводят водой до метки 10 мл и через 10 мин колориметрируют на ФЭКе с красным светофильтром в кюветах с рабочей длиной на 10 мм.

Одновременно проводят определения неорганического фосфата в том же самом растворе без предварительного гидролиза соляной кислотой. При наличии в растворе неорганического фосфата содержание АТФ рассчитывают как разность между содержанием фосфата в пробе с гидролизом и в пробе без гидролиза.

2. Определение АТФ после осаждения ее уксуснокислой ртутью. В мерную центрифужную пробирку помещают 2 мл трихлоруксусного фильтрата, добавляют туда 0,5 мл 20 %-ного раствора уксуснокислой ртути, хорошо

перемешивают и через 15 мин центрифугируют. Центрифугат сливают, а осадок два раза промывают 0,5%-ным раствором уксуснокислой ртути, беря каждый раз по 1—2 мл раствора. Затем осадок растворяют в 1 мл 0,1 н. соляной кислоты, доводят водой до 8 мл и тщательно перемешивают. Из раствора отбирают 1 мл в пробирку, добавляют туда 1 мл 2 н. раствора соляной кислоты, нагревают в течение 7 мин в кипящей водяной бане и после нейтрализации проводят определение фосфата обычным способом (см. с. 241). Одновременно из раствора отбирают пробу и проводят в ней определение неорганического фосфора, который увлекается ртутным осадком. Содержание АТФ определяют как разность между содержанием фосфора в пробе, подвергавшейся гидролизу, и количеством неорганического фосфата, найденным в ртутном осадке.

ГЛАВА XI

МОЧА

Моча — водный раствор конечных продуктов обмена веществ, выделяемых организмом. Суточное количество мочи колеблется у домашних животных в широких пределах и зависит от самых разнообразных причин, но главным образом от питания и питьевого режима. Количество мочи у домашних животных варьирует в следующих пределах (л/сут):

Лошади	3—11	Свиньи	2—6
Коровы	6—23	Кролики	0,04—0,1
Овцы	0,5—2,0	Собаки	0,2—0,5
Верблюды	8—15	Кошки	0,2—0,5

В патологических случаях может быть полное прекращение выделения мочи (анурия), уменьшение выделения мочи (олигурия) или повышенное выделение мочи (полиурия). Исследование мочи имеет большое значение, так как изменение химических процессов в организме при различных заболеваниях или нарушении питания приводит к изменению количества мочи и ее состава, к появлению, в некоторых случаях, патологических веществ, которые в нормальной моче не встречаются. С мочой, например, выделяется основная часть продуктов белкового и минерального обмена, а также такие ядовитые вещества, как фенолы, аммиак, лекарственные вещества и др. По своему составу моча значительно отличается от крови. В ней, как правило, нет белка или имеются лишь его следы. Сахар практически отсутствует. В моче много мочевины (2,3%), мочевой кислоты, креатинина и других веществ.

Исследование мочи важно при установлении диагноза заболевания для суждения о характере течения болезни. Для клинического анализа берут или утреннюю порцию мочи, или, в случае надобности, суточное ее количество. В последнем случае в закрывающийся сосуд, куда собирают мочу, добавляют 1 мл 25%-ного раствора серной кислоты или кристаллик тимола для предотвращения бактериального разложения мочи.

Цвет мочи

Свежая моча большинства животных прозрачна, у лошади и осла она немного мутная за счет фосфатов и тягуча, благодаря присутствию муцина. Моча различных животных имеет цвет от светло-желтого до темно-коричневого. Цвет мочи зависит от количества растворенных в ней пигментов, главным образом урохромов и других красящих веществ.

Необычную окраску моча может приобрести в связи с присутствием в ней крови, гемоглобина, желчных пигментов, лекарственных веществ, каротиноидов и др. Пена нормальной мочи белая, быстро исчезающая при стоянии. При содержании белка в моче пена делается более стойкой.

Определение плотности мочи

В цилиндр на 100 мл наливают около 50 мл мочи и осторожно опускают в него сухой и чистый урометр (диаметр цилиндра должен быть не менее чем на 1 см больше диаметра широкой части урометра). Легким толчком по верхушке урометра заставляют его совершить несколько небольших движений вниз и вверх и когда он остановится, не прикасаясь к стенкам цилиндра, производят отсчет, держа глаз на уровне мениска жидкости. Всякий урометр калиброван для определенной, указанной на нем температуры. Если определение производят при иной температуре, то вносят поправку: на каждые 3° выше указанной температуры к показаниям урометра прибавляют по 0,001, на каждые 3° ниже вычитают 0,001. Плотность мочи у разных животных неодинакова:

Лошади . . .	1,025—1,060	Козы	1,020—1,040
Коровы . . .	1,025—1,050	Свиньи	1,010—1,040
Овцы	1,020—1,070		

Меняется плотность в зависимости как от количества введенной в организм жидкости, так и от количества жидкости, выведенной из организма с потом и калом. Обычно чем больше выделяется мочи, тем меньше ее плотность. Исключением является моча при сахарной болезни, когда выделяется большое количество мочи высокой плотности. При сморщенной почке выделяется

большое количество мочи низкой плотности. При лихорадочных заболеваниях и при общем венозном застое выделяется немного мочи, но большей плотности.

Осмотическое давление мочи зависит от концентрации в ней неорганических солей и главным образом хлоридов, фосфатов и карбонатов. Оно изменяется в зависимости от характера кормления и водного режима. Депрессия мочи лошади составляет 1,7—2,0, крупного рогатого скота 1,2—2,0 и свиньи 1,0—1,5.

При распаде белков в организме животных сера, содержащаяся в аминокислотах (метионин, цистеин, цистин), окисляется и переходит в состав образующейся при этом серной кислоты. Последняя выводится с мочой в виде сложных эфиров с фенолами или в составе ее солей. Если количество серной кислоты невелико, образуются средние соли типа K_2SO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, Na_2SO_4 и др. При повышенном содержании белков в корме образуется больше серной кислоты и в связи с ограниченными запасами катионов будут возникать кислые соли: $KHSO_4$, $NaHSO_4$, NH_4HSO_4 и т. д. При их диссоциации образуется некоторое количество свободных ионов водорода и реакция их растворов будет кислой. Поэтому моча животных, с которой кислые соли выводятся из организма, будет иметь кислую реакцию при значительном содержании белков в корме.

Помимо серной кислоты при полном распаде белков в организме животных может образовываться и фосфорная кислота. Она содержится в значительных количествах в составе ядерных белков. Ее много также в фосфопротеидах, например в казеине. Поэтому при значительном содержании в корме белков среди конечных продуктов белкового обмена появляются кислые однозамещенные соли фосфорной кислоты.

Вот почему моча хищных и всеядных животных, в пище которых находится значительное количество белков, имеет кислую реакцию. Такую же реакцию имеет и моча телят-молочников, получающих с молоком значительное количество казеина.

В кормах травоядных животных белков гораздо меньше. Поэтому сульфатов и фосфатов с их мочой выделяется меньше. Катионы солей органических кислот, содержащихся в корме, оказываются в относительном избытке и в значительном количестве выделяются в составе солей угольной кислоты, в которую превращаются

при окислении органические кислоты. Поэтому в моче травоядных животных они появляются в виде солей угольной кислоты: NaHCO_3 , $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ и KHCO_3 . Их растворы имеют щелочную реакцию, так как при растворении они гидролизуются с образованием сильных оснований и слабой угольной кислоты. В связи с этим моча травоядных при нормальном обмене веществ имеет щелочную реакцию.

Приборы. Потенциометр. Прибор Михаэлиса. Мерный цилиндр на 25 мл.

Ход работы. В мерный цилиндр наливают 2 мл мочи, добавляют дистиллированную воды до 10 мл и перемешивают содержимое. Затем определяют рН мочи потенциометрическим или колориметрическим методом.

Химический состав мочи

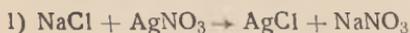
В суточной моче находится 12—25 г минеральных веществ.

Неорганические вещества мочи находятся в форме анионов Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ и катионов К, Na, Ca, Mg. Кальций и магний встречаются в моче в виде растворимых и нерастворимых солей. Фосфор выделяется в виде однозамещенных и двузамещенных солей калия, натрия, аммония, кальция, магния: NaH_2PO_4 , NaHPO_4 , $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$.

Неорганические вещества являются продуктами обмена, протекающего в тканях организма, или поступают из кишечника.

Качественное определение хлоридов в моче

При добавлении азотнокислого серебра к моче, подкисленной азотной кислотой, выпадает белый осадок хлористого серебра, темнеющий на свету, нерастворимый в азотной кислоте, но растворимый в аммиаке:



Приборы. Штатив с пробирками. Капельница.

Реактивы. Азотнокислое серебро. Азотная кислота, 10%-ный раствор.

Ход работы. К 20 каплям мочи приливают 2—5 капель 1%-ного раствора азотнокислого серебра и 2 капли 10%-ного раствора азотной кислоты. Выпадает белый творожистый осадок хлористого серебра (подкисление азотной кислотой предотвращает образование растворимого в азотной кислоте фосфорнокислого серебра).

4 Количественное определение хлоридов в моче

Принцип метода. При взаимодействии хлоридов мочи с ионами ртути образуется малодиссоциирующий, но не выпадающий в осадок хлорид ртути. Об окончании реакции судят по появлению в растворе свободных ионов ртути. С этой целью используют различные индикаторы, в частности дифенилкарбазон, который с ионами ртути образует окрашенный в фиолетово-синий комплекс.

Приборы. Микробюретка. Штатив с пробирками. Пипетки на 1 и 5 мл с делениями. Мерные колбочки на 25 мл.

Реактивы. Азотная кислота, 2 н. раствор. Нитрат ртути, 0,017 н. раствор. Хлорид натрия, 0,01 н. раствор. Этанол 96%-ный. Дифенилкарбазон, 0,1%-ный раствор. Азотная кислота, 0,05 н. раствор.

Ход работы. В колбу емкостью 25 мл вносят 1,5 мл дистиллированной воды, 0,5 мл мочи с добавлением 5 мл 0,05 н. раствора азотной кислоты и добавляют 0,06 мл (4 капли) раствора индикатора. Мутноватый раствор приобретает оранжево-красную окраску. Титруют его раствором азотнокислой ртути из микробюретки с делениями на 0,01 мл. Сразу же после начала титрования цвет раствора изменяется на интенсивно фиолетовый, а затем раствор становится прозрачным и бесцветным или слегка желтоватым. В конечной точке титрования отмечается резкое изменение окраски до слабо-фиолетовой, но отчетливо заметной.

Расчет. Для расчета уровня хлоридов (Cl, мг-экв/л) в моче используют формулы:

$$\frac{0,02 \cdot b \cdot 2 \cdot 1000}{a} = \frac{b \cdot 40}{a};$$

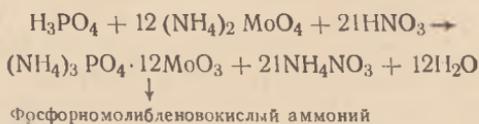
$$\frac{b \cdot 40 \cdot 35,5 \cdot c}{a \cdot 1000} = \frac{b \cdot c \cdot 1,42}{a};$$

где a — количество раствора азотнокислой ртути, пошедшее на титрование раствора хлористого натрия, мл; b —

количество раствора азотнокислой ртути, пошедшее на титрование опытной пробы мочи, мл; *c* — суточный диурез, л.

Определение фосфатов

При добавлении к молибденовому реактиву (предварительно нагрев его) мочи выпадает желтый кристаллический осадок фосфорномолибденовоокислого аммония $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{MoO}_3$, нерастворимый в азотной кислоте, но растворимый в аммиаке. Реакция протекает так:



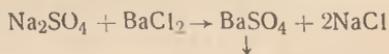
Приборы. Штатив с пробирками. Капельницы.

Реактивы. Молибденовоокислый реактив (см. с. 000).

Ход работы. В пробирку наливают 20—30 капель молибденовоокислого реактива и нагревают его почти до кипения; после этого прибавляют несколько капель мочи (избыток реактива); выпадает желтый кристаллический осадок фосфорномолибденовоокислого аммония.

Определение сульфатов

Принцип определения сульфатов основан на том, что при подкислении мочи и добавлении хлористого бария образуется белый осадок серникоокислого бария, нерастворимый в кислотах и щелочах:



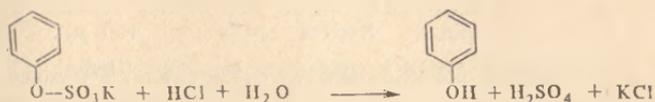
Нейтральная сера реагирует с хлористым барием только после окисления в сульфаты.

Приборы. Водяная баня. Колбочки. Фильтры.

Реактивы. Соляная кислота, 10%-ный раствор. Хлористый барий, 5%-ный раствор.

Ход работы. 1. К 20 каплям мочи приливают 5 капель 10%-ного раствора соляной кислоты и по каплям 5%-ный раствор хлористого бария до полного осаждения, т. е. до тех пор, пока новая капля хлористого бария не будет вызывать образования мути. Выпавший белый осадок серникоокислого бария отфильтровывают.

2. В фильтрат проходят растворимые в воде бариевые соли эфирсерных кислот — соединений серной кислоты с фенолом, индоксилем и др. Для их обнаружения кислый фильтрат помещают в кипящую водяную баню и кипятят в течение 5—10 мин. Снова появляется муть. Появление мути обусловлено освобождением серной кислоты в результате гидролиза эфирсерных кислот с образованием новой порции сернокислого бария:



Определение общего азота в моче

Всосавшиеся из кишечника аминокислоты в органах и тканях подвергаются различным превращениям. Часть их используется для синтеза белков органов и тканей, ферментов, некоторых гормонов, гемоглобина, креатина и т. д. Аминокислоты, не использованные для синтеза различных соединений, подвергаются распаду с образованием аммиака, углекислоты и воды.

Основная часть аммиака идет на образование мочевины, которая составляет 85—90% общего азота мочи. Часть аммиака выделяется с мочой в виде солей аммония. Кроме мочевины азот выделяется с мочой в виде креатинина, мочевой кислоты, индикана и небольшой части свободных аминокислот. Сумма азота, содержащегося во всех выделенных из организма азотистых веществ, обозначается как «общий азот мочи».

Определение общего азота мочи дает возможность судить об азотистом балансе организма. Общее количество азота, выделяемого за сутки с мочой у человека, составляет 10—18 г. При изменении показателей общего азота мочи исследуют отдельные азотсодержащие вещества. На основании полученных данных можно судить как о белковом обмене в организме, так и о функциональном состоянии отдельных органов (печень, почки).

Принцип метода. Моча минерализуется при нагревании с концентрированной серной кислотой в присутствии катализатора. При этом азот освобождается в

форме аммиака, который, соединяясь с серной кислотой, образует серноокислый аммоний. При добавлении к минерализату щелочи освобождается аммиак, который в условиях замкнутого пространства (в чашках Конвея) улавливается титрованным раствором серной кислоты. Избыток последней титруется щелочью. По количеству связанной кислоты судят о количестве выделившегося аммиака и, следовательно, о количестве азота.

Приборы. Колбы Кьельдаля на 25 мл. Чашка Конвея. Пипетки на 1, 2 и 5 мл. Капельницы. Колбы мерные на 100 мл. Песчаная баня.

Реактивы. Серная кислота, концентрированная. Сульфат меди, 20%-ный раствор. Серная кислота, 0,02 н. раствор. Гидроксид натрия, 0,02 н. раствор. Гидроксид натрия, 40%-ный раствор. Индикатор Таширо: а) метилрот, 0,1%-ный спиртовой раствор; б) метиленовый синий, 0,1%-ный спиртовой раствор. Одну часть раствора «а» смешивают с одной частью раствора «б». Затем к одной части смеси прибавляют одну часть спирта и две части воды.

Ход работы. В колбу Кьельдаля объемом на 25 мл вносят точно 3 мл мочи, прибавляют 5 мл концентрированной серной кислоты и 10 капель 20%-ного раствора медного купороса. Медный купорос прибавляют для ускорения минерализации. Сжигание производят на песчаной бане. Минерализация продолжается до полного просветления жидкости, затем колбу охлаждают, содержимое ее количественно переносят в мерную колбу емкостью на 100 мл. Раствор доводят дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают.

Во внутреннюю камеру чашки Конвея вносят 2 мл титрованной 0,02 н. серной кислоты и 3 капли индикатора, ставят сосуд в наклонное положение и наливают во внешнюю камеру 1 мл испытуемого раствора. Закрывают чашку Конвея крышкой, предварительно смазав края чашки специально приготовленной смазкой. Не следует полностью закрывать крышку, необходимо оставить небольшую щель, через которую вносят пипеткой 2 мл гидроксида натрия, 40%-ного раствора, затем быстро и плотно закрывают сосуд крышкой. Далее чашку ставят на ровное место и осторожными круговыми движениями смешивают испытуемую жидкость с гидроксидом натрия во внешней камере, оставляют сосуд в таком положении приблизительно на 20 ч.

Выделившийся аммиак поглощается серной кислотой, а остаток непрореагировавшей кислоты оттитровывают 0,02 н. гидроксидом натрия. Одновременно ставят

контрольный опыт, в котором испытуемый раствор заменяют на равный объем дистиллированной воды.

Расчет: $x = (a - b) \cdot 0,28$; где x — содержание азота во взятой для анализа пробе мочи, мг; a и b — количество 0,02 н. раствора гидроксида натрия, пошедшего на титрование серной кислоты в контрольной и исследуемой пробах; 0,28 — количество азота (мг), эквивалентное 1 мл 0,02 н. раствора гидроксида натрия или серной кислоты.

Определение креатинина и креатина в моче

Принцип метода. Колориметрический метод определения креатинина в моче основан на реакции Яффе, заключающейся в развитии интенсивной оранжевой окраски при смешивании растворов креатина с щелочным пикратом. Креатин определяется в виде креатинина. Для перевода креатина в креатинин производится нагревание его при высокой температуре в присутствии соляной кислоты.

Приборы. Фотоэлектроколориметр. Штатив с пробирками. Пипетки на 0,2, 1, 2, 5 и 10 мл с делениями.

Реактивы. Гидроксид натрия, 12,5%-ный раствор. Соляная кислота, 37%-ный раствор. Пикриновая кислота, насыщенный раствор.

Ход работы. В три пробирки (1— для определения креатинина, 2— для креатина, 3— контрольная) вносят по 0,2 мл соляной кислоты. В пробирку 1 и 2 добавляют по 0,2 мл мочи, разведенной в 5 раз. Пробирку 2 нагревают в течение 3 мин в кипящей бане, затем охлаждают. Во все пробирки добавляют сначала воду: в 1 и 2 — по 2 мл, в 3—2,2 мл, а затем по 0,6 мл пикриновой кислоты и по 1 мл гидроксида натрия. Оставляют стоять на 6—10 мин. Затем в них добавляют по 6 мл воды. После каждого добавления реактивов содержимое пробирок тщательно перемешивают.

Определение оптической плотности исследуемых растворов производят на фотоэлектроколориметре. Колориметрируют против контрольного раствора с зеленым светофильтром в рабочих кюветах толщиной в 10 мм.

Расчет количества креатинина производят по формуле $x = a \cdot b \cdot c$, где x — количество креатинина (мг), выделившееся с мочой за сутки; a — количество креатинина в первой пробе (мг), найденное по калибровочной кривой; b — разведение мочи; c — количество суточной мочи.

Во второй пробе определяют количество креатинина, представляющего сумму креатинина и креатина, переведенного в креатинин.

Количество креатина вычисляют как разницу между показателями второй и первой проб.

Количественное определение мочевины

Мочевина — главный конечный продукт обмена простых белков у млекопитающих. Небольшое количество мочевины может образоваться при окислении пиримидиновых оснований. В отличие от млекопитающих у птиц и рептилий главный конечный продукт белкового обмена — мочевая кислота.

Количество мочевины по отношению к другим азотистым веществам мочи зависит от вида животных, интенсивности белкового обмена и количества белка в корме. У плотоядных животных мочевины больше, чем у травоядных.

Содержание мочевины в моче от общего количества азота у различных животных следующее (%).

Собака при голодании	79	Лошадь	85
Собака при углеводной пище	85	Свинья	84
Собака при белковой пи- ще	96	Буйвол	42

Повышенное выделение мочевины с мочой наблюдается при некоторых заболеваниях, связанных с усиленным расходом белков, например злокачественных опухолях, лихорадке и при избытке белков в рационе.

Пониженное количество мочевины в моче имеет место при заболевании печени, недостатке белка в кормах.

Принцип метода основан на фотометрии продуктов реакции мочевины с диацетилмонооксимом. Интенсивность окраски полученного комплекса прямо пропорциональна концентрации мочевины в растворе (мочи, сыворотки крови).

Приборы. Электрофотокориметр. Мерная колба на 100 мл. Штатив с пробирками. Пипетки на 1, 2 и 5 мл с делениями. Водяная баня.

Реактивы. Диацетилмонооксим, 2%-ный водный раствор. Смесь концентрированных кислот (фосфорная кислота, 85%-ный раствор, 75 мл + серная кислота, концентрированная, 25 мл и вода 70 мл).

Ход работы. В мерную колбу емкостью 100 мл отмеривают 0,5 мл мочи и доводят до метки дистиллированной водой. Содержимое колбы тщательно перемешивают.

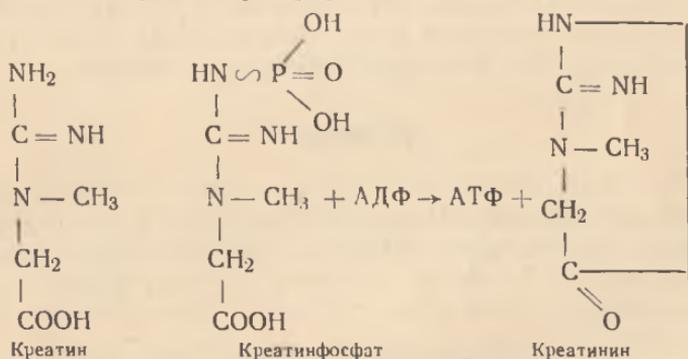
По 0,5 мл разведенной мочи отмеривают в две пробирки и добавляют в каждую 2,5 мл дистиллированной воды, 0,6 мл 2%-ного раствора диацетилмонооксида и 2,4 мл смеси концентрированных кислот. Пробирки с пробами кипятят на водяной бане в течение 30 мин, затем охлаждают.

Интенсивность окраски определяют на фотоэлектродетекторе против дистиллированной воды с синим светофильтром. Зная оптическую плотность опытного раствора, по калибровочной кривой находят количество мочевины, содержащейся в 0,5 мл разведенной мочи, а затем, учитывая разведение, находят содержание мочевины в суточном количестве мочи.

Построение калибровочной кривой производится так. Готовят ряд растворов мочевины с известными концентрациями (15, 30, 45, 60 мкг). Измеряют оптическую плотность каждого из растворов и строят калибровочную кривую.

Качественные реакции на креатинин и индикан

Креатинин — составная часть мочи. Во взрослом организме креатинин образуется в мышцах при дефосфорилировании креатинфосфорной кислоты:



Креатин в моче взрослых животных не содержится.

Креатурия наблюдается лишь в тех случаях, когда идет интенсивный распад тканей. В моче молодняка содержится как креатинин, так и креатин.

Принцип метода. В щелочной среде с пикриновой кислотой креатинин дает пикрат креатинина красного цвета. В щелочной среде с раствором нитропрусида натрия креатинин образует изонитрокреатинин, имеющий красную окраску, переходящую постепенно в желтую.

Приборы. Штатив с пробирками. Пипетки на 1 и 2 мл.

Реактивы. Пикриновая кислота, насыщенный раствор. Гидроксид натрия, 10%-ный раствор. Нитропруссид натрия, 3%-ный раствор. Уксусная кислота, 5%-ный раствор.

Реакция с пикриновой кислотой

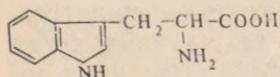
Ход работы. В пробирку наливают 2 мл мочи и добавляют 5—6 капель раствора гидроксида натрия и 3—4 капли пикриновой кислоты. Содержимое пробирки окрашивается в оранжево-красный цвет (обусловленный образованием красного таутомера пикрата креатинина).

Реакция с нитропруссидом натрия

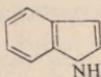
Ход работы. К 2 мл мочи прибавляют 2—3 капли свежеприготовленного раствора нитропрусида натрия $[\text{Na}_2 \text{Fe}(\text{CN})_5 \text{NO}]$ и подщелачивают по каплям 1%-ным раствором гидроксида натрия: жидкость приобретает красную окраску, вскоре переходящую в желтую. Еще быстрее окраска переходит в желтую при подкислении уксусной кислотой. Последнее отличает данную реакцию от реакции на ацетон, при которой первоначальная окраска более устойчива и приобретает при подкислении крепкой уксусной кислотой вишневый оттенок.

Индикан

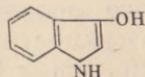
В толстом кишечнике под влиянием бактериальных процессов аминокислота триптофан подвергается разложению с образованием индола. Последний всасывается в кровь воротной вены и в печени обезвреживается, соединяясь после окисления с серной или глюкуроновой кислотой:



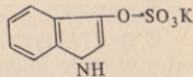
Триптофан



Индол



Индоксил



Индикан

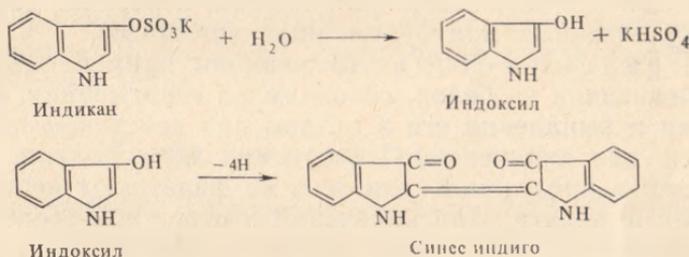
В ничтожном количестве индикан содержится в любой нормальной моче. В моче лошади индикана много всегда. Повышение содержания индикана имеет важное диагностическое значение при различных формах кишечной непроходимости.

Принцип метода. Обнаружение индикана в моче, основанное на том принципе, что находящиеся в моче индоксилсерная и индоксилглиукуроновая кислоты при прибавлении крепкой соляной кислоты разлагаются на свои составные части и освободившийся при этом индоксил окисляется KMnO_4 в синее индиго, растворимое в хлороформе. При нормальном содержании индикана хлороформ имеет бледно-синюю окраску, при повышенном количестве — синюю окраску с фиолетовым оттенком, при резко повышенном — густо синюю окраску с фиолетовым оттенком.

Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. Соляная кислота, концентрированная. Марганцево-кислый калий, 2%-ный раствор. Хлороформ.

Ход работы. К 2 мл мочи приливают такое же количество соляной кислоты, 2 капли 2%-ного KMnO_4 и 2 мл хлороформа. Пробирку плотно закрывают пробкой и несколько раз переворачивают, извлекая индиго хлорофор-



мом. При наличии индикана хлороформ окрашивается в синий цвет, интенсивность которого зависит от количества индикана.

Патологические составные части мочи

Исследование мочи позволяет установить различные нарушения в организме и дает представление о состоянии почек, сердца, печени, поджелудочной железы, желудочно-кишечного тракта и обмена веществ. Нередко

анализ мочи имеет большое значение для диагноза или прогноза. Состав мочи изменяется при многих инфекционных и паразитарных болезнях. При некоторых заболеваниях в моче могут появляться вещества, которые не встречаются в норме или присутствуют в ничтожных количествах, не выявляемых обычными методами. При клиническом исследовании мочи особое внимание обращают на содержание белка, сахара, ацетоновых тел, желчных и кровавых пигментов и индикана.

Определение белка

Моча здоровых животных содержит незначительное количество белка, не уловимое обычными методами. При некоторых патологических состояниях в моче может появиться белок, который представляет собой смесь сывроточных альбуминов и глобулинов. Выделение белка с мочой называют альбуминурией. Она может быть почечной (истинной), когда белок попадает в мочу в почках, и случайной (ложной), когда белок примешивается к моче после выхода ее из почек. Это наблюдается при заболеваниях мочеточников, почечных лоханок, мочевого пузыря. Истинная альбуминурия бывает патологической и физиологической. Последняя наблюдается при сильном мышечном напряжении, переохлаждении, у новорожденных или беременных животных.

Принцип метода. Все реакции, применяемые для исследования на белок, основаны на свертывании, осаждении и выпадении его в осадок под действием кислот, солей, при кипячении. Исследуемая моча должна быть свежей и прозрачной, для чего ее фильтруют через бумажный фильтр. При кипячении в щелочной среде белки не выпадают в осадок, а в нейтральной среде свертываются плохо. Поэтому мочу щелочной или нейтральной реакции нужно подкислить 10%-ным раствором уксусной кислоты. Лучшее образование осадка достигается в том случае, если к моче добавить достаточное количество какой-либо средней соли (хлорида натрия).

Ход работы. Проба с азотной кислотой: в пробирку наливают 1—2 мл концентрированной азотной кислоты и осторожно по стенке наклоняют равный объем профильтрованной мочи. При наличии белка на границе двух жидкостей появляется мутный белый слой, называемый кольцом. Если в моче содержится незначитель-

ное количество белка, кольцо появляется не сразу, а спустя 2—3 мин. Проба с азотной кислотой более чувствительна и позволяет обнаружить до 0,0033% белка.

Определение ацетоновых тел

К ацетоновым телам относят три соединения: ацетон, ацетоуксусная и β -оксимасляная кислоты. Они являются продуктами неполного окисления жирных кислот. При нормальном состоянии организма эти соединения выделяются с мочой в небольших количествах. Значительное количество ацетоновых тел в моче (ацетонурия) наблюдается при длительном голодании, истощении, недостатке углеводов в рационе, диабете, атонии преджелудков, злокачественных новообразованиях.

Ацетон обнаруживается по образованию иодоформа при взаимодействии с иодом в присутствии щелочи. Ацетоуксусная и β -оксимасляная кислоты обнаруживаются по пурпурно-фиолетовому окрашиванию с нитропруссидом натрия.

Проба на ацетон

Ход работы. В пробирку наливают 2—3 мл исследуемой мочи и по 5 капель реактива Люголя и 10%-ного раствора гидроксида натрия. В присутствии ацетона обнаруживается иодоформ (желтоватая муть) и его специфический запах.

Проба с нитропруссидом натрия

Ход работы. В пробирку наливают 2—3 мл исследуемой мочи, 5 капель свежеприготовленного 10%-ного нитропрусида натрия и несколько капель 10%-ного едкого натрия. Наблюдают красное окрашивание.

Добавляют несколько капель концентрированной уксусной кислоты. В присутствии ацетона развивается вишнево-красное окрашивание. Если ацетона нет, то красная окраска исчезает.

Реакция на кровяные пигменты

При патологических состояниях в моче может появляться кровь (гематурия) и гемоглобин (гемоглобинурия).

рия). Гематурия наблюдается при воспалении почек, кровотечении из сосудов почек, мочевых путей, уретры, половых органов. Гемоглинурия встречается при кровепаразитарных заболеваниях (пироплазмоз, нутталлиоз), инфекционных болезнях, интоксикациях.

Принцип метода. Одной из наиболее чувствительных реакций на пигменты крови является бензидиновая проба. В основе ее лежит способность гемоглобина и его производных разлагать перекись водорода. Освобождающийся при этом O_2 окисляет бензидин.

Ход работы. В пробирку наливают 2—3 мл 3%-ного раствора перекиси водорода и 15—20 капель свежеприготовленного насыщенного раствора бензидина в ледяной или 50%-ной уксусной кислоте. Смесь взбалтывают. В полученную смесь по каплям добавляют мочу. Появление зеленой окраски, быстро переходящей в синюю или изумрудно-зеленую, свидетельствует о наличии пигментов крови.

Реакции на желчные пигменты

Желчные пигменты обнаруживаются в моче при различных поражениях печени, протекающих с симптомами желтухи. При механической и паренхиматозной желтухах в моче обнаруживается большое количество билирубина и уробилина, а при гемолитической — уробилина.

Принцип качественных реакций на желчные пигменты основан на том, что под влиянием азотной и азотистой кислот они окисляются с образованием различно окрашенных продуктов: биливердина (зеленый), билицианина (синий), холестерина (желтый) и др.

Проба Гмелина

Ход работы. В пробирку наливают 2 мл концентрированной азотной кислоты с примесью азотистой (последняя обычно содержится в азотной кислоте, постоявшей на свету). Осторожно по стенке настилают 1—2 мл мочи. При наличии желчных пигментов на границе двух жидкостей появляются кольца, имеющие различную окраску: зеленую, синюю, фиолетовую, красную и желтую.

Проба Розенбаха

Ход работы. 2—3 мл исследуемой мочи фильтруют через небольшой бумажный фильтр, на котором задерживается часть желчных пигментов: фильтр разворачивают, кладут на стекло, в центр его наносят каплю концентрированной азотной кислоты. Присутствие желчных пигментов сопровождается появлением различно окрашенных колец. Зеленое кольцо располагается по периферии, а ближе к центру будут синее, фиолетовое, красное и желтое.

Методы определения сахара в моче

Сахар в моче наблюдается при бешенстве, нервной форме чумы собак, нарушениях функции печени, панкреатической железы и др. У лошадей глюкозурия встречается реже, чем у собак. Лактозурия наблюдается при родильном парезе, воспалении вымени, закупорке сосков, маститах. Содержание сахара в моче достигает 8—10%, а иногда и больше.

Определение сахара в моче основано на его свойствах восстанавливать металлы из их окисных соединений, что сопровождается появлением характерной окраски. Для этого чаще всего пользуются реакцией Троммера или реакцией с жидкостью Фелинга.

Проба Троммера

Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. Гидроксид натрия, 10%-ный раствор. Сульфат меди, 1%-ный раствор.

Ход работы. К 2—3 мл мочи нужно прибавить приблизительно $\frac{1}{3}$ объема 10%-ного раствора гидроксида натрия и затем осторожно, по каплям, разбавленный раствор сернокислой меди. Затем жидкость в верхней ее части нагревают до начала кипения. Нагревание производится только до начала кипения, и ждут не более 1 мин появления желто-красного осадка закиси меди. Изменение цвета без осадка может быть при наличии муцина, мочевой кислоты и др.

Проба с жидкостью Фелинга

Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. Реактив Фелинга.

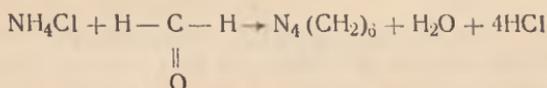
Ход работы. В пробирку наливают 1—2 мл мочи и равное количество фелинговой жидкости. Верхний слой жидкости нагревают до кипения. При наличии сахара в моче появляется желтый осадок гидрата закиси меди или красный осадок закиси меди.

Количественное определение аммиака

Аммиак — продукт дезаминирования аминокислот и нуклеотидов. Его содержание в моче зависит главным образом от характера пищи и функционального состояния печени. Аммиак ядовит. В организме он обезвреживается в печени и других тканях.

Принцип метода. При взаимодействии аммонийных солей с формальдегидом образуется соляная кислота, которая в последующем оттитровывается щелочью.

Химизм реакций. В нейтральной среде аммонийные соли распадаются с образованием гексаметилентетрамина (уротропин) и соляной кислоты:



Приборы. Колба коническая емкостью 100 мл. Пипетки на 5 мл с делениями. Бюретка. Капельница.

Реактивы. Гидроксид натрия, 0,1 н. раствор. Фенолфталеин, 1%-ный раствор. Формольная смесь (готовится перед употреблением). К 50 мл формалина прибавляют 1 мл 0,05%-ного водно-спиртового (1:1) раствора фенолфталеина и затем 0,2 н. гидроксида натрия до слабо-розового окрашивания.

Ход работы. 5 мл свежей мочи наливают в колбу, туда же вносят 1—2 капли фенолфталеина и добавляют 0,1 н. раствор щелочи, доводя содержимое колбы до слабощелочной реакции по фенолфталеину (слабо-розовая окраска). Затем в колбу добавляют 2,5 мл формольной смеси и титруют 0,1 н. едким натром до слабо-розовой окраски, не исчезающей в течение 1 мин. Учитывается количество щелочи, пошедшей на титрование.

Расчет. 1 мл 0,1 н. раствора щелочи эквивалентен 1,7 мг аммиака. Умножая количество миллилитров щелочи, использованной на титрование после добавления формольной смеси, на 1,7, получают содержание аммиака в 5 мл мочи, которое было взято для исследования.

Пример расчета. На титрование 5 мл мочи пошло 1,5 мл 0,1 н. раствора щелочи. Тогда

$$x = \frac{1,5 \cdot 1,7 \cdot 100}{5} = 51,0 \text{ мг \% аммиака.}$$

Количественное определение креатинина

Креатинин образуется из креатинфосфорной кислоты и является постоянно составной частью мочи. За сутки выделяется с мочой 1,3—2,2 г креатинина, что составляет 2,5—7,0% всего азота мочи. Количество выделенного с мочой креатинина зависит от интенсивности процессов распада белков тканей организма. Количество креатинина в моче будет меняться также и от содержания креатинина в рационе (или в результате избытка аминокислот глицина, метионина и аргинина). Креатин в моче взрослых животных не содержится. Креатинурия наблюдается лишь в тех случаях, когда идет интенсивный распад тканей. В моче молодняка содержатся как креатинин, так и креатин.

Принцип метода. В щелочной среде с пикриновой кислотой креатинин дает пикрат креатинина красного цвета.

Приборы. Фотоэлектроколориметр. Две колбочки на 50 мл. Пипетки на 1 и 2 мл с делениями.

Реактивы. Гидроксид натрия, 10%-ный раствор. Пикриновая кислота, насыщенный раствор. Стандартный раствор бихромата калия. Для его приготовления берут 24,5 г чистого, высушенного до постоянной массы при 110° С бихромата калия, помещают в мерную колбу на 1 л, растворяют и доводят дистиллированной водой до метки.

Ход работы. В одну мерную колбу на 50 мл отмеривают пипеткой 1 мл мочи, прибавляют 1,5 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты и 0,5 мл 10%-ного раствора щелочи. В другую мерную колбу на 50 мл вместо мочи добавляют 1 мл дистиллированной воды. В обеих колбах жидкость взбалтывают и оставляют стоять на 5 мин, в течение которых в опытной пробе развивается максимальная окраска. По истечении 5 мин доводят объем дистиллированной воды до метки, тщательно перемешивают. Интенсивность окраски опытной пробы определяют на ФЭКе относительно контрольной пробы (в кюветах толщиной 10 мм с зеленым светофильтром). Зная оптическую плотность опытного раст-

вора, по калибровочной кривой находят количество креатинина в 1 мл мочи и, наконец, зная суточное количество мочи, вычисляют суточное содержание креатинина.

Построение калибровочной кривой. Опытным путем найдено, что окраска стандартного раствора 0,5 н. бихромата калия соответствует окраске раствора 1 мг креатинина, содержащегося в 1 мл. Поэтому для построения калибровочной кривой вместо стандартного раствора креатинина используют стандартный раствор 0,5 н. бихромата калия, который по интенсивности окраски и цвету совпадает с пикратом креатинина. Из стандартного раствора 0,5 н. бихромата калия готовят ряд разведений, соответствующих определенному содержанию креатинина в 1 мл. Определяют их оптическую плотность и на основании результатов определения строят калибровочную кривую обычным способом.

ГЛАВА XII

МОЛОКО

Молоко — непрозрачная белая жидкость с желтоватым оттенком, сладковатого вкуса и слабого своеобразного запаха. Цвет молока в значительной степени зависит от содержания в молоке провитамина А — каротина, придающего ему желтоватый оттенок.

Плотность цельного молока несколько выше воды — 1,028—1,034, снятого — 1,032—1,036, рН коровьего молока 6,57.

Молоко состоит из молочной плазмы и жира, взвешенного в виде мельчайших шариков размером 1—5 мкм. Ниже представлен состав молока разных животных (%):

<i>Животное</i>	<i>Вода</i>	<i>Белки</i>	<i>Жиры</i>	<i>Лактоза</i>	<i>Минеральные вещества</i>
Корова	87,3	3,4	3,6	5,0	0,7
Кобыла	90,3	1,8	1,1	6,0	0,4
Ослица	90,1	1,8	1,4	6,0	0,5
Коза	87,0	3,7	4,0	4,5	0,9
Овца	84,0	5,1	6,1	4,2	1,0
Свинья	82,4	6,1	6,4	4,0	1,1
Собака	77,0	9,7	9,3	3,1	0,9
Крольчиха	70,0	15,5	10,4	1,9	2,7
Олень	65,0	14—20,0	17,0	2,8	1,5

Состав молока и количественное содержание в нем различных веществ соответствуют потребностям развития и роста тех или иных видов животных. Установлено, что чем выше в молоке концентрация белков и минеральных веществ, тем выше скорость роста новорожденных. По концентрации белков и жира в молоке ведется селекция одомашненных видов животных.

Особенную ценность имеют белки молока: казеиноген, лактоальбумин, лактоглобулины, липопротеиды, белки-ферменты и др. Важнейший белок молока — казеиноген — относится к фосфопротеидам. Фосфорная кислота связана в белке с остатками оксиаминокислот — серином и треонином. В настоящее время известно, что казеиноген — это гетерогенный комплекс, состоящий из близких по строению и биологическому значению α -

β - и γ -фракций. В молоке этот белок находится в коллоидном состоянии — в виде мицелл казеинат — кальций — фосфатного комплекса. Высокая пищевая ценность казеиногена определяется тем, что он, во-первых, представляет собой полноценный белок, т. е. в его составе имеются все незаменимые аминокислоты. Во-вторых, кальций и фосфор, входящие в его состав, находятся в нем в оптимальном соотношении и поэтому хорошо усваиваются организмом. Другие белки молока также биологически полноценны. Они не коагулируют при кипячении. Денатурация казеиногена наступает только после подкисления молока, так как его ИЭТ=4,7. Этим объясняется то, что при скисании, благодаря образованию молочной кислоты, молоко свертывается из-за выпадения в осадок казеиногена. При ферментативном свертывании молока (действии химозина, пепсина) казеиноген химически изменяется с образованием казеина. Са-соль казеина в отличие от Са-соли казеиногена нерастворима в воде.

Главная составная часть липидов молока — триглицериды. Молочные жиры отличаются разнообразием жирных кислот, особенно у жвачных животных. Жир в молоке находится в эмульгированном состоянии.

Углеводы молока на 99,9% представлены лактозой и на 0,1% — глюкозой. Лактоза (1,4-галактозидо-глюкоза) — дисахарид, специфичный для молочной железы. В организме лактоза способствует усвоению кальция, магния, фосфора и синтезу витаминов группы В.

При полноценном кормлении животных молоко богато каротином и витамином А, а также витаминами С, D, В₁, В₂, В₅, В₆. Значительно колеблется содержание витаминов, С, А, D. В молоке содержатся ферменты (амилаза, каталаза, ксантинооксидаза, дегидразы и др.); пигменты (ксантофилл, каротин, лактофлавин и др.); гормоны (пролактин, окситоцин и др.) и иммунные вещества.

Минеральные вещества молока весьма разнообразны. Молоко богато кальцием (до 140 мг%), фосфором (80—100 мг%), калием (140 мг%), но сравнительно бедно железом.

Состав молока зависит от индивидуальных особенностей животного, породы, времени года и лактационного периода, характера кормления и типа содержания. Физиологическое и патологическое состояние организма также влияет на состав и количество молока.

d 3
30/11 27Белки молока

2 Осаждение и выделение казеина

Казеиноген может быть выделен в виде казеина при действии на молоко кислотами (например, уксусной, молочной, соляной) или в виде соли путем насыщения молока нейтральными солями щелочных металлов (сульфат аммония, хлорид натрия). Казеин нерастворим в воде, но легко растворяется в растворах щелочей. После удаления из молока казеина получается молочная сыворотка, в которой содержатся лактальбумины и лактоглобулины, лактоза и минеральные соли. Жиры захватываются осадком казеина.

Приборы. Колбы или стаканы. Мерный цилиндр на 100 мл. Пипетки. Стеклянные палочки. Воронки с фильтром.

Реактивы. Уксусная кислота, 0,1%-ный раствор. Гидроксид натрия, 1%-ный раствор. Гидрокарбонат натрия, 5%-ный раствор. Молоко.

Ход работы. 25—30 мл молока разбавляют в стакане или колбе 3—4 объемами воды и к жидкости прибавляют по каплям при помешивании 0,1%-ную уксусную кислоту до прекращения выделения хлопьевидного белого осадка казеина, захватывающего с собой также и жиры. Прибавлять кислоту надо очень осторожно, так как в избытке кислоты казеин легко растворяется. Осадок отфильтровывают, тщательно промывают на фильтре 2—3 раза водой. Осадок и фильтрат вместе с промывными водами сохраняют для дальнейшей работы.

Небольшую часть осадка (казеин + жир) обрабатывают раствором гидроксида натрия или раствором гидрокарбоната натрия: казеин растворяется, жир остается во взвешенном состоянии. Жидкость фильтруют через влажный фильтр. Жир задерживается на фильтре. С фильтратом проводят реакции на белки (цветные и реакции осаждения).

1 Выделение лактоальбуминов и лактоглобулинов

Приборы. Стакан с фильтратом (из предыдущей работы). Воронки с фильтрами. Колбы на 50 мл. Штатив с пробирками.

Реактивы. Хлорид натрия, насыщенный раствор.

Ход работы. Фильтрат от первого осадка, имеющий кислую реакцию от прибавленной уксусной кислоты при осаждении казеина, смешивают с насыщенным раствором хлорида натрия (1 : 1) и кипятят. Происходит осаждение лактоальбуминов и лактоглобулинов. Содержимое фильтруют. Осадок промывают, растворяют в дистиллированной воде и с полученным раствором проводят цветные реакции на белки (биуретовая реакция, с. 137).

Определение количества казеина

Приборы. Колба на 50 мл. Стеклоанный шпатель. Водяная баня с термометром. Бюретка для титрования.

Реактивы. Салицилат натрия, 5%-ный нейтральный водный раствор. Фенолфталеин, 2%-ный раствор. Гидроксид натрия, 0,02 н. раствор.

Ход работы. Казеин, оставшийся на фильтрате (в работе «Осаждение и выделение казеина») стеклянным шпателем количественно переносят с фильтра в коническую колбу на 50 мл. Воронку с фильтром и шпатель промывают раствором салицилата натрия и добавляют в колбу 10 мл горячего (60—70° С) раствора салицилата натрия. Колбу опускают в баню с водой, нагретой до 75—80° С, и держат в ней, слегка взбалтывая, пока весь казеин не растворится. После этого раствор охлаждают, прибавляют 3 капли раствора фенолфталеина и титруют 0,02 н. раствором гидроксида натрия до появления не исчезающей в течение 1 мин розовой окраски.

По количеству израсходованной щелочи вычисляют количество казеина. При этом исходят из того, что на нейтрализацию 0,1 г чистого казеина расходуется 4,1 мл 0,02 н. раствора гидроксида натрия:

$$x = \frac{a \cdot 0,1}{4,1},$$

где x — количество казеина в исследуемом объеме молока, г; a — количество 0,02 н. раствора NaOH (мл), пошедшее на титрование.

В Денатурация белков молока солями тяжелых металлов

Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. Молоко. Ацетат свинца, 0,5%-ный раствор. Сульфат меди, 5%-ный раствор.

Ход работы. В одну пробирку налить 3—4 мл раствора ацетата свинца, в другую — столько же раствора сульфата меди. В обе пробирки добавляют по 1—2 мл молока, при этом белки выпадают в осадок. На этом свойстве основано применение молока в качестве противоядия при отравлении солями тяжелых металлов.

4. Действие химозина на казеин

При добавлении к свежему молоку химозина (сычужного фермента), выделенного из слизистой оболочки желудка теленка или овцы, молоко створаживается: казеиноген расщепляется с образованием казеина, дающего нерастворимую в воде Са-соль. Осаждение происходит в нейтральной или слабощелочной среде. Осадок казеина захватывает и жир молока. Химозин разрушается щелочью. Реакция жидкости не должна быть также кислой. Кислые жидкости предварительно нейтрализуют щелочью во избежание осаждения казеина под влиянием кислоты. Коагуляция казеина происходит только в присутствии солей кальция. Если к молоку прибавить соль, осаждающую кальций, то коагуляция не наступает. Если в раствор добавить Са-соль, то осаждение вновь наступает.

Приборы. Штатив с пробирками. Водяная баня. Термометр.

Реактивы. Химозин, нейтральный раствор. Гидрокарбонат натрия, 10%-ный раствор. Оксалат калия, 0,2%-ный раствор. Хлорид кальция, 1%-ный раствор. Молоко.

Ход работы. В пять пробирок наливают по 2—3 мл молока. В пробирку 1 добавляют несколько капель нейтрального раствора химозина, в пробирку 2 — 2—3 мл раствора гидрокарбоната натрия, а затем немного химозина, в пробирку 3 — немного раствора химозина, предварительно прокипяченного. В пробирки 4 и 5 добавляют по 5—6 капель раствора оксалата калия, взбалтывают, а затем прибавляют немного раствора химозина, также освобожденного от растворимых Са-солей прибавлением оксалата калия. Все пять пробирок помещают на 10—15 мин в водяную баню при 37—40° С. Вынимают из бани и наблюдают результаты. В пробирку 5 добавляют 1—2 капли раствора хлорида кальция. После этого наступает коагуляция казеиногена. Результаты опыта записывают в таблицу:

Субстрат	Условия действия химозина				
	1	2	3	4	5
Казеиноген молока	Ней- тральная реакция	Щелоч- ная реакция	Нейтраль- ная реакция, химозин прокипячен- ный	Оксалат калия	Оксалат калия после инкубации
Осажде- ние (+, -)					

Вывод:

Качественные реакции на молочный сахар

Лактоза содержит свободную альдегидную группу, поэтому она даст реакции восстановления металлов, реагирует с фенилгидразином, образуя озон, растворяющийся в горячей воде, а при охлаждении выпадающий в виде тонких игол желтого цвета.

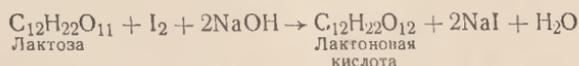
Приборы. Штатив с пробирками. Водяная баня. стакан со льдом. Микроскоп.

Реактивы. Реактив Фелинга (приготовление см. на с. 75). Смесь кристаллического хлорида фенилгидразина и безводного ацетата натрия (2 : 3).

Ход работы. Для реакций используют безбелковый фильтрат, оставшийся от предыдущего опыта после осаждения альбуминов и глобулинов. С одной частью фильтрата проводят реакцию Фелинга (см. с. 75). С другой частью — пробу с фенилгидразином и получают озон, кристаллы которого исследуют под микроскопом (см. с. 77).

Определение количества лактозы в молоке методом иодометрии

Принцип метода заключается в том, что альдегидная группа лактозы способна в щелочной среде окисляться озондом:



Приборы. Колбы на 50 и 100 мл. Пипетки на 5, 10 и 20 мл. Воронки с фильтрами. Бюретки.

Реактивы. Молоко. Сульфат меди, 7%-ный раствор. Гидроксид натрия, 2%-ный раствор. Фторид натрия, 5%-ный раствор. Соляная кислота, 5%-ный раствор. Тиосульфат натрия, 0,1 н. раствор. Крахмал, 5%-ный раствор. Иод, 0,1 н. раствор.

Ход работы. В две колбы на 50 мл наливают по 5 мл раствора сульфата меди, по 5 мл раствора гидроксида натрия и по 2,5 мл раствора фторида натрия. Затем в одну колбу (опыт) прибавляют 5 мл молока, а в другую (контроль) — 5 мл дистиллированной воды. Содержимое колб перемешивают и через 30 мин фильтруют.

20 мл фильтрата отмеривают пипеткой в колбу на 100 мл, прибавляют 20 мл раствора иода и при непрерывном перемешивании — 10 мл раствора гидроксида натрия. Обе колбы закрывают пробками.

Через 20 мин добавляют по 10 мл раствора соляной кислоты, 5 капель крахмала и титруют из бюретки раствором тиосульфата натрия до обесцвечивания раствора. 1 мл 0,1 н. раствора тиосульфата натрия соответствует 18,01 мг лактозы.

Расчет:

$$x = \frac{(a - b) \cdot K \cdot 18,01 \cdot 50 \cdot 100}{20 \cdot 5}$$

где x — количество лактозы в 100 мл молока, мг%; a — объем раствора тиосульфата натрия (мл), пошедший на титрование контроля; b — объем раствора тиосульфата натрия (мл), пошедший на титрование опытной пробы; K — коэффициент поправки на титр 0,1 н. раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

Среднее количество лактозы в цельном коровьем молоке равняется 4,6%.

Количественное определение витамина С в молоке

Принцип метода основан на титровании пробы в кислой среде раствором натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола без предварительного осаждения белков.

Приборы. Колбы на 50—100 мл. Пипетки. Бюретка.

Реактивы. Соляная кислота, 2%-ный раствор. 2,6-дихлорфенолиндофенол, 0,001 н. раствор (приготовление см. на с. 216). Молоко.

Ход работы. К 10 мл молока добавляют тройной объем дистиллированной воды (к молозиву — шесть объемов воды); наливают 1 мл раствора соляной кислоты в

коническую колбу на 50—100 мл и вносят пипеткой 5 мл разведенного молока, затем доводят дистиллированной водой до 15 мл. Далее, взбалтывая содержимое колбы, титруют раствором 2, 6-дихлорфенолиндофенола до появления слабо-розового окрашивания. Для контрольного опыта берут раствор соляной кислоты и воды (вместо молока) в тех же количествах, что и в опытной пробе. Количество краски, пошедшей на титрование контроля, вычитают из количества краски, которое пошло на титрование опытной пробы.

Расчет:

$$x = \frac{b \cdot K \cdot C \cdot 0,088 \cdot 100}{5}$$

где x — количество витамина С в молоке, мг%; b — количество краски (мл), пошедшее на титрование опытной пробы за вычетом поправки на контрольный опыт; K — поправка на титр краски; C — число, выражающее степень разведения молока; 0,088 — число аскорбиновой кислоты (мг), соответствующее 1 мл затраченного на титрование 0,001 н. раствора натриевой соли 2, 6-дихлорфенолиндофенола; 5 — количество молока, взятое для титрования, мл; 100 — пересчет, мг%.

Ферменты молока

В молоке содержится большое число ферментов. Они попадают в него из молочной железы и из микрофлоры молока. В молоке различных животных имеются гидролазы (амилаза, липаза, фосфатаза, лактаза и др.), оксидоредуктазы (анаэробные дегидрогеназы, оксидазы, пероксидаза, каталаза и другие ферменты).

5 Качественная реакция на пероксидазу

Действие пероксидазы состоит в переносе кислорода перекиси водорода на окисляемое вещество. Пероксидаза разлагает перекись водорода с высвобождением атомарного кислорода: $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}$.

Молочнокислые бактерии пероксидазы не выделяют. Таким образом, пероксидаза молока принадлежит к ферментам, количество которых не зависит от бактерий. Инактивирование пероксидазы при нагревании молока

около 80° С позволяет применять эту пробу для доказательства пастеризации молока.

Приборы. Штатив с пробирками. Водяная баня. Термометр.

Реактивы. Гваяковая смола, 3%-ный водный раствор. Перекись водорода, 2%-ный раствор. Молоко.

Ход работы. В две пробирки наливают по 0,5 мл раствора гваяковой смолы, по 0,5 мл раствора перекиси водорода и по 2—3 мл молока, причем в одну пробирку прибавляется свежее молоко, в другую — хорошо прокипяченное. Перемешивают и ставят на баню, нагретую до 40° С. Сравнивают результат реакции в первой и второй пробирках и делают вывод. В случае свежего молока и неразрушенной пероксидазы появляется синее окрашивание (продукты окисления атомарным кислородом гваяковой смолы).

Реакция на альдегиддегидрогеназу

Альдегиддегидрогеназу обнаруживают по обесцвечиванию метиленовой сини, раствор которой прибавляют в молоко. При наличии в нем указанного фермента происходит восстановление метиленовой сини до бесцветной лейкоформы:



Альдегиддегидрогеназа в очень небольшом количестве попадает в молоко из молочной железы. В основном она накапливается в нем при размножении микрофлоры, поэтому парное молоко слабо восстанавливает метиленовую синь. Восстанавливающая способность молока возрастает при хранении.

Приборы. Штатив с пробирками. Водяная баня. Термометр.
Реактивы. Формальдегид, 0,5%-ный раствор. Метиленовая синь, 0,001%-ный водный раствор. Молоко.

Ход работы. В одну пробирку наливают 2—3 мл кипяченого молока (контроль), в другую — столько же свежего молока (опытная проба). В обе пробирки прибавляют по 1 мл раствора формальдегида и по 1 мл раствора метиленовой сини, ставят в водяную баню, нагретую до 70° С, и следят за ходом реакции. В пробирке со свежим молоком происходит обесцвечивание смеси, в пробирке с прокипяченным молоком смесь не обесцвечивается вследствие разрушения фермента при кипячении.

Можно прибавлять уже готовый реактив смеси формалина и метиленовой сини, который называется реактивом Шардингера (приготовление: 5 мл формалина + 5 мл насыщенного спиртового раствора метиленовой сини + 190 мл воды).

6. Каталаза и каталазное число

Каталаза способствует разложению перекиси водорода на воду и молекулярный кислород: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$.

Наличие каталазы можно установить по выделению кислорода при добавлении в молоко перекиси водорода. При количественных исследованиях (каталазное число) выделяющийся газ собирают под водой в мерные трубки (каталазники) и отсчитывают количество кислорода в миллилитрах. Выделение газа в каталазниках из свежего коровьего молока (из 15 мл) достигает 1,5—3 мл, в среднем 2,5 мл. Молозиво и молоко от коров первого отела имеют высокое каталазное число (8—15 мл), а от старых коров каталазное число молозива и молока ниже (5—6 мл). Высокое каталазное число имеет молоко, полученное от больных животных (маститы и другие заболевания).

Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы. Молоко. Перекись водорода, 1%-ный раствор.

Ход работы. В одну пробирку берут 2—3 мл молока, добавляют столько же раствора перекиси водорода. Под влиянием каталазы происходит выделение пузырьков кислорода. Параллельно проводят пробу с кипяченым молоком. Реакция не идет, так как фермент в кипяченом молоке денатурирован действием высокой температуры.

8

Комплексонометрическое определение количества кальция

Из общего количества минеральных веществ молока до 20% падает на долю кальция. Количество кальция в молоке различных животных зависит от вида животных, типа кормления, сезона года и других факторов.

Среднее содержание кальция в молоке сельскохозяйственных животных составляет у коровы 140 мг%; козы 142; лошади 83 мг%.

Принцип комплексонометрического определения кальция см. на с. 240.

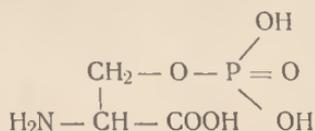
Приборы и реактивы см. на с. 240. Молоко.

Ход работы. В колбу отмерить 2 мл молока (опыт), в другую такую же колбу — 2 мл дистиллированной воды (контроль). Дальнейшие исследования и расчет проводят так же, как и при определении кальция в сыворотке крови (см. с. 241).

9

Определение количества фосфора

Фосфор входит в состав казеиногена молока, связываясь главным образом с остатками серина в его молекуле в виде серинфосфорной кислоты:



Фосфор играет важную роль в обмене веществ и формировании скелета. Единственный источник этого элемента у молодых животных (сосунов) — фосфор молока.

Среднее содержание фосфора в молоке животных составляет у коровы 80 мг%; козы 110; лошади 54 мг%.

Фосфор молока определяется по общепринятой методике, принцип которой изложен выше (см. с. 242). Приборы и реактивы см. там же.

Ход работы. В колбу Кьельдаля вносят 0,5 мл молока и 2 мл концентрированной серной кислоты (опыт). Во вторую колбу — 0,5 мл воды и 2 мл серной кислоты (контроль). Колбы ставят на горячую песочную баню. При

кипячении раствор темнеет, а затем начинают выделяться белые тяжелые пары серной кислоты. В это время колбы накрывают насадками, дальнейшая минерализация проводится обычным путем.

Прозрачный бесцветный фильтрат из каждой колбы количественно переносят в мерные колбы на 100 мл, объем доводят водой до метки. 5 мл раствора переносят в другую мерную колбу на 50 мл. Аналогичным образом поступают и с контролем. В обе колбы добавляют по 1 мл раствора молибдата аммония и 1 мл раствора аскорбиновой кислоты. Объем содержимого колб доводят до метки водой, перемешивают и спустя 15 мин колориметрируют на ФЭКе с красным светофильтром. Количество фосфора, соответствующее опытной и контрольной пробам, находят на основании экстинкции по стандартной кривой. Из опытной пробы вычитают контроль.

Расчет:

$$x = \frac{a \cdot 100}{c},$$

где x — количество фосфора, мг%; a — количество фосфора, найденное по стандартной кривой как разница между опытной и контрольной пробам; c — навеска; в нашем опыте это количество молока (мл), взятого для исследования = 0,05 мл. (Для исследования брали 0,5 мл молока. После минерализации объем раствора доводили до 50 мл. В 1 мл разведенного молока фактическая навеска составляла 0,01 мл. Количество молока в 5 мл, взятого для исследования, составляло 0,05 мл.)

1. Определение кислотности молока

Определение титруемой кислотности молока имеет большое практическое значение для оценки его свежести. Свежее молоко связывает небольшое количество щелочи. Это зависит от наличия в нем белков и однозамещенных фосфатов, обладающих слабокислыми свойствами.

В молоке при его хранении происходит молочнокислое брожение, и в результате накапливается молочная кислота. Кислотность молока выражают в градусах. Под 1 градусом подразумевается количество миллилитров 0,1 н. раствора щелочи, идущее на нейтрализацию 100 мл

исследуемого молока. Свежее молоко коровы имеет 15—18°, стоявшее — 20—22°, несвернувшееся, но свертывающееся при кипячении — 24—27°.

Приборы. Колба на 50—100 мл. Пипетки. Бюретки.

Реактивы. Гидроксид натрия, 0,1 н. раствор. Фенолфталеин, 0,1%-ный спиртовой раствор.

Ход работы. В колбу вносят 10 мл исследуемого молока, добавляют 20 мл дистиллированной воды и 2—3 капли фенолфталеина. Содержимое колбы тщательно перемешивают и титруют из бюретки 0,1 н. раствором гидроксида натрия до появления не исчезающего в течение 1 мин слабо-розового окрашивания.

Расчет: количество израсходованной на титрование щелочи умножают на 10 (пересчет на 100 мл). Это и будет кислотность молока в градусах.

МЫШЦЫ

На долю мышечной ткани, состоящей из поперечно-полосатой скелетной и гладкой мускулатуры, приходится более 40% всей массы тела животного. Мышцы обеспечивают выполнение чрезвычайно важных в физиологическом отношении функций, например кровообращения, дыхания, поддержания тонуса сосудов, выделение экскретов, перемещение тела в пространстве и др.

Морфологической структурной единицей скелетной мышцы является мышечное волокно. Оно представляет собой многоядерную клетку толщиной 10—1000 мкм и длиной до 12 см, окруженную довольно толстой мембраной — сарколеммой. Основную часть мышечного волокна занимают миофибриллы — сократительные элементы волокна диаметром около 1 мкм. Миофибриллы, а также ядра, митохондрии, рибосомы, саркоплазматическая сеть и другие субклеточные структуры, входящие в состав волокна, окружены жидкой цитоплазмой — саркоплазмой.

Мышечные волокна, объединяясь в пучки разных размеров, образуют отдельные мускулы.

В мышечной ткани животных содержится от 72 до 80% воды и 20—28% сухого остатка. В состав сухого остатка входят белки (около 85%), различные азотистые и безазотистые экстрактивные вещества, липиды и минеральные соли.

Важнейшей составной частью мышечной ткани являются белки, которые подразделяются на саркоплазматические, миофибриллярные и белки стромы (склеропротеины).

Основную массу саркоплазматических белков составляют миоген и глобулин X, которые представляют собой неоднородные белковые фракции. Белки миогеновой фракции входят в состав ферментов гликолиза (альдолаза), а глобулин X играет важную роль в качестве поставщика различных аминокислот, используемых для синтеза контрольных и других мышечных белков. К числу саркоплазматических белков также относятся миоальбумин, близкий по своим свойствам к альбумину сыворотки крови, миоглобин, способный, подобно гемоглобину,

связывать и отдавать кислород и нуклеопротеиды, входящие в состав рибосом и ядер. На долю белков саркоплазмы приходится около 40% всех белков мышцы. Часть саркоплазматических белков может быть извлечена из измельченных мышц водой, часть — 0,1 М раствором хлорида калия или натрия.

В группу миофибриллярных белков, обеспечивающих сокращение мышц, входят миозин, актин и тропомиозин. Белки этой группы в отличие от белков саркоплазмы извлекаются из мышц более крепкими солевыми растворами (0,6 М раствор хлорида калия) и составляют 50% всех белков мышцы.

Миозин обладает способностью расщеплять АТФ, действуя как АТФ-аза. АТФ-азная активность чистого миозина стимулируется ионами кальция. Он легко соединяется с актином и образует сократительный комплекс — актомиозин. Сокращение актомиозина происходит за счет химической энергии, освобождающейся при расщеплении АТФ на АДФ и неорганический фосфат под действием миозина в присутствии ионов магния.

Белки стромы или опорные белки (склеропротейны), составляющие около 10% всех белков мышцы, нерастворимы в воде и солевых растворах. Группа этих белков представлена в основном коллагеном и эластином. В их составе выявлены активные системы ферментов, создающие условия для передачи нервного импульса и образования мембранного потенциала (ацетилхолинэстераза, транспортная Na, K-активируемая АТФ-аза, АМФ-аминогидролаза и др.).

Следует подчеркнуть, что в мышечной ткани содержатся самые разнообразные ферменты, в частности катепсины, липаза, весь комплекс гликолитических и окислительно-восстановительных ферментов.

При экстракции из измельченных мышц легко переходят в водный раствор различные вещества небелковой природы.

В состав важнейших небелковых азотистых экстрактивных веществ мышц входят нуклеотиды адениловой (АТФ, АДФ, АМФ) и неадениловой (ГТФ, ГДФ, УТФ, УДФ, ЦТФ, ЦДФ) систем, креатинфосфат, креатин, креатинин, карнозин, ансерин, мочевины, мочевая кислота, холин, глутатион, свободные аминокислоты и другие соединения. Азот экстрактивных веществ составляет около 10% общего азота мышечной ткани.

К числу важнейших безазотистых веществ мышц относят гликоген, молочная, пировиноградная и янтарная кислоты, инозит, глюкоза, фосфорные эфиры гексоз и триоз. В мышцах также присутствуют в различном количестве нейтральные жиры, фосфолипиды, стеролы и стериды.

Минеральные вещества составляют 1—1,5% от массы мышцы. К ним относят необходимые для жизни животных макроэлементы — кальций, магний, фосфор, калий, натрий, хлор, сера и микроэлементы — железо, марганец, кобальт, медь, никель, цинк, иод и др.

Подготовка мышц к исследованию

Свежую мышцу освобождают от жира, соединительной ткани и тщательно измельчают на часовом стекле ножницами или на мясорубке.

Выделение белков мышечной ткани

Белки мышц можно разделить на ряд фракций с помощью последовательной экстракции водой, солевыми и щелочными растворами.

Выделение альбуминовой фракции

Приборы. Шутель-аппарат. Стаканы химические. Ножницы. Воронка. Пробирки стеклянные химические. Пипетки на 2 мл. Марля.

Реактивы. Гидроксид натрия, 10%-ный раствор. Сульфат меди, 1%-ный раствор. Сульфат аммония, кристаллический. Трихлоруксусная кислота, 6%-ный раствор.

Ход работы. 8—10 г измельченной мышцы помещают в химический стакан, заливают тройным объемом дистиллированной воды и экстрагируют, взбалтывая на шутель-аппарате в течение 20 мин. Вытяжку отделяют фильтрованием через три слоя марли в другой химический стакан, а оставшуюся мышечную кашу сохраняют для последующей солевой экстракции. В водный экстракт переходят белки саркоплазмы — миоген, миоальбумин и миоглобин, с которыми проводят следующие реакции.

В четыре пробирки наливают по 2 мл полученного экстракта. Для определения белка в экстракте в первой пробирке проводят биуретовую реакцию (см. с. 138). Во вторую пробирку добавляют порошок сульфата аммония

до насыщения, при этом выпадает осадок альбуминов. В других пробирках проводят реакции на осаждение белков солями тяжелых металлов и органическими кислотами (см. с. 130, 132).

Выделение глобулиновой фракции

Приборы. Шутель-аппарат. Стаканы химические. Воронки. Штатив с пробирками. Пипетки на 2 мл. Марля.

Реактивы. Сульфат аммония, насыщенный раствор. Хлорид аммония, 10%-ный раствор. Гидроксид натрия, 10%-ный раствор. Сульфат меди, 1%-ный раствор.

Ход работы. Остаток мышечной кашицы после экстракции водой помещают в стаканчик, заливают двойным объемом 10%-ного раствора хлорида аммония и экстрагируют при встряхивании в течение 30 мин.

Солевой экстракт отфильтровывают через три слоя марли. Остаток мышечной ткани на фильтре сохраняют для дальнейшего исследования. В солевой экстракт переходят белки глобулиновой фракции — миозин и актомиозин, которые определяют с помощью следующих реакций.

В три пробирки наливают по 2 мл полученного солевого экстракта мышц. В первой пробирке наличие белка устанавливают с помощью биуретовой реакции (см. с. 138). Во вторую пробирку добавляют равный объем насыщенного раствора сульфата аммония, при этом наблюдают выпадение осадка миозина и актомиозина. К экстракту в третьей пробирке добавляют дистиллированную воду до появления осадка нерастворимых в воде миозина и актомиозина.

Выделение склеропротеинов

Приборы. Горелка газовая. Стаканы химические. Штатив с пробирками. Воронки. Марля.

Реактивы. Гидроксид натрия, 10%-ный раствор. Сульфат меди, 1%-ный раствор. Трихлоруксусная кислота, 6%-ный раствор.

Ход работы. В остатке мышечной ткани после экстракции водными и солевыми растворами содержатся склеропротеины (коллаген и эластин).

Остаток мышечной ткани помещают в химический стакан, заливают тройным объемом воды и кипятят в течение 30 мин, сохраняя объем жидкости в стакане периодическим добавлением горячей воды. При кипячении колла-

ген, подвергаясь неглубокому гидролизу, превращается в растворимую в воде желатину.

Горячий раствор отфильтровывают в пробирку и в фильтрате открывают желатину с помощью биуретовой реакции, осаждения солями тяжелых металлов и других реакций (см. с. 130). Желатина не дает положительной реакции на триптофан и тирозин.

На фильтре остаются тонкие волокна и пленки эластина.

Определение гликогена

Основным резервом углеводов в мышечной ткани является гликоген, количество которого колеблется в широких пределах — от 0,5 до 2% и зависит от упитанности, функционального состояния и степени тренированности организма. По количеству этого полисахарида в мышцах можно, в известной степени, судить о работоспособности и энергетических ресурсах живого организма. Концентрация гликогена значительно понижается при скудном кормлении и высокому напряжению метаболических процессов в тканях, обусловленных интенсивной лактацией, яйцекладкой или физической работой.

Принцип метода. Гликоген из десмолизата мышечной ткани осаждают этиловым спиртом, гидролизуют соляной кислотой до глюкозы и по количеству последней вычисляют его содержание.

Приборы. Центрифуга. Весы торсионные. Штатив с центрифужными пробирками. Пробирки сахарные с меткой на 20 мл. Водяная баня. Пипетки градуированные на 2 и 5 мл. Палочки стеклянные.

Реактивы. Мышца свежая. Гидроксид калия, 5%-ный и 60%-ный раствор. Этиловый спирт, 96%-ный. Соляная кислота, 2 н. раствор. Уксусная кислота, 3%-ный раствор. Гексациано-(III)-феррат калия, 0,005 н. раствор (приготовление: 1,65 г гексациано-(III)-феррата калия и 10,6 г безводного карбоната натрия растворяют в 1 л дистиллированной воды). Тройной раствор сульфата цинка, хлорида натрия и иодида калия (приготовление: 50 г сульфата цинка, 250 г хлорида натрия и 25 г иодида калия растворяют в 1 л дистиллированной воды). Тиосульфат натрия, 0,005 н. раствор. Крахмал, 1%-ный раствор.

Ход работы. Отвешивают 1 г мышцы, опускают в центрифужную пробирку и заливают 1 мл 60%-ного раствора гидроксида калия. Содержимое пробирки, при периодическом перемешивании, гидролизуют в кипящей водяной бане в течение 2 ч. За это время белки гидролизуются и гликоген, связанный с ними, освобождается.

После полного растворения ткани пробирку вынимают из водяной бани, добавляют 2 мл дистиллированной воды, 6 мл 96%-ного этилового спирта и через 1 ч центрифугируют в течение 30 мин при 2500 об/мин. Надосадочную жидкость сливают.

Осадок гликогена растворяют в 2 мл горячей дистиллированной воды, добавляют 0,5 мл 60%-ного раствора гидроксида калия, 6 мл 96%-ного этилового спирта и через 1 ч вновь центрифугируют при тех же условиях, что и в первом случае. Если осадок имеет загрязненный вид, переосаждение гликогена спиртом повторяют.

Очищенный осадок гликогена растворяют в 5 мл горячей дистиллированной воды и переносят в пробирку с сахаром с меткой на 20 мл. Пробирку, после добавления в нее 5 мл 2 н. соляной кислоты, закрывают пробкой с обратным холодильником и ставят в кипящую водяную баню на 3 ч. За это время происходит гидролиз гликогена до глюкозы.

Параллельно готовят контрольную пробу: в пробирку с сахаром с меткой на 20 мл наливают 5 мл воды и 5 мл 2 н. соляной кислоты.

Охлажденные опытную и контрольную пробы нейтрализуют при наличии фенолфталеина 5%-ным раствором гидроксида калия и доводят их объем водой до метки.

Для дальнейшего определения в пробирки, содержащие сахар, берут по 5 мл опытного раствора и контроля, добавляют по 2 мл 0,005 н. щелочного раствора гексацано-(III)-феррата калия и помещают их в кипящую водяную баню на 15 мин. В охлажденные пробирки добавляют по 3 мл смеси растворов сульфата цинка, хлорида натрия и иодида калия, по 2 мл 3%-ной уксусной кислоты и по 2 капли крахмала. Пробы оттитровывают 0,005 н. раствором тиосульфата натрия до исчезновения синего окрашивания.

Концентрацию гликогена (x , мг%) в мышечной ткани рассчитывают с помощью таблицы Хаггедорна — Иенсена (см. с. 95) по формуле

$$x = \frac{(a - b) \cdot 20 \cdot 0,9 \cdot 100}{5 \cdot c},$$

где a — количество глюкозы в опытной пробирке, мг;
 b — количество глюкозы в контрольной пробирке, мг;
20 — общий объем гидролизата, мл; 0,9 — коэффициент

Принцип метода. Метод основан на измерении прироста неорганического фосфора, отщепившегося от креатинфосфата в кислой среде через 30 мин при 37° С. Освобождающийся фосфор определяют обычными методами (см. с. 153).

Приборы. Термостат на 37° С. Фотоэлектроколориметр. Центрифуга. Торзионные весы. Пижницы. Пинцет. Штатив с центрифужными пробирками. Пробирки на 10 мл. Пипетки с делениями на 2 и 5 мл. Ступка фарфоровая с пестиком. Песок кварцевый. Стаканы химические для льда. Стеклянные палочки. Воронки. Бумага фильтровальная.

Реактивы. Трихлоруксусная кислота, 6%-ный раствор. Магнезиальная смесь (приготовление: 100 г хлорида магния, 200 г хлорида аммония и 20 мл концентрированного раствора аммиака растворяют в 1 л воды). Аммиак, 10%-ный раствор. Фенолфталеин, 0,1%-ный раствор. Молибдат аммония (приготовление см. на с. 153). Аскорбиновая кислота, 0,4%-ный раствор (свежеприготовленный). Соляная кислота, 2 н. раствор. Жидкий азот. Лед.

Ход работы. Определение креатинфосфата и других лабильных фосфорных соединений проводят при температуре 0—4° С, склянки с растворами и посуда во время анализов погружаются в лед.

После обескровливания животного немедленно извлекают кусочек мышечной ткани массой до 2 г и замораживают в азоте. При отсутствии азота ткань помещают в рефрижератор холодильника, регулятор которого на 20—30 мин до начала опыта ставится на максимальный холод, и через 15—20 мин используют для исследований.

Навеску ткани до 400 мг быстро растирают в предварительно охлажденной фарфоровой ступке с кварцевым песком и к полученному гомогену приливают 20 мл 6%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Гомогенат перемешивают и спустя 5 мин небольшое количество его фильтруют в пробирку. В фильтрате определяют неорганический фосфор и креатинфосфат. Оставшуюся часть гомогената используют для определения АТФ (см. с. 294).

В центрифужные пробирки (опытную и контрольную) заранее наливают по 2 мл магнезиальной смеси и опускают их в ледяную смесь.

В опытную пробирку переносят 2 мл прозрачного фильтрата, в контрольную — 2 мл 6%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. В обе пробирки добавляют 1—2 капли фенолфталеина и содержимое их нейтрализуют 10%-ным раствором аммиака до слабо-розового окрашивания. С целью ускорения осаждения неорганического

фосфора раствор в опытной пробирке тщательно перемешивают, потирая по ее стенкам стеклянной палочкой (создание центров кристаллизации).

Спустя 10 мин пробирки центрифугируют в течение 7 мин при 5000 об/мин. Надосадочную жидкость отсасывают пипеткой в пробирку с меткой 10 мл и используют для определения креатинфосфата. Для этого в пробирки добавляют по 2 мл молибдата аммония, по 1 мл 0,4%-ного раствора аскорбиновой кислоты и объем доводят водой до метки 10 мл. Раствор в пробирках перемешивают, помещают в термостат и через 30 мин колориметрируют на фотоэлектроколориметре с красным светофильтром в кювете с рабочей длиной 10 мм.

Осадок неорганического фосфора растворяют в 2 мл 2 н. раствора соляной кислоты и переносят в опытную пробирку с меткой 10 мл. В контрольную пробирку наливают 2 мл воды. В пробирки добавляют по 1 мл молибдата аммония, по 1 мл 0,4%-ного раствора аскорбиновой кислоты и доводят объем водой до метки. Содержимое пробирок перемешивают и через 15 мин интенсивность окраски опытной пробы измеряют на фотоэлектроколориметре с красным светофильтром. Фотометрирование проводят относительно контрольной пробы.

Концентрацию креатинфосфата (x , мг%) в мышцах рассчитывают по формуле

$$x = \frac{a \cdot 20 \cdot 100}{2 \cdot c},$$

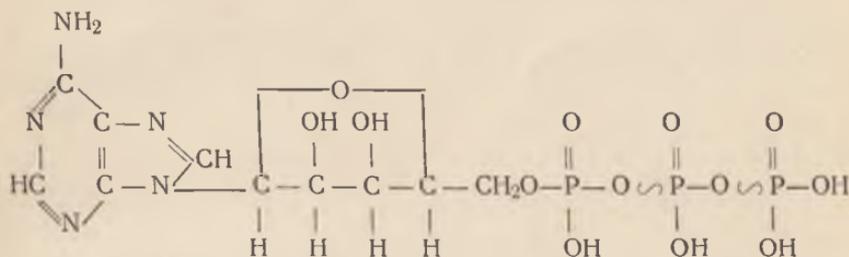
где a — концентрация фосфора в опытной пробирке, найденная по стандартной кривой, мг; 20 — объем гомогената ткани, мл; 100 — коэффициент перевода в проценты; 2 — объем фильтрата, взятого для определения, мл; c — навеска мышечной ткани, мг.

Концентрацию креатинфосфата определяют с помощью стандартной кривой. Для ее построения в серию пробирок с меткой 10 мл вносят стандартные растворы фосфора разной концентрации от 2,5 до 75 мкг, с которыми проводят цветную реакцию на фосфор и колориметрирование аналогично опытным пробам. Данные оптической плотности стандартных растворов фосфора используют для построения стандартной кривой.

Так же рассчитывают концентрацию неорганического фосфора в мышечной ткани.

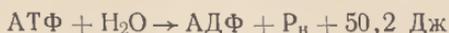
Определение аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ)

АТФ занимает центральное место в обмене веществ и энергии живого организма. Значение АТФ заключается прежде всего в функции переноса химической энергии между реакциями, сопровождающихся выделением энергии, и процессами, идущими с ее потреблением. В пирофосфатных макроэргических связях этого соединения накапливается около 50% энергии, образующейся в ходе биологического окисления различных веществ:



Аденозинтрифосфорная кислота

При гидролизе АТФ распадается на аденозиндифосфат, неорганический фосфат и энергию:



Свободная энергия затем может трансформироваться в механическую, электрическую, тепловую и другие виды энергии.

АТФ служит одним из основных поставщиков энергии для различных физиологических процессов (сокращение мышц, передача нервного импульса, секреция желез, всасывание метаболитов в тонком кишечнике) и реакций анаболизма (синтез белков, нуклеиновых кислот, углеводов, липидов, гормонов и др.).

В клетке основная масса АТФ (около 95%) регенерируется за счет реакций окислительного фосфорилирования в дыхательной цепи и сравнительно небольшая ее часть — за счет реакций субстратного фосфорилирования (анаэробный гликолиз, фосфорилирование АТФ за счет креатинфосфата).

Концентрация АТФ в мышцах составляет 30—45 мг% и при различных функциональных состояниях организма может изменяться в широких пределах. Так, уровень АТФ значительно понижается при мышечном переутомлении, инфекционных заболеваниях и голодании.

Принцип метода. АТФ выделяют из безбелкового фильтрата в виде ртутной соли, гидролизуют в кислой среде в течение 7 мин и по количеству отщепившегося неорганического фосфора судят о наличии в испытуемом объекте этого соединения.

Приборы. Фотоэлектроколориметр. Центрифуга. Водяная баня. Фарфоровая ступка. Кварцевый песок. Торзионные весы. Штатив с пробирками. Пробирки центрифужные на 10 мл. Пипетки на 1, 2 и 5 мл с делениями. Стаканы для льда. Воронки. Бумага фильтровальная. Стеклянные палочки.

Реактивы. Мышца свежая (получение см. на с. 291). Уксуснокислая ртуть, 0,5% - и 20%-ный растворы в 2%-ной уксусной кислоте. Соляная кислота, 1 н. раствор. Молибдат аммония (приготовление см. на с. 153). Аскорбиновая кислота, 0,4%-ный раствор (свежеприготовленный). Аммиак, 10%-ный раствор. Фенолфталеин, 0,1%-ный раствор.

Ход работы. Навеску ткани до 400 мг гомогенизируют в ступке с кварцевым песком. К полученному гомогенату добавляют 20 мл 6%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, хорошо перемешивают и через 15 мин фильтруют.

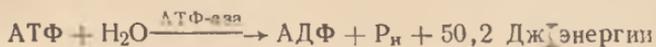
В центрифужную пробирку с меткой 10 мл берут 2 мл фильтрата, добавляют 0,5 мл 20%-ного раствора ацетата ртути и хорошо перемешивают. Пробирку помещают в ледяную смесь и через 20 мин центрифугируют в течение 10 мин при 2500—3000 об/мин. Центрифугат сливают, а осадок промывают 1 мл 0,5%-ного раствора ацетата ртути и вновь центрифугируют. Полученный осадок растворяют в 1 мл 1 н. раствора соляной кислоты и нагревают на кипящей водяной бане в течение 7 мин. Пробу охлаждают, добавляют одну каплю фенолфталеина и нейтрализуют 10%-ным раствором аммиака до едва заметного розового окрашивания.

В пробирку добавляют 2,5 мл раствора молибдата аммония, 1 мл 0,4%-ного раствора аскорбиновой кислоты, доливают водой до метки и перемешивают. Через 20 мин определяют интенсивность окраски опытной пробы относительно контроля (вода) с помощью фотоэлектроколориметра (светофильтр красный).

Концентрацию легкогидролизуемого фосфора АТФ рассчитывают так же, как и концентрацию креатинфосфата (расчет и построение стандартной кривой см. на с. 292).

Определение активности аденозинтрифосфатазы (Mg²⁺-АТФ-азы)

АТФ-аза катализирует гидролитическое расщепление АТФ, которое происходит в клетках с освобождением энергии:



Уровень активности фермента служит показателем интенсивности использования тканями АТФ.

Принцип метода. Показателем активности фермента является прирост неорганического фосфата, отщепляемого от АТФ под действием АТФ-азы.

Приборы. Гомогенизатор. Весы торсионные. Ножницы. Пробирки с меткой 5 мл. Пробирки с меткой 10 мл. Штатив с пробирками. Пипетки на 1 и 2 мл с делениями. Воронки. Фильтры бумажные. Термостат (37° С). Фотоэлектроколориметр.

Реактивы. Мышца свежая. Сахароза, 0,25 М раствор. Трихлоруксусная кислота, 20%-ный раствор. Сульфат магния, 0,05 М раствор. АТФ, 0,02 М раствор (приготовление: в 10 мл воды растворяют 0,1102 г АТФ-На с молекулярной массой 551,16). Гидроксид натрия, 0,1 н. раствор. Глицин, 0,1 н. раствор. Буферная смесь, рН 7,4 (приготовление: 0,1 н. раствор глицина подщелачивают до рН 7,4 0,1 н. раствором гидроксида натрия по индикаторной бумаге). Серная кислота, 5 н. раствор. Молибдат аммония, 2,5%-ный раствор на 5 н. серной кислоте. Аскорбиновая кислота, 0,4%-ный раствор (свежеприготовленный).

Ход работы. 100 мг мышечной ткани измельчают ножницами и гомогенизируют с 5 мл 0,25 М раствора сахарозы. В две пробирки с меткой 5 мл (опытную и контрольную) переносят по 2 мл полученного гомогената. В контрольную пробирку тотчас приливают 1 мл 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. В обе пробирки добавляют по 1 мл буферной смеси, по 1 капле раствора сернокислого магния, по 0,25 мл раствора АТФ и помещают их на 30 мин в термостат при 37° С. После инкубации в опытную пробирку для остановки реакции сразу же добавляют 1 мл 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Объем жидкости в пробирках доводят до метки, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр в другие пробирки. Для цветной реакции в пробирки с меткой 10 мл переносят по 1 мл фильтрата, добавляют по 2 мл молибдата аммония и по 1 мл 0,4% раствора аскорбиновой кислоты. Объем проб доводят водой до метки, перемешивают и через 30 мин определяют интенсивность

развившейся окраски на фотоэлектроколориметре с красным светофильтром.

Активность АТФ-азы выражают количеством микромолей АТФ, способным расщепить за 1 мин фермент, содержащийся в 1 г ткани.

Расчет активности АТФ-азы (E) ведут по формуле (мкмоль Р/г/мин)

$$E = \frac{(a - b) \cdot 5}{0,031 \cdot c \cdot 30},$$

где a — концентрация фосфора в опытной пробирке, найденная по стандартной кривой, мг; b — концентрация фосфора в контрольной пробирке, найденная по стандартной кривой, мг; 0,031 — количество Р (мг), отщепляемого от одного мкмоль АТФ под действием АТФ-азы; 5 — объем фильтрата, мл; c — навеска ткани, г; время инкубации 30 мин.

Концентрацию фосфора в опытной и контрольных пробах определяют по стандартной кривой. Для ее построения в пробирки с меткой 10 мл вносят соответственно 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 мл стандартного раствора, содержащего 0,025 мг фосфора в 1 мл, проводят цветную реакцию на фосфор и через 30 мин измеряют интенсивность окраски на фотоэлектроколориметре. Полученные данные оптической плотности растворов, содержащих разное количество фосфора, используют для построения стандартной кривой.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	3
<i>Глава I. Физическая химия</i>	<i>5</i>
Молекулярно-кинетические свойства разбавленных растворов	5
Диффузия	5
Влияние температуры на скорость диффузии	5
Осмоз и осмотическое давление	6
Обнаружение осмотического давления растворов	7
Искусственные полупроницаемые мембраны	8
Влияние растворов с разным осмотическим давлением на эритроциты и растительные клетки	9
Определение осмотической резистентности эритроцитов (ОРЭ)	10
Определение осмотического давления растворов неэлектролитов криоскопическим методом	12
Константа равновесия обратимых реакций	18
Электролитическая диссоциация	19
Электролитическая диссоциация солей	20
Физиологическое действие ионов	21
Определение общей кислотности растворов	22
Определение активной кислотности раствора (рН)	23
Колориметрический способ определения рН	23
Определение рН с одноцветным индикатором	26
Определение рН с двухцветными индикаторами	27
Определение рН мутных и окрашенных растворов	27
Потенциометрическое определение рН растворов	28
Буферные растворы	32
Приготовление буферных растворов	33
Свойства буферных растворов	34
Буферное действие раствора	34
Влияние разведения на рН буферного раствора и буферную емкость	35
Буферная емкость биологических жидкостей	35
<i>Глава II. Коллоидная химия</i>	<i>37</i>
Методы получения коллоидных растворов	37
Дисперсионные методы	37
Получение золя серебра	37
Конденсационные методы	38
Получение коллоидного раствора канифоли, фенолфталеина, серы	38
Получение золя гидроокиси железа	38
Получение золя серы	39
Получение золя берлинской лазури	39
Получение золя серебра	40
Диализ и ультрафильтрация	40
Приготовление коллоидных мембран	41
Диализ золя гидрата окиси железа	41
Определение заряда коллоида	42

Электрофорез коллоидных растворов	43
Электрофорез гидролиза берлинской лазури	43
Электрофорез белков на бумаге	44
Электрофорез белков на агар-агаре	46
Коагуляция коллоидных растворов	47
Коагуляция гидрозолей гидроокиси железа	57
Коагуляция минерального и органического коллоида сернистым аммонием	48
Коллоидная защита	48
Необратимая коагуляция органических коллоидов	49
Поверхностные явления в растворах	50
Поверхностно-активные вещества	50
Определение поверхностного натяжения методом стагмометрии	51
Влияние желчи (желчных кислот) на поверхностное натяжение воды	52
<u>Адсорбция твердых веществ на поверхности раздела фаз</u>	<u>53</u>
Адсорбция фуксина на стекле	54
Адсорбция на осажденном сульфате бария	54
Адсорбция ализарина окисью алюминия	55
Полярная адсорбция красящих веществ	55
<u>Хроматографическое разделение растительных пигментов на бумаге</u>	<u>56</u>
Распределительная хроматография аминокислот	57
Нисходящая хроматография	58
Круговая хроматография	60
Вязкость и методы ее определения	61
Определение вязкости с помощью капиллярного вискозиметра	61
Влияние концентрации раствора на его вязкость	62
Влияние температуры на вязкость	63
Оптические свойства коллоидных растворов	63
Опалесценция раствора канифоли и фенолфталеина	64
Наблюдение явления Фарадея — Тиндала	64
Студни лиофильных коллоидов	65
Получение зелей и студней желатина	66
Диффузия в студнях	67
Набухание желатина	68
Местное набухание под влиянием кислоты	69
Периодические осаждения в гелях	69
Глава III. Углеводы	71
Качественные реакции на углеводы	72
Реакция с α -нафтолом	72
Нафторезорциновая проба	72
Моносахариды	73
Альдогексозы	74
Реакция на редуцирующие углеводы	74
Проба с гидроксидом меди (II) — реакция Троммера	74
Реакция с жидкостью Фелинга	75
Реакция с солями висмута	75
Реакция с фенилгидразином	76

Кетогексозы	77
Обнаружение фруктозы в растворе (реакция А. Ф. Селиванова)	79
Пентозы	79
Реакция на пентозы с орцином	80
Реакция с флороглюцином	81
Реакция на делоксиприбозу	81
Дисахариды	82
Реакция на сахарозу	82
Реакции на мальтозу и лактозу	83
Реакции восстановления металлов	83
Реакция с фенилгидразином	84
Реакции брожения углеводов	84
Использование неорганического фосфата в процессе брожения	85
Полисахариды	87
Крахмал	87
Цветные реакции на крахмал	87
Кислотный ступенчатый гидролиз крахмала	88
Ферментативный гидролиз крахмала	89
Гликоген	90
Реакция гликогена с иодом	90
Обнаружение гликогена в животных тканях	90
Клетчатка, или целлюлоза	91
Гидролиз клетчатки	92
Количественное определение углеводов и их метаболитов.	
Определение глюкозы в биологических жидкостях по методу Хагедорна — Иенсена	92
Определение количества глюкозы оксидазным методом	96
Количественное определение пентоз в тканях (по Мейбаум)	98
Определение концентрации гликогена антроновым реактивом	98
Количественное определение молочной кислоты (по Баркеру и Саммерсону)	100
Количественное определение пировиноградной кислоты	102
Глава IV. Липиды и их метаболиты	104
Глицериды (жиры)	104
Качественные реакции на жиры	105
Реакция жира и масла с суданом III	105
Определение глицерина в жирах	105
Растворимость жиров	106
Определение констант жира	107
Определение температуры плавления	107
Определение кислотного числа	108
Определение иодного числа	109
Определение числа омыления	110
Определение эфирного числа	111
Эмульгирование жиров	111
Гидролиз глицеридов липазой	112
Количественное определение жира в печени и мышцах	114
Фосфолипиды	115
Выделение фосфолипидов	116
Выделение лецитинов из яичного желтка	117

Выделение фосфолипидов из нервной ткани	117
Качественная реакция на холинфосфолипиды	117
Гидролиз лецитина и определение продуктов гидролиза	117
Обнаружение высших жирных кислот	118
Обнаружение глицерина	118
Обнаружение фосфорной кислоты	118
Обнаружение азота	119
Стероиды и стериды	119
Выделение холестерина из нервной ткани	121
Цветные реакции на холестерин	121
Реакция с серной кислотой (реакция Шиффа)	121
Реакция с серной кислотой (реакция Сальковского)	122
Реакция с уксусным ангидридом и серной кислотой (реакция Либермана — Бурхарда)	122
Коллестивное определение холестерина в сыворотке крови (по Ильку)	122
Глава V. Простые белки (протеины)	124
Физико-химические свойства белков	124
Реакции на белки	126
Реакции осаждения белков	126
Высаливание белков	126
Осаждение белков сернокислым аммонием	127
Обратимое осаждение белков сернокислым аммонием	128
Осаждение белков хлористым натрием и сернокислым аммонием	128
Очистка белков от кристаллоидов методом диализа	129
Осаждение белков ионами тяжелых металлов	130
Осаждение белков минеральными кислотами	131
Осаждение белков органическими кислотами	132
Осаждение белков спиртом, ацетоном и хлороформом	132
Осаждение белков алкалоидами и реактивами на алкалоиды	133
Определение изоэлектрической точки белков	134
Качественные реакции на белки	136
Обнаружение в молекулах белков пептидных связей (биуретовая реакция)	137
Нингидриновая реакция	139
Реакция с пикриновой кислотой	141
Качественные реакции на аминокислоты	141
Ксантопротеиновая реакция	141
Реакция на тирозин	142
Реакция на триптофан	143
Реакция на аргинин	144
Реакция на серосодержащие аминокислоты	145
Качественная реакция на глутатион	145
Диазореакция на тирозин, триптофан и гистидин	146
Обнаружение углеводного компонента в белках	147
Глава VI. Сложные белки (протеиды)	149
Нуклеопротеиды	149
Выделение дезоксирибонуклеопротеида	150
Реакция на ДНК	151

Получение нуклеопротенда из дрожжей	151
Гидролиз нуклеопротенда	152
Обнаружение простых белков	152
Обнаружение пептоз	153
Обнаружение пуриновых оснований	153
Обнаружение фосфорной кислоты	153
Хромопротенды	154
Получение кристаллов оксигемоглобина	154
Реакция получения гемина	155
Гликопротенды	156
Выделение муцина из слюны	156
Методы определения количества белков в тканях и неко- торых продуктов их обмена	157
Определение белка по азоту методом Кьельдаля	157
Колориметрическое определение азота в тканях	160
Колориметрическое определение небелкового (остаточ- ного) азота в тканях	162
Определение остаточного азота крови	162
Определение небелкового азота в тканях	163
Количественное определение белка биуретовой реак- цией	164
Количественное определение белка с азотной кисло- той в биологических жидкостях	165
Количественное определение белка по методу Лоури	166
Рефрактометрическое определение белков в сыворот- ке крови	167
Определение азота аминных групп формальным тит- рованием	169
Выделение и раздельное определение нуклеиновых кислот методом Шмидта и Таннгаузера	170
Выделение и количественное определение нуклеино- вых кислот по Н. Ваннемахеру	174
Глава VII. Ферменты	177
Общие свойства ферментов	177
Термоллабильность ферментов	178
Влияние рН на активность ферментов	179
\ Специфичность ферментов	180
Влияние активаторов и ингибиторов	181
Определение активности ферментов	182
Оксидоредуктазы	182
Определение активности дегидрогеназы янтарной кислоты	182
Определение активности каталазы крови	183
Трансферазы	184
Определение активности аланинаминотрансферазы	184
Определение активности фосфорилазы	186
* Гидролазы	188
Определение активности холинэстеразы	188
Определение активности щелочной фосфатазы	190
Определение активности амлазы	191
Определение активности протеиназ	193
Лиазы	194
Определение активности альдолазы	194

Глава VIII. Витамины	196
Жирорастворимые витамины	196
Витамин А (антиксерофтальмический, ретинол)	196
Качественные реакции на витамин А	197
Реакция с треххлористой сурьмой	197
Реакция с серной кислотой	197
Количественное определение витамина А в желтке яиц	198
Количественное определение каротина в желтке яиц	200
Определение витамина А и каротина в сыворотке крови	201
Витамин D (антирахитический, кальциферол)	204
Качественная реакция на витамин D с треххлористой сурьмой	205
Витамин E (антистерильный, токоферол)	205
Качественная реакция на витамин E с азотной кислотой	205
Витамин K (антигеморрагический, филлохинон)	206
Качественная реакция на витамин K	207
Водорастворимые витамины	207
Витамин B ₁ (антиневритный, тиамин)	207
Качественная реакция на витамин B ₁	207
Количественное определение витамина B ₁ в моче	209
Витамин B ₂ (рибофлавин)	210
Реакция восстановления витамина B ₂	210
Количественное определение витамина B ₂ в яйцах	211
Витамин B ₅ (витамин PP, никотинамид)	212
Качественная реакция на витамин B ₅	212
Витамин B ₁₂ (антианемический, цианкобаламин)	213
Качественная реакция на кобальт, содержащийся в витамине B ₁₂	213
Витамин C (антицинготный, аскорбиновая кислота)	214
Качественная реакция на витамин C	214
Количественное определение витамина C в кормах	215
Глава IX. Гормоны	218
Инсулин	218
Влияние инсулина на содержание глюкозы в крови	219
Адреналин	220
Реакция адреналина с иодом	220
Реакция адреналина с хлорным железом	220
Влияние адреналина на содержание глюкозы в крови	221
Тироксин	222
Обнаружение иода в тиреоидине	222
Фолликулин	223
Реакция фолликулина с реактивом Фолина	223
Реакция фолликулина с серной кислотой	223
Глава X. Кровь	224
Техника получения сыворотки крови	224
Получение плазмы крови	226
Получение дефибринированной крови	226
Определение скорости свертывания крови	227
Определение протромбина	227
Электрофорез белков сыворотки крови	229

Определение резервной щелочности крови	229
Определение концентрации сахара по Хаседориу — Ненсену	232
Определение небелкового азота	232
Определение мочевой кислоты	233
Определение концентрации свободных аминокислот в сыворотке крови	234
Гравиметрическое определение общих липидов в сыворотке крови	236
Определение холестерина в сыворотке крови	237
Определение концентрации кальция	238
Комплексонометрический метод определения общего кальция в сыворотке крови	240
Определение фосфора в крови	241
Определение концентрации калия	243
Определение концентрации хлоридов	244
Определение концентрации фосфокреатина	246
Реакции на обнаружение билирубина	247
Определение концентрации аденозинтрифосфорной кислоты	248
Глава XI. Моча	251
Цвет мочи	252
Определение плотности мочи	252
Химический состав мочи	254
Качественное определение хлоридов в моче	254
Количественное определение хлоридов в моче	255
Определение фосфатов	256
Определение сульфатов	256
Определение общего азота в моче	257
Определение креатинина и креатина в моче	259
Количественное определение мочевины	260
Качественные реакции на креатинин и индикан	261
Реакция с пикриновой кислотой	262
Реакция с нитропруссидом натрия	262
Индикан	262
Патологические составные части мочи	263
Определение белка	264
Определение ацетоновых тел	265
Проба на ацетон	265
Проба с нитропруссидом натрия	265
Реакция на кровяные пигменты	265
Реакции на желчные пигменты	266
Проба Гмеллина	266
Проба Розенбаха	267
Методы определения сахара в моче	267
Проба Троммера	267
Проба с жидкостью Фелинга	267
Количественное определение аммиака	268
Количественное определение креатинина	269
Глава XII. Молоко	271
Качественный анализ молока	273
Белки молока	273

Осаждение и выделение казеина	273
Выделение лактоальбуминов и лактоглобулинов	273
Определение количества казеина	274
Денатурация белков молока солями тяжелых металлов	274
Действие химозина на казеин	275
Качественные реакции на молочный сахар	276
Определение количества лактозы в молоке методом иодометрии	276
<u>Колличественное определение витамина С в молоке</u>	<u>277</u>
Ферменты молока	278
Качественная реакция на пероксидазу	278
Реакция на альдегиддегидрогеназу	279
Каталаза и каталазное число	280
Комплексометрическое определение количества кальция	281
Определение количества фосфора	281
Определение кислотности молока	282
Глава XIII. Мышцы	284
Подготовка мышц к исследованию	286
Выделение белков мышечной ткани	286
Выделение альбуминовой фракции	286
Выделение глобулиновой фракции	287
Выделение склеропротеинов	287
Определение гликогена	288
Определение креатинфосфата и неорганического фосфора в мышцах	290
Определение аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ)	293
Определение активности аденозинтрифосфатазы (Mg^{2+} -АТФ-азы)	295

Алексей Васильевич Чететкин,
Владимир Иванович Воронянский,
Галина Григорьевна Покусай, Николай Иванович Карташов,
Нинель Львовна Докторович, Игорь Васильевич Кириченко

ПРАКТИКУМ ПО БИОХИМИИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Редактор Ю. А. Елков. Младший редактор Л. К. Архипова.
Художник Ю. С. Шлепер. Художественный редактор
Т. А. Коленкова. Технический редактор Э. М. Чижевский.
Корректор С. К. Завьялова

ИБ № 2326

Изд. № Е-365. Сдано в набор 11.03.80. Подп. в печать 14.10.80. Формат 84×108^{1/2}. Бум. тип. № 2. Гарнитура литературная. Печать высокая. Объем 15,96 усл. печ. л. Уч.-изд. л. 15,93 Тираж 24 000 экз. Зак. № 300. Цена 90 коп.
Издательство «Высшая школа», Москва, К-51, Неглинная ул., д. 29/14.
Московская типография № 8 Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли,
Хохловский пер., 7.

90000

