

Л. БРОУДЕ

ПРОФ. КАЗ. ГОС. МЕДИЦИНСК. ИНСТИТУТА

**КРАТКОЕ
РУКОВОДСТВО
ПРИ ПРАКТИЧЕСКИХ
ЗАНЯТИЯХ
ПО
БИОЛОГИЧЕСКОЙ
ХИМИИ**

ТАТГОСИЗДАТ

КАЗАНЬ 1937

Памяти
дорогого учителя—академика
Владимира Сергеевича
ГУЛЕВИЧА

ПРЕДИСЛОВИЕ К ТРЕТЬЕМУ ИЗДАНИЮ

Настоящее издание, появляющееся через 4 года после второго, переработано и дополнено в соответствии с успехами биологической химии за протекшие годы и применительно к требованиям новой программы курса биологической химии, утвержденной ВКВТО для мединститутков: введены реакции на некоторые витамины и гормоны, даны более подробно правила количественного анализа, приведены примеры микроанализа, дано описание манометрического метода Варбурга, расширен отдел ферментов и др. Прежний материал перегруппирован и пересмотрен как в теоретической, так и в практической части.

Казань,
январь, 1937

Профессор Л. Броуде

ПРЕДИСЛОВИЕ КО ВТОРОМУ ИЗДАНИЮ

В настоящем издании, появляющемся всего через полтора года после первого, сделаны лишь небольшие изменения и дополнения, вызванные требованиями преподавания.

Вновь введены: в главе III—анализ газов крови по Холдену (Haldane) (определение емкости крови в отношении кислорода, определение содержания угольной кислоты), выделение гепарина, получившего широкое применение в качестве вещества, препятствующего свертыванию крови; в главе IV—определение удельного веса пикнометром; в главе IX—калибрование мерительной посуды; в главе XVIII—определение в моче свинца (нефелометрическое) и ртути. Кроме того добавлены таблица для вычисления объема стеклянного сосуда по весу наполняющей его воды или ртути и таблица плотности и объема воды при различных температурах.

В остальном материал сохранен прежним и лишь несколько перегруппирован и расширен в теоретической части.

Л. Броуде

Москва,
март, 1933

ПРЕДИСЛОВИЕ К ПЕРВОМУ ИЗДАНИЮ

Составленное Л. М. Броуде руководство для практических занятий по биологической химии предназначено служить начальным пособием для студентов, главным образом медиков, и пополняет немногочисленную учебную литературу, существующую на русском языке в этой области. В руководство не включена микрометодика ввиду того, что по этому отделу биологической химии уже имеется достаточное количество практических пособий на русском языке, и с дидактической точки зрения нельзя считать правильным вводить обучение микрометодике в *practicum* большого количества одновременно работающих студентов, еще очень мало знакомых с техникой химических исследований; микроанализ, требующий значительно большей точности, аккуратности и химических навыков, чем макроанализ, следует относить не к первой, а ко второй ступени практических занятий по биологической химии. При выборе материала, вошедшего в руководство, автор, имеющий многолетний опыт ведения практических занятий по биологической химии со студентами, остановился на методах и реакциях по возможности простых, доступных для начинающих и наиболее важных в практическом или теоретическом отношении. Несколько более сложное формоловое титрование по Sørensen и определение амидных групп по van Slyke составляют в этом отношении исключение, допущенное ввиду большой практической важности названных методов. В руководстве уделено должное внимание как практической, так и теоретической стороне и отмечены те детали, несоблюдение или незнание которых начинающими часто служит источником ошибок.

Составленное Л. М. Броуде руководство несомненно окажет значительную помощь студентам при изучении биологической химии и облегчит работу руководителей практическими занятиями.

Академик Вл. Гулевич

Б Е Л К И

Белки—химические соединения очень большого молекулярного веса, дающие, поскольку они растворимы, коллоидные растворы и расщепляющиеся при гидролизе с образованием α -аминокислот.

Известно около 100 различных белков. За невозможностью провести их классификацию по химическому строению ее основывают в значительной мере на различиях в растворимости и осаждаемости; однако эти различия не настолько глубоки в разных группах белков, чтобы между последними можно было провести резкую границу.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ

Растворы белков имеют коллоидный характер вследствие большой величины белковых молекул (диаметр коллоидных частиц 0,1—0,001 μ). Белки относятся к так называемым гидрофильным коллоидам, но в некоторых условиях, например при нагревании, растворы белков приобретают свойства, напоминающие гораздо менее устойчивые суспензионные коллоиды. Коллоидные растворы (золи) белков, теряя воду, напр. при сушении, переходят в гели—студнеобразные полужидкие продукты превращения и далее в твердые ломкие листочки, набухающие при добавлении воды и снова растворяющиеся с образованием коллоидных растворов.

Белки—амфотерные электролиты. Их растворы имеют как основную константу электролитической диссоциации, так и кислотную; часто последняя является большей. Поэтому в большинстве случаев чистый белок оказывается заряженным отрицательно; при катодорезе белок идет к аноду. При добавлении водородных ионов (кислот) кислотная диссоциация белка понижается в согласии с законом действия масс, основная же диссоциация повышается вследствие связывания гидроксильных ионов. Наступает момент, когда диссоциация кислотная делается равной диссоциации основной; заряд на белковой частице делается при этом наименьшим, так как в растворе находятся

ионы белка, несущие равные количества положительных и отрицательных зарядов, уравнивающих друг друга (амфотерные ионы, цвиттер-ионы). Этот момент называется и з о э л е к т р и ч е с к о й т о ч к о й. Движение частиц под влиянием электрического тока равно при этом нулю. При дальнейшем добавлении водородных ионов кислотная диссоциация еще более уменьшается, основная же увеличивается; теперь в растворе содержатся главным образом катионы белка, происходит перезарядка коллоидных частиц; при катафорезе белок идет к катоду. Наоборот, при действии щелочей понижается основная, повышается кислотная диссоциация; белок является заряженным отрицательно.

В изоэлектрической точке осаждаемость белка нагреванием или спиртом (но не электролитами) достигает максимума. Это можно объяснить прекращением отталкивания частиц вследствие снятия заряда: под влиянием межмолекулярных сил притяжения частицы собираются в более крупные агрегаты *. Помимо этого для белков имеет силу положение, что растворимость амфотерного электролита является наименьшей в момент наименьшей его диссоциации **. Изоэлектрические точки для различных белков лежат при различных концентрациях водородных ионов в зависимости от их основного или кислотного характера. Так, например, протамины и гистоны в соответствии с их основным характером имеют изоэлектрическую точку, лежащую при слабощелочной реакции, и осаждаются из растворов основаниями (едкими щелочами, аммиаком). Однако состояние изоэлектрической точки не является единственным, приводящим к неустойчивости коллоидного раствора; достаточно понижения заряда на частицах до определенной критической величины, чтобы вызвать неустойчивость и выпадение коллоида.

Растворы белков обычно опализируют. Опализация (прозрачность с желтоватым или красноватым оттенком в проходящем свете,

* Коллоидные частицы (д и с п е р с н а я ф а з а) несут одноименные электрические заряды, противоположные по знаку заряду жидкости, в которой они взвешены (д и с п е р с и о н н о й с р е д ы). Электрические силы отталкивания, возникающие между одноименно заряженными частицами, препятствуют их соединению под влиянием сил притяжения, действующих между частицами на небольшом расстоянии. Но в случае снятия зарядов с коллоидных частиц (или при уменьшении заряда ниже определенной критической величины) силы притяжения могут привести к соединению частиц, попадающих вследствие броуновского движения в сферу взаимного притяжения.

** Некоторые белки не выпадают в изоэлектрической точке, например яичный, сывороточный альбумины, оксигемоглобин; это может быть объясняется тем, что у них не только ионы, но и недиссоциированные молекулы отличаются относительно хорошей растворимостью.

мутность с голубоватым оттенком в отраженном) наблюдается у большинства коллоидных растворов и обусловлена рассеянием света от взвешенных в жидкости коллоидных частиц; при боковом освещении виден путь лучей света, проходящих через мутную среду,—явление Тиндаля (Tyndall). При кипячении белочных растворов опализация усиливается, так как увеличиваются размеры взвешенных частиц белка.

Белки способны в отличие от суспензионных коллоидов понижать поверхностное натяжение и, скопляясь в поверхностном слое, вызывать образование твердых поверхностных оболочек, придавать стойкость пене (примером может служить взбитый белок куриного яйца). Однако поверхностное натяжение растворов белка очень изменчиво, и белки при различных условиях приобретают свойства суспензионных коллоидов. Недиссоциированные молекулы белка понижают поверхностное натяжение больше, чем ионы белка, поэтому в изоэлектрической точке поверхностное натяжение является наименьшим. Растворы белка вязки, медленно проходят через поры фильтра. Вязкость растворов белка повышается с увеличением диссоциации белка*.

БЕЛОК КУРИНОГО ЯЙЦА

Типичным представителем белков может служить белок куриного яйца.

Белок отделяют от желтка, хорошо взбивают для разрушения находящихся в яйце перепонки и фильтруют через полотно, которое должно быть предварительно выстирано для освобождения от крахмала.

Такие концентрированные растворы белка фильтруются чрезвычайно медленно. Полученная вязкая, слегка желтоватого цвета, опализирующая, легко пенящаяся жидкость содержит 10—13% белка, большая часть которого состоит из яичного альбумина. Жидкость имеет слабощелочную на лакмус реакцию, обусловленную присутствием щелочно реагирующих минеральных солей. Удельный вес ее 1,038—1,045.

При смешении небольшого количества профильтрованного яичного белка с 19—20-кратным объемом воды появляется хорошо заметный белый осадок яичного глобулина, легко растворяющийся при добавлении небольшого количества насыщенного

* Полагают, что повышение вязкости обусловлено увеличением гидратации коллоидных частиц в соответствии с возрастанием их заряда.

раствора поваренной соли. Если остальную часть профильтрованного яичного белка тоже разбавить 20 объемами воды и отфильтровать от выделившегося осадка глобулина, то получается примерно 0,5% раствор яичного альбумина.

Эти растворы белка (профильтрованный неразбавленный яичный белок, разбавленный раствор смеси альбумина и глобулина в поваренной соли и раствор альбумина) могут быть употреблены для приводимых ниже реакций.

ОБЩИЕ РЕАКЦИИ НА БЕЛКИ

Общие реакции на белки разделяются на реакции по осаждению и на цветные реакции. Альбумозы, пептоны, альбуминоиды и некоторые протеиды дают не все перечисленные ниже реакции.

1. Реакции на белки по осаждению

А. Свертывание при кипячении

При кипячении растворы белка претерпевают необратимое изменение: белок денатурируется* и в некоторых условиях свертывается. Прокипяченный несвернувшийся раствор куриного белка ведет себя в отношении осадителей как суспензионный коллоид. Растворы белков, обладающих нейтральным характером, свертываются хорошо при кипячении в слабокислой на лакмус среде, хуже — при нейтральной реакции; при щелочной реакции свертывания не происходит. Избыток кислоты за исключением азотной, трихлоруксусной и сульфосалициловой препятствует свертыванию, однако последнее наступает при добавлении насыщенного раствора какой-либо средней соли. Белки основного характера (протамины, гистоны) и белки кислотного характера (муцины, казеин) не свертываются при кипячении растворов их нейтральных солей. Пептоны не дают 1, 2 и 3-й реакций, альбумозы при обыкновенной т-ре дают осадки, растворяющиеся при нагревании. Многие органические основания, а также многоатомные спирты, сахара, сложные эфиры, кетоны, альдегиды могут мешать свертыванию белков при кипячении.

1. При нагревании водного раствора яичного альбумина осадок или усиление опалезации появляется еще до того, как жидкость закипит**.

* Денатурирование белков (необратимое изменение их природных свойств) наблюдается также под влиянием кислот, щелочей, спирта, коротковолновых излучений (лучи Рентгена, ультрафиолетовые) и других агентов.

** Растворы белков кипят неровно, толчками, так как белок по стенкам свертывается и в этих местах происходит перегревание.

2. Осаждение является более полным, если жидкость довести до очень слабокислой на лакмус реакции добавлением 1—2 капель 10% уксусной кислоты; осадок хлопьевидный, с трудом растворяющийся при комнатной температуре в кислотах или щелочах. Осаждение является полным, если к кислому раствору до кипячения или непосредственно после него прибавить немного ($\frac{1}{6}$ — $\frac{1}{3}$ объема) насыщенного раствора поваренной соли. Раствор альбумина, сильно подкисленный уксусной кислотой, не свертывается при кипячении без добавления средних солей*.

3. Раствор альбумина нагревают до кипения и к горячему раствору прибавляют 15—20 капель 25% азотной кислоты; получается хлопчатый осадок белка. Не следует кипятить жидкость с азотной кислотой, так как последняя при очень малых количествах белка может повести к растворению осадка вследствие гидролиза. Для получения осадка необходим некоторый избыток азотной кислоты. Осадок может получиться еще во время кипячения; в таком случае он не исчезает после добавления азотной кислоты.

4. Подщелоченный едким натром раствор альбумина не свертывается при кипячении.

При свертывании осаждающие ионы находятся в осадке белка. При осаждении денатурированного нагреванием белка средними солями наблюдаются закономерности, справедливые для всех вообще суспензионных коллоидов: осаждение протекает необратимо; при осаждении положительно заряженных коллоидных растворов белка главное значение приобретают анионы, при осаждении отрицательно заряженных — катионы; при этом имеет также значение валентность иона, степень электролитической диссоциации электролита и подвижность ионов.

Степень влияния ионов идет параллельно их способности адсорбироваться**. Адсорбированный ион, если он противоположен по

* При добавлении солей к растворам денатурированного нагреванием белка оптимум осаждения не совпадает с изоэлектрической точкой, а сдвигается несколько в ту или другую сторону в зависимости от того, преобладает ли влияние катиона или аниона. Если катион оказывает большее влияние, то сдвиг наблюдается в сторону менее кислой реакции, если превышает действие аниона, то в сторону более кислой реакции.

** В молекулярно тонкой оболочке воды, непосредственно окружающей взвешенную коллоидную частицу, весьма выражены явления поверхност-

знаку заряду коллоидной частицы, нейтрализует заряд частицы; наступает момент, когда силы притяжения между молекулами начинают превышать силы отталкивания,—происходит осаждение. Можно думать, что снятие зарядов совпадает с образованием нерастворимого соединения.

Б. Осаждение при комнатной температуре

5. При насыщении растворов белка при нейтральной реакции средними солями щелочных или щелочно-земельных металлов некоторые белки осаждаются (высаливаются). Только сернокислый аммоний осаждает в этих условиях все белки за исключением пептонов. Однако в присутствии кислот (HCl , CH_3COOH) и другие соли (NaCl , Na_2SO_4 , MgSO_4 и др.) могут служить общими осадителями для белков. Приводимые ниже реакции можно производить с раствором яичного белка, в котором яичный глобулин растворен добавлением нескольких капель насыщенного раствора поваренной соли.

а) Поваренная соль. К небольшому количеству раствора белка прибавляют понемногу растертую в порошок поваренную соль до насыщения раствора, т. е. до момента, когда часть кристаллов, несмотря на взбалтывание, остается нерастворенной. Минут через 10 отфильтровывают образовавшийся осадок яичного глобулина. Часть фильтрата кипятят и затем слегка подкисляют 1% уксусной кислотой, образуется осадок яичного альбумина; к другой части фильтрата прибавляют при комнатной т-ре разбавленной кислоты, осаждается тоже альбумин.

б) Сернокислый магний. При насыщении раствора яичного белка порошком сернокислого магния также выпадает глобулин. Фильтрат исследуют на альбумины, как описано при поваренной соли.

в) Сернокислый аммоний. К раствору белка прибавляют

ного натяжения, которые проявляются тем сильнее, чем больше степень дисперсности веществ, так как по мере раздробления увеличивается поверхность соприкосновения дисперсной фазы и дисперсионной среды. Если в растворе содержатся вещества, способные понижать поверхностное натяжение, они притягиваются в поверхностный слой, адсорбируются, и тем уменьшают энергию поверхности. Концентрация таких поверхностно активных веществ является большей в поверхностном слое, чем во внутренних частях жидкости. Адсорбцией в значительной мере определяются величина и знак заряда на коллоидных частицах.

равный объем насыщенного раствора сернокислого аммония, так что при перемешивании раствор делается полунасыщенным, выпадает осадок глобулина. Фильтруют, фильтрат насыщают сернокислым аммонием, выпадает осадок альбумина.

Этот метод применяют для разделения глобулинов и альбуминов.

Осаждение солями щелочных металлов и магния обратимо, т. е. осадки растворяются при уменьшении концентрации солей (например при разбавлении водой, диализе). Осаждение солями Ca, Sr, Ba необратимо.

Обратимость реакции осаждения белков солями щелочных металлов при нейтральной реакции, необходимость большой концентрации солей, препятствующее осаждению действие, оказываемое некоторыми солями,—все это объясняется отчасти тем, что белки, являясь амфотерными электролитами, обладают при нейтральной реакции слабо выраженным электрическим зарядом. В присутствии кислот или щелочей заряд на белковых частицах выражен более резко, и осаждающая способность щелочных солей увеличивается тем более, чем сильнее изменение реакции; осаждение белка делается при этом все более и более необратимым. В зависимости от того, является ли белок катионом или анионом, тот ион, который в первом случае действует наиболее сильно, во втором случае оказывается наиболее слабо действующим и наоборот. В осаждающем действии некоторых ионов наблюдается антагонизм; так например, влияния NaCl и CaCl₂, NaCl и MgCl₂ на осаждение белков являются в большей или меньшей степени противоположными. При осаждении может также иметь значение скорость приливания электролита: устойчивость коллоида может мало или совсем не измениться при медленном приливании электролита, тогда как при быстром происходит полное осаждение.

При осаждении белков большое значение помимо снятия заряда с коллоидных частиц имеет водоотнимающее действие ионов. Наибольшее действие оказывают ионы, более сильно притягивающие воду. Способность к гидратации зависит от радиуса и заряда иона: чем меньше радиус и чем больше заряд иона, тем сильнее способность притягивать воду. Ионы солей можно расположить по их осаждающему действию на неизменные белки в следующие ряды: $SO_4^{''} > Cl' > Br' > J'$; $Ca^{..} > Li^{\cdot} > Na^{\cdot} > K^{\cdot} > Rb^{\cdot} > Cs^{\cdot}$.

6. Соли тяжелых металлов вызывают образование осадков в растворах белков; на этом основано применение белков в качестве противоядия при отравлении солями тяжелых

металлов); некоторые соли, напр. AgNO_3 , HgCl_2 , дают осадки не растворяющиеся в избытке осадителя; другие соли, напр. ZnSO_4 , CuSO_4 , $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$, способны растворять (пептизировать) первоначально образовавшийся осадок. Некоторые соли, например ZnSO_4 , при добавлении больших количеств могут снова вызвать появление осадка; следовательно в некоторых условиях осадки могут растворяться и при добавлении белка. Белки, по возможности освобожденные диализом от солей, делаются нечувствительными к малым количествам ионов тяжелых металлов: Fe^{++} , Cu^{++} , Zn^{++} , Hg^{++} , Pb^{++} .

а) Сулема (HgCl_2). К раствору яичного альбумина прибавляют 2—3 капли раствора сулемы. Образуется тяжелый белый осадок, легко растворяющийся при добавлении небольшого количества насыщенного раствора NaCl ; при добавлении нескольких капель HCl снова выделяется осадок ртутного соединения белка.

б) Медный купорос. К раствору белка прибавляют осторожно по каплям (2—3 капли) разбавленного раствора CuSO_4 ; образуется бледно-голубой осадок, легко растворяющийся в избытке реактива.

в) Уксуснокислый свинец вызывает образование осадка, растворимого в избытке осадителя.

Соли тяжелых металлов вызывают необратимое осаждение белков и являются для них сильными осадителями.

При этом влияние аниона отходит на задний план. Катионы тяжелых металлов обладают тем большим осаждающим действием, чем легче они адсорбируются. Трехвалентные катионы действуют сильнее двухвалентных, но имеются и исключения.

7. Алкоголь, прибавленный в избытке к раствору яичного альбумина, вызывает образование осадка белка. При осаждении спиртом раствор должен быть нейтральным или слабощелочным, но не щелочным, и должен содержать достаточное количество средних солей.

Необходимая для осаждения концентрация спирта меняется в зависимости от природы белка. При усилении диссоциации белка его растворимость в спирте увеличивается. Соли белков (хлористые и натриевые) обычно легче растворимы, чем сами белки. Некоторые растительные белки (проламины) растворимы в горячем 70—80% спирте. Подобно спирту действуют на белки эфир, бензол, амилацетат и другие неэлектролиты, способные понижать поверхностное натяжение. Подобно

нагреванию спирт при длительном воздействии денатурирует белки. Осаждение сначала является обратимым; лишь через некоторое время осадок делается нерастворимым в воде.

8. Концентрированные минеральные кислоты (HNO_3 , HCl , H_2SO_4 , HPO_3) вызывают образование осадка в растворах белка. Избыток кислоты, кроме HNO_3 , растворяет образовавшийся осадок. Ортофосфорная кислота (H_3PO_4) осадка не вызывает.

В пробирку наливают 2—3 см³ концентрированной HNO_3 и затем, сильно наклонив пробирку, осторожно приливают по стенке раствор белка так, чтобы обе жидкости не смешались: в месте их соприкосновения образуется белый аморфный слой белка [проба Хеллера (Heller)] *. Так же поступают и с остальными кислотами.

Осаждение концентрированными минеральными кислотами обусловлено изменением состояния гидратации и диссоциации образующейся соли белка с кислотой.

9. Осаждение алкалоидными реактивами в кислой среде. Все эти реакции протекают в кислой среде, одни лучше в присутствии минеральных кислот, другие—в присутствии кислот органических. Белки, обладающие основным характером, осаждаются алкалоидными реактивами и без подкисления; наоборот, белки кислотного характера осаждаются не всеми алкалоидными реактивами.

а) Железистосинеродистоводородная кислота $\text{H}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$. К раствору альбумина прибавляют несколько капель крепкой уксусной или разбавленной (не содержащей Fe^{++}) соляной кислоты и затем по каплям 5% раствор $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, взбалтывая после каждой капли **.

Осаждение менее полно и может совсем не произойти в присутствии больших количеств средних солей; в этих случаях рекомендуется разбавлять испытуемую жидкость водой.

б) Пикриновая кислота $\text{C}_6\text{H}_2(\text{NO}_2)_3\text{OH}$. К раствору яичного белка, подкисленному органической, например уксусной,

* Эта форма производства реакции (так называемая проба кольцом) является весьма чувствительной, так как вследствие диффузии жидкостей устанавливаются различные переходы в концентрациях реагирующих веществ, в том числе и концентрация, наиболее благоприятная для данной реакции.

** Эта реакция может служить примером осаждения катионов белка, образовавшихся под влиянием уксусной кислоты, многовалентным анионом $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$

кислотой, прибавляют несколько капель насыщенного водного раствора пикриновой кислоты,—образуется желтоватый осадок.

в) Т а н н и н. При добавлении нескольких капель крепкого раствора таннина к подкисленному уксусной кислотой раствору белка образуется осадок.

Осадок может не получиться, если в растворе совершенно отсутствуют средние соли или имеется свободная минеральная кислота; в этих случаях прибавляют уксуснокислого натрия ($\text{HCl} + \text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 = \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2 + \text{NaCl}$).

г) При добавлении нескольких капель раствора иодной ртути в иодистом калии [реактив Брюке (Brücke)] * к раствору белка, подкисленному соляной кислотой, образуется осадок.

Осаждение алкалоидными реактивами обусловлено присутствием в белках азотистых групп (остатки диаминокислот, полипептидов, гетероциклические группы и др.). Алкалоиды, тоже содержащие гетероциклические группы, дают те же реакции.

10. Сульфосалициловая кислота $\text{HO} \cdot \text{C}_6\text{H}_3 \begin{cases} \text{COOH} \\ \text{SO}_2 \cdot \text{OH} \end{cases}$ (20% водный раствор) вызывает появление осадка в растворах белка.

11. Трихлоруксусная кислота $\text{CCl}_3 \cdot \text{COOH}$. При добавлении к небольшому количеству раствора белка нескольких капель свежеприготовленного 2—4% раствора трихлоруксусной кислоты образуется осадок.

12. Осаждение каолином в кислой среде. К нескольким кубическим сантиметрам раствора белка, подкисленного уксусной кислотой, прибавляют $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{2}$ объема каолина и сильно взбалтывают, закрыв отверстие пробирки пальцем, в течение 2—3 минут. Жидкость делается свободной от белка, который адсорбируется осадком каолина.

Белки могут быть в большей или меньшей степени осаждены как электроположительными, так и электроотрицательными суспензионными коллоидами. Это объясняется их амфотерной природой: они проявляют себя и как кислоты и как основания и дают анионы и катионы, несмотря на преобладание одной из функций. Однако для возможно полного выпадения является выгодной противоположность зарядов у реагирующих коллоидов. Так, белочные жидкости организма

* Для приготовления реактива Брюке растворяют 5 г иодистого калия в 50 см³ воды, насыщают иодной ртутью (12 г) и доводят водой до объема в 100 см³.

полностью освобождаются от белка при действии положительно заряженного коллоидного раствора $\text{Fe}(\text{OH})_3$, но для достижения того же при помощи отрицательно заряженного каолина или танина необходимо подкисление, т. е. перезарядка отрицательного белка.

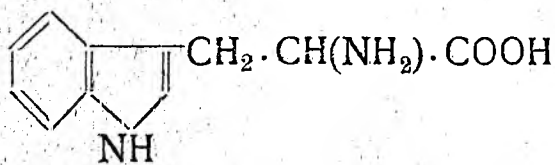
При осаждении одного коллоидного раствора другим, противоположного знака, максимальное осаждение наблюдается лишь при определенных количественных соотношениях обоих коллоидов. Гидрофильные коллоиды, прибавленные в избытке к суспензионному коллоиду, адсорбируясь на частицах последнего, не только не вызывают осаждения, но предохраняют суспензионный коллоид от обычных для него осадителей,—гидрофильный коллоид делается „защитным“ коллоидом. Защитное действие проявляется лишь через некоторое время после смешения коллоидов (время, необходимое для соединения частиц защитного коллоида с частицами суспензионного).

2. Цветные реакции на белки

Цветные реакции основываются на присутствии в белковой молекуле определенных атомных групп и дают возможность судить о строении белков.

1. Реакция Миллона (Millon). К неразбавленному яичному белку или его раствору прибавляют равный объем реактива Миллона*. Образуется белый осадок (действие соли тяжелого металла), делающийся пурпурно-красным при нагревании; жидкость также может окраситься в красный цвет.

Миллонов реактив дает окрашивание почти со всеми фенолами, и в случае белков реакция обусловлена присутствием в них тирозина $\text{HO} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}(\text{NH}_2) \cdot \text{COOH}$. Глутин, не содержащий тирозина, этой реакции не дает. Триптофан



при нагревании с миллоновым реактивом дает бурокрасное окрашивание. Реакции вредят хлориды, H_2O_2 , алкоголь, большие количества

* Миллонов реактив представляет раствор азотнокислых солей окиси и закиси ртути в азотной кислоте, содержащей примесь азотистой.

Для его приготовления растворяют 40 г ртути в 57 см³ концентрированной HNO_3 сначала при комнатной т-ре, затем нагревая на водяной бане. Раствор разбавляют двумя объемами воды и жидкость сливают с отстоявшегося осадка.

Можно также употреблять водный раствор уксуснокислой ртути, к которой перед употреблением прибавляют несколько капель 1% раствора KNO_3 или NaNO_2 и немного разбавленной уксусной кислоты, если реакция жидкости недостаточно кислая.

минеральных солей, так как многие из них дают осадки со ртутью и тем превращают реактив в недействительный. Щелочные жидкости должны быть предварительно нейтрализованы азотной или уксусной кислотой во избежание выпадения осадка окиси ртути.

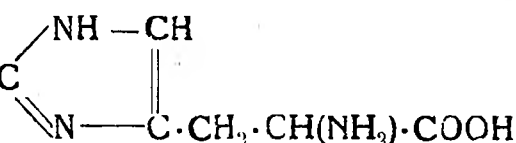
2. Ксантопротеиновая реакция Мульдера (Mulder). К раствору яичного альбумина прибавляют крепкой азотной кислоты до тех пор, пока еще образуется осадок. При нагревании осадок окрашивается в желтый цвет и растворяется, сообщая жидкости желтую окраску. При охлаждении прибавляют (*осторожно!*) избыток аммиака или едкой щелочи, — окраска делается оранжевой. Если щелочь прибавлять постепенно, то можно заметить выпадение осадка кислотного альбумината, растворяющегося в избытке щелочи с оранжевой окраской.

Реакция обусловлена образованием желтоокрашенных нитросоединений из ароматических и некоторых гетероциклических (триптофан) групп белка.

3. Биуретовая реакция. К раствору белка прибавляют поlobeма крепкого раствора едкой щелочи* и при взбалтывании 1—2 капли очень разбавленного, почти бесцветного раствора медного купороса, — получается красно-фиолетовое окрашивание жидкости.

Надо избегать избытка CuSO_4 , так как при дальнейшем его прибавлении все более усиливается нехарактерный синий оттенок, и наконец выпадает осадок гидрата окиси меди. Пептоны при этой реакции дают розовое или красное окрашивание.

Биуретовую реакцию способны давать вещества, которые содержат не менее двух $-\text{CO}-\text{NH}-$, $-\text{CS}-\text{NH}-$, $-\text{C}(\text{NH})-\text{NH}-$ групп или, при известных условиях, не менее двух $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ групп, связанных между собой непосредственно или через посредство атома углерода или азота. В белковой молекуле имеются подобного рода группировки, но вещества и небелкового характера, содержащие в нужных соотношениях указанные группы, дают биуретовую реакцию, например оксамид $-\text{H}_2\text{N}\cdot\text{CO}\cdot\text{CO}\cdot\text{NH}_2$, биурет $-\text{H}_2\text{N}\cdot\text{CO}\cdot\text{NH}\cdot\text{CO}\cdot\text{NH}_2$, по которому и названа реакция.

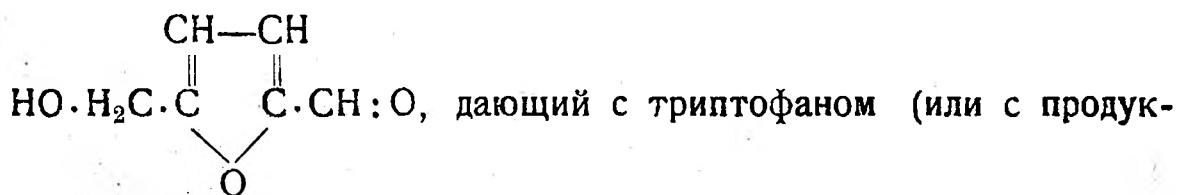
Гистидин  также дает биуретовую реакцию.

4. Реакция Либермана (Liebermann). К небольшому количеству неразбавленного яичного белка прибавляют большой избыток дымящейся соляной кислоты и нагревают, не до-

* Вещества, нерастворимые в щелочах при комнатной т-ре, кипятят со щелочью и проделывают реакцию по охлаждению.

вода однако до кипения во избежание улетучивания хлористого водорода. Выделившийся при добавлении кислоты осадок белка растворяется, и жидкость приобретает фиолетовую окраску. При стоянии окраска буреет и может появиться темнокоричневый осадок.

Эта реакция обусловлена одновременным присутствием в белковой молекуле углеводного остатка и триптофана. При нагревании с соляной кислотой из гексозы образуется оксиметилфурфурол



тами его превращения) фиолетовую окраску. Побурение зависит от образования меланоидиновых веществ (стр. 40). Глутин, не содержащий триптофана, этой реакции не дает, так же как и реакций 5-й и 6-й, тоже обусловленных присутствием триптофана в белковой молекуле.

5. Реакция Шульце-Распайля (Schultze-Raspail). Раствор белка или неразбавленный яичный белок смешивают с несколькими каплями 10% раствора тростникового сахара и переслаивают концентрированной серной кислотой. Осторожным встряхиванием пробирки постепенно смешивают обе жидкости. Вследствие выделения тепла при растворении H_2SO_4 в воде происходит саморазогревание жидкости на месте соприкосновения обоих слоев, и появляется вишнево-красное окрашивание.

Не следует жидкости давать нагреваться выше 70° , так как иначе под влиянием H_2SO_4 происходит обугливание органического вещества и раствор буреет; можно охлаждать пробирку холодной водой, однако не слишком, так как при комнатной т-ре реакция протекает очень медленно.

Реакция Шульце, как и реакция 4-я, обусловлена присутствием в белковой молекуле триптофана, реагирующего с фурфуролом, образующимся из тростникового сахара.

6. Реакция Адамкевича (Adamkiewicz). К небольшому количеству неразбавленного белка прибавляют большой избыток ледяной уксусной кислоты, нагревают, пока белок не растворится, охлаждают* и очень осторожно (беречь лицо!), сильно наклонив пробирку, приливают по стенке кон-

* При добавлении крепкой серной кислоты к еще теплему раствору жидкость может выбросить из пробирки.

центрированную серную кислоту так, чтобы обе жидкости не смешались. При стоянии на границе обеих жидкостей образуется красно-фиолетовое кольцо, постепенно распространяющееся на всю жидкость.

Эта реакция также обусловлена присутствием триптофана, который здесь реагирует в присутствии ничтожных следов меди с продуктами превращения глиоксилевой кислоты $\text{O}:\text{HC}\cdot\text{COOH}$, находящейся в виде примеси в ледяной уксусной кислоте.

Поэтому при производстве этой реакции можно вместо ледяной уксусной кислоты прибавлять небольшое количество раствора глиоксилевой кислоты* и затем переслаивать жидкость концентрированной серной кислотой—получается фиолетовое окрашивание. Жидкость слегка флуоресцирует и в спектре дает одну полосу поглощения между фраунгоферовыми линиями b и F (приложение 6).

Реакция не получается в присутствии окислителей (нитратов, нитритов, хлоратов) или избытка хлоридов.

7. Реакция на „слабосвязанную“ серу. Незабавленный яичный белок кипятят с двойным объемом 10% едкого натра; при этом происходит выделение аммиака, который может быть открыт по запаху, по посинению влажной красной лакмусовой бумажки, поднесенной к отверстию пробирки (не касаться стенки!), или по почернению фильтровальной бумаги, смоченной раствором азотнокислой закиси ртути. Щелочную жидкость разделяют на 2 части:

а) к одной прибавляют раствор плюмбита натрия (его готовят добавлением к раствору уксуснокислого свинца едкого натра до растворения образовавшегося вначале осадка гидрата окиси свинца)—образуется желтое, бурое или черное окрашивание или осадок сернистого свинца**;

б) к другой части жидкости прибавляют несколько капель свежеприготовленного разбавленного раствора нитропруссиды натрия $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN}_5)\text{NO}$ —получается красно-фиолетовое окрашивание.

* Приготовление раствора глиоксилевой кислоты: к 100 см³ насыщенного раствора щавелевой кислоты в высоком цилиндре прибавляют 6 г 2% амальгамы натрия; по окончании выделения водорода жидкость отфильтровывают и разбавляют 2—3 объемами воды.

** Для этой реакции применимы соли всех металлов, дающих окрашенные сернистые соединения.

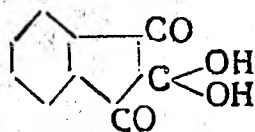
Эти реакции указывают на присутствие в молекуле белка цистина

$S \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH$
 $S \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH$, или цистеина $HS \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH$, разлагающихся при действии щелочей с отщеплением сероводорода. Образуемая сернистая щелочь реагирует с Pb^{++} и дает окраску с нитропруссидом натрия, являющимся реактивом на ион S'' (но не на ион HS' , ввиду чего при этой реакции среда должна быть сильно щелочной).

8. К раствору белка прибавляют $\frac{1}{3}$ объема 15% раствора едкого натра, равный объем 0,15% водного раствора α -нафтола и несколько капель примерно 5% раствора хлорноватисто-кислого натрия* ($NaClO$). Появляется красное окрашивание жидкости и пены, постепенно усиливающееся (реакция Sakaguchi). При длительном стоянии окраска бледнеет.

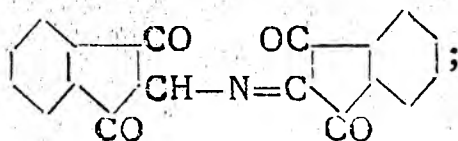
Эта реакция получается лишь с соединениями, содержащими гуанидиновую группировку $HN=C \begin{matrix} \diagup NH_2 \\ \diagdown NH_2 \end{matrix}$ и указывает на присутствие в молекуле белка остатка аргинина $HN=C \begin{matrix} \diagup NH_2 \\ \diagdown NH \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH \end{matrix}$.

9. Нингидриновая реакция. К нейтральному на лакмус, не содержащему аммонийных солей раствору белка прибавляют $\frac{1}{4}$ объема 0,1% водного раствора трикетогидринденгидрата (нингидрина)



и кипятят в течение 1 минуты. Появляется розовая окраска, переходящая в пурпурную и затем синюю.

Эта реакция, обусловленная наличием в молекуле белков карбоксильных и α -аминогрупп, получается и с продуктами гидролиза белков: пептидами и аминокислотами. Синяя окраска зависит от образования продукта конденсации нингидрина с отщепляющимся от α -аминокислот аммиаком:



* Раствор хлорноватисто-кислого натрия может быть приготовлен пропуская хлор в 15%-ный раствор едкого натра по уравнению:
 $2NaOH + Cl_2 = NaClO + NaCl + H_2O$. Хлор получают действием крепкой соляной кислоты на твердый марганцевокислый калий.

центрированную серную кислоту так, чтобы обе жидкости не смешались. При стоянии на границе обеих жидкостей образуется красно-фиолетовое кольцо, постепенно распространяющееся на всю жидкость.

Эта реакция также обусловлена присутствием триптофана, который здесь реагирует в присутствии ничтожных следов меди с продуктами превращения глиоксильной кислоты $\text{O}:\text{HC}\cdot\text{COOH}$, находящейся в виде примеси в ледяной уксусной кислоте.

Поэтому при производстве этой реакции можно вместо ледяной уксусной кислоты прибавлять небольшое количество раствора глиоксильной кислоты* и затем переслаивать жидкость концентрированной серной кислотой—получается фиолетовое окрашивание. Жидкость слегка флуоресцирует и в спектре дает одну полосу поглощения между фраунгоферовыми линиями b и F (приложение 6).

Реакция не получается в присутствии окислителей (нитратов, нитритов, хлоратов) или избытка хлоридов.

7. Реакция на „слабосвязанную“ серу. Незабавленный яичный белок кипятят с двойным объемом 10% едкого натра; при этом происходит выделение аммиака, который может быть открыт по запаху, по посинению влажной красной лакмусовой бумажки, поднесенной к отверстию пробирки (не касаться стенки!), или по почернению фильтровальной бумаги, смоченной раствором азотнокислой закиси ртути. Щелочную жидкость разделяют на 2 части:

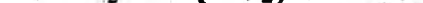
а) к одной прибавляют раствор плюмбита натрия (его готовят добавлением к раствору уксуснокислого свинца едкого натра до растворения образовавшегося вначале осадка гидрата окиси свинца)—образуется желтое, бурое или черное окрашивание или осадок сернистого свинца**;

б) к другой части жидкости прибавляют несколько капель свежеприготовленного разбавленного раствора нитропруссиды натрия $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN}_5)\text{NO}$ —получается красно-фиолетовое окрашивание.

* Приготовление раствора глиоксильной кислоты: к 100 см³ насыщенного раствора щавелевой кислоты в высоком цилиндре прибавляют 6 г 2% амальгамы натрия; по окончании выделения водорода жидкость отфильтровывают и разбавляют 2—3 объемами воды.

** Для этой реакции применимы соли всех металлов, дающих окрашенные сернистые соединения.

Эти реакции указывают на присутствие в молекуле белка цистина



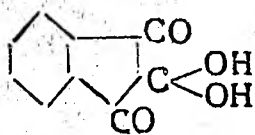
или цистеина $\text{HS} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}(\text{NH}_2) \cdot \text{COOH}$, разлагающихся при действии щелочей с отщеплением сероводорода. Образуемая сернистая щелочь реагирует с Pb^{2+} и дает окраску с нитропруссидом натрия, являющимся реактивом на ион S^{2-} (но не на ион HS^- , ввиду чего при этой реакции среда должна быть сильно щелочной).

8. К раствору белка прибавляют $\frac{1}{3}$ объема 15% раствора едкого натра, равный объем 0,15% водного раствора α -нафтола и несколько капель примерно 5% раствора хлорноватистокислового натрия* (NaClO). Появляется красное окрашивание жидкости и пены, постепенно усиливающееся (реакция Sakaguchi). При длительном стоянии окраска бледнеет.

Эта реакция получается лишь с соединениями, содержащими гуанидиновую группировку $\text{HN}=\text{C} \begin{matrix} \text{NH}_2 \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$ и указывает на присутствие в молекуле

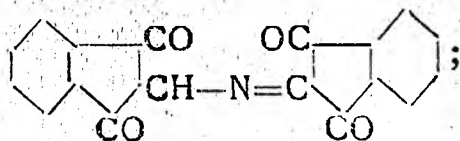
белка остатка аргинина $\text{HN}=\text{C} \begin{matrix} \text{NH}_2 \\ \text{NH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}(\text{NH}_2) \cdot \text{COOH} \end{matrix}$.

9. Нингидриновая реакция. К нейтральному на лакмус, не содержащему аммонийных солей раствору белка прибавляют $\frac{1}{4}$ объема 0,1% водного раствора трикетогидринденгидрата (нингидрина)



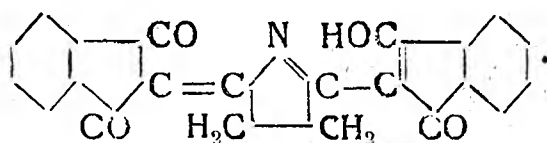
и кипятят в течение 1 минуты. Появляется розовая окраска, переходящая в пурпурную и затем синюю.

Эта реакция, обусловленная наличием в молекуле белков карбоксильных и α -аминогрупп, получается и с продуктами гидролиза белков: пептидами и аминокислотами. Синяя окраска зависит от образования продукта конденсации нингидрина с отщепляющимся от α -аминокислот аммиаком:



* Раствор хлорноватистокислового натрия может быть приготовлен пропуская хлор в 15% раствор едкого натра по уравнению:
 $2 \text{NaOH} + \text{Cl}_2 = \text{NaClO} + \text{NaCl} + \text{H}_2\text{O}$. Хлор получают действием крепкой соляной кислоты на твердый марганцевокислый калий.

иминокислоты (пролин, оксипролин) дают продукт конденсации по типу



Реакция не является специфической, так как ее дают некоторые амины, амиды кислот, а также аммонийные соли и др. соединения.

Так как каждая из приведенных реакций в отдельности не является специфической для белка, то доказательством присутствия белка может служить лишь положительный результат нескольких реакций.

Чувствительность реакций на белок

Чувствительность одного и того же реактива несколько меняется в зависимости от характера белка и от количества и характера находящихся в растворе солей; поэтому нельзя указать для каждого реактива его чувствительность по отношению ко всем белкам. Ниже приведены лишь приблизительные средние цифры, причем альбумозы и пептоны в расчет не принимались.

Проба кипячением с уксусной кислотой в присутствии средних солей, осаждение таннином, иодной ртутью в иодистом калии открывают 1 часть белка в 100 000 частях раствора. Осаждение железисто-синеродистоводородной кислотой, сульфосалициловой кислотой— 1 : 50 000, концентрированной HNO_3 (проба Хеллера) 1 : 40000, биуретовая проба 1 : 10 000, остальные реакции примерно 1 : 20 000.

Освобождение жидкостей от белка

Для удаления белков из жидкостей весьма удобным методом является кипячение с уксусной или какой-либо другой очень разбавленной кислотой. Если надо избежать нагревания, то можно осаждать алкоголем; при нахождении в растворе других осаждающихся спиртом веществ, например гликогена, производят осаждение трихлоруксусной кислотой. Можно также применять осаждение каолином, коллоидным раствором гидроксида железа, спиртовым раствором мастики, смесью вольфрамовокислого натрия и серной кислоты, гидроокисью цинка (гл. XV).

При осаждении белка кипячением с разбавленной кислотой необходимо иметь в виду, что как при недостатке кислоты, так и при

ее избытке часть белка остается в растворе. К жидкости* прибавляют по каплям уксусной кислоты (не крепче 1% раствора); после каждой капли кипятят и испытывают фильтрат на содержание белка переслаиванием концентрированной HNO_3 или прибавлением $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ к жидкости, сильно подкисленной уксусной кислотой. Таким образом достигают полного удаления белка. Если хотят предварительно определить количество кислоты, потребное для полного удаления белка из данного раствора, то отмеривают несколько равных порций испытуемой жидкости и в каждую из них, кроме первой, прибавляют по каплям 1% уксусную кислоту так, чтобы в каждой следующей пробе было на 1 каплю кислоты больше, чем в предыдущей. Кипятят. Каждую порцию отфильтровывают от осадка белка и испытывают фильтрат на содержание белка. Зная, сколько пошло кислоты для полного осаждения белка в пробе, вычисляют количество кислоты, нужное для полного удаления белка из всей жидкости.

ГЛАВНЕЙШИЕ ОТЛИЧИТЕЛЬНЫЕ СВОЙСТВА АЛЬБУМИНОВ, ГЛОБУЛИНОВ, КИСЛОТНЫХ И ЩЕЛОЧНЫХ АЛЬБУМИНАТОВ

I. Простые первичные белки

Альбумины—богатые серой (1,6—2,2%), не дающие при гидролизе гликокола, растворимые в воде белки. Альбумины не осаждаются из водных растворов разбавленными кислотами, едкими и углекислыми щелочами, осаждаются при насыщении серноокислым аммонием или смесью хлористого или серноокислого натрия и серноокислого магния; средними солями щелочных металлов [за исключением $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] осаждаются только при кислой реакции. При кипячении в присутствии средних солей свертываются.

Глобулины. В их состав входит 10—15% гексоновых оснований, гликокол; серы они содержат меньше, чем альбумины (однако не менее 1%), и кислотный характер в них выражен сильнее, чем у альбуминов. Глобулины в воде нерастворимы**, но растворяются в 8—15% растворах средних солей, например NaCl , NH_4Cl , MgSO_4 , и выпадают при достаточном разбавлении водой или при диализе этих растворов.

* Если испытуемая жидкость имеет щелочную или сильно кислую реакцию, ее предварительно нейтрализуют на лакмус.

** Исключением являются растворимые в воде и не выпадающие при насыщении NaCl α - и β -кристаллины, содержащиеся в хрусталике глаза, тиреоглобулин—глобулин щитовидной железы, обладающий действием, свойственным последней, а также многие растительные глобулины, не выпадающие при насыщении MgSO_4 и требующие большей концентрации $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, чем необходимо для полунасыщения.

Нейтральные солевые растворы глобулинов свертываются при кипячении. Глобулины растворимы в разбавленных кислотах и щелочах и выпадают при нейтрализации. Большинство глобулинов осаждается из растворов при полунасыщении сернокислым аммонием (стр. 12), при насыщении другими щелочными солями или $MgSO_4$ при нейтральной реакции. Глобулины осаждаются спиртом легче, чем альбумины.

Миозин

Свойствами, типичными для группы глобулинов, обладает миозин мышечной ткани.

Для его получения свежее мясо очищают от соединительной ткани и жира, пропускают через мясорубку и извлекают двойным количеством дистиллированной воды. Водную вытяжку пропускают через редкое полотно, а затем фильтруют через фильтровальную бумагу. Извлеченное водой мясо настаивают в течение одних суток с равным количеством 15% раствора NH_4Cl . Солевую вытяжку фильтруют через фильтровальную бумагу и с фильтратом проделывают приводимые ниже реакции.

а) В пробирку с дистиллированной водой прибавляют несколько капель солевой вытяжки,—образуется рыхлый осадок миозина. Его отфильтровывают и промывают водой, разбалтывают в воде и разделяют на 2 части: в одной растворяют миозин добавлением нескольких капель разбавленной кислоты, в другой—небольшим количеством разбавленной щелочи; наблюдают выпадение осадка миозина при нейтрализации полученных растворов (индикатор—несколько капель раствора лакмуса).

б) К части вытяжки прибавляют равный объем насыщенного раствора $(NH_4)_2SO_4$ (полунасыщение),—образуется осадок миозина.

в) Часть вытяжки насыщают порошком $NaCl$,—выпадает миозин.

г) Вытяжка свертывается при кипячении.

Относительно разделения глобулинов и альбуминов яичного белка см. стр. 12 (п. 5).

II. ИЗМЕНЕННЫЕ БЕЛКИ

Кислотные альбуминаты образуются при действии на белки кислот (из глобулинов легче, чем из альбуминов). При этом усиливается основной характер белка; способность связывать кислоты повышается примерно на 20%. Свернутые белки переходят в кислотные альбуминаты лишь при нагревании или при действии крепких

кислот. Кислотные альбуминаты нерастворимы в воде и в растворах средних солей средней концентрации (отличие от глобулинов), легко растворимы в разбавленных кислотах, едких и углекислых щелочах. Из кислых растворов выпадают при добавлении щелочей до слабокислой на лакмус реакции и из растворов в щелочах—при добавлении кислоты до слабощелочной реакции (отличие от щелочных альбуминатов). Кислотные альбуминаты выделяются при насыщении солями щелочных металлов в кислой среде, осаждаются избытком минеральных кислот, свертываются при нагревании лишь в присутствии средних солей*; при умеренном нагревании с едкими или углекислыми щелочами переходят в щелочные альбуминаты.

Щелочные альбуминаты образуются при действии на белки едких щелочей, что сопровождается отщеплением аммиака и сероводорода; щелочные альбуминаты могут не давать ввиду этого реакций на слабосвязанную серу и не могут быть переведены в кислотные альбуминаты. Они нерастворимы в растворах средних солей (отличие от глобулинов), очень мало растворимы в воде и спирте; в разбавленных кислотах, едких и углекислых щелочах растворяются легко, не свертываются при кипячении этих растворов. Из кислых растворов выделяются при нейтрализации, из щелочных—при добавлении кислоты до слабокислой на лакмус реакции (отличие от кислотных альбуминатов). Из кислых растворов выпадают при насыщении средними солями; из щелочных растворов с трудом или совсем не выделяются. Осаждаются концентрированными минеральными кислотами. Щелочные альбуминаты являются кислотами; их водные взвеси реагируют кисло на лакмус, вытесняют угольную кислоту из карбонатов щелочных земель, растворяясь при этом с образованием соединений с соответствующим металлом (отличие от кислотных альбуминатов). Щелочные альбуминаты вращают плоскость поляризации света влево сильнее, чем исходные белки.

А. Действие кислот на белок куриного яйца

1. К неразбавленному куриному белку прибавляют $\frac{1}{3}$ объема ледяной уксусной кислоты и тщательно перемешивают; при стоянии образуется студнеобразный осадок кислотного альбумината. Студнеобразную массу разбавляют водой, хорошо перемешивают, отфильтровывают от небольшого нерастворяющегося осадка и нагревают до кипения—свертывания не наступает.

* Ср. реакции по осаждению белков кипячением с уксусной кислотой.

2. К части охлажденного раствора прибавляют несколько капель раствора лакмуса и затем по каплям разведенный раствор едкого натра; осадок кислотного альбумината образуется, когда реакция является еще слабoкислой. Жидкость с осадком разделяют на 2 части:

а) к одной прибавляют по каплям насыщенный раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ —осадок не растворяется ни при какой концентрации соли (отличие от глобулинов);

б) к другой прибавляют несколько капель раствора едкого натра—осадок растворяется; при добавлении кислоты осадок снова появляется еще при слабoщелочной реакции.

3. Другую часть охлажденного раствора насыщают порошком NaCl или MgSO_4 —образуется осадок альбумината.

Б. Действие щелочей на белок куриного яйца

1. К неразбавленному яичному белку прибавляют по каплям крепкого раствора едкого натра при перемешивании палочкой—образуется студенистый осадок щелочного альбумината. Массу разбавляют водой и нагревают до кипения—свертывания не наступает.

2. К части охлажденного раствора прибавляют несколько капель раствора лакмуса и затем по каплям разбавленный раствор уксусной кислоты до образования осадка щелочного альбумината; осаждение происходит при слабoкислой реакции; при этом ясно различим запах сероводорода*. Жидкость с осадком разделяют на 2 части:

а) к одной прибавляют по каплям насыщенного раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ —осадок не растворяется (отличие от глобулинов);

б) к другой прибавляют избыток разбавленной уксусной кислоты—осадок растворяется; при добавлении щелочей до слабoкислой на лакмус реакции щелочной альбуминат снова выпадает.

3. К другой части первоначального раствора прибавляют разбавленной уксусной кислоты почти до полной нейтрализации и затем насыщают порошком NaCl —образуется осадок щелочного альбумината.

* В отношении отщепления аммиака и сероводорода при нагревании белка с едкими щелочами см. реакцию на слабoсвязанную серу (цветные реакции на белок).

ДИАЛИЗ БЕЛКА

Диффузия растворенного вещества в чистый растворитель обусловлена осмотическим давлением. Это давление у растворов белка очень мало, и поэтому белки диализируют чрезвычайно медленно, так что их можно практически считать неспособными к диализу. Скорость диффузии зависит также от свойств перепонки; чем богаче перепонка коллоидами, чем она беднее водой, тем медленнее происходит диффузия.

В диализатор* помещают раствор яичного альбумина в 5% растворе NaCl и заливают толуолом. Через сутки исследуют наружную жидкость (диализат) на присутствие хлоридов прибавлением HNO_3 и AgNO_3 и убеждаются в отсутствии в нем белка при помощи биуретовой реакции. Если подвергать диализу раствор миозина или какого-либо другого глобулина в растворе средней соли, то после достаточно долгого диализа происходит осаждение глобулина в диализируемой жидкости вследствие понижения в ней содержания солей.

Ускорению диализа способствуют: 1) увеличение диффузионной поверхности, 2) повышение t -ры, 3) частое перемешивание диализируемой жидкости, 4) частая смена воды в наружном сосуде, так как диффузия идет тем быстрее, чем больше разность концентраций способных к диффузии веществ в наружной и во внутренней жидкости, и 5) сгущение некоторое время подвергавшейся диализу жидкости выпариванием в вакууме (см. гидролиз белков) или на водяной бане

* Диализатор представляет невысокий широкий цилиндр (например банка с отрезанным дном), с дном из натянутой влажной пергаментной бумаги, плотно привязанной нитью так, чтобы была исключена возможность затекания жидкости из диализатора. Цилиндр помещают в более широкий сосуд, наполненный дистиллированной водой, которую меняют ежедневно или даже чаще. Вместо описанного диализатора можно для диализа также применять сделанный из пергаментной бумаги складчатый фильтр или коллодийный мешочек. Последний готовят следующим образом: в короткую широкую пробирку наливают 5—10 см³ коллодия и выливают обратно, вращая пробирку так, чтобы покрыть все ее стенки слоем коллодия. Вращением пробирки в горизонтальном положении распределяют коллодий по стенкам по возможности равномерно. Когда пленка начинает мутнеть и запах эфира ослабевает, снова наливают коллодий, быстро выливают и, вращая пробирку, дают образоваться пленке. Через несколько минут, когда запах эфира почти исчезнет, наливают в пробирку воду, оставляют 1 минуту и выливают. Отделяют края коллодийного мешочка от стенок пробирки, наливают между стенками мешочка и пробирки воду, которая отслаивает мешочек. Если коллодий плотно пристал к стенке его осторожно отделяют оплавленным капилляром. Вынув, мешочек наполняют водой и убеждаются в его целостности.

при t -ре не выше 40° перед дальнейшим ее диализом, так как диффузия замедляется по мере уменьшения в диализируемой жидкости концентрации способного к диффузии вещества.

Умеренно диализированный (в течение 2—3 суток) белок не свертывается при кипячении, наступает лишь усиление опалезации, но свертывание происходит при последующем добавлении средних солей.

По возможности освобожденный от электролитов продолжительным диализом (5 суток и более) белок также обнаруживает отличные от обычных свойства.

Свертывается при кипячении полностью без добавления электролитов. Осаждается необратимо алкоголем. Добавление малых количеств солей щелочных или щелочно-земельных металлов препятствует свертыванию такого белка при кипячении.

ПОЛУЧЕНИЕ БЕЛКОВ В КРИСТАЛЛИЧЕСКОМ ВИДЕ *

К неразбавленному свежему яичному белку приливают понемногу равный объем насыщенного раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, хорошо перемешивая (взбивая пену) после добавления каждой порции. Через 12 часов отфильтровывают осадок яичного глобулина. К прозрачному, желтовато-красному пахнущему аммиаком фильтрату прибавляют из бюретки 1% раствор H_2SO_4 в полунасыщенном растворе $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, перемешивая после каждой капли, до образования нерастворяющейся очень слабой опалезации и оставляют стоять при комнатной t -ре на 12—24 часа. Образуется обильный осадок, состоящий из микроскопических игольчатых кристаллов яичного альбумина.

Более медленным и сложным, но дающим лучше образованные кристаллы, является следующий способ.

К прозрачному фильтрату от осадка глобулинов, полученному так, как было указано выше, прибавляют из бюретки насыщенный раствор сернокислого аммония до исчезающей мутности и затем очень медленно при постоянном помешивании 1% раствор серной кислоты. При добавлении кислоты муть сначала исчезает, затем желтоватокрасная окраска жидкости переходит в желтую и наконец выделяется объемистый аморфный осадок, который вначале при помешивании растворяется, при дальнейшем же добавлении кислоты растворяется все труднее. Кислоту при-

* Кристаллы белка представляют собой, по видимому, псевдокристаллы, так как не вызывают интерференции рентгеновских лучей.

бавляют до исчезающей опализации и оставляют затем жидкость стоять при комнатной температуре, помешивая время от времени*. Кристаллизация начинается обычно через 1 час и заканчивается в течение 2—5 суток.

Для очищения полученные кристаллы отфильтровывают, промывают 1 раз раствором сернокислого аммония**, растворяют в небольшом количестве воды, фильтруют и вновь осаждают насыщенным раствором $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, который прибавляют до появления исчезающего при помешивании осадка (а не мути). Осадок вскоре делается кристаллическим (таблица II, рис. 1).

Таким же путем получают кристаллы сывороточного альбумина (табл. II, рис. 2).

ВРАЩЕНИЕ ПЛОСКОСТИ ПОЛЯРИЗАЦИИ СВЕТА

Для определения вращения плоскости поляризации лучей света (поляриметрии) служат поляризационные аппараты. В луче обыкновенного света колебания происходят перпендикулярно к направлению луча и притом последовательно во всех плоскостях, проходящих через эту линию. В прямолинейно же поляризованном свете колебания, оставаясь перпендикулярными к линии распространения луча, совершаются лишь в одной из таких плоскостей. Перпендикулярная к ней плоскость называется плоскостью поляризации света.

Такая прямолинейная поляризация света происходит при разных условиях, между прочим при прохождении луча через двоякопреломляющий кристалл (например известкового шпата): при этом луч разлагается на два; один из них более преломлен, чем другой. Оба луча поляризованы во взаимноперпендикулярных плоскостях, один—в плоскости так называемого главного сечения кристалла—обыкновенный луч, другой—в плоскости, к нему перпендикулярной,—необыкновенный луч. Чтобы получить свет полностью поляризованный, необходимо удалить один из этих лучей из поля зрения. Это достигается применением николевой призмы, представляющей собою ромбоэдр известкового шпата, разрезанный по диагонали через тупые углы и склеенный канадским бальзамом. Обыкновенный луч претер-

* Наиболее благоприятной для кристаллизации является рН 4,58.

** Для определения нужной концентрации сернокислого аммония в промывной жидкости поступают следующим образом: в несколько пробирок, содержащих по 10 см³ насыщенного раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, прибавляют возрастающие количества воды и затем по несколько куб. сантиметров фильтрата. Для промывания употребляют наименьшее разведение, при котором уже не происходит помутнения фильтрата.

пекает полное внутреннее отражение от канадского бальзама и вследствие этого не попадает в поле зрения. Необыкновенный же луч проходит и является полностью поляризованным: его колебания совершаются в плоскости главного сечения кристалла.

В состав поляризационного аппарата входят поляризатор и анализатор. Поляризатор делает обыкновенный свет линейно поляризованным, а анализатор позволяет определить направление плоскости поляризации света.

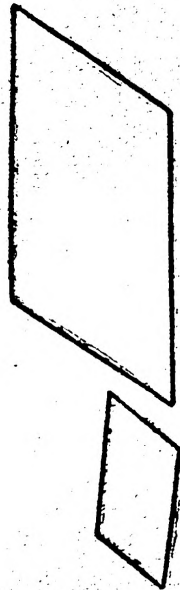


Рис. 1.

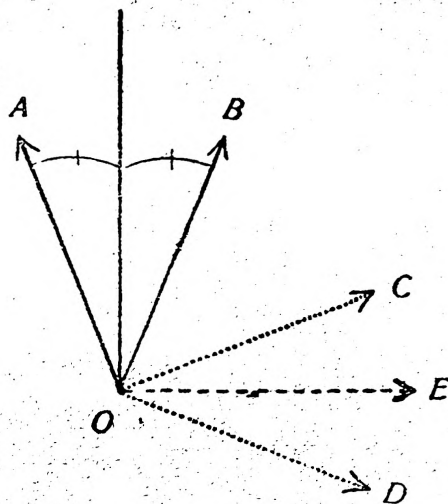


Рис 2.

В полутеневых аппаратах поляризатором служат 2 никелевые призмы (рис. 1), расположенные под острым углом (не более 3°) друг к другу одна перед другой; передняя, меньшая, поставлена так, что делит поле зрения пополам: в одну половину свет проходит лишь через заднюю призму, в другую — через обе призмы; при прохождении луча через вторую, стоящую под углом призму плоскость поляризации претерпевает некоторое добавочное вращение.

Положим, что плоскость колебания света, прошедшего большой николь-поляризатор, есть OA , прошедшего кроме того маленький николь— OB (рис. 2). Если на пути этих лучей поставить николь-анализатор, то при таком положении его, что плоскость колебаний луча, через него проходящего (плоскость главного сечения),— OC перпендикулярна к OA , луч с колебаниями в плоскости OA совершенно не будет проходить и соответственная половина поля зрения окажется темной. Если плоскость главного сечения анализатора будет перпендикулярна к OB (положение OD), то темной будет другая половина поля зрения. Равномерное освещение наступит, когда плоскость

колебаний анализатора образует равные углы с плоскостями колебаний в обеих половинах поля зрения, т. е. когда плоскость колебаний анализатора будет перпендикулярна к биссектрисе угла AOB (положение OE), тогда через прибор проходит лишь небольшое количество света (отсюда и название: „полутеневые“ аппараты). Такое положение анализатора называется нулевой точкой, она обычно не совпадает с нулем шкалы.

Наиболее резкое изменение интенсивности освещения обеих половин поля зрения при небольшом вращении анализатора получается, когда угол AOB возможно мало отличается от нуля. Однако произвольному уменьшению этого угла ставит предел наступающее при этом ослабление интенсивности освещения поля зрения.

Перед определением нулевой точки надлежит, изменяя положение малой призмы, найти угол наиболее благоприятный в смысле чувствительности при достаточной яркости поля зрения.

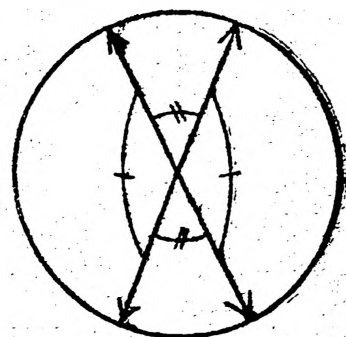


Рис. 3.

При вращении анализатора плоскость колебаний анализатора 4 раза устанавливается перпендикулярно к биссектрисам углов, образованных направлениями колебаний обоих поляризованных лучей (рис. 3). Биссектриса делит два вертикальных острых угла и два тупых. Из изложенного выше следует, что измерение надлежит производить только в положении плоскости колебаний анализатора, перпендикулярном к биссектрисе острых углов; это соответствует нулевой точке возле 0 и 180° шкалы

Сначала, вращая анализатор в ту или другую сторону, устанавливают равномерность освещения поля зрения без испытуемого вещества и производят отсчет по делениям круга и нониуса, вращающегося вместе с анализатором.

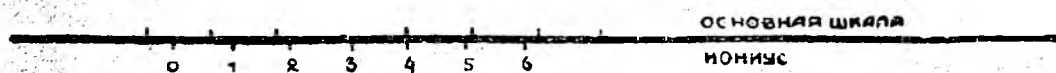


Рис. 4.

Если например каждое деление нониуса равно $\frac{9}{10}$ деления основной шкалы и если, допустим, совпадает 4-е деление нониуса с каким-нибудь делением шкалы, то это значит, что нуль нониуса отстоит на 0,4 деления от соответственного деления шкалы (рис. 4).

$$x = \frac{4 \cdot 10}{10} - \frac{4 \cdot 9}{10} = \frac{4}{10}.$$

Делают такие определения еще 3—5 раз, причем попеременно подходят к нулевой точке при одном определении—по направлению движения часовой стрелки, при другом определении—в обратном направлении. Берут среднее арифметическое из найденных величин (отбрасывая определения, по случайным причинам значительно отклоняющиеся от остальных) и таким путем находят нулевую точку. Затем между поляризатором и анализатором помещают трубку с оптически деятельным веществом. Направление колебаний как в правой, так и в левой половине поля зрения повернется на некоторый угол, вследствие чего произойдет изменение в освещении обеих

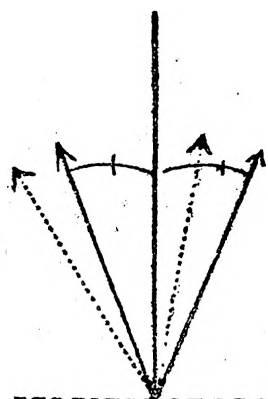


Рис. 5.

половин поля зрения (рис. 5). На такой же угол и в ту же сторону необходимо повернуть анализатор для восстановления равномерности освещения. Этот угол и будет равен углу вращения данного раствора. Угол отсчитывают несколько раз, как при определении нулевой точки.

Если например для достижения равномерного освещения поля зрения пришлось повернуть анализатор на некоторый угол a° и нулевая точка оказалась смещенной в том же направлении на угол b° , то искомый угол вращения плоскости поляризации $\alpha = a^\circ - b^\circ$; если же нулевая точка смещена в обратном направлении, то $\alpha = a^\circ + b^\circ$.

Вещество называют правовращающим, если для восстановления равномерного освещения анализатор приходится повернуть по направлению движения часовой стрелки на меньший угол, чем в противоположном направлении; для левовращающего вещества отношения обратные. Правое вращение обозначают знаком $+$, левое знаком $-$ *

Наблюдаемый угол α тем больше, чем концентрированнее раствор и чем длиннее столб жидкости, через который проходит свет. Результаты определения обычно выражают в виде удельного вращения $[\alpha]$: угла вращения раствора, содержащего в 1 см^3 1 г оптически деятельного вещества, при толщине слоя жидкости в 10 см. Удельное

* При определении направления вращения неизвестного вещества производят несколько определений при различных разведениях, так как вещество, сильно вращающее, может настолько повернуть плоскость поляризации, что для достижения равномерного освещения поля зрения нужно будет повернуть анализатор в направлении вращения вещества на угол больший, чем в противоположном направлении. Исследование растворов различной концентрации устраняет возможность этой ошибки.

вращение вычисляется по формуле $[\alpha] = \pm \frac{\alpha \cdot 100}{l \cdot c}$, где α — наблюдаемый угол вращения плоскости поляризации, c — концентрация раствора, т. е. количество граммов вещества в 100 см³ раствора, l — толщина слоя жидкости, выраженная в дециметрах. Удельное вращение меняется с изменением длины волны света и с изменением t -ры; поэтому определения производят в монохроматическом свете* и учитывают температуру; последнюю (t) обозначают цифрой, помещенной справа вверху при $[\alpha]$, длину волны (λ), или соответствующее ей обозначение фраунгоферовой линии (приложение 6) — справа внизу: $[\alpha]_{\lambda}^t$. При одних и тех же условиях $[\alpha]$ является величиной постоянной и характерной для каждого оптически деятельного вещества. Зная удельное вращение, можно определять концентрацию вещества по формуле

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

если в растворе не содержится других оптически деятельных веществ. Удельное вращение обыкновенно несколько изменяется с изменением концентрации раствора, что принимают в расчет, добавляя поправочные члены. При производстве определения необходимо соблюдать следующие условия.

Исследуемая жидкость должна быть профильтрована, прозрачна и по возможности бесцветна; слегка желтая окраска, в противоположность красной и бурой, мало вредит точности определения. Длину трубки выбирают в зависимости от прозрачности и степени окрашенности жидкости; так как определение тем более точно, чем длиннее слой жидкости, проходимый светом, то употребляют возможно более длинную трубку, однако так, чтобы изменения в интенсивности освещения обеих половин поля зрения были достаточно резко заметны**. Трубка должна быть сухой или ополоснутой испытуемой жидкостью. Закрытую с одного конца трубку наполняют жидкостью так, чтобы жидкость

* Для получения натриевого монохроматического света обыкновенно пользуются бунзеновской горелкой, в пламя которой на платиновой сетке или желобке вводят сплавленный NaCl. Для освобождения натриевого света от примесей ставят на его пути 6% раствор K₂Cr₂O₇.

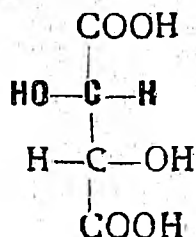
** Трубки для исследования оптически деятельных жидкостей делают стеклянные, различной длины, чаще всего применяются трубки в 10 и 20 см. С обеих сторон они закрываются стеклянными кружками, прижимаемыми к краям трубки навинчивающимися металлическими гильзами. Не следует слишком сильно завинчивать гильзы, так как появляющееся в стекле от давления двойное преломление мешает определению; явление двойного преломления наблюдается во всяком аморфном веществе при неравномерном его натяжении или давлении на него.

стояла куполом, и сухим стеклянным кружком срезают выступающую часть жидкости; при этом следят, чтобы под кружком не образовалось пузыря воздуха, так как он может вызвать затемнение поля зрения вследствие полного внутреннего отражения от него лучей света. Иногда у трубок делают расширение одного конца с тем, чтобы пузырек, если он образовался, не попадал в поле зрения. Источник света должен быть поставлен на таком расстоянии, чтобы его изображение получалось в плоскости диафрагмы анализатора; для этого у диафрагмы анализатора держат лист белой бумаги, а перед самым источником света—конец иглы; источнику света вместе с иглой придают такое положение, чтобы получить резкое изображение конца иглы у диафрагмы анализатора. Затем устанавливают окуляр на лучшую видимость и производят определение нулевой точки. После того как вложена трубка с исследуемой жидкостью, надо вновь установить окуляр, так как фокус при этом смещается.

Все белки (за исключением искусственно рацемизованных) вращают плоскость поляризации света. Это обусловлено тем, что каждая из входящих в их состав аминокислот (за исключением гликокола) содержит не менее одного асимметрического атома углерода (α -углеродный атом), причем все до сих пор изученные аминокислоты имеют одинаковую конфигурацию, все они относятся к l-ряду*. Большинство белков вращает влево; правовращающими являются гемоглобин и неуклеопротеиды, что обусловлено их небелковым компонентом. Удельное вращение белков меняется от прибавления кислот и щелочей.

Для исследования вращения плоскости поляризации к белку куриного яйца прибавляют немного воды и порошка поваренной соли, размешивают и фильтруют через складчатый фильтр.

* Исходят из конфигурации винных кислот. В зависимости от пространственного расположения 4 различных групп у определенного асимметрического C-атома объединяют одинаково построенные соединения в группы. Для всех соединений, относящихся к d- или l-ряду, сохраняют обозначения d или l независимо от того, вращают ли они вправо или влево.

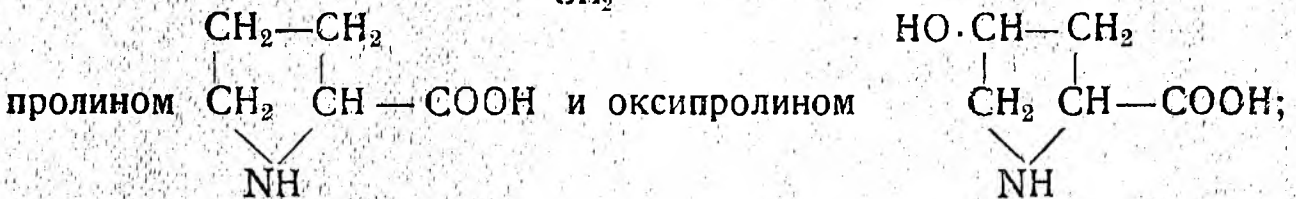


l-винная кислота

ГИДРОЛИЗ БЕЛКОВ

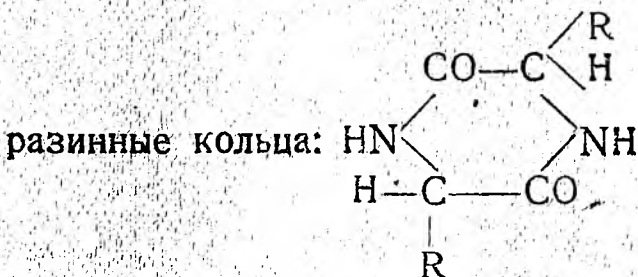
Расщепление молекул органических соединений на более простые части может быть вызвано различными способами—в особенности же путем гидролиза, т. е. расщепления под влиянием присоединения элементов частиц воды. Гидролиз может быть вызван прямым нагреванием с водой, но значительно легче идет под влиянием нагревания с кислотами и щелочами. И по отношению к белкам гидролиз явился главным методом, давшим возможность ближе подойти к изучению их химического строения, причем особенно важные результаты были получены при изучении продуктов кислотного и ферментативного гидролиза белков.

В белковой молекуле имеются следующие виды связи между аминокислотами: 1) наиболее простой и несомненно наичаще встречающейся является пептидная связь: α -аминогруппа одной аминокислоты соединяется с карбоксильной группой другой аминокислоты, причем отщепляется вода и образуется пептидная группа— $\text{CO}\cdot\text{NH}$ —; 2) пролинпептидная связь $-\text{CON}\begin{matrix} \text{CH}_2- \\ \text{CH}_2- \end{matrix}$, образованная аминокислотами:



кроме этого в белковой молекуле имеются следующие виды связи между атомами углерода и азота: 3) $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{:NH})-$ (в аргинине),

4) $-\text{C}\begin{matrix} \text{O} \\ // \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$ (амиды кислот)* и 5) свободные аминогруппы, стоящие у конечных углеродных атомов лизина и аргинина. Некоторые исследователи полагают, что в белковой молекуле, в особенности в альбуминоидах, имеются циклические группировки, например дикетопипе-



При кислотном гидролизе помимо аминокислот и иминопроизводных (пролина и оксипролина) образуется аммиак, глюкозамин и в качестве

* Одна карбоксильная группа двуосновных аминокислот (аспарагиновой и глутаминовой) находится в белках в форме амидов кислот, отщепляющих при гидролизе аммиак.

вторичных продуктов угольная кислота, сероводород, фурфурол, так называемые меланоидины (гумины)* и некоторые другие вещества, а при щелочном гидролизе также ацетальдегид. Промежуточными продуктами гидролиза являются различные переходные формы от истинных белков до аминокислот: среди них альбуминаты, альбумозы (и пептоны) и более простые полипептиды.

В большинстве случаев для гидролиза применяют соляную или серную кислоту. Производя расщепление, они ведут в то же время к образованию меланоидиновых веществ. При желании избежать темного окрашивания во время гидролиза прибавляют понемногу двухлористого олова для восстановления меланоидинов, впрочем это обесцвечивание несущественно, так как не отражается на результатах.

При гидролизе соляной кислотой кипятят 6—12 часов с 3—4-кратным по весу количеством 37% кислоты; при употреблении серной кислоты кипятят 12—20 часов с 5—10-кратным количеством 25—30% кислоты. Гидролиз продолжают до исчезновения биуретовой пробы** как с жидкостью, так и с нерастворимым остатком, всегда сохраняющимся и по окончании гидролиза.

Изолирование отдельных аминокислот разбивается на следующие части: 1) тирозин и цистин, как вещества труднорастворимые в воде, выпадают в виде осадка при нейтрализации гидролизата; 2) диаминокислоты и гистидин (гексоновые основания) осаждаются фосфорно-вольфрамовой кислотой; 3) моноаминокислоты переводят в хлористые соли их сложных эфиров, затем выделяют свободные эфиры и разделяют дробной перегонкой в высоком вакууме; 4) триптофан почти весь разрушается при кислотном гидролизе; поэтому его выделяют после гидролиза трипсином дробным осаждением 10% раствором HgSO_4 в 5% серной кислоте. Известно распределение примерно $\frac{3}{4}$ общего количества азота белка (в аминокислотах и прочих продуктах распада). Ниже приведены как наиболее простые способы выделения цистина и тирозина.

* Меланоидины—близкие меланинам, очень мало изученные, переменного состава, азотсодержащие вещества, бурого или черного цвета, нерастворимые в кислотах, растворяющиеся в щелочах. В их образовании по видимому участвуют триптофан и углеводная группа.

** Отрицательный результат биуретовой пробы является довольно убедительным, но все же не несомненным признаком окончания гидролиза, так как уже следующие за пептонами продукты расщепления белка ее не дают. Расщепление можно считать действительно законченным при отсутствии увеличения количества свободных амидных и карбоксильных групп, определенном в двух пробах гидролизата, взятых через некоторое время одна после другой (см. гл. XII).

Выделение цистина

Для выделения цистина берут богатые кератином вещества: волосы (кератин человеческих волос содержит 11,6% цистина, 3,3% тирозина), шерсть (овечья—7,3% цистина, 2,9% тирозина), рога (6,8—7,5% цистина, 4,6% тирозина).

100 г шерсти или волос нагревают с 200 см³ концентрированной соляной кислоты в колбе с обратным холодильником сначала на кипящей водяной бане до растворения*, а затем кипятят на песчаной бане или осторожно на голом огне в течение 3—5 часов до исчезновения биуретовой реакции.

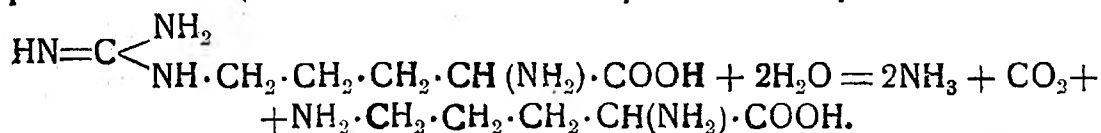
Для производства биуретовой пробы 1 см³ гидролизата сильно подщелачивают едким натром, разбавляют водой до бледной окраски и осторожно переслаивают очень разбавленным (почти бесцветным) раствором CuSO₄. Если получается розовое или фиолетовое кольцо, гидролиз продолжают. По окончании гидролиза в гидролизате открывают аммиак: 1 см³ жидкости смешивают с избытком жженой магнезии (MgO) или подщелачивают содой** и кипятят; выделение аммиака определяют: 1) по запаху, 2) по посинению влажной красной лакмусовой бумажки, поднесенной к отверстию пробирки, 3) по почернению фильтровальной бумажки, смоченной раствором Hg₂(NO₃)₂.

По окончании гидролиза колбу снимают с огня и к горячей жидкости прибавляют сухого уксуснокислого натрия (260—300 г) до исчезновения кислой реакции на конго. Оставляют стоять на 3—5 дней***, затем отсасывают полученный осадок.

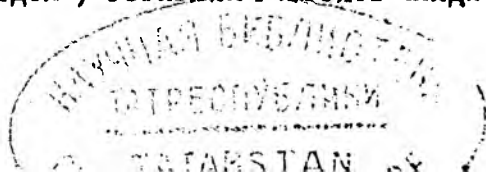
Для отсасывания служат фарфоровые воронки Бухнера с сетчатым дном или стеклянные воронки со вложенной продырявленной пластинкой. Сетчатую часть покрывают кружком фильтровальной бумаги. Воронку при помощи просверленной каучуковой пробки вставляют в толстостенную стеклянную колбу (или пробирку), в которой воздух разрежают водоструйным насосом (рис. 6).

* При этом достигается довольно глубокое расщепление белков, так что при дальнейшем кипячении жидкость не пенится.

** Едкие щелочи в данном случае неприменимы, так как вызывают разложение аргинина с отщеплением аммиака и образованием орнитина:



*** Чем дольше (до 3 недель) оставляют стоять жидкость, тем больше выделяется цистина.



Осадок промывают холодной водой, растворяют в 3% соляной кислоте и жидкость кипятят в течение 10 минут с 20 г

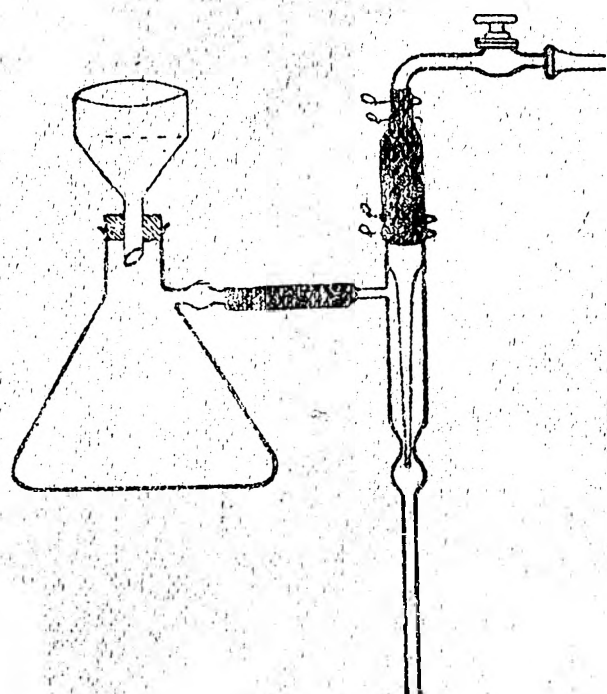


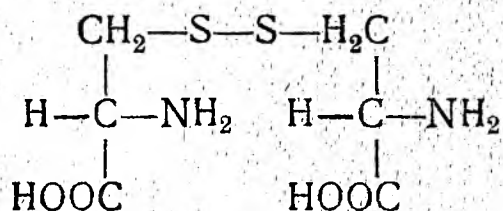
Рис. 6.

чистого животного угля, не содержащего фосфорнокислой извести*. Фильтруют, бесцветный фильтрат нагревают до кипения и к нему прибавляют понемногу, избегая избытка, горячий концентрированный раствор уксуснокислого натрия до исчезновения кислой реакции на конго. Образуется бесцветный кристаллический осадок цистина.

Если осадок темно окрашен, то его снова растворяют в 3% соляной кислоте и очищают как указано выше.

Или же растворяют осадок в 10% аммиаке, обесцвечивают животным углем, фильтруют и осаждают из раствора цистин осторожным добавлением ледяной уксусной кислоты.

Цистин



l-цистин ($\alpha\alpha'$ -диамино- $\beta\beta'$ -дитиомолочная кислота) кристаллизуется в виде микроскопических тонких, бесцветных 6-сторонних табличек (таб. I, рис. 8), ромбоэдров или коротких прямоугольных призм; в загрязненном состоянии часто в виде шаров. Почти нерас-

* Для приготовления чистого животного угля нечистый препарат оставляют на ночь с избытком разбавленной соляной кислоты, затем отфильтровывают и промывают холодной водой до исчезновения кислой на лакмус реакции в промывных водах.

Животный уголь обесцвечивает раствор, так как благодаря своей пористости и следовательно большой поверхности адсорбирует красящее вещество.

творим в воде (1 : 9 000 при 17°), спирте, эфире, уксусной кислоте; растворим в минеральных кислотах, щавелевой кислоте, едких щелочах, аммиаке; в углекислом аммонии нерастворим. Вращает плоскость поляризации сильно влево $[\alpha]_D = -224,3^\circ$. Медленно разлагается при 258—261°. При нагревании с едкими щелочами или баритовой водой до 75% серы цистина отщепляется в виде сернистой щелочи.

Реакции на цистин

- а) Определение формы кристаллов под микроскопом.
- б) Небольшое количество цистина кипятят с едким натром; к части жидкости прибавляют каплю раствора уксуснокислого свинца—получается бурый или черный осадок или окрашивание вследствие образования PbS . К другой части жидкости приливают несколько капель свежеприготовленного раствора нитропруссиды натрия $[Na_2Fe(CN)_5NO]$ —получается красно-фиолетовое окрашивание (реакция на S'' -ион). Жидкость не должна содержать белка, так как последний дает эти реакции (см. цветные реакции на белки).
- в) При нагревании цистина с несколькими каплями едкого натра на серебряной пластинке (монете) образуется несмывающееся черное или бурое пятно Ag_2S .

Выделение тирозина

Для выделения тирозина берут обычно шелковый очес, так как в фиброине шелка содержится около 11% тирозина.

а) Гидролиз серной кислотой

Белок нагревают при взбалтывании на кипящей водяной бане в колбе, снабженной обратным холодильником (рис. 7) или длинной восходящей стеклянной трубкой, с 5—6-кратным по весу количеством 25% серной кислоты до растворения вещества (см. примеч. на стр. 37), а затем кипятят на голом огне в течение 12—15 часов до исчезновения биуретовой реакции (стр. 37). Открывают в гидролизате аммиак. Затем отфильтровывают жидкость от меланоидных веществ, разбавляют двойным объемом воды и прибавляют до слабой, но еще ясно кислой на конго (стр. 134) реакции углекислого бария или насыщенного раствора

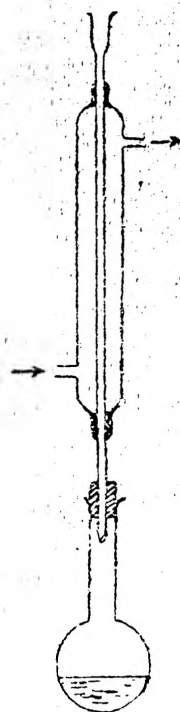


Рис. 7

едкого барита *. Осадок $BaSO_4$ отфильтровывают и промывают несколько раз горячей водой. Фильтрат вместе с промывными водами точно нейтрализуют** углекислым барием или едким баритом, снова отфильтровывают от $BaSO_4$ и осадок тщательно промывают горячей водой до исчезновения в промывных водах миллоновой реакции на тирозин. Полученную жидкость вместе с промывными водами выпаривают в чашке на водяной бане до появления кристаллической пленки на поверхности жидкости. По остывании кристаллы отфильтровывают, фильтрат сгущают, отделяют от второй порции выделившихся кристаллов и т. д.

В фиброине шелка, как и в большинстве белков (исключением являются кератины), содержание цистина настолько мало, что осадок состоит обычно из одного тирозина.

Для очищения полученное вещество растворяют в возможно малом количестве кипящей воды, прибавляют немного чистого, не содержащего фосфорнокислой извести животного угля и фильтруют горячий раствор. В тех случаях, когда в гидролизате содержится тирозин вместе с цистином (при гидролизе кератинов), первой обычно выпадает та аминокислота, концентрация которой больше, так что их можно разделить дробной кристаллизацией. Разделения можно достигнуть также при помощи очень разбавленной азотной кислоты, в которой тирозин растворяется легко, цистин же с трудом.

* Можно применять также гашеную известь; неудобство в том, что гипс ($CaSO_4$) несколько растворим в воде (около 0,2 г в 100 частях воды). Осадок гипса отсасывают и промывают водой; фильтрат обрабатывают баритом для удаления из раствора ионов SO_4^{2-} , насыщают угольной кислотой до слабокислой на лакмус реакции для осаждения Ba^{2+} и Ca^{2+} в виде углекислых солей, нагревают до кипения, отфильтровывают и промывают осадок горячей водой до исчезновения в промывных водах миллоновой реакции (см. цветные реакции на белки). Полученную жидкость (вместе с промывными водами) упаривают на водяной бане и подвергают дробной кристаллизации, как приведено в тексте.

** Щелочной реакции приходится избегать в тех случаях, когда из гидролизата помимо тирозина желают выделить цистин, который избытком щелочей разлагается.

В тех случаях, когда ограничиваются выделением лишь одного тирозина, обработка может быть значительно упрощена; к отфильтрованному от меланоидинов гидролизату прибавляют гашеной извести до слабощелочной на лакмус реакции, отфильтровывают и промывают осадок гипса, нейтрализуют фильтрат соляной кислотой и упаривают на водяной бане до появления кристаллической пленки на поверхности жидкости.

б) Гидролиз соляной кислотой

Ввиду трудности отмывания тирозина от осадка $BaSO_4$, можно гидролиз производить соляной кислотой, большую часть которой затем удаляют выпариванием под уменьшенным давлением (в вакууме) во избежание окисления тирозина. Остаток нейтрализуют аммиаком. Выделившийся тирозин обесцвечивают животным углем и перекристаллизовывают из горячей воды.

Вакуум-перегонка. Вакуум-перегонку обычно применяют в присутствии веществ, разлагающихся при обычном давлении вблизи их t -ры кипения (или t -ры кипения растворителя) или легко окисляющихся. Вакуум допускает быстрое выпаривание жидкости при значительно более низкой, чем в обычных условиях, температуре и при почти полном отсутствии воздуха.

Вакуум-перегонку производят в аппарате (рис. 8), составленном из двугорлой колбы Клайзена и приемника, который сообщается с насосом (обычно водоструйным), откачивающим из системы воздух. Давление измеряется при помощи манометра. Через вставленную в горло колбы стеклянную трубку, несущую наверху каучуковую трубку и заканчивающуюся у дна колбы капилляром, просасывается во все время

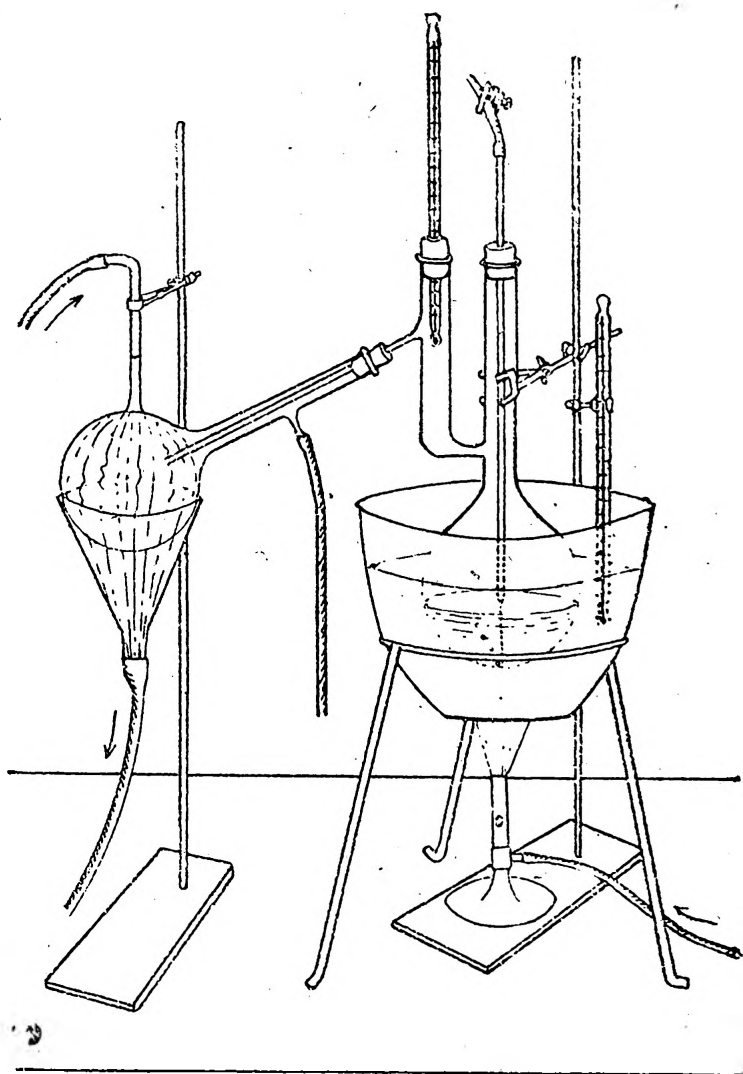


Рис. 8.

перегонки отдельными пузырьками слабая струя воздуха, обуславливающая ровное кипение жидкости; ток воздуха регулируется зажимом, надетым на каучуковую трубку. В другое горло колбы, если надо, вставляют термометр для измерения t -ры паров; верхняя часть шарика термометра должна находиться на уровне нижнего края отводной трубки. Все части при-

бора соединяются при помощи каучуковых трубок и не должны пропускать воздуха по месту соединений. Нагревание перегоняемой жидкости производят в водяной или масляной бане, причем т-ра бани не должна более, чем на 20° , превышать т-ру перегоняющихся паров. Перегонка ускоряется, если конденсировать пары, охлаждая приемную колбу водой из водопровода. Если желают возможно полнее собрать перегон, то между колбой и приемником включают холодильник. По окончании перегонки перед тем, как закрыт насос, в систему впускают воздух или через трубку, кончающуюся капилляром, или через отводную трубку приемной колбы.

Тирозин

1 - тирозин (р-оксифенил- α -аминопропионовая кислота)

$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2\cdot\text{CH}(\text{NH}_2)\cdot\text{COOH}$ кристаллизуется в виде микроскопических бесцветных, с шелковистым блеском тонких игол, собранных в виде снопов или шаров (табл. I, рис. 7b); в очень загрязненном состоянии может кристаллизоваться в виде концентрически и радиально исчерченных шаров, напоминающих лейцин. Тирозин очень трудно растворим в холодной воде (1 часть в 2454 частях воды при 20° ; 1:154 при 100°), легче растворим в едких щелочах, аммиаке, минеральных кислотах; нерастворим в спирте. Трудно растворим в ледяной уксусной кислоте: 100 частей ледяной $\text{CH}_3\cdot\text{COOH}$ растворяют при кипячении 0,18 частей тирозина; этим свойством пользуются для количественного отделения растворимого в ледяной уксусной кислоте лейцина от тирозина, причем до кипячения с кислотой прибавляют равный объем спирта. $[\alpha]_{\text{D}} = -12,56^{\circ}$; $-13,2^{\circ}$ (раствор в 4% HCl). Т-ра разложения $310-314^{\circ}$. При горении издает запах жженого рога. Тирозин является исходным веществом для образования в организме фенолов, находимых в моче.

Реакции на тирозин

а) Исследование формы кристаллов под микроскопом.

б) К нескольким кристаллам тирозина в пробирке прибавляют немного воды, несколько капель реактива Миллона и нагревают; получается красное окрашивание, через некоторое время выделяется краснобурый осадок.

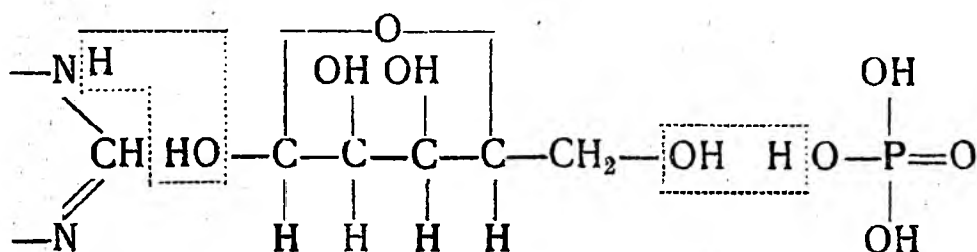
в) Проба Мёрнера (Mörner). При нагревании до кипения небольшого количества тирозина (в сухом виде или в растворе)

с несколькими куб. сантиметрами смеси 1 объема формалина с 45 объемами воды и 55 объемами концентрированной H_2SO_4 (смесь стойкая) появляется красивое зеленое окрашивание жидкости, долго не исчезающее. Эта реакция является характерной для тирозина, так как ни фенолы, ни белки ее не дают.

О различных видах белков см. Неклеопротеиды (гл. II), Кровь (гл. IX), Молоко (гл. X), Соединительная ткань (гл. XI), Пищеварительные соки (гл. XII), Моча (гл. XIII). О превращениях белков в организме см. Пищеварение (гл. XII), Моча (гл. XIII), Ферменты (гл. VII).

НУКЛЕОПРОТЕИДЫ

Нуклеопротеиды — соединения белков с нуклеиновыми кислотами. Участвующие в их образовании нуклеиновые кислоты построены из остатков нескольких (обычно 4) нуклеотидов — эфиробразных соединений фосфорной или пиррофосфорной кислоты с углеводом (пентозой: d-рибозой или l-дезоксирибозой)*, глюкозидоподобно связанным с пуриновым или пиримидиновым основанием:



Нуклеотиды соединяются друг с другом эфирной связью, образованной углеводной группой одного нуклеотида и остатком фосфорной кислоты другого. Нуклеиновые кислоты (в нуклеопротеидах) соединяются с белком по видимому через остаток фосфорной кислоты.

Нуклеопротеиды большей частью нерастворимы в воде, растворяются в щелочах (при этом изменяются), при слабом подкислении снова выпадают. В минеральных кислотах, даже очень разбавленных, легко растворяются. В слабокислой от уксусной кислоты среде осаждают белки; дают реакции на белки цветные и по осадению, поскольку их дает белковая составная часть молекулы. Плоскость поляризации света вращают вправо, за исключением левовращающего нуклеопротеина.

* В настоящее время подтверждена правильность для моноз циклических форм Толленса (Tollens) и установлено в них положение кислородных мостиков.

При кислотном гидролизе происходит расщепление нуклеопротеидов на белок, фосфорную кислоту, пуриновые и пиримидиновые основания; углеводная группа отщепляется как таковая или служит источником образования левулиновой ($\text{CH}_3 \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COOH}$) и муравьиной кислот. Открытие нуклеопротеидов обычно сводится к доказательству присутствия указанных веществ среди продуктов гидролиза.

При отщеплении от нуклеотида фосфорной кислоты образуется нуклеозид—соединение пуринового или пиримидинового основания с углеводным остатком.

Нуклеопротеиды являются необходимой составной частью клеточных ядер, ввиду чего содержание их особенно велико в органах и тканях, богатых клеточными ядрами, например в зобной, панкреатической, лимфатических железах, селезенке, печени, дрожжах и т. д.

О превращениях нуклеопротеидов в организме см. в гл. XIII раздел о мочевой кислоте.

Выделение нуклеопротеидов из дрожжей

40—50 г прессованных дрожжей смешивают в ступке с песком, 5 см³ эфира и 10 см³ воды и тщательно растирают 5—10 минут, добавляя понемногу еще 1—2 см³ воды так, чтобы смесь стала относительно жидкой. Содержимое ступки переносят в склянку, ступку ополаскивают 0,4% раствором едкого натра и доводят им объем жидкости до 125 см³, заливают жидкость толуолом для предохранения от загнивания и оставляют на сутки. Щелочную вытяжку, содержащую в растворе нуклеопротеид, фильтруют через влажный складчатый фильтр и к фильтрату прибавляют по каплям при помешивании 10% соляную кислоту до прекращения выделения осадка. Полученный осадок нуклеопротеида собирают на влажный складчатый фильтр и проводят с ним следующие реакции.

Реакции на нуклеопротеиды

1. Производят ксантопротеиновую и миллонову реакции (см. цветные реакции на белки).
2. Исследуют растворимость в воде, 10% растворе NaCl, 10% HCl, разведенном NaOH, спирте.
3. Для доказательства присутствия в молекуле нуклеопротеида пуриновых радикалов, остатка фосфорной кислоты и углеводной

группы * осадок нуклеопротеида ** подвергают гидролизу кипячением с 25—50 см³ 5% H₂SO₄ в течение 1—2 часов в небольшой колбе, снабженной пробкой со вставленной длинной прямой стеклянной трубкой, служащей воздушным холодильником; постоянство объема жидкости во время кипячения поддерживают добавлением воды; жидкость бурит вследствие образования меланоидинов.

Пуриновые основания

Общими для всех пуриновых оснований реакциями являются:

а) осаждение аммиачным раствором азотнокислого серебра, причем часть атомов водорода пуриновых оснований замещается серебром; эти осадки растворимы в кипящей HNO₃ (удельного веса 1,1), образуя двойные соединения пуриновых оснований и азотнокислого серебра;

б) образование нерастворимых в воде соединений с закисью меди при кипячении в кислой среде с медным купоросом в присутствии восстановителей (например кислых сернистокислых солей).

1. К части полученного гидролизата в чашке прибавляют малыми порциями при помешивании крепкого аммиака почти до полной нейтрализации и затем слабо подщелачивают разбавленным аммиаком. Жидкость профильтровывают, если она мутная, переливают в стакан и осаждают 5% аммиачным раствором азотнокислого серебра ***.

В присутствии пуриновых оснований образуется бурый осадок их серебряных соединений. Если осадок тотчас не образовался, жидкости дают некоторое время спокойно постоять.

2. Часть гидролизата слабо подщелачивают едким натром, фильтруют, слабо подкисляют уксусной кислотой и нагревают до кипения. Прибавляют 1 см³ 10% медного купороса и затем по каплям насыщенного свежеприготовленного раствора кислого сернистокислого натрия (NaHSO₃) до пожелтения осадка.

Фосфорная кислота

1. Часть гидролизата слабо подщелачивают аммиаком, подкисляют азотной кислотой и нагревают с раствором молибденово-

* Нуклеиновая кислота дрожжей является тетра-нуклеотидом, образованным рибозой, аденином, гуанином, цитозином, урацилом и фосфорной кислотой.

** Для гидролиза можно брать и прямо дрожжи; в этом случае применяют 0,5—1% H₂SO₄ и нагревание производят на песчаной бане (3—4 часа).

*** 50 г AgNO₃ растворяют в 500 см³ воды, прибавляют аммиака до растворения первоначально образующегося осадка и доводят водой до объема в 1 л.

кислого аммония*; образуется желтый осадок фосфорномолибденовокислого аммония $(\text{NH}_4)_3(\text{PO}_4 \cdot 12 \text{MoO}_3)$.

2. К жидкости, подщелоченной аммиаком, прибавляют магnezальной смеси**; образуется белый кристаллический осадок двойной аммонийномагнезевой соли фосфорной кислоты (трипельфосфата) $\text{Mg}(\text{NH}_4)\text{PO}_4$.

Углеродная группа

Открытие углеродной группы производят реакцией Троммера (Trommer), основанной на способности рибозы и других углеводов, входящих в состав нуклеиновых кислот, восстанавливать гидрат окиси меди в закись меди.

К части гидролизата прибавляют $\frac{1}{3}$ объема 15% едкого натра и затем по каплям разбавленный раствор медного купороса до образования первой нерастворяющейся при взбалтывании мути гидрата окиси меди*** и нагревают до начала кипения; образуется желтый осадок гидрата закиси или красный осадок закиси меди.

Раствор медного купороса следует прибавлять очень осторожно, так как избыток образовавшейся гидроокиси меди переходит при нагревании, теряя воду, в черную окись меди, что затемняет основную реакцию.

* 50 г молибденовой кислоты растворяют в 200 г 10% аммиака, смешивают жидкость с 750 г HNO_3 (удельного веса 1,2) и жидкость сливают с образовавшегося осадка после нескольких дней стояния.

** К водному раствору MgSO_4 прибавляют аммиака и затем NH_4Cl до растворения осадка $\text{Mg}(\text{OH})_2$.

*** Гидрат окиси меди вначале растворяется, так как дает с углеводом соединение, растворимое в щелочах с синим цветом.

ФЕРМЕНТЫ

Ферменты (энзимы)—вещества невыясненного* химического состава и строения, находимые в организме животных и растений и являющиеся биологическими катализаторами химических процессов.

Катализаторами называют вещества, незначительные количества которых изменяют скорость реакции в несоответственно больших количествах других веществ, причем сами катализаторы не входят в состав конечных продуктов данной реакции, т. е. сами химически или не изменяются или изменяются лишь незначительно по сравнению с количеством веществ, превращенных в течение реакции.

В объяснении катализа наиболее принятым и плодотворным, получившим экспериментальное подтверждение, является предположение об образовании распадающегося затем промежуточного химического соединения катализатора с веществом, на которое он действует (субстратом).

Если скорость таких промежуточных реакций является в сумме большей, чем скорость основного процесса в отсутствии катализатора, то этим и можно объяснить явление катализа.

Каталитические и ферментативные реакции подчиняются закону действия масс; из предположения, что реакция протекает путем присоединения фермента к субстрату, следует, что скорость реакции пропорциональна концентрации этого рода молекул:

$$K = \frac{[\text{Фермент} + \text{субстрат}]}{[\text{Фермент}] \cdot [\text{субстрат}]}$$
, где [] обозначают концентрации соответствующих веществ.

* Лишь за самые последние годы начинает выясняться химическая природа некоторых ферментов. Так, желтый дыхательный пигмент В а р б у р г а (Warburg) повидимому является соединением фосфорнокислого эфира желтого пигмента лактофлавина (см. ниже) с белком характера глобулина. Имеются указания, что активные группы каталазы, пероксидазы, железосодержащего дыхательного фермента В а р б у р г а представляют собой соединения близкие гематину крови (стр. 107).

Действие ферментов обратимо. При катализе осуществляются лишь термодинамически возможные реакции и меняется лишь скорость реакции, но не положение равновесия. Следствием из этого является то, что катализатор (фермент) при обратимых реакциях может влиять на протекание реакции в обоих направлениях. Так например фермент, гидролизующий дисахарид, ведет к синтезу последнего при действии на продукты гидролиза, что наблюдается постоянно и в организме (синтез и гидролиз гликогена, жиров и др.).

Ферменты отличаются значительной специфичностью своего действия; деятельность каждого данного фермента ограничена относительно небольшой группой веществ; так например пталин слюны расщепляет полиозы—крахмал и гликоген, но не действует на целлюлозу, тоже принадлежащую к полиозам. Возможность ферментативного расщепления зависит не только от химической структуры, но и от пространственной конфигурации субстрата. Так, мальтаза дрожжей действует только на глюкозиды α -ряда, тогда как эмульсин семян миндаля расщепляет только β -глюкозиды. Действие ферментов является асимметрическим.

Ферменты мало стойки. Большинство ферментов разрушается при нагревании их растворов в течение 1 часа до 60—70°. Фермент в присутствии субстрата приобретает большую устойчивость. Скорость ферментативной реакции увеличивается с повышением t -ры, проходит через максимум и снова уменьшается при дальнейшем повышении температуры, так как при этом сильно ускоряется разрушение самого фермента. Температурный оптимум, т. е. та t -ра, при которой фермент оказывает наиболее сильное действие, для большинства ферментов животного организма лежит при t -ре тела животного*.

Ферментативные процессы сильно зависят от реакции среды. Видимому, концентрация водородных ионов влияет на распад промежуточного соединения, а также и на самый субстрат. Оптимальная реакция является характеристичной для каждого фермента и может меняться в зависимости от субстрата. Под влиянием разбавленных кислот и щелочей большая часть ферментов разрушается.

Приведенные свойства ферментов не являются отличающими их от других катализаторов, природа которых известна. Так, коллоидные растворы металлов тоже являются весьма мало устойчивыми: их ак-

* Разрушение фермента является функцией и температуры и времени. Чем продолжительнее нагревание, тем при более низкой температуре наступает инактивирование фермента.

тивность меняется со временем, с т-рой, с изменением реакции среды, они переводятся в недейтельное состояние (отравляются) веществами, которые и для живого организма являются ядами (HCN, H₂S и др., но различные ферменты и катализаторы по-разному относятся к одному и тому же яду. Так, например, каталаза отравляется синильной кислотой и сероводородом, а катепсин—фермент аутолиза—активируется этими веществами). Однако неизвестны катализаторы неживой природы, которые в такой же чрезвычайно тонкой форме были бы установлены на структуру субстрата, как это наблюдается у некоторых ферментов.

Ферменты относят к коллоидам, но их коллоидный характер выражен нерезко. Малая стойкость ферментов напоминает нестойкость белков и других близких им коллоидов, с которыми каталитически действующая часть ферментов соединена более или менее прочно. Большая часть ферментативных реакций представляет собой катализ в гетерогенной системе, при котором большое значение имеют явления адсорбции, ведущие к повышению концентрации реагирующих веществ на границе раздела фаз, усилению полярности (тем самым и активности) адсорбированных молекул и др.

Некоторые ферменты могут являться в недейтальной форме (проферменты, зимогены) и переходить в дейтальную под влиянием активаторов. Из активаторов большое значение имеют электролиты (кислоты, основания, соли), вещества, меняющие реакцию среды и тем самым электролитическую диссоциацию фермента или субстрата и коллоидное их состояние, а также вещества, обуславливающие окислительно-восстановительный потенциал среды и влияющие на степень окисления фермента, субстрата или сопутствующих веществ. Наблюдается также влияние лучистой энергии на активность фермента.

Большинство ферментов растворимо в воде, в глицерине, растворе NaCl, разбавленном спирте и осаждается крепким спиртом, насыщением порошком (NH₄)₂SO₄.

Выделение ферментов

Для выделения ферментов готовят водный или глицериновый экстракт из измельченного органа, освобожденного от примеси крови, или выжимают орган под большим давлением (300 атмосфер).

Приготовление экстракта. Животное обескровливают и промывают кровеносную систему, а затем и соответствующий орган (через артерию) физиологическим раствором. Не содержащий крови

орган разрезают на крупные куски, освобождают от соединительной ткани, сосудов и т. п., растирают в ступке с песком или битым стеклом и настаивают размельченную массу с глицерином, с дистиллированной водой или с физиологическим раствором NaCl при комнатной т-ре или на льду, помешивая время от времени. В случае приготовления водного или солевого экстракта необходимо добавление антисептика (хлороформа, толуола или тимола). Предпочтительно готовить глицериновую вытяжку, так как глицерин растворяет мало белков и не требует прибавления антисептиков. Для приготовления экстракта можно также пользоваться, вместо свежего, органом, высушенным в токе воздуха при комнатной т-ре, для чего его измельчают и намазывают возможно более тонким слоем на стеклянных пластинках, покрытых парафином. Высушенную массу извлекают толуолом в экстракционном аппарате на холоду, причем удаляются жиры и липоиды. Для изучения действия ферментов употребляют отцентрифугированную или профильтрованную (фильтрование протекает очень медленно) вытяжку или из нее выделяют ферменты, пользуясь их способностью легко адсорбироваться осадками, обладающими большой поверхностью (например осадками холестерина и лецитина в воде; эти вещества являются весьма удобными тем, что могут быть затем удалены извлечением эфиром). Хотя спирт легко осаждает ферменты, он в некоторых случаях значительно уменьшает их активность.

Для очищения ферментов прибегают к различным методам: фракционированному высаливанию, избирательной адсорбции на каолине, гидроокиси алюминия, гидроокиси железа, угле и т. п., избирательной элюции—извлечении адсорбированного вещества из образовавшегося адсорбционного соединения действием аммиака, растворов фосфатов и других веществ, меняющих реакцию среды или вытесняющих фермент с поверхности адсорбирующего тела*.

В качестве примеров приготовления ферментных экстрактов могут служить получение а м и л а з ы из солода (стр. 56), с а х а р а з ы из дрожжей (стр. 59), к а т а л а з ы из сала (стр. 60), п е р о к с и д а з ы из хрена (стр. 62), п е п с и н а из слизистой оболочки желудка (гл. XII), т р и п-

* Очень чистые препараты желтого дыхательного фермента (см. примеч. на стр. 52) были получены при помощи катафореза. Комплекс ферментов, участвующих в процессе а у т о л и з а, удалось разделить фракционированием во времени. А у т о л и з—процесс распада клеток организма под влиянием заключающихся в них ферментов: к а т е п с и н а—протеазы, расщепляющей белки при слабокислой, близкой к нейтральной реакции (рН 4,0—7,0), п о л и п е п т и д а з, гидролизующих полипептиды, и д и п е п т и д а з, расщепляющих дипептиды.

сина из поджелудочной железы, липазы из поджелудочной железы, ферментов из слизистой оболочки тонких кишок. Для пероксидазы дан также метод приготовления очищенного препарата (стр. 59). Этот метод здесь приведен несмотря на трудности, связанные с его выполнением, чтобы дать представление о способах выделения и очищения ферментов.

ГИДРОЛИЗИРУЮЩИЕ ФЕРМЕНТЫ (ГИДРОЛАЗЫ)

Ферменты по характеру своего действия делятся на несколько групп. Гидролазами называются ферменты, вызывающие расщепление вещества путем присоединения элементов частицы воды. К ним относятся эстеразы, омыляющие сложные эфиры (например липазы); карбогидразы—ферменты, расщепляющие поли- и дисахариды, глюкозиды; амидазы, расщепляющие связь атомов С с N (сюда относятся и протеолитические ферменты, расщепляющие белки).

1. Гидролиз крахмала под влиянием амилазы слюны—птиалина*

Амилазы—карбогидразы, расщепляющие крахмал и гликоген до стадии дисахарида мальтозы. Промежуточными продуктами гидролиза являются растворимый крахмал и декстрины (амилодекстрины, дающие с иодом синее окрашивание, эритродекстрины, дающие с иодом красное окрашивание, хроодекстрины, не окрашивающиеся иодом, так же как и мальтодекстрины; степень ассоциации молекул уменьшается от амилодекстринов к мальтодекстринам).

Разбавленную слюну добывают, ополаскивая рот в течение 1—2 минут 20 см³ дистиллированной воды. Эту операцию повторяют 2—3 раза, собранную жидкость профильтровывают и употребляют для приводимых ниже реакций.

Приготовление крахмального клейстера. 5 г крахмала тщательно растирают в ступке, прибавляют немного воды так, чтобы образовалась густая кашица, и затем при помешивании вливают ее постепенно в 1/2 л кипящей воды.

На фарфоровую или стеклянную, положенную на белую бумагу,

* Вместо амилазы слюны можно воспользоваться растительной амилазой.

По возможности измельченный солод (осторожно высушенные проросшие зерна ячменя) извлекают водой, отфильтровывают и прибавляют к фильтрату дрожжи; через 12 часов подвергшуюся алкогольному брожению жидкость отфильтровывают от дрожжей и применяют для реакций. Можно также первоначальный экстракт осадить спиртом, отфильтровать осадок белков, захватывающий фермент, промыть его спиртом и растворить в воде.

пластинку наносят ряд капель раствора иода в иодистом калии. К одной из капель добавляют крахмального клейстера,—появляется синее окрашивание.

В две пробирки наливают по 5 см³ крахмального клейстера и затем в одну из них 5 см³ воды, в другую—5 см³ разбавленной слюны и ставят обе пробирки в водяную баню при 40°. Первая пробирка служит контролем. Через несколько секунд опализация жидкости во второй пробирке уменьшается вследствие образования растворимого крахмала; при смешении капли жидкости с каплей иода появляется синяя окраска, иногда с красноватобурым оттенком (образование эритродекстрина). Далее берут пробы жидкости каждые 1/2—1 минуту и смешивают с каплей иода. Вскоре синяя окраска сменяется красноватобурой (эритродекстрин), и наконец наступает момент, когда жидкость при смешении с иодом не окрашивается (ахроодекстрин, мальтодекстрин, мальтоза). По прошествии 5—10 минут от начала опыта с жидкостью проделывают троммеровскую пробу (стр. 71), происходит восстановление окиси меди в закись.

Восстановление при реакции Троммера получается еще тогда, когда жидкость с иодом дает красное окрашивание, так как одновременно с эритродекстрином из растворимого крахмала образуется некоторое количество мальтозы; кроме того некоторые декстрины сами обладают восстановительными свойствами в отличие от крахмала, который не содержит свободных карбонильных групп.

Жидкость в контрольной пробирке не изменяется при стоянии в бане, она попрежнему дает синее окрашивание с иодом и не восстанавливает гидрата окиси меди.

Если крахмальный клейстер кипятить с разбавленной соляной кислотой (неорганический катализатор), то наблюдаются явления, аналогичные приведенным выше, но расщепление доходит до стадии глюкозы.

Влияние температуры на амилазу

Для выяснения влияния т-ры в 2 пробирки наливают по 5 см³ крахмального клейстера и по 5 см³ разбавленной слюны; одну из пробирок оставляют в водяной бане при 40°, другую опускают в ледяную воду и сравнивают время, протекающее до наступления соответственных изменений в окрашивании с иодом в пробах с жидкостью из обеих пробирок; в пробирке, оставленной при низкой т-ре, изменения наступают медленнее.

К 5 см³ крахмального клейстера прибавляют 5 см³ предварительно прокипяченной слюны (следят, чтобы и пена, если она образовалась, прогрелась) и оставляют в бане при 40°. Гидролиз крахмала не наступает, так как фермент разрушается при кипячении.

Опыт подобный последнему является обычным контролем при ферментативных реакциях.

Влияние электролитов на амилазу

В одну пробирку помещают 5 см³ крахмального клейстера, 1 см³ воды и 5 см³ разбавленной слюны; в другую—5 см³ крахмального клейстера, 1 см³ 0,4% раствора HCl и 5 см³ разбавленной слюны; в третью—5 см³ крахмального клейстера, 1 см³ 0,5% уксусной кислоты и 5 см³ разбавленной слюны; в четвертую—5 см³ крахмального клейстера, 1 см³ 0,4% раствора NaOH и 5 см³ разбавленной слюны; в пятую—5 см³ крахмального клейстера, 1 см³ 1% раствора NaCl и 5 см³ разбавленной слюны; все 5 пробирок одновременно опускают в баню при 35—40° и через равные промежутки времени исследуют жидкость из каждой пробы по реакции с иодом. Соляная кислота совершенно прекращает действие амилазы; уксусная кислота замедляет превращение в ахроодекстрин и мальтозу; щелочи ускоряют реакцию при малых концентрациях (и останавливают при больших)*, NaCl в очень разбавленных растворах ускоряет (при концентрации же в 5% замедляет) реакцию; в жидкостях, освобожденных от солей, например диализом, амилаза теряет осахаривающую способность.

Определение амилазы по Вольгемуту (Wohlgemuth)

Метод основан на установлении предельного разведения раствора амилазы, при котором еще происходит в определенных условиях расщепление известного количества крахмала до стадии эритродекстрина.

В 10 пробирок отмеривают по 1 см³ воды. Ополоснув водой рот, набирают в маленький мерный цилиндр около 1 см³ слюны** и разбавляют ее в 10 раз водой (на 1 часть слюны прибавляют 9 частей воды). 1 см³ такой разведенной слюны помещают в первую из 10 приготовленных пробирок с водой, перемешивают

* Щелочную жидкость перед добавлением иода подкисляют уксусной кислотой.

** Этим же методом можно пользоваться для определения амилазы и в других жидкостях организма (в поджелудочном соке, крови, моче и др.).

и переносят 1 см³ жидкости в следующую пробирку, также перемешивают и переносят 1 см³ смеси в следующую пробирку и т. д. Из последней пробирки после перемешивания 1 см³ жидкости выливают. Затем в каждую пробирку прибавляют по 2 см³ свежеприготовленного 0,1% раствора крахмала и все пробирки в одно время помещают в водяную баню при 38°. Через 30 минут пробирки вынимают из бани, охлаждают, прибавляют в каждую из пробирок по капле n/10-раствора иода в иодистом калии и отмечают ту пробирку, в которой в первой вместо синей появляется красноватобурая окраска, свойственная эритродекстрину.

Расчет. Активность фермента выражают числом куб. сантиметров 0,1% раствора крахмала, какое могло бы в условиях опыта быть расщеплено до стадии эритродекстрина 1 куб. сантиметром неразбавленной слюны.

Этот метод позволяет учитывать лишь очень резкие различия в количестве или активности амилазы и потому пригоден лишь для весьма грубых и приблизительных определений.

Специфичность действия

К 5 см³ 1% раствора тростникового сахара прибавляют 5 см³ разбавленной слюны и оставляют на некоторое время в водяной бане при 40°. Испытывают жидкость троммеровской пробой: восстановления гидрата окиси меди не происходит.

II. Сахараза (инвертин)

Другим примером гидролазы может служить сахараза дрожжей, ускоряющая расщепление тростникового сахара на глюкозу и фруктозу.

Для приготовления сахаразы 100 г дрожжей тщательно растирают в ступке с песком, наносят тонким слоем на стеклянные пластины и высушивают в токе сухого теплого воздуха. Высушенные дрожжи растирают в порошок и извлекают водой; отфильтрованную вытяжкувливают в избыток ацетона, перемешивают и через несколько минут отсасывают образовавшийся осадок на бухнеровской воронке (см. гидролиз белков), высушивают его при t-ре тела и растирают в ступке; для изучения действия сахаразы растворяют порошок по мере надобности в воде.

К 5 см³ 1% раствора тростникового сахара прибавляют 1 см³ раствора сахаразы и оставляют в водяной бане при 40° на 10—15 минут. Одновременно ставят такую же пробу с прокипячен-

ным предварительно раствором фермента. При пробе Троммера восстановление окиси меди в закись наступает лишь в пробирке с некипяченной сахарозой.

Гидролиз тростникового сахара получил название инверсии, так как в результате расщепления вращающего вправо тростникового сахара образуется смесь равных частей d-(—)фруктозы и d-(+)глюкозы, вращающая влево вследствие более сильного вращения фруктозы. Пользуясь поляриметрическим методом (гл. I), удобно следить за ходом расщепления.

О действии протеолитических ферментов и липаз см. Пищеварение, гл. XII.

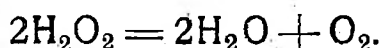
ДЕСМОЛАЗЫ. ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТЫ

Кроме гидролаз существует ряд других ферментов, преимущественно окислительно-восстановительного характера (десмолазы), вызывающих весьма многочисленные и разнообразные процессы окисления, восстановления и внутримолекулярных перегруппировок, сопровождающиеся значительным выделением (превращением) энергии. К ним относят: каталазу, оксидазы, пероксидазы, дегидразы, карбоксилазу и др.*

Сложные высокомолекулярные органические вещества клетки изменяются в организме действием окислительно-восстановительных ферментов, повидимому, лишь после того, как они подверглись гидролитическому расщеплению до стадии значительно менее сложных соединений, таких как монозы, аминокислоты, глицерин, жирные кислоты и т. д.

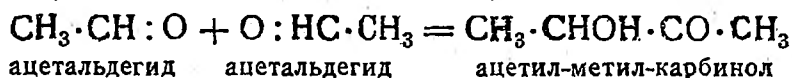
I. Каталаза

К а т а л а з а—весьма распространенный в организме фермент, вызывающий разложение перекиси водорода на молекулярный кислород и воду: **



Свежее (неоплавленное) сало, промытое водой для удаления крови, разминают в ступке с водой, фильтруют и к фильтрату

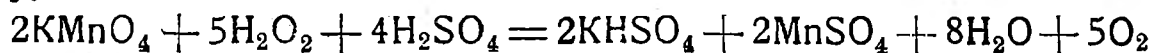
* Некоторые авторы предполагают существование особого фермента—к а р б о л и г а з ы, способствующего образованию из 2 молекул альдегида соответствующего оптически деятельного кетоналкоголя



** Каталазе приписывают роль агента, предохраняющего организм от накопления ядовитой перекиси водорода, образующейся при процессах дегидрирования молекулярным кислородом ($\text{RH}_2 + \text{O}_2 = \text{R} + \text{H}_2\text{O}_2$).

в пробирке прибавляют немного перекиси водорода,—происходит выделение кислорода (см. также каталазу крови, стр. 99).

О количестве или активности каталазы судят по количеству разложенной ею за определенный промежуток времени перекиси водорода. Количество H_2O_2 определяют титрованием (гл. XIV) перманганатом по уравнению:



Для опыта пользуются каталазой крови. Уколов палец, стирают первую каплю крови, затем набирают сухой микропипеткой (капиллярной пипеткой на $0,1 \text{ см}^3$ с делениями на $0,001 \text{ см}^3$) $0,02$ — $0,1 \text{ см}^3$ крови, выпускают в воду, несколько раз ополаскивают пипетку полученным раствором и доводят жидкость в мерном цилиндре до такого объема, чтобы получить разведение крови $1:1000$ (например, если было набрано $0,025 \text{ см}^3$ крови, то разбавляют до объема 25 см^3). Полученный разбавленный раствор и применяют для опытов.

а) Влияние температуры на каталазу

В 2 пробирки наливают по 2 — 3 см^3 раствора крови. Первую пробирку кипятят в течение 1 минуты на голем огне для разрушения фермента (контроль), вторую пробирку помещают в водяную баню при 40° , 60° или 80° . Через 15 минут пробирку вынимают из бани и охлаждают. Из каждой пробирки переносят по 1 см^3 жидкости (отдельные пипетки) в приготовленную для каждой пробы маленькую эрленмейеровскую колбочку, содержащую 10 см^3 воды. В третью колбочку с 10 см^3 воды переносят 1 см^3 исходного раствора крови, не подвергавшегося нагреванию. В каждую колбочку прибавляют по 1 см^3 $0,6$ — $0,7\%$ раствора чистой, не содержащей кислоты, перекиси водорода и оставляют стоять при комнатной температуре в течение 15 минут. Затем каждую пробу подкисляют 3 куб. сантиметрами 10% серной кислоты (кислота прекращает действие фермента) и титруют $n/50$ -раствором KMnO_4 до появления не исчезающей розовой окраски.

Результат титрования первой колбочки дает количество перекиси водорода, взятой для опыта. 2 других титрования дают количества перекиси водорода, оставшейся неразрушенной после действия каталазы. Разность между числами титрования этих проб и контрольной (1-ая проба) указывает, сколько перекиси разложено каталазой, является мерой ее количества или активности.

Таким же образом получают данные и для других температур и вычерчивают кривую теплового инактивирования каталазы.

б) Влияние активной реакции среды на каталазу

В три колбочки отмеривают по 10 см³ воды и прибавляют в одну 2 см³ n/10-HCl, в другую—2 см³ n/10-NaOH, в третью—2 см³ воды. Затем в каждую колбочку добавляют по 1 см³ раствора каталазы и по 1 см³ 0,6—0,7% перекиси водорода. Через 15 минут прибавляют по 3 см³ 10% H₂SO₄ и титруют n/50-раствором перманганата до появления исчезающей слабой розовой окраски.

Активность фермента находят вычитая числа, полученные при титровании, из цифры контрольного опыта при определении теплового инактивирования каталазы (см. выше).

II. Оксидазы

От ферментативного окисления ароматических соединений (тирозина и др.) зависит известное всем побурение поверхности разреза яблок, груш и т. п.

На свежую поверхность разреза картофелины наносят каплю спиртового раствора гваяковой смолы*. Через некоторое время поверхность делается синей вследствие образования озонида гваяковой смоляной кислоты, причем посинение начинается с периферии, где концентрация ферментов больше.

III. Пероксидазы

Пероксидазами называют ферменты, вызывающие окисление вещества переносом на него кислорода из перекиси водорода или какой-либо другой перекиси. Примером могут служить пероксидазы крови (стр. 99), молока (стр. 116), хрена. Оптимальная реакция среды для действия пероксидазы меняется в зависимости от субстрата. Для гваяковой смоляной кислоты она лежит при pH 5,0—5,2.

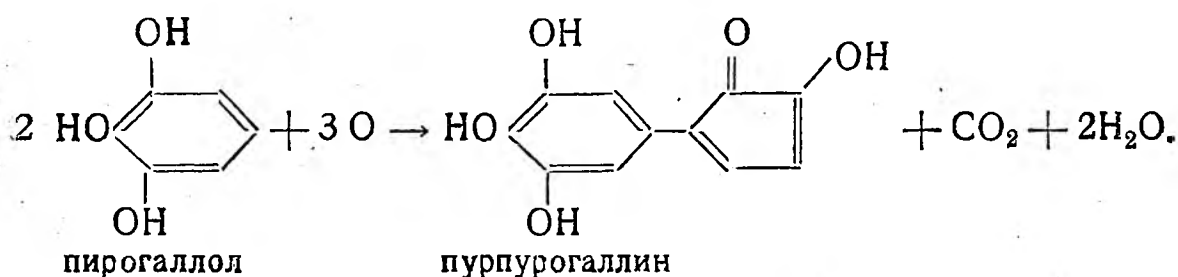
Приготовление вытяжки из хрена

100 г хрена измельчают в мясорубке и растирают в ступке с мелкоистолченным стеклом. Растертую массу переносят в склянку, смешивают с равным объемом очень слабого (от n/200 до n/100)

* 0,5 г смолы растворяют в 30 см³ 95% спирта.

раствора едкого барита или двууглекислой соды, заливают толуолом и, закрыв склянку, оставляют стоять в течение 5—6 часов. Затем жидкость отфильтровывают и употребляют для реакций.

1. К 1—2 см³ 1% водного раствора пирогаллола C₆H₃(OH)₃ 1, 2, 3 прибавляют 1 каплю 2% раствора H₂O₂ и немного раствора фермента. Тотчас же появляется буроватое окрашивание, постепенно усиливающееся, и выпадает темнобурый осадок пурпурогаллина (продукт окисления и конденсации пирогаллола):



Этой реакцией пользуются и для количественного учета фермента.

2. В пробирку наливают 0,5 см³ 3% раствора гваяковой смолы, 0,5 см³ 2% раствора H₂O₂ и немного раствора фермента. Появляется сине-зеленое окрашивание, постепенно бледнеющее.

Эта реакция обусловлена окислением гваяковой смоляной кислоты с образованием ее озонида вследствие переноса на нее кислорода из перекиси водорода под влиянием пероксидазы хрена. Так как появление окраски при этих реакциях может быть обусловлено наличием оксидаз, то в качестве контроля проделывают соответствующие опыты без добавления перекиси водорода.

Обе реакции повторяют также с предварительно прокипяченным раствором фермента.

Получение очищенного препарата пероксидазы из хрена по Вильштетеру и Штолю (Willstätter, Stoll)

1 кг хрена нарезают ломтиками толщиной в 1—1,5 мм и промывают текущей водой в течение 4—6 суток, отсасывают и настаивают твердый остаток в течение 4—6 часов с 2 литрами 0,4% раствора щавелевой кислоты; при этом примеси переходят в раствор, а большая часть фермента адсорбируется осад-

ком. Осадок отжимают, растирают в ступке, взмучивают в 1400 см³ воды, отсасывают на большой бухнеровской воронке через полотно, промывают 3 литрами 0,1% раствора щавелевой кислоты, отжимают в прессе, растирают в ступке и настаивают 1/2 часа с 200 см³ 1/3—1/2-насыщенного раствора едкого барита для удаления кислореагирующих примесей. Добавление едкого барита должно проводиться очень осторожно, малыми порциями, при постоянном помешивании; реакция должна оставаться слабокислой или нейтральной, но не щелочной. Снова отжимают (жидкость содержит сравнительно немного пероксидазы), а остаток растирают в ступке с 250 см³ насыщенного при 20° раствора едкого барита; пероксидаза при этом переходит в раствор, и получается очень активная вытяжка. Жидкость с осадком переносят в склянку и тотчас же, при постоянном взбалтывании, насыщают угольной кислотой до появления слабокислой на лакмус реакции, затем к отделенной прессованием от осадка жидкости прибавляют 9/10 объема 96% алкоголя и оставляют стоять на льду. Пероксидаза остается в растворе. Твердый остаток еще дважды извлекают по 1/2 часу 100 см³ полунасыщенного раствора едкого барита, каждый раз насыщая затем угольной кислотой и добавляя к жидкой части алкоголь. Через 12 часов алкоголь-водные вытяжки отсасывают через полотно, покрытое слоем грубого талька, упаривают в вакууме (см. гидролиз белков) при 30° до объема 10—15 см³, вновь отсасывают через полотно, покрытое тонким слоем талька, и осаждают пероксидазу прибавлением 5-кратного объема абсолютного спирта. Осадок отсасывают, растирают с абсолютным спиртом (осадок делается при этом порошковатым), вновь отсасывают и сохраняют в эксикаторе над концентрированной серной кислотой в темноте, растворяя по мере надобности в воде.

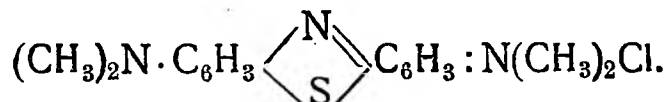
Для получения еще более чистого препарата осадок растворяют в 10-кратном по весу количестве воды, очень слабо подкисляют серной кислотой и вновь осаждают прибавлением 5 объемов абсолютного алкоголя*.

* Наиболее чистые препараты пероксидазы были получены путем дальнейшей обработки сулемой и хлористым кальцием для удаления примеси азотсодержащего глюкозида, повторной адсорбцией фермента на каолине, гидроокиси алюминия, элюцией водой, аммиаком, уксусной кислотой, осаждением танином и алкоголем. Однако и в этих наиболее очищенных препаратах содержание самого фермента вряд ли превышало 2—3%.

IV. Дегидразы

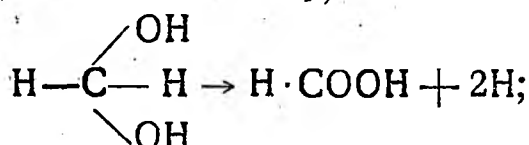
Реакция Шардингера (Schardinger)

В 3 пробирки наливают по 5 см³ молока. Одну пробу кипятят и остужают. В каждую пробу приливают по 1 см³ 0,02% водного раствора метиленовой сини

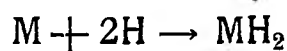


Прокипяченную пробу и одну из не кипяченых смешивают с 0,4% раствором формалина (1 см³) и заливают парафиновым маслом; все три пробы ставят в водяную баню при 70°. Жидкость в пробе, не кипяченой и залитой парафиновым маслом, постепенно обесцвечивается.

Эта реакция служит примером окисления в присутствии легко восстанавливающихся веществ, каковым в данном случае является метиленовая синь. Под влиянием присутствующих в молоке дегидраз водород отщепляется от формальдегида (который окисляется при этом в муравьиную кислоту) и восстанавливает (обесцвечивает) краску:



Гидратная
форма формальдегида



Метиленовая синь Бесцветный продукт восстановления

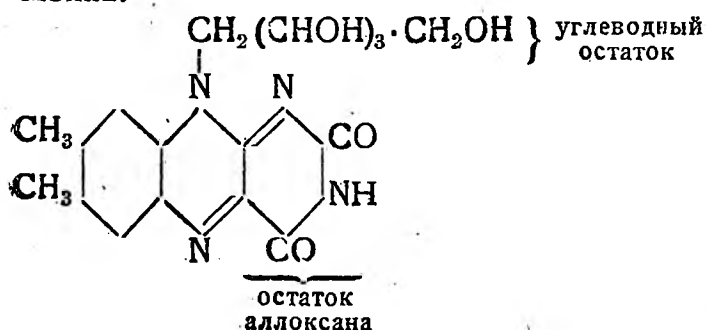
В окислительных процессах организма имеют значение сравнительно устойчивые в отношении нагревания вещества, легко окисляющиеся и снова восстанавливающиеся, служащие переносчиками водорода и кислорода.

К их числу относят, например,

аскорбиновую кислоту (витамин С, см. стр. 88);

лактофлавин*, желтый пигмент, входящий в форме фосфорно-

* Лактофлавин имеет строение 6,7-диметил-9-(d-рибитил)-изоаллоксазина:



Бурооранжевые иголочки, плавящиеся с разложением при 267°. Растворимы в воде с интенсивной желто-зеленой флуоресценцией (стр. 82). Лактофлавин отождествляют с витамином В₂.

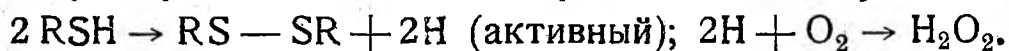
кислого эфира в состав желтого дыхательного фермента. Легко восстанавливаясь до лейкосоединения и вновь окисляясь до пигмента, он образует обратимую окислительно-восстановительную систему;

пиридиннуклеотиды (см. Брожение, стр. 65);

цитохромы и железосодержащий комплекс дыхательного красного фермента Варбурга—вещества, близкие по строению гематину крови и способные активировать кислород;

соединения полиенового класса—витамин А (стр. 86), каротиноиды и другие ненасыщенные соединения (например, жирные кислоты);

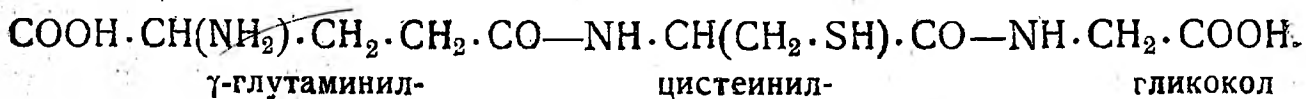
соединения, содержащие активную группу—SH (цистеин $\text{HS}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}(\text{NH}_2)\cdot\text{COOH}$, глутатион и др.). Эти вещества ($\text{R}-\text{SH}$) легко окисляются, теряя атом водорода из группы—SH, образуя из 2 молекул соединения, построенные по типу цистина $\text{RS}-\text{SR}$; в присутствии кислорода реакция может быть представлена следующим образом:



Под влиянием некоторых находимых в организме устойчивых в отношении нагревания веществ соединения типа цистина снова восстанавливаются: $\text{RS}-\text{SR} + 2\text{H} \rightarrow 2\text{RSH}$.*

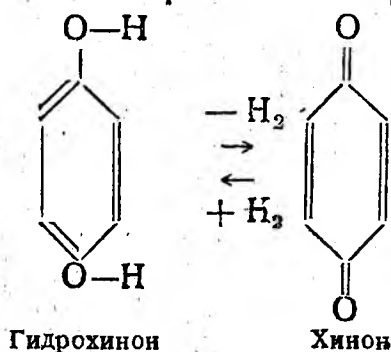
Глутатион

Г л у т а т и о н—трипептид, выделенный из дрожжей и мышц, содержащийся повидимому во всех растительных тканях и животных органах и построенный из остатков цистеина, глутаминовой кислоты и гликокола:



* Системе цистеин-цистин приписывают существенную роль в дыхании тканей, не снабжаемых кровью, например роговицы, хрусталика. При катаракте хрусталик не дает цистеиновой реакции. При анемии наблюдается повышение содержания цистина в крови.

Возможно, что и соединения типа хинонов, являющихся сильными акцепторами водорода могут образоваться в организме из адреналина и тирозина.



Реакция на глутатион

Растирают в ступке небольшой кусочек печени или почки с небольшим количеством песка и несколькими куб. сантим. насыщенного раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Прибавляют 5—6 капель 2% раствора $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}$ и 2 см³ крепкого аммиака—смесь принимает пурпурную окраску вследствие расщепления глутатиона с образованием сероводорода (см. цветные реакции на белки). Окраска постепенно бледнеет.

Эту реакцию дает только восстановленная форма глутатиона. Если реакцию проводить в присутствии цианистого калия, то происходит восстановление дисульфидной формы глутатиона и получается окраска, отвечающая всему наличному количеству глутатиона.

Глутатион является активатором кетон-альдегидмутаза (см. ниже), активирует также некоторые протеолитические ферменты.

Брожение

Алкогольное брожение—анаэробное расщепление гексоз под влиянием ряда ферментов, совокупность которых обозначают термином „зимаза“.

Опыт производят с небольшим количеством дрожжей и 1% растворами глюкозы, фруктозы, галактозы, мальтозы, лактозы или тростникового сахара, в бродильном аппарате (рис. 9), трубку которого совершенно заполняют испытуемой жидкостью, или в пробирке, которую наполняют доверху, перепрокидывают, закрыв отверстие пальцем, и опускают отверстием в чашку со ртутью. Оставляют при 37° на 12 часов. Образующийся газ является углекислотой, что видно из того, что при взбалтывании с крепкой щелочью он поглощается.

Так как в дрожжах помимо зимазы содержатся мальтаза и сахараза, то все перечисленные выше сахара, за исключением лактозы, сбраживаются. Лактоза сбраживается лишь специальными видами дрожжей (кефирными).

Химизм процесса алкогольного брожения

Тогда как раньше полагали, что гексоза (или ее фосфорнокислый эфир) распадается при брожении на 2 молекулы метилглиок-

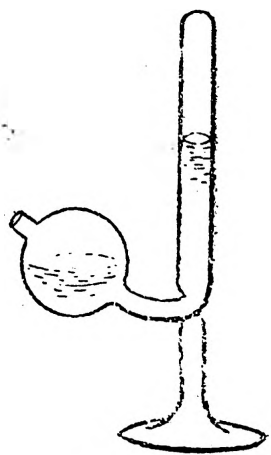
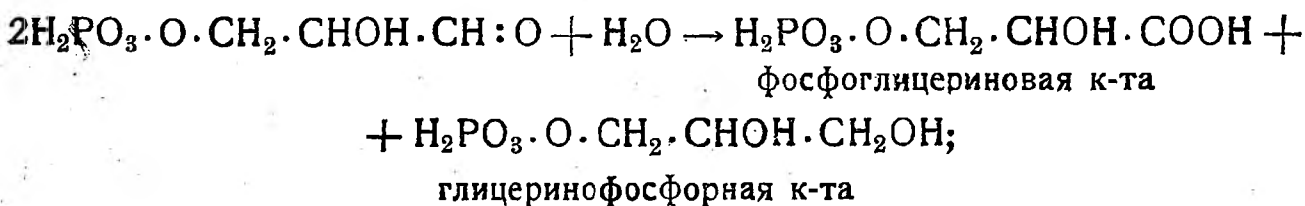


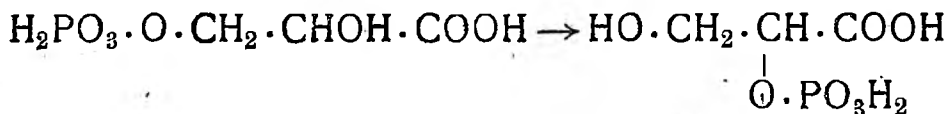
Рис. 9.

с аля $\text{CH}_3 \cdot \text{CO} \cdot \text{CH} : \text{O}$, переходящего путем дальнейших превращений в пировиноградную кислоту, ацетальдегид и спирт, работы последних лет приводят к новым представлениям*.

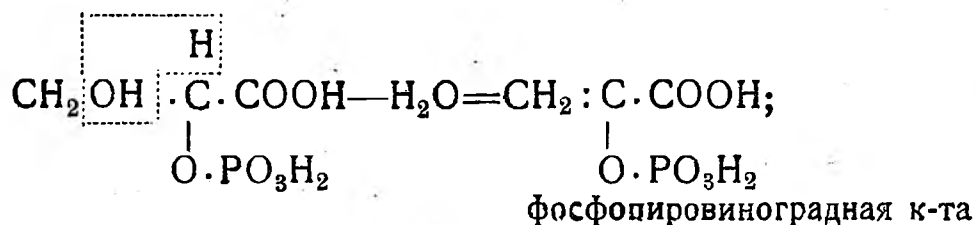
Схема процесса алкогольного брожения под влиянием несодержащего клеток дрожжевого сока представляется по работам Эмбдена и Мейерхофа (Embden, Meyerhof) и др. в следующем виде: гексозы в присутствии фосфорнокислых солей и гексозодифосфорной кислоты превращаются в фосфорнокислые эфиры соединений с 3 атомами углерода в цепи типа диоксиацетонфосфорной кислоты $\text{H}_2\text{PO}_3 \cdot \text{O} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}_2\text{OH}$ и глицеринальдегидфосфорной кислоты $\text{H}_2\text{PO}_3 \cdot \text{O} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CHOH} \cdot \text{CH} : \text{O}$; последняя под влиянием фермента кетональдегидмутазы (глиоксалазы) подвергается дисмутации** с образованием фосфоглицериновой кислоты и глицеринофосфорной кислоты:



остаток фосфорной кислоты в фосфоглицериновой кислоте переходит под влиянием фосфоглицеромутазы от 3-го углеродного атома ко 2-му

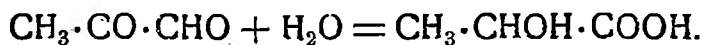


и далее при отщеплении воды из этого изомера под влиянием фермента энлазы образуется фосфопировиноградная кислота



Фосфопировиноградная кислота реагирует с глюкозой, переводя ее

* Возможно, что метилглиоксаль является промежуточным продуктом при молочнокислом брожении, так как под влиянием ферментов (также и щелочей) он легко переходит в молочную кислоту:



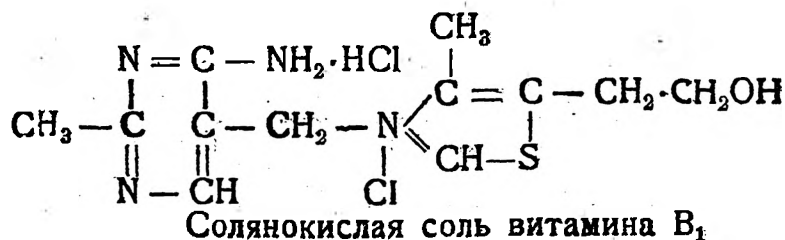
** Дисмутация, реакция Каницаро (Canizzaro)—сопряженный окислительно-восстановительный процесс, наблюдаемый на альдегидах и имеющий большое значение в биологических процессах расщепления углеводов, аминокислот и вероятно жирных кислот.

рого обратимо переходит в дигидропиридиновое. Роль кофермента карбоксилазы приписывают фосфорнокислому эфиру витамина В₁* или близкого ему вещества.

Примеры других ферментативных реакций см. гл. IX (тромбин), гл. X (химозин, молочнокислое брожение), главу XII (пищеварительные ферменты).



* Антиневритический витамин В₁ получен в кристаллическом виде и имеет, повидимому, строение, выражающееся формулой:



Содержится в дрожжах, зернах злаков (главным образом в наружной части и в зародышевом слое), многих овощах и фруктах. Растворим в воде, разрушается при нагревании, особенно легко в щелочной среде (рН 10, 90).

У Г Л Е В О Д Ы

Гликоген

Гликоген (животный крахмал) $(C_6H_{10}O_5)_n$ —углевод, относящийся, как и крахмал, к так называемым коллоидным полиозам (полисахаридам). Конечным продуктом при кислотном его гидролизе является d-глюкоза, при ферментативном (амилаза)—мальтоза. Гликоген—белый порошок, растворимый в холодной воде с образованием сильно опалезирующих коллоидных растворов. Отличается весьма большой устойчивостью по отношению к действию щелочей. Плоскость поляризации света вращает вправо $[\alpha]_D = +196,6^\circ$. Находится главным образом в печени, содержится также в мышцах и других органах и расходуется организмом по мере надобности после превращения его в глюкозу*.

Приготовление гликогена

Кролика кормят морковью, через 5—10 часов убивают обескровливанием, печень по возможности быстро вырезают, быстро отмывают от крови, пропуская через артерию физиологический раствор, нарезают на куски и бросают в 5-кратный объем заранее приготовленной кипящей воды, слабо подкисленной уксусной кислотой. Белки при этом свертываются, а ферменты, превращающие гликоген в сахар, разрушаются. Жидкость колируют (фильтруют через полотно), остаток растирают в ступке и повторно извлекают кипящей водой; вытяжки соединяют и выпаривают на водяной бане до объема примерно 150 см³. Сгущенную вытяжку охлаждают и освобождают от белков трихлоруксусной кислотой или прибавлением реактива Брюке (см. реакции на белки по осаждению) к подкисленной соляной кислотой жид-

* Содержание гликогена составляет 1—4% веса печени, но может достигать 20%. В форме гликогена в организме отлагаются значительные запасы потенциальной энергии (1 г гликогена развивает при сгорании 3874 калории)

кости. Отфильтрованную от белков опализирующую жидкость нейтрализуют и употребляют для следующих реакций.

Реакции на гликоген

а) Отмечают характерную опализацию разбавленных растворов гликогена.

б) При добавлении двойного объема спирта гликоген выпадает из раствора в виде белого хлопьевидного осадка.

в) Опализирующая жидкость дает красное окрашивание с раствором иода в иодистом калии, исчезающее при нагревании и вновь появляющееся при охлаждении.

г) Гликоген осаждается основным уксуснокислым свинцом — $Pb(OH)(C_2H_3O_2)$.

д) Гликоген и другие полисахариды (крахмал, высокомолекулярные декстрины) выделяются при насыщении их растворов порошком $(NH_4)_2SO_4$, Na_2SO_4 (при 33°), $MgSO_4$ и тем самым могут дать повод к смещению с белками, ввиду чего осадок, полученный при высаливании жидкостей организма, должен быть исследован на полиозы; его промывают насыщенным раствором соответствующей соли, растворяют в воде и испытывают реакцией с иодом.

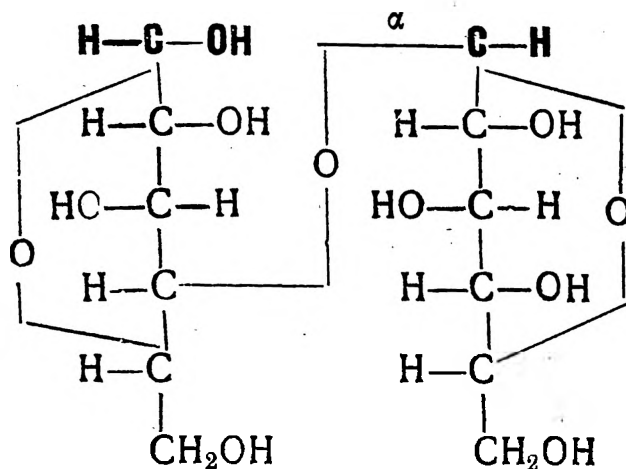
е) Раствор гликогена, если он не содержит примеси редуцирующих сахаров и декстринов, не дает восстановления при пробе Троммера (см. ниже).

Гидролиз гликогена

Гликоген гидролизуют действием амилазы слюны так же, как это было описано для крахмала (стр. 52) (конечный продукт — мальтоза), или кипячением в течение 5—10 минут с разбавленной соляной кислотой (конечный продукт — глюкоза) и производят пробу Троммера. Происходит восстановление гидрата окиси меди.

Мальтоза

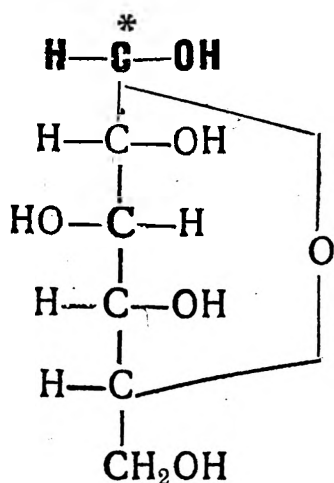
Мальтоза (солодовый сахар) — $C_{12}H_{22}O_{11}$ — дисахарид (биоза), построенный из остатков d-глюкозы по типу моноглюкозидной связи, т. е. путем отщепления воды из гидроксила при карбонильной группе одной монозы и спиртового гидроксила другой, тогда как



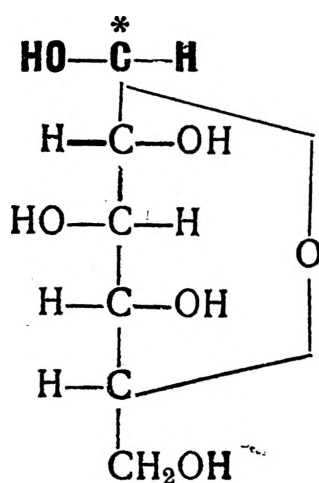
Мальтоза

гидроксил при карбонильной группе этой монозы остается нетронутым. Вследствие этого мальтоза, как и все дисахариды, построенные по типу моногликозидной связи, обладает восстановительной способностью, реагирует с фенилгидразином и обнаруживает явление мутаротации, заключающееся в том, что свежеприготовленный раствор ее показывает иное удельное вращение, чем раствор, некоторое время постоявший.

Мутаротация наблюдается у сахаров, обладающих свободной карбонильной группой, и обусловлена существованием у них двух диастереоизомерных форм (α и β) в связи с появлением в их циклической форме нового асимметрического атома углерода (отмечен*). Так например d-глюкозе должны быть приписаны формулы:



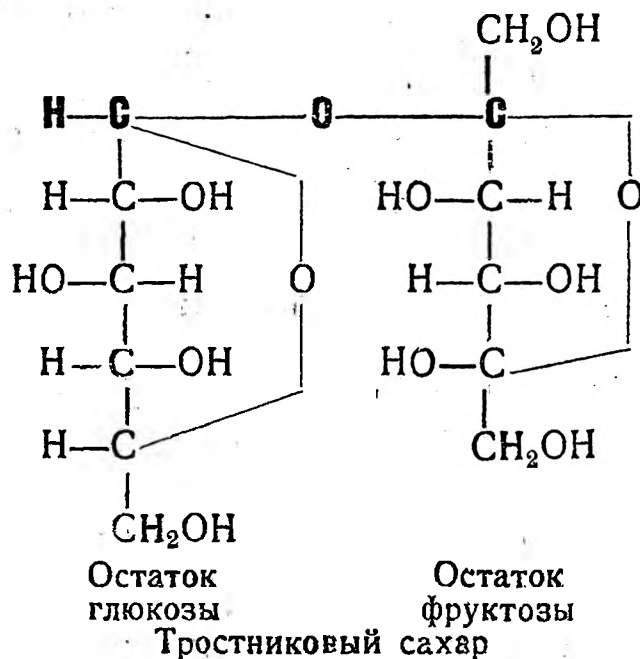
α -d-глюкоза
 $[\alpha]_D = +106^\circ$



β -d-глюкоза
 $[\alpha]_D = +19,8^\circ$

Эти две формы не являются оптическими антиподами и обладают различным удельным вращением. Обе модификации устойчивы лишь в твердом виде. В растворе устанавливается равновесие между обеими формами при определенном их соотношении.

Перечисленными свойствами не обладают дисахариды, построенные по типу диглюкозидной связи, типичным представителем которых может служить тростниковый сахар. В образовании диглюкозидной связи участвуют гидроксилы, стоящие при карбонильных группах обеих молекул:



Свободная мальтоза кристаллизуется с 1 молекулой воды в форме тонких иголок. Плоскость поляризации света вращает сильно вправо $[\alpha]_D = +138^\circ$. Сбраживается дрожжами, так как в них содержится мальтоза, расщепляющая мальтозу с образованием d-глюкозы.

Реакции на мальтозу

а) При пробе Троммера (см. ниже) образуется красный осадок закиси меди или желтый осадок гидрата закиси меди.

б) Фенилозозон мальтозы (табл. I, рис. 10b) выпадает лишь по остывании жидкости, нагревавшейся $1\frac{1}{2}$ часа в кипящей бане (получение озаона см. ниже при глюкозе).

Глюкоза

d-глюкоза, $C_6H_{12}O_6$, весьма легко растворима в воде, трудно в холодном, легко в горячем спирте. Кристаллизуется в виде бесцветных призм, собранных в шары. Безводная глюкоза плавится при 146° . Растворы глюкозы дают следующие реакции:

1. Альдегидная проба Мура (Moore).

При кипячении жидкости, подщелоченной едким натром, появляется сначала желтое, а затем темное бурое окрашивание и запах

карамели, делающийся более заметным при подкислении жидкости разбавленной серной кислотой.

2. Восстановление окислов металлов при нагревании в щелочной среде.

Серебро. К раствору ляписа в чистой (промытой крепкой HNO_3 , а затем водой) пробирке прибавляют несколько капель раствора едкого натра и затем по каплям, взбалтывая после каждой капли, аммиака только до растворения образовавшегося по добавлению NaOH осадка Ag_2O , избегая избытка аммиака. К полученному аммиачному раствору прибавляют испытуемую жидкость (нейтральную на лакмус) и нагревают в водяной бане или на голом огне—на стенках пробирки появляется серебряное зеркало (металлическое серебро).

Медь. Проба Троммера.

К раствору глюкозы в пробирке прибавляют $\frac{1}{3}$ объема 15% раствора едкого кали или едкого натра и затем осторожно по каплям разбавленный раствор медного купороса до появления небольшой, исчезающей при взбалтывании голубой мути гидрата окиси меди *. В тех случаях, когда медного купороса приходится добавлять очень много, к жидкости прибавляют еще $\frac{1}{4}$ объема едкой щелочи. Затем жидкость, в верхней ее части, нагревают до начала кипения. Появляется желтое окрашивание жидкости и образуется желтый осадок гидрата закиси или красный осадок закиси меди.

Раствор медного купороса следует прибавлять очень осторожно, так как избыток образовавшейся гидроокиси меди переходит при нагревании, теряя воду, в черную окись меди, что затемняет основную реакцию.

Висмут. Реакция Ниландера (Nylander). К испытуемой жидкости прибавляют $\frac{1}{5}$ — $\frac{1}{10}$ объема реактива Ниландера (2 г основного азотнокислого висмута, 4 г $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ и 100 г раствора NaOH удельного веса 1,12, нагревают на кипящей водяной бане, затем дают охладиться и отфильтровывают от нерастворившегося осадка) и кипятят 2—5 минут. Жидкость постепенно бурет—образуется черный осадок металлического висмута.

Эта реакция неприменима в присутствии белков, так как при нагревании со щелочью происходит отщепление слабосвязанной серы

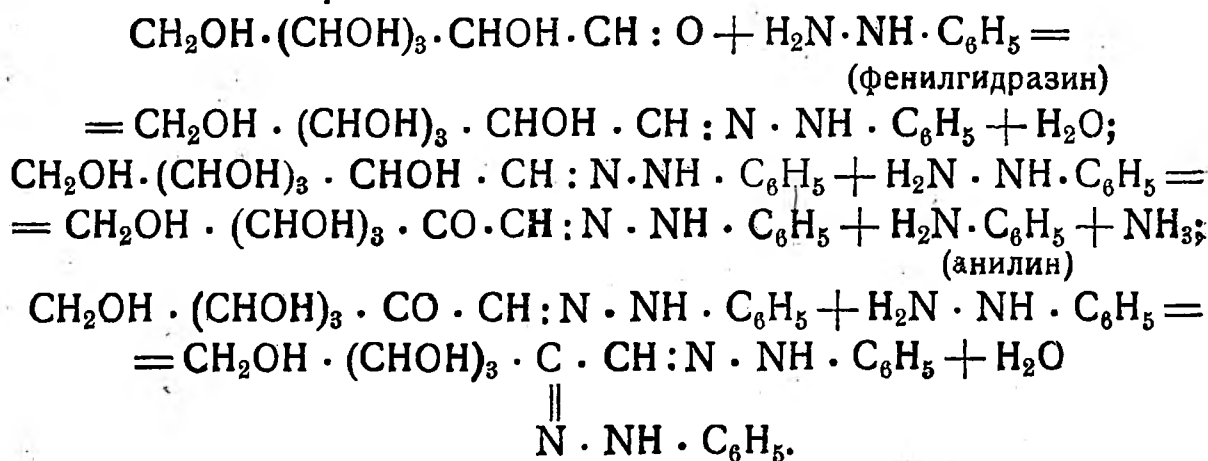
* Гидрат окиси меди вначале растворяется, так как дает с углеводом соединение, растворимое в щелочах с синим цветом.

(см. цветные реакции на белки), и образующийся чернобурый осадок Bi_2S_3 может симулировать восстановление.

3. Фенилгидразинная проба. Насыпают столько растертой в ступке смеси 2 весовых частей солянокислого фенилгидразина с 3 весовыми частями уксуснокислого натрия*, чтобы заполнить закругленную часть пробирки, наливают 1—2 см³ испытуемой жидкости, взбалтывают, оставляют в кипящей водяной бане на $\frac{1}{2}$ — $\frac{3}{4}$ часа, затем дают жидкости медленно охладиться и исследуют под микроскопом выделившиеся кристаллы. Если жидкость очень концентрирована, она приобретает интенсивно красную окраску и выделяет кристаллы лишь при разбавлении водой. При недостатке фенилгидразина, особенно легко при комнатной т-ре, вместо оазона образуется легко растворимый в воде гидразон.

Оазон весьма трудно растворим в воде, кристаллизуется в форме желтых иголок, собранных в пучки и снопы (табл. I, рис. 10а); плавится, разлагаясь, при 205°.

Химизм образования оазона:



4. Проба брожением (гл. III).

5. Вращение плоскости поляризации света (гл. I).

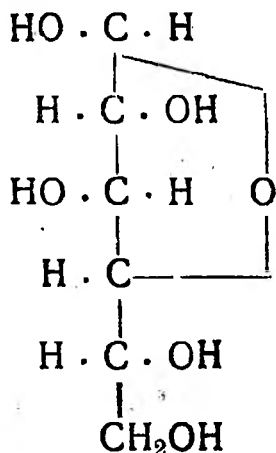
Глюкоза вращает вправо и показывает явление мутаротации. Удельное вращение для α -формы равно +106°, для β -формы равно +19,8°. В растворе устанавливается равновесие между обеими формами и удельное вращение делается равным $[\alpha]_D = +52,5^\circ$.

Для производства определения испытуемая жидкость должна быть свободной от других оптически деятельных веществ (например белков), достаточно прозрачной и мало окрашенной. Если испытуемое вещество находится в сухом виде, то опреде-

* $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ прибавляют для перевода солянокислого фенилгидразина в уксуснокислый.

ление производят через сутки после приготовления раствора, т. е. по установлении равновесия между диастереоизомерными формами; оно наступает через несколько минут, если жидкость прокипятить, особенно в присутствии OH -ионов (следы аммиака, соды, едких щелочей).

Помимо α - и β -глюкоз предполагают (хотя это далеко еще не доказано) существование отличной от них по строению и по вращению γ -глюкозы, являющейся весьма малоустойчивой, легко расщепляющейся в организме формой глюкозы:



Неустойчивая
 γ -форма d-глюкозы

О количественном определении глюкозы в моче см. стр. 225, о микроопределении в крови—стр. 236. О реакциях на фруктозу см. стр. 192, на молочный сахар—стр. 117, на крахмал и декстрины—стр. 52, на аскорбиновую кислоту—стр. 88, на глюкуроновые кислоты—стр. 191. О пентозах см. гл. II, об аминсахарах—стр. 131.

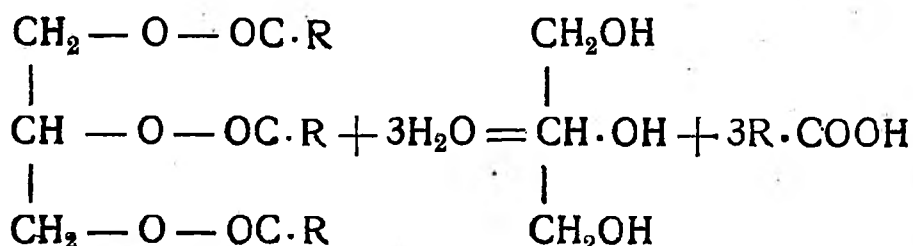
О превращениях углеводов в организме см. гл. III, XII и XIII.

Ж И Р Ы

Жиры—простые и смешанные триглицериды (сложные эфиры глицерина) высших жирных кислот, содержащих четное число атомов углерода. В состав жиров человека входят главным образом кислоты: олеиновая (89,8%), пальмитиновая (8,1%) и стеариновая (2,0%).

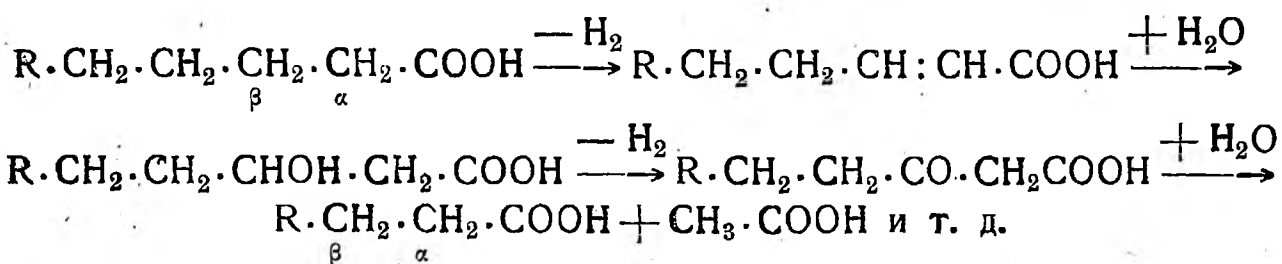
Жиры многих морских животных весьма отличны от обычных жиров; так, некоторые из них представляют эфиры высших одноатомных спиртов. В печени полярных акул вместо жира найдены весьма непредельные углеводороды (сквалены— $C_{30}H_{50}$).

Жиры представляют нейтральные на лакмус, не обладающие ни запахом, ни вкусом, бесцветные, способные кристаллизоваться вещества. Они нерастворимы в воде, трудно растворимы в холодном, легче—в горячем спирте, легко растворяются в эфире, хлороформе, сероуглероде. Растворяются друг в друге и особенно легко в жидкостях, содержащих желчнокислые соли. Жир вызывает на бумаге образование маслянистых прозрачных пятен, не исчезающих при лежании. Жиры легко дают стойкие эмульсии в щелочной среде, особенно в присутствии растворимых мыл или белков. Жиры и мыла сильно уменьшают поверхностное натяжение воды. При стоянии на воздухе на свету жиры прогоркают—окисляются* и расщепляются с образованием неприятно пахнущих продуктов (летучих жирных кислот, кетонов и альдегидов). При гидролизе [действием перегретого пара, кипячением с кислотами или щелочами, под влиянием ферментов (липаз)] жиры расщепляются на глицерин и жирные кислоты—омыляются.



* Преимущественно непредельные жирные кислоты.

В организме жиры омыляются под влиянием липаз (стр. 152) и образующиеся при этом глицерин и жирные кислоты отчасти снова синтезируются в жиры, отчасти идут на синтез липоидов (фосфатидов, эфиров холестерина, цереброзидов и др.), отчасти подвергаются дальнейшему расщеплению. Подготовка к распаду происходит в печени путем образования высших ненасыщенных жирных кислот под влиянием дегидраз. При расщеплении жирных кислот укорочение углеродной цепи происходит, повидимому, вследствие разрыва по месту двойной связи или в результате β -окисления. При β -окислении, т. е. окислении у β -углеродного атома, происходит последовательное отщепление по 2 углеродных атома:



β -окислению может предшествовать ω -окисление стоящей на другом конце цепи метильной группы, с образованием двухосновной кислоты.

Вываривание жиров

По возможности механически раздробленную богатую жиром ткань кипятят с водой или спиртом, причем разрушаются жировые клетки, и жир всплывает на поверхность.

Для приводимых ниже реакций можно пользоваться говяжьим или свиным салом и прованским маслом.

Растворимость

а) При нагревании с водой прованское масло не изменяется, а сало плавится, не растворяясь. б) Прованское масло растворяется в спирте, сало — лишь при нагревании (спиртовой раствор оставляет на бумаге жирные пятна). в) В эфире и прованское масло и сало растворяются легко.

Акролеиновая проба

Небольшое количество жира растирают в сухой ступке с порошком KHSO_4 , переносят смесь в сухую пробирку и осторожно нагревают. Появляется резкий запах акролеина, образующегося путем отщепления воды от глицерина:



Гидролиз жиров

а) Омыление этилатом натрия по способу Косселя (Kossel) и Обермюллера (Obermüller). Небольшое количество свиного или говяжьего сала растворяют в двойном объеме эфира, смешивают с 5 объемами спиртового раствора этилата натрия (1 г металлического Na на 50 см³ спирта) и оставляют стоять в склянке, закрытой пробкой. Жидкость превращается в желеобразную массу вследствие образования мыла в результате гидролиза. Мыло растворяют в воде и осаждают CaCl₂—образуется осадок известковых мыл.

б) Омыление спиртовой щелочью. В колбу помещают 25 г сала, приливают крепкий спиртовой раствор КОН (15 г КОН растворяют в 10 см³ воды на водяной бане и вливают в 100 см³ 90% спирта) и тщательно перемешанную жидкость нагревают до слабого кипения, закрыв колбу пробкой, через которую вставлен воздушный холодильник. Об окончании омыления узнают по прекращению образования масляных капель при добавлении к пробе жидкости дистиллированной воды. По окончании гидролиза жидкость переливают в чашку, добавляют 100 см³ воды, нагревают на водяной бане до удаления спирта. Полученную водную жидкость подкисляют H₂SO₄ или HCl—выделяется осадок свободных высших жирных кислот, причем делается ясно различимым запах летучих жирных кислот. Осадок собирают на влажный фильтр и тщательно промывают дистиллированной водой до исчезновения в промывных водах кислоты на лакмус реакции. Часть промытого осадка растворяют в эфире (отмытом водой от кислот) и прибавляют раствор к спирту, содержащему каплю раствора фенолфталеина и каплю раствора соды,—красная окраска исчезает, что указывает на присутствие в растворе свободных жирных кислот.

Другую часть осадка растворяют в едком натре и наблюдают: 1) образование мыльной пены при взбалтывании с водой, 2) выделение, при насыщении жидкости порошком NaCl, мыла, которое собирается на поверхности (высаливание), 3) образование осадка известковых мыл при добавлении раствора CaCl₂, 4) появление осадка известковых и магниевых мыл при добавлении водопроводной воды (жесткость воды).

в) Омыление водной щелочью. Жир кипятят в чашке с крепким водным раствором КОН или NaOH до полного омыления, причем поддерживают примерное постоянство объема

жидкости добавлением воды взамен испарившейся. Конец реакции узнают по отсутствию образования жировых капель при смешении 2—3 капель жидкости с полной пробиркой дистиллированной воды. Омыление идет очень беспокойно, с сильными толчками. Для полного омыления требуется несколько часов.

О ферментативном гидролизе жиров см. Пищеварение.

Открытие непредельных кислот

К раствору жира в хлороформе прибавляют по каплям при взбалтывании хлороформный раствор брома или иода. В случае присутствия в молекуле жира непредельных кислот (олеиновой, льняной, линоленовой) вначале происходит обесцвечивание растворов брома или иода.

Эмульгирование жиров

а) При взбалтывании прованского масла с 2—3 объемами воды образуется нестойкая эмульсия.

б) К 5 см³ воды прибавляют 2—3 капли 0,5% раствора Na₂CO₃ и 2 см³ нейтрального прованского масла*—при взбалтывании образуется довольно стойкая эмульсия.

в) Повторяют пробу „б“ с прогорклым прованским маслом,—эмульсия получается очень стойкая, что обусловлено присутствием свободных жирных кислот в прогорклом масле и образованием из них мыла.

г) При взбалтывании нейтрального прованского масла с разбавленным раствором белка образуется стойкая эмульсия.

Влияние жира и мыл на поверхностное натяжение воды

В чисто вымытый широкий стакан наливают до половины свежеперегнанной дистиллированной воды и насыпают несколько маленьких кусочков камфоры. Кусочки начинают быстро двигаться по поверхности, что стоит в связи со способностью камфоры понижать поверхностное натяжение воды; вследствие неодинаковой скорости растворения камфоры в различных частях

* Обыкновенное прованское масло взбалтывают с 10% раствором Na₂CO₃ и извлекают смесь эфиром. Эфирный слой отделяют и испаряют эфир; остаток представляет нейтральное прованское масло.

каждого кусочка поверхностное натяжение воды вокруг кусочка понижается неравномерно, и кусочек сдвигается в направлении большего натяжения.

Если дотронуться стеклянной палочкой до кусочка мыла и затем прикоснуться ею к поверхности воды, то поверхностное натяжение сразу понижается и движение кусочков камфоры прекращается.

Если тщательно вымыть стакан и повторить опыт, но вместо мыла прикоснуться палочкой к жиру, то кусочки будут отодвигаться от палочки (места малого натяжения) и наконец перестанут двигаться.

Л И П О И Д Ы

К группе так наз. „липоидов“, объединяющей различные по своему составу вещества, напоминающие жиры некоторыми физическими и химическими свойствами (особенно растворимостью), относятся фосфатиды, стерины (и их эфиры с высшими жирными кислотами), цереброзиды и сульфатиды*,**.

Лецитины. Кефалины

Наиболее встречающимися фосфатидами являются лецитины и кефалины***.

Лецитины—соединения, расщепляющиеся при гидролизе с образованием высших жирных кислот (главным образом пальмитиновой, стеариновой и олеиновой), глицерофосфорной кислоты

* Эти вещества весьма широко распространены в организме, но особенно богата ими нервная ткань. Фосфатиды и стерины являются необходимой составной частью каждой клетки; организм обладает способностью их синтезировать.

** Цереброзиды построены из остатков жирной кислоты, сфингозина (непредельный аминоалкоголь $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\cdot\text{CH}:\text{CH}\cdot\text{CH}\cdot\text{N}\cdot\text{H}_2\cdot\text{CHON}\cdot\text{CH}_2\text{OH}$) и d-галактозы. Сульфатиды—соединения, построенные по типу фосфатидов, но содержащие вместо остатка фосфорной кислоты остаток серной кислоты.

*** К фосфатидам относятся также сфингомиелины; они не содержат глицерина, вместо которого входит остаток сфингозина, связанный с остатком высшей жирной кислоты (амидная связь) и с остатком фосфорной кислоты, эфиروобразно соединенной с остатком холина.

воздуха (фёном). Сухую растертую массу настаивают на холоду с эфиром в течение 2—3 суток.

Эфирную вытяжку отфильтровывают, сгущают* и осаждают ацетоном—выпадает смесь лецитинов и кефалинов. Осадок (I) отфильтровывают [фильтрат (II) сохранить для выделения холестерина!] и проделывают с ним следующие реакции:

а) Часть осадка нагревают с едким кали или натром. При этом делается заметный запах селедочного рассола вследствие отщепления триметиламина из холина. Жидкость подкисляют HCl—выделяются жирные кислоты. Их отфильтровывают, нейтрализуют фильтрат, содержащий холин и глицерофосфорную кислоту, едким натром и выпаривают досуха на водяной бане (остаток А).

Часть остатка (А) растворяют в спирте и осаждают холин 10% спиртовым раствором хлорной платины. Образовавшийся осадок отфильтровывают, высушивают и растворяют в возможно малом количестве горячей воды. По охлаждению или при медленном испарении на воздухе выделяются (иногда крупные) оранжево-красные кристаллы хлороплатината холина.

В другой части остатка (А) открывают глицерин акролеиновой пробой (см. жиры).

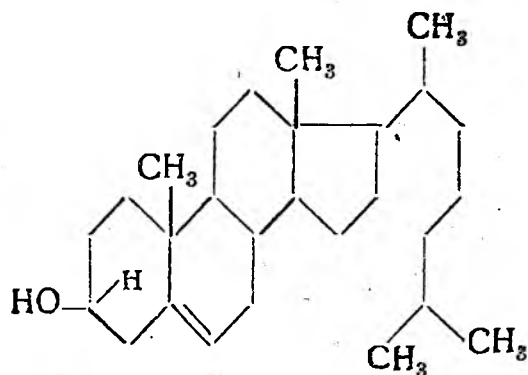
Третью часть остатка (А) сплавляют в тигле с KNO_3 и Na_2CO_3 , растворяют сплав в HNO_3 и производят пробу на фосфорную кислоту с молибденовокислым аммонием (стр. 47).

б) Остальное количество смеси лецитина и кефалина растворяют в небольшом количестве горячего спирта и раствор делят на 2 части: 1) при достаточном разбавлении одной части водой образуется белая эмульсия, 2) к другой части спиртового раствора добавляют спиртовой раствор $CdCl_2$ —образуется белый осадок кадмиевого соединения лецитина.

Холестерин

Главным представителем стеридов является холестерин— $C_{27}H_{45} \cdot OH$ —вторичный гидроароматический спирт, строение которого выражается формулой

* Эфирные вытяжки выпаривают на горячей водяной бане, потушив под ней горелку.



Подобно жирам холестерин нерастворим в воде и растворяется в эфире, хлороформе, бензине, ацетоне и горячем спирте. Из водного спирта кристаллизуется с одной молекулой воды в форме тонких бесцветных ромбоидальных пластинок, часто сросшихся ступенеобразно (табл. I, рис. 9). Плоскость поляризации света вращает влево: $[\alpha]_D = -36^\circ$ (в хлороформе). Плавится при 148° .

Реакции на холестерин

Эфирно-ацетоновый фильтрат (II) от смеси лецитинов и кефалинов, содержащий холестерин, выпаривают досуха в чашке на водяной бане.

а) Небольшое количество холестерина растворяют в горячем спирте, наливают несколько капель раствора на часовое стекло и исследуют под микроскопом форму выделившихся кристаллов.

б) Реакция Зальковского (Salkowski). К раствору холестерина в хлороформе прибавляют равный объем концентрированной H_2SO_4 и смешивают обе жидкости. После отстаивания верхний хлороформный слой жидкости окрашивается в красный цвет, нижний слой (H_2SO_4) желто-красного цвета и показывает зеленую флуоресценцию: жидкость в проходящем свете прозрачна и желто-красного цвета, в отраженном же свете кажется мутной и с зеленым оттенком*. Если к нижнему (H_2SO_4) слою жидкости прибавить ледяной уксусной кислоты, то жидкость делается розово-красной, флуоресценция сохраняется.

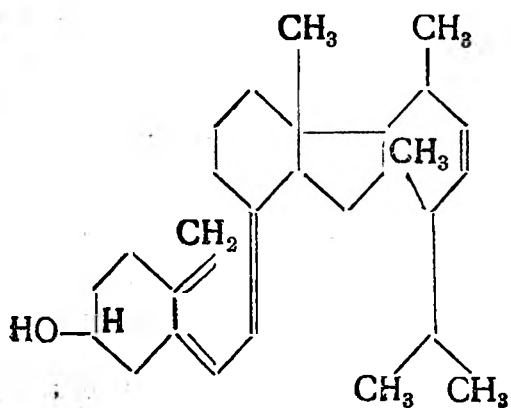
в) Проба Либермана-Бурхарда (Liebermann-Burchard). Немного холестерина растворяют в сухой пробирке в 2 см³ хлороформа. К жидкости прибавляют 10 капель уксусного ангидрида, 1—2 капли концентрированной H_2SO_4 и хорошо переме-

* Флуоресценция обусловлена поглощением части энергии падающего луча, превращением лучей с меньшей длиной волны в лучи с большей длиной.

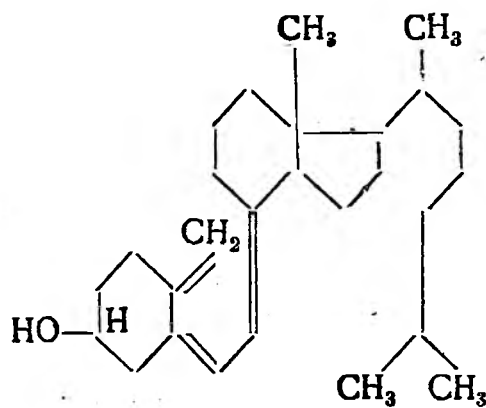
шивают. Жидкость принимает сначала красную, затем синюю и наконец сине-зеленую окраску. При малых концентрациях холестерина может сразу появиться зеленая окраска.

Цветные реакции на холестерин обусловлены по видимому переходом его как вторичного спирта путем отщепления воды в непредельный углеводород. Сходные реакции получаются и с другими стеринами, а также с холевой кислотой (см. гл. XII, желчь)*.

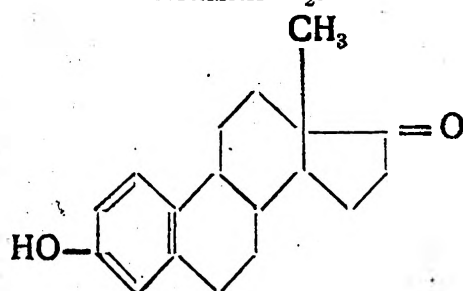
* Близки по строению к стеринам желчные кислоты (стр. 156), антирахи- тические витамины D₂ и D₃, половые гормоны, некоторые сердечные яды (диги- токсигенин), карциногенные вещества и др.



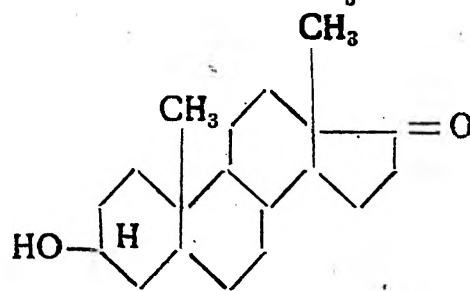
Витамин D₂.



Витамин D₃.



Женский половой гормон
(Фолликулин)



Мужской половой гормон
(андростерон)

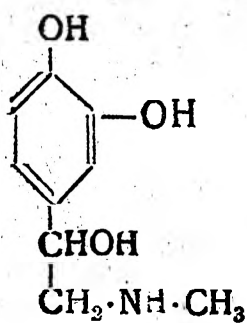
ГОРМОНЫ

Гормонами* были названы Старлингом (Starling) специфически действующие вещества, вырабатываемые в определенных местах организма, разносимые с кровью по всему организму и регулирующие деятельность различных органов. Химическое строение некоторых гормонов в настоящее время выяснено, например, адреналина—гормона надпочечников, тироксина—гормона щитовидной железы, некоторых половых гормонов (стр. 83).

Ниже приведены лишь реакции на адреналин, так как для других гормонов еще нет сколько-нибудь надежных химических методов их обнаружения. Но и в отношении адреналина химические методы не могут служить полной заменой биологической пробы.

Адреналин

1-адреналин, $C_9H_{13}NO_3$, найденный в мозговом веществе надпочечников у всех позвоночных (содержание адреналина в надпочечнике человека около 5 мг = 0,1%) и в ядовитом секрете околоушной железы японской жабы *Bufo agua* (около 5% адреналина), представляет собой производное пирокатехина. Кристаллизуется в



1-адреналин

с собой производное пирокатехина. Кристаллизуется в форме микроскопических иголок или листочков, плавящихся с разложением при 212°. Плоскость поляризации света вращает влево: $[\alpha]_D = -51,4^\circ$ (для 5% раствора 1-адреналина в п-НCl). Адреналин мало растворим в холодной воде, в холодном алкоголе, в эфире. Водные растворы адреналина имеют слабощелочную реакцию на лакмус. В силу своего основного характера адреналин легко растворим в кислотах; как фенол он растворяется в щелочах, причем избытком щелочей разлагается. Адреналин отчасти окисляется на воздухе, вследствие чего растворы его часто окрашены в розовый цвет.

* От греческого *βοηταο*—возбуждаю.

Введение в кровь даже ничтожных количеств адреналина оказывает очень сильное действие на организм: усиливает превращение гликогена печени и мышц в сахар, повышает кровяное давление, сильно суживая мелкие артерии*, вызывает расширение зрачка, сокращение мышц матки, влияет на деятельность сердца, на дыхание, служит нормальным раздражителем нервной системы**.

Реакции на адреналин

1. При нагревании 1 см³ водного раствора адреналина (1:1000) с каплей n/10 - раствора иода появляется розовое или красное окрашивание.

Эта реакция основана на образовании окрашенных продуктов окисления адреналина и получается также при действии других слабых окислителей.

2. К 1 см³ раствора адреналина прибавляют 1 каплю 5% раствора хлорного железа. Появляется изумрудно-зеленое окрашивание жидкости, переходящее в винно-красное при добавлении капли аммиака.

Эта реакция основана на содержании в молекуле адреналина пирокатехинового ядра. Подобное окрашивание от хлорного железа получается как с самим пирокатехином, так и с другими ортодиокси-соединениями.

* Этим пользуются для остановки или для предотвращения кровотечения при операциях.

** Действие адреналина связывают с его влиянием на окончания симпатических нервов.

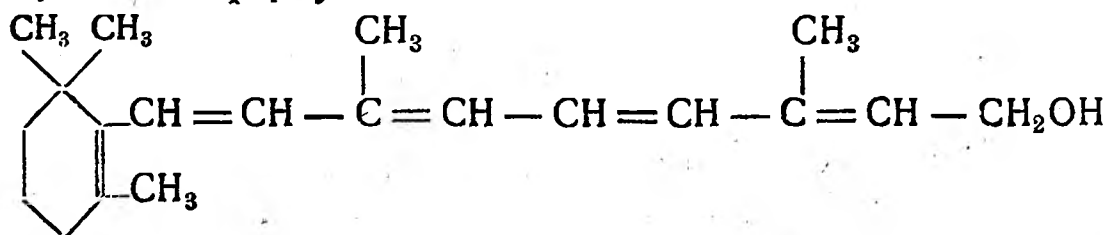
ВИТАМИНЫ

Витамины—вещества растительного происхождения, играющие в растениях, повидимому, роль гормонов и оказывающие также весьма важное влияние на течение и регулирование процессов в животном организме. Витамины являются необходимыми составными частями пищи животных, хотя и не имеют значения источников материи и энергии для организма, так как вводятся в организм в весьма малых количествах. Отсутствие витаминов в пище вызывает развитие таких заболеваний, как рахит, цынга, пеллагра, бери-бери, ксерофтальмия, обуславливает приостановку роста, потерю в весе и целый ряд других расстройств.

Животные получают витамины с пищей или в готовом виде, или в виде недействительных провитаминов, которые затем активируются под влиянием различных факторов (лучистой энергии и др.). Витамины широко распространены в природе. Они найдены и у высших растений, у водорослей, бактерий. Различают более 10 отдельных витаминов. Химическая природа некоторых из них в настоящее время уже выяснена*.

Витамин А

Витамин А (антиксерофтальмический витамин) представляет собой масло состава $C_{20}H_{30}O$, нерастворимое в воде, растворимое в жирах и жировых растворителях. Относится к классу полиенов; его строение выражается формулой



* ● строении витамина B_1 см. стр. 56 (брожение), витамина B_2 —окислительно-восстановительные ферменты (стр. 61), витаминов D_2 и D_3 — стр. 83.

серной кислоты. Появляется красивое постепенно усиливающееся фиолетовое окрашивание, переходящее примерно через 1 минуту в красно-бурое.

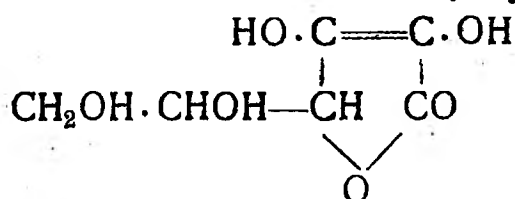
Эта реакция не является специфической для витамина А и получается с рядом других веществ биологического происхождения.

В основании обеих приведенных реакций лежит, вероятно, водоотнимающее действие добавляемых реактивов (SbCl_3 , конц. H_2SO_4).

Специфическим для определения витамина А является спектрофотометрическое измерение интенсивности полосы поглощения в ультрафиолетовой части спектра при $\lambda = 328$ м μ .

Витамин С

Одной из компонент витамина С, противоцинготного витамина, является 1-аскорбиновая кислота, имеющая строение энольной формы лактона 3-кетогулоновой кислоты. Аскорбиновая кислота представляет собой кристаллическое тело с температурой плавления 192° .



Аскорбиновая к-та

Растворима в воде и спирте. Вращает плоскость поляризации, света вправо $[\alpha]_D^{20} = 20^\circ$ (для 14% водного раствора). Обладает очень сильной восстановительной способностью. Разрушается при окислении, при нагревании на воздухе, но не изменяется при нагревании в отсутствие кислорода*; более устойчива в кислой среде, чем в щелочной. Окисление аскорбиновой кислоты может протекать обратимо, что делает вероятным ее участие в катализе окислительно-восстановительных процессов в организме. Аскорбиновая кислота является активатором для ряда ферментов (катепсина, аргиназы, папаина). Суточная потребность человека в аскорбиновой кислоте, 30—60 мг, легко покрывается ее содержанием во многих плодах, овощах и других свежих растительных продуктах, в молоке, яйцах и т. п.

Реакции на аскорбиновую кислоту

1. К нескольким каплям лимонного сока прибавляют каплю свежеприготовленного насыщенного на холоду раствора железоз-

* Нагреванием в вакууме пользуются при приготовлении содержащих витамин С консервов.

синеродистого калия $K_3Fe(CN)_6$ и затем каплю раствора хлорного железа. Появляется синее или зеленое окрашивание и при стоянии образуется синий осадок берлинской лазури.

Для контроля проводят пробу с водой, смешанной с теми же количествами $K_3Fe(CN)_6$ и $FeCl_3$, что и испытуемая жидкость; получается лишь бурое окрашивание жидкости, зависящее от образования железосинеродистой окиси железа.

2. При добавлении к лимонному соку реактива Бессонова [15% раствор фосфорно-вольфрамово-молибденовой кислоты ($17WO_3 \cdot MoO_3 \cdot P_2O_5 \cdot 24H_2O$) в 5% серной кислоте] появляется фиолетовое окрашивание.

3. К небольшому количеству лимонного сока прибавляют по каплям свежеприготовленный 0,02% раствор 2,6-дихлорфенол-индофенола (стр. 245). Происходит обесцвечивание краски.

Эти реакции, основанные на восстановительной способности аскорбиновой кислоты, не являются для нее специфическими, так как и некоторые другие вещества биологического происхождения способны окисляться в приведенных условиях.

В отношении других витаминов еще нет надежных химических методов их обнаружения. Но и приведенные здесь методы открытия витаминов А и С еще не могут заменить опытов на животных.

К Р О В Ъ

Кровь—жидкость непрозрачная, красного цвета, щелочной на лакмус реакции, удельного веса от 1,045 до 1,075, в среднем у человека 1,058. В ней различают форменные элементы (красные и белые кровяные тельца и пластинки Биццоцери) и жидкую часть—плазму, в которой форменные элементы взвешены. При стоянии кровь свертывается, происходит выделение нерастворимого белка—фибрина, захватывающего и форменные элементы. Сверток постепенно сжимается и выдавливает желтоватого цвета жидкость—сыворотку крови. Если во время свертывания крови ее помешивать, то фибрин выделяется в виде клубка волокон на предмете, которым производилось помешивание, и получается так называемая дефибрированная кровь, в которой большая часть кровяных телец остается во взвешенном состоянии.

Для определения удельного веса крови готовят такую смесь бензина и хлороформа, чтобы внесенная в нее капля крови не всплывала и не опускалась, т. е. чтобы удельный вес смеси был равен удельному весу крови (удельный вес бензина ниже, удельный вес хлороформа выше, чем у крови). Определяют ареометром (стр. 115) удельный вес смеси и тем самым узнают удельный вес крови.

Приведение смеси к нужному удельному весу не должно занимать более 1—2 минут, так как вследствие диффузии удельный вес внесенной капли крови постепенно меняется.

ПЛАЗМА КРОВИ

Для предохранения свежес выпущенной крови от свертывания ее смешивают с таким количеством 3% раствора щавелевокислой соли калия, натрия или аммония, чтобы содержание этой соли в крови равнялось 0,1%. Плазма, называемая оксалат-

ной, может быть отделена от форменных элементов отстаиванием или лучше центрифугированием (15 минут при 3 000 оборотах в минуту). Плазму с отседа снимают пипеткой или сливают сифоном*.

Значение ионов кальция для свертывания крови

Щавелевокислые соли препятствуют свертыванию крови, так как осаждают ионы кальция, необходимые для превращения протромбина в тромбин,—фермент, вызывающий свертывание крови.

К части оксалатной плазмы прибавляют $\frac{1}{10}$ объема 3% раствора хлористого кальция ($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), перемешивают и остав-

* Веществом, очень хорошо предохраняющим кровь от свертывания, является также выделенный из печени гепарин. Гепарин неядовит и потому может быть употреблен в опытах на животных. Он представляет собой полисахарид-эфирсерную кислоту, близкую хондроитино-серной кислоте (гл. XI, хрящевая ткань).

Получение гепарина. Свежевырезанную печень убитой обескровливанием собаки промывают через *vena portae* 1 л 1% раствора NaCl , хорошо отжимают, разрезают на мелкие куски, пропускают через мясорубку, намазывают тонким слоем на стеклянные пластинки и высушивают при $65-70^\circ$. 500 г порошка печени (лучше перед дальнейшей обработкой сухую растертую массу поместить в банку, закрытую пробкой, и оставить стоять несколько месяцев) растирают в ступке с 5-кратным количеством 1% раствора NaCl , добавляют аммиака до слабощелочной на лакмус реакции, оставляют на $\frac{1}{4}$ часа, помешивая время от времени, фильтруют через двойной слой полотна и отжимают остаток. Фильтрат центрифугируют, жидкость сливают, смешивают с равным объемом ацетона, хорошо взбалтывают и вновь центрифугируют в закрытой пробирке. Жидкость выбрасывают; осадок высушивают, переносят в колбу с обратным холодильником, кипятят 2 часа с избытком 95% метилового спирта, отфильтровывают, промывают горячим метиловым спиртом, снова сушат и извлекают при растирании в ступке 1% раствором NaCl , центрифугируют, декантируют, затем фильтруют вытяжку, смешивают фильтрат с равным объемом ацетона, хорошо взбалтывают и центрифугируют в закрытой пробирке; жидкость выливают, а осадок сушат, растворяют в возможно малом количестве воды, отфильтровывают раствор в маленький кристаллизатор и выпаривают на водяной бане. Полученные бурые в форме пластинок кристаллы сушат, растирают в порошок и сохраняют. Если при выпаривании остаток получается аморфным, то его вновь растворяют в воде, отфильтровывают и фильтрат выпаривают и повторяют эту обработку, пока не будет получен легко растворяющийся в воде кристаллический остаток.

Для предохранения от свертывания берут на 5—10 см³ крови около 1 мг полученного порошка.

ляют на водяной бане при 30—40°; вскоре наступает свертывание.

Избыток хлористого кальция (2—3%) препятствует свертыванию крови.

Фракционированное осаждение белков оксалатной плазмы

В плазме крови содержатся белки: фибриноген, сывороточный глобулин (параглобулин), сывороточный альбумин, а также небольшое количество нуклеопротеида и глюкوپротеида (серомукоида). Сывороточный глобулин представляет собой смесь нескольких глобулинов. Фибриноген обладает также свойствами глобулинов и отличается от сывороточного глобулина тем, что осаждается при полунасыщении поваренной солью (свободной от известковых солей). Для фибриногена характерна его способность переходить в фибрин, близкий в отношении растворимости к свернутым белкам; фибриноген выделяется также при $\frac{1}{4}$ насыщении сернокислым аммонием. Осадки фибриногена и сывороточного глобулина растворимы в 5% растворе NaCl. Сывороточный альбумин является по видимому смесью нескольких альбуминов. Сывороточный глобулин расщепляется нормальными растворами едких щелочей легче, чем сывороточный альбумин, тогда как под влиянием трипсин-киназы (гл. XII, поджелудочный сок) он в отличие от сывороточного альбумина не гидролизуется.

а) 12 см³ оксалатной плазмы разбавляют 30 см³ воды и смешивают с 20 см³ насыщенного раствора (NH₄)₂SO₄. Образуется липкий осадок фибриногена*; его отфильтровывают или отсасывают (стр. 37).

б) К 40 см³ фильтрата прибавляют 25 см³ насыщенного раствора (NH₄)₂SO₄—образуется осадок сывороточного глобулина; его также отфильтровывают.

в) Часть нового фильтрата слабо подкисляют разбавленной уксусной кислотой и кипятят—образуется осадок сывороточного альбумина.

г) Другую часть фильтрата насыщают порошком сернокислого аммония—образуется также осадок сывороточного альбумина.

* Для получения чистого фибриногена оксалатную плазму обрабатывают лишь после того, как выделился при стоянии на холоду осадок, содержащий протромбин, который отфильтровывают.

В нормальной крови отношение количеств глобулинов к альбуминам колеблется от 1:1,5 до 1:2,3. При многих патологических процессах это отношение (белковый коэффициент) меняется; при воспалениях почек может доходить до 1:11,3; при заболеваниях, сопровождающихся лейкоцитозом, наоборот, повышается относительное содержание глобулинов.

Остаточный (небелковый) азот крови.

Азот, содержащийся в фильтрате после осаждения белков крови, получил название небелкового или остаточного азота (RN). В норме содержание остаточного азота в крови человека колеблется от 28 до 42 мг-% (Ф о л и н, Folin) и определяется наличием азотистых экстрактивных веществ: мочевины, нормальное содержание которой в крови человека равно 19—32 мг-% (на долю мочевины приходится $\frac{1}{2}$ всего количества остаточного азота), аминокислот (6—7 мг-%), креатина (3—7 мг-%), креатинина (1—2 мг-%), мочевой кислоты (2—3 мг-%), индикана (0,025—0,082 мг-%), аммиака (0,02—0,03 мг-%), пуриновых оснований, фосфатидов и др. Увеличение количества остаточного азота наблюдается при различных патологических состояниях и в первую очередь при поражениях почек. При уремии находили содержание остаточного азота превышавшее 300 мг-%.

О микроопределении остаточного азота в крови см. стр. 241.

ДЕФИБРИНИРОВАННАЯ КРОВЬ

Реакция крови

Помещают каплю крови на красную и на синюю лакмусовые бумажки, смоченные 10% раствором NaCl. Через полминуты смывают дистиллированной водой—на красной бумажке остается синее пятно.

Кровь имеет слабощелочную на лакмус реакцию, обусловленную главным образом содой, но определение реакции затруднено из-за присутствия кровяного пигмента. Активная реакция крови, обусловленная содержанием в растворе H^+ , лежит при рН 7,3—7,5*.

* рН — водородный показатель; $pH = -\log [H^+] = \log \frac{1}{[H^+]}$; $[H^+] = 10^{-pH}$; $[H^+]$ концентрация ионов водорода. Об одном из методов определения рН см. стр. 208.

Осмотическое давление

Молекулы твердого вещества в растворе оказывают давление по всем направлениям, подобно тому, как это наблюдается у газов, и законы, определяющие повышение давления с увеличением концентрации, те же, что и для газов. В отношении давления ионы ведут себя как целые молекулы. При соприкосновении раствора с водой происходит движение частиц из раствора в воду (диффузия), пока не сравняется концентрация растворенного вещества во всей жидкости. Если же на границе обеих жидкостей находится полупроницаемая перегородка, т. е. перепонка, проницаемая для молекул растворителя и задерживающая молекулы растворенного в нем вещества, то наблюдаются явления осмоса.

Эти явления, связанные с существованием полупроницаемых перепонок, можно наблюдать на эритроцитах. Последние находятся в осмотическом равновесии с плазмой крови; если заменить плазму изотоничным ей (имеющим то же осмотическое давление, что и плазма) 0,9% раствором NaCl, то объем эритроцитов не изменяется. В гипертоническом растворе (растворе высшей осмотической концентрации) эритроциты отдают воду, пока не установится осмотическое равновесие; они сморщиваются, и объем их делается меньше. В гипотонических растворах (растворах меньшей осмотической концентрации), так же как и под влиянием воды, эритроциты увеличиваются в объеме вследствие прохождения в них воды через пограничный слой клетки, непроницаемый для твердых составных частей; набухание может доходить до того, что эритроциты разрушаются; гемоглобин отделяется от стромы и переходит в водный раствор (гемолиз).

К нескольким куб. сантиметрам дефибринированной крови в пробирке приливают понемногу при взбалтывании равный объем воды; к другой порции крови прибавляют равный объем изотоничного (0,9%) раствора NaCl, к третьей—равный объем 10% раствора NaCl; через несколько секунд исследуют под микроскопом каплю жидкости из каждой пробы. Помимо изменений, видимых под микроскопом, наблюдают изменения в окраске жидкостей.

В отраженном свете окраска в пробе с добавлением воды является более темной, в пробе с добавлением 10% раствора NaCl—более яркой, чем в исходной крови. Изменение окраски в первом случае обусловлено разбуханием эритроцитов, вследствие чего количество отраженного от них света уменьшается, во втором случае сморщен-

ные эритроциты отражают больше света, чем в норме. При рассмотрении в тонком слое в проходящем свете кровь в первой пробирке имеет вид красного лака (лаковая кровь), тогда как сама дефибринированная кровь непрозрачна; образование лаковой крови обусловлено гемолизом—выхождением пигмента из стромы эритроцитов в плазму.

Гемолиз наступает легче, если помимо воды прибавить немного эфира или какого-либо другого вещества, легко проникающего в клетку и способного растворить липоидную оболочку эритроцитов, вследствие чего клеточное содержимое выступает наружу.

Необходимость сильного разбавления крови (в $1\frac{1}{2}$ —3 раза) для получения гемолиза имеет большое значение для организма, так как не будь этого гемолиз наступал бы в циркулирующей крови под влиянием незначительных местных изменений концентрации (например при всасывании жидкостей в кишечном канале).

Газы крови

Анализ по методу Холдена (Haldane)

Определение способности крови связывать кислород. Определение содержания угольной кислоты в крови.

Принцип метода определения емкости крови в отношении кислорода основан на том, что гемолизированная кровь при добавлении $K_3Fe(CN)_6$ отдает O_2 , причем оксигемоглобин переходит в метгемоглобин (см. ниже). По изменению в объеме и давлении находящейся над кровью газовой смеси вычисляют количество выделившегося кислорода при условии отсутствия в крови CO , так как и окись углерода освобождается под влиянием $K_3Fe(CN)_6$.

Если после определения O_2 привести газы в равновесие с наружным воздухом, то добавлением виннокаменной (или молочной) кислоты из крови может быть вытеснена угольная кислота и измерена таким же путем, как и кислород.

Реактивы

Все реактивы готовят на свежeproкипяченной (для удаления угольной кислоты) дистиллированной воде.

1. Раствор аммиака (2 см³ крепкого аммиака удельного веса 0,88 смешивают с 500 см³ воды).
2. Свежеприготовленный (может стоять не более 2 дней) насыщенный по холоду раствор K₃Fe(CN)₆.
3. Дистиллированная вода (свободная от угольной кислоты).
4. 20% раствор виннокамненной кислоты.

Определение можно проводить в упрощенном приборе, изображенном на рис. 10. Он состоит из склянки, примерно на 120 см³, закрытой каучуковой пробкой, через которую проходит Т-образная трубка; один конец трубки закрыт короткой каучуковой трубкой с винтовым зажимом, другой—при помощи толстостенной каучуковой трубки (диаметр просвета 1 мм) соединен с перевернутой бюреткой (или пипеткой) с делениями на 0,05 см³, помещенной в высокий цилиндр.

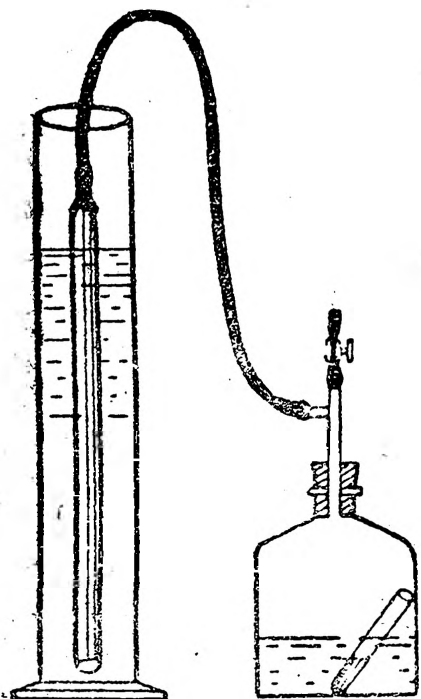


Рис. 10.

а) Определение емкости крови в отношении кислорода

В склянку отмеривают пипеткой 20 см³ оксалатной или дефибринированной крови*. Последние капли крови не выдувают во избежание смешения крови с выдыхаемым воздухом, а вытесняют, закрыв верхнее отверстие пипетки, нагреванием рукой расширенной ее части. Отмеренную кровь взбалтывают с воздухом для насыщения ее кислородом и смешивают с 30 см³ разбавленного аммиака. Вода вызывает гемолиз, а аммиак связывает образующуюся при этом угольную кислоту. Снова взбалтывают жидкость до тех пор, пока при рассматривании в тонком слое она не станет совершенно прозрачной. В маленькую пробирку,

* Кровь должна исследоваться возможно быстро после взятия, так как образующаяся при стоянии молочная кислота ведет к ошибке как при определении угольной кислоты, так и кислорода. Эти изменения устраняются стерильными условиями взятия крови и хранения на льду с добавлением 0,05—0,1% NaF; однако и при этих условиях анализ не должен производиться позже, чем через 12 часов после взятия крови. В качестве веществ, препятствующих свертыванию крови, применяют щавелевокислый калий, лимоннокислый натрий, гирудин, гепарин. В тех случаях, когда хотят избежать обмена газов между кровью и воздухом, кровь собирают под жидкий парафин.

длина которой немногим превышает ширину склянки, наливают 4 см³ раствора K₃Fe(CN)₆ и ставят пробирку в склянку, прилонив к стенке. Склянку закрывают пробкой с Т-образной трубкой, соединенной с бюреткой, и помещают в сосуд с водой (ванну) комнатной т-ры. Открывают зажим на Т-образной трубке и наполняют цилиндр водой так, чтобы она заполнила бюретку почти доверху, однако не выше верхнего деления; уровень воды в цилиндре и в бюретке устанавливается на одной высоте. Через 5—10 минут закрывают зажим и наблюдают, происходит ли изменение стояния жидкости в бюретке. Если уровень изменился, то, открыв зажим, выравнивают давление с наружным воздухом и вновь закрывают зажим; эту операцию повторяют до тех пор, пока уровень жидкости в бюретке не перестанет меняться. Тогда отмечают уровень стояния жидкости в бюретке, показание барометра и т-ру ванны. Вынимают склянку из воды и энергичным взбалтыванием (чтобы не образовалось крупных хлопьев свернувшегося белка) смешивают гемолизированную кровь с раствором K₃Fe(CN)₆; взбалтывание продолжают все время, пока происходит выделение газа. Затем склянку вновь помещают в банку; добавлением холодной или теплой воды приводят ванну к той т-ре, которая была при первом отсчете; устанавливают бюретку так, чтобы уровень воды в ней и в цилиндре был на одной высоте, и производят отсчет.

Разница между последним отсчетом и первым дает объем выделившегося кислорода. Этот объем (V) приводят к 0°, 760 мм и сухости, пользуясь формулой:

$$V_0 = \frac{V \cdot (b - f) \cdot 273,}{760 \cdot (273 + t)}$$

где b—барометрическое давление в миллиметрах ртутного столба во время отсчета объема газа (с поправкой, внесенной по таблице, приложение 3);

t—температура во время отсчета;

f—упругость насыщенного водяного пара при данной t° в миллиметрах ртутного столба (табл. 2).

Помимо этого вносят поправку на отмеривание крови пипеткой. Средняя величина отмеривания крови пипеткой соответствует 97,1% ее объема с отклонением ± 1% от этой величины, т. е. из пипетки в 20 см³ выливается всего 19,6 см³ крови.

20 см³ свежей бычьей крови дают примерно 4 см³ кислорода. При

100% содержания гемоглобина 1 см³ крови человека дает 0,185 см³ O₂ (0°, 760 мм)*.

Если в качестве газовой бюретки взять пипетку на 2 см³ с делениями на 0,01 см³, то нужное для анализа количество крови можно свести к 3—5 см³.

б) Определение содержания CO₂ в крови

Определение производят в пробе крови после определения O₂ так, как это описано для кислорода, лишь с тем отличием, что вместо раствора K₃Fe(CN)₆ прибавляют 4 см³ 20% раствора виннокаменной кислоты.

Объем выделившегося газа, приведенный к 0° и 760 мм Hg, дает содержание CO₂ в исследуемой крови. Помимо поправки на отмеривание крови пипеткой здесь вносят еще поправку на количество CO₂, которое и по добавлении виннокаменной кислоты остается в крови физически абсорбированным. Оно составляет при 13° 1% наблюдаемого объема CO₂ = 1,065% приведенного к 0° объема. С повышением т-ры эта величина понижается с каждым градусом на 2,5%, так как физическая абсорбция с повышением т-ры уменьшается.

Свертывание белков дефибринированной крови при нагревании; открытие поваренной соли и сахара

25 см³ дефибринированной крови разбавляют в чашке 150 см³ воды и нейтрализуют разбавленной уксусной кислотой. Нагревают при постоянном помешивании до кипения и очень слабо подкисляют разведенной уксусной кислотой. Образовавшийся бурый сверток, состоящий из белков крови и из гематина—продукта разложения кровяного пигмента, отфильтровывают и с ним проделывают ксантопротеиновую реакцию (см. цветные реакции на белки).

* Способность гемоглобина связывать кислород зависит от количества и состава находящихся в растворе электролитов и потому не является вполне одинаковой для разных видов животных. В вычислении содержания гемоглобина в крови из емкости в отношении кислорода исходят из наблюдения, что 1 г гемоглобина связывает (оксигемоглобин—отдает) 1,34 см³ O₂ (0°, 760 мм). Кровь, 100 см³ которой связывают 18,5 см³ O₂, т. е. содержат 13,8 г гемоглобина, принимается условно за 100%. Содержание гемоглобина находят, умножая объемный процент содержания

O₂ на 0,746 $\left(= \frac{13,8}{18,5} \right)$.

Если не было прибавлено избытка уксусной кислоты, то фильтрат получается прозрачным и бесцветным; при избытке уксусной кислоты может получиться буроватая окраска жидкости вследствие образования кислого гематина (см. ниже).

Фильтрат сгущают выпариванием в чашке на водяной бане до объема в 20 см³.

а) Открытие NaCl

Часть фильтрата подкисляют HNO₃ и осаждают AgNO₃; выделяется белый творожистый осадок AgCl, растворимый в NH₃.

б) Открытие сахара

В случае свежей крови можно сделать пробу Троммера на виноградный сахар (гл. IV).

В крови, стоявшей некоторое время, проба может не удалась, так как сахар легко окисляется под влиянием гликолитических ферментов. Нормальное содержание сахара в крови человека около 0,1% (70—110 мг-%).

О микроопределении сахара в крови см. стр. 236.

Разложение перекиси водорода

К небольшому количеству дефибринированной крови прибавляют примерно двойной объем 3% раствора перекиси водорода— происходит выделение кислорода.

Эта реакция, вызываемая кровяными пигментами и каталазой (стр. 56), протекает интенсивнее со свежей кровью, содержащей ферменты.

Гваяковая проба Вебера (Weber)

Берут 2—3 капли дефибринированной крови на пробирку воды, хорошо размешивают и приливают около 2 см³ спиртового раствора гваяковой смолы (0,5 г смолы растворяют в 30 см³ 95% спирта), смешанного перед самым опытом с 1—2 каплями приблизительно 1% раствора перекиси водорода. Через некоторое время появляется синяя окраска, после долгого стояния исчезающая.

Эта реакция удается с кровью еще при разбавлении 1:10 000, со старыми кровяными пятнами, с карбоксигемоглобином, гемохромоге-

ном, кристаллами гемина и т. д., с прокипяченными растворами крови, и обусловлена окислением гваяковой смоляной кислоты с образованием ее озонида вследствие переноса на нее кислорода из перекиси водорода под влиянием кровяного пигмента и пероксидаз (стр. 58) крови.

Бензидиновая проба

К небольшому количеству разбавленного раствора дефибринированной крови прибавляют равный объем свежеприготовленного 10% раствора бензидина $\text{NH}_2 \cdot \langle \text{C}_6\text{H}_4 \rangle - \langle \text{C}_6\text{H}_4 \rangle \cdot \text{NH}_2$ в ледяной уксусной кислоте и затем 1 см³ 3% раствора перекиси водорода. Появляется синяя или зеленая окраска, зависящая от образования продуктов окисления бензидина.

Чувствительность этой реакции очень высока: она удаётся еще при разбавлении крови 1 : 200 000, но она не является специфичной, так как помимо кровяных пигментов ее дают и другие переносчики кислорода.

Три последние реакции повторяют с разбавленной, прокипяченной и отфильтрованной от осадка белков кровью.

СЫВОРОТКА КРОВИ

Сыворотка крови—слегка вязкая, липкая, прозрачная или слабо опалезирующая жидкость, более или менее ясно желтого цвета, который зависит главным образом от пигмента, относящегося к группе липохромов*. Часто сыворотка имеет красноватую окраску вследствие присутствия растворенного оксигемоглобина.

Для получения сыворотки, не окрашенной кровяными пигментами, кровь собирают в цилиндр, опущенный в воду т-ры тела. Цилиндр наполняют кровью доверху, закрывают пробкой и оставляют свертываться при той же т-ре. Наполнение цилиндра доверху и поддержание т-ры тела устраняют возможность отпотевания на стенках цилиндра капель воды, которые при стекании ведут к разрушению части эритроцитов.

В сыворотке содержатся за исключением фибриногена те же белки, что и в плазме.

Липохромы близко стоят к растительным пигментам: каротину, стр. 87—высокомолекулярному непредельному углеводороду ($\text{C}_{40}\text{O}_{56}$) и его диоксидированному—ксантофиллу ($\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_2$).

а) К 20 см³ воды, подкисленной 3 каплями 1% уксусной кислоты, прибавляют 1—2 см³ сыворотки крови. При стоянии выделяется легкий хлопчатый осадок сывороточного глобулина (свойства глобулинов, гл. I).

б) При добавлении нескольких капель сыворотки крови к насыщенному водному раствору MgSO₄ также образуется осадок сывороточного глобулина.

в) При добавлении к сыворотке равного объема насыщенного раствора (NH₄)₂SO₄ образуется осадок сывороточного глобулина; его отфильтровывают и часть фильтрата нагревают,—происходит свертывание сывороточного альбумина; другую часть фильтрата насыщают (NH₄)₂SO₄—образуется осадок также сывороточного альбумина. Фильтрат от сывороточного альбумина не содержит белков, что может быть обнаружено например по неполучению осадка и окрашивания при ксантопротеиновой пробе.

г) Отсутствие фибриногена в сыворотке крови.

К сыворотке крови прибавляют полобъема насыщенного раствора NaCl (не содержащего известковых солей) и отфильтровывают от образовавшегося осадка; к фильтрату прибавляют остальное нужное для полунасыщения количество NaCl—осадок фибриногена не выпадает.

О получении сывороточного альбумина в кристаллическом виде см. стр. 28.

Буферные свойства сыворотки

В одну пробирку наливают 1 см³ сыворотки, в другую—1 см³ воды. В обе пробирки прибавляют по 3—4 капли индикатора бромфенолблау* (0,04% водный раствор) и затем по каплям из бюретки или из пипетки n/10-раствор соляной кислоты; отмечают, какое количество кислоты пошло в том и другом случае до достижения одинакового изменения окраски**.

* Область изменения окраски бромфенолблау (тетрабромфенолсульфонфталеин) лежит при pH 3,0—4,6; окраска в кислой среде бледножелтая, в щелочной—сине-фиолетовая.

** Буферным действием обладают малодиссоциирующие на ионы соединения кислого или основного характера, например кисло или щелочно реагирующие соли, слабые кислоты или основания, в особенности в присутствии их солей.

КРОВЯНЫЕ ПИГМЕНТЫ

Кровяные пигменты относятся к хромопротеидам и расщепляются при гидролизе, нагревании, действии спирта, солей тяжелых металлов, с образованием белка глобина и небелкового железосодержащего красящего вещества гемохромогена (из гемоглобина) и гематина (из оксигемоглобина).

Функцией кровяных пигментов является перенос кислорода к тканям, а также буферное действие, т. е. способность ослаблять изменение активной реакции крови, делать реакцию устойчивой по отношению к кислотам и щелочам.

Оксигемоглобин

Оксигемоглобин (О-Нб)—амфолит со свойствами слабой кислоты (приближается по силе к угольной кислоте); растворим в воде, в органических жидкостях не растворяется; О-Нб имеет яркокрасный цвет с желтоватым оттенком (алый); вращает плоскость поляризации света вправо $[\alpha]_D = +10,4^\circ$ (для 1,2% раствора). Азотнокислое серебро, средний и основной уксуснокислый свинец не осаждают О-Нб, но при стоянии происходит расщепление О-Нб и осаждение глобина. О-Нб представляет молекулярное соединение гемоглобина с кислородом. Реакция соединения гемоглобина с кислородом обратима; при действии восстановителей (например NH_4HS), при уменьшении парциального давления кислорода (в вакууме, при пропускании тока индифферентного газа) происходит отщепление кислорода—образуется гемоглобин; обратно, под влиянием кислорода воздуха происходит образование О-Нб из гемоглобина. Способность присоединять кислород стоит в связи с содержанием в гемоглобине железа, повидимому, двувалентного. Белковый компонент гемоглобина весьма влияет на способность железа связывать кислород.

Получение кристаллов О-Нб

К 20 см³ крови барана, собаки или лошади прибавляют 2 см³ воды, 2 см³ эфира и перемешивают до наступления полного гемолиза (контролируют микроскопом). Жидкость смешивают с равным объемом насыщенного раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, тотчас отфильтровывают от образующегося осадка и оставляют фильтрат на сутки в закрытой пробкой склянке. При исследовании под микроскопом выделившегося при стоянии осадка видны кристаллы О-Нб в виде длинных узких пластинок или призм красного цвета (табл. II, рис. 3).

Кристаллы метгемоглобина (см. ниже) также могут быть получены по этому методу, если лаковую кровь сначала взболтать с несколькими каплями железосинеродистого калия $[K_3Fe(CN)_6]$.

Спектроскопическое исследование кровяных пигментов

Сложный пучок белого света, проходя через призму (рис. 11), претерпевает на каждой грани преломление, сопровождающееся дисперсией вследствие неодинакового преломления лучей различной длины волны. Получается цветной пучок лучей — спектр. Пучок фиолетовых лучей оказывается наиболее отклоненным, пучок красных — наименее; поря-

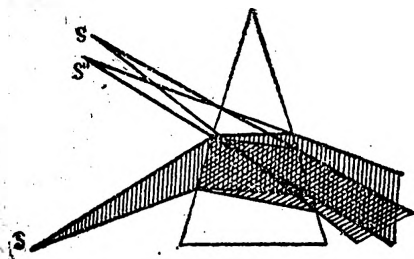


Рис. 11.

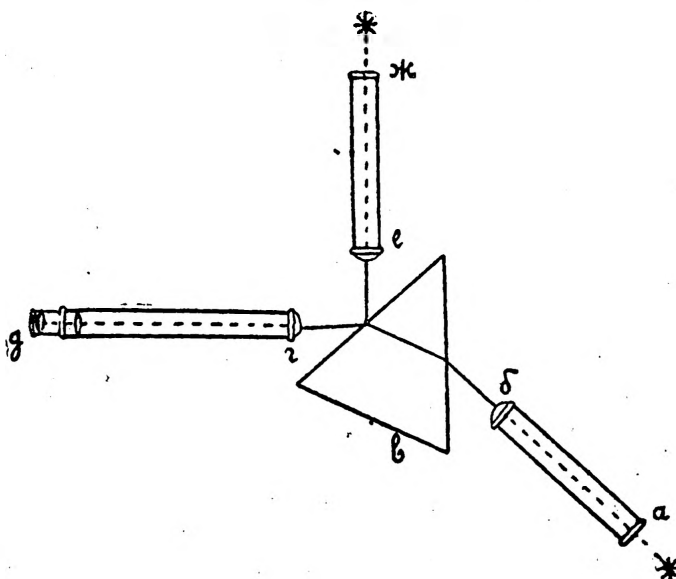


Рис. 12.

док цветов: красный, оранжевый, желтый, зеленый, синий, индиго-
вый и фиолетовый.

На конце *a* трубы, называемой коллиматором (рис. 12), находится вертикальная щель, ширина которой может меняться при помощи микрометрического винта; на другом конце *б* находится выпуклая линза, в фокусе которой расположена щель *a*; таким образом достигается превращение света, поступающего через щель, в параллельный пучок, который в призме *в* подвергается разложению в спектр и через зрительную трубу *г—д*, увеличивающую изображение, попадает в глаз наблюдателя. В трубе *e—ж* у *ж* находится прозрачная шкала, изображение которой при освещении шкалы отражается от грани призмы, обращенной к зрительной трубе, и попадает в поле зрения. Нижняя половина щели *a* прикрывается прямоугольной призмой, которая отражает в коллиматор свет от другого источника и ведет к получению в верхней части поля зрения (зрительная труба обращает изображение) второго спектра, служащего для сравнения.

Спектры следует наблюдать при возможно более узкой щели спектроскопа.

Это вызывается тем, что спектр состоит из ряда различно отклоненных, окрашенных изображений щели, накладывающихся отчасти одно на другое; наложение тем меньше и следовательно спектр тем чище, чем уже щель.

В правильно собранном аппарате при наблюдении дневного неба должны быть ясно видны темные Фраунгоферовы линии солнечного спектра, обусловленные абсорбцией света раскаленными парами находящихся в солнечной атмосфере металлов: в красной части спектра видны три линии А ($\lambda = 759,4$ м μ *), В ($\lambda = 686,7$) и С ($\lambda = 656,3$), в желтой одна — D (двойная, $\lambda = 589,6; 589,0$), в зеленой три — E ($\lambda = 527,0$), b, F ($\lambda = 486,1$), в фиолетовой две — G ($\lambda = 430,8$) и H ($\lambda = 396,9$).

Если между источником света и щелью спектроскопа поместить жидкость, поглощающую лучи той или другой длины волны, в соответствующих местах спектра обнаруживаются темные линии или полосы, получают так называемые спектры поглощения. Для их наблюдения направляют щель аппарата на рассеянный сильный дневной свет или на свет яркой лампы и освещают шкалу у ж. Испытуемую жидкость в сосуде с плоскопараллельными стенками устанавливают возле самой щели, так чтобы свет падал перпендикулярно к параллельным плоскостям сосуда. Можно применять и клинообразные сосуды, а также пробирки, но в последнем случае следует иметь в виду, что они обладают свойствами цилиндрических линз, и надо заботиться о том, чтобы свет, пройдя жидкость в пробирке, падал на щель спектроскопа яркой полосой. Положение и протяжение полос поглощения определяются шкалой, калиброванной для длин волн (λ), выражаемых в миллионных долях миллиметра (м μ), и сравниваются с положением Фраунгоферовых линий солнечного спектра.

Оксигемоглобин дает характерную спектроскопическую картину.

Дефибринированную кровь, разведенную 5 объемами воды, постепенно разбавляют, наблюдая в спектроскопе, еще в 6 раз. Вначале видна лишь красная часть спектра, затем появляется свет в зеленой части, и наконец делаются видными 2 полосы

* 1 м μ = 0,000001 мм.

поглощения в желтом и зеленом цвете между фраунгоферовыми линиями D и E. Ближе к D находится узкая резкая полоса (ее середина соответствует длине волны $\lambda = 578,1 \text{ м}\mu$), середина второй полосы, более широкой и бледной, соответствует $\lambda = 541,7 *$ (см. таблицу спектров поглощения).

Обе полосы поглощения делаются видимыми в 0,1% растворах оксигемоглобина при толщине слоя в 1 см; они еще ясно видны в 0,01% растворах и исчезают при разведении большем, чем 1 : 14 700. Вместо дефибринированной крови можно пользоваться раствором кристаллов O-Hb в воде.

Гемоглобин

Гемоглобин (Hb) отличается от O-Hb меньшим содержанием кислорода. Кристаллы Hb изоморфны с кристаллами O-Hb, но легче растворимы в воде. Цвет Hb темнокрасный с фиолетовым оттенком (багровый). Большинство солей тяжелых металлов Hb не осаждается. Гемоглобин находится в эритроцитах в растворенном виде.

К раствору O-Hb, разбавленному лишь настолько, чтобы появились обе полосы поглощения между D и E, прибавляют несколько капель раствора NH_4HS и нагревают до 50° или оставляют стоять при обычной т-ре. Желтовато-красный первоначально раствор приобретает вскоре фиолетовый оттенок, и в спектре появляется с нерезкими краями полоса поглощения между D и E, несколько заходящая за D в сторону красного конца спектра и немного не доходящая до E; наиболее темная ее часть соответствует длинам волн 555—558 м μ . Помимо этих полос иногда наблюдается узкая полоса в красной части спектра, обусловленная образованием сульфогемоглобина при действии H_2S на гемоглобин. Сульфогемоглобин не образуется, если вместо NH_4HS взять несколько капель реактива Стокса (Stokes)**, действующего к тому же быстрее сернистого аммония и не требующего нагревания.

В обоих случаях происходит восстановление O-Hb до Hb; в первом

* В тех случаях, когда нельзя воспользоваться дневным светом, место положения D легко установить, внося стеклянную палочку в газовое пламя, причем получается яркожелтое пламя, дающее в спектре интенсивно желтую линию, положение которой в точности соответствует положению линии D.

** Реактив Стокса представляет 2% раствор сернокислой закиси железа в 2—3% виннокаменной кислоте; перед употреблением к реактиву прибавляют аммиака до растворения первоначально образующегося осадка.

случае за счет окисления серы ($S'' \rightarrow S^\circ$), во втором—железа ($Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$).

Если раствор гемоглобина хорошо взболтать с воздухом, то происходит окисление Hb и появляются окраска и спектр оксигемоглобина.

Hb по мере соединения с кислородом делается все более сильной кислотой, что имеет значение при удалении угольной кислоты из крови.

Метгемоглобин

Метгемоглобин (M-Hb) представляет собой соединение Hb с кислородом более прочное, чем O-Hb (в вакууме, при пропускании тока индифферентного газа не происходит отщепления кислорода). M-Hb кристаллизуется в бурокрасных иглах, призмах и пластинках; осаждается смесью основного уксуснокислого свинца и аммиака (отличие от Hb и O-Hb). M-Hb образуется под влиянием многих веществ, особенно окислителей; встречается в крови при патологических условиях, при отравлении бертолетовой солью, нитробензолом, анилином и др. Содержит, повидимому, трехвалентное железо.

К дефибринированной крови, разбавленной 5 объемами воды, прибавляют несколько капель свежеприготовленного раствора $K_3Fe(CN)_6$ и взбалтывают. Жидкость принимает красновато-бурю окраску, и в спектре появляются 3 полосы поглощения: одна резкая характерная полоса в красной части спектра между C и D ($\lambda = 630 \text{ м}\mu$), 2 полосы между D и E ($\lambda = 580$ и $540 \text{ м}\mu$), соответствующие по положению полосам поглощения O-Hb и может быть ими обусловленные. В хорошем спектроскопе видна еще 4-я полоса в синевато-зеленой части спектра между b и F ($\lambda = 500 \text{ м}\mu$).

Если к раствору M-Hb прибавить несколько капель NH_4HS , то в спектре вместо полос поглощения M-Hb появляется одна полоса поглощения Hb.

Этим M-Hb отличается от гематина (см. ниже), который дает в кислой среде спектр поглощения, похожий на спектр M-Hb, но при восстановлении NH_4HS переходит в характерный спектр гемохромогена.

Образование M-Hb из O-Hb протекает в 2 стадии: вначале происходит отщепление слабо связанного кислорода и лишь затем окисление гемоглобина до M-Hb.

Карбоксигемоглобин

Карбоксигемоглобин (CO-Hb)—молекулярное соединение Hb и окиси углерода—является соединением гораздо более прочным, чем

О-Нб. В организме СО-Нб образуется при отравлении угарным и светильным газом. У животных, обитающих в городах с сильно развитой газовой сетью, в крови содержатся следы СО-Нб.

СО-Нб может быть приготовлен насыщением дефибринированной крови светильным газом, который содержит обычно около 8% СО, но лучше для этой цели пользоваться током окиси углерода, получаемой при действии концентрированной H_2SO_4 на муравьиную кислоту; в последнем случае на пути газа должна быть поставлена склянка с раствором едкой щелочи.

Кровь, насыщенная окисью углерода, имеет цвет сока красной смородины. Разбавленные растворы СО-Нб дают в спектре 2 полосы поглощения между D и E ($\lambda=572$ и 536 м μ), сходные с полосами поглощения О-Нб, но смещенные несколько к фиолетовому концу спектра.

При добавлении к раствору СО-Нб сернистого аммония или реактива Стокса образования Нб не происходит (практически важное отличие от О-Нб).

Натронная проба. Смешивают на крышке тигля 2 капли крови, насыщенной окисью углерода, с 2 каплями 25% раствора едкого натра,—образуется красный осадок СО-Нб, тогда как нормальная кровь дает при этом бурое с зеленоватым оттенком окрашивание вследствие образования гематина. При стоянии красный осадок постепенно буреет.

ПРОДУКТЫ РАСЩЕПЛЕНИЯ КРОВЯНЫХ ПИГМЕНТОВ

Гематин

Гематин, $C_{34}H_{32}O_4N_4Fe^{III}$. ОН, пигмент, образующийся в количестве 4,3% при действии кислот или щелочей на О-Нб. В молекулу гематина входят 4 замещенных пиррольных кольца, 1 ОН-группа, соединенная с атомом трехвалентного железа, комплексно связанным, и 2 карбоксильные группы, сообщающие ему кислый характер (ср. ниже строение гемина). Гематин является, по видимому, продуктом окисления красящего вещества гемоглобина (гема). Гематин представляет собой чернобурый порошок, нерастворимый в обычных растворителях за исключением щелочей и подкисленного спирта и эфира; с трудом растворяется в горячей ледяной уксусной кислоте, растворяется в концентрированной H_2SO_4 , причем отщепляет железо и переходит в гематопорфирин.

Гематин в кислой среде

К дефибринированной крови, разбавленной 5 объемами воды,

прибавляют $\frac{1}{4}$ объема 33% уксусной кислоты, тщательно перемешивают и нагревают 5—10 минут в водяной бане при 40—50°. Часть жидкости разбавляют водой и исследуют в спектроскопе.

Гематин в кислой среде дает одну полосу поглощения в красной части спектра между С и D, другую очень узкую полосу между D и E, ближе к D, и третью слабую полосу между E и F, распадающуюся на две при разбавлении раствора**.

Полосы поглощения кислого раствора гематина сходны с полосами поглощения метгемоглобина, но гематин отличается тем, что под влиянием восстанавливающих веществ переходит не в гемоглобин, а в гемохромоген (см. ниже).

Гематин в щелочной среде

К дефибринированной крови, разбавленной 5 объемами воды, прибавляют по объему крепкого раствора NaOH, перемешивают и нагревают постепенно почти до кипения*. Жидкость охлаждают и хорошо взбалтывают перед тем, как исследовать в спектроскопе, чтобы окислить гемохромоген, который частично образуется из гематина под влиянием восстанавливающих веществ, появляющихся при действии щелочи на кровь.

Жидкость дает одну слабую широкую полосу поглощения в красной части спектра, несколько заходящую за D в сторону фиолетового конца спектра**.

Щелочные растворы гематина дихроичны: в проходящем свете в толстых слоях они представляются бурокрасными, в тонких—зеленоватыми.

Гемохромоген

Гемохромоген образуется при восстановлении гематина и, по видимому, представляет собой соединение окрашенной атомной группы гемоглобина (гема) с денатурированным глобином. Красного цвета порошок, не растворяющийся в воде, спирте и эфире. Растворяется в щелочах с вишнево-красным цветом. Железо в нем двувалентно и связано менее прочно, чем трехвалентное железо в гематине.

К щелочному раствору гематина, разбавленному настолько, чтобы перестала быть видной полоса поглощения, прибавляют несколько капель NH_4HS .

* Кипятить не следует, так как при этом образуется осадок.

** Соответственные длины волн (λ), приведены быть не могут, так как положение полос поглощения гематина весьма изменчиво.

Окраска жидкости делается красной и в спектре появляются 2 характерные полосы поглощения гемохромогена: одна очень резкая, узкая, наиболее интенсивная из всех полос поглощения кровяных пигментов, лежит на середине расстояния между D и E (середина ее соответствует $\lambda=556,4$), другая значительно более слабая, исчезающая первой при разведении раствора, находится в зеленой части спектра между E и b ($\lambda=520,4$).

Порфирины

Порфирины—близкие по строению и дающие почти совершенно одинаковые спектры поглощения—безжелезистые пигменты, являющиеся производными пиррола и полученные при действии сильных кислот из гемохромогена, гематина, гемина и из хлорофила. В молекуле гематопорфина— $C_{34}H_{38}O_6N_4$, полученного из кровяного пигмента, кислород находится в виде двух карбоксиллов и двух алкогольных гидроксиллов. Гематопорфирин представляет собой порошок бурокрасного цвета, плохо растворяющийся в воде и обычных растворителях. Легко растворяется с образованием солей в едких, углекислых и двууглекислых щелочах, а также в разбавленных минеральных кислотах. Различные растворы гематопорфина имеют желтовато-красный или фиолетово-красный цвет.

К 5 см³ концентрированной H_2SO_4 в пробирке прибавляют 2—3 капли дефибрированной крови, тщательно перемешивая жидкость после каждой капли. Образуется гематопорфирин, жидкость приобретает виннокрасную окраску и красную флуоресценцию. При исследовании в спектроскопе в случае надобности небольшую часть жидкости разбавляют ледяной уксусной кислотой.

Кислые от минеральной кислоты растворы гематопорфина дают в спектре 3 полосы поглощения: одну—узкую в оранжевой части спектра между C и D, возле D ($\lambda=593$), две других (часто сливающихся вместе)—в желто-зеленой части спектра между D и E; 3-я полоса резко ограничена в направлении фиолетового конца спектра (максимум ее лежит при $\lambda=550$).

Большую часть раствора гематопорфина в H_2SO_4 выливают в избыток дистиллированной воды, охлаждают и доводят до слабокислой на лакмус реакции прибавлением малыми порциями раствора едкого натра. При этом выделяется осадок, содержащий большую часть гематопорфина; осаждение является более полным, если добавить еще насыщенного раствора уксуснокислого

натрия. Осадок отфильтровывают и растворяют в малом количестве разбавленной едкой щелочи.

Полученный красный щелочной раствор гематопорфирина дает 4 полосы поглощения: узкую полосу в красной части спектра на середине расстояния между С и D, две полосы в зеленой части спектра (одну более широкую и темную возле D, другую между D и E, несколько заходящую за E) и широкую и темную полосу между b и F, на месте перехода зеленого в синий цвет.

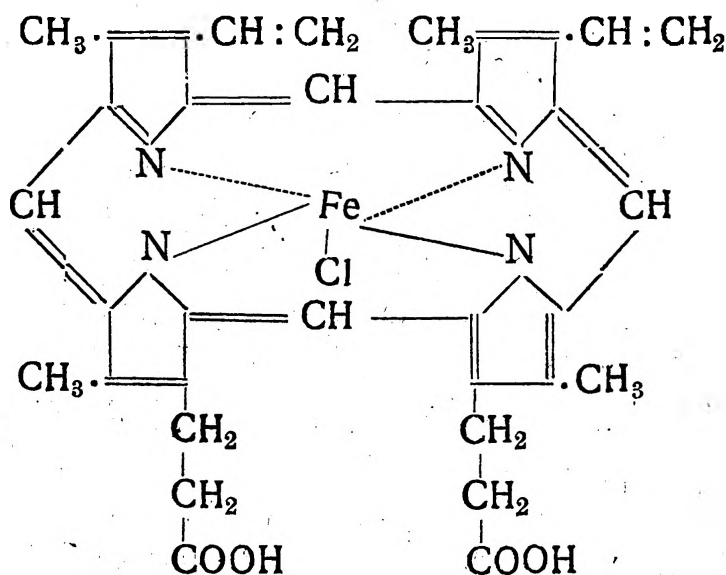
Положение полос поглощения в спектре гематопорфирина несколько меняется в зависимости от способа приготовления и других условий.

Относительно много содержится порфиринов в растущих тканях (зубы, костная ткань, юные формы эритроцитов и т. д.). Порфирины оказывают на организм сенсibiliзирующее к свету действие. Обычно в организме содержатся недействительные бесцветные лейкосоединения, которые лишь при окислении переходят в окрашенные порфирины. С сенсibiliзирующим к свету действием порфиринов связывают наблюдающиеся иногда при порфиринурии, особенно у детей, поражения кожи.

Кристаллы гемина [Тейхмана (Teichmann)]

Гемин, $C_{34}H_{32}O_4N_4FeCl$, является производным гематина; в гемине гидроксил гематина, стоящий при атоме железа, замещен хлором. Гемин кристаллизуется в триклинной системе, в форме ромбоидальных табличек и призм*, сине-черных в падающем свете, темнобурых — в проходящем. Гемин нерастворим в обычных растворителях и лишь несколько растворяется в горячей ледяной уксусной кислоте. В щелочах растворяется легко и при этом изменяется.

Строение гемина выражается формулой:



* Существует несколько модификаций гемина; из них β-гемин кристаллизуется кубовидных формах.

Геминовая проба

Для ее производства кровь должна быть вполне высушенной. Капле крови дают высохнуть на предметном стекле или очень осторожно высушивают при t -ре не выше 60° , наносят каплю ледяной уксусной кислоты, смешивают, закрывают покровным стеклом и нагревают смесь на небольшом пламени до начала кипения, но не кипятят, так как иначе пузырьки пара могут выбросить вещество из-под стеклышка, затем дают остынуть и исследуют под микроскопом. Если не находят характерных бурых ромбоидальных табличек, часто лежащих крестообразно или звездообразно (табл. II, рис. 4), то нагревание с ледяной уксусной кислотой снова повторяют. В случае старых высушенных кровяных пятен перед обработкой ледяной уксусной кислотой необходимо прибавить очень немного поваренной соли: берут с булавочную головку сухой крови и маленький кристаллик NaCl . В случае свежей крови прибавление NaCl излишне.

Под влияние нагревания с ледяной уксусной кислотой происходит образование гематина и в то же время выделение хлористого водорода вследствие взаимодействия уксусной кислоты и NaCl и образуется хлоропроизводное гематина—гемин, который выкристаллизовывается при остывании ледяной уксусной кислоты.

Геминовая проба не удается или получается сомнительной, если кровь была выпарена досуха при t -ре выше 60 — 70° или выпаривалась в присутствии HCl , HNO_3 или ржавчины, если сухая кровь была нагрета выше 140° или долго подвергалась освещению солнцем, а также в результате некоторых других причин.

Исследование кровяных пятен

Для этой цели или производят, как описано выше, геминовую пробу с соскобом пятна или исследуют спектроскопически вытяжку из пятна; материю с пятном вырезают и нагревают с 1% раствором NaOH , охлаждают, фильтруют раствор, прибавляют к нему несколько капель NH_4HS и спектроскопируют; в случае крови виден характерный спектр поглощения гемохромогена (хотя бы одна полоса между D и E).

Открытие железа

Дефибрированную кровь выпаривают досуха в небольшой фарфоровой чашке, обугливают и затем озоляют; озоление уско-

ряется добавлением нескольких капель концентрированной HNO_3 ; остаток растворяют в чистой, не содержащей железа, разбавленной соляной кислоте, фильтруют и с фильтратом проводят реакции на Fe^{+++} : а) с $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ получается синее или зеленое окрашивание, при стоянии синий осадок берлинской лазури— $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ и б) с KCNS —розовое или красное окрашивание вследствие образования роданистого железа— $\text{Fe}(\text{CNS})_3$.

МОЛОКО

Свойства свежего коровьего молока

1. Коровье молоко имеет кислую на фенолфталеин, слабощелочную или амфотерную (слегка меняет цвет как синей, так и красной лакмусовой бумаги) на лакмус реакцию.

Реакция молока обусловлена одновременным присутствием кислореагирующих однометальных и щелочнореагирующих двуметальных фосфорнокислых солей, щелочных металлов. У плотоядных молоко обычно имеет кислую на лакмус реакцию.

2. Молоко непрозрачно, так как представляет собой эмульсию жировых капелек в молочной плазме. При исследовании капли молока под микроскопом видны жировые (молочные) шарики диаметром 0,8—10 μ ; некоторые из них находятся в состоянии броуновского движения. В 1 мм³ молока содержится 1—5³/₄ млн. молочных шариков.

а) Молоко взбалтывают в пробирке с двойным объемом эфира, прозрачность молока при этом мало меняется. Эфир сливают, по его испарении остаются жиры.

б) К молоку прибавляют несколько капель крепкого раствора едкого натра и затем взбалтывают с двойным объемом эфира, — жидкость делается прозрачной.

Действие щелочи объясняется, с одной стороны, растворением белковой оболочки вокруг жировых шариков, что ведет к разрушению эмульсии, с другой — переходом опализирующего раствора известковой соли казеина (см. ниже) в прозрачный раствор натриевой его соли.

3. Удельный вес молока колеблется между 1,028 и 1,034 (при 15°). Снятое молоко, т. е. молоко, из которого удалены жиры, всплывающие наверх (вследствие их меньшего удельного веса по сравнению с молочной плазмой), имеет удельный вес более высокий — от 1,032 до 1,036.

Для точного определения удельного веса молока применяют пикнометры (рис. 13), но для обычных целей служит ареометр (рис. 14).

а) Определение удельного веса пикнометром

Принцип определения: сравнивают веса равных объемов испытуемой жидкости и воды при одинаковой т-ре, принимая вес воды за единицу.

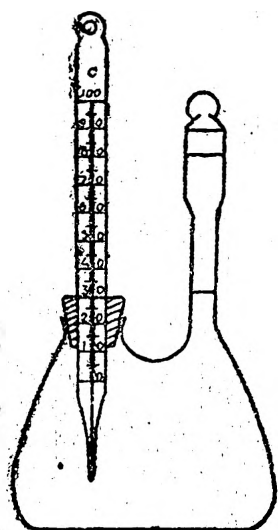


Рис. 13.

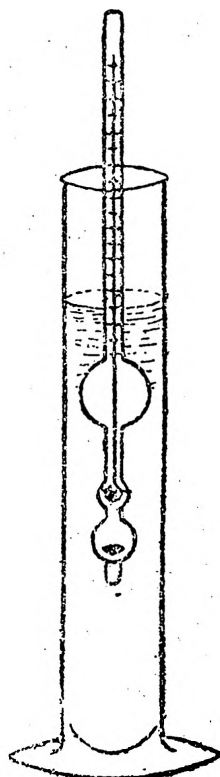


Рис. 14.

В качестве пикнометра может служить маленькая мерительная колбочка на 25, 50 или 100 см³ (гл. XIV) с узкой (или суженной на месте метки) шейкой и хорошо пришлифованной пробкой. Удельный вес жидкости вычисляют, определив вес *a* пустого сосуда, вес *b*—сосуда с испытуемой жидкостью при данной температуре и вес *c*—сосуда с дистиллированной водой при той же т-ре: удельный вес испытуемой жидкости $= \frac{b-a}{c-a}$.

Пикнометр тщательно моют водой, спиртом и эфиром, высушивают и взвешивают. Каждый раз перед взвешиванием пикно-

метра как пустого, так и наполненного, ему дают в течение получаса принять т-ру весов. Затем наполняют пикнометр до метки* дистиллированной водой, освобожденной кипячением от угольной кислоты, отмечают т-ру воды и взвешивают. Воду выливают, сосуд моют спиртом и эфиром, высушивают, наполняют молоком той же т-ры**, какую имела вода, и взвешивают. Вычисление удельного веса производят, как описано выше.

* Наполняют через маленькую с оттянутым концом воронку или при помощи пипетки. Если жидкость несколько перелита, ее отсасывают фильтровальной бумагой.

** Чтобы жидкость имела желаемую температуру, наполненный пикнометр оставляют в бане с постоянной температурой до тех пор, пока уровень жидкости вблизи метки не станет постоянным.

Определение протекает быстрее, если пользоваться пикнометром, снабженным термометром (рис. 13), так как в этом случае может быть допущено взвешивание испытуемой жидкости и воды при различных t -рах; приходится лишь корректировать вес воды соответственно t -ре, при которой производилось наполнение пикнометра исследуемой жидкостью, по таблице, заключающей значение удельного веса воды при различных t -рах (приложение 4). Если например вес воды при $15^\circ = 22,3461$ г, вес исследуемой жидкости при $18^\circ = 22,9826$ г, то нужно вычислить, каков был бы вес воды при 18° . При 15° удельный вес воды равен $0,999126$, при $18^\circ = 0,998622$. Отсюда следует, что при 18° вода весила бы $\frac{0,998622}{0,999126} \cdot 22,3461 = 22,3348$ г. На эту вели-

чину надо разделить вес исследуемой жидкости при 18° , чтобы найти ее удельный вес: $\frac{22,9826}{22,3348} = 1,029$. Вес пустого пикнометра и вес пикнометра с водой определяют раз навсегда, так что для определения удельного веса приходится производить лишь одно взвешивание пикнометра с испытуемой жидкостью.

Определение удельного веса пикнометром является наиболее точным методом, допускающим исследование как непрозрачных жидкостей, так и жидкостей, содержащих взвеси (молоко, кровь, моча с осадками и др.).

б) Определение удельного веса ареометром

Хорошо перемешанное молоко наливают в вертикально стоящий сухой цилиндр* и осторожно опускают в него сухой и чистый ареометр (можно пользоваться урометром), легким толчком по верхушке заставляют его совершить несколько небольших движений вниз и вверх и, когда он остановится и не прикасается к стенкам цилиндра, производят отсчет, держа глаз на уровне деления. Одновременно определяют и t -ру молока, так как удельный вес меняется с t -рой.

4. При кипячении свежее молоко не свертывается, но на его поверхности образуется пленка (пенка), состоящая из жира, известковых солей и небольшого количества свернувшихся белков.

* Диаметр цилиндра должен быть по крайней мере на 1 см больше диаметра широкой части ареометра.

Гваяковая проба

К небольшому количеству спиртового раствора гваяковой смолы прибавляют свежего молока, немного перекиси водорода, перемешивают и ставят в баню, нагретую до 40°. Жидкость постепенно делается синей вследствие окисления гваяковой смоляной кислоты под влиянием находящихся в молоке пероксидаз (стр. 58).

Прокипяченное молоко этой реакции не дает, так как при кипячении ферменты разрушаются.

Молоко кипятят, остужают и проделывают гваяковую пробу.

ОТКРЫТИЕ И ВЫДЕЛЕНИЕ ГЛАВНЫХ СОСТАВНЫХ ЧАСТЕЙ КОРОВЬЕГО МОЛОКА

К главным составным частям молока относятся: жиры, белки (казеин, молочные альбумин и глобулин), углеводы (молочный сахар), минеральные соли (главным образом фосфорнокислые соли извести).

Жиры

Жиры молока находятся в молочных шариках и отличаются от обычных жиров жировой ткани содержанием более значительных количеств глицеридов миристиновой— $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\cdot\text{COOH}$ и летучих жирных кислот, главным образом масляной кислоты— $\text{CH}_3\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}_2\cdot\text{COOH}$. Из числа жирных кислот, входящих в состав триглицеридов молока, на долю олеиновой кислоты приходится 40%, миристиновой—25%, летучих жирных кислот—8%.

Казеин

Казеин относится к нуклеоальбуминам, белкам, содержащим фосфор, но не дающим при гидролизе пуриновых оснований, и является слабой кислотой. При гидролизе казеина получены в значительном количестве триптофан и тирозин, гликокол найден не был. Казеин у различных животных разнится по составу. Казеин в воде нерастворим, но соли его (казеинаты) со щелочными и щелочно-земельными металлами растворимы легко. В молоке казеин находится в виде средней известковой соли и может быть выделен или в свободном виде, при действии кислот, или в виде соли—при насыщении NaCl или MgSO_4 , или при полунасыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Казеин осаждается также солями тяжелых металлов.

а) 25—30 см³ молока разбавляют в стакане 3—4 объемами воды и к жидкости прибавляют по каплям при помешивании

0,1% уксусной кислоты до прекращения выделения хлопчатого белого осадка казеина, захватывающего с собой также и жиры. Прибавлять кислоту следует очень осторожно, так как в избытке кислоты казеин легко растворяется. Осадок отфильтровывают и промывают 3—4 раза водой. Профильтрованную жидкость (фильтрат) вместе с промывными водами сохраняют.

б) Небольшую часть осадка (казеин + жиры) обрабатывают разбавленным раствором соды: казеин растворяется, жир остается во взвешенном состоянии. Жидкость фильтруют через влажный фильтр, причем жиры задерживаются на фильтре. С фильтратом проделывают реакции на белки цветные и по осаждению.

в) Остальную часть осадка (казеин + жиры) отжимают досуха между листами фильтровальной бумаги, переносят в сухую пробирку и для удаления жира извлекают при энергичном встряхивании сначала спиртом, а затем повторно эфиром. Эфир сливают, казеин отжимают досуха между листами фильтровальной бумаги и растирают в ступке. Полученный таким путем чистый казеин обладает ясно кислым характером: при растирании в ступке с раствором соды или взвесью CaCO_3 в воде происходит выделение CO_2 и растворение казеина. Если к прозрачному водному раствору натриевой соли казеина прибавить немного раствора CaCl_2 , появляется опализация, обусловленная образованием известковой соли казеина.

Молочные глобулин и альбумин

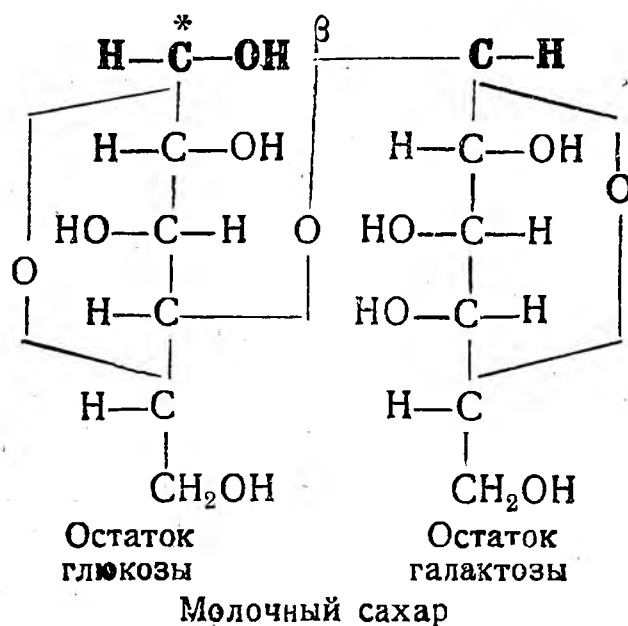
Фильтрат от осадка (казеин + жир, см. выше), имеющий сильно кислую реакцию от прибавленной при осаждении казеина уксусной кислоты, нагревают до кипения и в кипящую жидкость прибавляют по каплям до слабокислой на лакмус реакции разбавленный раствор соды,—происходит осаждение молочных глобулина и альбумина. Осадок отфильтровывают и проделывают с ним цветные реакции на белки (стр. 17).

Молочный сахар

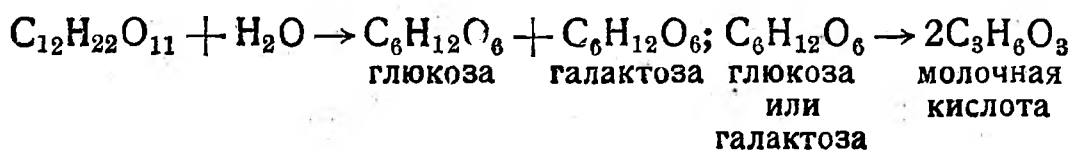
Фильтрат от молочных глобулина и альбумина исследуют на молочный сахар.

Молочный сахар (лактоза) $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ —дисахарид, построен-

ный из остатков d-галактозы и d-глюкозы, эфиробразно соединенных через атом кислорода по типу моноглюкозидной связи (гл. IV), в соответствии с чем обладает восстановительной способностью, показывает явление мутаротации и реагирует с фенолгидразином.



Молочный сахар кристаллизуется с 1 молекулой воды в ромбической системе с сильно выраженной гемиедрией. Плоскость поляризации света вращает вправо $[\alpha]_D = +55,3^\circ$. Под влиянием чистых культур дрожжей молочный сахар не бродит (отличие от виноградного сахара), но под влиянием многих микроорганизмов расщепляется на способные к брожению галактозу и глюкозу и переходит в молочную кислоту:



При этом образуется преимущественно оптически недеятельная молочная кислота и в небольших количествах d- и l-молочные кислоты и янтарная кислота $\text{COOH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COOH}$.

Свободный от белков фильтрат (см. выше) выпаривают в чашке на водяной бане до консистенции сиропа и оставляют на 12—20 часов—выкристаллизовывается молочный сахар; его растворяют при нагревании в возможно малом количестве воды, фильтруют в кристаллизатор или небольшую фарфоровую чашку и оставляют медленно кристаллизоваться на остывающей водяной бане.

Исследуют под микроскопом форму кристаллов (табл. II, рис. 5). Часть кристаллов растворяют в воде и производят с раствором следующие пробы*.

Реакции на молочный сахар

а) При пробе Троммера (стр. 71) образуется красный осадок закиси меди или желтый осадок гидрата закиси меди.

б) Фенилгидразинная проба. Реакцию производят также, как с глюкозой (стр. 72), и исследуют под микроскопом выделившиеся кристаллы фениллактозона (т-ра разложения 210—212°) (табл. I, рис. 10с).

в) Образование слизиевой кислоты. В соответствии с содержанием остатка галактозы молочный сахар отличается от большинства других, обладающих восстановительными свойствами дисахаридов, способностью переходить при окислении азотной кислотой в труднорастворимую в воде слизиевую кислоту — $\text{COOH} \cdot (\text{HC} \cdot \text{OH})_4 \cdot \text{COOH}$ (т-ра плавления 213°). Слизевая кислота оптически недеятельна и неспособна расщепляться на деятельные компоненты вследствие внутренней компенсации вращения.

Испытуемую жидкость (около 100 см³) выпаривают с 20 см³ концентрированной азотной кислоты (удельного веса 1,4) на водяной бане в плоской стеклянной чашке или кристаллизаторе до объема примерно 20 см³—образуется белый осадок слизиевой кислоты. При малом содержании молочного сахара в испытуемой жидкости осадок появляется лишь при стоянии охлажденной жидкости в течение суток. Осадок отфильтровывают, промывают 8 раз водой, высушивают и определяют т-ру плавления.

Сушение вещества

Для сушения небольшое количество вещества тщательно отжимают между листами фильтровальной бумаги, растирают на часовом стекле и помещают на сутки в эксикатор или вакуум-экси-

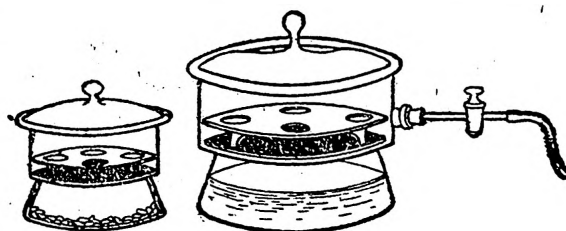


Рис. 15.

* Приводимые реакции можно также прямо производить с безбелковым фильтратом от молочных альбумина и глобулина.

катор (рис. 15), из которого выкачивают воздух, над жадно поглощающим воду веществом (концентрированной H_2SO_4 , безводным $CaCl_2$).

Определение температуры плавления

В запаянную с одного конца стеклянную, с возможно более тонкими стенками, капиллярную трубку, диаметром в 1—2 мм, помещают очень немного совершенно сухого вещества; если надо, вещество проталкивают концом тонко оттянутой стеклянной палочки.

Капилляр прикрепляют к проверенному термометру при помощи резинового колечка или капли концентрированной H_2SO_4 (удерживается силами сцепления) так, чтобы вещество находи-

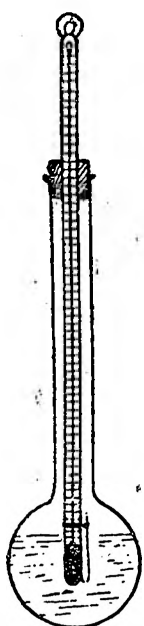


Рис. 16. чтобы т-ра поднималась не более чем на 1° в минуту.

лось на уровне резервуара со ртутью. Термометр на пробке (с надрезанными краями для прохождения воздуха) опускают в наполненную на $\frac{4}{5}$ концентрированной серной кислотой колбу иенского стекла так, чтобы вещество приходилось примерно по середине жидкости, а верхний край капилляра значительно выступал над поверхностью серной кислоты (рис. 16). Колбу, поставленную на сетку, нагревают на голом огне и наблюдают, при какой т-ре (и в каких пределах) вещество плавится, предшествует ли плавлению спекание (сморщивание) вещества, темнеет ли оно, разлагается ли и т. д. К моменту плавления скорость нагревания должна быть таковой,

чтобы т-ра несколько ниже истинной, если часть столбика ртути в термометре выступает из жидкости. Коррегированную т-ру плавления находят, внося поправку на выступающую часть ртути по формуле

$$T^\circ \text{ пл. (корр.)} = t - 0,000154 \cdot a (t - t'),$$

где 0,000154—разность между коэффициентами объемного расширения ртути и стекла, a —выраженная в градусах длина выступающего столбика ртути, t —наблюдённая т-ра плавления, t' —средняя т-ра выступающей части ртути.

t' измеряют при помощи термометра, помещенного на половине высоты выступающего столбика ртути.

Для веществ, разлагающихся при т-ре плавления, чтобы избежать излишнего длительного нагревания, рекомендуется до внесения капил-

ляра с веществом нагреть серную кислоту до т-ры, примерно на 20° отстоящей от т-ры плавления. Всегда производят несколько определений т-ры плавления (с новыми порциями вещества) и берут среднее арифметическое.

Высаливание белков молока

К молоку прибавляют равный объем насыщенного раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — происходит осаждение казеина и молочного глобулина. Осадок отфильтровывают и насыщают фильтрат порошком $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — выпадает молочный альбумин.

Осаждение солями тяжелых металлов

К водному раствору сулемы прибавляют каплю молока—осаждаются белки молока.

На этом основано применение молока в качестве противоядия при отравлении солями тяжелых металлов.

Действие химозина на казеин; значение ионов кальция

При добавлении к свежему молоку химозина* происходит створаживание молока, причем казеин расщепляется с образованием параказеина, дающего нерастворимое в воде известковое соединение (сыр). Свертывание происходит при нейтральной или слабощелочной на лакмус реакции. Осадок параказеина захватывает и жиры молока.

В 5 пробирок наливают по 5—6 см³ молока и прибавляют:
а) в одну пробу несколько капель нейтрального раствора химозина;

б) в другую—несколько куб. сантиметров соды и затем немного химозина;

в) в третью—немного раствора химозина, предварительно прокипяченного в течение минуты;

г) в четвертую и пятую по 5—6 капель 0,2% раствора щавелевокислого калия, взбалтывают и добавляют немного раствора химозина, также освобожденного от растворимых известковых солей прибавлением $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$.

* Х и м о з и н (сычужный фермент)—фермент, добываемый из слизистой оболочки желудка телят и овец.

Все 5 проб оставляют на 10—15 минут в водяной бане при 37—40°. В „а“ происходит свертывание казеина; пробирку можно перевернуть без того, чтобы содержимое вылилось. При стоянии сверток сжимается и выдавливает прозрачную жидкость, содержащую все составные части молока за исключением параказеина и жиров—сладкую сыворотку.

В „б“ осадка не образуется, так как фермент разрушается щелочью. Реакция жидкости не должна быть также кислой; кислые жидкости предварительно нейтрализуют во избежание осаждения казеина под влиянием кислоты.

В „в“ изменений не поступает, так как кипячение разрушает химозин (см. ферменты).

В „г“ свертывания не происходит, так как растворимые известковые соли осаждены в форме CaC_2O_4 . Если же в жидкость прибавить небольшой избыток известковых солей (1—2 капли 1% раствора CaCl_2), то свертывание наступает.

Химозин в растворе, не содержащем ионов кальция, не дает нерастворимого осадка параказеина, однако реакция между химозином и казеином все-таки происходит. Это видно из следующего:

если жидкость во второй пробе „г“ прокипятить в течение 1 минуты для разрушения фермента и затем добавить очень немного 1% раствора CaCl_2 , то осаждение происходит.

СКИСШЕЕ МОЛОКО

При стоянии, особенно при t-ре тела, молоко скисает под влиянием ферментов (гл. III), вырабатываемых некоторыми микроорганизмами, попадающими в молоко из воздуха, и вызывающих превращение молочного сахара в молочную кислоту. Реакция молока делается все более кислой, причем можно различить несколько стадий процесса.

В самом начале скисания осаждение казеина происходит лишь при кипячении молока, насыщенного CO_2 , далее наступает период, когда казеин осаждается при кипячении молока и без пропускания CO_2 , затем для осаждения казеина оказывается достаточным только пропускание тока CO_2 , и наконец наступает самопроизвольное осаждение казеина образовавшейся молочной кислотой, причем вся жидкость превращается в желеобразную массу (простокваша), которая состоит из сгустка казеина, захватившего жиры молока, при стоянии сжимается (творог) и вы-

давливают кислую зеленовато-желтого цвета жидкость—кислую сыровотку.

Открытие молочной кислоты

Для открытия молочной кислоты, $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}(\text{OH}) \cdot \text{COOH}$, в скисшем молоке можно применять реакцию Уффельмана (Uffelmann):

К 2—3 см³ 2% раствора фенола ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$) прибавляют раствор хлорного железа до ясной аметистово-фиолетовой окраски и затем несколько капель свободной от белков испытуемой жидкости. Появляется желтое с зеленоватым оттенком окрашивание, обусловленное образованием молочно-кислого железа.

Подобное окрашивание дают и другие α -оксикислоты.

СОЕДИНИТЕЛЬНАЯ ТКАНЬ

К числу составных частей соединительной ткани принадлежат коллаген, эластин, мукоид, жиры и минеральные соли. Их количественные соотношения неодинаковы в различных видах соединительной ткани.

КЛЕТЧАСОЕДИНИТЕЛЬНАЯ ТКАНЬ

Коллаген

Главной твердой составной частью клетчатосоединительной ткани является коллаген — альбуминоид, нерастворимый в воде, растворах солей, разбавленных кислотах и щелочах. При кипячении с водой, легче в присутствии небольших количеств кислоты, коллаген переходит в глютин (желатину), причем происходит отщепление части азота в форме аммиака.

Глутин растворим в горячей воде, в щелочах. Его растворы в воде, даже очень слабые (0,5 — 1%), застывают при охлаждении в желеобразную массу (желатинируют), однако если такой раствор достаточно долго (несколько часов) прокипятить, то он теряет способность желатинировать. Глутин не содержит тирозина, триптофана и цистина, в соответствии с чем не дает реакций Миллона, Адамкевича, Либермана, Шульце, ксантопротеиновой, на слабосвязанную серу (см. цветные реакции на белки, гл. I), и в качестве пищевого вещества не является полноценным белком. Глутин не дает также некоторых реакций на белки по осаждению (см. ниже). Переваривается глютин легко.

Выделение коллагена

Для выделения коллагена ахиллово сухожилие быка очищают от фасций, нарезают на мелкие кусочки, промывают в текущей

воде для удаления растворимых белков и минеральных солей, тщательно отжимают и извлекают полунасыщенным раствором известковой воды (1 объем насыщенного раствора $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + 1 объем воды) в закрытой пробкой склянке в течение суток, взбалтывая время от времени. Щелочно-реагирующую жидкость, содержащую в растворе глюкопротеид—тендомукоид, сливают и промывают коллаген холодной дистиллированной водой до исчезновения в промывных водах щелочной реакции на лакмус.

При осторожном подкислении известкового раствора выделяется тендомукоид.

Глутин (желатина)

Для превращения в глутин коллаген кипятят в чашке, наполненной на $\frac{2}{3}$ водой, в течение нескольких часов, поддерживая постоянство объема жидкости добавлением воды взамен испарившейся.

Приводимые ниже реакции могут быть произведены и с продажной желатиной, которую промывают холодной водой для удаления примеси других белков. Желатина при этом разбухает, но не растворяется; ее отжимают между листами фильтровальной бумаги.

Небольшое количество глутина растворяют в пробирке при нагревании в воде; при охлаждении раствор желатинирует.

Продельывают с глутинном реакции Миллона, ксантопротеиновую, Адамкевича, Либермана, биуретовую и на слабо связанную серу (см. цветные реакции на белки, гл. I).

При ксантопротеиновой и миллоновой реакциях могут появиться очень слабые окраски, повидимому обусловленные примесью к глутину следов других белков. При биуретовой реакции получается красно-фиолетовое окрашивание.

Растворы глутина в воде не осаждаются концентрированными минеральными кислотами, плохо или совсем не осаждаются $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ + $\text{CH}_3\cdot\text{COOH}$. Глутин осаждается из растворов таннином (имеет большое значение при дублении кож), сулемой в присутствии HCl и NaCl , спиртом (в пробирку, наполовину наполненную 95% спиртом, прибавляют немного концентрированного раствора глутина), при насыщении порошком $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 при нейтральной реакции и NaCl в кислой среде.

ЭЛАСТИЧЕСКАЯ ТКАНЬ

Эластин

Типичным представителем этого вида соединительной ткани может служить выйная связка (*ligamentum nuchae*) быка. Главной твердой ее составной частью является альбуминоид эластин, нерастворимый в воде и весьма устойчивый по отношению к химическим реактивам.

Для выделения эластина выйную связку быка разрезают на узкие полосы, пропускают через мясорубку, отмывают в текущей воде в течение 1—2 суток от растворимых белков и солей, извлекают в течение 2—3 суток полунасыщенным раствором известковой воды для удаления мукоида, тщательно отмывают от щелочной жидкости декантацией водой, для превращения коллагена в глютин и его удаления, повторно кипятят со свежими порциями воды до исчезновения в вытяжке реакций на белки. Затем эластин кипятят с 10% уксусной кислотой и извлекают при комнатной температуре 5% HCl; обработку уксусной и соляной кислотами повторяют еще раз. Эластин отмывают от кислоты, обезвоживают кипячением со спиртом, а затем повторно настаивают с эфиром, высушивают в сушильном шкафу при 100° и растирают в ступке. Получается белый с желтоватым оттенком порошок.

Эластин не содержит триптофана и аспарагиновой кислоты и обычно теряет серу в результате обработки при его получении.

Исследуют отношение эластина к обычным растворителям.

Производят реакции Миллона, ксантопротеиновую, биуретовую, Адамкевича и на слабо связанную серу и убеждаются в том, что эластин двух последних реакций не дает.

ХРЯЩЕВАЯ ТКАНЬ

К главным составным частям хрящевой ткани относятся — хондромукоид, хондроитиносерная кислота, хондроальбумоид и коллаген. Хондромукоид — глюкопротеид, расщепляющийся при гидролизе на белок и хондроитиносерную кислоту; в воде нерастворим, обладает кислыми свойствами, растворим в щелочах и выделяется при подкислении.

Хондроитиносерная кислота — парная эфиросерная кислота, образованная хондроитином, веществом — дающим при гидролизе глюкуроновую кислоту — $O : CH \cdot (CH \cdot OH)_4 \cdot COOH$, хондрозамин

(аминогалактоза) — $O : HC \cdot CH(NH_2) \cdot (CH \cdot OH)_3 \cdot CH_2 \cdot OH$ и уксусную кислоту.

Хондроальбумоид напоминает по свойствам эластин и кератин.

Хондромукоид

Трахеи быка кипятят в воде до тех пор, пока хрящевые кольца не будут легко отделяться от окружающих тканей. Для извлечения хондромукоида хрящи разрезают на мелкие кусочки и настаивают при комнатной т-ре с 2 частями 2⁰/₀ раствора КОН. Через 2 суток разбавляют 3 частями воды, коагулируют, а затем фильтруют через бумагу и профильтрованную жидкость подкисляют уксусной кислотой. Выделившийся осадок хондромукоида отфильтровывают, растворяют в разбавленной соляной кислоте и раствор кипятят некоторое время.

Открытие продуктов расщепления хондроитиносерной кислоты

К части прокипяченной жидкости прибавляют немного раствора $BaCl_2$ или $Ba(NO_3)_2$ — образуется белый кристаллический осадок $BaSO_4$ (с серной кислотой, отщепившейся при гидролизе от хондроитиносерной кислоты).

Остальную часть гидролизата охлаждают, сильно подщелачивают едким натром или кали и производят пробу Троммера (стр. 71). Происходит восстановление гидрата окиси меди в закись, обусловленное присутствием хондрозамина и глюкуроновой кислоты.

КОСТНАЯ ТКАНЬ

На долю неорганических веществ, придающих костной ткани твердость, приходится примерно половина всех твердых составных частей кости, причем $Ca_3(PO_4)_2$ составляет 85—88⁰/₀ всего количества неорганических солей, $CaCO_3$ 9—10⁰/₀, $Mg_3(PO_4)_2$ меньше 2⁰/₀, CaF_2 около 0,4⁰/₀, $CaCl_2$ 0,2—0,3⁰/₀. Находимое в костной золе железо (0,1⁰/₀) содержится повидимому не в веществе самой кости, а в питательных жидкостях или прилегающих тканях. Следы $SO_4^{''}$ обусловлены примесью хондроитиносерной кислоты. Из органических веществ в кости содержатся коллаген (оссеин), мукоид (оссеомукоид) и альбумоид (оссеоальбумоид).

При кипячении с водой оссеин переходит в глютин (см. выше), что имеет техническое применение в клееварении.

При обжигании на воздухе органические вещества кости сгорают—кость делается хрупкой, легко растирается в порошок.

Если кость вымачивать в разбавленной соляной кислоте, то неорганические составные части переходят в раствор — кость приобретает мягкость и гибкость.

Понижение содержания известковых солей наблюдается при рахите и остеомалации (до 34—19% веса сухой кости), кости могут стать гибкими; содержание $Mg_3(PO_4)_2$ при этом обычно повышается и может в 4 раза превосходить нормальное*.

Озоление кости

Для озоления кости с нее соскабливают наcostницу, удаляют изнутри губчатую часть, измельчают кость в стальной ступке и сильно прокаливают в тигле до полного сгорания угля.

Анализ костной золы

Около 1 г костной золы в небольшой фарфоровой чашке растворяют при помешивании в разбавленной азотной кислоте, причем наблюдается сильное выделение пузырьков газа (CO_2 из $CaCO_3$). Раствор (если нужно, его фильтруют) подщелачивают аммиаком, избегая его избытка, — выпадает нерастворимый в воде осадок фосфорнокислых солей извести, магнeзии и железа, который отфильтровывают и исследуют далее по п. „б“.

а) В отдельных порциях фильтрата открывают: 1) Cl' — осадением азотнокислым серебром подкисленной HNO_3 жидкости, 2) SO''_4 — прибавлением к подкисленному соляной или азотной кислотой раствору какой-либо растворимой соли бария, 3) Ca'' — осадением $(NH_4)_2C_2O_4$ подкисленной уксусной кислотой жидкости.

б) Осадок фосфорнокислых солей извести, магнeзии и железа обрабатывают на фильтре уксусной кислотой, причем фосфорнокислые известь и магнeзия переходят в раствор, который исследуют по п. „в“. Оставшееся на фильтре фосфорнокислое железо промывают водой, растворяют в разбавленной азотной кислоте и открывают Fe''' добавлением $K_4Fe(CN)_6$, PO''_4 — нагреванием с раствором молибденовокислого аммония (стр. 46).

в) В небольшой части уксуснокислого фильтрата открывают Ca'' добавлением $(NH_4)_2C_2O_4$, PO''_4 — магнeзиальной смесью

* При рахите понижение содержания известковых солей наблюдается не только в костях, но и в мышцах и других тканях.

(стр. 47). Остальную часть фильтрата нагревают до кипения и медленно прибавляют к горячей жидкости растворы $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ и NH_4Cl до тех пор, пока еще образуется осадок CaCO_3 (MgCO_3 не осаждается вследствие присутствия NH_4Cl). Осадок CaCO_3 отфильтровывают и промывают горячей водой до исчезновения в промывных водах реакции на Cl' . Фильтрат сильно подщелачивают аммиаком, — образуется белый кристаллический осадок $\text{Mg}(\text{NH}_4)\text{PO}_4$.

ЖИРОВАЯ ТКАНЬ

Содержимое жировых клеток состоит из жиров (гл. V), холестерина и лецитинов (см. липоиды), красящего вещества (липохромы, стр. 100), воды, небольших количеств свободных высших жирных кислот и остатков протоплазмы.

ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫЕ СОКИ И ПИЩЕВАРЕНИЕ

Поступающие с пищей белки, жиры и углеводы подвергаются в пищеварительном канале перевариванию под влиянием ферментов, вырабатываемых особыми железами и вызывающих гидролитическое расщепление названных питательных веществ, и переводятся в форму, способную всасываться в кишечнике.

Гидролиз белков вызывается последовательным действием ряда так называемых протеолитических ферментов: 1) пепсина, вырабатываемого слизистой оболочкой желудка и расщепляющего в присутствии соляной кислоты белки до стадии альбумоз и пептонов, 2) трипсина поджелудочного сока, гидролизующего пептоны, гистоны, протамины и приобретающего в присутствии энтерокиназы способность глубоко расщеплять и первичные белки, 3) эрепсина— комплекса ферментов слизистой оболочки кишечника, расщепляющего более простые полипептиды.

Расщепление углеводов происходит под влиянием амилаз (слюна, поджелудочный сок, кишечный сок), гидролизующих крахмал и гликоген до стадии мальтозы, которая действием мальтазы (найденна в слюне, поджелудочном и кишечном соках, крови) переходит в глюкозу. Находящаяся в кишечном соке сахараза инвертирует тростниковый сахар, лактаза расщепляет молочный.

Жиры гидролизуются липазами (эстеразы)*, найденными в желудочном и поджелудочных соках. Желудочный сок действует на жиры слабо, панкреатический же сок энергично расщепляет жиры.

Ниже рассмотрен состав действие различных пищеварительных соков.

I. СЛЮНА

Переваривание углеводов начинается у человека и некоторых других животных в полости рта под влиянием птйалина слюны и

* Отщепление жирных кислот из фосфатидов также происходит под влиянием липаз.

продолжается некоторое время в желудке (пока пищевая масса не пропитается соляной кислотой желудочного сока, прекращающей действие фермента). Слюна—жидкость удельного веса 1,002—1,008—содержит помимо ферментов белок муцин и часто роданистые соли. Обычно имеет слабощелочную на лакмус реакцию, обусловленную главным образом присутствием щелочнореагирующих двухметалльных фосфорнокислых солей, но может быть амфотерной или слабокислой реакции в результате образования продуктов бактериального расщепления. Кислая реакция слюны часто наблюдается при диабете, при лихорадочных заболеваниях, при расстройствах пищеварения и других патологических состояниях. При лихорадочных состояниях выделение слюны уменьшается, иногда даже совершенно прекращается (сухость во рту и зеве, обложенный язык, изменения вкусовые). При отравлении иодом или ртутью наблюдается обильное отделение слюны, богатой белками и минеральными солями. При воспалении почек и особенно при уремии в слюне появляется мочевины, а также и мочевины кислоты.

1. Муцин

Муцины—гликопротеиды, при гидролизе которых освобождаются хитозамин (маннозамин) и глюкуроновая кислота, обладающие восстановительной способностью.

Растворы муцинов отличаются большой вязкостью. Присутствием муцинов обусловлены особые свойства слизи, которая находится в организме всюду, где ткани должны быть защищены от механических, термических, химических и физико-химических влияний. Ею покрыты слизистые оболочки пищеварительного, дыхательного и мочеполового аппаратов. Слизь является также препятствием для проникновения микроорганизмов. Муцин слюны облегчает проглатывание пищи.

а) К 5—10 см³ слюны прибавляют разбавленной уксусной кислоты. Выделяется осадок муцина, трудно растворимый в избытке уксусной кислоты. Муцин отфильтровывают (фильтруется очень медленно; иногда при помешивании муцин собирается в комок и пристаёт к палочке, вместе с которой и может быть вынут из жидкости). Остающаяся прозрачная жидкость содержит лишь следы белка, в чем можно убедиться, производя миллионову реакцию или свертывая белки при кипячении раствора, доведенного прибавлением соды до слабокислой на лакмус реакции.

б) С муцином проделывают цветные реакции на белки (ксантопротеиновую, Адамкевича, Миллона).

в) Муцин растворяется в 0,1% соляной кислоте и в 2% растворе соды.

г) Муцин гидролизуют кипячением с разбавленной соляной кислотой до побурения жидкости, гидролизат подщелачивают едким натром и производят пробу Троммера (стр. 71). Реакция эта не всегда удается, так как для нее нужны довольно большие количества муцина и кипячение с HCl должно быть не слишком коротким (иначе не будет полного гидролиза).

2. Роданистые соли

Роданистоводородную кислоту (HCNS) открывают, прибавляя к слюне, подкисленной соляной кислотой, по каплям, взбалтывая после каждой капли, разбавленный раствор FeCl_3 —появляется розовая или красная окраска роданистого железа $\text{Fe}(\text{CNS})_3$. Для контроля производят пробу с водой, подкисленной HCl и смешанной с тем же количеством FeCl_3 , что и испытуемая жидкость.

В слюне курильщиков обычно содержится больше роданистых солей, чем у некурящих.

3. Амилаза слюны—птиалин

О действии птиалина на крахмал и гликоген см. стр. 52.

II. ЖЕЛУДОЧНЫЙ СОК И ЖЕЛУДОЧНОЕ ПИЩЕВАРЕНИЕ

Желудочный сок—прозрачная или слегка опализирующая жидкость, удельного веса 1,003—1,009, сильно кислой вследствие содержания соляной кислоты реакции (у человека 0,4—0,5% HCl, концентрация ионов водорода равна $1 \cdot 10^{-2}$ — $7 \cdot 10^{-2}$)—входит в состав желудочного содержимого. Главными составными частями желудочного сока являются соляная кислота и ферменты пепсин, химозин и липаза. В состав желудочного содержимого входят также проглоченная слюна, пища и продукты ее переваривания.

Кислоты желудочного содержимого

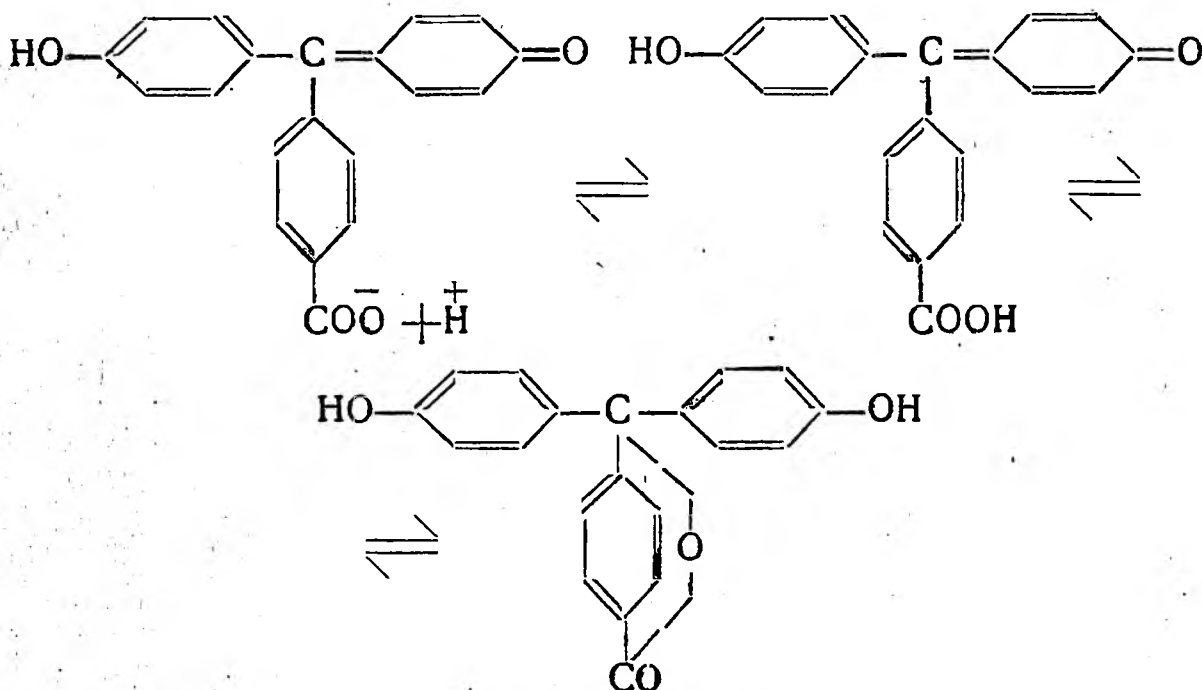
Кислая реакция желудочного содержимого может быть обусловлена присутствием соляной кислоты, кислореагирующих одномолекулярных фосфорнокислых солей, при патологических условиях молочной кислоты и летучих жирных кислот. Сумму всех кислореагирующих ве-

ществ обозначают термином „общая кислотность“, соляную кислоту, находящуюся в соединении с белками и продуктами их переваривания,—термином „связанная соляная кислота“, остающуюся в избытке соляную кислоту—„свободной соляной кислотой“; „свободная“ и „связанная“ соляная кислота вместе составляют „общую соляную кислоту“. При недостатке свободной соляной кислоты в желудочном содержимом развиваются процессы брожения, ведущие к образованию органических кислот, главным образом молочной.

Реакции на свободную соляную кислоту

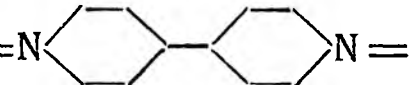
Присутствие свободной соляной кислоты в желудочном содержимом открывают при помощи индикаторов—красок, меняющих свой цвет в зависимости от изменения реакции среды. Такими индикаторами могут служить, например, электролиты—слабые кислоты или основания, претерпевающие при переходе из солеобразного состояния в свободное и обратно внутримолекулярные перегруппировки, обуславливающие изменение окраски.

Так фенолфталеин является очень слабой кислотой, дающей соли интенсивно красного цвета, содержащие хромофорную хиноидную группировку. Свободная же кислота тотчас по образовании почти нацело превращается в бесцветную бензоидную форму:



Водные растворы фенолфталеина бесцветны, так как в растворе находится почти исключительно бензоидная форма, но в присутствии едкой щелочи, например едкого натра, происходит в согласии с за-

коном действия масс, вследствие связывания ионов водорода, дальнейшего распада хиноидной формы на ионы и переход бензоидной формы в хиноидную; при достаточном добавлении NaOH образуется столько ионов и молекул фенолфталеина в хиноидной форме, что появляется красная окраска. Если такой красный раствор подкислить даже очень слабой кислотой, то жидкость обесцвечивается, так как вытесняется еще более слабая кислота—фенолфталеин, переходящая в бензоидную форму. Область изменения окраски лежит для фенолфталеина в интервале pH от 8,2 до 10,0. Интервал pH, при котором происходит изменение окраски (зона перехода), характерен для каждого индикатора.

Красное конго, $\text{NaO}_3\text{S} \cdot (\text{NH}_2)\text{C}_{10}\text{H}_5\text{—N=N}$  $\text{=N—C}_{10}\text{H}_5(\text{NH}_2) \cdot \text{SO}_3\text{Na}$, является натриевой солью сульфокислоты, т. е. кислоты гораздо более сильной, чем фенолфталеин. Зона перехода для конго лежит при pH 3,0—5,2 (окраска синяя в кислой среде, красная—в щелочной), в соответствии с чем красное конго переходит в синее только под влиянием сильно диссоциированных минеральных кислот и не меняет цвета от разбавленных органических кислот и кислореагирующих солей, чем пользуются для открытия свободной соляной кислоты в желудочном содержимом.

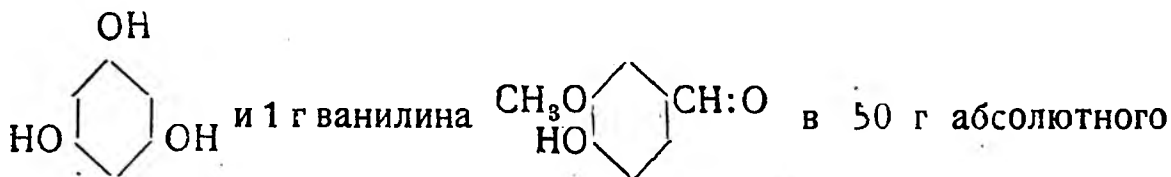
Красное конго в присутствии минеральных кислот приобретает интенсивно синюю окраску (слабая фиолетово-синяя окраска может получиться и от молочной кислоты). Вместо раствора (0,1%) красного конго можно пользоваться „бумажками конго“, фильтровальной бумагой, пропитанной раствором краски и высушенной; такую бумажку смачивают испытуемой жидкостью и наблюдают изменение окраски.

Помимо красного конго для открытия свободной соляной кислоты могут служить:

0,5% спиртовой раствор **p-диметиламидазобензола**— $\text{C}_6\text{H}_5\text{N:N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{N}(\text{CH}_3)_2$ (зона перехода при pH 2,9—4,0; желтый в щелочной среде принимает вишнево-красную окраску от свободных минеральных кислот, красновато-желтую от больших количеств молочной кислоты);

0,05—0,1% раствор **трепеолина 00** (оранж IV)— $\text{KSO}_3 \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{N:N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{NH}(\text{C}_6\text{H}_5)$ (зона перехода при pH 1,3—3,0; оранжево-желтый в щелочной среде, в присутствии минеральных кислот окраска делается малиново-красной);

реактив Гюнцбурга (Günzburg)—свежеприготовленный раствор
2 г флороглюцина



спирта, которым пользуются следующим образом: 1—2 капли реактива смешивают с 1—2 каплями испытуемой жидкости и осторожно выпаривают до суха на крышечке тигля; в присутствии свободной соляной кислоты образуется пурпурно-красная окраска. Молочная кислота никакой окраски при этой реакции не дает.

Реакции на молочную кислоту

Для открытия молочной кислоты производят реакции Уфельмана (стр. 123) и Боаса (Boas) с разбавленным раствором FeCl_3 . Так как реакцию Уфельмана дают также спирт, сахара, фосфаты и др., то для того, чтобы открыть молочную кислоту в желудочном содержимом, лучше ее предварительно выделить.

5 см³ желудочного сока взбалтывают в маленькой делительной воронке (рис. 17) (или в пробирке) с 15—30 см³ эфира, не содержащего спирта; водную жидкость выпускают через кран, а эфирную вытяжку сливают через верхнее отверстие воронки (пробирки) и разделяют на две части; одну часть выпаривают в чашке на горячей водяной бане, остаток растворяют в малом количестве воды и проделывают реакцию Уфельмана; другую часть взбалтывают с 5 см³ воды, к которой прибавлено хлорное железо до едва заметной желтой окраски—желтое окрашивание усиливается (реакция Боаса).

Молочная кислота часто встречается в желудочном содержимом при раке желудка, однако может в нем находиться и при физиологических условиях в результате введения с пищей (содержится например в печеном хлебе).

Открытие свободной соляной и молочной кислот

6 пробирок помещают в штатив, ставят позади лист белой бумаги и наливают:

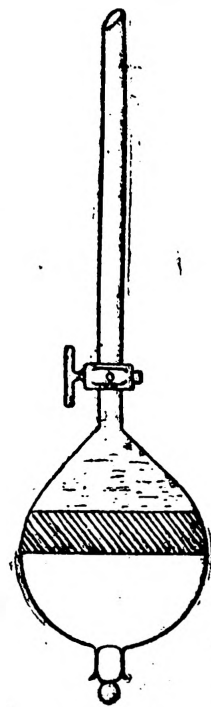


Рис. 17.

в первую пробирку—2 см³ 0,2% соляной кислоты (6 см³ HCl уд. в. 1,19 на 1 л воды);

во вторую пробирку—2 см³ разбавленной молочной кислоты (0,8 см³ на 1 л воды);

в третью пробирку—2 см³ 0,2% HCl и 2 см³ разбавленной молочной кислоты;

в четвертую пробирку—2 см³ 0,2% HCl и 2 см³ 2% раствора пептона Витте (Witte) в 5% растворе NaCl;

в пятую пробирку—2 см³ разбавленной молочной кислоты и 2 см³ раствора пептона Витте;

в шестую пробирку—2 см³ 0,2% HCl, 2 см³ разбавленной молочной кислоты и 2 см³ раствора пептона Витте.

С каждой пробой проделывают реакции на свободную соляную и молочную кислоты и отмечают в таблице полученные окраски (растворов диметиламиноазобензола и тропеолина 00 прибавляют по 1—2 капли).

	Конго	Реакция Гюнцбурга	Диметил-амидоазобензол	Тропеолин 00	Реакция Уфельмана
HCl					
Молочная кислота . . .					
HCl + молочная кислота					
HCl + пептон					
Молочная кислота + пептон					
HCl + молочная кислота + пептон					

Летучие жирные кислоты

Летучие жирные кислоты, главным образом масляная кислота, могут быть открыты по запаху.

Титрование* кислот желудочного содержимого

К 5—10 см³ профильтрованного желудочного содержимого прибавляют 1—2 капли 0,5% спиртового раствора диметила-

* Гл. XIV.

мидоазобензола и 2 капли 1% спиртового раствора фенолфталеина и титруют $n/10$ NaOH до перехода первоначальной красной окраски в желтовато-розовую (а), далее до чисто желтой окраски (б) и затем до общей розовой окраски от фенолфталеина, исчезающей не тотчас (в). Пункт (а) соответствует свободной соляной кислоте; количество щелочи, пошедшей от начала титрования до середины расстояния между (б) и (в), соответствует „общей соляной кислоте“ и до пункта (в) общей кислотности (соляная кислота, кислореагирующие соли и органические кислоты).

Результаты титрования могут быть выражены или числом куб. сантиметр. $n/10$ едкой щелочи, которая потребовалась бы для нейтрализации 100 см³ желудочного содержимого, или весом хлористого водорода (в граммах) в 100 см³ желудочного содержимого, т. е. процент HCl, причем принимают во внимание, что 1 см³ $n/10$ щелочи соответствует 1 см³ $n/10$ HCl, или 0,003646 г HCl.

При определении общей кислотности через 45—60 минут после пробного завтрака в норме на 100 см³ желудочного содержимого идет 3—6 см³ $n/10$ щелочи, а для нейтрализации свободной соляной кислоты— 2—4 см³.

В патологических случаях, при отсутствии свободной соляной кислоты в желудочном содержимом, определяют ее дефицит, т. е. количество $n/10$ HCl, которое нужно прибавить для получения красного окрашивания от диметиламидазообензола.

Уменьшение содержания HCl наблюдается при катарре желудка, при лихорадочных заболеваниях, при некоторых нервных заболеваниях, малокровии и др., полное отсутствие—при атрофии слизистой оболочки желудка, часто при раке. Количество HCl увеличивается при круглой язве желудка, при неврастении и др.

Ферменты желудочного сока

О действии химозина см. стр. 121.

Химозин несомненно содержится в желудочном соке (по крайней мере у телят) в то время, когда молоко является единственной пищей животного. Позже он повидимому исчезает, остается лишь пепсин, который также способен переводить казеин в параказеин. Химозин способен действовать помимо казеина и на другие белки и при концентрации водородных ионов меньшей, чем та, которая является оптимальной для действия пепсина. Биологическое значение створаживания молока заключается в том, что образующийся сгусток парака-

зеина, захватывающий и жиры, задерживается в желудке и подвергается расщеплению под влиянием ферментов, тогда как жидкая пища обычно быстро покидает желудок. Имеет также значение, что параказеин гидролизуется легче, чем неизмененный казеин.

О действии липазы см. Поджелудочный сок. Липаза желудка, действующая и в кислой среде, расщепляет жиры молока, которые в отличие от других жиров эмульгируются и при кислой реакции желудочного содержимого, что имеет существенное значение в пищеварении у грудных детей. Повидимому липаза желудка тождественна с липазой печени.

Пепсин

Оптimum действия пепсина лежит при рН, равном примерно 2. Пепсин расщепляет белки до стадии альбумоз и пептонов, не действует на протамины, полипептиды, однако расщепляет гистоны и некоторые пептоны, полученные при триптическом переваривании. Сывороточный глобулин не изменяется видимым образом под влиянием пепсина, так же как и под влиянием трипсин-киназы, однако последняя расщепляет сывороточный глобулин, если он был предварительно подвергнут действию пепсина. Пепсин расщепляет соединительную ткань, эластин легче, чем трипсин-киназа.

Для реакций пользуются продажным препаратом пепсина; его растворяют в 0,2% HCl (1 г препарата на 1 л кислоты) и оставляют перед употреблением стоять в течение нескольких часов, затем фильтруют.

Приготовление пепсина. Слизистую оболочку желудка промывают теплым (37°) физиологическим раствором, отсепаарывают, измельчают (пропускают через мясорубку) и извлекают двойным объемом 0,4% соляной кислоты в течение суток. Жидкость колируют, а затем фильтруют через складчатый бумажный фильтр.

Исследование действия пепсина

Приготовление фибрина. Фибрин из бычьей крови* тщательно отмывают от кровяных пигментов, воду отжимают, а фибрин сохраняют в закупоренной банке, облив приблизительно равным объемом спирта. Перед употреблением спирт тщательно отмывают в проточной воде.

В 5 пробирок помещают по несколько волоконцев фибрина,

* Фибрин свиньи непригоден, так как часто растворяется при действии разбавленной соляной кислоты даже в отсутствии пепсина.

взятого приблизительно поровну в каждую пробирку, и прибавляют:

в одну пробирку—5 см³ раствора пепсина в 0,2% соляной кислоте;

в другую—5 см³ нейтрализованного содой раствора пепсина в 0,2% соляной кислоте;

в третью—5 см³ раствора пепсина, подщелоченного 0,4% раствором NaOH;

в четвертую—5 см³ предварительно прокипяченного раствора пепсина в 0,2% соляной кислоте;

в пятую—5 см³ 0,2% HCl (обычная концентрация HCl в желудочном содержимом равна 0,1—0,2%).

Все пробирки ставят одновременно в водяную баню при 35—40° и наблюдают изменения.

Пепсин действует только в присутствии кислот; поэтому переваривание (растворение) фибрина наступает лишь в первой пробе (примерно через полчаса от начала опыта). Что это растворение не является результатом действия одной соляной кислоты, показывают пробы пятая и четвертая, в которых наблюдается лишь набухание фибрина под влиянием кислоты. Фибрин во второй и третьей пробах остается неизменным, что указывает на неспособность пепсина действовать в нейтральной или щелочной среде.

Действие щелочей на пепсин

Пепсин разрушается под влиянием разбавленных щелочей, поэтому в кишечнике его действие прекращается.

5 см³ раствора пепсина подщелачивают 2 см³ разбавленного раствора соды и ставят в водяную баню при 40°; через полчаса жидкость нейтрализуют разбавленной соляной кислотой, прибавляют затем равный объем 0,2% HCl, кусочек фибрина и снова ставят в баню при 40°. Переваривания не наступает.

Температура разрушения пепсина

В 3 пробирки наливают раствор пепсина в 0,2% соляной кислоте. Одну пробу нагревают в течение нескольких минут в водяной бане при 50°, другую—при 60°, третью—при 70°, охлаждают и прибавляют в каждую из них по волоконцу фибрина; ставят в водяную баню при 40° и отмечают, в каких пробах фибрин не растворяется.

Сравнение переваривающей способности растворов пепсина

Метод Метта

Метод Метта заключается в прямом измерении количества переваренного в течение определенного промежутка времени белка, находящегося в узких стеклянных трубках, открытых с обоих концов.

Стеклянные трубки с внутренним диаметром в 1—2 мм насыщают яичным белком, процеженным через полотно и выдержанным в течение суток в вакуум-эксикаторе (рис. 15), для удаления растворенного воздуха; насыщают так, чтобы не было пузырей воздуха. Наполненные трубки опускают в теплую водяную баню, нагревают ее до 85—90° и оставляют охлаждаться вместе с трубками. Меттовские трубки могут сохраняться долгое время, если концы трубок залить сургучом или парафином (опускают концы трубки в расплавленную массу). Перед употреблением трубку разрезают на куски длиной примерно в 2 см. Свернувшийся белок должен образовать сплошную массу, не содержащую пространств, заполненных воздухом. В подлежащие сравнению растворы ферментов помещают по такой трубке и оставляют в водяной бане при 37°. Через 8—10 часов их вынимают и по миллиметровой шкале при помощи лупы отсчитывают с каждого конца длину растворенного слоя белка. Берут среднее арифметическое из этих отсчетов.

По правилу Шюц-Борисова (Schütz) количества пепсина пропорциональны квадратам длины столбиков переваренного белка.

Уменьшение количества пепсина наблюдается при катарре желудка, при раке желудка; полное отсутствие наблюдается редко (при атрофии слизистой оболочки, раке желудка).

Исследование продуктов пептического переваривания

Продуктами пептического переваривания являются кислотные альбуминаты, альбумозы и пептоны. Их количественные соотношения меняются в зависимости от количества и активности пепсина и продолжительности воздействия.

К 2 г отжатого фибрина прибавляют 5 см³ раствора пепсина в 0,2% соляной кислоте и оставляют в водяной бане при 40° не менее получаса, поддерживая во все время переваривания добавлением 0,2% HCl кислую на конго реакцию*. При-

* Фибрин можно заменить вареным яичным белком, но в этом случае переваривание необходимо вести в течение трех суток, по временам помешивая.

бавляют несколько капель раствора лакмуса и очень разбавленной соды или едкой щелочи до почти нейтральной реакции; образуется осадок кислотного альбумината, который отфильтровывают и испытывают, как указано в главе I. Фильтрат нагревают до кипения и, если выпал осадок, снова фильтруют горячим и производят с жидкостью реакции на альбумозы.

Реакции на альбумозы

а) При кипячении альбумозы не свертываются.

б) К части жидкости прибавляют немного насыщенного раствора NaCl и по каплям, избегая избытка, концентрированной HNO_3 до появления сильной молочной мути. Нагревают жидкость до кипения (но не кипятят во избежание гидролиза)—муть растворяется с желтым цветом; при быстром охлаждении жидкости под водопроводным краном она вновь мутнеет.

в) При добавлении к другой части жидкости равного объема насыщенного раствора поваренной соли и нескольких капель уксусной кислоты получается муть такого же вида, как при предыдущей пробе; муть растворяется при нагревании и снова появляется при охлаждении.

г) Если третью часть жидкости подкислить небольшим количеством уксусной кислоты и добавить 1—2 капли раствора железистосинеродистого калия $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, то тоже получается муть с теми же свойствами, что и при двух предыдущих пробах.

Реакциями „а—г“ альбумозы отличаются от первичных белков, которые дают осадки, при нагревании не растворяющиеся.

д) Биуретовая реакция получается с красно-фиолетовым цветом (красный оттенок более выражен, чем в случае реакции с первичными белками).

е) Остальную часть жидкости нагревают до 60° , насыщают порошком $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и подкисляют разбавленной серной кислотой, насыщенной $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; происходит выделение альбумоз; осадок отфильтровывают.

Реакция на пептоны

В фильтрате открывают пептоны биуретовой пробой: к жидкости прибавляют очень большой избыток едкого кали или натра (в твердом виде или 40% растворе) и 1—2 капли 1% раствора CuSO_4 —образуется характерная для пептонов

розовая окраска, хотя часто она может маскироваться лазуревосиней окраской комплексного аммиачномедного иона.

Большой избыток едкой щелочи необходим для перевода аммиака в недиссоциированное состояние.

Дезинфицирующее действие соляной кислоты

Смесь фибрина, пепсина и соляной кислоты, взятых в тех же соотношениях, что и в предыдущем опыте, делят пополам. Одну половину нейтрализуют на лакмус содой, в другой во все время опыта поддерживают добавлением 0,2% HCl кислую на конго реакцию. Обе пробы оставляют при комнатной т-ре или лучше при 37° на несколько дней. Нейтрализованная проба загнивает в отличие от пробы, содержащей HCl.

Многие патогенные микроорганизмы, попадающие с пищей, погибают под действием соляной кислоты желудочного сока.

Открытие крови в желудочном содержимом

При патологических условиях (язва желудка, рак) в желудочном содержимом может находиться кровь. Для ее открытия пользуются гваяковой пробой (стр. 99).

Муцин

Муцин в желудочном содержимом находится обычно в небольших количествах; его содержание увеличивается при катаррах желудка, а также при заглатывании слюны, мокроты из зева и дыхательных органов.

III. ПОДЖЕЛУДОЧНЫЙ СОК

Главными ферментами поджелудочного сока являются амилаза, мальтаза, липаза и трипсин. Для изучения их действия можно пользоваться поджелудочным соком, полученным из фистулы и активированным добавлением кишечного сока, вытяжками из поджелудочной железы или 0,5% раствором продажного препарата „панкреатина“.

Трипсин

Трипсин гидролизует пептоны, гистоны, протамины, а в присутствии содержащейся в вытяжке из слизистой оболочки кишечника

энтерокиназы*—и первичные белки, причем достигается глубокое расщепление белковой молекулы вплоть до образования свободных аминокислот; особенно легко отщепляются триптофан и тирозин. Таким образом в поджелудочном соке содержатся как протеаза, расщепляющая неизменные белки, так и полипептидаза**. Оптимум действия трипсина лежит при слабощелочной реакции (рН = от 8,0 до 8,7 в зависимости от субстрата), соответствующей 0,2—0,5% раствору соды, но медленный гидролиз происходит и в нейтральной и даже очень слабокислой среде.

Так как трипсин под влиянием кислот быстро теряет активность, то приготовление вытяжек, содержащих трипсин, следует вести при нейтральной или слабощелочной реакции.

Достаточно активная вытяжка получается, если измельченную, полежавшую ночь на воздухе железу извлекать примерно четырехкратным по весу количеством разведенного 0,03% аммиака*** в течение суток при помешивании; жидкость заливают толуолом. Вытяжку фильтруют и осаждают нуклеопротели разбавленной уксусной кислотой. Осадок, захватывающий ферменты, отфильтровывают, растворяют в 0,2—0,8% растворе соды и употребляют для реакций. Активность фермента увеличивается при добавлении вытяжки из слизистой оболочки кишечника (образование трипсин-киназы).

Исследование действия трипсина

В 3 пробирки помещают по несколько волоконцев фибрина и наливают:

в одну пробирку 5 см³ раствора трипсина в соде и 5 см³ воды;

в другую—5 см³ раствора трипсина в соде, нейтрализованного соляной кислотой и затем подкисленного 5 см³ 0,4% соляной кислоты;

в третью—5 см³ воды и 5 см³ прокипяченного раствора трипсина в соде.

Все 3 пробы ставят в водяную баню при 35—40°, взбалтывают

* Правильнее называть энтерокиназу просто киназой, так как она, или вернее предшествующее ей вещество, вырабатывается, повидимому, в поджелудочной железе. Трипсин и киназа соединяются в определенных количественных соотношениях.

** Действие пепсина в кишечнике прекращается вследствие уменьшения кислотности среды и осаждающего действия желчи.

*** 1 см³ аммиака уд. в. 0,88 на 1 л воды.

каждые 5—10 минут и наблюдают за происходящими изменениями.

Только в первой пробе, содержащей соду и деятельный трипсин, происходит растворение фибрина, причем, в отличие от переваривания фибрина желудочным соком, предшествующего растворению набухания не наблюдается. В пробе с прокипяченным раствором трипсина никаких изменений не происходит. В пробе с соляной кислотой наблюдается лишь набухание фибрина.

Влияние киназы на триптическое переваривание

Для наблюдения влияния киназы берут поджелудочный сок, добытый через фистулу при кормлении животного хлебом.

Вытяжку, содержащую киназу, готовят, растирая 5 г свежей слизистой оболочки 12-перстной кишки с песком и постепенно добавляя 50 см³ воды; колируют.

В 3 пробирки наливают по 5 см³ 0,5% раствора соды и бросают по меттовской трубке (стр. 140), наполненной вместо свернутого яичного белка желатиной, подкрашенной метиленовой синькой (трубки наполняют 10—20% горячим раствором окрашенной желатины и затем дают застыть при охлаждении). В одну пробирку прибавляют 1—2 см³ поджелудочного сока неактивированного, в другую 1—2 см³ поджелудочного сока и каплю раствора киназы, в третью 1—2 см³ прокипяченного поджелудочного сока и каплю раствора киназы. Все 3 пробирки оставляют на 8—10 часов при комнатной т-ре (при 37° желатина плавится).

Переваривание наступает только в пробе, содержащей деятельную трипсин-киназу.

Исследование продуктов триптического переваривания

Около 200 г творога размешивают с 2 л 0,4% раствора соды, 10 см³ толуола (для предохранения от загнивания) и 8 г продажного препарата „панкреатина“ или 8 г измельченной, полежавшей ночь на воздухе, поджелудочной железы (можно также применять вытяжку из поджелудочной железы, стр. 143). Оставляют при 37°, перемешивая время от времени. Через 6 часов часть жидкости отфильтровывают и исследуют на содержание щелочного альбумината, альбумов и пептонов. Для открытия

щелочного альбумината жидкость осторожно нейтрализуют разведенной уксусной кислотой, избегая ее избытка, в котором выпавший осадок щелочного альбумината может вновь раствориться. Жидкость нагревают до кипения и фильтруют горячей. В фильтрате ищут альбумозы и пептоны при помощи биуретовой реакции (стр. 141), получающейся с красно-фиолетовым оттенком.

Реакции на альбумозы см. стр. 141.

Остальную часть гидролизата подвергают перевариванию в течение трех суток, каждый день добавляя свежего фермента, так как он в значительной мере разрушается во время опыта.

а) Наблюдают в гидролизате образование белого кристаллического осадка, состоящего главным образом из тирозина; его отфильтровывают, часть осадка растворяют в разбавленной HCl и испытывают раствор миллоновой реакцией—жидкость делается красной.

б) К 5 см³ фильтрата (смешанного с 5 каплями уксусной кислоты) прибавляют по каплям бромной или хлорной воды (работать под тягой!). Появляется красновато-фиолетовая окраска, которая постепенно усиливается, а при дальнейшем добавлении брома (хлора) переходит в желтую. Если красновато-фиолетовую жидкость взболтать с 2—3 см³ амилового алкоголя, то окраска переходит в алкогольный слой. Эта реакция указывает на присутствие свободного триптофана, так как триптофан, находящийся в связанном состоянии, например в белках, этой реакции не дает.

в) Остающуюся часть фильтрата испытывают на присутствие щелочного альбумината (см. выше). В случае присутствия его жидкость осторожно нейтрализуют и осадок щелочного альбумината отфильтровывают. Часть полученного фильтрата испытывают на присутствие белков, свертывающихся при кипячении. Если такие белки присутствуют, жидкость нагревают до кипения и при помешивании очень слабо подкисляют 1% уксусной кислотой, прибавляя ее по каплям. Осадок свернувшихся белков отфильтровывают, фильтрат нейтрализуют содой, сгущают выпариванием на водяной бане до консистенции жидкого сиропа и оставляют на ночь в прохладном месте. Исследуют под микроскопом выделившиеся кристаллы, представляющие собой, если жидкость не была слишком сгущена, главным образом иглы **тирозина** (стр. 42). Жидкость колируют. Часть оставшихся на плотне кристаллов помещают на фильтровальную бумагу, чтобы

впитать маточный раствор, отжимают между новыми слоями фильтровальной бумаги и производят с кристаллами пробу Миллона.

г) Маточный раствор от тирозина сгущают выпариванием на водяной бане до состояния густого сиропа и оставляют на ночь. На поверхности сиропа образуется корка, состоящая главным образом из кристаллов лейцина и глутаминовой кислоты. Под микроскопом видны слабо преломляющие свет, часто неправиль-

ной формы, шары лейцина:

$$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array}} \right\} \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH}(\text{NH}_2) - \text{COOH},$$

представляющиеся однородными или радиально и концентрически исчерченными, состоящими из тонких листочков (табл. I, рис. 7а). Здесь может выделиться также глутаминовая кислота: $\text{COOH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}(\text{NH}_2) \cdot \text{COOH}$, которая кристаллизуется в форме октаэдров, тетраэдров или блестящих листочков.

Кристаллическую корку снимают, отжимают между слоями фильтровальной бумаги, растворяют в воде, нагревают раствор до кипения и прибавляют порошок углекислой меди; происходит выделение CO_2 , осадок углекислой меди растворяется и жидкость окрашивается в синий цвет вследствие образования медных солей аминокислот.

Сравнение переваривающей способности растворов трипсина

1. Способ Метта.

Для исследования действия трипсина, активированного киназой, применимы трубки, наполненные свернутым яичным белком или желатиной (стр. 144). Измеряют длины переваренных слоев белка с обоих концов через промежутки в 2—4—8—24 часа.

Трипсин не следует правилу Шюц-Борисова (стр. 140): количество переваренного белка прямо пропорционально количеству фермента и времени его действия.

Помимо способа Метта для количественного определения активности растворов трипсина могут служить методы, позволяющие судить о степени гидролиза белков по количеству образовавшихся в результате расщепления пептидных связей свободных карбоксильных и амидных групп. К этому типу принадлежат приводимые ниже методы.

2. Титрование* карбоксильных групп по методу Вильштеттера и Вальдшмидт-Лейца (Willstätter, Waldschmidt-Leitz)

Вследствие того, что в аминокислотах содержатся одновременно амидная группа, имеющая основной характер**, и кислая карбоксильная группа, аминокислоты нельзя прямо титровать щелочью, как остальные кислоты. Если же аминокислоту растворить в 97% спирте, диссоциация аминогрупп вследствие малого содержания воды понижается настолько, что аминокислоты ведут себя как обыкновенные кислоты и могут быть оттитрованы спиртовым раствором едкой щелочи (индикатор—фенолфталеин). Пептиды, пептоны (альбумозы) и белки ведут себя как карбоновые кислоты уже при концентрации спирта в 40%, тогда как на титрование аминокислот при этой концентрации спирта идет всего 28% теоретически нужного количества щелочи. Это различие делает возможным количественное определение обеих групп веществ при одновременном их присутствии.

Определение производят в разных порциях жидкости, взятых в начале гидролиза и по истечении желаемого промежутка времени. Прирост кислотности прямо указывает величину расщепления. В случае ферментативного гидролиза нарастание кислотности происходит тем быстрее, чем активнее раствор фермента.

К двум пробам испытуемой жидкости (по 10 см³), нейтрализованной на лакмус, прибавляют столько спирта, чтобы содержание его в одной пробе равнялось 50%, в другой—97%, и титруют $n/1$ спиртовым раствором едкого кали.

Израсходованное количество щелочи распределяется между образовавшимися аминокислотами и полипептидами. Количество (x) щелочи, связанной аминокислотами, может быть вычислено по формуле

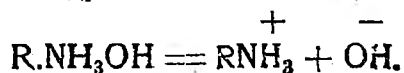
$$x = \frac{100(b - a)}{72},$$
 где a и b количества щелочи, пошедшей при титровании соответственно в 50 и 97% спирте, $72 = 100 - 28$. Количество щелочи, соответствующей полипептидам, равно $(b - x)$.

3. Формоловое титрование*** по Зеренсену (Sørensen)

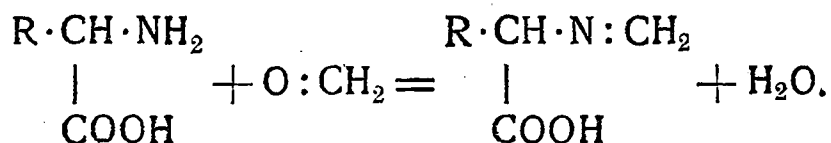
При действии избытка нейтрального раствора формалина на очень слабокислый ($pH = 6,8$) раствор аминокислот происходит связывание

*, *** Гл. XIV.

** Аминогруппы, присоединяя воду, дают подобно аммиаку гидроокиси, диссоциирующие с образованием гидроксильных ионов:



аминогрупп; последние переходят повидимому в нейтральные метиленовые группы



Остающиеся при этом свободными карбоксильные группы оттитровываются щелочью (индикатор—фенолфталеин) до $\text{pH} = 9,1$.

Определение производят с контролем в одинаковых по форме и величине сосудах. 20 см³ примерно $n/10$ в отношении NH_2 -групп испытуемой жидкости нейтрализуют, пользуясь чувствительной лакмусовой бумажкой, и смешивают с 10 см³ нейтрализованного непосредственно перед опытом формалина [к 30—40% формалину прибавляют 0,5% раствор фенолфталеина в 50% спирте (1 см³ на 50 см² формалина) и $n/5$ едкой щелочи до появления слабозимовой окраски]; смесь титруют сначала до слабозимовой окраски, а затем до окраски контрольного раствора (см. ниже), который должен иметь тот же объем, что и испытуемая жидкость в момент конца титрования.

Контроль. К 20 см³ прокипяченной (для удаления CO_2) дистиллированной воды прибавляют 10 см³ нейтрализованного формалина, половину того количества $n/5$ щелочи, какое пошло при титровании испытуемой жидкости, затем $n/5$ HCl до тех пор, пока в жидкости не останется лишь слабозимовая окраска (первая стадия, $\text{pH} = 8,3$), и прибавляют 1 каплю $n/5$ щелочи,—жидкость делается яснокрасной (промежуточная стадия, $\text{pH} = 8,8$).

Испытуемую жидкость попеременным добавлением $n/5$ щелочи и $n/5$ кислоты доводят точно до окраски контрольной жидкости. К контролю прибавляют теперь еще 2 капли $n/5$ щелочи—появляется интенсивная красная окраска (вторая стадия, $\text{pH} = 9,1$). Испытуемую жидкость тоже доводят до этой же окраски.

Вычисление. Из числа куб. сантим. $n/5$ щелочи, пошедшей на титрование испытуемой жидкости до 2-й стадии, вычитают количество куб. сантим. прибавленной $n/5$ HCl , а также избыток щелочи, прибавленной в контрольную жидкость. Каждый куб. сантим. полученной разности соответствует 2,8 мг определяемого по формоловому методу азота.

Ошибки формолового титрования. Цифры, которые полу-

чаются, для тирозина оказываются слишком высокими, для пролина — низкими. Мочевина и соли гуанидина остаются нейтральными и по добавлении формалина, поэтому соль аргинина оттитровывается как одноосновная кислота. Испытуемая жидкость должна быть по возможности менее окрашенной, не содержать углекислых, фосфорнокислых и аммиачных солей. Количество аммиака, образующегося при гидролизе большинства белков, настолько невелико, что можно пренебречь обусловленной им ошибкой.

Для определения переваривающей способности раствора трипсина отмеривают в небольшую склянку 100 см³ 4% раствора казеина в 0,4% растворе соды, помещают в баню при 40° и, когда жидкость прогреется, смешивают с 5 см³ раствора трипсина. Тотчас по смешении и затем каждые полчаса берут пипеткой пробы жидкости по 20 см³ и производят формоловое титрование, как описано выше.

Подобным же образом испытывают подлежащий сравнению раствор трипсина.

Переваривающие способности растворов фермента относятся как количества пошедшей в каждом случае щелочи.

4. Определение азота свободных амидных групп по ван Слайку (van Slyke)

Метод ван Слайка основан на том принципе, что алифатические аминокислоты при действии азотистой кислоты переводятся в оксисоединения; выделившийся при этом азот освобождают при помощи щелочного перманганата от окислов азота и измеряют его объем:

$$R \cdot NH_2 + O : N \cdot OH = R \cdot OH + N_2 + H_2O.$$

Определение производят в аппарате, изображенном на рис. 18. Краны аппарата смазывают сплавом из 1 части невулканизированного каучука, 1 части парафина и 2 частей вазелина. Замыкающая жидкость в груше *E*, азотомере *D* и соединительной трубке *ж* — вода, в гемпелевской (Hempel) пипетке *Ж* — щелочной раствор перманганата (50 г $KMnO_4$ + 25 г $NaOH$ в 1 л воды). Опуская грушу *E* и приводя в сообщение *D* с *ж* при помощи крана *д* (с двумя параллельными ходами, положение \diagup) заполняют *ж* перманганатом, избыток которого выпускают через *K*, для чего поворачивают краны *д* ($\diagup \rightarrow \diagdown$) и *г* (трехходовой \vdash) и поднимают грушу *E*. При помощи крана *з* соединяют *B* с *K* ($\vdash \rightarrow \dashv$); грушу *E* опускают. Закрыв краны *а*, *б* и *в* \perp , наливают в воронку *A* до нижней черты ледяную уксусную

кислоту* и впускают в Б. Кран а закрывают, наполняют А до верхней черты 30% раствором NaNO_2 и впускают в Б; воздух при этом вытесняется через 2 наружу. Кран 2 закрывают и при открытом кране а взбалтывают Б рукой; образующийся газ заполняет верхнюю часть Б, его выпускают через 2 наружу; эту операцию повторяют еще раз и удаляют таким образом из Б остатки воздуха. Взбалтыванием Б при помощи мотора, при закрытом кране 2, заполняют Б до черты газом; жидкость при этом вытесняется в А. Кран а закрывают и тотчас устанавливают сообщение между Б (\perp) и Д (\searrow) при опущенной груше Е. Из бюретки В впускают в Б ($\perp \rightarrow \sqcap$) испытуемую жидкость (10 см³) и взбалтывают при помощи мотора** (для α -амино-

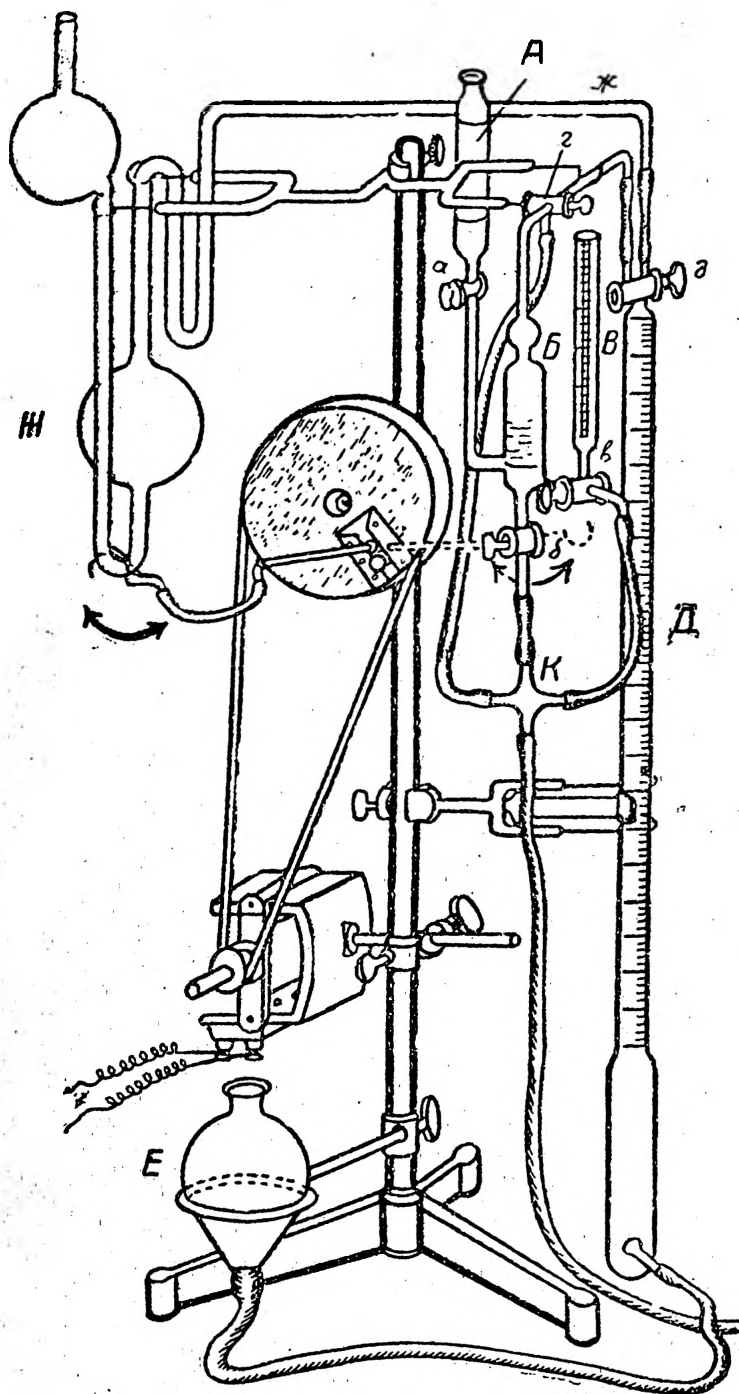


Рис. 18.

при этом вытесняется через 2 наружу. Кран 2 закрывают и при открытом кране а взбалтывают Б рукой; образующийся газ заполняет верхнюю часть Б, его выпускают через 2 наружу; эту операцию повторяют еще раз и удаляют таким образом из Б остатки воздуха. Взбалтыванием Б при помощи мотора, при закрытом кране 2, заполняют Б до черты газом; жидкость при этом вытесняется в А. Кран а закрывают и тотчас устанавливают сообщение между Б (\perp) и Д (\searrow) при опущенной груше Е. Из бюретки В впускают в Б ($\perp \rightarrow \sqcap$) испытуемую жидкость (10 см³) и взбалтывают при помощи мотора** (для α -амино-

* Употребляют уксусную кислоту, так как она не гидролизует испытуемое вещество и вызывает относительно небольшое образование окислов азота. Воронка А в макроаппарате имеет объем примерно 35 см³, сосуд Б — 40—45 см³, бюретка В — 10 см³. Нижняя черта воронки А нанесена на уровне, отвечающем $\frac{1}{5}$ объема сосуда Б, верхняя — немного превышает $\frac{4}{5}$ объема Б. Черта на сосуде Б делит его пополам.

** Если жидкость при взбалтывании пенится, в Б прибавляют октилового спирта или фенилового эфира — $\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{O} \cdot \text{C}_6\text{H}_5$.

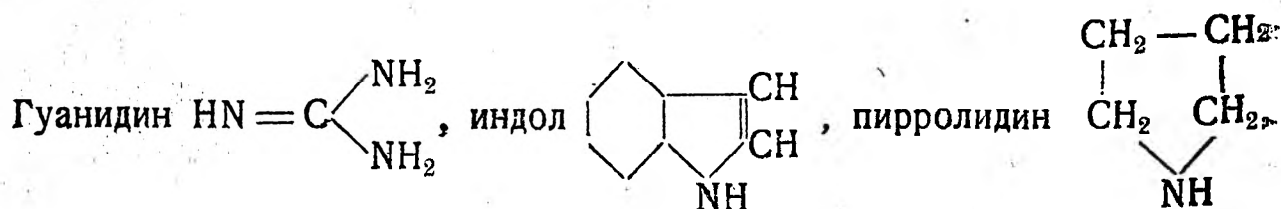
кислот обычно достаточно 5-минутного взбалтывания). Образующиеся окислы азота (N_2O_3) переходят в *Д* и захватывают с собой N_2 . Остающийся в *Б* газ вытесняют в *Д*, впуская жидкость из *А*. Поворотом крана *д* ($\backslash \rightarrow /$) приводят в сообщение *Д* с *ж*. Кран *а* оставляют открытым для выхода образующихся в *Б* окислов азота. Поднимая грушу *Е*, переводят газ в *Ж*; закрыв кран *д*, взбалтывают *Ж* 1 минуту для окисления и поглощения окислов азота щелочным перманганатом. Остающийся в *Ж* газ, повернув кран *д* ($\backslash \rightarrow /$), осторожно переводят в *Д* и определяют его объем, держа *Е* так, чтобы жидкость в груше и бюретке стояла на одном уровне; одновременно измеряют т-ру и атмосферное давление. Чтобы убедиться в полноте поглощения окислов азота, газ снова переводят в *Ж*, повторяют взбалтывание и вновь измеряют объем газа. По окончании опыта выпускают газ из *Д* через *К*, выливают жидкость из *Б*, промывают *В* водой, осушают фильтровальной бумагой или ополаскивают спиртом и эфиром и дают высохнуть. Таким образом аппарат оказывается готовым для нового определения.

Слепой опыт для определения количества газа, образующегося из примесей в азотистокислом натрии, производят так, как это описано выше, но вместо испытуемой жидкости впускают равный ей объем дистиллированной воды. Делают несколько слепых опытов и берут среднее арифметическое из полученных результатов.

$NaNO_2$ негоден к употреблению, если при слепом опыте (продолжительность взбалтывания 5 минут) дает более $0,5 \text{ см}^3$ газа, не поглощаемого щелочным перманганатом.

Вычисление. Из объема газа, полученного в основном опыте, вычитают объем газа, выделившегося при слепом опыте. Половина найденной разности соответствует азоту аминогрупп, так как половина азота образуется из азотистой кислоты (см. уравнение реакции). Найденный таким путем объем газа (*V*) приводят к нормальным условиям (0° , 760 мм) и сухости (см. стр. 97, газы крови).

Вес 1 см^3 сухого азота при нормальных условиях равен $0,0012508 \text{ г}$.



имидазол $\begin{array}{c} \text{HC} = \text{CH} \\ | \quad | \\ \text{N} \quad \text{NH} \\ \diagdown \quad / \\ \text{CH} \end{array}$ не реагируют с HNO_2 ; поэтому пролин и окси-

пролин не дают азота по методу ван Слайка, триптофан дает $\frac{1}{2}$ общего количества N, гистидин — $\frac{1}{3}$, аргинин — $\frac{1}{4}$. NH_2 -группа, связанная в аспарагине в виде амида, не реагирует с HNO_2 . Гликокол (вследствие образования CO) и цистин дают 103—107% теоретического количества. Пептиды и белки реагируют соответственно содержанию в них свободных NH_2 -групп (за исключением гуанидиновой группы аргинина). При дезаминировании белков отщепляется 1—2% общего количества N. Повидимому свободными в белковой молекуле являются ϵ - NH_2 -группы лизина $\text{NH}_2 \cdot (\text{CH}_2)_4 \cdot \text{CH}(\text{NH}_2) \cdot \text{COOH}$. Способность к реакции и скорость последней повышаются в присутствии минеральных кислот. Подлежащие исследованию жидкости не должны содержать этилового спирта и ацетона, так как они дают с азотистой кислотой газообразные продукты, не поглощаемые щелочным перманганатом.

Липаза (стеапсин) поджелудочного сока

Для наблюдения действия липазы можно пользоваться поджелудочным соком или глицериновой вытяжкой поджелудочной железы: вырезают поджелудочную железу свиньи, освобождают от жира, пропускают через мясорубку, взвешивают и растирают в ступке с 24-кратным количеством ацетона для удаления жиров и липоидных веществ. Смесь помещают в склянку, закрывают ее пробкой. Спустя сутки ацетоновую вытяжку сливают или отфильтровывают, оставшуюся массу взбалтывают со смесью равных объемов ацетона и эфира, собирают на фильтр, промывают несколько раз эфиром, выкладывают на несколько слоев фильтровальной бумаги и высушивают на воздухе. Сухое вещество растирают в ступке и просеивают. Полученный порошок по мере надобности настаивают с 12 частями 87% водного раствора глицерина при 30° в течение 4 часов.

5 см³ нейтрального прованского масла (стр. 77) смешивают в пробирке с 5 см³ глицериновой вытяжки (или 1 см³ поджелудочного сока) и каплей спиртового раствора фенолфталеина. Из бюретки прибавляют очень разбавленный раствор едкой щелочи до первого появления красной окраски. Помещают пробирку в водяную баню при 37° и время от вре-

мени взбалтывают. Через некоторое время жидкость обесцвечивается вследствие образования свободных жирных кислот в результате расщепления жиров под влиянием липазы. По мере обесцвечивания прибавляют щелочь до покраснения жидкости и отмечают количество пошедшей щелочи и время, прошедшее до обесцвечивания. Одновременно производят контрольный опыт с прокипяченной вытяжкой. Повторяют этот же опыт в присутствии желчи. Реакция значительно ускоряется—желчь способствует омылению жиров липазой*. Образовавшиеся жирные кислоты могут быть выделены подкислением жидкости. Липаза действует в довольно широких пределах рН, что зависит от сопутствующих веществ; оптимальная реакция для очищенных препаратов липазы лежит при рН 8,0.

Амилаза поджелудочного сока

Для осахаривания 5 см³ крахмального клейстера берут 1 см³ сока поджелудочной железы или глицериновой вытяжки, приготовленной так же, как для опыта с липазой (см. выше). Осахаривание ведут так, как это было описано для птиалина (стр. 52).

IV. ЖЕЛЧЬ

Желчь является секретом печеночных клеток. Главными ее составными частями являются: желчные пигменты (билирубин и биливердин); соли желчных кислот**, главным образом натриевые соли гликохолевой, гликодезоксихолевой, таурохолевой и тауродезоксихолевой кислот; муцин или муциноподобный нуклеоальбумин в небольшом количестве; холестерин (стр. 81), который является также главной составной частью образующихся при патологических условиях желчных камней; янтарная кислота; амилаза.

Желчь из желчного пузыря вязкая, удельного веса 1,008 — 1,040 жидкость, зеленовато-бурого или зеленого цвета, дающая окрашенную пену. Вкус желчи горький с сладковатым привкусом, запах своеобразный ароматический. Желчь имеет слабощелочную или нейтральную на лакмус реакцию. При кипячении не свертывается.

* Активирующее действие желчи объясняют тем, что соли желчных кислот (см. ниже) дают коллоидной природы осадки с белками, адсорбирующие фермент и субстрат (ср. гл. IV). Подобно желчным кислотам действуют и известковые соли, давая нерастворимые мыла, адсорбирующие липазу и жиры.

** Иногда при патологических условиях желчь не содержит желчных кислот или желчных пигментов.

Влияние желчи на поверхностное натяжение воды

В пробирку с желчью, сильно разбавленной водой, насыпают порошок серы (серный цвет): порошок тонет, так как желчно-кислые соли понижают поверхностное натяжение воды. Если вместо разбавленной желчи взять чистую воду, то кусочки серы остаются плавать на поверхности жидкости. Повторяют опыт с крепкими минеральными кислотами, аммиаком, раствором $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,—сера плавает на поверхности. Сера тонет в спирте, эфире, хлороформе, прованском масле, т. е. в жидкостях, поверхностное натяжение которых меньше 60 дин на 1 см^2 .

Способностью желчнокислых солей понижать поверхностное натяжение воды и растворять многие труднорастворимые соединения обусловлено прохождение жира через фильтр, смоченный разбавленным раствором желчи, тогда как через фильтр, смоченный водой, жир не проходит. Благодаря присутствию желчных кислот желчные пигменты и холестерин удерживаются в коллоидном растворе.

Размешивают немного говяжьего или свиного сала с водой—растворения не происходит. Прибавляют немного желчи и снова размешивают, отфильтровывают, выпаривают фильтрат досуха и нагревают на голом огне—жиры открываются по характерному запаху акролеина, образующегося при нагревании глицерина (стр. 75).

Этот процесс растворения протекает и в организме при переваривании и всасывании жиров.

Выделение нуклеоальбумина (так наз. муцина желчи).

При подкислении желчи разбавленной уксусной кислотой выделяется труднорастворимый в избытке уксусной кислоты осадок муциноподобного нуклеоальбумина, который захватывает часть желчных пигментов.

Желчные пигменты

Желчные пигменты, производные пиррола, обладают свойствами кислоты, растворяются в щелочах, дают нерастворимые соли с щелочными землями и тяжелыми металлами. В отличие от кровяных пигментов (гл. IX), из которых они образуются, не содержат железа и, за исключением билицианина и холетелина, не дают полос поглощения в спектре. В желчи всех исследованных позвоночных содержится у одних животных, в том числе и у человека, краснобурый били-

рубин*— $C_{33}H_{36}O_6N_4$, в молекулу которого входят 4 пиррольных кольца в открытой цепи, у других—зеленый биливердин— $C_{33}H_{36}O_8N_4$ (?)—продукт окисления билирубина, часто уробилин (гл. XIII) и уробилиноген.

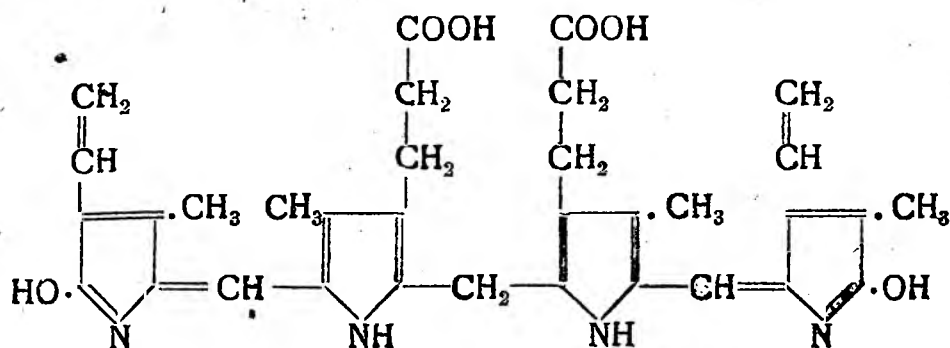
Реакции на желчные пигменты основаны на получении окрашенных продуктов окисления билирубина: биливердина (зеленый), билицианина (синий), холетелина (желтый) и др.; из них наименее окисленным является биливердин, наиболее окисленным—холетелин.

а) Проба Гмелина (Gmelin). Разбавленную водой желчь помещают в пробирку и, наклонив пробирку, по стенке ее осторожно вливают азотную кислоту, содержащую азотистую**, так чтобы кислота пошла вниз, не смешиваясь с желчью,—на границе обеих жидкостей образуется ряд цветных колец: зеленое кольцо, появляющееся там, где всего меньше азотной кислоты, т. е. вверху, ниже—синее, фиолетовое, красное и желтое; при стоянии все пигменты окисляются до желтого холетелина. Помимо цветных колец на поверхности соприкосновения обеих жидкостей может появиться осадок желчных кислот и нуклеоальбумина.

Эту же реакцию можно произвести следующим образом: желчь повторно фильтруют через небольшой фильтр, причем бумага задерживает желчные пигменты; если фильтр развернуть и капнуть на него азотной кислотой, то появляется ряд концентрических цветных колец—снаружи наружу: желтое, красное, фиолетовое, синее и зеленое [Проба Розенбаха (Rosenbach)].

б) Проба Гупперт-Зальковского (Huppert). 5 см³ желчи разводят 25—50 см³ воды и прибавляют 4 см³ раствора соды и 6 см³ раствора CaCl₂. Отфильтровывают желтый осадок, содержащий нерастворимую известковую соль билирубина, и кипятят его с 5 см³ спирта, подкисленными 1—2 каплями креп-

* Строение билирубина выражается формулой



** Азотная кислота, стоявшая на свету, всегда содержит примесь азотистой.

кой соляной кислоты. Образуется зеленое или синее окрашивание.

Уменьшение содержания желчных пигментов наблюдается при жировом перерождении печени, при лихорадочных состояниях.

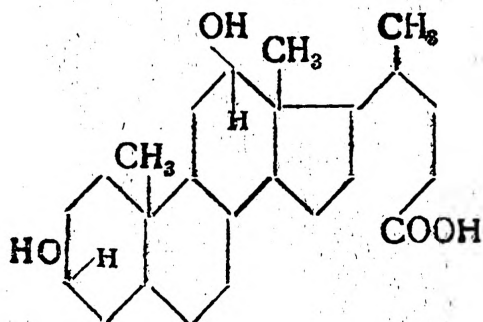
Желчные кислоты

Желчные кислоты состоят из 2 компонентов (парные желчные кислоты). Одним компонентом являются холевые кислоты— характерные для желчных кислот кристаллические, близкие по строению к стеринам, одноосновные оксикислоты, производные углевода холана $C_{24}H_{42}$, содержащие 4 гидроароматических кольца. Из них дезоксихолева кислота* $C_{23}H_{37}(OH)_2 \cdot COOH$ обладает замечательной способностью давать легко растворимые аддиционные соединения с высшими жирными кислотами и со многими другими органическими веществами. Эта способность имеет большое физиологическое значение, так как таким путем многие нерастворимые в воде вещества (холестерин, жирные кислоты и др.) переводятся в растворимую в воде, способную всасываться форму. Другим компонентом являются гликокол, $H_2N \cdot CH_2 \cdot COOH$, или таврин, $H_2N \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot SO_2 \cdot OH$. Оба компонента связаны амидокислотной связью— $CO \cdot NH$ —, образованной путем отщепления воды из карбоксильной группы холевой кислоты и амидной группы гликокола или таврина.

Желчные кислоты усиливают сердечные сокращения и замедляют пульс, т. е. оказывают действие, подобное дигиталину, который повидимому содержит комплекс, близкий по строению к холевой кислоте.

Реакция Петтенкофера (Pettenkofer)

Холевые кислоты и парные желчные кислоты дают реакцию Петтенкофера.



Дезоксихолева к-та (3,12-дигидроксихолановая к-та)

Небольшим количеством желчи (можно разбавить в 10 раз водой), смешанным с 2—3 каплями 10% раствора тростникового сахара, осторожно переслаивают несколько куб. сантим. концентрированной H_2SO_4 . На границе обеих жидкостей образуется осадок желчных кислот и появляется красновато-фиолетовая окраска. Осторожно смешивают обе жидкости, не давая им слишком нагреваться (выше 70°) (ср. стр. 19, реакция Шульце). Жидкость принимает вишнево-красную окраску, которая быстро темнеет и приобретает пурпурный оттенок при взбалтывании с воздухом.

Окраска обусловлена взаимодействием холевой кислоты с оксиметилфурфуролом, образующимся из тростникового сахара под влиянием серной кислоты. Надо избегать избытка сахара, так как может наступить обугливание, меняющее окраску.

Часть пурпурно-красной жидкости разбавляют ледяной уксусной или 50% серной кислотой и исследуют в спектроскопе: видны 2 полосы поглощения, одна между С и D возле D, другая в зеленой части спектра.

Белки дают реакцию Шульце, напоминающую реакцию Петтенкоффера по окраске, но отличимую по спектроскопической картине.

Парные желчные кислоты, производные от таурина, легко растворимы в воде и спирте. Кислоты, производные от гликокола, трудно растворимы в воде, легко растворимы в спирте. Щелочные соли парных желчных кислот легко растворимы в воде, остальные соли трудно растворимы или нерастворимы.

Гликохолевая кислота

Гликохолевая кислота, $C_{23}H_{39}O_3 \cdot CO \cdot NH \cdot CH_2 \cdot COOH + 1,5 H_2O$, иглы сладковато-горького вкуса; $[\alpha]_D = +32,3^\circ$ (в спиртовом растворе). Растворимость в холодной воде 0,33:1 000, в кипящей 8,5:1 000. При кипячении с кислотами или щелочами расщепляются на холевую кислоту и гликокол.

Выделение гликохолевой кислоты и реакции на нее

К 200 см³ бычьей желчи в склянке прибавляют 10 см³ концентрированной соляной кислоты, 25 см³ эфира и сильно взбалтывают. Бросают в жидкость кристаллик гликохолевой кислоты и оставляют в холодном месте. Выделяются кристаллы гликохолевой кислоты. Их отфильтровывают и промывают холодной во-

дой, пока промывные воды не станут бесцветными. Кристаллическую массу переносят в колбу, растворяют в возможно малом количестве кипящей воды и фильтруют раствор горячим. По охлаждении выделяются кристаллы гликохолевой кислоты в форме тонких иголок (табл. 1, рис. 5).

Кристаллы исследуют под микроскопом, проделывают с ними реакцию Петтенкофера и реакцию флуоресценции: при растворении в концентрированной серной кислоте получается краснорубая жидкость с зеленой флуоресценцией вследствие образования дегидрохолана.

Часть кристаллов растворяют в воде и нейтрализуют на лакмус содой. Отмечают горький вкус раствора.

К части раствора прибавляют несколько капель раствора CuSO_4 —образуется осадок медной соли гликохолевой кислоты. Укусноокислый свинец вызывает образование осадка свинцовой соли.

Холестерин

Для открытия холестерина на 10 см³ желчи выпаривают досуха на водяной бане. Сухой остаток повторно извлекают небольшими количествами эфира. Эфир испаряют, остаток растворяют в 2 см³ хлороформа и проделывают реакцию Зальковского (стр. 82).

V. КИШЕЧНЫЙ СОК

Главными ферментами кишечного сока являются эрепсин (комплекс полипептидаз и дипептидаз), расщепляющий пептиды до аминокислот (действует при слабощелочной и нейтральной реакции, оптимальная реакция лежит при $\text{pH} = 7,8$), сахараза, лактаза и мальтаза.

Приготовление вытяжки. Слизистую оболочку тонких кишок растирают с песком в ступке и извлекают в течение 1—3 суток водой, к которой прибавляют толуол; колируют.

Открытие эрепсина

1. В две пробирки наливают равные количества раствора пептона Витте, слабо подщелачивают содой и прибавляют в одну пробирку несколько куб. сантим. приготовленной вытяжки, в другую—столько же вытяжки, предварительно прокипяченной, и

ставят в водяную баню при 35—40°. Время от времени проделывают биуретовую пробу. После достаточно долгого переваривания жидкость, содержащая деятельный фермент, перестает давать биуретовую реакцию.

2. Вместо раствора пептона Витте берут водный раствор шелкового пептона (Seidenpepton), нейтрализуют его содой, добавляют водной вытяжки из слизистой оболочки кишечника и оставляют на ночь при комнатной т-ре. В жидкости, содержащей деятельный эрепсин, образуется обильный осадок тирозина иглы под микроскопом; реакция Миллона (стр. 17) с осадком, отфильтрованным и отжатым в фильтровальной бумаге].

Открытие сахаразы (инвертина)

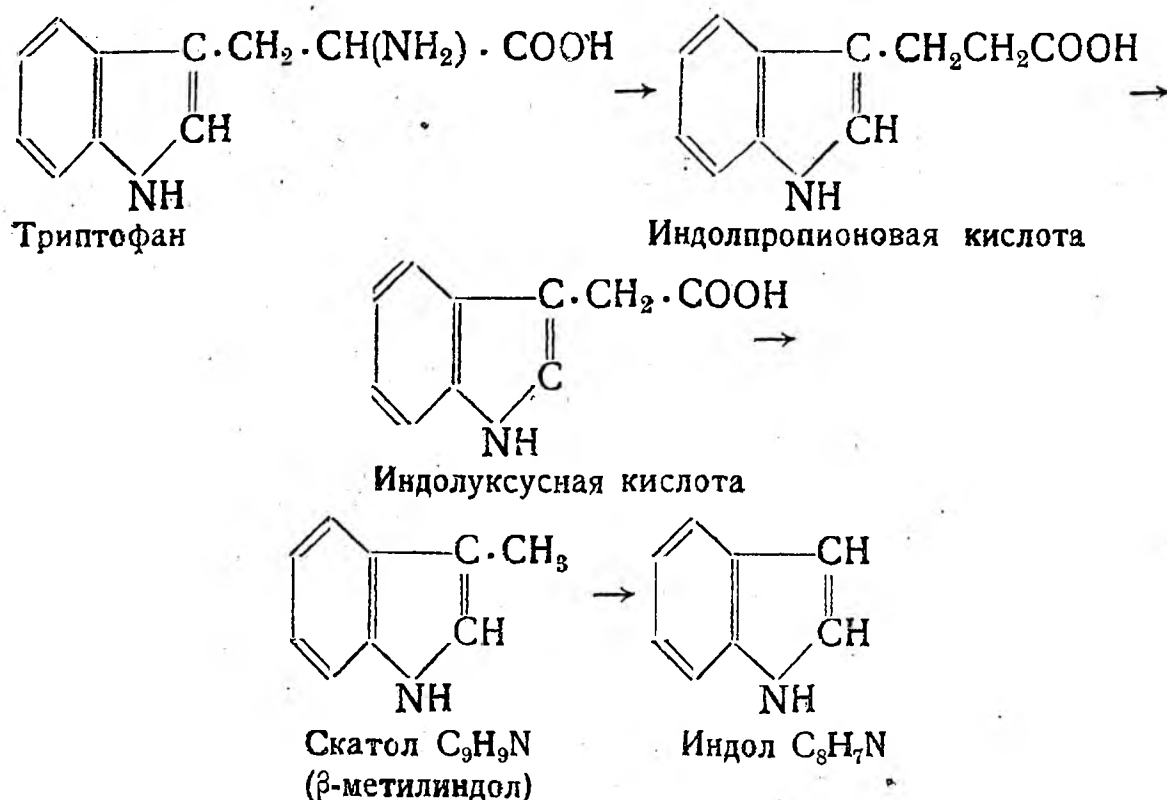
Вытяжку смешивают с 1% раствором тростникового сахара и оставляют в бане при 37° на 12 часов. Такую же пробу ставят с прокипяченной вытяжкой. Восстановление при пробе Троммера (стр. 71) получается только в пробирке с некипяченым раствором фермента.

VI. ГНИЕНИЕ В КИШЕЧНИКЕ

Пищеварительные соки и остатки невсосанной пищи подвергаются главным образом в толстых кишках разложению под влиянием бактерий, вызывающих декарбоксилирование и дезаминирование аминокислот и ряд других химических процессов. Результатом является образование многочисленных и разнообразных продуктов гнилостного распада белков, в том числе и образование многих более или менее ядовитых птомаинов. При нормальных условиях процессы гниения в кишечнике не настолько интенсивны, чтобы быть вредными для организма. Продукты гниения могут быть удобно исследованы на разложившемся в щелочной среде мясе.

200 г провернутого через мясорубку мяса смешивают с 1 л 0,5% раствора соды в большой склянке, заткнутой ватой, и настаивают при 40° в течение недели. Разложение идет быстрее, если добавить немного загнившего мяса. Жидкость приобретает отвратительный запах вследствие образования таких веществ, как индол, скатол, сероводород, меркаптаны.

Индол и скатол являются продуктами превращения триптофана



Часть жидкости исследуют на альбумозы и пептоны. (стр. 141).
 От остальной жидкости отгоняют летучие продукты гниения, для чего жидкость кипятят в колбе, соединенной с нисходящим холодильником. Первую часть перегона собирают отдельно и в ней ищут скатол, который перегоняется раньше индола. Открывают также аммиак обычными реакциями (стр. 20).

Реакции на индол и на скатол

а) К жидкости прибавляют несколько капель азотной кислоты и 1—2 капли 0,02% раствора KNO_2 . В присутствии индола жидкость делается красной и может выделиться красный осадок нитрата нитрозоиндола — $C_{16}H_{13}(NO)N_2 \cdot HNO_3$. В присутствии одного скатола при этой реакции появляется лишь белая муть.

б) При добавлении к жидкости свежеприготовленного раствора нитропруссид натрия $[Na_2Fe(CN)_5 \cdot NO]$ до ясножелтой окраски и затем нескольких капель едкого натра появляется сине-фиолетовая окраска в присутствии индола, интенсивно-желтая, если содержится один скатол. При сильном подкислении соляной или ледяной уксусной кислотой окраска от индола делается синей, от

скатола при кипячении в течение нескольких минут постепенно приобретает фиолетовый цвет.

Реакция на скатол

3 см³ испытуемой жидкости смешивают с 3 каплями метилового спирта (не содержащего альдегида) и переслаивают равным объемом концентрированной H₂SO₄, содержащей следы соли окиси железа [на 100 г H₂SO₄ 1 капля 1% водного раствора Fe₂(SO₄)₃]. На границе соприкосновения обеих жидкостей образуется фиолетовое кольцо. Если через несколько минут жидкости перемешать, появляется общая фиолетово-красная окраска.

Индол и триптофан этой реакции не дают.

VII. ЭКСКРЕМЕНТЫ

В состав экскрементов входят: 1) непереваренные остатки пищи, 2) остатки невсосавшихся продуктов переваривания, 3) остатки пищеварительных соков, 4) продукты действия бактерий (в том числе индол, скатол, уробилин, копростерин*, 5) вещества, подлежащие удалению из организма, выделяемые стенкой кишечника (фосфорнокислые соли извести и магнезии, соли железа и других металлов), 6) организованные элементы (клетки и т. п.), 7) при патологических условиях также кровь, гной, слизь, паразиты, желчные, кишечные камни и др.

Экскременты обычно имеют нейтральную или слабощелочную реакцию на лакмус, иногда кислую (часто у детей).

Нормальная окраска экскрементов зависит от стеркобилина C₃₃H₄₆O₆N₄, — близкого уробилину продукта восстановления билирубина под влиянием бактерий кишечника. Его содержание в экскрементах равно 0,2—0,3 г в сутки.

При поносах экскременты содержат много белков, жиров, неизменные жирные кислоты, билирубин. Реакция бывает кислой или щелочной в зависимости от того, преобладают ли процессы брожения или гниения. При дизинтерии содержат кровь, при диабете — сахар. При желтухе имеют глинистый вид вследствие содержания больших количеств жиров и отсутствия желчных пигментов; увеличено при этом содержание нерастворимых мыл (известковых и магнезиальных). При холере имеют вид рисового отвара и вследствие одновременного при-

* Продукт превращения холестерина.

сутствия индола и азотистокислых солей окрашиваются в красный цвет при подкислении разведенной серной кислотой (нитрозоиндоловая реакция, см. выше).

Открытие стеркобилина

а) Небольшое количество экскрементов растирают в ступке с насыщенным водным раствором сулемы, переносят на часовое стекло и оставляют покрытым на 6—24 часа. Содержащие стеркобилин места экскрементов окрашиваются в розовый цвет вследствие образования ртутного соединения стеркобилина. Если имеется неизменный билирубин, то в соответствующих местах появляется зеленая окраска в результате окисления билирубина в биливердин.

б) Свежие экскременты растирают с водой, прибавляют равный объем хорошо перемешанного 10% спиртового раствора уксуснокислого цинка и фильтруют. Фильтрат показывает зеленую флуоресценцию и характерный спектр поглощения; одну полосу поглощения между ν и F , несколько заходящую за F в сторону фиолетового конца спектра (см. таблицу спектров).

Запах экскрементов зависит между прочим от индола и скатола.

Для открытия индола и скатола экскременты растирают с водой в жидкую кашицу, отгоняют летучие продукты и исследуют, как указано выше.

Открытие крови (в патологических случаях)

Кусок экскрементов величиной с орех растирают с 30 см³ смеси алкоголя с эфиром (поровну), фильтруют, промывают фильтр той же смесью, затем одним эфиром несколько раз, пока стекающая жидкость не станет почти бесцветной. Оставшееся на фильтре разминают с 4 см³ ледяной уксусной кислоты, затем наливают еще 4 см³ ее; прошедшую сквозь фильтр кислую жидкость еще раз наливают на тот же фильтр, разминая смесь палочкой. К новому фильтрату добавляют двойной объем эфира, затем приливают к жидкости полобъема воды и взбалтывают. Эфирный слой сливают или снимают при помощи пипетки (если образовалась эмульсия, ее устраняют прибавлением спирта или воды или эфира); отделенный эфирный слой вновь взбалтывают с полубъемом воды; отстоявшийся эфирный слой, содержащий гема-

тин, отделяют и смешивают с 10 каплями свежеприготовленного спиртового раствора гваяковой смолы, содержащего небольшое количество перекиси водорода. В случае содержания кровяного пигмента появляется синее окрашивание (проба Вебера).

При относительно большом содержании кровяных пигментов их удается открыть спектроскопически:

подкисленные серной кислотой экскременты извлекают эфиром или спиртом, отфильтровывают вытяжку и прибавляют к ней едкого натра и сернистого аммония (NH_4HS); наблюдают характерный спектр поглощения гемохромогена (стр. 108).

КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ НЕКОТОРЫХ НОРМАЛЬНЫХ И ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТАВНЫХ ЧАСТЕЙ МОЧИ

Моча — продукт выделения почек — представляет водный раствор весьма многочисленных и разнообразных веществ, удаляемых из организма. Азотистые продукты обмена веществ и растворимые неорганические соли выделяются из организма главным образом с мочой. Около 95% общего количества N мочи падает на N мочевины, аммиака, аминокислот, мочевой кислоты, пуриновых оснований, креатинина и индикана. Остающиеся 5% N мочи приходятся на пигменты и неизвестные азотистые вещества.

Практическое значение исследования мочи обусловлено тем, что всякое изменение химических процессов в организме, сказываясь на продуктах расщепления, отражается и на составе мочи: меняется количественный состав ее, могут появиться патологические вещества, в нормальной моче не встречающиеся. Однако эти изменения не всегда могут быть обнаружены, так как моча не представляет собой жидкости строго постоянного состава, и небольшие изменения в химизме клеточного обмена могут лежать еще в пределах нормальных колебаний состава мочи. Исследование мочи как химическое, так и микроскопическое, имеет весьма важное значение при установлении диагноза заболевания, для суждения о характере его течения, имеет значение при разрешении вопросов диететики и т. п. Помимо чисто практического, исследование мочи имеет большое теоретическое значение, так как позволяет на основании изучения продуктов конечного превращения судить в некоторой мере о характере процессов, протекающих в организме, что является необходимым при изучении обмена веществ в организме.

Свойства мочи

1. Моча — легко подвижная жидкость более или менее интенсивного желтого цвета. Пена нормальной мочи белая, быстро исчезающая

при стоянии. В некоторых патологических случаях, например при содержании в моче белка, слизи, пена делается более стойкой, моча может стать вязкой. Нормальная окраска мочи обусловлена рядом пигментов типа урохрома, уробилина, копропорфирина, уроэритрина и др. Интенсивность окраски обычно меняется параллельно изменению удельного веса мочи от светложелтой до насыщенно-желтой; исключением является моча при сахарной болезни (бледная моча высокого уд. веса). При различных заболеваниях окраска мочи может меняться в зависимости от присутствия тех или иных пигментов (кровяных, желчных пигментов, уробилина, порфиринов, индиго и др.).

2. Суточное количество мочи в среднем равно $1\frac{1}{2}$ л. Удельный вес колеблется от 1,010 до 1,025. Определение удельного веса производят урометром (см. ареометр, стр. 115).

Всякий урометр калиброван для определенной, указанной на нем, т-ры. Если определение производят при иной т-ре, то вносят поправку: на каждые 3° выше указанной т-ры прибавляют по 0,001 к показанию урометра, на каждые 3° ниже—вычитают по 0,001. Так например, если удельный вес мочи при 21° , определенный при помощи урометра, калиброванного для 15° , оказался равным 1,017, то для 15° он равен $1,017 + 0,002 = 1,019$.

Количество мочи и ее удельный вес меняются в зависимости как от количества введенной в организм жидкости, так и от количества воды, выведенной из организма другими, помимо почек, путями (поты, поносы), причем обычно чем больше выделяется мочи, тем она более низкого удельного веса. Исключением является сахарная болезнь, при которой сильно повышается как количество, так и удельный вес мочи. При сморщенной почке выделяется больше, чем в норме, мочи низкого удельного веса. Количество мочи уменьшается и удельный вес ее возрастает при лихорадочных заболеваниях, при общем венозном застое.

3. Реакция мочи колеблется между рН 5 и 7. Моча плотоядных животных или находящихся на смешанной пище (человек) имеет кислую на лакмус реакцию, которая объясняется накоплением кислотных эквивалентов в результате окисления в организме серы и фосфора белков пищи до серной и фосфорной кислот, образующих кислореагирующие соли. Щелочная реакция мочи травоядных обусловлена содержанием в растительной пище солей органических кислот, переходящих в организме в щелочнореагирующие углекислые соли калия и натрия.

При стоянии реакция мочи делается щелочной вследствие перехода мочевины в углекислый аммоний под влиянием фермента уреазы, вырабатываемого микроорганизмами, попадающими в мочу. При катарах мочевого пузыря моча еще в пузыре может подвергаться щелочному брожению.

4. Кислая моча выделяется обычно прозрачной, и только через некоторое время в ней появляется полупрозрачное облачко (*nubesula*), состоящее из эпителиальных клеток, слизевых телец и мукоида, иногда с примесью кристаллов мочевого кислоты и щавелевокислого кальция.

Всякая щелочная моча мутна от осадка главным образом фосфатов щелочных земель, удерживающихся в кислой моче в виде однометалльных солей в растворе. В моче, богатой мочекислыми солями, при остывании выпадает кирпично-красный * осадок (*sedimentum lateritium*), состоящий главным образом из кислого мочекислового натрия.

5. Запах мочи своеобразный, напоминающий запах бульона. Подвергшаяся щелочному брожению, загнившая моча приобретает резкий, неприятный аммиачный запах и делается мутной от осадка солей и бактерий

6. Т-ра замерзания мочи колеблется от $-0,075$ до $-2,6^{\circ}$ и обычно лежит между $-1,3$ и $-2,3^{\circ}$.

ГЛАВНЫЕ НОРМАЛЬНЫЕ СОСТАВНЫЕ ЧАСТИ МОЧИ

1. НЕОРГАНИЧЕСКИЕ СОСТАВНЫЕ ЧАСТИ.

А. Анионы

1. Хлориды. Мочу подкисляют азотной кислотой и осаждают азотнокислым серебром, образуется белый творожистый осадок— AgCl .

В среднем за сутки выделяется около 15 г NaCl . Количество хлоридов в моче более или менее соответствует содержанию поваренной соли в пище. При некоторых лихорадочных заболеваниях (крупозная пневмония), при раке и других истощающих болезнях, при поражении почек, при образовании содержащих NaCl экссудатов (выпотов) наблюдается задержка хлоридов. Выведение хлоридов увеличивается по окончании лихорадки, при рассасывании экссудатов.

* Окраска обусловлена пигментом уроэритрином (трииндилметановая краска), производным триптофана.

2. Фосфаты. Фосфорная кислота в моче находится в соединении с кальцием и магнием и со щелочными металлами.

а) Мочу подщелачивают аммиаком, отфильтровывают образовавшийся осадок фосфатов кальция и магния, промывают осадок водой, растворяют на фильтре в разбавленной азотной кислоте и нагревают азотнокислый фильтрат с раствором молибденовокислого аммония, образуется желтый кристаллический осадок фосфомолибдата аммония (стр. 47).

б) В фильтрате от фосфатов щелочных земель добавлением магниальной смеси (стр. 47) открывают растворимые в воде фосфаты щелочных металлов.

В среднем за сутки выделяется с мочой около 2,5 г P_2O_5 . Это количество зависит от содержания в пище фосфатов и органических соединений фосфора (нуклеиновые кислоты, лецитины, нуклеоальбумины), превращающихся в организме главным образом в неорганические фосфаты.

3. Сульфаты. Сера в моче находится в форме: а) неорганических сульфатов, б) солей эфирсерных кислот, в) так называемой „нейтральной серы“ (цистин, тиоцианаты, сульфиды и др.).

а) Для открытия неорганических сульфатов к 40—50 см³ подкисленной соляной кислотой мочи прибавляют какой-либо растворимой соли бария до тех пор, пока еще образуется осадок $BaSO_4$ за счет солей неорганических сульфатов. Фильтруют.

б) В фильтрат проходят растворимые в воде бариевые соли эфирсерных кислот: соединений серной кислоты с фенолами ($C_6H_5 \cdot O \cdot SO_2OH$), индоксилем и др.

Для их открытия кислый фильтрат кипятят в течение 5—10 минут, причем снова появляется небольшой осадок $BaSO_4$ в результате гидролиза эфирсерных кислот с образованием свободной H_2SO_4 .

В среднем за сутки выделяется около 2,5 г сульфатов. Сульфаты образуются в организме главным образом в результате окисления серы белков. Количество выделяющихся с мочой сульфатов зависит поэтому от содержания белков в пище и колеблется параллельно с изменением количества азота составных частей мочи.

Количество солей эфирсерных кислот увеличивается при усилении гниения в кишечнике (образование фенолов), а также при отравлении фенолами. Эфирсерные кислоты являются соединениями менее ядовитыми, чем сами фенолы.

Б. Катионы

1. Кальций. К моче, подкисленной уксусной кислотой, прибавляют раствор $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ до прекращения образования осадка. Осадок щавелевокислого кальция отфильтровывают.

За сутки с мочой выделяется около 0,3—0,4 г СаО. Большая часть известковых и магниальных солей удаляется из организма не почками, а кишечником.

2. Магний. Фильтрат от щавелевокислого кальция подщелачивают аммиаком. При стоянии образуется небольшой кристаллический осадок— $\text{Mg}(\text{NH}_4)\text{PO}_4$.

За сутки с мочой выделяется около 0,1—0,2 г MgO.

3. Натрий. 100 см³ мочи выпаривают досуха в небольшой фарфоровой чашке, остаток обугливают, прокаливают до полного удаления аммиачных солей (прекращение дымления и исчезновение запаха), извлекают 5 см³ горячей воды и фильтруют (часть фильтрата сохраняют для открытия калия). Натрий открывают:

а) по желтому окрашиванию пламени при внесении капли раствора на прокаленной платиновой проволоке* в бесцветное пламя горелки; при рассматривании в спектроскопе видна яркая линия, соответствующая фраунгоферовой линии D;

б) по образованию кристаллического осадка— $\text{NaH}_2\text{SbO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ по добавлении свежеприготовленного раствора так наз. пиросурьмянокислого калия**.

Натрия (Na_2O) выделяется с мочой за сутки 4—7 г.

4. Калий. В профильтрованной водной вытяжке (см. натрий) открывают калий:

а) по окрашиванию пламени в розово-фиолетовый цвет (при рассматривании через кобальтовое стекло). При рассматривании в спектроскопе видны светлые линии в красной части спектра возле А и в фиолетовой части;

б) по образованию белого кристаллического осадка кислого виннокаменнокислого калия по добавлении концентрированного раствора виннокаменной кислоты (2 объема раствора виннока-

* Вместо платиновой проволоки можно брать фильтровальную бумажку, обильно смоченную испытуемой жидкостью; обращают внимание лишь на окраску, появляющуюся в первый момент по внесении бумажки в пламя, т. е. пока бумажка сохраняется еще влажной и не горит.

** Реакция испытуемой жидкости должна быть нейтральной. Появление осадка ускоряется встряхиванием жидкости и потиранием палочкой,

менной кислоты на 1 объем испытуемой жидкости) при потирании жидкости палочкой.

Количество выделенного за сутки с мочой калия соответствует 2—4 г K_2O .

5. Аммонийные соли. В пробирку наливают через воронку мочу, затем известковое молоко* и закрывают отверстие пробирки пробкой с укрепленной влажной красной лакмусовой бумажкой. Через некоторое время бумажка синее в результате выделения аммиака.

На долю аммонийных солей приходится примерно 4—5% общего количества азота мочи (соответствует 0,6—1,2 г NH_3 за сутки). По количеству выделенных аммиачных солей можно судить о размерах образования кислот в организме. Аммиак образуется главным образом при дезаминировании аминокислот и аминопуринов, и часть его идет на нейтрализацию кислот, образующихся в организме (также и введенных извне), большая же часть—на синтез мочевины.

2. ОРГАНИЧЕСКИЕ СОСТАВНЫЕ ЧАСТИ МОЧИ

Мочевина

Мочевина ($H_2N \cdot CO \cdot NH_2$)—главная составная часть мочи—представляет легко растворимые в воде и горячем спирте, нерастворимые в эфире кристаллы, имеющие форму 4-сторонних призм с тупыми пирамидами на концах; нейтральна на лакмус; дает трудно растворимые соли с азотной кислотой, со щавелевой кислотой.

За сутки выделяется около 30 г мочевины, что составляет 85—93% общего количества азота мочи. Количество мочевины стоит в зависимости от содержания белков в пище, так как мочевина является конечным продуктом превращения белков в организме**. В соответствии с этим выделение мочевины с мочой увеличивается при усилении распада белков в организме (при лихорадочных состояниях, при диабете и др.).

* Применять едкие щелочи, равно как и нагревать с более слабыми основаниями в данном случае нельзя, так как это вызвало бы частичное превращение мочевины в углекислый аммоний.

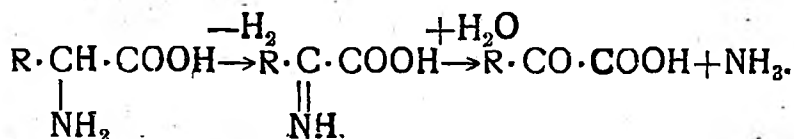
** Около 90% N введенных в организм человека белков выделяется при нормальных условиях с мочой в виде мочевины. Последняя синтезируется из аммиака и угольной кислоты. Источником образования аммиака являются аминокислоты, азотистые основания фосфатидов и цереброзидов, пуриновые и пиримидиновые основания, производные пиррола (кровяные пигменты, хлорофил)

Выделение мочевины из мочи

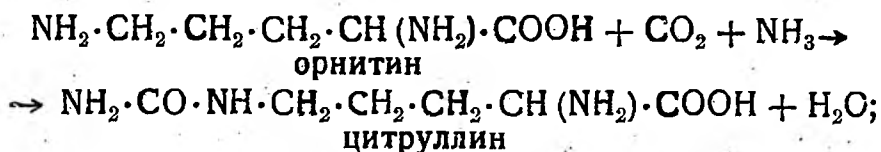
100 см³ мочи выпаривают в чашке на водяной бане до консистенции сиропа, извлекают горячим спиртом и фильтруют. К охлажденной, поставленной в холодную воду, вытяжке приливают при помешивании крепкую HNO₃, разбавленную половинным объемом воды, пока еще заметно выделение кристаллов азотнокислой мочевины. Для получения свободной мочевины кристаллы через несколько часов отфильтровывают, отжимают между листами фильтровальной бумаги, переносят в чашку и, добавив спирта, разлагают при нагревании на водяной бане избытком BaCO₃ [2NH₂·CO·NH₂·HNO₃ + BaCO₃ = 2NH₂·CO·NH₂ + Ba(NO₃)₂ + CO₂ + H₂O]. Прибавляют для обесцвечивания немного животного угля и выпаривают жидкость на водяной бане досуха. Остаток извлекают спиртом. Вытяжку, содержащую мочевину, фильтруют и сгущают выпариванием на водяной бане. Образуются длинные игольчатые кристаллы мочевины.

Небольшое количество мочевины растворяют при нагревании в спирте, помещают каплю раствора на предметное стекло и наблюдают форму выделившихся кристаллов (табл. 1, рис. 6,а).

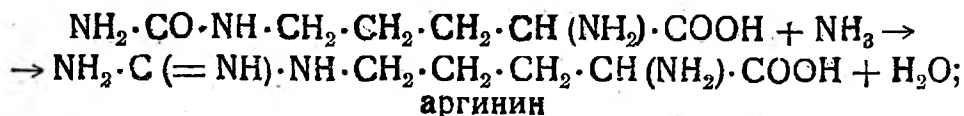
Дезаминирование аминокислот обычно протекает окислительным путем по схеме



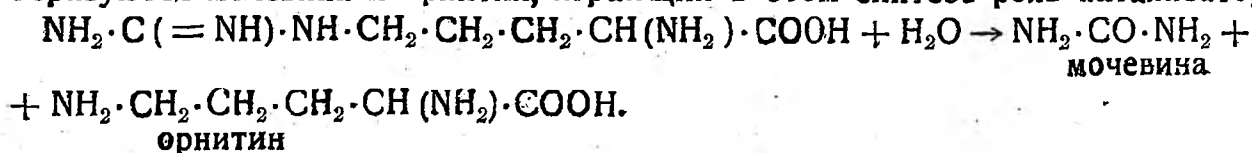
Мочевина образуется, по видимому, следующим путем: угольная кислота и аммиак присоединяются к δ-аминогруппе орнитина с отщеплением 1 молекулы воды и образованием цитруллина:



затем к цитруллину присоединяется с отщеплением воды еще одна молекула аммиака и получается аргинин



из аргинина при гидролитическом его расщеплении под влиянием аргиназы образуются мочевина и орнитин, играющий в этом синтезе роль катализатора:



. Определение т-ры плавления мочевины, перекристаллизованной из спирта и высушенной при комнатной т-ре в эксикаторе над серной кислотой, производится, как описано в гл. X. Вещество плавится при 130—132°.

Следующие реакции производят с чистой сухой мочевиной:

1. Получение кристаллов азотнокислой мочевины.

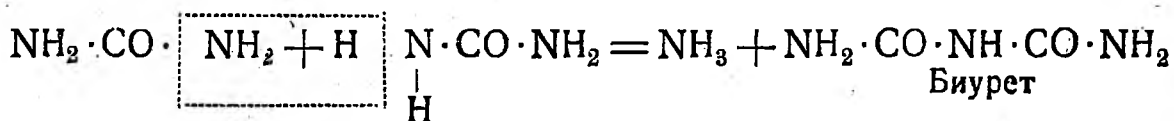
Несколько кристаллов мочевины растворяют на предметном стекле в капле воды и смешивают с каплей крепкой HNO_3 ; выделяются микроскопические кристаллы азотнокислой мочевины— $\text{NH}_2 \cdot \text{CO} \cdot \text{NH}_2 \cdot \text{HNO}_3$, имеющие вид тонких ромбоидальных или неправильной формы шестиугольных табличек, большей частью собранных в кучи (табл. I, рис. 6b).

2. Кристаллы щавелевокислой мочевины

Несколько кристаллов мочевины растворяют на предметном стекле в капле воды и смешивают с каплей насыщенного раствора щавелевой кислоты. Образуются микроскопические кристаллы щавелевокислой мочевины— $(\text{NH}_2 \cdot \text{CO} \cdot \text{NH}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$, имеющие форму коротких кососрезанных призм, пирамид и толстых ромбоидальных табличек (табл. I, рис. 6,с).

3. Биуретовая проба.

Несколько кристаллов мочевины помещают в сухую пробирку и нагревают на маленьком пламени. Мочевина плавится. Нагревание продолжают до начала затвердевания расплавленной массы. При этом происходит выделение аммиака, который можно узнать по запаху и по посинению влажной красной лакмусовой бумажки, и из мочевины образуется биурет:



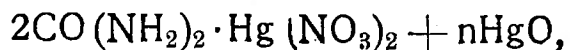
и отчасти циануровая кислота: $3\text{CO}(\text{NH}_2)_2 = \text{C}_3\text{H}_3\text{O}_3\text{N}_3 + 3\text{NH}_3$.

Выше места нагрева на холодных частях пробирки образуется белый возгон циановокислого аммония— $\text{NH}_4 \cdot \text{CNO}$. По охлаждении остаток растворяют в разбавленном едком натре и смешивают с 1—2 каплями очень разбавленного раствора CuSO_4 . Появляется розовое или красное окрашивание (ср. стр. 18).

4. Осаждение азотнокислой окисью ртути

К разбавленному водному раствору мочевины прибавляют 1%

раствор $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$. Образуется белый осадок переменного в зависимости от условий осаждения состава

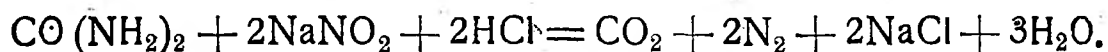


где n может быть 1, 2 или 3.

5. Разложение бромноватистой щелочью — см. гл. XIV.

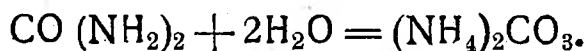
6. Разложение азотистой кислотой

Раствор мочевины смешивают с раствором азотистокислого натрия или калия и подкисляют соляной кислотой; происходит выделение бесцветных пузырьков газа:



7. Действие уреазы

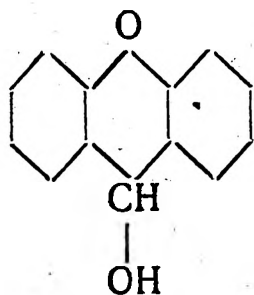
Под влиянием уреазы, фермента, находящегося в некоторых бактериях, а также бобах сои*, мочевины переходит в углекислый аммоний:



К раствору мочевины прибавляют растертых бобов сои и каплю раствора фенолфталеина. Вскоре наступает покраснение жидкости вследствие образования углекислого аммония.

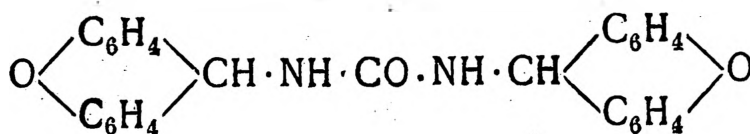
Действие, подобное уреазе, оказывают на мочевины едкие щелочи.

8. Осаждение ксантгидролом



Ксантгидрол

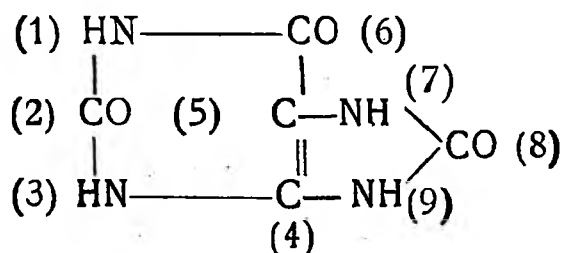
Мочевина количественно осаждается из уксуснокислых растворов 10% спиртовым раствором ксантгидрола в виде кристаллической, весьма устойчивой в отношении горячих щелочей диксантилмочевины:



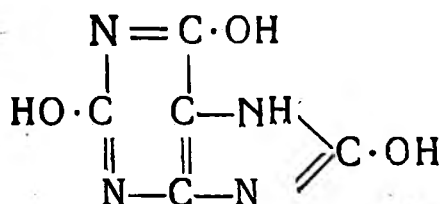
* Найдена также в стенке желудка.

Мочевая кислота

Мочевая кислота — $C_5H_4N_4O_3$ (2, 6, 8-триоксипурин) может быть в двух таутомерных формах: оксоформе



и оксиформе



и является слабой двуосновной кислотой. Мочевая кислота очень трудно растворима в холодной воде (1:39 500 при 18°), трудно — в кипящей (1:1 600), легче в сыворотке крови*, нерастворима в спирте и эфире. Легко растворяется, особенно при нагревании, в едких и углекислых щелочах, во многих органических основаниях, в концентрированной H_2SO_4 (выделяется из нее при разбавлении водой). Средние соли мочевой кислоты и щелочных металлов ($Na_2C_5H_2N_4O_3$) легко растворимы в воде, кислые соли ($NaC_5H_3N_4O_3$) растворимы труднее, в особенности кислый мочекислый аммоний; в организме никогда не встречаются средние соли мочевой кислоты, а только кислые или же свободная мочевая кислота. Чистая мочевая кислота представляет собой бесцветный, под микроскопом кристаллический порошок.

В моче человека и большинства позвоночных мочевая кислота содержится в небольших количествах. У человека в среднем выделяется за сутки 0,5 г мочевой кислоты, что соответствует 1—3% всего количества азота мочи, тогда как у птиц, чешуйчатых амфибий и беспозвоночных выделяется в больших количествах, заменяя у них мочевины. Мочевая кислота является главным продуктом пуринового обмена в организме человека. Количество мочевой кислоты, выделенной с мочой, колеблется в зависимости от количества пуринов в пище и в самом организме. Помимо мочевой кислоты с мочой человека за сутки выделяется 0,15—0,2 г N в форме пуриновых оснований.

* В отношении растворимости мочевой кислоты очень большое значение имеют концентрация ионов водорода и присутствие коллоидных веществ (защитное действие, стр. 17).

Содержащиеся в нуклеопротеидах клеточных ядер пуриновые основания подвергаются в организме дезаминированию и окислению в мочевую кислоту. С несомненностью установлено, что животный организм способен также синтезировать пуриновые основания. Помимо образования мочевой кислоты в организме млекопитающих происходит и ее расщепление до аллантаина* или мочевины. При кормлении пищей, богатой готовыми пуринами или клеточными ядрами, при лихорадочных состояниях, при лейкемии повышается образование и выведение мочевой кислоты. У детей мочевой кислоты выделяется относительно больше, чем у взрослых. Мочевая кислота часто входит в состав мочевых сростков и является главной составной частью подагрических отложений (в форме кристаллов кислого мочекислового натрия)**.

Выделение из мочи

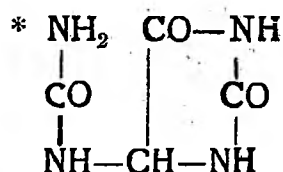
100 см³ мочи (не содержащей белка) смешивают с 5 см³ концентрированной HCl и оставляют на сутки. На дне и по стенкам сосуда образуются краснобурые кристаллы, часто плавающие и на поверхности жидкости. Осадок отфильтровывают и исследуют под микроскопом в капле воды. Кристаллы окрашены пигментами мочи в желтокрасный или песочный цвет и имеют весьма разнообразную форму; преобладают ромбоидальные формы, точильные бруски (табл. I, рис. 4).

Приводимые ниже реакции производят с чистой, растертой в порошок мочевой кислотой.

1. Растворимость мочевой кислоты и ее солей

а) Мочевую кислоту нагревают с избытком дистиллированной воды, причем не происходит заметного растворения. По добавлении едкой щелочи мутная жидкость просветляется вследствие перехода мочевой кислоты в ее щелочную соль.

б) Мочевую кислоту растворяют в концентрированной H₂SO₄, нагревая в водяной бане до 40°, остужают и вливают в избыток воды (20 объемов). Мочевая кислота выделяется в виде микроскопических ромбоидальных кристаллов.



** При подагре содержание мочевой кислоты в моче невелико, несмотря на повышенное ее содержание в крови.

в) Наблюдают под микроскопом растворение мочево́й кислоты при введении под покровное стекло едкой щелочи.

г) Кислый моче́кислый аммоний — $\text{NH}_4\text{HC}_5\text{H}_2\text{N}_4\text{O}_8$. Мочевую кислоту растворяют в малом количестве NaOH , фильтруют, если не все растворилось, и смешивают с избытком крепкого раствора NH_4Cl ; образуется белый осадок кислого моче́кислого аммония.

Это соединение, ввиду его трудной растворимости, довольно часто встречается в осадках мочи, в мочевых камнях и служит для выделения мочево́й кислоты при количественном ее определении (стр. 222).

2. Восстановительные свойства мочево́й кислоты

а) К раствору мочево́й кислоты в едком натре прибавляют несколько капель раствора CuSO_4 . Образуется грязнозеленый осадок моче́кислой окиси меди, который при стоянии (быстрее при нагревании) переходит в белый осадок моче́кислой закиси меди.

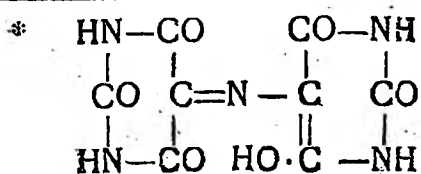
При этом часть мочево́й кислоты окисляется и восстанавливает гидрат окиси меди в гидрат закиси меди, который с неизменной мочево́й кислотой дает белый осадок моче́кислой закиси меди.

б) К разбавленному раствору мочево́й кислоты в едком натре прибавляют по каплям раствор CuSO_4 до образования голубой мути гидрата окиси меди. При кипячении происходит образование красного осадка закиси меди.

Вследствие содержания в моче мочево́й кислоты при производстве с мочой пробы Троммера (см. реакции на сахар в моче) не следует кипятить жидкость, а только нагревать до начала кипения.

3. Мурексидная проба

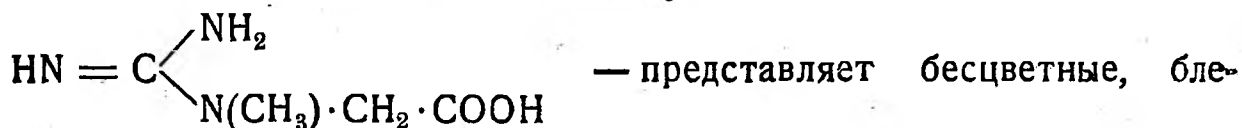
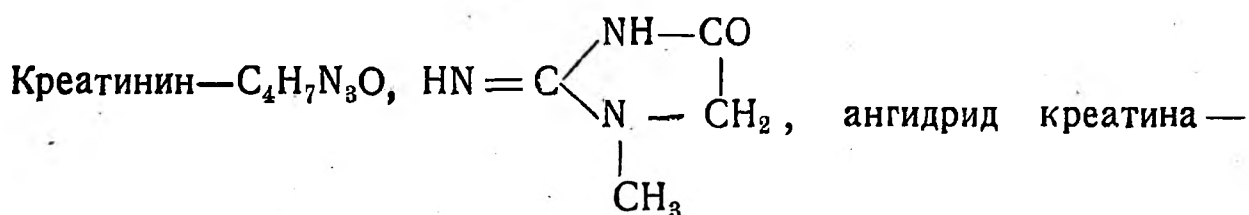
К очень небольшому количеству сухой мочево́й кислоты на фарфоровой крышечке или чашке прибавляют 1—2 капли концентрированной HNO_3 и затем осторожно выпаривают до суха на голом огне, держа крышечку пальцами и сдувая образующиеся пары низших окислов азота. Если коричневокрасный остаток, содержащий продукты окисления и гидратации мочево́й кислоты, смочить по остывании аммиаком, то получается красивое пурпурно-красное окрашивание вследствие образования мурексида—аммонийной соли пурпурной кислоты*. Если вместо аммиака



смочить остаток едким натром или кали, то получается синефиолетовое окрашивание.

Этой реакцией пользуются для открытия мочевої кислоты в мочевых камнях. Названа она мурексидной потому, что получающаяся при ней окраска напоминает пурпур древних, который они добывали из улиток *Murex brandaris*. Продукты, получающиеся из мочевої кислоты под влиянием нагревания с азотной кислотой, тождественны с продуктами окисления мочевої кислоты в организме.

Креатинин



Креатинин обладает слабыми восстановительными свойствами, имеет очень слабо щелочную или нейтральную реакцию на лакмус, но ведет себя как сильное основание: вытесняет аммиак из его солей, дает с кислотами хорошо кристаллизующиеся соли, например довольно трудно растворимую в воде пикриновокислую соль. Под влиянием щелочей частично переходит в креатин.

Креатинин является постоянной составной частью мышц и мочи человека и некоторых млекопитающих. За сутки выделяются около 1,3—2 г креатинина, что соответствует 2,5—6,0% всего азота мочи. Количество выведенного с мочой креатинина зависит от интенсивности процессов распада белков протоплазмы. Помимо этого эндогенного креатинина в моче содержится креатинин экзогенный—из мясной пищи. Количество эндогенного креатинина повышается при лихорадочных состояниях, в период инволюции матки.

Креатинин образуется в организме отчасти из креатина. Источником образования последнего по видимому могут являться аргинин, гистидин, пуриновые основания, холин. Выделение креатина с мочой наблюдается при беременности, в послеродовом периоде, при сахарном диабете, при кахектических состояниях.

При выпаривании растворов креатина досуха (сначала на голом огне, потом на водяной бане) с равным объемом $n-HCl$ креатин количественно переходит в креатинин.

Для открытия креатинина в моче пользуются следующими реакциями:

1. Реакция Вейля (Weyl). Мочу смешивают с несколькими каплями свежеприготовленного разбавленного раствора нитропруссиды натрия $[\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$ и подщелачивают, прибавляя по каплям разбавленный раствор едкого натра; жидкость приобретает красную окраску, вскоре переходящую в желтую*. При этой реакции образуется изонитрозокреатинин.

2. Реакция Яффэ (Jaffé). Мочу смешивают с несколькими каплями насыщенного водного раствора пикриновой кислоты и подщелачивают едким натром; появляется оранжевая или оранжево-красная окраска, обусловленная образованием красного таутомера пикрата креатинина.

Выделение креатинина из мочи по Бенедикту (Benedict)

К 10 литрам свежей не щелочной мочи прибавляют при энергичном помешивании раствор 180 г пикриновой кислоты в 450 см³ горячего алкоголя. На следующий день сливают отстоявшуюся жидкость, а осадок отсасывают на бухнеровской воронке и промывают 1—2 раза насыщенным на холоду водным раствором пикриновой кислоты. По возможности досуха отсосанный осадок тщательно растирают в ступке с концентрированной соляной кислотой (60 см³ соляной кислоты на 100 г пикрата), жидкость отсасывают и остаток промывают 2 раза небольшими количествами воды. Фильтрат в большой колбе нейтрализуют на лакмус добавлением малыми порциями избытка жженой магнезии (колбу все время охлаждают под водопроводным краном), снова отсасывают и промывают остаток 2 раза водой. Фильтрат тотчас же сильно подкисляют несколькими куб. сантиметрами ледяной уксусной кислоты, не обращая внимания на образующийся осадок, разбавляют четверным объемом 95% спирта и отсасывают через 20—25 минут. К полученному фильтрату прибавляют 30—40 см³ 30% раствора хлористого цинка, перемешивают и оставляют на ночь в холодном месте. Отстоявшуюся жидкость сливают, осадок хлорцинккреатинина $(\text{C}_4\text{H}_7\text{N}_3\text{O})_2\text{ZnCl}_2$ отсасывают и промывают 1 раз водой, а затем несколько раз 50% под конец 95% спиртом и высушивают. Выход 15—18 г.

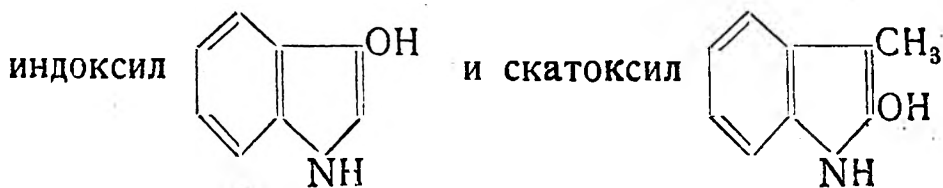
* В отличие от реакции на ацетон (см. ниже) подкисление уксусной кислотой красной жидкости лишь ускоряет приобретение ею желтой окраски.

Для перекристаллизации 10 г хлорцинккреатинина кипятят со 100 см³ воды и 60 см³ п-серной кислоты до полного растворения осадка, прибавляют около 4 г чистого животного угля, кипятят еще 1 минуту и повторно отсасывают через один и тот же маленький фильтр, пока жидкость станет бесцветной; остаток на фильтре промывают горячей водой. К фильтрату прибавляют 3 см³ концентрированного раствора хлористого цинка и раствор 7 г уксусного калия в небольшом количестве воды. Через 10 минут прибавляют равный объем алкоголя, оставляют на несколько часов в прохладном месте и отсасывают выделившиеся кристаллы. Для удаления примеси сернокислого калия хлорцинккреатинин смешивают с двойным по весу количеством воды, отфильтровывают, промывают небольшим количеством воды и затем алкоголя. Выход 8,5—9 г чистого хлорцинккреатинина.

Для выделения свободного креатинина хлорцинккреатинин растирают в порошок, смешивают в сухой склянке с 7-кратным количеством концентрированного водного раствора аммиака, растворяют при слабом нагревании и осторожном помешивании (чтобы потеря аммиака была по возможности малой) и плотно закрыв склянку оставляют на несколько часов на льду. Выделяются кристаллы чистого креатинина. Выход—60—80% теории. Если кристаллы имеют желтоватую окраску, их снова перекристаллизовывают из кипящего алкоголя или из 5-кратного количества концентрированного аммиака, в котором вещество растворяют при слабом нагревании.

Фенолы

Фенолы, ароматические соединения, содержащие один или несколько гидроксильных заместителей в ядре, образуются в организме при гниении белков в кишечнике, при распаде злокачественных опухолей, при обширных нагноениях. Фенолы—сильные яды; они обезвреживаются в организме, главным образом в печени и в небольших размерах также в почках и в легких, путем образования эфирсерных кислот и парных соединений с глюкуроновой кислотой (см. ниже), в виде которых они и выводятся с мочой. Свободных фенолов в моче не содержится, или содержатся ничтожные следы. Среди соединений фенольного характера, входящих в состав эфирсерных и парных глюкуроновых кислот найдены: фенол C_6H_5OH , р-крезол $CH_3 \cdot C_6H_4 \cdot OH$, пирокатехин (о-диоксибензол) $C_6H_4(OH)_2$, гидрохинон (р-диоксибензол),

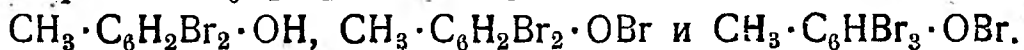


С мочой человека за сутки выводится в среднем 45 мг одноатомных фенолов, входящих в состав парных соединений; из них большая часть (около 58%) приходится на долю р-крезола, самого фенола содержится меньше. Из двухатомных фенолов найдены лишь следы пирокатехина, а гидрохинон встречается лишь в случаях отравления карболовой кислотой. У травоядных животных, в связи с большей интенсивностью процессов гниения в кишечнике, содержание парных соединений фенолов в моче значительно выше, чем у плотоядных.

Для открытия одноатомных фенолов в моче проводят гидролитическое расщепление парных соединений и отгоняют образующиеся одноатомные фенолы, пользуясь их летучестью с водяным паром.

200 см³ мочи (лучше лошадиной) смешивают с 50 см³ крепкой соляной кислоты и перегоняют из колбы на 500 см³, снабженной нисходящим холодильником, 50—70 см³ жидкости. Перегон, кислый от присутствия летучих жирных кислот мочи и перегнавшейся соляной кислоты, подщелачивают содой и перегоняют еще раз из маленькой колбы, собирая только первые 3—4 см³ жидкости. С этим перегоном проделывают следующие реакции:

1. При добавлении к 1 см³ перегона бромной воды появляется молочная муть или осадок, зависящие от образования бромтрибромфенола $C_6H_2Br_3 \cdot OBr$ и производных крезоло:



2. При нагревании 1 см³ перегона с небольшим количеством реактива Миллона (стр. 17) наблюдается красное окрашивание жидкости.

3. 1 см³ перегона смешивают с 2—3 каплями разбавленного раствора хлорного железа, не содержащего свободной соляной кислоты, получается окрашивание жидкости в фиолетовый или синий цвет.

Эта проба мало чувствительна. Наличие свободных кислот, алкоголя, избытка хлорного железа мешает реакции.

4. При повышенном содержании парных фенольных соединений в моче для открытия фенолов можно воспользоваться реакцией Зальковского, не требующей предварительной перегонки.

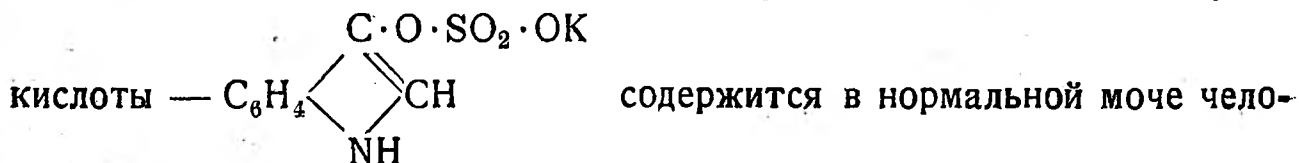
Мочу кипятят в пробирке с небольшим количеством концентрированной азотной кислоты, причем появляется запах горьких миндалей вследствие образования ортонитрофенола. Жидкости дают охладиться и делят на 2 части:

а) к одной части прибавляют бромную воду—образуется более или менее сильная муть, или выпадает осадок трибромнитрофенола. В качестве контроля эту пробу проделывают с нормальной мочой—жидкость остается прозрачной или появляется ничтожная муть;

б) другую часть жидкости подщелачивают едким натром—появляется оранжевое окрашивание, обусловленное образованием натриевой соли нитрофенола.

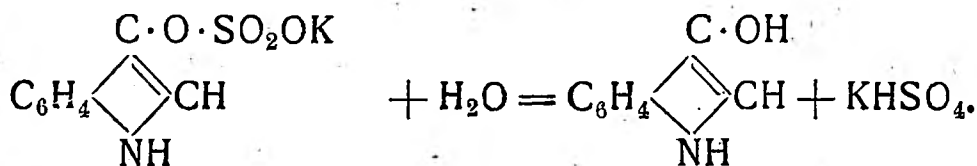
Индикан

Животный индикан—калиевая или натриевая соль индоксил-серной

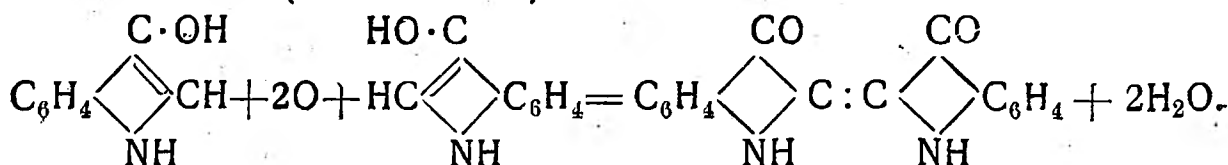


в незначительных количествах (0,005—0,02 г за сутки). Количество индикана увеличивается при усилении процессов гниения в организме: при запорах, при непроходимости кишечника, распаде злокачественных опухолей, обширных нагноениях и т. п.

Реакция на индикан. Мочу смешивают с равным объемом дымящейся соляной кислоты, чем достигают гидролитического расщепления индикана с образованием индоксила



Прибавляют 1—2 капли разбавленного раствора $FeCl_3$ и хорошо взбалтывают 1—2 минуты. Хлорное железо окисляет индоксил в индиготин (синее индиго):



Затем к жидкости прибавляют 2—3 см³ хлороформа и несколько раз перепрокидывают пробирку, закрыв отверстие пальцем. Индиготин легко растворим в хлороформе и окрашивает его в синий цвет.

По интенсивности окраски хлороформного слоя можно приблизительно судить о количественном содержании индикана.

II. ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ СОСТАВНЫЕ ЧАСТИ МОЧИ

1. Белки

Следы белка содержатся и в нормальной моче, но обычными, приведенными ниже, реакциями не открываются, так как в моче присутствуют вещества (главным образом минеральные соли), уменьшающие чувствительность реакций на белок. При патологических условиях (воспалении почек, расстройствах сердечной деятельности и мн. др.), довольно часто при беременности, содержание белка в моче увеличивается, и он начинает открываться обычными реакциями (альбуминурия). Различают истинную альбуминурию, при которой почка пропускает мочу, уже содержащую белок, и случайную, когда почки выделяют нормальную мочу, но затем в нее попадают примеси, содержащие белки (кровь, гной, семя, лимфа и др.). Белок, встречающийся при истинной альбуминурии, является почти всегда смесью глобулинов и альбуминов кровяной плазмы (в различных соотношениях) и белков самой почки. Количество белка в моче обычно не превышает 1%, очень редко доходит до 4%; однако наблюдались случаи содержания в моче 8% белка.

Открытие белка в моче

Мочу фильтруют, так как она должна быть прозрачной, ибо малейшая муть при пробе на белок указывает уже на ненормально повышенное содержание белка.

1. Свертывание при кипячении (ср. стр. 10)

а) Мочу, кислую на лакмус, прямо кипятят, мочу щелочную предварительно очень слабо подкисляют 1% уксусной кислотой. В присутствии белка образуется при кипячении осадок или муть, не растворяющиеся, если к жидкости прибавить 3—5 капель 10% уксусной кислоты и прокипятить (отличие от фосфатов и карбонатов щелочных земель, которые также могут выпасть при кипячении в слабокислой среде, но растворяются при достаточно сильном подкислении).

б) К моче прибавляют $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{3}$ объема насыщенного раствора поваренной соли, подкисляют несколькими каплями 10% уксусной кислоты и кипятят. В присутствии белка образуется белый хлопчатый осадок или муть.

Эту реакцию производят главным образом в моче с низким удельным весом.

в) Пробу при кипячении с азотной кислотой производят, как описано в гл. 1, стр. 11.

2. Проба Хеллера (Heller)

Мочу осторожно наливают по стенке на концентрированную азотную кислоту. В присутствии белка на границе обеих жидкостей образуется белый аморфный осадок (так наз. белочное кольцо) или муть. В случае нормальной мочи на границе появляется красное кольцо в результате изменения мочевых пигментов под влиянием азотной кислоты.

Иногда мутное кольцо появляется выше границы; такое явление может зависеть от выпадения осадков кислых мочеислых солей, или так наз. муцина мочи. В случае концентрированной мочи, богатой мочевиной, на границе двух жидкостей может образоваться кристаллический осадок азотнокислой мочевины; его образование может быть предотвращено предварительным разбавлением мочи водой. Осадок при пробе Хеллера дают и альбумозы (стр. 141), а также смоляные кислоты, которые могут появляться в моче при употреблении смолистых лекарственных веществ (копайский бальзам и др.). Для отличия белков от альбумоз служат реакции при кипячении, которых альбумозы не дают. Для отличия от смоляных кислот применяют сульфосалициловую кислоту, которая смоляных кислот не осаждает, или извлекают осадок спиртом или эфиром: смоляные кислоты в отличие от белков растворимы в спирте и эфире.

3. Осаждение сульфосалициловой кислотой см. стр. 16.

Для доказательства присутствия белка необходимо проделать несколько реакций, из них хотя бы одну при нагревании. Цветные реакции на белки непосредственно в моче неприменимы, но могут быть проделаны с отфильтрованным осадком свернувшихся белков.

Чувствительность реакций на белок в моче

Проба кипячением с уксусной кислотой открывает 1 часть белка в 100 000 частей мочи, проба Хеллера—1 : 40 000, сульфосалициловая кислота—1 : 130 000. Чувствительность этих реакций колеблется в зависимости от состава мочи (главным образом от минеральных солей).

Освобождение патологической мочи от белка

100 см³ мочи кипятят в чашке на голом огне (мочу нейтральную или щелочную предварительно очень слабо подкисляют на лакмус 1% уксусной кислотой). Если хорошего свертывания белка не происходит, прибавляют еще каплю (или несколько капель, если это нужно) кислоты. Жидкость кипятят еще некоторое время, фильтруют через маленький фильтр в мерительный цилиндр, промывают чашку и фильтр малыми порциями воды, пока объем остывшего фильтрата не будет равен 100 см³. Чтобы убедиться в полном удалении белка, с фильтратом проделывают пробу Хеллера (см. выше).

2. Альбумозы

Открытие альбумоз в моче в присутствии белков.

Мочу насыщают порошком сернокислого аммония [8 частей (NH₄)₂SO₄ на 10 частей мочи] и нагревают до кипения. Осадок, состоящий из альбумоз и свернувшихся белков, отфильтровывают и извлекают сначала спиртом для удаления уробилина, который подобно альбумозам дает биуретовую реакцию, а затем кипящей водой, растворяющей альбумозы. С водной вытяжкой (фильтровать горячей!) производят биуретовую пробу так, как она была описана для пептонов (стр. 141), ксантопротеиновую и миллонову реакции (стр. 17).

Альбумозы могут появляться в моче или входя в состав примешанного к моче семени или как продукт аутолиза (стр. 51): при инволюции матки, обширных нагноениях, ожогах, острых инфекциях, отравлении фосфором, лейкемии, острых психических заболеваниях.

3. „Нуклеоальбумин“ и „муцин“ мочи

Эти вещества могут обусловить появление опализации, мути или осадка при подкислении уксусной кислотой нормальной мочи, содержащей хондроитиносерную (стр. 126) и нуклеиновые (стр. 44) кислоты. Соли мочи препятствуют осаждению.

Если подобный осадок образуется, его следует удалить перед исследованием мочи на белок.

Мочу разбавляют водой до удельного веса 1,007—1,008, смешивают с 4—5 каплями насыщенного раствора NaCl, подкисляют уксусной кислотой и оставляют в прохладном месте до следующего дня. Прозрачную жидкость сливают или отфильтровывают (если нужно, центрифугируют).

4. Кровяные пигменты

Кровяные пигменты появляются в моче или в результате повреждения кровеносных сосудов на протяжении мочевых или половых путей (гематурия), или в результате перехода кровяных пигментов в плазму крови (гемоглобинурия). При гематурии моча бывает окрашена в красный или буро-красный цвет и содержит эритроциты. При гемоглобинурии моча большей частью имеет бурый или буро-черный цвет, так как обычно содержит метгемоглобин. Гемоглобинурия наблюдается при обширных ожогах, при солнечном ударе, при тяжелых инфекциях, при некоторых отравлениях (бертолетовой солью, нитробензолом, анилином, амилнитритом и др.). В редких случаях наблюдается так наз. пароксизмальная гемоглобинурия, наступающая периодически, приступами, главным образом при охлаждении тела*. Если в моче кровяных пигментов мало, то зависящую от них окраску можно не заметить.

Так как кровяные пигменты вещества белкового характера, то в моче, содержащей кровяные пигменты, всегда обнаруживается и белок.

Открытие кровяных пигментов в моче

1. Гваяковая проба

К смеси, состоящей из 3 см³ гваяковой настойки** и 2 см³ 3% перекиси водорода, в пробирке осторожно из пипетки прибавляют 1 см³ предварительно прокипяченной*** и затем остуженной не фильтрованной мочи (щелочную мочу сначала слабо подкисляют уксусной кислотой). В присутствии крови или кровяного пигмента опускающаяся на дно моча оказывается окрашенной в синий цвет, причем в случае малого содержания крови окраска после взбалтывания перестает быть заметной.

2. Спектроскопическое исследование (стр. 103).

а) Этот метод очень чувствителен, если собственная окраска мочи позволяет спектроскопировать слой толщиной в 1—2 см.

Спектр поглощения O-Hb—см. гл. IX и таблицу спектров.

Спектр поглощения M-Hb—см. гл. IX и таблицу спектров.

б) Так как полосы поглощения в спектре M-Hb слабы, то,

* При пароксизмальной гемоглобинурии в крови больных были найдены вещества, способные разрушать эритроциты только на холоду, но не при т-ре тела.

** Немного растертой в порошок гваяковой смолы (сохранять в темноте!) смешивают в пробирке с 3—5 см³ спирта и через 1 минуту сливают или отфильтровывают прозрачную жидкость.

*** Кипячение уничтожает способность гнойных телец давать гваяковую пробу.

чтобы получить более резкую картину, часто переводят М-Нб в О-Нб; восстанавливают М-Нб сернистым аммонием до Нб и затем, взбалтывая жидкость с воздухом, переводят Нб в О-Нб.

в) Получение спектра гемохромогена. К 100 см³ мочи прибавляют немного белка, кипятят, отфильтровывают сверток белка, промывают водой, отжимают между листами фильтровальной бумаги и растирают со спиртом, подкисленным серной кислотой. Смесь нагревают, фильтруют, прибавляют к фильтрату едкого натра и сернистого аммония и исследуют в спектроскопе на гемохромоген (см. гл. IX и таблицу спектров).

Эта проба очень чувствительна.

3. Проба Хеллера.

Мочу подщелачивают едким натром и кипятят. Осадок фосфатов щелочных земель захватывает гематин и гемохромоген (образуется из гематина под влиянием редуцирующих веществ мочи) и оказывается по отстаиванию окрашенным в красный или бурый цвет.

Помимо кровяных пигментов темное окрашивание осадка фосфатов могут вызывать и другие пигменты, а также сахар (проба Мура-стр. 70).

4. Микроскопическое исследование

Мочу центрифугируют и исследуют осадок под микроскопом на содержание в нем эритроцитов и остатков их стромы (гематурия).

5. Желчные пигменты

Желчные пигменты появляются в моче при желтухе. Желтушная моча имеет более или менее интенсивный шафранно-желтый или бурозеленый цвет и желтую пену.

Реакции на желчные пигменты в моче

1. Проба Гмелина. Мочу осторожно наливают по стенке на концентрированную азотную кислоту так, чтобы обе жидкости не смешались: в месте их соприкосновения образуется ряд цветных колец. Характерным для желчных пигментов является образование верхнего зеленого кольца и одновременно с ним синего или фиолетового. Ниже расположенные желтое и красное кольца получаются и с нормальной мочой. Одно зеленое кольцо, без сопровождения синего или фиолетового, может получиться с мочой, не содержащей желчных пигментов, после

принятия внутрь антипирина. При стоянии все кольца постепенно окисляются до желтого.

Чувствительность этой пробы 1 : 80000. Белки мало вредят реакции, но она плохо удаётся с мочой темно-окрашенной от уробилина, мет-темоглобина или гематина.

2. Проба Розенбаха. Мочу фильтруют через небольшой фильтр; часть желчных пигментов задерживается при этом на фильтре. Если, после того, как жидкость стечет, фильтр развернуть и капнуть на него концентрированной азотной кислотой, то появляется ряд концентрических цветных колец: наружное—зеленое, кнутри—синее, фиолетовое, красное и желтое.

3. Проба Гупперт-Зальковского (стр. 155) применяется также в тех случаях, когда в моче присутствуют вещества, мешающие 1-й и 2-й реакциям (кровь, большие количества уробилина и других пигментов). Эта реакция открывает 1 часть желчных пигментов в 500 000—1 000 000 частей мочи.

4. Проба Розина (Rosin). Мочу (если она щелочная, ее подкисляют уксусной кислотой) осторожно переслаивают 2—3 см³ 1% спиртового раствора иода. На границе жидкостей образуется не позже чем через 1 минуту зеленое кольцо.

Эта реакция хорошо удаётся также в темной моче, дающей резкую реакцию на индикан.

5. Реакция Хаммарстена (Hammarsten). При смешении нескольких капель мочи с 2—3 см³ реактива Хаммарстена (пожелтевшая при стоянии смесь 1 объема 25% HNO₃ с 19 объемами 25% HCl; перед употреблением смешивают 1 объем смеси кислот с 4 объемами спирта) появляется стойкое зеленое окрашивание жидкости. При дальнейшем прибавлении смеси кислот окраска делается синей, фиолетовой, затем красной и бурой.

6. Желчные кислоты

Соли желчных кислот появляются в моче лишь в очень небольших количествах даже в самых тяжелых случаях желтухи.

Открытие желчных кислот в моче

1. Проба с серным цветом (см. стр. 154, желчь). 2. Реакция Петтенкофера (стр. 156); ее производят с выделенным из мочи осадком желчнокислых солей.

500 см³ мочи выпаривают почти досуха на водяной бане и извлекают спиртом. Профильтрованную вытяжку выпаривают

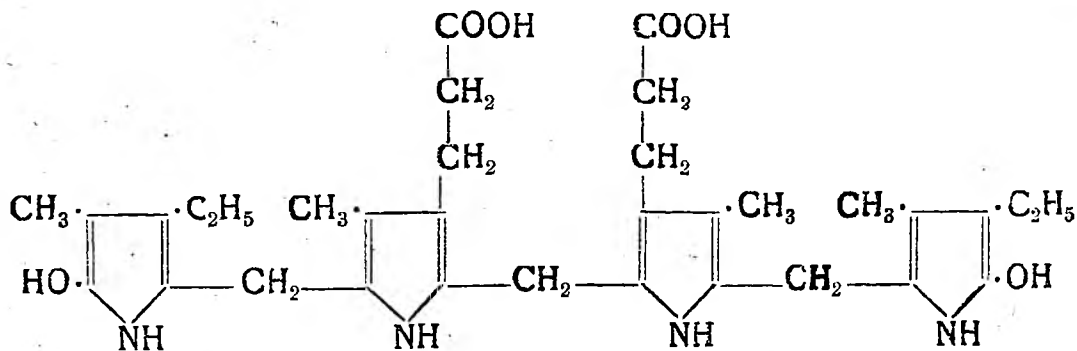
досуха, остаток извлекают абсолютным алкоголем, фильтруют, фильтрат выпаривают, остаток растворяют в воде и осторожно, избегая избытка, осаждают свинцовым уксусом— $Pb(OH)C_2H_3O_2$ слабо подщелоченным аммиаком. Отфильтрованный через 12—24 часа и отжатый между листами фильтровальной бумаги осадок извлекают кипящим абсолютным алкоголем, вытяжку фильтруют горячей, выпаривают с содой досуха и остаток извлекают абсолютным алкоголем. Со спиртовой вытяжкой, содержащей натриевые соли желчных кислот, производят реакцию Петтенкофера.

По этому способу можно открыть 1 часть желчных кислот в 10 000—20 000 частей мочи.

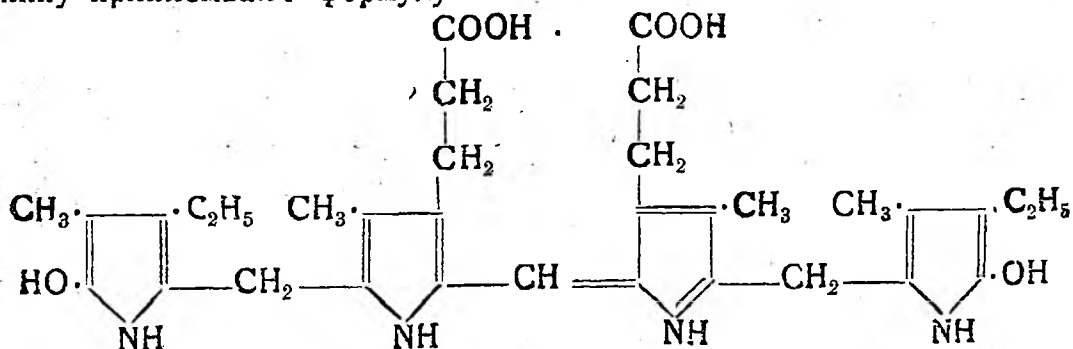
7. Уробилин

Уробилин, $C_{33}H_{42}O_6N_4$, оранжево-красный пигмент, образующийся, как и стеркобилин (стр. 161), при восстановлении желчных пигментов в кишечнике. Свежая нормальная моча не содержит уробилина или содержит его очень немного, но хромоген уробилина—уробилиноген—содержится всегда в небольших количествах и при стоянии мочи на воздухе на свету окисляется в уробилин*. Содержание уро-

* Строение уробилиногена (мезобилирубиногена) выражается формулой:



Уробилину приписывают формулу:



билина в моче увеличивается при заболеваниях печени и желчных путей, при расстройствах циркуляции (застойная печень), при многих лихорадочных инфекционных заболеваниях, при некоторых отравлениях, вызывающих распад эритроцитов (о связи между кровяными и желчными пигментами см. гл. XII, желчь).

Для открытия уробилина в моче при повышенном его содержании пользуются следующими реакциями:

а) Мочу подкисляют несколькими каплями разведенной H_2SO_4 и наблюдают в спектроскопе полосу поглощения между b и F , ближе к F , которая при больших концентрациях уробилина заходит за F .

б) Берут 10—20 см³ мочи (щелочную мочу подкисляют несколькими каплями разведенной HCl), приливают 5—10 см³ амилового спирта и извлекают уробилин, несколько раз перекидывая пробирку. Осторожно слитую прозрачную спиртовую вытяжку исследуют в спектроскопе. Наблюдают зеленую флуоресценцию после добавления нескольких капель 1% спиртового раствора $ZnCl_2$ (сильно подщелоченного аммиаком и профильтрованного); в проходящем свете жидкость розового цвета и прозрачна, в падающем представляется мутноватой и зеленой. Раствор показывает характерный спектр поглощения (см. таблицу спектров).

Подобную реакцию дают почти все дипиррилметены.

8. Порфирины

500—200 см³ мочи осаждают 10% раствором соды (20 см³ на каждые 100 см³ мочи), дают осесть осадку фосфатов щелочных земель, захватывающему и порфирины, сливают отстоявшуюся жидкость при помощи сифона, осадок переносят на фильтр, промывают возможно малым количеством воды (до появления бесцветных промывных вод) и извлекают спиртом, подкисленным соляной кислотой. Фильтруют спиртовую вытяжку и исследуют в спектроскопе; наблюдают полосы поглощения гематопорфирина в кислом растворе (стр. 109).

Порфирины и их хромогены содержатся в небольших количествах в нормальной моче. Их количество (главным образом уропорфирина) сильно повышается при некоторых патологических состояниях (кишечные кровотечения, заболевания печени), отравлениях (свинцом, сульфоналом, трионалом и др.), при так называемой врожденной порфиринурии.

9. Глюкоза

В нормальной моче содержатся следы виноградного сахара (около 0,02%), которые не могут быть обнаружены обычными реакциями на сахар. При патологических условиях происходит повышение содержания виноградного сахара в моче (глюкозурия), сахар начинает открываться обычными реакциями. Все виды глюкозурии могут быть разделены на две группы: 1) глюкозурии почечного происхождения (почка начинает пропускать нормально задерживаемый ею сахар), наступающие при некоторых отравлениях (флоридзин), а также иногда при беременности, и 2) глюкозурии в результате гипергликемии—повышения содержания сахара в крови, причем избыток сахара из крови выводится почками с мочой. Гипергликемия и последующая глюкозурия наблюдаются при введении с пищей больших количеств углеводов, когда образующаяся глюкоза не успевает усваиваться организмом (пищевая глюкозурия); в патологических случаях (диабет, отравления некоторыми ядами, например окисью углерода, и др.) они связаны с нарушением гликогенообразовательной и сахарообразовательной функций печени, в тяжелых случаях диабета—с понижением способности организма разрушать виноградный сахар. В происхождении диабета огромное значение имеют влияния органов внутренней секреции (поджелудочной железы и др.), головного мозга и вегетативной нервной системы*.

При диабете наблюдается длительное выделение значительных количеств виноградного сахара (до 8—10%), причем значительно увеличивается количество мочи (может достигать до 3—10 л и более в сутки), она бледного цвета и высокого удельного веса (1,030—1,040 и выше). Высокий удельный вес диабетической мочи обусловлен содержанием сахара и повышением, в связи с усиленным расщеплением белков в организме диабетика, выделения мочевины, аммонийных, сернокислых и фосфорнокислых солей.

Открытие глюкозы в моче

Исследование на сахар необходимо производить со свежей мочой, так как при ее стоянии сахар может подвергнуться сбраживанию под влиянием дрожжевых грибов, попадающих из воздуха.

* Из инкретов (гормонов желез внутренней секреции) особо важное значение в углеводном обмене принадлежит инсулину, адреналину и инкрету передней доли гипофиза. Их взаимоотношения еще не вполне выяснены.

1. Проба Троммера

К 5—8 см³ мочи в пробирке прибавляют $\frac{1}{3}$ объема 15% раствора едкого кали или едкого натра (при этом может выпасть небольшой белый осадок фосфорнокислых солей щелочных земель) и затем осторожно, по каплям разбавленный раствор медного купороса до появления небольшой, исчезающей при взбалтывании голубой мути гидрата окиси меди. В тех случаях, когда медного купороса приходится добавлять очень много, к жидкости прибавляют еще $\frac{1}{4}$ объема едкой щелочи. Затем жидкость, в верхней ее части, нагревают до начала кипения.

Нагревание производят только до начала кипения и ждут появления желтого осадка гидрата закиси меди или красного осадка закиси меди не более 1 минуты от момента прекращения нагревания.

Появление одного только желтого окрашивания жидкости недостаточно, так как оно наблюдается и с нормальной мочой; оно зависит от присутствия в нормальной моче, с одной стороны; очень небольших количеств редуцирующих веществ [следы виноградного сахара, мочева кислота, креатинин], с другой стороны—веществ, способных удерживать закись меди в растворе (например аммиачные соли). Присутствие этих веществ иногда значительно затрудняет открытие пробой Троммера сахара в моче при малом его содержании (менее 0,5%).

Белок, если он присутствует в больших количествах, должен быть предварительно удален, так как может служить защитным коллоидом, препятствующим осаждению закиси меди.

Фруктоза, лактоза, пентозы и глюкуроновые кислоты (см. ниже) вызывают подобно глюкозе восстановление при пробе Троммера.

2. Проба Ниландера (стр. 71)

Эта проба неприменима в присутствии белка и альбумоз, так как при кипячении в щелочной среде происходит отщепление слабо связанной серы и образование буро-черного осадка сернистого висмута (Bi_2S_3).

Мочевая кислота и креатинин не восстанавливают реактива Ниландера, некоторые глюкуроновые кислоты вызывают восстановление.

3. Проба брожением

Свежую неразложившуюся мочу, свободную от крови, белков и альбумоз, кипятят несколько минут в колбочке для уничто-

жения микроорганизмов. Если моча имеет щелочную или нейтральную реакцию, ее слабо подкисляют виннокаменной кислотой и снова кипятят для удаления угольной кислоты. По остывании прибавляют свежих пивных дрожжей (по 1 г на 10 см³ мочи), помещают смесь в тщательно вымытый бродильный аппарат (или пробирку), заливают ртутью и оставляют стоять при 34—37° или при комнатной т-ре.

Одновременно ставят контрольный опыт с нормальной мочой. При 34—37° сбраживание заканчивается в течение 6 часов, так что, если образование газа не происходит, опыт ранее этого срока не прерывают. Через 6 часов и в контрольной пробе образуется небольшой пузырек газа (самосбраживание дрожжей), и испытуемая моча может лишь тогда считаться содержащей сахар, если образовавшийся в ней пузырек больше, чем в контрольной пробе (различия в величине пузырьков газа делаются более заметными, если оба сосуда нагреты до 70°). По окончании опыта испытывают реакцию жидкости. Если она щелочная, то образование газа не указывает на сахар.

За исключением глюкозы и редко встречающейся фруктозы, в моче неизвестны другие вещества, способные бродить под влиянием пивных дрожжей. Относительно лактозы см. ниже.

4. Вращение плоскости поляризации света (стр. 29, 69).

Это определение имеет большое значение для отличия вращающей вправо глюкозы от глюкуроновых кислот и фруктозы, которые вращают влево.

10. Молочный сахар

Молочный сахар иногда встречается в моче у женщин при беременности, при кормлении грудью и особенно при прекращении кормления.

Наиболее важным в практическом отношении свойством, отличающим его от глюкозы, является неспособность бродить под влиянием чистых культур пивных дрожжей; с продажными дрожжами брожение может наступить, но не тотчас, а спустя более или менее продолжительное время, вследствие расщепления лактозы на глюкозу и галактозу под влиянием содержащихся в дрожжах бактерий.

11. Парные глюкуроновые кислоты

d-глюкуроновая кислота— $O : CH \cdot (CHOH)_4 \cdot COOH$ —находится в моче в виде парных β -глюкозидоподобных соединений с фенолами, индокс-

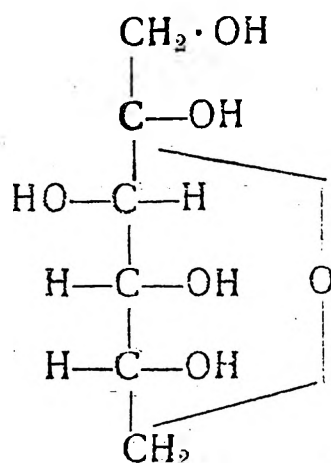
силлом, скатоксиллом и другими веществами ароматического и жирного рядов. Эти парные соединения вращают плоскость поляризации света влево, хотя сама кислота вращает вправо; некоторые из них обладают восстановительными свойствами.

Их содержание равно 0,004—0,025% в нормальной моче и увеличивается после приема многих медикаментов (антипирина, хлорала, салола и др.).

Парные глюкоуроновые кислоты являются соединениями менее ядовитыми, чем входящие в их состав компоненты.

12. Фруктоза

d-фруктоза — $C_6H_{12}O_6$ — кетоза, довольно редко встречающаяся в моче. Плоскость поляризации света вращает влево $[\alpha]_D^{20} = -(91,90 + 0,111p)^\circ$, где p обозначает количество сахара в граммах в 100 г раствора. Бродит под влиянием пивных дрожжей. Обладает несколько меньшей, чем виноградный сахар, восстановительной в отношении окиси меди способностью (отношение 100:92,8).



Левое вращение и восстановительная способность мочи, исчезающие после брожения, положительный результат пробы Селиванова (см. ниже) указывают на присутствие фруктозы. Если количество сахара, определенное при помощи поляриметра (стр. 225), меньше количества, определенного титрованием (стр. 225), причем перебродившая моча оказывается оптически недеятельной, то можно предположить одновременное присутствие фруктозы и глюкозы; возможность одновременного их присутствия не исключена и в том случае, если моча после брожения оказывается обладающей левым вращением, так как последнее может зависеть от β -оксимасляной кислоты (стр. 195).

Реакция Селиванова

Эту реакцию производят со свежесыпущенной кислой реакцией мочой (при щелочной реакции возможен переход виноградного сахара в фруктозу) *.

Несколько кубич. сантиметров мочи смешивают в пробирке с равным объемом 25% HCl и несколькими кристалликами резорцина $[C_6H_4(OH)_2, 1,3]$ и кипятят не более 20 секунд **. При содержании фруктозы появляется красное окрашивание.

АЦЕТОНОВЫЕ ТЕЛА

Ацетоновые тела: ацетон — $CH_3 \cdot CO \cdot CH_3$, ацетоуксусная кислота — $CH_3 \cdot CO \cdot CH_2 \cdot COOH$, β -оксимасляная кислота — $CH_3 \cdot CH(OH) \cdot CH_2 \cdot COOH$, являются продуктами неполного окисления в организме жирных кислот (гл. V) и появляются в моче в результате расстройства жирового обмена при диабете, при истощении, при острых лихорадочных заболеваниях, часто у детей при кори и скарлатине, при токсикозах беременных. Источником образования ацетоновых тел помимо жиров могут служить и белки (подвергшиеся дезаминированию аминокислоты). Введение углеводов уменьшает образование ацетоновых тел в организме и их содержание в моче.

С нормальной мочой за сутки выделяется в среднем 0,003—0,015 г ацетона и ацетоуксусной кислоты; примерно $\frac{1}{4}$ этого количества приходится на долю ацетона ***. В тяжелых случаях диабета за сутки выделяется до 6 г и более ацетона и ацетоуксусной кислоты; количество ацетона может доходить до 57 г, ацетоуксусной кислоты—до 24 г в сутки.

Количество β -оксимасляной кислоты, выделяющейся за сутки с нормальной мочой, равно 0,02—0,03 г, но при голодании или безуглеводной диете оно может повыситься до 20 г, а в тяжелых случаях диабета доходить до 50—100—220 г за сутки.

Введение инсулина ведет к исчезновению ацетоновых тел, что позволяет предотвращать диабетическую кому.

* d-глюкоза, d-манноза, d-фруктоза и d-галактоза легко переходят друг в друга как в организме, так и вне его особенно под влиянием едких щелочей или щелочных земель.

** Реакция основана на образовании оксиметилфурфуrolа из кетоз; при более продолжительном кипячении оксиметилфурфуrol может образоваться и из альдоз.

*** Имеются указания на то, что в моче нет предобразованного ацетона, что он является лишь продуктом протекающего в моче расщепления ацетоуксусной кислоты.

13. Ацетон

Реакции на ацетон могут быть произведены или непосредственно с мочой или с первыми 20 см³ перегона из 250 см³ мочи, слегка подкисленной разбавленной соляной кислотой. Так как ацетон кипит при 56,3°, то большая его часть собирается в первых порциях погона. Приемник охлаждают снегом или водой.

Если в моче присутствует ацетоуксусная кислота, то она при перегонке расщепляется с образованием ацетона.

1. Проба Либена (Lieben). К испытуемой жидкости прибавляют несколько капель раствора NaOH и затем по каплям до слабо желтой окраски раствор иода в иодистом калии, — жидкость делается мутной вследствие выделения бледножелтого кристаллического, обладающего характерным запахом осадка иодоформа: $\text{CH}_3 \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}_3 + 3 \text{I}_2 + 4 \text{NaOH} = \text{CHI}_3 + \text{CH}_3 \cdot \text{COONa} +$

$+ 3 \text{NaI} + 3 \text{H}_2\text{O}$.

2. Проба Легалья (Legal). К испытуемой жидкости прибавляют несколько капель свежеприготовленного раствора нитропруссиды натрия $[\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{ON}]$ и затем несколько капель едкого натра, образуется красное окрашивание; если красную жидкость подкислить крепкой уксусной кислотой, то окраска приобретает вишневый оттенок (ср. с реакцией Вейля на креатинин).

14. Ацетоуксусная кислота

Реакция Герхарта (Gerhardt). К моче прибавляют по каплям раствор FeCl_3 . По осаждении всех фосфатов в форме FePO_4 от прибавленной лишней капли хлорного железа появляется виннокрасное окрашивание, постепенно бледнеющее при стоянии. При кипячении окраска быстро исчезает* в результате расщепления ацетоуксусной кислоты ($\text{CH}_3 \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COOH} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{CH}_3 \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}_3$).

Реакция Герхарта открывает 1 часть ацетоуксусной кислоты в 2500—2000 частях мочи.

Фенолы, салициловая кислота, антипирин при выделении их с мочой

* Если для студенческих занятий к моче был прибавлен этиловый эфир ацетоуксусной кислоты, то обесцвечивание жидкости при кипячении наступает лишь с большим трудом, так как эфир является соединением, значительно более устойчивым, чем свободная кислота.

также дают при добавлении FeCl_3 красное окрашивание, которое однако не исчезает после кипячения или при стоянии.

15. β -оксимасляная кислота

l- β -оксимасляная кислота вращает плоскость поляризации света влево; $[\alpha]_D = -24,12^\circ$ (для 1—11% растворов свободной кислоты). Всегда сопровождается ацетоуксусной кислотой. Если последняя найдена, то присутствие β -оксимасляной кислоты можно подозревать, если перебродившая, свободная от белков и осветленная добавлением $\text{Pb}(\text{OH})\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2 + \text{NH}_4\text{OH}$ моча показывает левое вращение.

III. МОЧЕВЫЕ ОСАДКИ И ТРОСТКИ

Мочевые осадки (неорганизованные)

Содержащиеся в моче осадки делятся на организованные и неорганизованные. К организованным осадкам принадлежат клетки и клеточные образования; их изучение не относится к области биологической химии. Неорганизованные осадки представляют собой химические составные части мочи, выделившиеся вследствие изменений условий растворимости, главным образом вследствие изменения реакции среды. Поэтому различают осадки кислой и осадки щелочной мочи.

Осадки мочи могут быть получены отстаиванием мочи или, что гораздо лучше, ее центрифугированием. Большую часть отстоявшейся прозрачной жидкости сливают, берут пипеткой жидкость с осадком помещают каплю на предметное стекло, покрывают покровным и исследуют под микроскопом (увеличение в 200—300 раз). Перед исследованием определяют реакцию мочи на лакмус.

1. Наичаще встречающиеся осадки кислой мочи

1. Мочевая кислота—разнообразной формы кристаллы, окрашенные в буроватый цвет (табл. I, рис. 4); наичаще встречаются ромбоидальные таблички с округленными тупыми углами (точильные бруски), нерастворимые в HCl и NH_3 , растворимые в едких щелочах; дают мурексидную пробу.

2. Щавелевокислая известь ($\text{CaC}_2\text{O}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$) (табл. I, рис. 3)—октаэдры, напоминающие по виду почтовые конверты; иногда имеет форму гимнастических гирь или сфероидальных тел; нерастворима в уксусной кислоте и аммиаке, растворима в HCl .

3. Двуметальная фосфорнокислая известь (табл. I, рис. 1)—большие призматические кристаллы, часто собранные в розетки, растворимые в уксусной кислоте.

4. Ураты—буроватого цвета зернышки кислого мочекислового натрия или калия, растворяющиеся в щелочах, в воде (при нагревании); при подкислении дают окрашенный осадок свободной мочево́й кислоты.

2. Наичаще встречающиеся осадки щелочной мочи

1. Фосфорнокислая аммиак магнезия $[Mg(NH_4)PO_4 + 6H_2O]$ —кристаллы в форме гробовых крышек (табл. I, рис. 2а, α, β); легко растворима в кислотах. Очень часто содержится в загнившей моче.

2. Щавелевокислая известь (см. выше).

3. Двуметальная фосфорнокислая известь (см. выше); может быть в начале появления щелочной реакции.

4. Кислый мочекислый аммоний—окрашенные в буроватый цвет шары, снабженные шипами (напоминают плоды дурмана) (табл. I, рис. 2 б); растворяется в соляной кислоте, причем образуются ромбоидальные окрашенные кристаллы мочево́й кислоты.

5. Углекислая известь ($CaCO_3$)—шарики, собранные по два или кучками; очень редко имеют форму гимнастических гирь. Растворяется в уксусной кислоте с выделением пузырьков CO_2 .

6. Трехметальная фосфорнокислая известь— $Ca_3(PO_4)_2$ и магнезия— $[Mg_3(PO_4)_2 + 22H_2O]$ —зерна, легко растворимые в уксусной кислоте (без выделения CO_2).

Мочевые сrostки

Накопление мочевых осадков может повести в некоторых случаях к образованию мочевых сrostков: песка или камней, которые могут достигать значительных размеров (больше куриного яйца). Однако одного выпадения осадка недостаточно для образования сrostков,—необходимо, чтобы произошло склеивание частиц—повидимому белками, слизью.

Главные типы мочевых сrostков

Различают три типа мочевых сrostков: уратовые, оксалатовые и фосфатовые. Уратовые состоят из мочево́й кислоты и ее солей; они окрашены в желтый или бурый цвет, довольно тверды и гладки. Оксалатовые сrostки состоят из щавелевокислой извести; они

тверже остальных камней, поверхность их неровная, часто бугристая, темная от крови, так как они ранят ткани. Фосфатные сростки состоят из фосфорнокислой извести и магнезии, они белого цвета, мягче других сростков и потому имеют истыканную поверхность. Обычно встречаются сростки смешанного типа, слоистые.

Краткий анализ сростков

Растиертый в порошок сросток нагревают в пробирке с 7% соляной кислотой; по охлаждении, если вещество не растворилось полностью, фильтруют через маленький фильтр, переносят остаток с фильтра на фарфоровую крышечку и производят мурексидную пробу на мочевую кислоту. Фильтрат подщелачивают аммиаком; если в состав сростка входят оксалаты или фосфаты, образуется белый осадок. Жидкость с осадком подкисляют 10% уксусной кислотой и нагревают: в присутствии оксалатов остается нерастворившимся белый кристаллический осадок, который по остывании жидкости отфильтровывают. Фильтрат подщелачивают аммиаком: в присутствии фосфатов образуется белый осадок $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ и $\text{Mg}(\text{NH}_4)\text{PO}_4$. По величине получающихся при анализе осадков судят о том, какое вещество является главной составной частью сростка и какие входят в виде примесей.

МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕКОТОРЫХ СОСТАВНЫХ ЧАСТЕЙ МОЧИ

В настоящей главе приведены некоторые применимые к моче методы весового, объемного, колориметрического, нефелометрического, газометрического и поляриметрического анализа.

I. Общие правила количественного анализа

Весовой анализ

Весовой анализ основан на количественном выделении вещества в форме соединения, химический состав которого известен, взвешивании этого соединения и вычислении содержания искомого вещества. Способ выделения вещества различен в разных случаях. Если вещество находится в растворе в смеси с другими веществами, как это имеет, например, место в моче, то его осаждают другим веществом, дающим с ним нерастворимое соединение. См. определение сульфатов, кальция, магния.

Главными операциями при весовом анализе являются осаждение, фильтрование, промывание, сушение, сжигание и взвешивание осадка. Практические приемы приведены в изложении последовательного хода соответствующих анализов. Здесь же даны лишь правила взвешивания на точных аналитических весах.

Правила взвешивания

а) Проверяют, находятся ли весы в равновесии: для этого осторожным поворотом арретира (винта, опускающего подставку, поддерживающую коромысло весов) опускают коромысло; стрелка должна совершать качание на равное число делений по обе стороны нуля. Если равновесия нет, его устанавливают поворачивая флюгер, установленный посредине длины коромысла, или перемещая гаечки по винтовым стержням, находящимся на концах коромысла.

б) Взвешиваемое вещество помещают на чашку весов непременно в соответствующем сосуде: тигле, весовой баночке, весовой трубке, на часовом стекле и т. п. (бумага из-за гигроскопичности не применима). Летучие, гигроскопические, содержащие кристаллизационную воду вещества должны взвешиваться в закрытых сосудах.

в) Общий вес вещества с сосудом не должен превышать максимально допустимой нагрузки данных весов (обычно 100 или 200 г); желательно, чтобы он отстоял от максимального веса возможно дальше.

г) Взвешиваемое тело должно иметь температуру весов, для чего его перед взвешиванием оставляют возле весов на $\frac{1}{4}$ — $\frac{3}{4}$ часа. (Нагретое тело, вследствие восходящих от него токов теплого воздуха, кажется более легким).

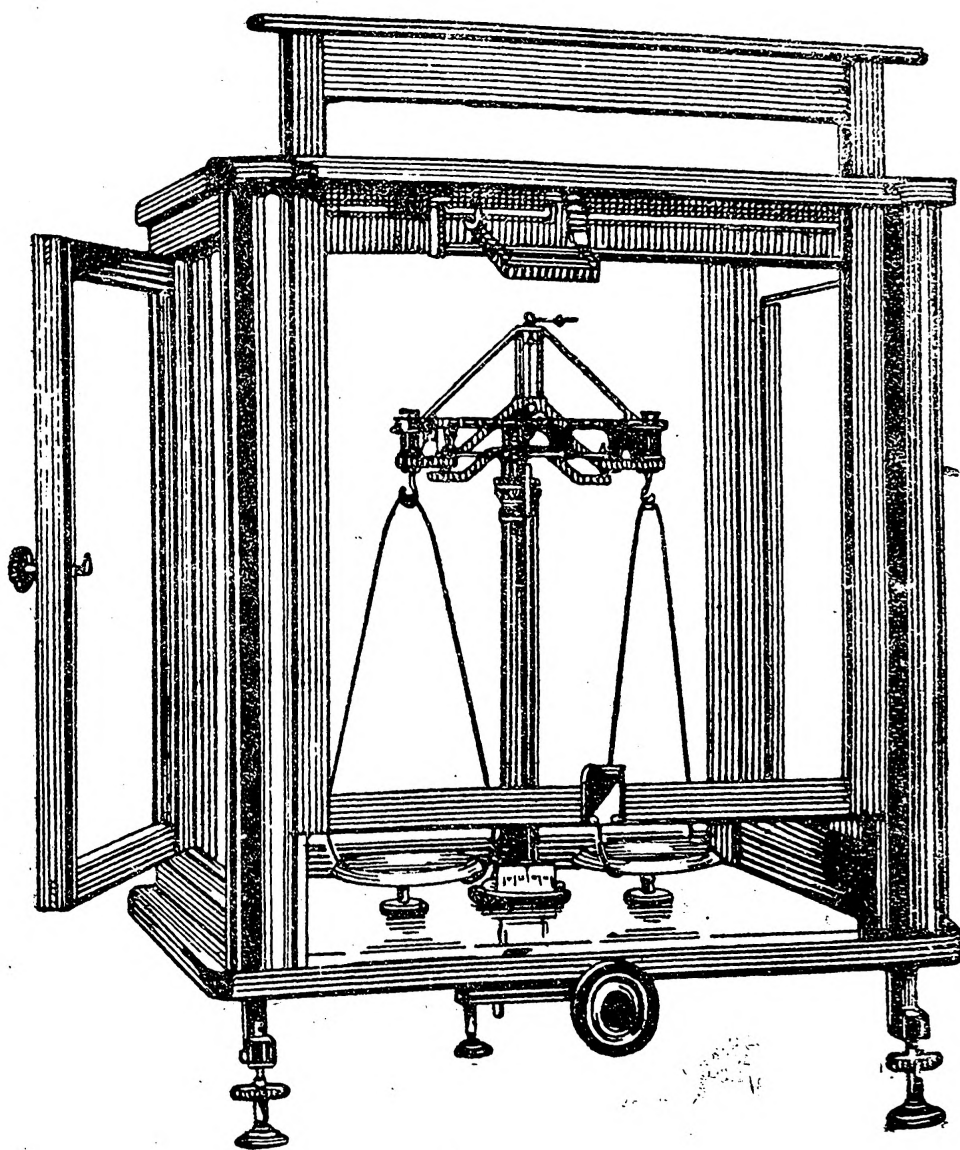


Рис. 19.

д) Весы все время, за исключением самого момента взвешивания, должны быть арретированы, коромысло поднято. Какие бы то ни было перемещения на чашках весов допускаются лишь в арретированном состоянии. Дверцы футляра весов держат закрытыми и открывают лишь в момент, когда кладут разновески или взвешиваемое тело.

е) Взвешиваемое тело помещают всегда на левую чашку весов, разновес—на правую.

ж) Разновес кладется щипчиками с костяными наконечниками (отнюдь не пальцами), последовательно и систематически переходя от более крупных к более мелким.

Тысячные и десятитысячные доли грамма определяют при помощи рейтера, весом в 0,01 г, насаживаемое на правое плечо коромысла весов. Плечо разделено на 10 равных частей, из которых каждая обычно разделена еще на 5 частей. Перемещение рейтера вдоль коромысла на 1 большое деление соответствует изменению нагрузки чашки на 0,001 г, перемещение на 1 малое деление—изменению на 0,0002 г.

з) Взвешивание окончено, когда стрелка совершает качания одинаково в обе стороны (при не слишком малом размахе).

и) По окончании взвешивания тотчас же подсчитывают и записывают вес по пустым местам в ящике для хранения разновесок и проверяют его, когда кладут разновески на место.

к) Сейчас же по окончании взвешивания взвешенное тело и разновески снимают с чашек весов, рейтер—с коромысла.

Объемный анализ

Объемный анализ основан на том, что нужную реакцию вызывают измеряемым объемом реактива точно известной объемной концентрации (титра) и отсюда вычисляют количество определяемого вещества. Конец реакции узнается по наступлению изменения в окраске индикатора (стр. 133). Для отмеривания жидкостей служит специальная мерительная посуда (бюретки, пипетки, колбы, рис. 20 а, б). При титровании необходимо соблюдать следующие правила:

а) Все сосуды, бюретки, пипетки, воронки, которые служат для сохранения или измерения жидкостей, должны быть совершенно сухими или ополоснутыми данной жидкостью три раза.

б) При отмеривании уровень жидкости устанавливают так, чтобы нижний край ее мениска совпадал с соответствующим делением, $\frac{1}{2}$ причем сосуд должен находиться в вертикальном

положении, а глаз наблюдателя—на уровне нижнего края мениска. Шкала бюреток разделена на десятые доли кубического

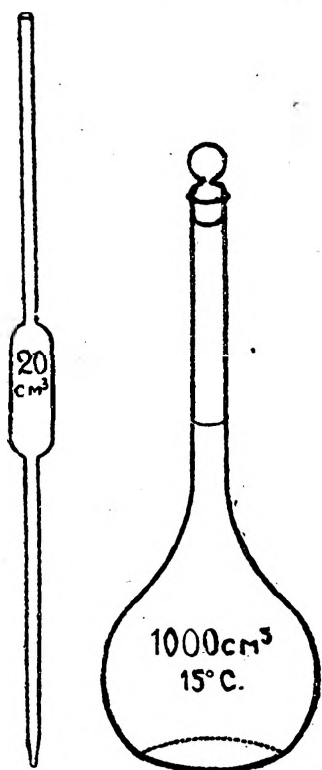


Рис. 20а.

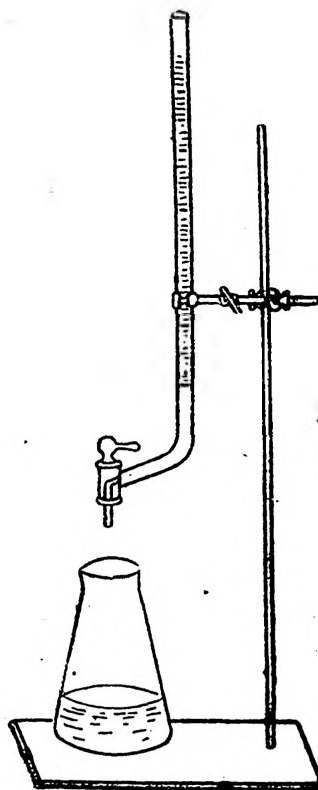


Рис. 20б.

сантиметра, что позволяет производить отсчет с точностью до 0,05 и даже 0,01 см³. Перед началом титрования отмечают уровень стояния жидкости в бюретке*.

в) При наполнении бюреток следят за тем, чтобы воздух из нижней суженной части бюретки был полностью вытеснен жидкостью, что достигается повторным быстрым открыванием крана (зажима) бюретки. При титровании веществами, окисляющими каучук и вазелин (например растворами перманганата, иода) применяют бюретки со стеклянным краном, не смазанным вазелином.

* Большая точность отсчета достигается при применении предложенного А. Шаттенштейном для объемного анализа простого приспособления, устраняющего явление параллакса: на бюретку надевается свободнодвигающаяся вдоль нее короткая стеклянная трубка с тонким кольцевым делением, служащим нулевым делением нониуса, нанесенного на передней поверхности трубки. На задней поверхности трубки на 1 мм ниже кольцевого деления наносится горизонтальная, занимающая примерно полукруглости, шириной около 2 мм черная полоска, благодаря которой нижний край мениска представляется тонкой черной линией.

г) При отмеривании жидкости пипеткой не касаются рукой ее расширенной части, чтобы не вызвать изменения объема от нагревания. При выпускании жидкости пипетку держат вертикально, касаясь концом ее стенки сосуда; по прекращении вытекания ждут 15 секунд и вынимают пипетку, проводя концом ее по стенке.

д) Производят не менее 2 параллельных определений, причем они не должны расходиться между собой более, чем на $0,2 \text{ см}^3$.

е) Для анализа берут по возможности такие количества испытуемой жидкости, чтобы ошибка титрования в $0,2 \text{ см}^3$ не превышала $0,2\%$ определяемого элемента или группы.

ж) Титрованные растворы сохраняют в склянках, залитых парафином во избежание испарения воды, а в некоторых случаях и растворенного вещества, и перед употреблением взбалтывают для смешения с водой, отпотевающей над жидкостью по стенкам.

з) При титровании растворами щелочей верхнее отверстие бюретки закрывают пробкой со вставленной в нее трубкой, наполненной кусочками КОН или натронной извести, для предохранения титрованного раствора от поглощения угольной кислоты из воздуха, так как CO_2 , выделяясь при титровании, может вредить резкости изменения окраски индикатора.

и) Лучше производить титрование при дневном освещении, так как при искусственном переходе окраски индикатора делаются менее заметными.

к) Для мытья (обезжиривания) мерительной посуды пользуются хромовой смесью, которую готовят, осторожно смешивая крепкий раствор кристаллического $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ с концентрированной H_2SO_4 . После мытья хромовой смесью посуду затем тщательно отмывают сначала простой, а затем дистиллированной водой. Хромовая смесь является годной к употреблению до тех пор, пока она не позеленеет (восстановление хромового ангидрида).

Проверка (калибрирование) мерительной посуды.

К калиброванию мерительной посуды прибегают в тех случаях, когда при производстве точных анализов не имеется посуды, проверенной Палатой мер и весов (на проверенной посуде имеется особое клеймо). Калибрование производится взвешиванием воды или ртути, занимающей объем проверяемой посуды.

Мерительную посуду, дважды дистиллированную воду (освобожденную кипячением от CO_2) или ртуть и сосуды, в которых

производится взвешивание, оставляют возле весов примерно на $\frac{3}{4}$ часа, чтобы они приняли одинаковую т-ру. При калибровании колбы ее взвешивают сначала пустую, а затем наполненную до метки водой (ртутью), т-ру которой измеряют. Разность между обоими взвешиваниями дает вес измеряемого объема воды (ртути) при данной т-ре. Для калибрования пипетки воду (ртуть) из нее выпускают в предварительно взвешенную весовую баночку с хорошо притертой крышкой. Так же поступают и при калибровании бюреток, выпуская воду (ртуть) из них по частям: сначала например от нулевого деления до 10,0, затем от нулевого до деления 20,0, от нулевого до деления 30,0 и т. д.

По найденному весу воды (ртути) при измеренной т-ре вычисляют объем проверяемой посуды для желаемой т-ры (обычно 15 или 20°) по табл. 5.

Нормальные растворы

Для объемного анализа обычно применяют нормальные растворы, т. е. титрованные растворы, содержащие в 1 л граммэквивалент соответствующего вещества.

Так например в 1 л нормального раствора соляной кислоты содержится 36,4648 г HCl, серной кислоты $\frac{98,0756}{2} = 49,0378$ г H₂SO₄,

едкого натра—40,0048 г NaOH, азотнокислого серебра—169,8880 г

AgNO₃, марганцевокислого калия— $\frac{158,0260}{5} = 31,6052$ г KMnO₄,

серноватистокислого натрия—248,1920 г Na₂S₂O₃·5H₂O и т. д. В большинстве случаев употребляют $\frac{1}{2}$ -, $\frac{1}{5}$ -, $\frac{1}{10}$ -, $\frac{1}{20}$ -, $\frac{1}{100}$ -нормальные растворы, т. е. содержащие в 1 л: $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{5}$, $\frac{1}{10}$ и т. д. граммэквивалента.

Приготовление титрованных растворов происходит различно и будет указано при соответствующих методах. См. напр. приготовление не содержащего углекислых солей раствора NaOH и установление его титра по свежеперекристаллизованной щавелевой кислоте [см. ниже определение кислотности мочи (1)] установление титра азотнокислого серебра по чистому хлористому натрию (2), установление титра перманганата по щавелевокислороду натрию (10); установление титра тиосульфата по навеске иода (14) и по $\frac{1}{200}$ -раствору иодноватокислого калия (стр. 237); установление титра уксуснокислого уранила по двуметальному фосфорнокислому натрию (3); приготовление фелинговой

жидкости (12); приготовление титрованного раствора сернокислого аммония для несслеризации (стр. 243); приготовление титрованного раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола для определения витамина С (стр. 245); приготовление титрованного раствора уксуснокислого свинца для нефелометрирования (16).

Методы объемного анализа

Методы объемного анализа делятся на 3 группы:

1. Методы ацидиметрии и алкалиметрии основаны на нейтрализации кислот основаниями и оснований—кислотами. Примерами могут служить: определение титруемой кислотности мочи (1); определение аммиака (7); определение азота по Кьельдалю (8). Ср. также титрование кислот желудочного содержания, титрование карбоксильных групп аминокислот по методу Вильштеттера и Вальдшмицт-Лейца, формоловое титрование по Зеренсену (гл. XII).

2. Методы осаждения основаны на осаждении определяемого элемента в виде нерастворимого соединения. См. определение хлоридов по Фольгарду и по Мору (2); определение фосфатов осаждением уксуснокислым уранилом (3).

3. Методы окисления и восстановления:

а) перманганатометрия основана на окисляющем действии перманганата. См. определение мочевой кислоты (10); ср. титрование перекиси водорода (гл. III).

б) иодометрия основана на определении иода титрованием серноватистокислым натрием. См. определение ацетоновых тел, ср. также микроопределение сахара в крови по Хагедорн-Иенсену (стр. 236).

Из других методов этой группы см. определение сахара в моче титрованием фелинговой жидкостью (12); ср. титрование витамина С 2,6-дихлорфенолиндофенолом (стр. 245).

О методах *колориметрического* анализа см. определение активной реакции мочи (1), определение креатинина (11); ср. микроопределение остаточного азота в крови по Фолину гл. XV, определение ртути в моче по Стуковенкову (17), определение амилазы по Вольгемуту (стр. 54).

О методах *нефелометрических* см. определение свинца в моче (16); ср. определение белка в моче по Робертс-Стольникову (13).

О методах *газометрического* анализа см. определение мочевины

по Бородину (9); ср. также анализ газов крови по Холдену (стр. 95), определение азота свободных амино групп по ван Слайку (стр. 149).

О *поляриметрическом* анализе см. определение сахара в моче (12) ср. гл. I, стр. 29).

II. ПРИМЕРЫ ОПРЕДЕЛЕНИЙ

1. Кислотность мочи

Различают титруемую и истинную кислотность. Титруемая кислотность определяется общим количеством атомов водорода, способных замещаться металлом при действии оснований (резервная кислотность). Истинная кислотность (активная реакция) обусловлена содержанием в растворе H^+ и колеблется для мочи между рН 5 и 7; ее определяют электрометрически или индикаторным методом (см. ниже).

а) Определение титруемой кислотности

Реактивы: 1n/10-NaOH. Титр едкого натра устанавливают по свежеперекристаллизованной и высушенной между листами фильтровальной бумаги химически чистой щавелевой кислоте ($C_2H_2O_4 \cdot 2H_2O$).

Перекристаллизация щавелевой кислоты. Для очищения продажного препарата щавелевой кислоты и получения в свежевыкристаллизованном состоянии с определенным содержанием кристаллизационной воды, 20—30 г растертого в порошок вещества растворяют при помешивании стеклянной палочкой в возможно малом количестве горячей воды и быстро фильтруют через складчатый фильтр, вставленный в воронку с отрезанным носиком, или через нагревательную воронку. Фильтрат все время помешивают палочкой и охлаждают водой для ускорения кристаллизации и получения мелких, не заключающих маточного раствора кристаллов. Кристаллы отфильтровывают или отсасывают (стр. 37) и повторяют перекристаллизацию из воды еще 2 раза. Примеси при этом остаются в маточных растворах. Выделившиеся чистые кристаллы отфильтровывают (отсасывают), растирают в ступке в тонкий порошок, кладут на сложенный в несколько раз лист фильтровальной бумаги, покрывают другим таким же листом и осторожно отжимают рукой (при этом не следует тереть бумагу, чтобы к ве-

еществу не пристали волокна бумаги), снова растирают в ступке и отжимают между листами фильтровальной бумаги и повторяют эту обработку до тех пор, пока вещество не станет на вид совершенно сухим и не перестанет приставать к пестику. После этого вещество оставляют $\frac{1}{2}$ часа на воздухе и затем употребляют для приготовления навески.

Навеска щавелевой кислоты

Во взвешенную весовую трубочку—небольшую пробирку, закрывающуюся пришлифованной стеклянной пробочкой или надевающейся перевернутой пробиркой несколько более широкого диаметра—помещают немного более нужного по расчету количества вещества и точно взвешивают. На 1 литр $n/10$ -раствора (молекулярный вес $C_2H_2O_4 \cdot 2H_2O = 126,0468$) требуется $\frac{126,0468}{2 \cdot 10} = 6,3023$ г щавелевой кислоты. Осторожно, чтобы не просыпать ни одной порошинки вещества, открывают весовую трубку над куском черной глянцевой бумаги, высыпают содержимое в мерную колбу на 1 литр и снова взвешивают. Разность обоих взвешиваний дает величину взятой навески. Если на глянцевой бумаге оказались все же порошинки вещества, их сметают в мерную колбу чистым перышком или кисточкой. Навеску растворяют в дистиллированной воде, смывая ею приставшие к стенкам колбы порошинки вещества, доводят объем жидкости до метки колбы, добавляют из бюретки по расчету столько воды, чтобы получить точно $n/10$ -раствор, плотно закрывают колбу пробкой и энергично перемешивают жидкость взбалтыванием.

В тех случаях, когда нет необходимости иметь в точности $n/10$ -раствор, ограничиваются доведением объема жидкости до метки колбы и вычисляют фактор полученного раствора, т. е. величину, указывающую, во сколько раз данный раствор крепче или слабее нужного. Например, если вместо 6,3023 г $C_2H_2O_4 \cdot 2H_2O$ в 1 литре раствора содержится 6,3346 г, то фактор этого раствора равен $\frac{6,3346}{6,3023} = 1,0051$. Умножая на фактор число кубических сантиметров, потраченного на титрование раствора, находят объем соответствующего ему теоретически точного $n/10$ -раствора.

Приготовление n/10-раствора едкого натра

Готовят раствор едкого натра, не содержащий углекислых солей, так как CO_2 , выделяясь при титровании, вредит резкости изменения окраски индикатора (фенолфталеина). 50 г химически чистого NaOH растворяют в фарфоровой чашке в 40 см^3 воды; тотчас по растворении жидкость переливают в плотнозакрывающуюся деревянной или каучуковой пробкой склянку и оставляют несколько дней спокойно стоять, чтобы выкристаллизовалась сода, нерастворимая в крепком едком натре. Отстоявшуюся прозрачную жидкость сливают в хорошо закрывающуюся склянку. Отмеривают пипеткой 3 см^3 щелочи и разбавляют в мерной колбе на 500 см^3 , прибавляя до метки свежeproкипяченной и остуженной дистиллированной воды. Хорошо перемешивают жидкость и наполняют ею бюретку; верхнее отверстие бюретки закрывают пробкой со вставленной в нее трубкой, наполненной кусочками едкого кали или натронной извести для предохранения раствора от поглощения угольной кислоты из воздуха. Отмеривают пипеткой в 2 эрленмейеровские колбочки по 20 см^3 n/10-раствора щавелевой кислоты, прибавляют по 2 капли 1% спиртового раствора фенолфталеина и титруют едким натром до появления исчезающей в течение $\frac{1}{2}$ минуты розовой окраски. Результаты обоих титрований не должны расходиться между собой более, чем на $0,2 \text{ см}^3$. В противном случае производят еще несколько определений.

Принимая во внимание, что 1 см^3 n/10-раствора щавелевой кислоты соответствует 1 см^3 n/10-раствора едкого натра, или $0,00400 \text{ г NaOH}$, вычисляют титр раствора едкого натра или его фактор и добавляя по расчету воду, готовят точно n/10-раствор NaOH .

Если, например, на титрование 20 см^3 n/10-щавелевой кислоты пошло в среднем $18,77 \text{ см}^3$ раствора щелочи, то в этом объеме щелочи должно заключаться $20 \times 0,00400 = 0,0800 \text{ г}$

NaOH , откуда титр раствора едкого натра $\frac{0,0800}{18,77} = 0,004262$,

а фактор $\frac{0,004262}{0,004000} = 1,0655$. Фактор может быть вычислен

и непосредственно из отношения объемов $\frac{20 \cdot 00}{18,77} = 1,0655$.

2. 1% спиртовый раствор фенолфталеина.

Производство определения

Пипеткой или бюреткой отмеривают 2 пробы по 10 см³ мочи*; разбавляют каждую пробу одинаковым количеством дистиллированной воды до бледножелтой окраски (от 40 до 90 см³ воды в зависимости от интенсивности окраски мочи), прибавляют в каждую 1 см³ 1% спиртового раствора фенолфталеина и титруют одну из проб n/10 раствором NaOH до появления не исчезающей в течение полминуты розовой окраски; другая проба служит контролем при определении конечного момента титрования.

Результаты выражают числом куб. сантиметров n/10 NaOH, потребных для нейтрализации 100 см³ неразбавленной мочи или всего суточного ее количества.

В норме кислотность мочи равна 200—500 (за сутки). Кислотность, меньшая 250, обычно соответствует действительной щелочности.

б) Определение активной реакции (pH) мочи индикаторным методом

Этот метод основан на измерении интенсивности окраски (колориметрии) индикатора, прибавленного к моче. Различные индикаторы меняют свой цвет при различных pH. Ниже приведены индикаторы, которые меняют окраску при pH, наблюдающихся в моче.

Индикатор	Область изменения окраски (pH)	Окраска	
		в кислой среде	в щелочной среде
1. Бромкрезолгрюн	4,0—5,6	желтая	синяя
2. Метиловый красный	4,2—6,3	красная	желтая
3. Бромкрезолпурпур	5,4—7,0	желтая	пурпурная
4. Фенолрот	6,6—6,2	желтая	красная

Найдя для данной мочи подходящий индикатор, производят сравнение окраски, им вызванной, в моче и стандартном растворе, pH которого известно. Стандартные растворы готовят, пользуясь так называемыми буферными смесями**, в виде серии растворов, обладающих последовательно меняющейся активной реакцией. Употребляют

* Собранную за сутки мочу смешивают и измеряют ее объем.

** Буферными смесями, годными для приготовления стандартных растворов при колориметрировании мочи, служат: 1) смесь уксусной кислоты и уксуснокислого натрия (ацетатная смесь), 2) смесь однометалльного и двухметалльного фосфатов натрия или калия. Активная реакция таких смесей зависит от соотношения обоих компонентов:

0,04% водные растворы индикаторов. 10 капель (0,5 см³) индикатора прибавляют к 10 см³ буферного раствора. Для колориметрирования:

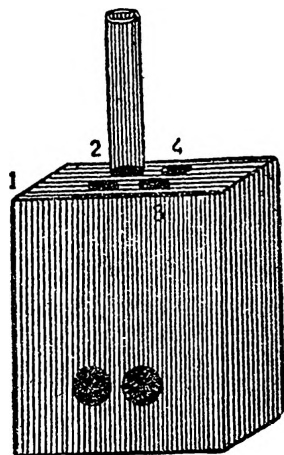


Рис. 21.

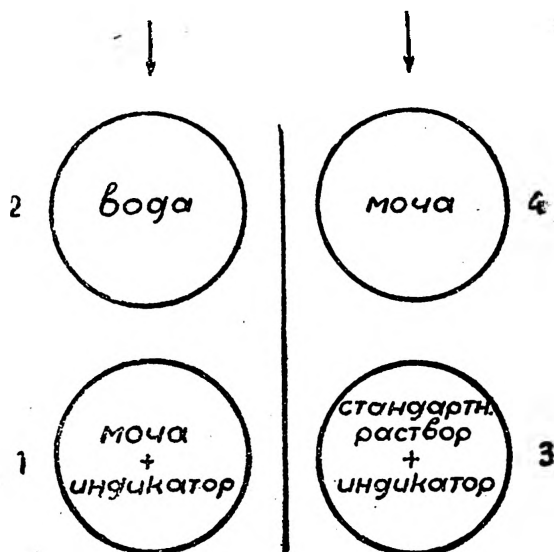


Рис. 22.

пользуются компаратором Уолпола (Walpole) (рис. 21), представляющим ящик с 4 отверстиями для вставления пробирок и отверстиями на передней и задней стенках для наблюдения окраски. Расположение растворов представлено на схеме (рис. 22).

Ацетатные смеси:

рН	п/10 CH ₃ COOH	п/10 NaC ₂ H ₃ O ₂
	см ³	см ³
3,6	185	15
3,8	176	24
4,0	164	36
4,2	147	53
4,4	126	74
4,6	102	98
4,8	80	120
5,0	59	141
5,2	42	158
5,4	29	171
5,6	19	181

Такое расположение позволяет производить колориметрирование жидкостей мутных или имеющих собственную первоначальную окраску (например моча); моча в 4-й пробирке служит светофильтром и оказывает на окраску стандартного раствора такое же влияние, как если бы находилась в пробирке 3-й; чтобы поглощение света водой в обоих случаях было одинаковым, пробирка 2-я наполняется водой.

Производство определения. Мочу во избежание потери CO_2 собирают под парафиновое масло. В пробирку такого же цвета и диаметра, как и та, в которой находится стандартный раствор, наливают 8 см³ свежeproкипяченной и остуженной до комнатной т-ры дистиллированной воды, 10 капель (или 0,5 см³) раствора бромкрезолпурпура и несколько кубич. сантиметров парафинового масла; пипеткой вносят 2 см³ мочи, осторожно перемешивают и сравнивают в компараторе со стандартом. Если моча слишком кисла для бромкрезолпурпура, то опреде-

Смеси фосфатов:

рН	м/15 Na_2HPO_4	м/15 KH_2PO_4
	см ³	см ³
5,4	3,0	97,0
5,6	5,0	95,0
5,8	7,8	92,2
6,0	12,0	88,0
6,2	18,5	81,5
6,4	26,5	73,5
6,6	37,5	62,5
6,8	50,0	50,0
7,0	61,1	38,9
7,2	71,5	28,5
7,4	80,4	19,6
7,6	86,8	13,2
7,8	91,4	8,6
8,0	94,5	5,5

Для приготовления м/15 раствора двуметального фосфорнокислого натрия отвешивают 11,871 г чистой высушенной до постоянного веса в эксикаторе над серной кислотой соли $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (по З е р е н с е н у) и растворяют в мерной колбе в дистиллированной воде, доводя объем раствора до 1 литра.

Для приготовления м/15 раствора однометального фосфорнокислого калия растворяют 9,076 г чистой высушенной при 110° до постоянного веса соли KH_2PO_4 в мерной колбе в дистиллированной воде, доводя объем раствора до 1 литра.

В случае надобности каждую из этих солей очищают трехкратной перекристаллизацией из воды.

ление повторяют с бромкрезолгрюном или метилротом; если слишком щелочна—применяют фенолрот.

В присутствии белков, продуктов их расщепления, а также больших количеств солей индикаторный метод не дает достаточно точных результатов. Для большей части клинических исследований несодержащей белка мочи индикаторный метод пригоден.

2. Хлориды

а) Метод Фольгарда (Volhard)

Метод Фольгарда основан на осаждении хлоридов в присутствии HNO_3 титрованным раствором ляписа (AgNO_3), избыток которого затем определяют обратным титрованием роданистым аммонием (или калием). Индикатором служат железные квасцы (соль окиси железа): в кислом от HNO_3 растворе, содержащем ляпис и соли окиси железа, прибавление роданистых солей вызывает образование белого осадка роданистого серебра, а по осаждении всего серебра—красное окрашивание (образование роданистого железа).

Реактивы

1. Раствор AgNO_3 , титр которого устанавливают по высушенному до постоянного веса чистому хлористому натрию (или приготовленному из него титрованному раствору) так, как это указано ниже при производстве определения; навеску хлористого натрия берут такую, чтобы на каждое титрование приходилось 0,10—0,15 г NaCl .

2. 30% HNO_3 (уд. вес 1,2), не содержащая соляной кислоты.

3. Насыщенный водный раствор железоаммиачных квасцов (не содержащий хлоридов).

4. Титрованный раствор NH_4CNS (или KCNS). 13 г чистого NH_4CNS растворяют в 1 л воды и устанавливают соотношение между раствором роданистой соли (тиоцианата) и раствором ляписа: 10 см^3 раствора ляписа отмеривают пипеткой в стакан, смешивают с 4 см^3 30% HNO_3 , 5 см^3 раствора железных квасцов и 80 см^3 воды и титруют раствором тиоцианата до появления первой стойкой розовой окраски; по количеству a куб. сантиметров тиоцианата, пошедших на титрование 10 см^3 раствора ляписа, вычисляют количество $\left[\frac{10}{a}\right]$ куб. сантиметров AgNO_3 , соответствующих 1 см^3 NH_4CNS .

Производство определения. 10 см³ мочи отмеривают пипеткой в мерную колбу на 100 см³, прибавляют туда же 4 см³ 30% HNO₃ и 20 см³ титрованного раствора AgNO₃ (другой пипеткой); доводят объем жидкости до метки водой, закрывают колбу пробкой, тщательно перемешивают жидкость и фильтруют через сухой шведский фильтр в сухую склянку. 50 см³ фильтрата отмеривают пипеткой в коническую колбочку, смешивают с 5 см³ раствора железных квасцов и титруют раствором тиоцианата до появления первой, не исчезающей при помешивании, розовой окраски.

Вычисление. Если на титрование 50 см³ фильтрата пошло A см³ тиоцианата, то всему количеству жидкости (100 см³) соответствуют $2A$ см³ тиоцианата; следовательно избыток взятого при осаждении

хлоридов раствора $AgNO_3 = 2A \cdot \frac{10}{a}$ см³, откуда количество раствора

AgNO₃, связанное хлоридами, равно $\left(20 - \frac{10 \cdot 2A}{a}\right)$ куб. сантиметров.

В случае применения $n/10$ раствора AgNO₃ (16,9888 г в 1 л) 1 см³ раствора соответствует 0,0058454 г NaCl.

Часто пользуются раствором ляписа, 1 см³ которого соответствует 0,01 г NaCl. Такой раствор содержит в 1 л 29,0633 г AgNO₃; $AgNO_3 + NaCl = AgCl + NaNO_3$, т. е. 58,454 г NaCl соответствуют

169,888 г AgNO₃; $(0,01 \times 1000) = 10$ г NaCl соответствуют

$$\frac{169,888 \cdot 10}{58,454} = 29,0633 \text{ г.}$$

Если титр приготовленного раствора ляписа не соответствует в точности нужному по теории, то вычисляют ф а к т о р полученного раствора, т. е. величину, указывающую во сколько раз данный раствор крепче или слабее нужного. Например, если вместо 29,0633 г AgNO₃ в 1 л раствора содержится 29,1704 г, то фактор этого раствора равен

$$\frac{29,1704}{29,0633} = 1,0037. \text{ Умножая на фактор число куб. сантиметров, потраченного на титрование раствора, находят объем соответствующего ему теоретически точного раствора.}$$

Количество NaCl выражают в граммах в суточном количестве мочи.

В присутствии белков или альбумоз мочу предварительно озоляют.

б) Метод Мора (Mohr).

Метод Мора основан на осаждении хлоридов титрованным раствором AgNO₃ при нейтральной реакции. Индикатором служит K₂CrO₄.

По осаждении всех хлоридов по добавлении лишней капли AgNO_3 образуется красный осадок Ag_2CrO_4 , причем первоначально белый осадок AgCl приобретает слабый красновато-оранжевый оттенок. Жидкость не должна содержать свободных кислот, так как они растворяют Ag_2CrO_4 и переводят хромовокислый калий в двуххромовокислый, придающий жидкости красный оттенок (кислая реакция мочи не имеет значения). Слабо-щелочная реакция не вредит определению, но при большом содержании углекислых щелочей образуется белый осадок Ag_2CO_3 .

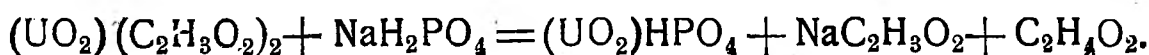
Определение. 10 см³ мочи разбавляют 90 см³ воды, смешивают с 5—6 каплями насыщенного на холоду раствора K_2CrO_4 и при постоянном помешивании титруют раствором азотнокислого серебра (см. метод Фольгарда) до появления слабой красновато-оранжевой окраски осадка хлористого серебра. Цвет осадка наблюдают со стороны дна, где осадок прилежит к стеклу.

Расчет. Количество пошедшего на титрование ляписа соответствует количеству NaCl в 10 см³ мочи; отсюда вычисляют суточное содержание поваренной соли.

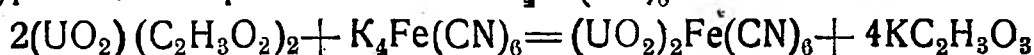
Этот метод дает в моче несколько более высокие результаты, чем метод Фольгарда, так как помимо хлоридов происходит осаждение и некоторых других веществ (пурины и др.).

3. Фосфаты

Определение фосфатов основано на их осаждении титрованным раствором уксусного (или азотнокислого) уранила в присутствии уксуснокислого натрия и уксусной кислоты в форме фосфорнокислого уранила:



Конец реакции узнают по появлению зеленой окраски от кошенили или буроватого окрашивания от $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$:



Реактивы

1. Ацетатная смесь (100 г $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 + 30$ г $\text{CH}_3 \cdot \text{COOH} +$ вода до 1 л). Прибавлением ацетатной смеси достигается переводение всех присутствующих фосфатов в однометалльные соли, и если имеется осадок фосфатов, то его растворение.

2. Настой кошенили в 25% спирте.

3. Свежеприготовленный раствор $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$.

4. Титрованный раствор уксуснокислого (или азотнокислого) уранила, 1 см³ которого осаждает 0,005 г P₂O₅. 5 г уксуснокислого уранила UO₂(C₂H₃O₂)₂ + 2H₂O растворяют при нагревании в 1 л воды и фильтруют. Титр раствора устанавливают, как указано ниже при производстве определения, по раствору химически чистого двуметального фосфорнокислого натрия; так как эта соль легко выветривается, то титр приготовленного из нее раствора устанавливают следующим образом: 50 см³ раствора [12 г соли (Na₂HPO₄ + 12H₂O) в 1 л воды] выпаривают досуха на водяной бане в маленькой фарфоровой чашке, прокаливают и взвешивают полученный пирофосфат натрия (Na₄P₂O₇); 1 г Na₄P₂O₇ = 0,53393 г P₂O₅.

Производство определения. К 50 см³ мочи, в конической колбе, прибавляют 5 см³ ацетатной смеси и несколько капель настоя кошенили. Нагревают жидкость на кипящей водяной бане (или на голом огне почти до кипения) и медленно по каплям прибавляют из бюретки раствор уранила до тех пор, пока еще образуется осадок. Снова нагревают жидкость и прибавляют по каплям раствор уранила, пока окраска жидкости не перейдет из красной в зеленую. Конец реакции узнают по появлению слабого буроватого окрашивания при смешении на фарфоровой или стеклянной (на белом фоне) пластинке капли жидкости с каплей раствора K₄Fe(CN)₆, что наступает обычно по добавлении еще нескольких капель уранила.

Расчет. Если на 50 см³ мочи потрачено a см³ раствора уранила, то это соответствует $a \cdot 0,005$ г P₂O₅. Отсюда вычисляют суточное количество P₂O₅.

4. Общее количество сульфатов

В стакан с носиком отмеривают пипеткой 50 см³ свободной от белков* мочи, добавляют 50 см³ воды и 5 см³ HCl (уд. в. 1,12). Закрыв стакан часовым стеклом, жидкость осторожно нагревают на сетке на маленьком пламени в течение 10 минут, затем к горячей жидкости прибавляют по каплям 10 см³ 5% раствора BaCl₂, смесь нагревают в течение 1 часа на кипящей

* Если моча содержит белки, их удаляют, для чего отмеривают пипеткой или бюреткой 100 см³ мочи в чашку и свертывают белки (стр. 183); по остывании жидкость с осадком помещают в мерительную колбу на 100 см³, доводят водой до метки, хорошо перемешивают, закрыв колбу пробкой, и отфильтровывают через сухой фильтр.

водяной бане, пробуют на полноту осаждения, пустив по стенке стакана каплю раствора $BaCl_2$, и оставляют на ночь. На другой день сливают осторожно по палочке через плотный беззольный фильтр * прозрачную жидкость, не взмучивая осадка и оставляя над ним слой жидкости в 1 см. В стакан наливают приблизительно 15 см^3 горячей воды, размешивают, дают осадку отстояться на кипящей водяной бане, прозрачную жидкость сливают через тот же фильтр, вновь оставляя над осадком слой жидкости в 1 см, и такую операцию, называемую декантацией, повторяют еще 3 раза **, после этого собирают осадок на тот же фильтр *** и промывают горячей водой до тех пор, пока промывная вода не перестанет давать малейшей мути с раствором азотнокислого серебра. Для удаления бурых смолистых веществ, образовавшихся при кипячении мочи с HCl , фильтр с осадком промывают несколько раз горячим спиртом. Закрыв воронку бумагой, дают фильтру и осадку высохнуть, затем высушивают в сушильном шкафу при $120\text{--}125^\circ$. Высушенный фильтр с осадком вынимают из воронки над тиглем, поставленным на кусок черной глянцевой бумаги, осторожно ссыпают осадок в тигель и сверху осадка кладут фильтр. При этом следят, чтобы по возможности ни одна порошинка вещества не просыпалась; если бы на глянцевой бумаге оказались порошинки вещества, их сметают в тигель чистым перышком или кисточкой. Тигель вместе с крышкой должен быть заранее прокален и, по остывании в течение $\frac{3}{4}\text{--}1$ часа в эксикаторе, взвешен с точностью до десятитысячных долей грамма. Тигель вместе с фильтром и осадком помещают на фарфоровый треугольник, закрывают крышкой и прокаливают сначала на небольшом пламени, а затем, когда прекратится выделение дыма и исчезнет запах, нагревают

* Употребляют так наз. беззольные фильтры из шведской бумаги, оставляющей по сжиганию ничтожное (определенное) количество золы. Фильтр должен быть меньше воронки, через которую производят фильтрование, так как иначе невозможно его полное промывание. Фильтр смачивают дистиллированной водой и плотно прижимают к стенкам воронки.

** Без соблюдения указанных предосторожностей осадок $BaSO_4$ может пройти сквозь фильтр, не будучи задержан им.

*** Если осадок плотно пристает к стенкам и не смывается струей воды, его отделяют или при помощи стеклянной палочки, на конец которой надет кусочек каучуковой трубки, или кусочками беззольного фильтра, которые затем бросают в фильтр с осадком. Во избежание заползания осадка на стенки воронки фильтр не заполняют жидкостью до краев.

докрасна. Через некоторое время отставляют горелку, снимают при помощи никелевых щипцов крышку (покрытую с внутренней стороны копотью) и кладут ее в эксикатор, а тигель сильно прокаливают до тех пор, пока его содержимое не станет совершенно белым. Тигель помещают в эксикатор, а крышку кладут на фарфоровый треугольник ушком книзу и осторожно прокаливают, пока не сгорит копоть, после чего крышку кладут на тигель. Когда прокаленный тигель с веществом и крышкой совершенно охладится (приблизительно через $\frac{3}{4}$ часа), его взвешивают. Прибавка веса, по сравнению с первоначальным весом тигля с крышкой, указывает количество полученного BaSO_4 ; $1 \text{ г BaSO}_4 = 0,42017 \text{ г H}_2\text{SO}_4$. Прокаливание и взвешивание повторяют. Оба взвешивания должны совпадать, в противном случае прокаливают вновь.

5. Кальций

100 см³ профильтрованной мочи подщелачивают аммиаком до появления мути, не исчезающей при помешивании, и сейчас же приливают уксусной кислоты, пока не растворится муть. К жидкости, нагретой на водяной бане, прибавляют приблизительно 10 см³ 10% раствора щавелевокислого аммония, пробуют на полноту осаждения, нагревают полчаса на водяной бане и оставляют на ночь. Затем декантируют (см. выше) прозрачную жидкость через плотный беззольный фильтр, разбалтывают осадок с небольшим количеством горячего 1% раствора щавелевокислого аммония, сливают отстоявшуюся жидкость через тот же фильтр, повторяют декантацию 4 раза, после этого количественно переносят осадок на фильтр, заканчивают промывание (проба на полноту промывания: отсутствие помутнения от $\text{AgNO}_3 + \text{HNO}_3$) и высушивают фильтр с осадком при 100—105°. Прокаливают, как описано выше, вначале слабо, затем сильно, пользуясь паяльной лампой, до постоянного веса. Привес тигля прямо указывает количество CaO в 100 см³ мочи. В присутствии белка мочу необходимо предварительно озолить.

6. Магний

Фильтрат от осадка щавелевокислой извести (см. выше) вместе с промывными водами выпаривают на водяной бане до объема примерно в 50 см³, переливают количественно в стакан с носиком, ополаскивают чашку 3 раза дистиллированной водой

(по 20 см³) и при помешивании палочкой (стараятся не задевать стенок и дна стакана, так как на месте царапин осадок очень плотно пристает) сильно подщелачивают аммиаком. Через 12 часов образовавшийся осадок фосфорнокислой аммиакмагнезии отфильтровывают через беззольный фильтр, промывают 2,5% аммиаком до исчезновения реакции на Cl-ион в стекающей жидкости, подкисленной HNO₃, высушивают и прокаливают сначала слабо, а затем сильно до постоянного веса (на паяльной лампе). Взвешивают образующийся пирофосфат магния (Mg₂P₂O₇); 1 г. Mg₂P₂O₇ = 0,36213 г MgO = 0,21843 г Mg.

Прокаливание ускоряется, если предварительно смочить осадок в тигле несколькими каплями концентрированного раствора NH₄NO₃ и высушить в сушильном шкафу.

7. Аммиак

Метод определения основан на вытеснении содой из аммиачных солей свободного аммиака, который током воздуха при комнатной т-ре переводится в титрованный раствор кислоты и обратно оттитровывается щелочью.

Определение производят в аппарате, изображенном на рис. 23. Цилиндр А (диаметром около 5 см и высотой около 45 см) снабжен

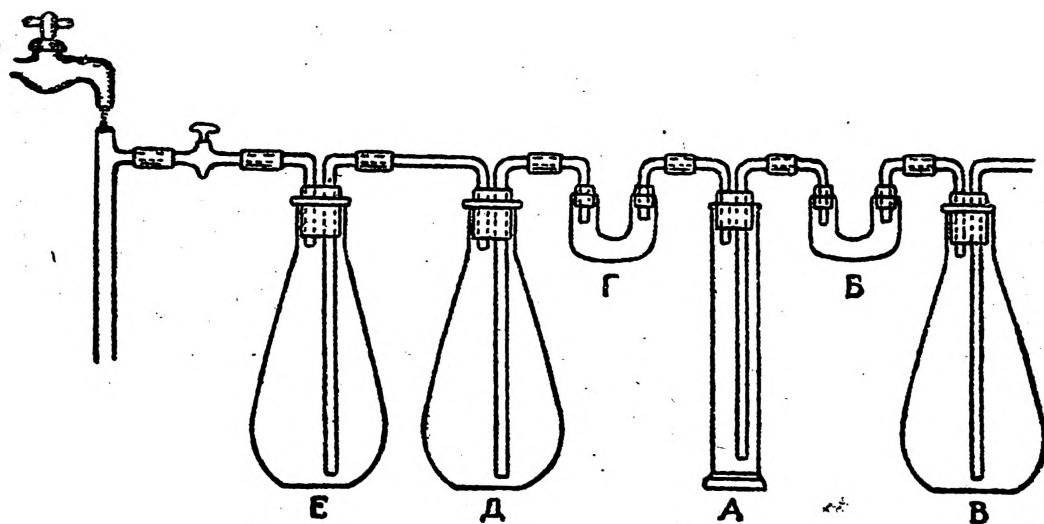


Рис. 23.

каучуковой пробкой с 2 отверстиями. Через одно из них пропущена стеклянная трубка, которая доходит почти до дна цилиндра и соединяет его с U-образной трубкой Б, наполненной ватой, и, далее, с промывной склянкой В с серной кислотой, которая служит для улавливания аммиака из просасываемого воздуха. Через другое отверстие

пробки в цилиндр *A* проходит стеклянная трубка, оканчивающаяся тотчас под пробкой и соединенная через наполненную ватой U-образную трубку *Г* с двумя последовательно включенными приемными склянками *Д* и *Е*, из которых *Д* содержит 25 см³, *Е*—10 см³ *n*/10 H₂SO₄.

В цилиндр *A* отмеривают пипеткой 25 см³ мочи, прибавляют 8—10 г NaCl, 5—10 см³ толуола или парафинового масла (чтобы жидкость не пенилась) и 1 г соды в порошке; тотчас соединяют цилиндр с аппаратом и при помощи водоструйного насоса, присоединенного к *Е*, просасывают воздух. При 20—25° и просасывании 600—700 л воздуха в час весь аммиак переходит в приемные склянки в течение 1—1½ часов. Содержимое приемных склянок количественно переливают в коническую колбу и оттитровывают *n*/10 щелочью в присутствии индикатора алizarинрота (по 1 капле 1% раствора индикатора на каждые 100—150 см³ жидкости) до красной (но не фиолетовой) окраски.

Количество NH₃ (в граммах в 25 см³ мочи) находят, вычитая из 35 (число куб. сантиметров налитой в приемники *n*/10 H₂SO₄) число куб. сантиметров *n*/10 щелочи, пошедшей на титрование, и умножая разность на 0,00170314 (содержание NH₃ в 1 см³ *n*/10 раствора). Далее вычисляют содержание NH₃ в суточном количестве мочи.

Присутствие белка не вредит определению.

8. Определение азота по Кьельдалю (Kjeldahl)

Принцип метода. При кипячении с концентрированной H₂SO₄ органическое вещество разрушается, причем весь азот его переходит в сернокислый аммоний; подщелочив жидкость, отгоняют аммиак в избыток титрованного раствора кислоты, которую затем обратно оттитровывают щелочью.

Реактивы

- 1 *n*/10 H₂SO₄.
2. *n*/10 NaOH.
3. 0,1% спиртовый раствор метилрота (сохранять в темном месте).

4. Концентрированная H₂SO₄ (чтобы предохранить от поглощения NH₃ из воздуха, сохраняют в склянке с хорошо притертой пробкой, под стеклянным колпаком, края которого опущены в чашку с разбавленной H₂SO₄).

5. Медный купорос в порошке.
6. Сернокислый калий в порошке.
7. Тальк в порошке.
8. Крепкий раствор NaOH (25—33%).

Производство определения

Отмеривают пипеткой 5 см³ мочи в так наз. кьельдалевскую круглодонную иенского стекла колбу на 100—200 см³ с длинным (15—18 см) горлом, смешивают с 1/2 г порошка медного купороса, 3 г K₂SO₄* и 15 см³ концентрированной H₂SO₄ и, поставив на сетку, кипятят до полного исчезновения желтоватого оттенка жидкости, вначале буреющей от обугливания органических веществ крепкой H₂SO₄. Кипячение продолжают после того, как жидкость приобретает чисто зеленый оттенок, еще около 1/4 часа. Обычно разрушение мочи продолжается около 3/4 часа.

После того как жидкость остыла, ее разбавляют водой, вливаемой при взбалтывании малыми порциями, переливают количественно в коническую или круглодонную колбу на 600 — 800 см³, споласкивая кьельдалевскую колбу 3 раза водой, и присыпают чайную ложку талька в порошке. Охладив разогревшуюся жидкость, к ней осторожно, по стенке приливают 2/3 того количества крепкого раствора едкого натра, какое нужно для нейтрализации 15 см³ крепкой серной кислоты. Сильно разогревшуюся жидкость охлаждают, вливают остальную 1/3 нужного количества едкого натра плюс лишних 10 см³ и тотчас же (во избежание улетучивания NH₃) закрывают колбу *a* каучуковой пробкой со вставленной кьельдалевской насадкой *б* (рис. 24) (предохраняет приемник от забрызгивания щелочной

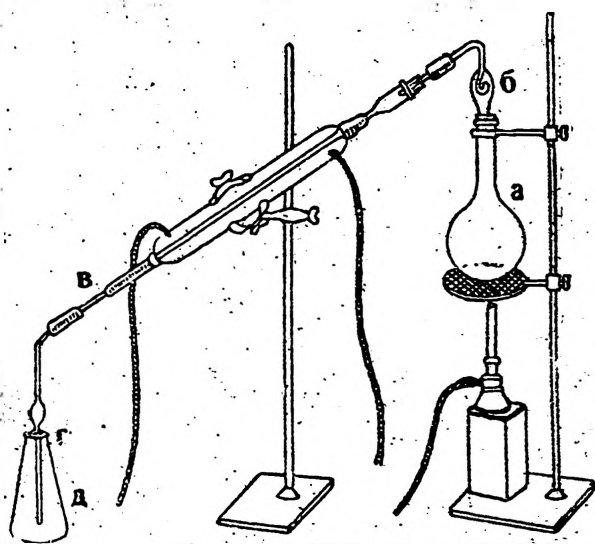


Рис. 24.

* Медный купорос каталитически ускоряет разложение органических веществ серной кислотой, сернокислый калий, повышая t-ру кипения смеси, тоже ускоряет разложение.

жидкости из перегонной колбы), которая через холодильник соединяется с трубкой *г*, опущенной в приемник *д*, куда уже налита $n/10$ H_2SO_4 (50 см^3)*, **. Перемешав жидкость в перегонной колбе, ее нагревают до кипения. Перегонку прекращают после того, как весь аммиак отогнан, что узнают следующим образом, разъединяют прибор между *в* и *г*, смачивают красную лакмусовую бумажку каплей стекающей жидкости и тотчас снова соединяют прибор; отсутствие посинения бумажки указывает на конец реакции; в противном случае перегонку продолжают. Обычно перегонка занимает около $3/4$ часа. По ее окончании, прежде чем потушить горелку, трубку *г* разъединяют от *в* и продолжают перегонку еще 5 минут, для того чтобы перегоняющимися каплями омыть трубку *в*, в которую во время перегонки засасывало кислоту из приемника. Собранную в приемнике жидкость титруют $n/10$ $NaOH$ в присутствии индикатора метилрота до пожелтения первоначального красного раствора.

Расчет. Разность между числом куб. сантиметров $n/10$ H_2SO_4 , влитой в колбу *д*, и числом куб. сантиметров $n/10$ $NaOH$, пошедшего на обратное титрование, дает число куб. сантиметров $n/10$ кислоты, нейтрализованной аммиаком; 1 см^3 $n/10$ H_2SO_4 соответствует 1 см^3 $n/10$ $NH_3 = 0,0014008$ г N. Отсюда вычисляют суточное содержание N.

Производят не менее двух параллельных опытов, которые не должны расходиться между собой более чем на $0,2\text{ см}^3$ $n/10$ $NaOH$. Так как употребляемые по этому методу реактивы, в особенности H_2SO_4 , сами могут содержать аммиачные соли, то при определении N по Кьельдалю всегда ставят слепой опыт с одними реактивами. Полученную в результате слепого опыта разность между числом куб. сантиметров взятой $n/10$ серной кислоты и пошедшей на титрование $n/10$ едкой щелочи прибавляют к числу куб. сантиметров $n/10$ $NaOH$, пошедшего на титрование в основном опыте.

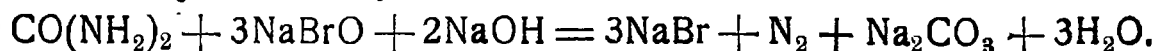
* Какое количество раствора $NaOH$ нужно для нейтрализации 15 см^3 H_2SO_4 устанавливают предварительным опытом: 15 см^3 H_2SO_4 осторожно, малыми порциями, вливают в 100 см^3 воды, охлаждают, прибавляют несколько капель раствора метилрота и приливают из мерного цилиндра при помешивании раствор едкого натра до пожелтения первоначально красной жидкости.

** Все нужное количество едкого натра можно добавить и в один прием, но при этом необходимо следить, чтобы обе жидкости не смешались. Удельно более тяжелый раствор едкого натра идет книзу, а находящаяся над ним кислая жидкость предохраняет от потери аммиака.

9. Мочевина

Определение по способу Бородина

Способ Бородина основан на разложении мочевины на воду, угольную кислоту и азот бромноватистым щелоком:



CO_2 поглощается щелочной жидкостью, а по объему выделившегося азота вычисляют содержание мочевины. Способ Бородина достаточно точен для клинических исследований.

Реактивы

1. Свежеприготовленный раствор бромноватистого щелока (300 г NaOH растворяют в 1 л воды и по охлаждении смешивают под тягой с 50 см³ брома, прибавляя его понемногу и тщательно охлаждая).

2. Насыщенный раствор поваренной соли, подщелоченный содой и отфильтрованный от образовавшегося осадка известковых и магниезальных солей.

Определение производят в аппарате, изображенном на рис. 25. Существенной частью аппарата является трехходовой кран (рис. 25), сообщающий *А* с *Б* и позволяющий при повороте на 90° выпускать жидкость из *А* наружу; *А* и *Б* при этом разобщаются.

Установив сообщение между *А* и *Б*, вытесняют воздух из аппарата насыщенным раствором поваренной соли, который наливают через *В*. Когда жидкость появляется над краном, *А* и *Б* разобщают и выпускают жидкость из *А* наружу. Сдавливая каучуковую трубку *Г* по направлению от *Б* к *В*, проверяют, не застряли ли в ней пузыри воздуха. Затем 3 раза ополаскивают *А* разбавленной мочой и наполняют ею *А*. Мочу разбавляют в зависимости от концентрации мочевины в 2—5—10 раз. Опустив грушу *В* и отметив уровень стояния мочи в *А*, выпускают из *А* в *Б* 5 см³ мочи, избыток мочи из *А* выливают наружу, заменяют бромноватистым щелоком, ждут, пока не прекратится выделение газа в результате разложения мочи, остав-

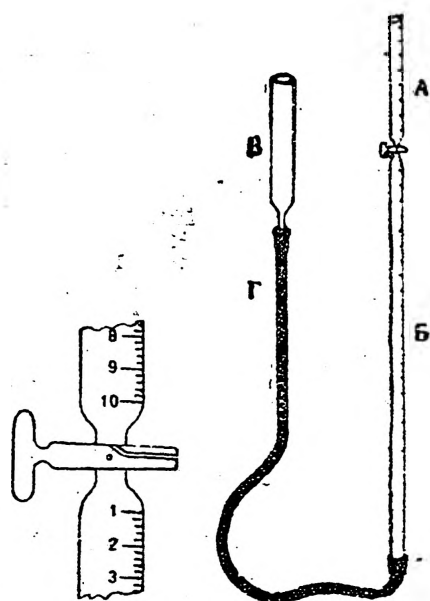


Рис. 25.

шейся по стенкам, и затем малыми порциями впускают бромноватистый щелок в *Б* до тех пор, пока еще происходит выделение газа, который скопляется под краном. Через $\frac{1}{4}$ часа по прекращении выделения газа определяют его объем, держа грушу *В* так, чтобы жидкость в ней и в бюретке стояла на одном уровне. Одновременно измеряют т-ру и атмосферное давление.

Найденный объем газа приводят к нормальным условиям (0° , 760 мм) и сухости по формуле, приведенной на стр. 97 (газы крови). 1 см³ сухого азота при нормальных условиях весит 0,0012508 г, что соответствует 0,0026808 г мочевины. При расчете учитывают степень разведения взятой для анализа мочи.

10. Мочевая кислота

Определение по методу Фолина и Шефера (Folin, Shaffer). Этот метод основан на окислении перманганатом мочевой кислоты, выделенной из мочи в виде кислой аммонийной соли.

Реактивы

1. Раствор 500 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 г $\text{UO}_2(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ и 60 см³ 10% уксусной кислоты в 650 см³ воды.

2. 10% раствор химически чистого $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (не должен содержать солей закиси железа и хлоридов).

3. Раствор KMnO_4 , приблизительно $n/20$. Растворяют 1,6 г химически чистого KMnO_4 в 1 л воды и после выстаивания раствора в течение 10 дней устанавливают титр его по титрованному раствору, приготовленному из химически чистого, высушенного при $100-105^\circ$ до постоянного веса щавелевокислого натрия: $(2\text{KMnO}_4 + 5\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4 + 8\text{H}_2\text{SO}_4 = \text{K}_2\text{SO}_4 + 5\text{Na}_2\text{SO}_4 + 2\text{MnSO}_4 + 8\text{H}_2\text{O} + 10\text{CO}_2)$:

навеску щавелевокислого натрия (0,25 — 0,3 г) растворяют примерно в 200 см³ воды, нагретой до 70° , прибавляют около 10 см³ серной кислоты (1 : 4 воды) и горячий раствор титруют перманганатом. Индикатором служит сам перманганат, обесцвечивающийся при восстановлении; конец реакции узнается по появлению не исчезающей при перемешивании розовой окраски по добавлении лишней капли KMnO_4 . Титруют из бюретки со стеклянным краном, не смазанным вазелином, так как перманганат окисляет каучук и вазелин. Раствор перманганата сохраняют в темноте. Так как титр его меняется при хранении, то его надо время от времени проверять.

4. 25% аммиак.

Производство определения. Для удаления из мочи мукоида (стр. 183) замедляющего фильтрование и промывание кислого мочекислового аммония и мешающего при титровании мочево́й кислоты, 300 см³ мочи смешивают с 75 см³ раствора 1, и через 5 минут фильтруют сквозь сухой складчатый фильтр в сухой сосуд. Отмеривают пипеткой в 2 стакана две порции фильтрата по 125 см³, что соответствует 100 см³ мочи, и подщелачивают каждую 5 см³ 25% аммиака (производят два параллельных определения). На следующий день отфильтровывают отстоявшуюся над осадком кислого мочекислового аммония жидкость, переводят осадок с помощью 10% раствора (NH₄)₂SO₄ на фильтр и промывают 1—2 раза 10% раствором (NH₄)₂SO₄. Фильтр вынимают из воронки, разворачивают и при помощи шпателя и струи воды количественно переводят осадок с фильтра обратно в стакан. К жидкости (объем ее равен примерно 100 см³) прибавляют 15 см³ концентрированной H₂SO₄, причем наступает саморазогревание до 60—63°. Жидкость тотчас титруют перманганатом, прибавляя его сначала по 3 капли, а в конце титрования—по одной, до появления первой, распространяющейся при помешивании на весь раствор, розовой окраски, быстро затем исчезающей. Жидкость не должна иметь т-ру ниже 50°, в противном случае ее подогревают.

1 см³ п/20 KMnO₄ соответствует 0,00375 г мочево́й кислоты.

Принимая во внимание растворимость кислого мочекислового аммония, к найденному количеству мочево́й кислоты прибавляют по 0,003 г на каждые 100 см³ взятой мочи.

Если в моче присутствует белок, его предварительно удаляют.

11. Креатинин

Метод Фолина. Колориметрическое определение креатинина по методу Фолина основано на реакции Яффе (стр. 177) с пикриновой кислотой и едким натром.

Раствор 10 мг креатинина в 10 см³ воды дает при добавлении 10 см³ насыщенного раствора пикриновой кислоты и 4—8 см³ 10% NaOH красную окраску, постепенно усиливающуюся, достигающую максимума между 5 и 10 минутами и затем вновь бледнеющую. Если эту жидкость в это время разбавить водой до 500 см³, то слой ее в 8,1 мм имеет в проходящем свете точно такую же окраску, как слой в

8 мм п/2 раствора $K_2Cr_2O_7$, который поэтому и служит при этом методе стандартным раствором.

Реактивы

1. Насыщенный водный раствор пикриновой кислоты [12 г $C_6H_2(NO_2)_3OH$ в 1 л].

2. 10% раствор NaOH.

3. Стандартный п/2 раствор бихромата калия, содержащий в 1 л 24,54 г химически чистого, высушенного при 110° до постоянного веса $K_2Cr_2O_7$.

Определение. В мерительную колбу на 500 см³ отмеривают пипеткой 10 см³ мочи; туда же прибавляют 15 см³ насыщенного раствора пикриновой кислоты и 5 см³ 10% раствора NaOH, взбалтывают жидкость и оставляют на 5—6 минут, после чего доводят объем водой (15°) * до 500 см³, тщательно перемешивают и тотчас сравнивают в колориметре ** окраску полученной жидкости с окраской стандартного раствора бихромата. Колориметр устанавливают так, чтобы свет проходил через слой бихромата в 8 мм. Меняя высоту столба исследуемой жидкости, добиваются того, чтобы интенсивности окраски обеих жидкостей совершенно сравнялись, и отмечают в миллиметрах высоту столба исследуемой жидкости. Производят несколько отсчетов, которые не должны расходиться между собой более чем на 0,3 мм, и берут среднее арифметическое из них (a мм).

Расчет. 10 см³ мочи содержат $\frac{8,1}{a} \cdot 10$ мг креатинина; отсюда вычисляют суточное содержание креатинина в моче.

Точные результаты получаются при концентрациях креатинина, соответствующих значениям a от 5 до 13 мм. Если a меньше 5, то определение повторяют с 5 см³ мочи; если a больше 13—берут 20 см³ мочи.

Ацетон, ацетоуксусная кислота и сероводород влияют на окраску при реакции Яффе и потому мешают определению. Они могут быть удалены кипячением мочи, подкисленной уксусной кислотой, однако если в моче присутствует кре-

* Окраска бихромата и окраска, получающаяся при реакции Яффе, меняется с изменением температуры неодинаково.

** Прибор, позволяющий удобно сравнивать интенсивности окраски двух жидкостей.

атин, часть его может при этом перейти в креатинин. Большие количества сахара также вредят определению.

12. Сахар

а) Поляриметрическое определение (стр. 29, 69).

Во многих случаях профильтрованная моча прямо может быть исследована в поляризационном аппарате. Если же она сильно окрашена или остается после фильтрования мутной, к ней приливают 10% раствор среднего уксуснокислого свинца в количестве $\frac{1}{10}$ взятого объема мочи и смесь фильтруют через сухой фильтр. Щелочную мочу перед добавлением уксуснокислого свинца подкисляют уксусной кислотой.

Количество виноградного сахара определяют по формуле

$$c = \frac{a \cdot 100}{[a]_D \cdot l}, \text{ где } [a]_D = +52,6^\circ.$$

Существуют специальные сахариметры, в которых деления шкалы прямо соответствуют процентному содержанию глюкозы. Но и в обычных поляризационных аппаратах отсчет будет прямо указывать процентное содержание глюкозы, если взять трубку длиной в 190 мм.

Определение дает правильные результаты лишь при отсутствии в моче левовращающих веществ (белков, альбумоз, β -оксимасляной кислоты, парных глюкуроновых кислот, фруктозы и др.). Белки предварительно удаляют (стр. 183). Для обнаружения других левовращающих веществ мочу сбраживают дрожжами и снова поляриметрируют. Если обнаруживается левое вращение, то найденные в обоих случаях величины складывают. Парные глюкуроновые кислоты и β -оксимасляная кислота [ее левое вращение еще более увеличивается после обработки мочи $Pb(C_2H_3O_2)_2$] не бродят. Присутствие способной бродить фруктозы, редко встречающейся в моче, можно предположить, если количество сахара, определенное поляриметрическим путем, меньше найденного титрованием, если исключена возможность присутствия других левовращающих веществ. В щелочной моче часть глюкозы может перейти в фруктозу.

Молочный сахар вращает вправо: $[a]_D = +55,3^\circ$.

Поляриметрический анализ чрезвычайно ценен простотой и быстротой выполнения и тем, что дает указание не только о количестве, но и о характере редуцирующего вещества.

б) Титрование фелинговой жидкостью

Метод Фелинга (Fehling), основанный на реакции Троммера (стр. 190), дает несколько более высокие результаты, так как в мо-

че помимо сахара содержатся вещества, обладающие восстановительной способностью (мочевая кислота, креатинин и др.). Важным для точности определения по этому методу является: 1) такое разведение мочи, чтобы содержание сахара в ней было равно 0,5—1%, 2) чтобы все нужное количество мочи было прилито к отмеренному количеству фелинговой жидкости сразу, а не малыми порциями, 3) чтобы восстановление протекало при кипячении. Метод Фелинга плохо применим при малом содержании сахара в моче, так как в таком случае мочу не разводят, и присутствующие в моче коллоиды удерживают образующийся осадок закиси меди во взвешенном состоянии, что мешает наблюдению окраски жидкости.

Приготовление фелинговой жидкости

1. 34,639 г свежеперекристаллизованного из воды, растертого в порошок и высушенного отжиманием между листами фильтровальной бумаги химически чистого медного купороса ($\text{CuSO}_4 + 5 \text{H}_2\text{O}$) растворяют в мерной колбе на 500 см³ воды и доводят объем до метки.

2. 173 г чистой сеньетовой соли ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 + 4\text{H}_2\text{O}$) растворяют в мерной колбе на 500 см³ в небольшом количестве воды, прибавляют раствор 70 г NaOH примерно в 100 см³ воды и доводят водой до метки.

Фелингову жидкость готовят перед титрованием, смешивая отмеренные пипетками или бюретками равные объемы обеих жидкостей*. 1 см³ фелинговой жидкости соответствует 0,005 г глюкозы.

Определение. 10 см³ свободной от белка мочи доводят в мерительной колбе на 100 см³ до метки водой; закрыв колбу пробкой, хорошо перемешивают жидкость и наполняют разбавленной таким образом мочой бюретку**. В фарфоровой чашке смешивают 20 см³ фелинговой жидкости с 80 см³ воды, жидкость нагревают до начала кипения, прибавляют из бюретки 5 см³ мочи, кипятят несколько секунд и наблюдают на белом фоне чашки окраску жидкости. Если синяя окраска жидкости сохранилась, прибавляют еще 5 см³ мочи, снова кипятят и т. д. до тех пор, пока жидкость над красным осадком закиси меди не станет бесцветной (но не желтой, пожелтение наступает при избытке сахара в щелочной жидкости—реакция Мура, стр. 70).

* Готовая фелингова жидкость при стоянии портится.

** Если уд. вес мочи больше 1,030, ее разбавляют в 10 раз; при уд. в. 1,025—1,030—в 5 раз; при уд. в. меньше 1,025—в 4—2 раза или совсем не разбавляют

Если нельзя быстро * прийти к заключению относительно окраски, жидкость фильтруют в пробирку через маленький сухой и плотный фильтр и сравнивают на белом фоне окраску фильтрата и воды. Если фильтрат оказывается окрашенным в голубой цвет, его вливают обратно в чашку и продолжают титрование. Для каждой пробы берут новый фильтр.

Повторяют титрование еще 1—2 раза с соответственно разбавленной мочой, причем прибавляют сразу почти все нужное количество мочи.

При расчете принимают во внимание разведение мочи. Титрование необходимо производить днем, так как при искусственном освещении слабые голубые оттенки плохо различимы.

13. Белки

Определение по методу Робертс-Стольников-Брандберга (Roberts, Brandberg)

Метод основан на наблюдении, что при переслаивании мочи крепкой HNO_3 (проба Хеллера, стр. 182) помутнение на границе обеих жидкостей происходит между 2-й и 3-й минутами при содержании в моче 0,0033% белка.

Мочу смешивают в мерительном цилиндре с 9 объемами воды и затем готовят из нее ряд дальнейших разведений. В ряд пробирок наливают пипеткой примерно по 1 см³ концентрированной HNO_3 , следя за тем, чтобы стенки пробирки выше уровня азотной кислоты не были ею смочены, и при помощи тонкооттянутой пипетки переслаивают азотную кислоту мочой; таким путем получается серия пробирок с мочой различной степени разведения. Отмечают, через сколько времени от момента начала переслаивания в каждой пробе появляется едва заметное белое кольцо (рассматривать на черном фоне).

Проба, в которой кольцо появляется не ранее 2-й и не позже 3-й минуты, содержит 0,0033% белка. Содержание белка в неразбавленной моче (в процентах) находят, умножая 0,0033 на степень разведения мочи.

Этот метод дает для клинических целей достаточно точные результаты.

* Долгое ожидание нежелательно, так как закись меди на воздухе постепенно снова окисляется.

14. Ацетоновые тела

Метод Шеффера и Мариотта (Marriott)

Метод основан на отгонке из мочи ацетона как предобразованного, так и образующегося при перегонке из ацетоуксусной кислоты, и на определении ацетона по количеству иода, идущего на образование из него иодоформа. По отгонке ацетона нелетучую β -оксималяную кислоту окисляют бихроматом в ацетон, который перегоняют и определяют иодометрически. Парные глюкуроновые кислоты, виноградный сахар, которые при действии хромовой кислоты также дают ацетон, удаляют предварительно основным уксуснокислым свинцом и аммиаком; другие образующиеся при окислении вещества, способные связывать иод, разрушают, подвергая дестиллят вторичной перегонке с H_2O_2 и NaOH .

Реактивы

1. Основной уксуснокислый свинец: 180 г $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ и 110 г PbO нагревают в водяной бане с небольшим количеством воды до тех пор, пока PbO не прореагирует; затем прибавляют столько воды (около 1 л), чтобы удельный вес жидкости при 25° был равен 1,235.

2. 25% аммиак.

3. 1% раствор $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.

4. 10% раствор NaOH .

5. 3% раствор H_2O_2 .

6. Крахмальный клейстер (щепотку растворимого крахмала нагревают в кипящей водяной бане с 10—15 см³ воды).

7. n/10 раствор иода (12,693 г в 1 л); титр устанавливают каждый раз по раствору тиосульфата ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$).

8. n/10 раствор $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (24,8192 г $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 + 5\text{H}_2\text{O}$ в 1 л). Титр устанавливают по навеске возогнанного и высушенного в эксикаторе над CaCl_2 иода. Навеску иода делают в весовую баночку с 2—3 г KJ и 0,3—0,5 см³ воды. Баночку с навеской, приоткрыв крышку, бросают в коническую колбу с 200 см³ 0,5% раствора KJ и производят титрование: $2 \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 + \text{J}_2 = 2\text{NaJ} + \text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$. Индикатором служит крахмальный клейстер, который прибавляют, когда жидкость по добавлению $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ становится слабозелтой. Титруют до исчезновения синей окраски от крахмального клейстера.

О п р е д е л е н и е

а) Ацетон+ацетоуксусная кислота. В мерительную колбу на 500 см³, содержащую 200—300 см³ воды, отмеривают пипеткой 50 см³ мочи, прибавляют 50 см³ раствора основного уксуснокислого свинца, тщательно перемешивают, подщелачивают 25 см³ крепкого аммиака, доводят водой до метки, хорошо взбалтывают, закрыв колбу пробкой, и через несколько минут отфильтровывают через сухой складчатый фильтр. 200 см³ фильтрата помещают в кьельдалевскую колбу на 800—1000 см³, разбавляют 400 см³ воды и смешивают с 5 см³ концентрированной H₂SO₄ и небольшим количеством талька. Колбу закрывают пробкой со вставленной делительной воронкой и отводной трубкой, соединяющей колбу через холодильник со стеклянной трубкой, опущенной в приемную кьельдалевскую колбу с дистиллированной водой; во избежание потери ацетона трубка должна быть опущена глубоко в воду. Во время перегонки следят, чтобы объем жидкости в перегонной колбе не становился меньше 500—400 см³, для чего время от времени прибавляют воду (по каплям) из делительной воронки. Собирают примерно 200 см³ перегона и освобождают от примеси муравьиной и азотистой кислот и других, способных связывать иод веществ, вторичной перегонкой жидкости, подщелоченной 10 см³ 10% NaOH. Перегоняют 20 минут в приемник (литровая склянка с хорошо притертой пробкой) с водой. К перегону прибавляют большой избыток n/10 раствора иода и при взбалтывании по каплям избыток свободного от нитритов крепкого раствора NaOH, закрывают склянку пробкой, взбалтывают 1/4 минуты и оставляют стоять 5 минут. Затем ополаскивают пробку дистиллированной водой, подкисляют жидкость крепкой HCl и обратно оттитровывают иод n/10 тиосульфатом (индикатор—крахмальный клейстер).

Разность между числом куб. сантиметров n/10 раствора иода, прилитого к перегону, и числом куб. сантиметров n/10 Na₂S₂O₃, пошедшего при обратном титровании (1 см³ n/10 J₂ = 1 см³ n/10 Na₂S₂O₃), дает число куб. сантиметров n/10 раствора иода, связанного ацетоном. 1 см³ n/10 раствора иода соответствует 0,000968 г ацетона.

б) β-оксимасляная кислота. Жидкость, оставшуюся в перегонной колбе после первой отгонки ацетона, подвергают вторичной перегонке, прибавляя медленно по каплям через делительную воронку 1% раствор K₂Cr₂O₇: сначала 20 см³, а затем по 10 см³ каждые 15—20 минут, пока не будет прибавлено

все нужное количество $K_2Cr_2O_7$ (обычно не более 100 см^3). Если при этом жидкость делается заметно зеленой, то бихромат приливают через соответственно более короткие промежутки времени и в количестве, достаточном для поддержания слабой красно-желтой окраски. Перегонка занимает 2—3 часа. Все время объем жидкости в перегонной колбе поддерживают около $400\text{—}600\text{ см}^3$. Перегон собирают в литровую круглодонную колбу с водой, подщелачивают $10\text{ см}^3\ 10\%$ $NaOH$, прибавляют $25\text{ см}^3\ 3\%$ H_2O_2 и снова перегоняют около 20 минут в склянку с водой; вначале, пока не разложится вся перекись водорода, нагревают очень осторожно. Перегон смешивают с избытком $n/10$ раствора иода и едким натром и ведут определение, как указано выше.

$1\text{ см}^3\ n/10$ раствора иода соответствует $0,001736\text{ г}$ β -оксимасляной кислоты. Так как при переходе β -оксимасляной кислоты в ацетон наблюдается постоянный дефицит около 10% , то к найденному количеству β -оксимасляной кислоты прибавляют еще 10% .

15. Ацетон

Метод Фолина

Метод основан на определении количества иода, потребного для перевода в иодоформ предобразованного ацетона, увлекаемого из мочи током воздуха при комнатной температуре.

Определение производят в аппарате, служащем для определения аммиака в моче (7). В цилиндр А (рис. 23) отмеривают пипеткой 25 см^3 мочи, прибавляют $0,3\text{ г}$ щавелевой кислоты, 10 г $NaCl$ (ацетон нерастворим в насыщенном растворе поваренной соли) и несколько капель керосина (чтобы жидкость не пенилась). В приемник Д помещают $10\text{ см}^3\ 40\%$ раствора едкого кали, 150 см^3 воды и большой избыток $n/10$ -раствора иода. Затем в течение 25 минут, при комнатной температуре, просасывают при помощи водоструйного насоса сильной струей воздух. Весь ацетон при этом переходит в приемник и превращается в иодоформ. Содержимое приемной колбы подкисляют $10\text{ куб. сантиметрами}$ концентрированной соляной кислоты и избыток иода обратно оттитровывают $n/10$ -раствором тиосульфата в присутствии крахмального клейстера.

Расчет ведут так же, как в методе Шефера и Мариотта (14).

Этот метод не вполне надежен в виду легкости разложения щелочного раствора иодноватистокислого калия.

16. Свинец

Метод Тробеза (Troboes) в модификации Токаревой.

Свинец находят в моче (также в костях, мышцах и печени) при свинцовой болезни. Свинцовая болезнь является одним из самых частых случаев профессиональных отравлений, что объясняется широким применением свинца в промышленности и ядовитостью даже нерастворимых в воде солей свинца.

Принцип метода. Органические вещества, содержащие свинец, осаждают из мочи содой и разрушают концентрированной серной кислотой; выделившийся сернокислый свинец растворяют в уксуснокислом аммонии и переводят в хромовокислый свинец, который нефелометрируют.

Реактивы

1. 5% раствор соды.
2. Концентрированная H_2SO_4 , свободная от свинца*.
3. Пергидроль (30% перекись водорода).
4. 96% этиловый спирт.
5. 30% раствор уксуснокислого аммония, слабо подщелоченный на лакмус аммиаком.
6. 10% раствор уксусной кислоты.
7. 5% раствор химически чистого K_2CrO_4 .
8. Совершенно прозрачный**, подкисленный уксусной кислотой раствор уксуснокислого свинца, содержащий в 1 л 0,1570 г химически чистого, перекристаллизованного*** и высушенного до постоянного веса в вакуумэксикаторе над серной кислотой $Pb(C_2H_3O_2)_2$; 1 см³ такого раствора содержит 0,0001 г Pb.

* Реактивы не должны содержать свинца; его присутствие можно обнаружить ставя слепой опыт с одними реактивами.

** Водные растворы уксуснокислого свинца разлагаются углекислотой воздуха, причем образуется осадок основного углекислого свинца и освобождается уксусная кислота, которая предохраняет остальную соль от разложения угольной кислотой. Подобное разложение происходит и на поверхности твердой соли при хранении ее на воздухе.

*** Уксуснокислый свинец перекристаллизовывают из равного по весу количества горячей воды, подкисленной уксусной кислотой; выделившиеся кристаллы отсасывают (стр. 37) или отфильтровывают, растирают в порошок, отжимают между листами фильтровальной бумаги, снова растирают и отжимают и повторяют эту обработку до тех пор, пока вещество не станет на вид совершенно сухим и не перестанет приставать к пестику.

О п р е д е л е н и е. Суточное количество нефльтрованной мочи нагревают в колбе на кипящей водяной бане (кислую мочу предварительно нейтрализуют содой) и осаждают 5% раствором соды, прибавляя его из расчета 1 см³ на 100 см³ мочи; нагревание продолжают до тех пор, пока не образуются хорошие хлопья. По охлаждении жидкости осадок, захвативший весь свинец, отфильтровывают через беззольный фильтр, промывают 5 раз раствором соды, высушивают, переносят вместе с фильтром в кьельдалевскую колбу и смешивают с 5 см³ концентрированной H₂SO₄ и несколькими каплями пергидроля; колбу ставят на сетку и кипятят, пока жидкость не станет совершенно бесцветной. По охлаждении жидкости к ней прибавляют 6 см³ воды и 20 см³ спирта и оставляют на полчаса для более полного осаждения сернокислого свинца. Осадок PbSO₄ отфильтровывают через маленький беззольный фильтр, промывают сначала разбавленным (2 объема спирта + 1 объем воды), а затем 96% спиртом и переносят вместе с фильтром обратно в кьельдалевскую колбу. Прибавляют 5 см³ раствора уксуснокислого аммония для растворения сернокислого свинца и через полчаса отфильтровывают * жидкость в мерительную колбу на 25 см³; кьельдалевскую колбу и фильтр промывают 4 раза водой, фильтрат слабо подкисляют уксусной кислотой, осаждают 3 см³ раствора K₂CrO₄ доводят водой до метки, тщательно взбалтывают и через 15 минут сравнивают со стандартом в нефелометре **. Одновременно с осаждением испытуемой жидкости хромовокислым калием готовят стандарт, для чего смешивают в мерительной колбочке на 25 см³ 5—10 см³ раствора уксуснокислого свинца (в зависимости от количества свинца в моче ***) с 5 см³ щелочного раствора уксуснокислого аммония, подкисляют жидкость

* Фильтр предварительно промывают несколько раз водой, чтобы удалить пыль и оторвавшиеся волокна бумаги, мешающие при нефелометрировании.

** Нефелометр—прибор, позволяющий по степени мутности жидкости судить о количественном содержании в ней вызывающего муть вещества. Нефелометрический метод приложим к определению веществ, которые могут быть осаждены из очень разбавленных растворов в форме взвесей, представляющих простому глазу гомогенными и не свертывающихся в течение времени, необходимого для производства определения (10—20 минут). Метод приобретает все большее и большее распространение, так как позволяет определять количества веществ гораздо меньшие, чем это возможно путем весового анализа.

*** Нефелометрировать следует растворы близкие по концентрации; во всяком случае отношение концентрации сравниваемых жидкостей не должно выходить за пределы 1 : 4.

уксусной кислотой, осаждают 3 см³ раствора K₂CrO₄ и доводят до метки водой.

Для определения степени мутности сравниваемые жидкости помещают в нефелометр в 2 пробирки, которые освещают спереди, и наблюдают сверху конус Тиндаля (свет, отраженный от взвешенных частиц). Высота освещенной части каждой пробирки может быть произвольно изменяема и измерена. Наблюдаются прямая пропорциональность между степенью мутности и концентрацией обуславливающего мутность вещества и обратная пропорциональность между высотой освещенного слоя (столба) и концентрацией двух растворов одного и того же вещества при одинаковой степени мутности. Если обозначить концентрации обоих растворов C и C' , высоту освещенных столбов жидкости (при одинаковой степени мутности) через d и d' , то справедливым является уравнение $C' = \frac{C \cdot d}{d'}$; зная концентрацию C и высоту столбов d и d' , можно вычислить концентрацию C' .

Определение производят в темной комнате, причем глазу предварительно дают адаптироваться к темноте в течение 5—10 минут. Источник света устанавливают так, чтобы обе пробирки были одинаково освещены. Чтобы проверить равномерность освещения, в обе пробирки помещают одну и ту же мутную жидкость,—при одинаковой ширине щели на обеих сторонах яркость обоих полей зрения в пробирке должна быть одинаковой и сохраняться, если обе пробирки поменять местами. Затем в тщательно вымытые и высушенные пробирки помещают исследуемую жидкость и стандарт и, меняя высоту освещенных столбов сравниваемых жидкостей, добиваются того, чтобы яркости обоих полей зрения в приборе снова совершенно сравнялись, и отмечают (в миллиметрах) высоту освещенных столбов испытуемой жидкости и стандарта. Производят несколько отсчетов, берут среднее арифметическое из них и вычисляют концентрацию свинца в исследуемой жидкости по приведенной выше формуле.

17. Ртуть

Определение по методу Стуковенкова

Ртуть появляется в моче при лечении ртутными препаратами, при отравлении ртутными солями или парами ртути (в большинстве случаев профессиональных отравлений ртутью). Определение содержания ртути в моче является важным в качестве контроля при лечении сифилиса ртутью.

Определение основано на образовании амальгамы меди и на выделении из нее при нагревании ртути в форме HgJ_2 .

Реактивы

1. Свежий куриный белок.
2. Хлористый натрий.
3. 1% раствор уксусной кислоты.
4. Соляная кислота уд. веса 1,19.
5. Свежевычищенная наждачной бумагой лента (около 5 мм шириной и около 1 м длиной) из латунной биты.
6. Этиловый спирт.
7. Эфир.
8. Иод.

Определение

500 см³ хорошо перемешанной нефильтрованной мочи смешивают с 2—5 см³ куриного белка и 0,5—1 г NaCl * и нагревают на кипящей водяной бане, пока не образуются хорошо оседающие хлопья; щелочную или нейтральную на лакмус мочу слабо подкисляют разведенной уксусной кислотой, прибавляя ее по каплям. Осадок, захватывающий всю ртуть, отфильтровывают через плотный фильтр (лучше—через так наз. уплотненный фильтр) и переносят в маленький стакан, закрывающийся часовым стеклом, или в баночку с притертой пробкой; прибавляют 25—30 см³ соляной кислоты, опускают в жидкость свернутую латунную ленту и оставляют на сутки, помешивая время от времени. Белок растворяется, а ртуть выделяется на меди. Латунную ленту вынимают, промывают последовательно водой, спиртом и эфиром. По испарении эфира ленту помещают в сухую, из тугоплавкого стекла, пробирку (длиной 16—18 см, внутреннего диаметра 8—9 мм), на дно которой предварительно бросают маленький кристаллик иода. Держа горизонтально и все время медленно вращая, пробирку нагревают на очень маленьком пламени, начиная со дна и постепенно доходя до обращенной к отверстию пробирки части латунной ленты. Выше этого места пробирку обертывают полоской фильтровальной бумаги, слегка смоченной водой для охлаждения возгоняющихся паров иодной ртути. HgJ_2 оседает в виде яркокрасного кольца в верхней холодной части пробирки. Пробирку продолжают вра-

* Способствует лучшему свертыванию белка и препятствует улетучиванию HgCl_2 при нагревании.

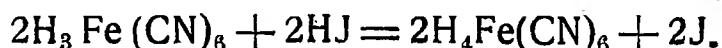
щать, пока она не остынет, затем, повернув ее отверстием к низу, осторожно вынимают ленту. Кольцо имеет тем большую ширину и интенсивность окраски, чем выше содержание ртути в моче. Если было взято недостаточно иода, то кольцо получается желтоватого цвета; в этом случае бросают в пробирку еще маленький кристаллик иода, дно пробирки слегка нагревают и оставляют пробирку на некоторое время—кольцо принимает яр-кокрасную окраску. Ширину и интенсивность окраски полученного кольца сравнивают в отраженном свете на черном фоне с кольцами, полученными по описанному способу с мочой, к которой были прибавлены, например в виде сулемы (HgCl_2), различные количества ртути (0,02 мг, 0,04 мг, ... 0,10 мг, ... 0,15 мг и т. д.). 1 мг Hg соответствует 1,3535 мг HgCl_2 . Эти кольца (эталон) бледнеют при долгом хранении, поэтому иногда пользуются точными цветными изображениями на бумаге пробирок с кольцами; промежутки между пробирками закрашивают в черный цвет.

Этот метод позволяет обнаружить до 0,01 мг ртути в 500 см³ мочи.

МИКРОМЕТОДЫ

I. Микроопределение сахара в крови по методу Хагедорна и Иенсена (Hagedorn, Jensen)

Метод основан на восстановлении железосинеродистого калия $K_3Fe(CN)_6$ до железистосинеродистого $K_4Fe(CN)_6$ при нагревании в щелочной среде с несодержащим белков фильтратом крови*. Избыток железосинеродистой соли определяют иодометрическим титрованием в кислой среде:



В виду обратимости этой реакции ее проводят в присутствии сернокислого цинка, осаждающего железистосинеродистоводородную кислоту: $2H_4Fe(CN)_6 + 3ZnSO_4 \rightarrow H_2Zn_3[Fe(CN)_6]_2 + 3H_2SO_4$.

Реактивы

1. n/10 NaOH
2. 45% водный раствор сернокислого цинка ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$).
3. 0,45% водный раствор сернокислого цинка (его готовят из 45% раствора) сохраняет годность не дольше 1 недели.
4. Водный раствор, содержащий в 1 литре 1,65 г чистого для анализа железосинеродистого калия и 10,6 г безводной соды (раствор должен храниться в склянке оранжевого стекла).
5. Раствор 10 г химически чистого, не содержащего железа сернокислого цинка и 50 г NaCl в 175 см³ воды.
6. Раствор 5 г KI в 25 см³ воды.
7. 3% уксусная кислота (3 см³ ледяной уксусной кислоты, не содержащей железа, растворяют в 100 см³ воды).
8. Раствор 1 г крахмала в 100 см³ насыщенного раствора поваренной соли.

* Помимо глюкозы и некоторые другие вещества, например мочевая кислота, креатинин, способны восстанавливать $K_3Fe(CN)_6$ в щелочной среде.

9. n/200 раствор иодноватокислого калия (0,1784 г химически чистого и сухого KJO_3 на 1 литр раствора). В случае необходимости очистить препарат, его перекристаллизовывают несколько раз из воды и высушивают до постоянного веса при 180° .

10. n/200 раствор тиосульфата (0,7 г чистого кристаллического $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 500 см^3 свежей, дважды перегнанной и охлажденной воды или 5 см^3 n/10 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ разбавляют в мерной колбочке на 100 см^3 в 20 раз водой). Титр тиосульфата устанавливают по n/200 раствору KJO_3 : в маленькой эрленмейеровской колбочке растворяют немного иодистого калия в небольшом количестве воды, подкисляют 5% соляной кислотой и прибавляют из пипетки 2 см^3 n/200 KJO_3 ; выделившийся иод ($\text{KJO}_3 + 5\text{KI} + 6\text{HCl} = 6\text{KCl} + 3\text{H}_2\text{O} + 3\text{I}_2$) оттитровывают из микробюретки тиосульфатом (индикатор—2 капли 1% раствора крахмала в NaCl).

Фактор раствора тиосульфата, т. е. величину, указывающую во сколько раз данный раствор тиосульфата крепче или слабее n/200 раствор, находят делением взятого для титрования объема n/200 раствора KJO_3 (2 см^3) на количество (a) см^3 тиосульфата, пошедшего на титрование

$$\left(f = \frac{2,00}{a}\right).$$

Для титрования пользуются бюреткой на 2 см^3 с делениями до $0,02 \text{ см}^3$ (микробюретка, рис. 26). Микробюретку можно легко сделать из точной пипетки с делениями на $0,02 \text{ см}^3$, присоединив ее, как изображено на рис. 27, к склянке с титрованным раствором при помощи T-образной стеклянной трубки и недлинных, эластичных каучуковых трубок с довольно толстыми стенками. Носик бюретки делают из узкой стеклянной трубки, оттянутой в капилляр, длиной в 5—8 см с наружным диаметром около 1 мм. Большое трение о стенки такого капилляра делает возможным выпускание жидкости очень малыми порциями. На каучуковую трубку, соединяющую носик бюретки с нижним концом T-образной трубки, надевают зажим или внутрь каучуковой трубки вставляют плотно входящую маленькую оплавленную стеклянную палочку или бусину; при сдавлива-

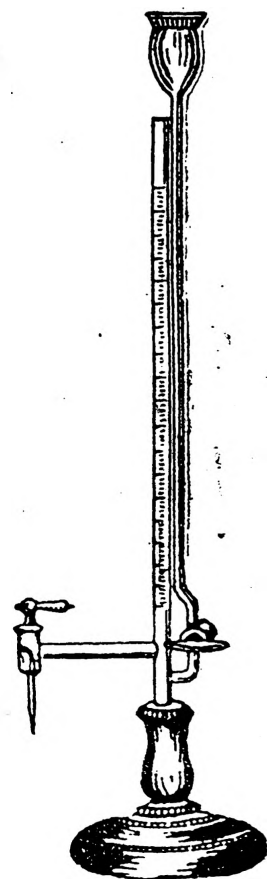


Рис. 26.

нии каучуковой трубки с двух сторон в месте нахождения стеклянной палочки, вдоль палочки образуется узкий канал, по которому может стекать жидкость.

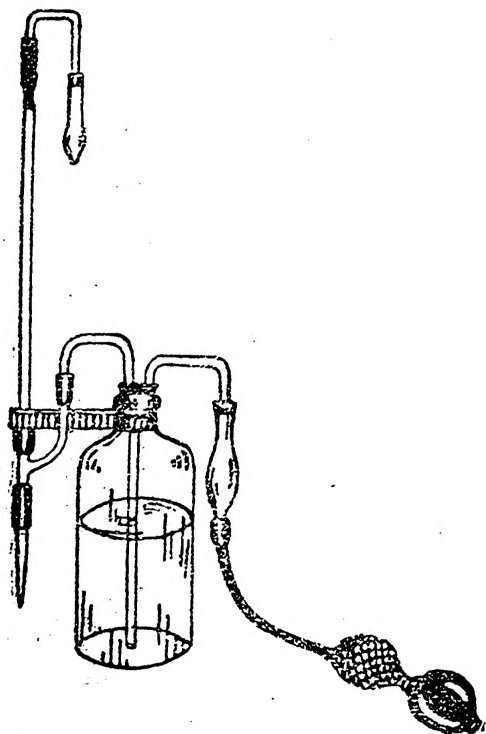


Рис. 27.

Вся посуда должна быть тщательно вымыта хромовой смесью, затем водой и высушена.

Производство определения

В каждом анализе проводят несколько (не менее двух) параллельных основных определений и не менее двух слепых опытов с одними реактивами без добавления крови.

Удаление белков

1 см³ n/10 NaOH смешивают в пробирке с 5 см³ 0,45% раствора сернокислого цинка, образуется белый студенистый осадок гидроокиси цинка. В эту смесь выдувают из микропипетки 0,1 см³ свеж взят

той крови* и дважды ополаскивают пипетку этой же смесью, набирая ее в пипетку и снова выдувая. Затем пробирку нагревают 3 минуты в кипящей водяной бане и жидкость отфильтровывают от осадка свернувшихся белков через вату** в маленькую эрленмейеровскую колбочку. Пробирку и воронку с ватой промывают горячей дистиллированной водой (2 раза по 3 см³ воды).

* Кровь набирают после укола в палец в обезжиренную хромовую смесью вымытую водой и тщательно высушенную капиллярную пипетку на 0,1 см³ с делениями на 0,001 см³ (микропипетка). Удаление белков следует производить тотчас же по взятии крови, так как этим устраняется возможность наступления гликолиза, идущего в цельной крови. Безбелковый фильтрат при хранении на льду остается годным для анализа в течение 1–2 дней.

** Для фильтрования употребляют воронку диаметром 3–4 см со вставленным маленьким не очень плотным кусочком ваты; вату предварительно промывают на воронке горячей дистиллированной водой до исчезновения в промывных водах реакции на сахар (стр. 71), затем сушат; перед фильтрованием осадка белка вату слегка смачивают дистиллированной водой.

Определение сахара

К несодержащей белков жидкости прибавляют 2 см³ щелочного раствора железосинеродистого калия и смесь нагревают в кипящей водяной бане 15 минут. По остывании (но не позднее, чем через 6 часов) прибавляют 2,6 см³ раствора ZnSO₄ в поваренной соли и затем 0,4 см³ раствора иодистого калия, перемешивают содержимое колбочки взбалтыванием и подкисляют 2 куб. сантиметрами уксусной кислоты. Выделившийся иод отфильтровывают тиосульфатом, прибавив 2 капли крахмального раствора.

Расчет

Содержание сахара находят по прилагаемой эмпирической таблице, составленной для точно $n/200$ раствора тиосульфата. Если для титрования применялся раствор тиосульфата не точно $n/200$, то, умножая число пошедших на титрование куб. сантиметров раствора на его фактор, находят объем, отвечающий точно $n/200$ раствору. Разность в величинах содержания сахара, найденных из основных опытов и из слепых, дает содержание глюкозы в миллиграммах в 0,1 см³ крови. Для выражения в мг-% эту величину умножают на 1000.

Пример расчета: израсходовано на титрование в основном опыте 1,32 см³ тиосульфата (среднее из нескольких определений), в слепом—1,86 см³ (среднее из нескольких определений). При установке титра на 2 см³ $n/200$ -KJO₃ пошло 1,90 см³ тиосульфата; отсюда фактор раствора тиосульфата $f = \frac{2,00}{1,90} = 1,0526$; умножая на фактор, получаем для основного опыта 1,39 см³ $n/200$ -Na₂S₂O₃, для слепого—1,96 см³. Из таблицы находим для основного опыта величину 0,108, для слепого—0,007, откуда искомое содержание глюкозы = 0,101 мг в 0,1 см³ крови = 101 мг-%.

Исходя из того, что на восстановление 2 см³ $n/200$ -K₃Fe(CN)₆ расходуется 0,385 мг глюкозы, содержание глюкозы в исследуемой жидкости может быть также вычислено с достаточной точностью по формуле $x = \frac{0,385 \cdot a}{2,00}$, где a обозначает количество куб. сантиметров $n/200$ -K₃Fe(CN)₆, восстановленного взятой пробой.

Таблица для нахождения содержания глюкозы по Хагедорну и Иенсену

$\frac{n}{200}$	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
0,0	0,385	0,382	0,379	0,376	0,373	0,370	0,367	0,364	0,361	0,358	
0,1	0,355	0,352	0,350	0,348	0,345	0,343	0,341	0,338	0,336	0,333	
0,2	0,331	0,329	0,327	0,325	0,323	0,321	0,318	0,316	0,314	0,312	
0,3	0,310	0,308	0,306	0,304	0,302	0,300	0,298	0,296	0,294	0,292	
0,4	0,290	0,288	0,286	0,284	0,282	0,280	0,278	0,276	0,274	0,272	
0,5	0,270	0,268	0,266	0,264	0,262	0,260	0,259	0,257	0,255	0,253	
0,6	0,251	0,249	0,247	0,245	0,243	0,241	0,240	0,238	0,236	0,234	
0,7	0,232	0,230	0,228	0,226	0,224	0,222	0,221	0,219	0,217	0,215	
0,8	0,213	0,211	0,209	0,208	0,206	0,204	0,202	0,200	0,199	0,197	
0,9	0,195	0,193	0,191	0,190	0,188	0,186	0,184	0,182	0,181	0,179	
1,0	0,177	0,175	0,173	0,172	0,170	0,168	0,166	0,164	0,163	0,161	
1,1	0,159	0,157	0,155	0,154	0,152	0,150	0,148	0,146	0,145	0,143	
1,2	0,141	0,139	0,138	0,136	0,134	0,132	0,131	0,129	0,127	0,125	
1,3	0,124	0,122	0,120	0,119	0,117	0,115	0,113	0,111	0,110	0,108	
1,4	0,106	0,104	0,102	0,101	0,099	0,097	0,095	0,093	0,092	0,090	
1,5	0,088	0,086	0,084	0,083	0,081	0,079	0,077	0,075	0,074	0,072	
1,6	0,070	0,068	0,066	0,065	0,063	0,061	0,059	0,057	0,056	0,054	
1,7	0,052	0,050	0,048	0,047	0,045	0,043	0,041	0,039	0,038	0,036	
1,8	0,034	0,032	0,031	0,029	0,027	0,025	0,024	0,022	0,020	0,019	
1,9	0,017	0,015	0,014	0,012	0,010	0,008	0,007	0,005	0,003	0,002	

В левом столбце помещены целые и десятые доли, в верхнем горизонтальном—сотые доли куб. сантиметров израсходованного на титрование $n/200$ -раствора тиосульфата. Число, помещенное на перекресте линий, идущих от целых и от сотых долей $\text{cm}^3 \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, указывает содержание глюкозы в миллиграммах в $0,1 \text{ cm}^3$ крови.

II. Микроопределение остаточного азота (небелкового азота) в крови по Фолину (Folin)

Метод основан на удалении из крови белков (осаждением вольфрамвокислым натрием и серной кислотой) и переведении всего азота безбелкового фильтрата сжиганием в аммиак, который определяют колориметрически прямой несслеризацией*.

Удаление белков по Филлону и Ву (Wu)

Реактивы: 1. 10% раствор вольфрамвокислого натрия ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); препарат должен хорошо растворяться в воде и не содержать значительных количеств соды: на 10 см³ приготовленного раствора реактива не должно итти более 0,4 см³ n/10-соляной кислоты для нейтрализации.

2. 2/3 n- H_2SO_4 (раствор, содержащий в 1 литре 18,47 см³ концентрированной H_2SO_4 уд. веса 1,84).

3. 10% раствор H_2SO_4 .

Осаждение. К 5 см³ оксалатной** крови, в колбочке или небольшой склянке, прибавляют из пипетки или бюретки семи-кратный объем воды (35 см³). Пипетку, которой отмеривалась кровь, промывают повторным насасыванием и выпусканьем полученного раствора. Жидкость оставляют стоять до наступления полного гемолиза, затем прибавляют 5 см³ 10% раствора вольфрамвокислого натрия и медленно, взбалтывая после каждой капли, 5 см³ 2/3n H_2SO_4 . Колбочку закрывают каучуковой пробкой, несколько раз сильно встряхивают и оставляют стоять.

* Все операции, связанные, как с производством самого определения, так и с приготовлением реактивов, проводятся в проветренном, не содержащем паров аммиака, помещении. Как в ходе самого анализа, так и для приготовления растворов рекомендуется употреблять свободную от аммиака воду. Этому достигают перегонкой дистиллированной воды, подкисленной серной кислотой или взбалтыванием дистиллированной воды с пермутитом (пермутиты—искусственные силикаты натрия и алюминия, обладающие способностью поглощать аммиак из нейтральных или слабокислых растворов).

** Для предохранения от свертывания, кровь, взятую шприцем или уколом, собирают в сухую пробирку, содержащую твердый щавелевокислый натрий в таком количестве, чтобы получился по добавлению крови 0,1—0,2% раствор. Во время вливания крови пробирку слегка встряхивают, а затем, закрыв отверстие, несколько раз перепрокидывают, чтобы достигнуть хорошего смешения.

5 минут. Окраска осадка белка должна при этом приобрести бурый оттенок, жидкость не должна пениться при взбалтывании. Если этих изменений не произошло (что обычно зависит от избытка щавелевокислой соли, взятой для предохранения крови от свертывания), то добавляют еще немного, но не более 10 капель, 10% H_2SO_4 , сильно взбалтывая после каждой капли, пока жидкость не перестанет пениться и не появится бурая окраска. Фильтруют через сухой складчатый фильтр, который сначала смачивают несколькими куб. сантиметрами отстоявшейся жидкости. Фильтрат должен быть бесцветен и прозрачен* и иметь лишь очень слабо кислую на конго реакцию. Этот фильтрат, отвечающий 10-кратному разбавлению крови, используют для определения остаточного азота**.

Определение остаточного азота

Реактивы. 1. Смесь для сжигания органического вещества готовят следующим образом: 50 см³ 5% раствора медного купороса смешивают с 300 см³ 85% фосфорной кислоты и 100 см³ чистой, не содержащей аммонийных солей, концентрированной серной кислоты. 50 см³ этой смеси разбавляют 50 куб. сантиметрами воды и употребляют при сжигании. Оба раствора (разбавленная и неразбавленная смеси кислот)

* Так как фильтруется очень медленно, то удобнее жидкость отделить от осадка центрифугированием после 2—3-минутного нагревания в кипящей водяной бане.

** Безбелковые фильтраты, полученные по описанному методу, содержат некоторое количество продуктов разрушения эритроцитов, что может вредить точности проводимых далее определений. Поэтому Ф о л и н предложил метод получения безбелкового фильтрата, не требующий гемолиза крови:

Реактивы: 1. Водный раствор, содержащий в 1 литре
6 г $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ и 15 г Na_2SO_4 (безводного).

2. $1/3$ n- H_2SO_4 .

О с а ж д е н и е: К 40 см³ (8 объемов) раствора вольфрамвокислого и серноокислого натрия прибавляют 5 см³ (1 объем) оксалатной крови. Осторожно, чтобы не произвести механического повреждения эритроцитов, жидкости смешивают и оставляют стоять 5 минут, помешивая время от времени. Затем медленно, при осторожном, но постоянном помешивании, приливают 5 см³ (1 объем) $1/3$ n- H_2SO_4 , смесь переносят в центрифужные пробирки на 15 см³ и 10 минут центрифугируют при неслишком большой скорости. Отцентрифужированная прозрачная и бесцветная жидкость берется для исследования.

должны сохраняться в склянках с хорошо шлифованными стеклянными пробками во избежание поглощения аммиака из воздуха (стр. 218).

2. Реактив Несслера (Nessler). 22,5 г иода прибавляют к раствору 30 г иодистого калия в 20 см³ воды, туда же вливают 30 г чистой ртути и сильно взбалтывают в течение 10—15 минут, охлаждая под водопроводным краном, если происходит саморазогревание жидкости. По исчезновении желтого от иода окрашивания жидкости, раствор сливают с осадка и несколько его капель испытывают крахмальным клейстером. Должно наступить посинение, указывающее на небольшой избыток свободного иода. Если синего окрашивания не появилось, то ко всей жидкости прибавляют по каплям раствор иода в иодистом калии указанной выше концентрации, до появления небольшого избытка иода (проба с крахмальным клейстером). Затем объем жидкости доводят водой до 200 см³, хорошо перемешивают и вливают в 975 см³ точно 10% раствора едкого натра, свободного от примеси углекислых солей, снова перемешивают и дают отстояться. 10 см³ этого отстоявшегося прозрачного раствора разбавляют в 10 раз водой в мерной колбочке на 100 см³ и употребляют для определения аммиака. В плотно закрывающейся склянке оранжевого стекла реактив сохраняет годность неограниченно долгое время.

Для приготовления 10% раствора едкого натра, не содержащего соды, 240 г химически чистого NaOH растворяют в 200 см³ воды и оставляют стоять в хорошо закрытой склянке на несколько дней, чтобы осели все углекислые соли. Прозрачную жидкость сливают в плотно закрывающуюся склянку. Отмеривают пипеткой несколько куб. сантиметров щелочи, разбавляют в 10 раз водой и оттитровывают *n*/1-соляной или серной кислотой в присутствии фенол-фталеина. Добавляя по расчету воду, готовят точно 10% раствор едкого натра.

Если в несслеровском реактиве недостаточно щелочи или содержится углекислая щелочь, то при несслеризации образуется бурокрасная муть, делающая невозможным колориметрирование. Правильно приготовленного реактива Несслера идет 11—11,5 см³ на титрование 20 куб. сантиметров *n*/1-соляной кислоты (индикатор фенол-фталеин).

3. Стандартный раствор сернокислого аммония, содержащий 1 мг азота в 10 см³, готовят растворением хими-

чески чистого $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,4716 г на 1 литр раствора) в несодержащей аммиака воде. В случае надобности сернокислый аммоний очищают повторным осаждением из водного раствора алкоголем и высушивают в эксикаторе над серной кислотой или нагреванием при 110° до постоянного веса.

О п р е д е л е н и е

5 см³ безбелкового фильтрата помещают в сухую пробирку тугоплавкого стекла (диаметр примерно $2\frac{1}{2}$ см, высота—20 см) с метками 35 см³ и 50 см³. Затем прибавляют 1 см³ смеси для сжигания, бросают кусочек платиновой проволоки для предохранения от толчков при кипении и сильно кипятят на пламени микрогорелки до появления тяжелых белых паров серного ангидрида (на это требуется от 3 до 7 минут). Когда пары заполнят всю пробирку, горелку опускают так, чтобы только поддерживалось кипение, покрывают отверстие пробирки часовым стеклом и продолжают нагревание, пока раствор не станет почти совершенно бесцветным (обычно через $\frac{1}{2}$ минуты). Через 2 минуты от момента появления белых паров и во всяком случае не позднее, чем через 3 минуты, горелку отставляют, дают жидкости охладиться в течение $1\frac{1}{2}$ минут и разбавляют 15—25 куб. сантиметрами воды. По охлаждении до комнатной температуры прибавляют воды до метки 35 см³ и затем реактива Несслера до метки 50 см³, закрывают пробирку чистой каучуковой пробкой и перемешивают (если жидкость мутна, то центрифугируют) и прозрачную желтую жидкость сравнивают в колориметре с несслеризованным раствором сернокислого аммония, содержащим 0,3 мг азота в 100 см³ (3 см³ стандартного раствора сернокислого аммония помещают в мерную колбочку на 100 см³, прибавляют туда 2 см³ смеси для сжигания, воды примерно до объема 60 см³, 30 см³ реактива Несслера и доводят водой до метки). Реактив Несслера прибавляют к испытуемой жидкости и к стандартному раствору в одно время. Колориметр устанавливают так, чтобы свет проходил через слой стандартного раствора в 20 мм. Меняя высоту столба исследуемой жидкости, добиваются того, чтобы интенсивности окраски обеих жидкостей совершенно сравнялась и отмечают в миллиметрах высоту столба исследуемой жидкости. Производят несколько отсчетов, которые не должны расходиться между собой

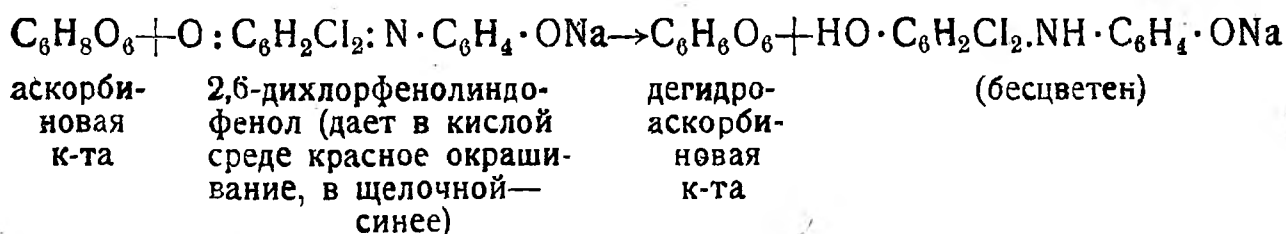
более, чем на 0,3 мм, и берут среднее арифметическое из них (а мм).

Расчет. По формуле $x = \frac{20}{a} \cdot 0,3$ находят количество миллиграммов остаточного азота, содержащегося в 1 см³ крови*. Умножая эту величину на 100, находят содержание остаточного азота, выраженное в миллиграмм-процентах. Вносят поправку на основании результатов слепого опыта, сделанного с одними реактивами без крови. В каждом анализе проводят несколько параллельных основных и слепых опытов.

III. Количественное определение витамина С

[Метод Тильманса в модификации Бесей и Кинг (Tillmans, Bessey, King)].

Метод основан на восстановлении 2,6-дихлорфенолиндофенола аскорбиновой кислотой. Реакция идет по уравнению:



а) Приготовление раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола. 0,10 г натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола растворяют в горячей воде, добавляя ее небольшими порциями, затем остужают раствор, доводят его водой до объема 200 см³ и фильтруют. Для придания раствору краски большей стойкости, добавляют немного фосфатного буфера рН 6,8 (стр. 210) и хранят раствор в склянке оранжевого стекла. 2,6-дихлорфенолиндофенол в твердом и сухом виде вполне устойчив, но в водном растворе медленно изменяется и потому титр раствора должен устанавливаться ежедневно. Растворами краски, стоявшими более 5 дней, не следует пользоваться, так как при их употреблении трудно уловить конец реакции: раствор при восстановлении не обесцвечивается, а переходит от красной окраски к бурой.

* Так как 0,5 см³ крови (количество крови, отвечающее 5 куб. сантиметрам взятого для анализа безбелкового фильтрата) нецелеризовались в объеме 50 см³, то 1 куб. сантиметру крови отвечает нецелеризация в 100 см³.

б) Установление титра раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола. Отмеривают пипеткой 5 см³ свежеприготовленного профильтрованного лимонного сока, прибавляют немного крахмального клейстера и титруют из микробюретки со стеклянным краном n/100 раствором иода, содержащим 15 г иодистого калия на 1 литр раствора, до появления не исчезающего голубого окрашивания. Каждый куб. сантиметр n/100 раствора иода соответствует 0,88 мг аскорбиновой кислоты (в лактонной форме).

Другие 5 см³ лимонного сока титруют раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления не исчезающей в течение 1/2—1 минуты розовой окраски.

На основании результатов титрования иодом определяют содержание витамина С в лимонном соке и вычисляют титр раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, выражая его в миллиграммах аскорбиновой кислоты, отвечающих 1 куб. сантиметру раствора краски.

в) Приготовление и титрование экстрактов из животных и растительных тканей. В большинстве случаев одного выжимания сока из ткани оказывается недостаточным для полного извлечения витамина, приходится растирать ткани с песком в присутствии кислоты, которая предохраняет витамин от быстрого окисления под влиянием освобождающихся ферментов. Для подкисления, в случае животных тканей, применяют трихлоруксусную кислоту, которая осаждает белки, мешающие при титровании. Но сама трихлоруксусная кислота вызывает медленное побледнение раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, что должно быть принято во внимание при производстве титрования. Растительные ткани извлекают горячей уксусной кислотой, которая с 2,6-дихлорфенолиндофенолом не реагирует.

Отвешивают 5—10 г подлежащей исследованию ткани и тщательно растирают в ступке с чистым белым песком* и 25 см³ 8% трихлоруксусной кислоты (в случае животных тканей) или 8% горячей уксусной кислоты (в случае растительной ткани). Центрифугируют и прозрачную жидкость сливают с осадка. Новыми 10 см³ кислоты обмывают ступку, смешивают промыв-

* Для очищения белый песок кипятят в течение 1 часа с концентрированной соляной кислотой, промывают водой до исчезновения в промывных водах реакции на железо, затем прокалывают в фарфоровом тигле, вновь кипятят с соляной кислотой, тщательно промывают водой до исчезновения кислой реакции на лакмус и сушат.

ную жидкость с осадком и вновь центрифугируют. Промывание повторяют еще 1 раз 5 см³ кислоты. Полученные экстракты соединяют и доводят в мерной колбе водой до объема 50 см³. 10 см³ этого раствора разбавляют 40 куб. сантиметрами дистиллированной воды или 8% раствора соответствующей кислоты и титруют 2,6-дихлорфенолиндофенолом до появления не исчезающей слабой розовой окраски и вычисляют содержание витамина С.

Витамин С реагирует с 2,6-дихлорфенолиндофенолом очень быстро, так что на титрование уходит примерно всего 1 минута. Конечная окраска, в случае растительных тканей, сохраняется некоторое время неизменной, но в случае животных тканей и в экстрактах, содержащих глутатион (стр. 62) или трихлоруксусную кислоту, наступает медленное побледнение, которое не должно смешивать с действием витамина С; такие экстракты титруют только до момента, когда прекращается быстрое побледнение окраски.

Поскольку приведенный метод количественного определения аскорбиновой кислоты основан на восстановлении 2,6-дихлорфенолиндофенола, всякое другое вещество, обладающее более низким восстановительным потенциалом, чем 2,6-дихлорфенолиндофенол, если оно присутствует в растворе, может являться источником ошибки. Подобные вещества встречаются в организме вместе с витамином С, но скорость реакции витамина С с 2,6-дихлорфенолиндофенолом обычно значительно больше, чем у большинства этих соединений. Однако наличие в экстракте таких веществ, как цистеин, пирогаллол, продукты расщепления тростникового сахара или глюкозы под влиянием нагревания со щелочами („редуктоны“), может повести к очень грубым ошибкам в определении витамина С. При титровании экстрактов из растительных тканей, богатых витамином С, например при определении содержания аскорбиновой кислоты в лимонном соке, ошибка, зависящая от присутствия мешающих веществ, равна 2—3%; при титровании экстрактов из животных тканей ошибка достигает 6—8% в соответствии с большим содержанием мешающих веществ и наличием трихлоруксусной кислоты.

Наблюдаются случаи, когда в экстракте, восстанавливающем 2,6-дихлорфенолиндофенол, не содержится витамина С и наоборот при наличии аскорбиновой кислоты в обратимо окисленной форме она не обнаруживается титрованием 2,6-дихлорфенолиндофенолом, но может быть обнаружена биологической пробой на животных.

IV. Манометрический метод Варбурга (O. Warburg)

Для изучения реакций, идущих с поглощением или выделением газов, очень удобным и точным является метод Варбурга, основанный на измерении давления в системе при постоянном объеме и постоянной температуре. Метод Варбурга позволяет изучать и процессы обмена в клетках и тканях, идущие при участии газов (например, дыхание, ассимиляцию угольной кислоты, некоторые виды брожения), процессы, ведущие к образованию кислот, способных вытеснять CO_2 из прибавленных бикарбонатов (гликолиз, омыление жиров липазой и др.), процессы, сопровождающиеся освобождением оснований, поглощающих CO_2 , и т. п.

Аппарат Варбурга состоит из ряда гидростатических двухколенных манометров с притертыми к правому колену сосудиками, опущенными в водяной термостат и приводимыми качательным механизмом в движение для ускорения установления абсорбционного равновесия между жидкостью и газом. Сосудики имеют различную, в зависимости от задач, форму и величину и обычно снабжены притертой пробкой. Правое колено манометра имеет сверху кран для сообщения с наружным воздухом. Внизу, у места схождения обоих колен, манометр имеет отросток, заканчивающийся слепой каучуковой трубкой, наполненной замыкающей жидкостью. Вращением винта, нажимающего на каучуковую трубку, уровень замыкающей жидкости в манометре может подниматься и опускаться. Замыкающей жидкостью служит ртуть или жидкость Броди (Brodie): раствор 23 г NaCl и 5 г холеиновокислого натрия в 500 cm^3 воды, подкрашенный эозином или индигокармином и смешанный с несколькими каплями концентрированного спиртового раствора тимола. 1000 мм жидкости Броди = 760 мм Hg.

Чтобы по показанию манометра судить о количестве определяемого газа, необходимо знать объем сосуда и его так называемую „константу“.

К а л и б р и р о в а н и е производится или взвешиванием (стр. 202) наполненного ртутью или водой сосудика с примыкающей к нему частью капилляра манометра до середины правого колена (нулевого деления), или же манометрическим путем. При манометрическом калибровании водой, слегка влажный внутри сосудик, соединенный с манометром (шлиф тщательно смазывают безводным ланолином) и укрепленный пружинными спиральями или резиновыми трубками, помещают в термостат при комнатной температуре. При открытом кране опускают жидкость в манометр.

метре на 10—20 мм ниже нулевого деления и, закрыв кран, вращением винта поднимают уровень в правом колене до нулевого деления. Жидкость в левом колене поднимается при этом на некоторую бóльшую величину h_1 , которую отмечают после того, как уровень установится, что происходит не сразу по прекращении вращения винта. Затем в сосудик помещают некоторый объем (a) воды (a должно отвечать примерно $1/2$ объема сосудика) и повторяют определение; при этом уровень жидкости в левом колене поднимается на еще бóльшую величину— h_2 .

Так как в обоих определениях в сосудик, содержащий во 2-м случае объем a воды, вгоняется один и тот же объем (x) газа, то по закону Бойля (Boyle):

$$(P + h_1) v = P(v + x)$$

$$(P + h_2)(v - a) = P(v - a + x),$$

где P —атмосферное давление, v —объем сосудика.

Решение этих уравнений дает для объема (v) сосудика следующее выражение:

$$v = \frac{ah_2}{h_2 - h_1}.$$

Во время определения колебания температуры не должны превышать $0,5^\circ$, колебания атмосферного давления—5 мм Hg. При калибровании ртутью сосудик должен быть совершенно сухим.

Определив объем сосудика, вычисляют его „константу“ (k) по формуле Варбурга:

$$k = \frac{v_1 \cdot \frac{237}{T} + v_2 \alpha}{P_0},$$

где v_1 —объем газа в сосудике, v_2 —объем жидкости в сосудике, T —абсолютная температура, P_0 —нормальное давление (760 мм Hg или 10000 мм жидкости Броди), α —коэффициент абсорбции в воде измеряемого газа.

Так как α зависит от природы газа*, то соответственно меняется и величина константы k . Различают k_{O_2} , k_{CO_2} , k_{N_2} , k_{H_2} и т. д. Как видно из формулы, величина константы k меняется также в зависимости от количества жидкости в сосудике и от температуры.

Объем (v) определяемого газа находят, умножая константу k на

* Величину α находят в справочных таблицах („Спутник химика“ и др.).

Для O_2 при 18° $\alpha = 0,0322$ Для CO_2 при 18° $\alpha = 0,928$

„ „ „ 25° $\alpha = 0,0283$ „ „ „ 25° $\alpha = 0,759$

„ „ „ $37,5^\circ$ $\alpha = 0,0237$ „ „ „ $37,5^\circ$ $\alpha = 0,561$

величину h — наблюдавшееся по манометру изменение давления, выраженное в миллиметрах замыкающей жидкости (ртути или жидкости Броди):

$$\pm v = \pm hk.$$

Чем меньше k , тем больше чувствительность метода. v выражается в куб. миллиметрах или куб. сантиметрах в зависимости от того, в каких единицах выражены v_1 и v_2 в формуле Варбурга.

Приведенная формула для определения объема газа пригодна лишь в тех случаях, когда меняется парциальное давление только одного какого-либо газа. Она применима и в тех случаях, когда нормально должны бы меняться парциальные давления двух газов, но наличие поглотителя (например, щелочей для CO_2 , Pd-асбеста для H_2) позволяет определить изменение парциального давления только одного газа.

В тех случаях, когда образуются или исчезают несколько газов (например, O_2 и CO_2 при дыхании и ассимиляции CO_2 , или H_2 и CO_2 при маслянокислом брожении) наблюдаемое изменение давления (h) равно сумме изменений парциальных давлений отдельных газов, например,

$$h = h_{\text{O}_2} + h_{\text{CO}_2}$$

и соответствующие объемы образующихся или исчезающих газов будут:

$$v_{\text{O}_2} = h_{\text{O}_2} k_{\text{O}_2}$$

$$v_{\text{CO}_2} = h_{\text{CO}_2} k_{\text{CO}_2}$$

Этих двух уравнений недостаточно для вычисления v_{O_2} и v_{CO_2} , так как в них содержатся 4 неизвестных: v_{O_2} , v_{CO_2} , h_{O_2} и h_{CO_2} . Чтобы получить нужное число уравнений, проводят параллельные определения в 2 сосудиках одинакового объема с одинаковыми количествами реагирующих веществ, но с различным количеством жидкости; v_{O_2} и v_{CO_2} в обоих сосудиках не меняются, но константы сосудов, а следовательно, и изменения в давлении будут различными. Таким путем получают 6 уравнений:

$$v_{\text{O}_2} = h_{\text{O}_2} k_{\text{O}_2}$$

$$v_{\text{O}_2} = H_{\text{O}_2} K_{\text{O}_2}$$

$$v_{\text{CO}_2} = h_{\text{CO}_2} k_{\text{CO}_2}$$

$$v_{\text{CO}_2} = H_{\text{CO}_2} K_{\text{CO}_2}$$

$$h = h_{\text{O}_2} + h_{\text{CO}_2}$$

$$H = H_{\text{O}_2} + H_{\text{CO}_2}$$

с 6 неизвестными: v_{O_2} , v_{CO_2} , h_{O_2} , h_{CO_2} , H_{O_2} и H_{CO_2} (константы и изменения давления во втором сосудике обозначены большими буквами). Решение уравнений дает:

$$v_{\text{O}_2} = \frac{hk_{\text{CO}_2} - HK_{\text{CO}_2}}{\frac{k_{\text{CO}_2}}{k_{\text{O}_2}} - \frac{K_{\text{CO}_2}}{K_{\text{O}_2}}}$$

$$v_{\text{CO}_2} = \frac{hk_{\text{O}_2} - HK_{\text{O}_2}}{\frac{k_{\text{O}_2}}{k_{\text{CO}_2}} - \frac{K_{\text{O}_2}}{K_{\text{CO}_2}}}$$

Производство определения

Испытуемые вещества помещают в сосудик, который присоединяют к манометру и взбалтывают в термостате при открытом кране в течение 10 минут при постоянной температуре (колебания температуры на всем протяжении определения не должны превышать $0,01^{\circ}$). В случае надобности, из сосудика вытесняют воздух соответствующим газом. Для контроля за изменением температуры и атмосферного давления применяют в качестве термобарометра другой манометр с сосудиком такого же размера, что и в основном опыте, содержащим столько воды, сколько было взято жидкости в основном опыте. Уровень жидкости в манометрах устанавливают на нулевом делении (середина шкалы); по выравниванию температуры, не останавливая качания, закрывают краны и через определенные промежутки времени отмечают показания манометров, прекращая на это время качание и приводя вращением винта уровень замыкающей жидкости в правом колене к нулевому делению. Изменения давления отсчитывают по левому колену и заносят в таблицу, отмечая время. На основании показаний термобарометра вносят поправку и, применяя константу сосуда для соответствующего газа, вычисляют происшедшие за время опыта изменения в количестве газа.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Таблица атомных весов некоторых элементов

Элемент	Сим-вол	Атомный вес	Элемент	Сим-вол	Атомный вес
Азот	N	14,008	Молибден	Mo	95,95
Алюминий	Al	26,97	Мышьяк	As	74,91
Барий	Ba	137,36	Натрий	Na	22,997
Бор	B	10,82	Никель	Ni	58,69
Бром	Br	79,916	Олово	Sn	118,70
Висмут	Bi	209,00	Платина	Pt	195,23
Водород	H	1,0078	Ртуть	Hg	200,61
Вольфрам	W	183,92	Рубидий	Rb	85,48
Железо	Fe	55,84	Свинец	Pb	207,22
Золото	Au	197,2	Сера	S	32,06
Иод	I	126,92	Серебро	Ag	107,880
Кадмий	Cd	112,41	Стронций	Sr	87,63
Калий	K	39,096	Сурьма	Sb	121,76
Кальций	Ca	40,08	Углерод	C	12,00
Кислород	O	16,0000	Уран	U	238,07
Кобальт	Co	58,94	Фосфор	P	31,02
Кремний	Si	28,06	Фтор	F	19,0000
Литий	Li	6,940	Хлор	Cl	35,457
Магний	Mg	24,32	Хром	Cr	52,01
Марганец	Mn	54,93	Цезий	Cs	132,91
Медь	Cu	63,57	Цинк	Zn	65,38

Приложение 2

Таблица упругости насыщенного водяного пара

t°	Упругость в мм ртутного столба	t°	Упругость в мм ртутного столба
0,0	4,6	15,0	12,8
0,5	4,8	15,5	13,2
1,0	4,9	16,0	13,6
1,5	5,1	16,5	14,0
2,0	5,3	17,0	14,5

t°	Упругость в мм ртутного столба	t°	Упругость в мм ртутного столба
2,5	5,5	17,5	15,0
3,0	5,7	18,0	15,5
3,5	5,9	18,5	16,0
4,0	6,1	19,0	16,5
4,5	6,3	19,5	17,0
5,0	6,5	20,0	17,5
5,5	6,8	20,5	18,1
6,0	7,0	21,0	18,6
6,5	7,3	21,5	19,2
7,0	7,5	22,0	19,8
7,5	7,8	22,5	20,4
8,0	8,0	23,0	21,1
8,5	8,3	23,5	21,7
9,0	8,6	24,0	22,3
9,5	8,9	24,5	23,1
10,0	9,2	25,0	23,8
10,5	9,5	25,5	24,5
11,0	9,8	26,0	25,2
11,5	10,2	26,5	26,0
12,0	10,5	27,0	26,7
12,5	10,9	27,5	27,5
13,0	11,2	28,0	28,3
13,5	11,6	28,5	29,2
14,0	12,0	29,0	30,0
14,5	12,4	29,5	30,9

Приложение 3

Таблица поправок к показаниям барометра

Количество миллиметров ртутного столба, которое надлежит вычесть из показания барометра для приведения к 0°

t°	Стеклянная шкала	Латунная шкала
7	0,9	0,9
8	1,0	1,0
9	1,2	1,1
10	1,3	1,2
11	1,4	1,3
12	1,5	1,5
13	1,7	1,6
14	1,8	1,7
15	1,9	1,8
16	2,1	1,9
17	2,2	2,1
18	2,3	2,2
19	2,4	2,3
20	2,6	2,4
21	2,7	2,5
22	2,8	2,7
23	2,9	2,8
24	3,1	2,9

Плотность и объем воды при различных температурах

t°	Плотность	Объем
0	0,999868	1,000132
1	927	073
2	968	032
3	992	008
4	1,000000	000
5	0,999992	008
6	968	032
7	929	071
8	876	124
9	808	192
10	727	273
11	632	368
12	525	476
13	404	596
14	271	729
15	126	874
16	0,998970	1,001031
17	801	200
18	622	380
19	432	571
20	230	773
21	019	895
22	0,997797	1,002208
23	565	441
24	323	685
25	071	938
26	0,996810	1,003201
27	539	473
28	259	755
29	0,995971	1,004046
30	673	346
31	367	655
32	052	972
33	0,994720	1,005299
34	398	634
35	058	978

Таблица для вычисления объема стеклянного сосуда по весу наполняющей его воды или ртути

Если вес воды или ртути, наполняющей стеклянный сосуд при t° , при взвешивании латунными разновесками в воздухе при 760 мм давления, равен P , то объем сосуда в кубических сантиметрах будет

$$\text{при той же температуре } t^\circ \dots V = PR = P \frac{P}{d},$$

$$\text{при другой температуре } t_1^\circ \dots V = PR_1 = P \frac{P}{d} [1 + \gamma(t_1 - t)],$$

где p —приведенный к пустоте вес того количества воды (или ртути), которое соответствует 1 г при взвешивании латунными разновесками; d —плотность воды или ртути при t° и γ ($= 0,00025$) — коэффициент кубического расширения стекла.

Таблица заключает значения R и R_1 для $t_1 = 10, 15$ и 20° .

t	В о д а				Р т у т ь		
	R	R ₁ для t ₁ = 10°	R ₁ для t ₁ = 15°	R ₁ для t ₁ = 20°	R	R ₁ для t ₁ = 10°	R ₁ для t ₁ = 20°
°	см ³	см ³	см ³	см ³	см ³	см ³	см ³
0	1,001192	1,001443	1,001568	1,001693	0,0735499	0,0735683	0,0735867
1	1133	1358	1483	1609	633	798	982
2	1092	1292	1417	1542	766	914	736098
3	1064	1243	1368	1493	900	736029	213
4	1060	1210	1335	1460	736033	144	328
5	1008	1193	1318	1443	167	259	443
6	1092	1192	1317	1442	301	374	558
7	1131	1206	1331	1456	434	490	674
8	1184	1234	1359	1485	568	605	789
9	1252	1277	1402	1527	702	720	904
10	1333	1333	1458	1584	835	835	737020
11	1428	1403	1528	1653	969	951	135
12	1536	1486	1611	1736	737103	73066	250
13	1657	1582	1707	1832	236	181	365
14	1790	1690	1815	1940	370	297	481
15	1935	1810	1935	2060	504	412	596
16	2092	1942	2068	2193	637	527	711
17	2261	2086	2212	2337	771	642	826
18	2441	2241	2366	2491	905	757	941
19	2633	2407	2533	2658	738039	872	738057
20	2835	2584	2710	2835	172	988	172
21	3048	2772	2898	3023	306	738103	288
22	3271	2970	3095	3220	440	218	403
23	3504	3178	3304	3429	573	333	518
24	3748	3306	3522	3647	707	449	633
25	4001	3624	3750	3875	841	564	748
26	4264	3862	3988	4113	974	679	864
27	4537	4110	4236	4361	739108	794	979
28	4818	4366	4491	4616	242	910	739094
29	5110	4632	4758	4884	376	739025	210
30	5410	4908	5034	5159	510	140	325

Длины волн главных фраунгоферовых линий

(выражены в миллимикронах (м μ)—миллионных долях миллиметра)

A	759,4
	686,7
C	656,3
D (двойная)	589,6; 589,0
E	527,0
b (четыре линии)	518,4; 517,3; 516,9; 516,8
F	486,1
G	430,8
H	396,9

Таблица удельных весов оснований и кислот при 15°

(I)

Удельный вес d 15° 4°	100 вес. частей содержат NaOH	Удельный вес d 15°	100 вес. частей содержат KOH	Удельный вес d 15° 4°	100 вес. частей содержат NH ₃
1,014	1,20	1,014	1,7	0,998	0,45
1,022	2,00	1,029	3,5	0,994	1,37
1,036	3,35	1,045	5,6	0,990	2,31
1,045	4,00	1,060	7,4	0,986	3,30
1,052	4,64	1,075	9,2	0,982	4,30
1,060	5,29	1,091	10,9	0,978	5,30
1,075	6,55	1,100	12,0	0,974	6,30
1,091	8,00	1,116	13,8	0,970	7,31
1,100	8,68	1,134	15,7	0,966	8,33
1,116	10,06	1,152	17,6	0,962	9,37
1,134	11,84	1,171	19,5	0,958	10,47
1,152	13,55	1,190	21,4	0,954	11,60
1,171	15,13	1,210	23,3	0,950	12,74
1,190	16,77	1,231	25,1	0,946	13,88
1,210	18,58	1,252	27,0	0,942	15,04
1,231	20,59	1,274	28,9	0,938	16,22
1,252	22,64	1,297	30,7	0,934	17,42
1,274	24,81	1,320	32,7	0,930	18,64
1,297	26,83	1,345	34,9	0,926	19,87
1,320	28,83	1,370	36,9	0,922	21,12
1,345	31,22	1,397	38,9	0,918	22,39
1,370	33,69	1,424	40,9	0,914	23,68
1,397	36,25	1,453	43,4	0,910	24,99
1,424	38,80	1,483	45,8	0,906	26,31
1,453	41,41	1,514	48,3	0,902	27,65
1,483	44,38	1,546	50,6	0,898	29,01
1,514	47,60	1,580	53,2	0,894	30,37
—	—	1,615	55,9	0,890	31,73
—	—	1,634	57,5	0,886	33,25
—	—	—	—	0,882	34,95

(II)

Удельный вес $d_{4}^{15^{\circ}}$	100 вес. частей содержат HCl	Удельный вес $d_{4}^{15^{\circ}}$	100 вес. частей содержат H ₂ SO ₄	Удельный вес $d_{4}^{15^{\circ}}$	100 вес. частей содержат HNO ₃
1,010	2,14	1,020	3,03	1,020	3,70
1,015	3,12	1,040	5,96	1,030	5,50
1,020	4,13	1,060	8,77	1,040	7,26
1,025	5,15	1,080	11,60	1,050	8,99
1,030	6,15	1,100	14,35	1,060	10,67
1,035	7,15	1,120	17,01	1,070	12,32
1,040	8,16	1,140	19,61	1,080	13,94
1,045	9,16	1,160	22,19	1,090	15,52
1,050	10,17	1,180	24,76	1,100	17,10
1,055	11,18	1,200	27,32	1,110	18,66
1,060	12,19	1,220	29,84	1,120	20,22
1,065	13,19	1,240	32,28	1,130	21,76
1,070	14,17	1,260	34,57	1,140	23,30
1,075	15,16	1,280	36,87	1,150	24,83
1,080	16,15	1,300	39,19	1,160	26,35
1,085	17,13	1,320	41,50	1,170	27,87
1,090	18,11	1,340	43,74	1,180	29,37
1,095	19,06	1,360	45,88	1,190	30,87
1,100	20,01	1,380	58,00	1,200	32,34
1,105	20,97	1,400	50,11	1,210	33,80
1,110	21,92	1,420	42,15	1,220	35,26
1,115	22,86	1,440	54,07	1,230	36,76
1,120	23,82	1,460	55,97	1,240	38,27
1,125	24,78	1,480	57,83	1,250	39,80
1,130	25,75	1,500	59,70	1,260	41,32
1,135	26,70	1,520	61,59	1,270	42,85
1,140	27,66	1,540	63,43	1,280	44,39
1,145	28,61	1,560	65,20	1,290	45,93
1,150	29,57	1,580	66,95	1,300	47,47
1,155	30,55	1,600	68,70	1,310	49,05
1,160	31,52	1,620	70,42	1,320	50,69
1,165	32,49	1,640	72,12	1,330	52,34
1,170	33,46	1,660	73,81	1,340	54,04

Продолжение приложения 7.

Удельный вес $d_{15}^{4^{\circ}}$	100 вес. частей содержат HCl	Удельный вес $d_{15}^{4^{\circ}}$	100 вес. частей содержат H_2SO_4	Удельный вес $d_{15}^{4^{\circ}}$	100 вес. частей содержат HNO_3
1,175	34,42	1,680	75,50	1,350	55,76
1,180	35,39	1,700	77,17	1,360	57,54
1,185	36,31	1,720	78,92	1,370	59,36
1,190	37,23	1,740	80,58	1,380	61,24
1,195	38,16	1,760	82,44	1,390	63,20
1,200	39,11	1,780	84,50	1,400	65,27
—	—	1,800	86,92	1,410	67,47
—	—	1,820	90,05	1,420	69,77
—	—	1,840	95,60	1,430	72,14
—	—	1,8405	95,95	1,440	74,64
—	—	1,8415	97,35	1,450	77,24
—	—	1,8405	98,52	1,460	79,94
—	—	1,8400	98,72	1,470	82,86
—	—	—	—	1,480	86,01
—	—	—	—	1,490	89,56

Приложение 8

Растворимость некоторых солей в 100 частях воды при различных температурах

t°	Частей $(NH_4)_2SO_4$	$MgSO_4$	Na_2SO_4	$ZnSO_4$	NaCl
0	41,4	—	4,76	29,55	26,23
10	42,2	—	8,25	—	26,30
15	—	—	11,70	33,73	—
20	43,0	26,2	16,20	—	26,38
25	—	26,8	21,90	36,67	—
30	43,8	29,0	28,60	—	26,50
35	—	—	33,10	39,98	—
40	44,8	31,3	32,50	—	26,65
50	45,8	33,5	31,90	43,45	26,82
55	—	34,3	—	—	—
60	46,8	35,5	31,30	—	27,04
70	47,9	—	30,80	47,10	27,28
80	48,8	38,6	30,40	46,20	27,54
90	49,8	—	30,00	—	27,81
100	50,8	40,6	29,90	44,00	28,15

Область изменения окраски различных индикаторов по Кольтхофу
(I. M. Kolthoff)

Индикатор	Область изменения окраски (рН)	О к р а с к а	
		В кислой среде	В щелочной среде
Метилвиолет	0,1— 1,5	желтая	синяя
Метилвиолет	1,5— 3,2	синяя	фиолетовая
Метанилгельб	1,2— 2,3	красная	желтая
Тимолсульфонфталеин	1,2— 2,8	красная	желтая
Тропеолин ОО	1,3— 3,2	красная	желтая
Бензопурпурин	1,3— 5,0	синефиолетовая	оранжевая
Диметиламиноазобензол	2,9— 4,0	красная	желтая
Метилоранж	3,1— 4,4	красная	оранжевая
Тетрабромфенол- сульфонфталеин	3,0— 4,6	желтая	синяя
Конго	3,0— 5,2	синефиолетовая	красная
Ализариновокислый натрий	3,7— 5,2	желтая	фиолетовая
Метилрот	4,2— 6,3	красная	желтая
Лакмоид	4,4— 6,4	красная	синяя
р-нитрофенол	5,0— 7,0	бесцветная	желтая
Дибромкрезол- сульфонфталеин	5,2— 6,8	желтая	пурпурная
Лакмус (азолитмин)	5,0— 8,0	красная	синяя
Дибромтимол- сульфонфталеин	6,0— 7,6	желтая	синяя
Нейтральрот	6,8— 8,0	красная	желтая
Фенолсульфонфталеин	6,8— 8,4	желтая	красная
Розоловая кислота	6,9— 8,0	коричневая	красная
о-крезолсульфон- фталеин	7,2— 8,8	желтая	красная
Брильянтгельб	7,4— 8,5	желтая	красно-бурая
α-нафтолфталеин	7,3— 8,7	розовая	синяя
Тропеолин ООО	7,6— 8,9	бурожелтая	розово-красная
Куркумин	7,8— 9,2	желтая	красно-бурая
Тимолсульфонфталеин	8,0— 9,6	желтая	синяя
Фенолфталеин	8,2—10,0	бесцветная	красная
Тимолфталеин	9,3—10,5	бесцветная	синяя
Ализарингельб	10,1—12,1	желтая	лиловая
Тропеолин О	11,0—13,0	желтая	оранжево-бурая
Ализаринблау S	11,0—13,0	зеленая	синяя

РЕАКТИВЫ

1. Кислоты

А. Минеральные

- Азотная кислота, концентрированная, уд. в. 1,42.
 Азотная кислота, 30⁰/о, уд. в. 1,2.
 Азотная кислота, 25⁰/о, уд. в. 1,15.
 Метафосфорная кислота.
 Ортофосфорная кислота, концентрированная, уд. в. 1,88.
 Платинохлористоводородная кислота, 10⁰/о спиртовой раствор.
 Серная кислота, концентрированная, уд. в. 1,84.
 Серная кислота, концентрированная, уд. в. 1,84, свободная от свинца.
 Серная кислота, 9⁰/о, уд. в. 1,06.
 Соляная кислота, дымящаяся, уд. в. 1,19.
 Соляная кислота, 24⁰/о, уд. в. 1,12.
 Соляная кислота, 7⁰/о (100 см³ HCl уд. в. 1,19 + 400 см³ воды).
 Соляная кислота, 0,2⁰/о (6 см³ HCl уд. в. 1,19 + 994 см³ воды).

Б. Органические

- Виннокаменная кислота, насыщенный водный раствор.
 Виннокаменная кислота, 20⁰/о раствор.
 Глиоксилевая кислота (гл. I).
 Молочная кислота, разведенная (0,8 см³ кислоты на 1 л воды).
 Муравьиная кислота.
 Пикриновая кислота, насыщенный водный раствор.
 Сульфосалициловая кислота, 20⁰/о раствор.
 Трихлоруксусная кислота, 2—4⁰/о раствор, свежеприготовленный.
 Угольная кислота (можно из бомбы).
 Уксусная кислота, ледяная.
 Уксусная кислота, 33⁰/о.
 Уксусная кислота, 1⁰/о.
 Уксусная кислота, 0,1⁰/о.
 Фосфорная кислота, 85⁰/о.
 Щавелевая кислота, хим. чистая (гл. XIV).
 Щавелевая кислота, насыщенный водный раствор.

II. Основания

- Аммиак, концентрированный, уд. в. 0,88.
 Аммиак, 16⁰/о, уд. в. 0,938.
 Аммиак, разведенный (2 см³ аммиак уд. в. 0,88 + 500 см³ воды).
 Едкий барит.
 Едкий натр.

Едкий натр, концентрированный раствор, уд. в. 1,34.
Едкий натр, 10% раствор.
Едкое кали.
Едкое кали, 10% раствор.
Едкое кали, спиртовой раствор (гл. V).
Жженая магнезия.
Известковая вода (1 объем насыщенного раствора $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + 1 объем воды).
Известковое молоко.
Известь гашеная.
Известь натронная.

III. Соли

А. Растворы

Аммоний молибденовоокислый (гл. II).
Аммоний сернистый.
Аммоний серноокислый, насыщенный раствор.
Аммоний углекислый, 5% раствор.
Аммоний хлористый, насыщенный раствор.
Аммоний хлористый, 15% раствор.
Аммоний хлористый, 10% раствор.
Аммоний щавелевоокислый, 10% раствор.
Аммоний щавелевоокислый, 5% раствор.
Барий хлористый, 5% раствор.
Железоаммиачные квасцы, насыщенный водный раствор.
Железо серноокислое окисное, 1% раствор.
Железо хлорное, 2% и 5% раствор.
Кадмий хлористый, насыщенный спиртовой раствор.
Калий двуххромовоокислый, 6% раствор.
Калий двуххромовоокислый, 1% раствор.
Калий железистосинеродистый, 5% раствор.
Калий железосинеродистый, све же при готов лен н ы й насыщенный на хо-
л оду раствор.
Калий железосинеродистый, све же при готов лен н ы й, 5% раствор.
Калий марганцовоокислый (гл. XII).
Калий роданистый, 5% раствор.
Калий хромовоокислый, насыщенный раствор.
Калий хромовоокислый, 5% раствор.
Калий щавелевоокислый, 3% раствор.
Кальций хлористый ($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 3% раствор.
Магний серноокислый, насыщенный раствор.
Медный купорос, 1% раствор.
Натрий азотистокислый, 30% раствор.
Натрий нитропруссид, све же при готов лен н ы й раствор.
Натрий кислый сернистоокислый, све же при готов лен н ы й насыщенный
раствор.

Натрий углекислый, 10⁰/о раствор.

Натрий углекислый, 5⁰/о раствор.

Натрий углекислый, 2⁰/о раствор.

Натрий углекислый, 0,4⁰/о раствор.

Натрий хлористый, насыщенный раствор.

Натрий хлористый; насыщенный раствор при определении мочевины по Бородину, гл. XIV, 9.

Натрий хлористый, 1⁰/о раствор.

Пиротурьмянокислый калий, свежеприготовленный насыщенный раствор.

Ртуть азотнокислая окисная, 1⁰/о.

Свинец уксуснокислый, 10⁰/о раствор.

Свинец уксуснокислый основной [раствор уксуснокислого свинца нагревают в кипящей водяной бане (или продолжительное время настаивают в теплом месте) с избытком гидрата окиси свинца и затем фильтруют], см. также гл. XIV, 14.

Серебро азотнокислое, 2⁰/о раствор.

Сулема, насыщенный водный раствор.

Сурьма треххлористая, насыщенный хороформный раствор (гл. VIII)

Цинк сернокислый, 45⁰/о водный раствор.

Цинк сернокислый, 0,45⁰/о водный раствор (свежеприготовленный) (гл. XV)

Цинк уксуснокислый, 10⁰/о спиртовой раствор.

Цинк хлористый, 1⁰/о спиртовой раствор.

Цинк хлористый, 30⁰/о водный раствор.

Б. В твердом виде

Аммоний сернокислый.

Аммоний сернокислый, химически чистый (гл. XV).

Барий углекислый.

Железа закись сернокислая.

Иод.

Калий азотнокислый (3 части) + натрий углекислый (1 часть)—смесь для сплавления.

Калий железосинеродистый.

Калий иодноватокислый, хим. чистый (гл. XV).

Калий кислый сернокислый.

Калий сернокислый.

Калий фосфорнокислый однометальный, хим. чистый (гл. XIV, 1).

Кальций сернокислый (г и п с).

Кальций углекислый.

Кальций хлористый, безводный.

Каолин.

Магний сернокислый.

Медный купорос.

Медь углекислая.

Натрий (металлический; сохранять под бензином).

Натрий вольфрамовокислый (гл. XV).

Натрий сернокислый.

Натрий углекислый, безводный.
Натрий углекислый кислый
Натрий уксуснокислый.
Натрий фосфорнокислый двуметальный ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 12\text{H}_2\text{O}$).
Натрий хлористый, химически чистый.
Натрий хлористый (в порошке).
Натрий хлористый (сплавленный).
Натрий щавелевокислый, химически чистый.
Сеньетова соль ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 + 4\text{H}_2\text{O}$).
Уранил уксуснокислый.

IV. Органические растворители

Алкоголь амиловый.
Алкоголь метиловый, 95%.
Алкоголь октиловый.
Алкоголь этиловый (метилованный), 96%.
Алкоголь этиловый, абсолютный.
Ацетон.
Бензин.
Глицерин.
Толуол.
Хлорсформ.
Эфир.

V. Специальные растворы и препараты

Адреналин (1 : 1000).
Ацетатная смесь, гл. XIV, 1.
Ацетоуксусный эфир.
Белок куриный, свежий.
Бензидин, 10% раствор в ледяной уксусной кислоте, свежеприготовленный (гл. IX).
Бром.
Бромная вода, насыщенный раствор.
Бромноватистый щелок, XIV, 9.
Гваяковая смола (сохранять в темноте).
Гваяковой смолы спиртовой раствор (0,5 г в 30 см³ 95% спирта).
Глюкоза.
Дистиллированная вода, дважды перегнанная.
Животный уголь.
Иод, кристаллический.
Иода раствор (4 г J_2 + 6 г KJ + 100 см³ воды).
Иода 1% спиртовой раствор.
Камфора.
Крахмальный клейстер (гл. III, см. также гл. XIV, 14).
Лактоза.
Латунная бить.
Метиленовая синь (0,02% водный раствор).
Мочевина.

Мочевая кислота.
Натрий хлорноватистокислый (гл. I).
Натрий холеновокислый
 α -нафтол, 0,15⁰/о водный раствор.
Несслера реактив (гл. XV).
Нингидрин, 0,1⁰/о водный раствор (гл. I)
Панкреатин.
Парафин.
Парафиновое масло.
Пепсин.
Пергидроль (30⁰/о перекись водорода.)
Перекись водорода, 3⁰/о и 0,6⁰/о.
Пермутит для поглощения аммиака (гл. XV).
Пирогаллол, свежеприготовленный 1⁰/о водный раствор.
Реактив Брюке (гл. I).
Реактив Миллона (гл. I).
Реактив Ниландера (гл. IV).
Реактив Стокса (гл. IX).
Резорцин.
Ртуть.
Серный цвет.
Смесь для сжигания при определении остаточного азота (гл. XV).
Сои бобы.
Тальк в порошке.
Танин, крепкий водный раствор (свежеприготовленный).
Тимол
Тростниковый сахар, 10⁰/о раствор.
Уксусный ангидрид.
Фенилгидразин хлористый.
Фенол, 2⁰/о раствор.
Физиологический раствор (0,9⁰/о) поваренной соли.
Формалин, 30—40⁰/о раствор.
Формалин, 0,4⁰/о раствор.
Фруктоза.
Хаммарстена реактив, гл. XIII желчные пигменты.
Химозин.
Эозин.

VI. Индикаторы

Ализаринрот, 1⁰/о раствор.
Бромкрезолгрюн, 0,04⁰/о водный раствор.
Бромкрезолпурпур, 0,04⁰/о водный раствор.
Бромфенслблау, 0,04⁰/о водный раствор.
Диметиламиноазобензол, 0,5⁰/о спиртовой раствор.
Индигокармин
Лакмусовая бумага.
Лакмусовая бумага очень чувствительная (для формолового титрования, гл. XII)

Лакмусовый раствор (10 г растертого в порошок очищенного лакмуса извлекают 20 см³ горячей дистиллированной воды. Прозрачную синюю жидкость сливают с осадка и разводят водой до 1 л).

Конго бумага (или 0,1% водный раствор красного конго).

Кошениль, настой в 25% спирте.

Метилрот, 0,1% спиртовой раствор.

Метилрот, 0,04% водный раствор (свежеприготовленный).

Реактив Гюнцбурга (гл. XII).

Тропеолин 00 0,05—0,1% водный раствор.

Фенолрот, 0,04% водный раствор.

Фенолфталеин, 1% спиртовой раствор.

VII. Титрованные растворы

n/10 аммоний роданистый, гл. XIV, 2.

2,6-дихлорфенолиндофенол (гл. XV).

n/10 раствор иода, гл. XIV, 14.

n/1 кали едкое, спиртовой раствор, гл. XII.

n/2 калий двухромовокислый, гл. XIV, 11.

n/200 калий иодноватоокислый, гл. XV.

n/20 калий марганцовокислый, гл. XIV, 10.

n/50 калий марганцевоокислый.

M/15 калий фосфорнокислый однометальный, гл. XIV, 1.

n/5 натр едкий, гл. XII.

n/10 натр едкий, гл. XIV, 1.

n/10 натрий серноватистоокислый, гл. XIV, 14.

n/200 натрий серноватистоокислый, гл. XV.

n/10 натрий уксуснокислый, гл. XIV, 1.

M/15 натрий фосфорнокислый двуметальный, гл. XIV, 1.

Свинец уксуснокислый, гл. XIV, 16.

n/10 серебро азотнокислое, гл. XIV, 2.

n/10 серная кислота, гл. XIV, 8.

n/5 соляная кислота, гл. XII.

n/10 уксусная кислота, гл. XIV, 1.

Уранил уксуснокислый, гл. XIV, 3.

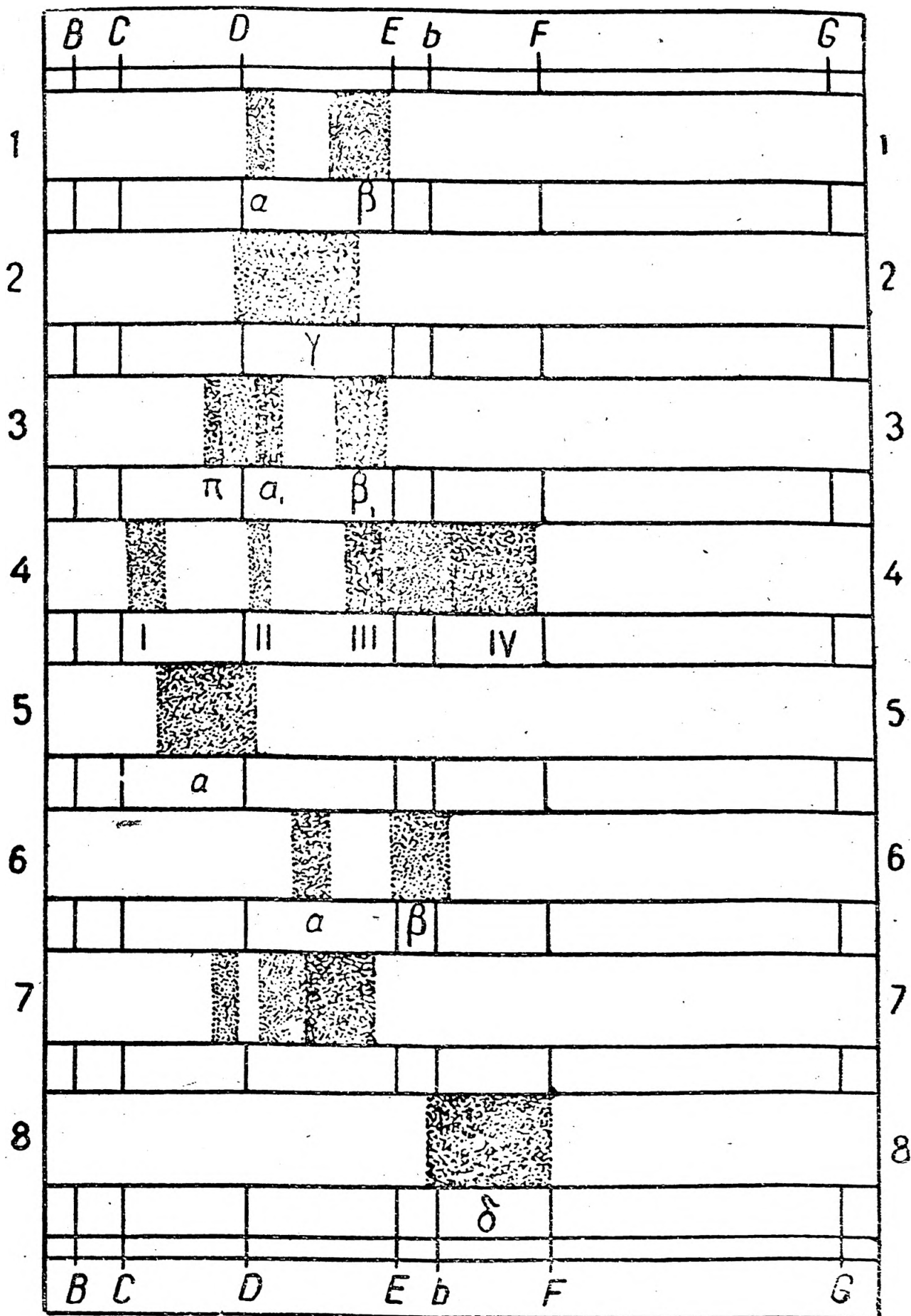
Фелингова жидкость, гл. XIV, 12.

Числа	Пропорциональные части									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
10	0000	0043	0086	0128	0170	0212	0253	0294	0334	0374
11	0414	0453	0492	0531	0569	0607	0645	0682	0719	0755
12	0792	0828	0864	0899	0934	0969	1004	1038	1072	1106
13	1139	1173	1206	1239	1271	1303	1335	1367	1399	1430
14	1461	1492	1523	1553	1584	1614	1644	1673	1703	1732
15	1761	1790	1818	1847	1875	1903	1931	1959	1987	2014
16	2041	2068	2095	2122	2148	2175	2201	2227	2253	2279
17	2304	2330	2355	2380	2405	2430	2455	2480	2504	2529
18	2553	2577	2601	2625	2648	2672	2695	2718	2742	2765
19	2788	2810	2833	2856	2878	2900	2923	2945	2967	2989
20	3010	3032	3054	3075	3096	3118	3139	3160	3181	3201
21	3222	3243	3263	3284	3304	3324	3345	3365	3385	3404
22	3424	3444	3464	3483	3502	3522	3541	3560	3579	3598
23	3617	3636	3655	3674	3692	3711	3729	3747	3766	3784
24	3802	3820	3838	3856	3874	3892	3909	3927	3945	3962
25	3979	3997	4014	4031	4048	4065	4082	4099	4116	4133
26	4150	4166	4183	4200	4216	4232	4249	4265	4281	4298
27	4314	4330	4346	4362	4378	4393	4409	4425	4440	4456
28	4472	4487	4502	4518	4533	4548	4564	4579	4594	4609
29	4624	4639	4654	4669	4683	4698	4713	4728	4742	4757
30	4771	4786	4800	4814	4829	4843	4857	4871	4886	4900
31	4914	4928	4942	4955	4969	4983	4997	5011	5024	5038
32	5052	5065	5079	5092	5105	5119	5132	5145	5159	5172
33	5185	5198	5211	5224	5237	5250	5263	5276	5289	5302
34	5315	5328	5340	5353	5366	5378	5391	5403	5416	5428
35	5441	5453	5465	5478	5490	5502	5514	5527	5539	5551
36	5563	5575	5587	5599	5611	5623	5635	5647	5658	5670
37	5682	5694	5705	5717	5729	5740	5752	5763	5775	5786
38	5798	5809	5821	5832	5843	5855	5866	5877	5888	5899
39	5911	5922	5933	5944	5955	5966	5977	5988	5999	6010

Числа	Пропорциональные части									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
40	6021	6031	6042	6053	6034	6075	6085	6096	6107	6117
41	6128	6138	6149	6160	6170	6180	6191	6201	6212	6222
42	6232	6243	6253	6263	6274	6284	6294	6304	6314	6325
43	6335	6345	6355	6365	6375	6385	6395	6405	6415	6425
44	6435	6444	6454	6464	6474	6484	6493	6503	6513	6522
45	6532	6542	6551	6561	6571	6580	6590	6599	6609	6618
46	6628	6637	6646	6656	6665	6675	6684	6693	6702	6712
47	6721	6730	6739	6749	6758	6767	6776	6785	6794	6803
48	6812	6821	6830	6839	6848	6857	6866	6875	6884	6893
49	6902	6911	6920	6928	6937	6946	6955	6964	6972	6981
50	6990	6998	7007	7016	7024	7033	7042	7050	7059	7067
51	7076	7084	7093	7101	7110	7118	7126	7135	7143	7152
52	7160	7168	7177	7185	7193	7202	7210	7218	7226	7235
53	7243	7251	7259	7267	7275	7284	7292	7300	7308	7316
54	7324	7332	7340	7348	7356	7364	7372	7380	7388	7396
55	7404	7412	7419	7427	7435	7443	7451	7459	7466	7474
56	7482	7490	7497	7505	7513	7520	7528	7536	7543	7551
57	7559	7566	7574	7582	7589	7597	7604	7612	7619	7627
58	7634	7642	7649	7657	7664	7672	7679	7686	7694	7701
59	7709	7716	7723	7731	7738	7745	7752	7760	7767	7774
60	7782	7789	7796	7803	7810	7818	7825	7832	7839	7846
61	7853	7860	7868	7875	7882	7889	7896	7903	7910	7917
62	7924	7931	7938	7945	7952	7959	7966	7973	7980	7987
63	7993	8000	8007	8014	8021	8028	8035	8041	8048	8055
64	8062	8069	8075	8082	8089	8096	8102	8109	8116	8122
65	8129	8136	8142	8149	8156	8162	8169	8176	8182	8189
66	8195	8202	8209	8215	8222	8228	8235	8241	8248	8254
67	8261	8267	8274	8280	8287	8293	8299	8306	8312	8319
68	8325	8331	8338	8344	8351	8357	8363	8370	8376	8382
69	8388	8395	8401	8407	8414	8420	8426	8434	8439	8445

Числа	Пропорциональные части										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
70	8451	8457	8463	8470	8476	8482	8488	8494	8500	8506	6
71	8513	8519	8525	8531	8537	8543	8549	8555	8561	8567	5
72	8573	8579	8585	8591	8597	8603	8609	8615	8621	8627	5
73	8633	8639	8645	8651	8657	8663	8669	8675	8681	8686	5
74	8692	8698	8704	8710	8716	8722	8727	8733	8739	8745	5
75	8751	8756	8762	8768	8774	8779	8785	8791	8797	8802	5
76	8808	8814	8820	8825	8831	8837	8842	8848	8854	8859	5
77	8865	8871	8876	8882	8887	8893	8899	8904	8910	8915	5
78	8921	8927	8932	8938	8943	8949	8954	8960	8965	8971	4
79	8976	8982	8987	8993	8998	9004	9009	9015	9020	9025	4
80	9031	9036	9042	9047	9053	9058	9063	9069	9074	9079	4
81	9085	9090	9095	9101	9106	9112	9117	9122	9128	9133	4
82	9138	9143	9149	9154	9159	9165	9170	9175	9180	9186	4
83	9191	9196	9201	9206	9212	9217	9222	9227	9232	9238	4
84	9243	9248	9253	9258	9263	9269	9274	9279	9284	9289	4
85	9294	9299	9304	9309	9315	9320	9325	9330	9335	9340	4
86	9345	9350	9355	9360	9365	9370	9375	9380	9385	9390	4
87	9395	9400	9405	9410	9415	9420	9425	9430	9435	9440	4
88	9445	9450	9455	9460	9465	9469	9474	9479	9484	9489	4
89	9494	9499	9504	9509	9513	9518	9523	9528	9533	9538	4
90	9542	9547	9552	9557	9562	9566	9571	9576	9581	9586	4
91	9590	9595	9600	9605	9609	9614	9619	9624	9628	9633	4
92	9638	9643	9647	9652	9657	9661	9666	9671	9675	9680	4
93	9685	9689	9694	9699	9703	9708	9713	9717	9722	9727	4
94	9731	9736	9741	9745	9750	9754	9759	9763	9768	9773	4
95	9777	9782	9786	9791	9795	9800	9805	9809	9814	9818	4
96	9823	9827	9832	9836	9841	9845	9850	9854	9859	9863	4
97	9868	9872	9877	9881	9886	9890	9894	9899	9903	9908	4
98	9912	9917	9921	9926	9930	9934	9939	9943	9948	9952	4
99	9956	9961	9965	9969	9974	9978	9983	9987	9991	9996	4

Таблица спектров поглощения



1) Оксигемоглобин. 2) Гемоглобин. 3) Метгемоглобин (в щелочном растворе). 4) Метгемоглобин (в нейтральном растворе). Гематин (в кислом растворе). 5) Гематин (в щелочном растворе). 6) Гемохромоген. 7) Гематопорфирин (в кислом растворе). 8) Уробилин. Стеркобилин.

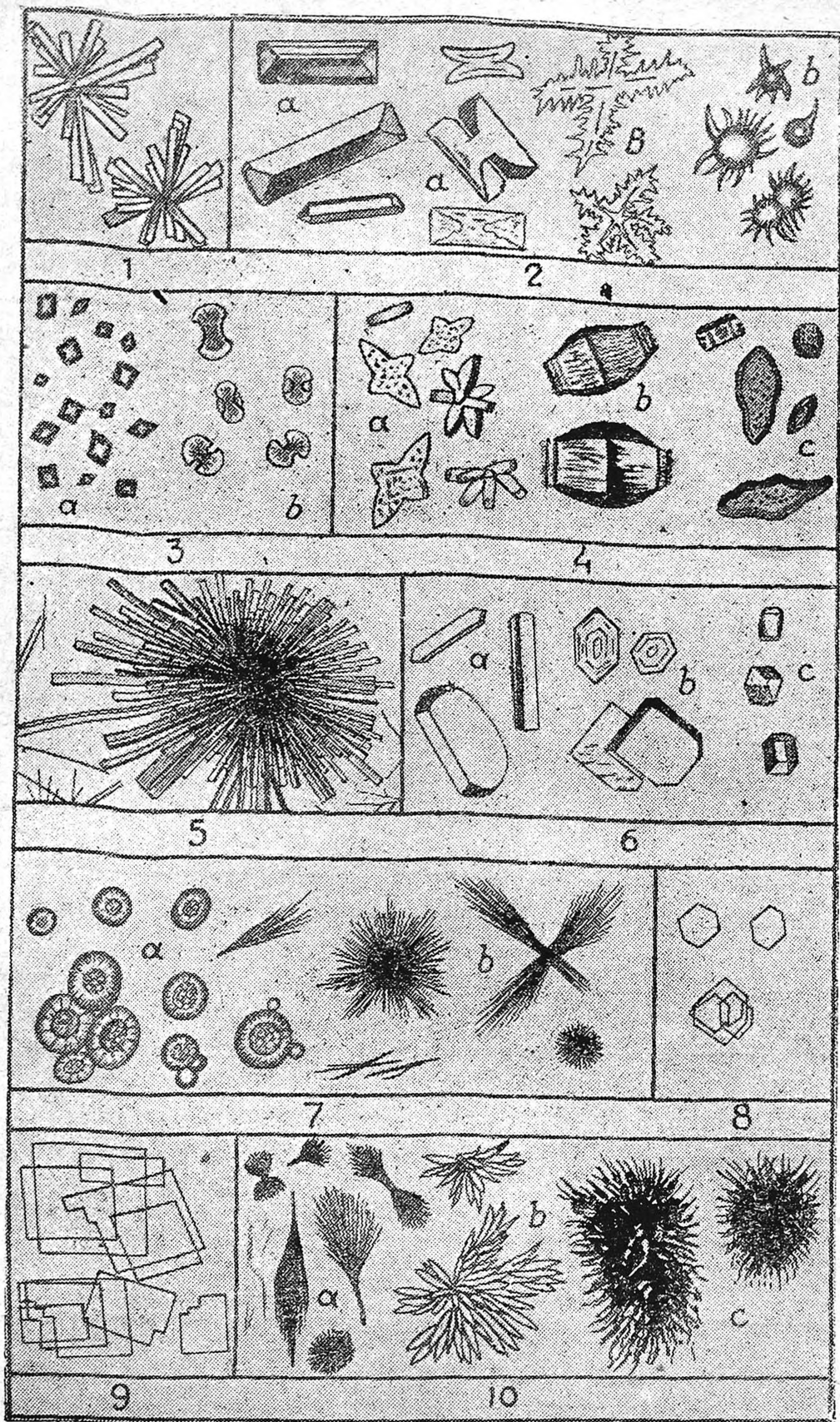


ТАБЛИЦА I

Рис. 1. Фосфорнокислая известь двуметаллическая.

Рис. 2. (а, α, β) фосфорнокислая аммиак-магнезия.

Рис. 3. Шавелевокислая известь:

(а) почтовые конверты.

(б) гимнастические гири.

Рис. 4. Мочевая кислота.

Рис. 5. Гликолевая кислота.

Рис. 6. (а) мочевина.

(б) мочевина азотнокислая.

(с) мочевина щавелевокислая.

Рис. 7. (а) лейцин (нечистый).

(б) тирозин.

Рис. 8. Цистин.

Рис. 9. Холестерин.

Рис. 10. (а) фенилглюкозозон (малое увелич.),
(б) фенилмальтозозон (большое увелич.).

(с) фениллактозозон (большое увелич.).

инв. 9389

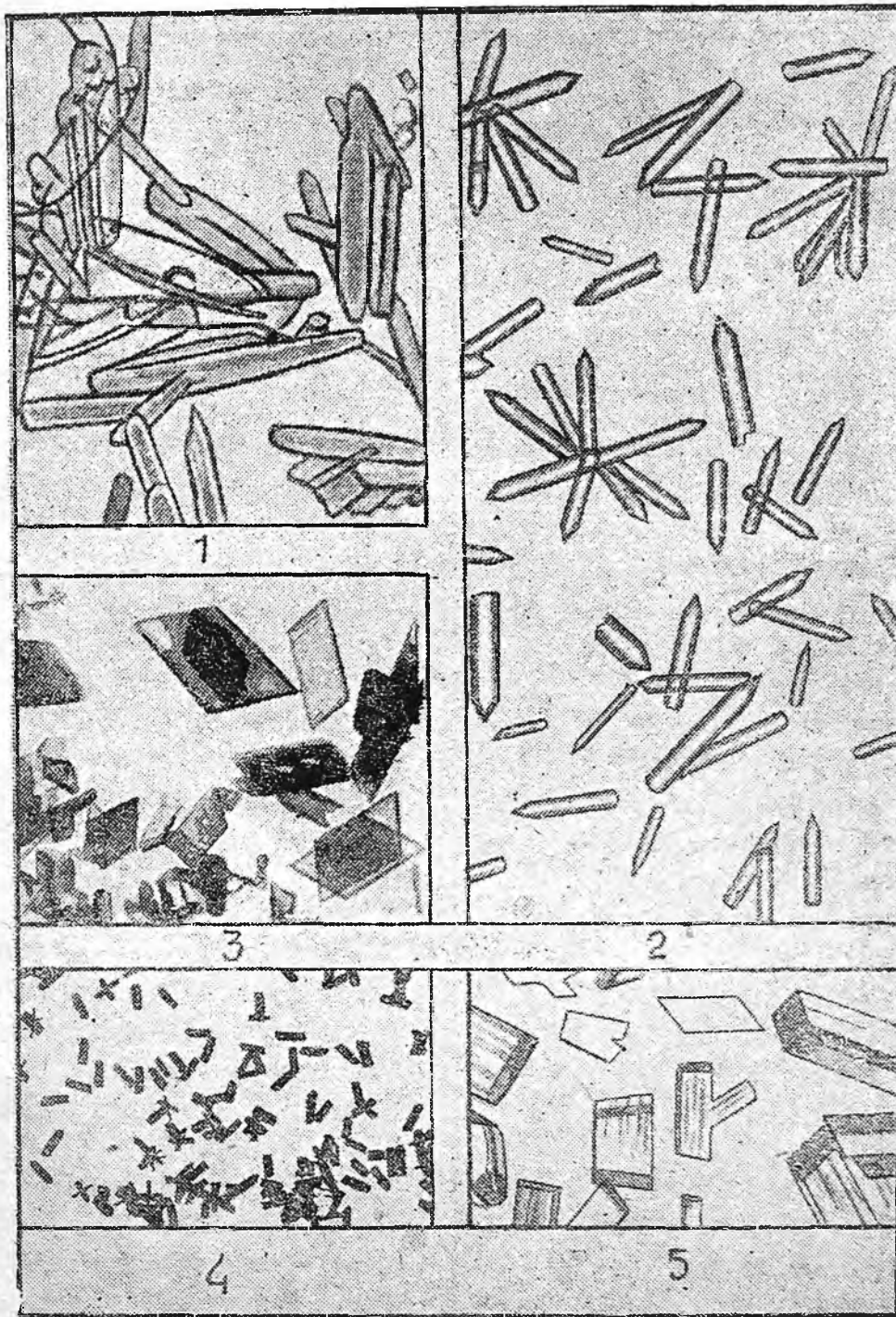


ТАБЛИЦА II

- Рис. 1. Кристаллы яичного альбумина.
- Рис. 2. Кристаллы сывороточного альбумина.
- Рис. 3. Кристаллы оксигемоглобина (из крови лошади).
- Рис. 4. Кристаллы гемина.
- Рис. 5. Кристаллы молочного сахара.

Институт биологии
Учен. зап. кн. библиотеки

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Адамкевича реакция 19.
Аденил-пирофосфорная к-та 65.
Аденин 46.
Адреналин 84.
Адсорбция 11.
Азот, определение по Кьельдалю 218.
Азот остаточный 93.
Азот остаточный, колич. определение 241.
Азотистокислые соли 162.
Азотистые продукты обмена веществ 164.
Акролеин 75.
Активаторы 50.
Активная реакция 49, 54, 58, 93.
Алкалоидные реакции на белки 15.
Алкоголь этиловый 63.
Аллантоин 174.
Альбумин молочный 117.
Альбумин сывороточный 92, 181.
Альбумин яичный 9.
Альбуминаты кислотные 24, 140.
Альбуминаты щелочные 25, 145.
Альбуминоиды см. Альбумоиды.
Альбуминурия 181.
Альбумины 23.
Альбумозы 141, 147.
Альбумозы в моче 183.
Альбумоиды 35, 124.
Альдегиды 64, 74.
Альдегидная проба Мура 70.
Амидазы 52.
Амидные группы, колич. определение 147, 149.
Амиды аминокислот 35.
Амилаза 52, 67, 142, 153.
Амилодекстрины 52.
Аминогалактоза 127.
Аминогруппы см. Амидные группы.
Аминокислоты 7, 17, 35, 62, 142, 145, 152, 157, 164, 169.
Аминопурины 46, 169.
Аминоэтиловый алкоголь 80.
Аммиак 20, 37, 160.
Аммиак в моче 164, 169, 189.
Аммиак в моче, колич. опред. 217.
Амфолиты (белки) 7.
Андростерон 83.
Аргинин 35, 37, 152.
Ареометр 115.
Аскорбиновая кислота 88, 61.
Аскорбиновая кислота, колич. определение 245.
Аспарагиновая к-та 35.
Атомные веса (таблица) 252.
Аутолиз 51, 183.
Ахроодекстрины 52.
Ацетальдегид 36, 65.
Ацетон 193, 194.
Ацетоуксусная к-та 194.
Ацетоновые тела 193, 75.
Ацетоновые тела, колич. опред. в моче 228, 230.
Беззольные фильтры 215.
Белки 7 и след., 149, 152, 159, 169, 176, 178, 181, 227.
Белки крови, удаление 238, 241.
Белки кровяной плазмы 90.
Белки кровяной сыворотки 100.
Белки молока 116 и след.
Белки неполноценные 124.
Белки слюны 131.
Белки соединительной ткани 124 и след.
Белковый коэффициент 93.
Белок в моче 181 и след., 184.
Белок в моче, ^г колич. определение 227.
Белок в ⁻моче, удаление 183, 214.
Белок диализированный 28.
Белок куриного ^г яйца 9.
Бензидиновая проба 100.
Биливердин 155.

Билирубин 154.
Билицианин 155.
Биозы 68.
Биурет 171.
Биуретовая проба на белки 18, 37, 141.
Борисова-Шюца правило 140.
Бородина способ определения мочевины 221.
Бродильный аппарат 63
Брожение 63, 122, 161, 190, 191.
Броуновское движение 8, 113.
Буферные свойства сыворотки крови 101.
Буферные смеси 101, 209, 210.
Бюретка 200, 237.
Ван-Слайка метод определ. NH_2 -групп 149.
Вакуум перегонка 41.
Вакуум эксикатор 119.
Варбурга дыхательные ферменты 48, 51, 61.
Варбурга метод 248.
Вебера гваяковая проба на кровь 99, 142, 162.
Весовой анализ 198, 214, 216.
Взвешивание 198.
Вильштеттера и Вальдшмит-Лейца способ определения COO H -групп аминокислот 147.
Виноградный сахар см. Глюкоза 70
Витамины 86.
Витамин А 86.
Витамин В₁ 66.
Витамин В₂ 61.
Витамин С 88.
Витамин С, количествен. определение 245.
Витамины D₂ и D₃ 83.
Внутримолекулярные перегруппировки 56, 64.
Водородный показатель 93.
Вольгемута метод 54.
Воронка Бухнера 37.
Вращение плоскости поляризации света 29, 69, 192, 225.
Вываривание жиров 75.

Высаливание 12, 26, 51, 68, 76, 92, 101, 121.
Вязкость растворов белка 9.
Газы крови 95.
Галактоза 118, 63, 191.
Гваяковая проба на кровь 99, 142, 162.
Гваяковая проба с молоком 116.
Гваяковая проба на оксидазы 58.
Гексозофосфорные кислоты 64.
Гексоновые основания 38.
Гели 7.
Гем 107.
Гематин 107.
Гематопорфирин 109, 188.
Гематурия 184.
Гемин 110.
Гемоглобин 105, 34, 128.
Гемоглобинурия 184.
Гемолиз 94.
Гемохромоген 108, 184.
Гепарин 91.
Гидразон 72.
Гидратация ионов 13.
Гидратация коллоидных частиц 13.
Гидролазы 52.
Гидролиз 35, 52, 55, 63, 76, 130.
Гидрофильные коллоиды 7.
Гидрохинон 62.
Гипергликемия 189.
Гистидин 18, 36, 152.
Гистоны 8, 10, 130, 142.
Гликоген 67.
Гликокол 23, 62, 116, 157.
Гликолиз 65, 96.
Гликохолевая к-та 157.
Глицерин 74, 152.
Глицеринальдегид-фосфорная кислота 64.
Глицерофосфорная к-та 64.
Глобин 102.
Глобулин молочный 117.
Глобулин сывороточный 92, 101, 181.
Глобулин яичный 9, 12.
Глобулины 23.
Глуматиновая к-та 35, 62, 146.
Глутатион 62.
Глутин 125, 19.

Глюкоза 70.
Глюкоза в крови 99.
Глюкоза в крови, количествен. определение 236.
Глюкоза в моче 189.
Глюкоза в моче, колич. определение 225.
Глюкозамин 35.
Глюкозиды 44, 49, 63.
Глюкозурия 189.
Глюкопротеиды 92, 125, 126, 131.
Глюкуроновая кислота 126, 131.
Глюкуроновые к-ты парные 191.
Гниение 159, 167, 178, 180.
Гормоны 84.
Гуанидин 149, 151.
Гуанин 46.
Гумины 36.
Дегидразы 61.
Дегидрохолан 158.
Дезаминирование 169, 159, 149, 152.
Дезоксирибоза 44.
Дезоксихолевая к-та 156.
Дезинфицирующее действие соляной к-ты 142.
Декантация 214.
Декарбоксилирование 65, 159.
Декстрины 52.
Денатурирование белков 10.
Дефибрированная кровь 93.
Дефицит соляной к-ты 137.
Диабет 189.
Диализ 27.
Диализаторы 27.
Диаминодитиомолочная к-та см. Цистин 38.
Диаминокислоты 16, 36.
Диастаза см. Амилаза 52.
Диглюкозидная связь 70.
Дикетопиперазины 35.
Диксантилмочевина 172.
Диоксиацетонфосфорная кислота 64,
Дипептидазы 158.
Дисахариды 68, 130.
Дисмутация 64.
Диссоциация электролитическая (значение при осаждении белков) 7 и след.

Диссоциация электролитическая (значение для действия ферментов) 50.
Диффузия 94, 27.
Длины волн фраунгоферовых линий 104, 256.
Дрожжи 45, 63, 191.
Дыхательные ферменты Варбурга 48, 51, 61.
Желатина 125.
Железо 111, 161.
Желудочный сок 132 и след.
Желчные камни 153, 161.
Желчные к-ты 156, 186.
Желчные пигменты 154, 185.
Желчь 153.
Женский половой гормон 83.
Животный крахмал 67, см. Гликоген.
Животный уголь 38.
Жирные кислоты 74 и след., 116, 152, 156, 161, 193.
Жирные кислоты летучие 116, 136.
Жировая ткань 129.
Жировой обмен 75, 152, 193.
Жиры 74, 152, 193.
Жиры молока 116.
Запах мочи 166.
Заряд иона (значение в осаждении белка) 13.
Заряд коллоидной частицы 7 и след.
Защитные коллоиды 17.
Зимаза 63.
Зимогены 50.
Зола костная 128.
Золи 7.
Зона перехода индикаторов 134, 208, 258.
Известковые соли 91, 153, 161.
Изотонические растворы 94.
Изоэлектрическая точка 8.
Имидазол 152.
Иминопроизводные 35.
Инверсия 56.
Инвертин 55, 159.
Индиго синее (индиготин) 165, 180.
Индикан 180.
Индикатор 133.
Индикаторный метод 208.
Индоксил 179.

Индоксилсерная к-та 180.
Индол 160, 162, 178.
Индолпропионовая к-та 160.
Индолуксусная к-та 160.
Инсулин 189.
Ионы (осаждающее действие на белки) 13.
Казеин 116, 144.
Калибрование мерительной посуды 202.
Кальций в моче 168.
Кальций в моче, колич. определ. 216.
Кальций углекислый 127.
Кальций фосфорнокислый (см. также известковые соли) 127.
Кальций фтористый 127.
Кальций хлористый 127.
Камни желчные 153, 161.
Камни кишечные 161.
Камни мочевые 196.
Каницаро реакция 64.
Карбогидразы 52.
Карбоксигемоглобин 106.
Карбоксилаза 65.
Карбоксильные группы аминокислот колич. определ. 147, 149.
Карболигаза 56.
Каротины 87.
Каталаза 56, 99.
Катализатор 48.
Катализ гетерогенный 50.
Катафорез 8.
Катепсин 51.
Кератин 37.
Кетозы 192.
Кетональдегидмутаза 64.
Кетоны 74.
Кефалины 79.
Киназы 143, 144.
Кислая сыворотка 123.
Кислородная емкость крови 95.
Кислотность желуд. содержимого 137.
Кислотность мочи истинная 208.
Кислотность мочи титруемая 205.
Кислоты желудочного содержимого 132.
Кишечный сок 158.
Клейстер крахмальный 52, 228.

Клетчатосоединительная ткань 124.
Козимазы 65.
Колба мерительная 201.
Колба Клайзена 41.
Колирование 67.
Коллаген 124.
Коллоидные диализаторы 27.
Коллоидные свойства белков 7 и след.
Колориметрия 208, 223, 241, 54.
Компаратор Уолпола 209.
Концентрация ионов водорода 93, 208.
Копростерин 161.
Костная зола 128.
Костная ткань 127.
Коферменты 65.
Крахмал 52.
Крахмал растворимый 53.
Креатин 176, 224.
Креатинин 114, 124, 132, 136, 164, 176, 224.
Креатинин колич. определ. в моче 223.
Кристаллины 23.
Кристаллизация белков 28, 102.
Кровь 90 и след.
Кровяные пигменты 102 и след., 154.
Кровяные пигменты в моче 184.
Кровяные пятна 111.
Ксантопротеиновая реакция 18.
Ксантофилл 100.
Кьельдаля метод определения азота 218.
Лаковая кровь 95.
Лактаза 130, 158.
Лактальбумин 117, 121.
Лактоза 117, 63.
Лактоза в моче 191, 225.
Лактофлавин 61.
Левулиновая к-та 45.
Лейцин 146.
Летучие жирные к-ты 116, 136.
Лецитины 79, 167.
Либермана реакция на белки 18.
Лизин 38, 152.
Линолевая к-та 77.
Липаза 130, 138, 152.
Липоиды 79, 95.
Липохромы 100.
Логарифмические таблицы 266.

Льняная к-та 77.
Магнезиальные соли 65, 161.
Магний в моче 168.
Магний в моче, колич. опред. 216
Магний фосфорнокислый 127, 161.
Мальтаза 49, 69, 130, 142, 158.
Мальтодекстрины 52.
Мальтоза 68, 53.
Маннозамин 131.
Масляная к-та 116, 136.
Меланоидины 36.
Меркаптаны 159.
Мернера проба на тирозин 42.
Метгемоглобин 106, 184.
Метилглиоксаль 63.
Метта метод опред. активности пеп-
сина 140.
Метта метод опред. активности трип-
сина 146.
Микробюретка 237.
Микрометоды 236.
Миллона реакция на белки 17.
Миозин 24.
Миристиновая к-та 116.
Молоко 113.
Молочная к-та 123, 65, 133, 135.
Молочнокислое брожение 65, 123.
Молочные шарики 113.
Молочный сахар 117, 63.
Моноаминокислоты 36.
Моноглюкозидная связь 68.
Монохроматический свет 33.
Мора метод определения хлоридов
212.
Моча 164, 198.
Мочевая к-та 173, 196.
Мочевая к-та, колич. опред. 222.
Мочевина 169.
Мочевина, колич. определение 221.
Мочевые осадки неорганизов. 195.
Мочевые сростки 196.
Мужской половой гормон 83.
Мура проба альдегидная на сахар 70.
Муравьиная кислота 45.
Мурексидная проба 175.
Мутаротация 69.
Муцин 131.
Муцин желчи 154.

Муцин мочи 183.
Мыло, 76, 161.
Набухание 139.
Навеска 206.
Натрий в моче 168.
Натрий хлористый 99, 166.
Натронная проба 107.
Неполноценные белки 124.
Непредельные жирные кислоты 77.
Несслеризация 241.
Нефелометрия 231.
Ниландера реакция 71, 190.
Нингидриновая реакция 21.
Нитрозоиндол 160.
Нитрозоиндоловая реакция 160, 162.
Нормальные растворы 203, см. Тит-
рованные растворы.
Nubecula 166.
Нуклеиновые кислоты 44, 65.
Нуклеоальбумин 116.
Нуклеоальбумин желчи 154.
Нуклеобальбумин мочи 183.
Нуклеозиды 45.
Нуклеоклупейн 45.
Нуклеопротеиды 44, 34, 174.
Нуклеотиды 44.
Облачко 166.
Обратимость действия ферментов 49.
Общая кислотность желуд. содерж.
133, 137.
Объем стекл. сосуда (таблица для
вычисл.) 255.
Объемный анализ 200.
Озазон 72.
Озоление кости 128.
 β -окисление 75, 193.
Окислительно-восстановительные фер-
менты 55.
Оксалатная плазма 90.
Оксалаты 196.
Оксигемоглобин 102, 184.
Оксидазы 56.
 β -оксимасляная к-та 193, 75.
 β -оксимасляная к-та, колич. опред.
229.
Оксиметил-фурфурол 19
Оксипролин 35, 152.

p — оксифенил — α -аминопропионо-
вая к-та см. Тирозин 42.
Олеиновая кислота 74, 77, 79, 116.
Омыление жиров 76, 152.
Опализация 8.
Оптимальная реакция для действия
ферментов 49, 54, 58.
Оптимальная температура для дейст-
вия ферментов 49, 53, 57.
Осаждение белков 10 и след.
Осахаривание 52, 153.
Освобождение жидкостей от белков
22, 183, 214, 238, 241, 246.
Осмотическое давление 27, 94.
Оссеин 127.
Оссеоальбумоид 127.
Оссеомукоид 127.
Остаточный азот 93.
Остаточный азот, колич. опред. 241.
Остеомаляция 128.
Отравление ферментов 50.
Отсасывание 37.
Ошибка, допустимая при химич. ко-
лич. анализе 202.
pH 93.
Пальмитиновая к-та 74, 79.
Панкреатин 142.
Панкреатический сок 142.
Параглобулин 92, 101.
Параказеин 121.
Парные глюкуроновые к-ты 191.
Парные желчные к-ты 156, 186.
Пентозы 44, 190.
Пепсин 138.
Пептидная связь 35, 147.
Пептиды 35, 141, 147.
Пептизация 14.
Пептон шелковый 159.
Пептоны 141, 10, 130, 147.
Перекристаллизация 205.
Перепонки полупроницаемые 27, 94.
Пероксидазы 58.
Пероксидазы крови 99.
Пероксидазы молока 116.
Пероксидазы хрена 58.
Пигменты крови 102 и след., 154, 184.
Пикнометр 114.
Пипетка 201.

Пиридиннуклеотиды 65.
Пиримидоновые основания 44, 169.
Пировиноградная к-та 65.
Пищеварение 130.
Пищеварение желудочное 132.
Пищеварение поджелудочное 142.
Пищеварение кишечное 158.
Пищеварительные ферменты 120, см.
отдельные ферменты.
Плавления вещества t° , определение
120.
Плазма крови 90.
Плазма молока 113.
Плотность и объем воды при различ-
ных t° 254.
Поверхностное натяжение 11, 77, 154,
186.
Подагрические отложения 174.
Подвижность ионов, значение при
осажд. белков 11.
Поджелудочный сок 142.
Полиены 86.
Полипептидазы 142, 158, 51.
Полипептиды см. пептиды.
Полисахариды см. Крахмал, Гликоген,
Дисахариды.
Полноценность белков 124.
Поляриметрическое определение са-
хара в моче 225.
Поляриметрия 29, 69, 225.
Поправки к показаниям барометра
253.
Порфирины 109, 188.
Правило Шюц-Борисова 140.
Проба см. также Реакция.
Проба акролеиновая 75.
Проба брожением в моче 190.
Проба кольцом 15.
Прогоркание жиров 74.
Прованское масло нейтр. 77.
Прозрачность молока 113.
Прозрачность мочи 166.
Прокаливание осадка в весовом ана-
лизе 215.
Проламины 14.
Пролин 35, 152.
Пролин-пептидная связь 35.

Промывание осадка (при кол. анализе) 215.
Пространств. конфигурация (знач. для действия ферментов) 49.
Протаминаы 10, 130.
Протеолитические ферменты 130, см. также Пепсин, Трипсин, Эрепсин.
Протромбин 91.
Проферменты 50.
Птиалин 52.
Птомаины 159.
Пуриновые основания 46, 164, 169, 174.
Пуриновый обмен 174.
Пурины 44, 46, 164, 169, 174.
Пурпурная кислота 175.
Радиус иона, значение для адсорбции 13.
Растворимость жиров 75.
Рахит 128.
Реактив Брюке 16.
Реактив Гупперт-Зальковского 155.
Реактив Гюнцбурга 135.
Реактив Миллона 17.
Реактив Несслера 243.
Реактив Ниландера 77.
Реактив Стокса 105.
Реактив Хаммарстена 186.
Реактивы (список) 260.
Реакция Адамкевича на белки 19.
Реакция биуретовая на белки 18, 37, 141.
Реакция биуретовая на мочевины 171.
Реакция Боаса на молочную к-ту 135.
Реакция Вейля на креатинин 177.
Реакция Герхарта на ацетоукс. к-ту 194.
Реакция Гмелина на желчн. пигм. 155, 185.
Реакция Гупперт-Зальковского на желчн. пигм. 155, 186.
Реакция Гюнцбурга на свобод. соляную к-ту 135.
Реакция Зальковского на холестерин 82.
Реакция Каницаро (дисмутация) 64.
Реакция крови 93.
Реакция Легалья на ацетон 194.

Реакция Либена на ацетон 194.
Реакция Либермана на белки 18.
Реакция Либермана-Бурхарда на холестерин 82.
Реакция Мернера на тирозин 42.
Реакция Миллона на белки 17.
Реакция молока 113.
Реакция мочи 165, 208.
Реакция Мульдера (ксантопротеиновая) на белки 18.
Реакция Мура (альдегидная) на сахара 70.
Реакция мурексидная на мочевую к-ту 123.
Реакция на адреналин 85.
Реакция на витамин А 87.
Реакция на витамин С 88.
Реакция Ниландера на сахара 71, 190.
Реакция нингидриновая на белки 21.
Реакция Петтенкофера на желч. к. 156, 186.
Реакция Розенбаха на желч. пигм. 155, 186.
Реакция Розина на желч. пигм. 186.
Реакция Сакагучи на аргинин 21.
Реакция Селиванова на фруктозу 193.
Реакция слюны 131.
Реакция с серным цветом на желчн. к-ты 154.
Реакция на слабосвязанную серу 20.
Реакция Троммера 71.
Реакция Троммера в моче 190.
Реакция Уфельмана на молочн. к-ту 123, 135.
Реакция фенилгидразинная на сахара 72, 70, 119.
Реакция флуоресц. на жолч. к. 158.
Реакция Хаммарстена на желч. пигм. 186.
Реакция Хеллера на белки 15, 182.
Реакция Хеллера на кров. пигм. в моче 185.
Реакция Шардингера на дегидразы 61.
Реакция Шульце-Распайля на белки 19.
Реакция Яффе на креатинин 177.
Редуцирующие вещества в моче 189.

Резервная кислотность 205.
d-рибоза 44.
Роберт — Стольникова — Брандберга метод колич. опред. белка в моче 227.
Роданистые соли 132, 167.
Ртуть, колич. определение в моче 233.
Ряды активности ионов 13.
Сальковского реакция на холестерин 81.
Самосбраживание дрожжей 191.
Сахар, содержание в крови 99, см. Глюкоза.
Сахароза 55, 130, 158.
Сахара см. Галактоза, Глюкоза, Лактоза, Мальтоза, Рибоза, Тростниковый сахар, Фруктоза.
Сахара, кол. опред. в моче 225.
Свертывание белков при кипячении 10, 181.
Свертывание крови 91.
Свинец, колич. определен. в моче 231.
Sedimentum lateritium 166.
Сера „нейтральная“ 167.
Сера слабосвязанная 20.
Сероводород 20, 25, 36, 159.
Серомукоид 92.
Скатола 160, 179.
Скатоксил 179.
Сквалены 74.
Скисание молока 122.
Скорость приливания электролитов (значение при осажд. белков) 13.
Скорость ферментативной р-ции 48.
Слепой опыт 220.
Слизевая к-та 119.
Сложные эфиры аминокислот 36.
Слюна 130, 52.
Смоляные кислоты в моче 182.
Сода 93, 141.
Соединительная ткань 124.
Сок желудочный 132 и след.
Сок кишечный 158.
Сок поджелудочный 142.
Солод 52.
Солодовый сахар 68 см. Мальтоза.
Соляная кислота 132 и след.

Соляная к-та общая 133, 137.
Соляная кислота свободная 133—137.
Соляная кислота связанная 133, 137.
Спекание вещества 120.
Спектроскопия 103.
Спектры поглощения 104 и след., 157, 163, 184, 188.
Специфичность действия ферментов 49, 55.
Спирт этиловый 65.
Сростки мочевые 196.
Стандартные растворы 208.
Створаживание молока 121.
Стеапсин 152.
Стеариновая к-та 74, 79.
Стерины 81, 153.
Стеркобилин 161.
Стойкость ферментов 49, 53, 139.
Стуковенкова метод определения ртути в моче 233.
Сульфатиды 79.
Сульфаты в моче 167, 183.
Сульфаты в моче колич. опред. 214.
Суспензионные коллоиды 7, 11.
Сушение вещества 119, 214.
Сыворотка крови 100.
Сыворотка молока кислая 123.
Сыворотка молока сладкая 122.
Сывороточный альбумин 92, 181.
Сывороточный глобулин 92, 101, 181.
Сыр 121.
Сычужный фермент 121, 137.
Сфингомиэлины 79.
Таврин 156.
Таутомерия мочевой к-ты 173.
Творог 122, 144.
Тейхмана кристаллы 110.
Температура замерзания мочи 166.
Температура плавления, опред. 120.
Темп. пл. коррегированная 120.
Тендомукоид 125.
Тильманса метод определёния витамина С 245.
Тиоцианаты см. Роданистые соли.
Тиреоглобулин 23.
Тирозин 42, 145, 149, 152.
Титр 200.

Титрование 200.
Титрование алкалиметрическое аминокислот по Вильштеттеру и Вальдшмит-Лейцу 147.
Титрование аммиака 217, 218.
Титрование ацетона 228, 230.
Титрование витамина С 245.
Титрование кислот желуд. содержимого 136.
Титрование 205.
Титрование мочевой к-ты 222.
Титрование перекиси водорода 57.
Титрование сахара фелинговой жидкостью 225.
Титрование сахара крови по Хагедорн-Иенсену 236.
Титрование формоловое 147.
Титрование фосфатов 213.
Титрование хлоридов 211, 212.
Титрованные растворы 203.
Титрованный раствор 2, 6—дихлофенолиндофенола 245.
Титрованный раствор едкого натра 207.
Титрованный раствор иода 154.
Титрованный раствор иодноватокислого калия 237.
Титрованный раствор марганцевокислого калия 222.
Титрованный раствор , роданистого аммония 211.
Титрованный раствор серебра азотнокислого 211.
Титрованный раствор серноватистокислого натрия 228.
Титрованный раствор серной к-ты 218.
Титрованный раствор сернокислого аммония 243.
Титрованный раствор соляной к-ты 137.
Титрованный раствор уксуснокислого уранила 214.
Титрованный раствор щавелевой к-ты 205.
Титрованный раствор щавелевокислого натрия 222.
Триметиламин 81.

Триметил-гидроксиэтилгидрат аммония (холин) 80, 81.
Трипсин 142.
Триптофан 17 и след., 38' 145.
Тробеза метод колич. опред. свинца в моче 231.
Тромбин 91.
Троммера проба 71.
Троммера проба в моче 190.
Тростниковый сахар 70, 159.
Тяжелых металлов соли (осаждение белков) 13, 102, 105, 121.
Углеродная группа белков 18.
Углеродная группа муцина 131.
Углеродная группа нуклеопротеидов 44, 47.
Углеводы 57.
Углеводороды непредельные 74.
Углекислая известь 127, 196.
Угольная к-та 36, 65.
Угольная к-та в крови (колич. определение) 98.
Удельные веса некотор. оснований при 15° 256.
Удельные веса кислот при 15° 257.
Удельный вес крови 90.
Удельный вес молока 113.
Удельный вес мочи 165.
Уолпола компаратор 209.
Упругость насыщенного вод. пара при различн. t° 252.
Ураты, см. Мочевая кислота.
Урацил 46.
Уреаза 172, 166.
Уробилин 187, 161.
Уробилиноген 187.
Урометр 165.
Уропорфирин 188.
Урокротин 165.
Уроэритрин 166.
Уфельмана р-ция на молочную к-ту 123, 135.
Фактор титрованного раствора 206.
Фелинга метод определ. сахаров 225.
Фенилглюкозозон 72.
Фениллактозозон 119.
Фенилмальтозозон 70.
Фенолы 178, 159, 167, 17.

Ферменты 48 и след., 130 и след.
Фибрин 92, 140.
Фибриноген 92.
Фиброин шелка 39.
Физико-химич. свойства белков 7
и след.
Фильтрование при колич. анализе
214.
Фильтры беззольные 214.
Флавины 61.
Флавин-фермент 51.
Флуоресценция 82.
Фолина метод опред. креатинина в
моче 223.
Фолина метод определения ацетона
в моче 230.
Фолина метод определения остаточ-
ного азота 241.
Фолина и Шефера метод определ.
мочевой кислоты 222.
Фолликулин 83.
Фольгарда метод опред. хлоридов
211.
Формоловое титрование 147.
Формула для приведения объема газа
к 0° и 760 мм. 98.
Фосфатиды 79.
Фосфаты в моче 167.
Фосфаты в моче, колич. опред. 213.
Фосфоглицериновая кислота 64.
Фосфопировиноградная кислота 64.
Фосфорная к-та 46, 79.
Фосфорнокислая аммиак-магнезия
196.
Фосфорнокислая известь 127.
Фосфорнокислая магнезия 127.
Фраунгоферовы линии 104, 256.
Фруктоза 192, 55, 225,
Фурфурол 36.
Хагедорн-Йенсена метод определения
сахара в крови 236.
Хеллера реакция на белки 15, 182.
Хеллера реакция на кровь в моче 185.
Химозин 121, 137.
Хинон 62.
Хитозамин 131.
Хлориды мочи 166.

Хлориды мочи, колич. опред. 211,
212.
Хлористый натрий в крови 99.
Хлористый натрий в моче 166.
Хлорофил 109.
Холан 156.
Холдена метод анализа газов крови.
95.
Холевые кислоты 156, 186.
Холестерин 81, 158.
Холестерин 154.
Холин 80, 81.
Холодильник воздушный 39.
Холодильник обратный 39.
Хондроальбумоид 126.
Хондрозамин 126.
Хондроитин 126.
Хондроитиносерная к-та 127, 128.
Хондромукоид 127.
Хромопротеиды 102.
Хрящевая ткань 126.
Цвет мочи 164, 184, 185, 187.
Цереброзиды 79.
Циановокислый аммоний 171.
Циануровая кислота 171.
Цистеин 21, 62.
Цистин 38, 37, 21, 62, 152, 167.
Цитозин 46.
Цитохром 62.
Цитрулин 170
Чувствительность р-ций на белки 22.
Чувствительность р-ций на белки в
моче 182.
Чувствительность р-ций на желч.
к-ты в моче 187.
Чувствительность р-ций на желч. пиг-
менты в моче 186.
Шардингера р-ция на дегидразы 61.
Шульце-Распайля р-ция на белки 19.
Шюц-Борисова правило 140.
Щавелевокислая известь 195, 196.
Щелочное брожение мочи 166.
Эксикатор 119.
Экскременты 161.
Эластин 126.
Эластическая ткань 126.
Электролитическая диссоциация со-

лей (значение при осаждении белков) 11.
Электролиты (влияние на свойства белков) 28.
Электролиты (значение для действия ферментов) 50, 54, 58, 91, 139.
Элюция 51.
Эмульгирование жиров 77.
Эмульсин 49.
Энзимы 48, см. Ферменты.

Энтерокиназа 143, 144
Эрепсин 158.
Эритродекстрины 52.
Эритроциты 94.
Эстеразы 52, см. Липаза.
Эфиросерные кислоты 167, 178, 180.
Яичный альбумин 9.
Яичный глобулин 9, 12.
Янтарная кислота 153.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Глава I. Белки	7
Физико-химические свойства белков. Белок куриного яйца. Реакции на белки по осаждению. Цветные реакции. Чувствительность реакций на белок. Освобождение жидкостей от белка. Свойства альбуминов и глобулинов. Миозин. Свойства кислотных и щелочных альбуминатов. Диализ белка. Получение белков в кристаллическом виде. Вращение плоскости поляризации света. Гидролиз белков. Выделение цистина. Реакции на цистин. Выделение тирозина. Вакуум-перегонка. Реакции на цистин.	
Глава II. Нуклеопротейды	44
Выделение нуклеопротейдов из дрожжей. Пуриновые основания. Открытие фосфорной кислоты и углеводной группы.	
Глава III. Ферменты	48
Методы получения ферментов. Гидролазы. Гидролиз крахмала под влиянием амилазы слюны птиалина. Открытие декстринов по реакции с иодом. Влияние т-ры. Влияние электролитов. Определение амилазы по Вольгемуту. Специфичность действия. Сахараза (инвертин). Окислительно-восстановительные ферменты. Кatalаза. Влияние т-ры. Влияние рН. Оксидазы. Пероксидазы. Получение вытяжки из хрена. Приготовление очищенного препарата пероксидазы. Дегидразы. Реакция Шардингера. Глутатион. Реакция на глутатион. Брожение. Гликолиз.	
Глава IV. Углеводы	67
Гликоген. Получение гликогена. Реакции на гликоген. Гидролиз гликогена. Мальтоза, Глюкоза. Реакции на глюкозу.	
Глава V. Жиры	74
Вываривание жиров. Растворимость. Акролеиновая проба. Гидролиз жиров. Непредельные жирные кислоты. Эмульгирование жиров. Влияние жира и мыла на поверхностное натяжение воды.	
Глава VI. Липоиды	79
Лецитины. Кефалины. Выделение смеси лецитинов и кефалинов из мозга. Выделение холина. Открытие глицерина и фосфорной кислоты. Реакции на лецитин. Холестерин, реакции на холестерин.	
Глава VII. Гормоны	84
Гормоны. Адреналин. Реакции на адреналин.	
Глава VIII. Витамины	86
Витамины. Витамин А. Реакции на витамин А. Витамин С. Реакции на витамин С.	
Глава IX. Кровь	90
Плазма крови. Получение гепарина. Значение ионов кальция для свертывания крови. Фракционированное осаждение белков оксалатной плазмы. Остаточный азот крови. Дефибринированная кровь. Осмотическое давление. Гемолиз. Газы крови; определение емкости	

крови в отношении кислорода; определение содержания угольной кислоты. Свертывание белков дефибринированной крови при нагревании; открытие поваренной соли и сахара. Каталаза. Гваяковая проба. Бензидиновая проба. Сыворотка крови. Отсутствие фибриногена. Буферные свойства сыворотки. Кровяные пигменты. Оксигемоглобин. Получение кристаллов оксигемоглобина. Спектроскопическое исследование. Гемоглобин. Метгемоглобин. Карбоксигемоглобин. Продукты расщепления кровяных пигментов. Гематин. Гемохромоген. Порфирины; гематопорфирин. Кристаллы гемина (Тейхмана). Исследование кровяных пятен. Открытие железа.

Глава X. Молоко	113
Свойства свежего коровьего молока. Определение удельного веса: пикнометром, ареометром. Открытие и выделение главных составных частей коровьего молока. Жиры. Казеин. Молочные глобулин и альбумин. Молочный сахар. Реакции на молочный сахар. Сушение вещества. Определение t° плавления. Высаливание белков молока. Осаждение солями тяжелых металлов. Действие химозина на казеин; значение ионов кальция. Скисшее молоко. Открытие молочной кислоты.	
Глава XI. Соединительная ткань	124
Клетчато-соединительная ткань	124
Коллаген. Глутин.	
Эластическая ткань	126
Эластин.	
Хрящевая ткань	126
Хондромукоид; открытие хондроитиносерной кислоты.	
Костная ткань	127
Оссеин. Обугливание; озоление кости. Анализ костной золы.	
Жировая ткань	129
Глава XII. Пищеварительные соки и пищеварение	130
I. Слюна	130
Физические свойства и состав слюны. Выделение муцина. Реакции на муцин. Открытие роданистоводородной кислоты.	
II. Желудочный сок и желудочное пищеварение	132
Желудочный сок. Кислоты желудочного содержимого. Реакции на свободную соляную кислоту. Индикаторы. Открытие молочной кислоты. Летучие жирные кислоты. Титрование кислот желудочного содержимого. Пепсин. Роль пепсина и соляной кислоты при переваривании белков. Действие щелочей на пепсин. T° разрушения пепсина. Количественное определение активности пепсина (метод Метта). Исследование продуктов пептического переваривания. Альбумозы. Пептоны. Дезинфицирующее действие соляной кислоты. Открытие крови. Муцин.	
III. Поджелудочный сок	142
Трипсин. Триптическое переваривание белков. Влияние киназы. Исследование продуктов триптического переваривания. Сравнение переваривающей способности растворов трипсина. Метод Метта. Метод Вильштеттера и Вальдшмидт Лейца. Формоловое титрование	

по Зеренсену. Определение азота свободных амидных групп по ван Слайку. Липаза. Расщепление жиров. Влияние желчи. Амилаза.	
IV. Желчь	153
Состав и физические свойства. Влияние желчи на поверхностное натяжение воды. Растворяющее действие желчи. Выделение нуклеоальбумина (так называемого муцина желчи). Желчные пигменты. Желчные кислоты. Выделение гликохолевой кислоты. Открытие холестерина.	
V. Кишечный сок	158
Эрепсин. Расщепление полипептидов. Открытие сахаразы.	
VI. Гниение в кишечнике	159
Гниение мяса. Открытие индола и скатола.	
VII. Экскременты	161
Состав экскрементов. Открытие уробилина, индола и скатола. Реакции на кровь.	
Глава XIII. Качественный анализ некоторых нормальных и патологических составных частей мочи	164
I. Нормальные составные части мочи	164
Свойства мочи. Цвет. Количество. Уд. вес. Реакция. Прозрачность. Запах. Т-ра замерзания. Главные нормальные составные части мочи. Хлориды. Фосфаты. Сульфаты. Кальций. Магний. Натрий. Калий. Аммиачные соли. Мочевина. Выделение мочевины из мочи. Отличительные реакции мочевины. Действие уреазы. Мочевая кислота. Выделение мочевой кислоты из мочи. Отличительные реакции мочевой кислоты. Креатинин. Реакции на креатинин. Выделение креатинина из мочи. Фенолы. Открытие фенолов в гидролизате мочи. Индикан.	
II. Патологические составные части мочи	181
Белки. Открытие их в моче. Чувствительность реакций на белки. Освобождение патологической мочи от белка. Альбумозы. „Нуклеоальбумин“, „муцин“ мочи. Кровяные пигменты. Открытие их в моче. Желчные пигменты. Открытие в моче. Желчные кислоты. Уробилин. Порфирины. Углеводы и редуцирующие вещества. Глюкоза. Открытие в моче. Молочный сахар. Парные глюкуроновые кислоты. Фруктоза. Ацетоновые тела. Ацетон. Ацетоуксусная кислота. β -оксимасляная кислота.	
III. Мочевые осадки и сrostки	195
Мочевые осадки (неорганизованные). Осадки кислой мочи. Осадки щелочной мочи. Мочевые сrostки. Их главные типы. Краткий анализ.	
Глава XIV. Методы количественного определения некоторых составных частей мочи	198
Общие правила количественного анализа. Весовой анализ. Правила взвешивания. Объемный анализ. Калибрование мерительной посуды. Нормальные растворы. Методы объемного анализа. Определение кислотности мочи. Приготовление $n/10$ -NaOH. Кристаллизация щавелевой кислоты. Навеска. Определение титруемой кислотности. Определение pH мочи индикаторным методом. Приготовление буферных растворов. Хлориды. Способ Фельгарда.	

Способ Мора. Фосфаты. Сульфаты. Кальций. Магний. Аммиак. Азот по Кьельдалю. Мочевина. Мочевая кислота. Креатинин. Колориметрия. Сахар. Поляриметрическое определение. Титрование фелинговой жидкостью. Белки. Ацетоновые тела. Ацетон + ацетоксусная кислота. β -оксимасляная кислота. Ацетон. Свинец. Нефелометрия. Ртуть.	
Глава XV. Микрометоды	236
Определение сахара в крови по Хагедорн-Иенсену. Определение остаточного азота в крови по Фолину. Определение витамина С. Метод Варбурга.	
Приложения	252
I. Таблица атомных весов некоторых элементов	252
II. Таблица упругости насыщенного водяного пара при различных температурах.	252
III. Таблица поправок к показаниям барометра.	253
IV. Таблица плотности и объема воды при различных температурах.	254
V. Таблица для вычисления объема стеклянного сосуда по весу наполняющей его воды или ртути.	255
VI. Таблица длин волн главных фраунгоферовых линий.	256
VII. Таблицы удельных весов некоторых оснований и кислот при 15°	256
VIII. Таблица растворимости некоторых солей при различных температурах.	258
IX. Область изменения некоторых индикаторов.	259
X. Список реактивов.	260
XI. Таблицы логарифмов.	266
Предметный указатель	272

Отв. редактор проф. А. Е. АРБУЗОВ. Тех. редактор А. САДОВ.

18 п. л. В печ. листе 48.400 знаков. Ст. фор. 62×94. Сдано в производство 22/II 1937 г. Подписано к печати 9/VII 37 г. Тираж 6000+115 экз.

Наряд № 031. Татглавлит № В—223.

Татполиграф при НКМП АТССР. Казань, ул. Миславского, 9. 1937 г.

ГЛАВНЫЕ ЗАМЕЧЕННЫЕ ОПЕЧАТКИ.

Страница	Строка	Напечатано	Должно быть
15	1 снизу	$[\text{Fe}(\text{CN})_6]'''$	$[\text{Fe}(\text{CN})_6]''''$
28	16 "	стоять	стоять
35	1 "	гидр лизе	гидролизе
70	в формуле	$\begin{array}{c} \\ \text{НО}-\text{C}- \\ \\ \text{CH}_2\text{ОН} \end{array}$	$\begin{array}{c} \\ \text{Н}-\text{C}- \\ \\ \text{CH}_2\text{ОН} \end{array}$
87	9 сверху	Дача больших доз ви- тамина А	Дача больших доз го- тового витамина А
89	1 снизу	еще не могут	не могут
110	1 "	кубовидных	в кубовидных
130	7 снизу	состав действие	состав и действие
135			Рисунок должен быть перевернут
152	7 сверху	свободнах	свободных
159	10 "	тирозина иглы	тирозина [иглы
179	14 снизу	$\text{C}_6\text{H}_2\text{Br}_2$. OBr	$\text{C}_6\text{H}_2\text{Br}_3$. OBr
213	8 "	$4 \text{KC}_2\text{H}_3\text{O}_3$	$4 \text{KC}_2\text{H}_3\text{O}_2$
236	1 "	креатинин	, креатинин,
256	5 сверху	В
257	В 4-м столбце	58,00	48,00
267	В 9-м столбце	8434	8432
273	3 снизу	Глуматиновая	Глутаминовая
276	22 сверху	Нуклеобальбумин	Нуклеоальбумин
277		Пищеварительные фер- менты 120	Пищеварительные фер- менты 130
279	8 снизу	Сода 93, 141	Сода 93, 143
279	6 сверху	Спектры поглащения	Спектры поглощения
280		Титрованный раствор 2,6-дихлофенолиндофе- нола	Титрованный раствор 2,6-дихлорфенолиндо- фенола
280		Урохром	Урохром
283	10 сверху	Реакции на цистин	Реакции на тирозин

ЦЕНА 5 р. 65 коп.

Переплет 55 коп.

