

57  
P T78  
661458

$\pi-1.$   
 $\pi-14.$



ТРУДЫ ГОСУДАРСТВЕННОГО ТИМИРЯЗЕВСКОГО НАУЧНО-  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ИНСТИТУТА

изучения и пропаганды естественно-научных основ диалектического  
материализма

---

Отделение физико-химических основ жизни

СЕРИЯ I Отд. I

Выпуск I

Проф. С. С. Перов

Явления тождества в белках

Prof. S. S. Peroff

Erscheinungen der Identität in  
den Eiweisskörper

Б. А. Догадкин

Дисперсные свойства некото-  
рых солей плазмы

B. A. Dogadkin

Dispersische Eigenschaften eini-  
ger Plasma-Sälzer

М. А. Лисицын

Изучение физико-химических  
свойств белка

M. A. Lissitzyn

Studium der physiko-chemischen  
Eigenschaften des Eiweisses

## Т Р У Д Ы

Проф. С. С. Перов. — Явления тожества  
в белках. Б. А. Догадкин. — Дисперс-  
ные свойства некоторых солей плазмы.  
М. А. Лисицын. — Изучение физико-  
химических свойств белка.

«СЕВЕРНЫЙ ПЕЧАТНИК»

ВОЛОГДА

1925

Типо-литография Акц. О-ва „Северный Печатник“.

Гублит № 1104. (Вологда).

Тираж 1000 экз.

# **Явления тождества в белках**

**Проф. С. С. Перов**



## Явления тождества в белках.

Научному работнику-материалисту, стремящемуся разрешить «загадку жизни», основным препятствием является густой туман, которым окутана в химии белковая проблема.

Мистическое, священное отношение к целостности белкового вещества при выделении его из животного или растительного тела (только физические растворители), непонятная боязнь применить химико-аналитический прием к белковой молекуле, доводящий до конца исследование (установление молекулярного веса), усиленное стремление не объединить наблюдения и тем уменьшить количество отдельных белков, а, наоборот, разъединить, различить, индивидуализировать при первом намеке получающиеся фракции белковых веществ, а тем самым увеличить количество названий белка,—все это создало внутренний консервативный стимул для научных работников задержать химию протеинов на алхимической стадии.

Между тем, яснее дневного света положение, что в белке и только в белке сосредоточено все, что названо в биологии—жизненными явлениями.

Без белкового субстрата нет «жизни». Белок дает основу всем формообразующим процессам «живого тела». Вся эволюция «от амебы до человека» опирается на усложнение белковой субстанции. В раскрытии ее сущности и в выражении ее свойств физической моделью и заключено решение «загадки».

Свойства же белковой субстанции весьма примечательны. Чрезвычайная физическая и химическая подвижность и в то же время упорная стойкость, упругая сопротивляемость внешнему воздействию; возможность быстрого и легкого распада и свободно идущая в организме обратимость в виде простого и прямого синтеза; с одной стороны—наличность ритмичного угасания, старения, а с другой—способность к возрождению, как



феникса из пепла, возможность омоложения,—в этих противоречиях пульсирует белковый субстрат.

Этими же противоречиями богато и движется вперед то, что любят называть «жизнью».

Казалось бы, необходимо направить все усилия химиков на разрешение белковой задачи, а, между тем, она насчитывает около себя едва десяток лиц, имея столетнюю давность.

После работ Фуркруа, Эйнгофа, Грена, Браконно и Буссенго вплотную белками занялся Риттгаузен, и его работы, проведенные в 1862—82 годах, остаются и по сей час единственным источником сведений о белках. Группа ученых в позднейшее время с Осборном во главе, монография которого о белках появилась в начале XX века, почти не внесла ничего нового в учение о белках, пользуясь методами и уточняя классификацию Риттгаузена.

В стороне стоят работы Робертсона, Зеренсена и Леба, не касающихся вопросов систематики белков и их состава и принимающих за белки весьма и весьма сомнительные вещества в смысле однородности, как желатина и альбумин (Леб и Зеренсен).

В химии белков XIX столетия остается, как можно убедиться из любого учебника по физиологической химии, классификация, введенная Риттгаузенем и несколько дополненная Осборном; классификация эта имеет разделы—собственно белков, соединений белков, первичных производных белков и вторичных производных белков. Все это деление формально и поверхностно, ибо так классифицировать—все равно, что сказать в общей химии о существовании элементов и соединений их или в ботанике о существовании разновидностей и гибридов. Эта классификация годна для предварительного отличения, а не для систематического изучения.

Классификация собственно белков включает в себя альбумины, глобулины, глутелины и проламины.

Основным признаком этой классификации взята растворимость, чем вся проблема поставлена на ложный путь.

Растворимость, указывающая лишь на физическое соотношение дисперсной фазы с дисперсионной средой, никоим образом не может служить признаком для определения различия в

химическом составе. Растворимость является вторичным признаком, функцией от величины веймарид вещества.

Исследования Stas'a с несомненностью показали, что растворимость  $\text{AgCl}$  зависит от величины агрегатов  $\text{AgCl}$ ; В. Оствальд говорит о разнице в растворимости окиси ртути; G. Hullet установил для разной величины частиц сернокислых соединений щелочно-земельных металлов разную концентрацию насыщения <sup>1)</sup>).

Мои исследования над казеиновой кислотой показали, что из нее можно приготовить препараты растворимые в солях, а с другой стороны—нерастворимые даже в щелочах. Все это зависит от размеров осаждаемых веймарид казеиновой кислоты

Русский химик профессор Прянишников, подтверждая классификацию Осборна, говорит: «Пока строение частицы белка неизвестно, пока не выяснена связь того или иного белка с особенностями его ближайшего химического состава, приходится для установления групп часто пользоваться признаками преимущественно физическими, каково, например, отношение к растворителям, к действию тепла» <sup>2)</sup>).

Подобные воззрения крайне затрудняют прогресс в науке. Смысл цитированного сводится к тому, что пока мы мало работали в какой-либо области науки, то можно пользоваться любым ложным, но доступным признаком для разделения. Для полной ясности, попробуем перейти к неорганической химии и предположим, что мы не знаем состава и свойств ряда веществ и будем их классифицировать по отношению к растворителям и к действию тепла (физические признаки).

Тогда все металлы, имеющие пассивное состояние к кислотам, отойдут сами от себя в особую группу.

Хлориды серебра, соединившись с платиной, металлоидами и некоторыми сернистыми соединениями металлов, образуют однородную группу.

Сера, селен и теллур дадут по  $t^0$  плавления ряды особых индивидов. Ряд сплавов металлов и металлы чистые объединяются

<sup>1)</sup> Zeitschr. d. phys. Chem. 1900—1901 г.г.

<sup>2)</sup> Д. Н. Прянишников. Химия растения. Белковые вещества. Москва, 1914 г., стр. 109.

по т<sup>0</sup> плавления в общие группы, несмотря на различие в химическом составе.

Целый ряд сюрпризов принесла бы эта попытка классификации и послужила бы полной остановке науки.

Сжатый искусственными перегородками, исследователь обратил бы все свое внимание на правильность отнесения какого-либо вещества к той или иной группе и, не размышляя о ложности классификационного признака, был бы бесплоден в работе, как мул.

Нечто подобное и происходило с химиками, работающими в области белковых веществ.

Легумин, в ряде опытов не растворявшийся в солевых растворах и отнесенный вначале к типу глутелинов, пришлось перенести к типу глобулинов, когда способ размельчения помог вытянуть из семян гороха легумин в раствор NaCl.

В любых семенах, хотя бы овса, все белковые вещества подтекают в зольном состоянии, они образуются не в семени, ибо белок находится в соке растений. Отсюда странно было бы предполагать, что от момента молочного периода до отвердения с белком в семени происходит что-нибудь большее, чем дегидратация, а вероятнее—просто коагуляция, сопровождаемая синерезисом и уплотнением сгустка.

Абсолютно нерастворимых тел в природе не существует следовательно, уже в начале совершена познавательная ошибка переноса чисто физического и условного момента растворения на более стойкие химические свойства веществ, ошибка, так как есть нечто присущее только химическому индивидууму и нечто общее группе гетерогенных химических веществ.

Схема для разделения по растворителям—вода (очевидно, дистиллированная, но ведь без указания на  $P_H$ ), 10% раствор NaCl и щелочь (концентрация?)—совершенно условна. Этот ряд можно было бы продолжить, хотя бы такими солями— $Na_2HPO_4$ ,  $Na_2CO_3$  или солями органических кислот, хотя бы  $C_6H_4(OH)COONa$ . По нашим опытам все эти соли дают свои фракции из общесырой массы белка, и тогда могут появиться еще три или четыре «ина».

Аналогией из общей химии возможно показать, как условна концепция разделения по растворителям.

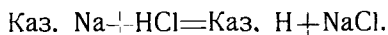
Если мы возьмем полуразрушенную щелочью соль алюминия, то в общей массе гидрата окиси алюминия будут находиться легко растворимые в воде соли. И, что может проделать всякий, мне при известной настойчивости удавалось получить из общей массы смеси соединений алюминия фракцию, растворимую в простой воде, фракцию, растворимую в 10% NaCl (очевидно, смешанные, двойные соли?), и фракцию, растворимую только в щелочи. Подобные же вытяжки можно получить с разложенными солями  $H_2SiO_3$ .

С молоком можно проделать опыт постепенного высушивания его при низкой температуре и извлечения из полученного сухого вещества всех типов белков по Осборну.

С другой стороны—из совершенно чистой, выделенной казеиновой кислоты, при условии прилития к ней небольшого количества щелочи и раствора  $CaCl_2$ , после связывания щелочи и последующего высушивания образовавшейся жидкости, можно было извлечь из оставшегося порошка все фракции белков и даже типа проламина.

Все это говорит о произвольности признака классификации у Осборна, признака, подсказанного фактом физической общности, без приложения критического химического анализа.

Вопрос упростится при переносе его в область механики растворения белковых веществ несомненно индивидуализированных, в роде казеиновой кислоты. Если взять соль ее, хотя бы натриевую, то обменная реакция между нею и HCl будет такова:



Выделившаяся казеиновая (белковая) кислота выпадает, коагулирует при условии концентрации окончательного раствора выше  $\frac{E}{200}$ .

Если же взять концентрации окончательного раствора ниже  $\frac{E \text{ и } p}{500}$ , то казеиновая кислота остается в золевом состоянии, следовательно, она уже растворима в почти чистой воде.

Далее. Если взять концентрацию сливаемых растворов (Каз. Na и HCl)  $\frac{E \text{ и } p}{50}$  или выше, но перед сливанием добавить

в казеин натрий 20% NaCl, то казеиновая кислота останется на этот раз в золевом состоянии высшей степени дисперсности, чем в случае  $\frac{E}{200}$ , следовательно, она растворима при известных условиях и в 10% растворе NaCl. В щелочи растворить казеиновую кислоту возможно в широких пределах.

Отсюда ясно, что все виды белковых тел в виде физических фракций присутствуют в совершенно однородном протеине. И фракции эти вызываются величиной получаемых веймарид, соотношением между дисперсными фазами и дисперсионной средой и поддерживательным напором или самой среды, или внесенной в нее второй, или третьей фазой, а, следовательно, только физическим различием.

Эта постановка вопроса менее гипотетична, чем классические подходы к систематике белков, ибо она приводит к меньшим противоречиям, упрощает представление о белке, уничтожает таинственность каких-то особых изменений белка признанием химических методов его извлечения.

Коагуляция белка при повышении температуры или получение щелочного раствора протеинового тела упирается в классической химии в мистику неведомых изменений, наступления необратимости, тогда как с точки зрения коллоидного анализа здесь лишь имеется изменение степени дисперсности,—вполне возможный к обращению процесс.

Не менее тяжким уроном для химии белка были глубокие исследования в области органического синтеза гениального химика Э. Фишера. Из его работ вытекло определенное решение, что протеины построены из аминокислот, и синтез их заключается в уменьши нанизать аминокислоты друг на друга.

Эта уверенность не оправдалась всем ходом его исследований и исследований его учеников. Даже 18-членный полипептид не давал сходства с белковыми простейшими веществами. Это был только полипептид. Повидимому, белок построен проще. В него входит большое количество простых и неразнообразных групп, имеется протеиновое ядро, а аминные группы являются добавочными группами.

В чем ошибка? В исходной точке, что гидролиз может дать указание на порядок синтеза.

Нагревание с кислотами при высокой температуре в течение ряда часов не может дать уверенности, что разложение белка на составные части таким путем естественно, непринужденно.

Здесь сказывается оборотная сторона мистики.

Если с белком черезчур осторожничают, выделяя его из сырья, то при гидролизе черезчур смело решают за однозначность процесса, за отсутствие побочных реакций. Наличие темных малоопределимых веществ в результате гидролиза, аналогия с сухой перегонкой, при которой химик не получает составных частей, а ряд побочных, и в разнообразных отношениях, продуктов, в зависимости от условий перегонки, говорят за то, что метод гидролиза более чем условен. Подход к анализу и синтезу белка иной. Необходимо выделить белки в наиболее чистом химическом состоянии, а не пользоваться случайными физическими фракциями его, и необходимо индивидуализировать белок лишь при помощи ряда физико-химических констант. Через них возможно и определение молекулярного веса. Кроме того, имеются и прямые химические способы определения его, один из которых я и предполагаю изложить,—метод титрования в нейтральном растворителе.

Э. Фишер же, повторяю, получал не белковые вещества, а полипептиды, как химик по углеводам, нанизывая случайно друг на друга гептозы, гексозы, пептозы и тетрозы, получил бы не естественно присутствующие в природе сахара и крахмал, а всего лишь на всего искусственные полиозы.

Характеристикой белкового тела являются не столько данные элементарного анализа, весьма мало друг от друга отличающиеся у ряда протеинов и молчащие о строении групп, входящих в молекулу белка, сколько качественные и количественные реакции на физически яркие, химически ощутимые по свойствам составные части этой молекулы.

Протеин-химики установили, что в молекуле белка встречаются характерные группы, своего рода радикалы, как-то: аминные, карбоксильные, фенильные, кетонные.

Любая из таких групп, способная отозваться на определенный индикатор, могла бы служить для распознавания, а тем самым и для основ классификации белка.

Если бы под руками у химика были способы быстро и легко определить количество входящих групп-радикалов в молекулу «альбумина», то при данных элементарного анализа построить молекулу альбумина было бы так же просто, как молекулу любой неорганической соли в роде  $\text{CuSO}_4$ .

Путь нащупывания реакции для групп, составляющих молекулу, является, поэтому, более плодотворным и надежным для классификационных целей.

Из групп радикалов, установленных в молекуле, наиболее интересными являются аминные и карбоксильные, ибо их весьма легко определить при помощи титрования с индикаторами.

В этом направлении особенно посчастливилось «казеину» молока. Поскольку молоко является жидкостью, для изучения его белков не понадобилось применения растворителей. Из практики скисания был выдвинут вопрос о закономерности получения белков при помощи осаждения кислотой, хотя бы уксусной. И лишь по сходству влияния температуры был отнесен к альбуминам белок, остающийся в сыворотке.

У казеина на первом плане выступает кислотная функция, группы-радикалы карбоксильные— $\text{COOH}$ . Эти группы настолько сильны, что могут вытеснять углекислоту из солей.

Целый ряд химиков дал для казеина т. н. числа титрования, т.-е. количества  $\frac{n}{10}$   $\text{NaOH}$ , идущие на нейтрализацию 1 гр. казеина. Они таковы: Long—8,3 к. с., Courant—9,5 к. с., Spiro и Pemsel—8,7—8,57, Laqueur и Sackur—8,81, Robertson—8,0, Перов—8,2 к. с.

Для непредубежденного исследователя ясно, что «казеин» есть слабая белковая кислота, могущая растворяться в ряде растворителей и титроваться щелочами.

Вот эту ионную функцию и возможно положить в основу классификации белковых веществ. Она дает возможность установления эквивалентного веса, а последний признается лучшей характеристикой для индивидуализации вещества.

Мною выработан метод титрования казеиновой кислоты в нейтральных растворителях, заключающийся в том, что чистый выделенный из молока «казеин» растворяется в смеси  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,

KCl и NaCl или в растворах солей салициловой кислоты и титруется  $\frac{n}{10}$  NaOH с фенолфталеином.

В качестве индикатора наиболее пригоден фенолфталеин по общей теории индикаторов: слабая кислота (казеиновая) титруется сильной щелочью (NaOH).

Реакция с индикатором наступает резко, вызываясь одной каплей  $\frac{n}{10}$  NaOH. Точность титрования установлена на методах титрования слабых неорганических кислот, в роде угольной и фосфорнокислой.

Эквивалентный вес по этому способу для казеиновой кислоты равен 1220.

В моей работе «О тожесамости белков молока»<sup>1)</sup> указано на неверность общепринятого деления белков молока, и при помощи метода титрования все белки его сведены к физическим фракциям казеиновой кислоты. В качестве лишней иллюстрации можно привести следующий опыт.

Молоко нагревается осторожно до 70—75° C. В охлажденное до нормальной температуры вливается рассчитанное количество  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Препарат, полученный отсюда, был совершенно однородным по общим свойствам и давал числа титрования, равные числам титрования казеиновой кислоты, — 8,2. В фильтрате белка уже не обнаруживалось.

Все это говорит за правильность подхода к классификации белка с точки зрения карбоксильной функции.

Естественными и богатыми запасами белковых веществ в природе являются семена растений и ряд биологических жидкостей (молоко, кровь и т. д.) в организме животного. В семенах растений легко осуществимо отделение грубых составных частей — клетчатки, жиров, белков, экстрактивных веществ и солей. Соли, за исключением легко растворимых хлоридов и фосфатов калия и натрия, в большей своей части относятся ко всевозможным соединениям кальция. В семенах с несомненностью установлены кальциевые соединения ряда минеральных и органических кислот. Все эти соли, повидимому, составляют

---

<sup>1)</sup> Труды Вологодского Молочно-Хозяйственного Института, т. II, № 1.



основу скелета семени, ибо во всех уголках эндосперма возможно установить наличие кальция. Выявить вид этого скелета трудно за отсутствием пока реактива, удаляющего содержимое семени за исключением его минеральной части.

Кальций не может образовать солей с клетчаткой; жиры в семени присутствуют в виде чистом (нейтрализация глицерином). Следовательно, из органической части семени с кальцием соединены белки, которые и имеют в наличности кислотные функции. Литературные источники изобилуют указаниями на возможность получения протеинатов кальция и их свойства. Кроме того, вполне вероятными являются абсорбционные соединения фосфорно-кальциевых солей с белковыми солями кальция, создающими как-раз наиболее прочные гели. Для доказательства возможности соединения кальция с белковыми веществами достаточно проделать опыт выделения осадков из нейтральных растворов белка в щелочи приливанием раствора  $\text{CaCl}_2$ . Анализ обнаруживает постоянство чисел для содержания Са в коагуляте.

Абсорбционные соединения, дающие тонкий скелет веществу, можно воспроизвести осторожной реакцией (особенно при нагревании) тех же протеинатов, но в присутствии фосфорнокислых солей натрия и солей кальция.

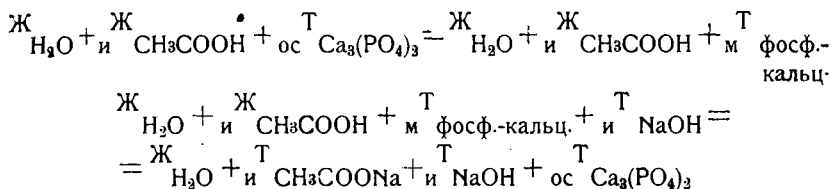
Если обыкновенные протеин-кальциевые соединения ложатся аморфно на дно, то в присутствии фосфорно-натриевых солей получается сплошной сгусток, имеющий несомненно сплетенное, скелетообразное строение внутри из абсорбционно-спаянных кальциевых солей фосфорной кислоты, чистых протеиновых кислот и их кальциевых соединений.

Следующий опыт даст доказательство присутствия в качестве опорной части солевого скелета.

Если взять семена бобов или миндаля, разделенные на половинки, и, разбив их на две части, залить в стаканчиках водой одну часть, а другую—5% уксусной кислотой, то через короткое время семена, залитые кислотой, становятся рыхлыми, ломкими, легко раздавливающимися, безопорными в отличие от оставшихся упругими и плотными семян залитых водой.

Еще эффектнее уничтожение опорной части идет в сгустке молока от сычужного фермента. Плотный и упругий сгусток от действия уксусной кислоты становится рыхлым и рассыпающимся.

В фильтрате от уксусно-кислой заливки легко обнаружить присутствие фосфорно-кальциевых солей фактом прибавления до сильной реакции раствора NaOH. Появляется хлопьевидный осадок, в виду уничтожения растворяющего фосфорно-кальциевые соли действия уксусной кислоты.



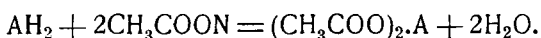
Таковы дисперсоидологические реакции этих процессов воздействия  $\text{CH}_3\text{COOH}$  на сырую массу семян и NaOH—на уксусно-кислую вытяжку.

Общая методика получения белковых веществ из сырья, главным образом семенного, опирается в моих работах на представление о запасах белкового вещества в зерне в форме протеинатов кальция и абсорбционных соединений этих протеинатов с фосфорно-кальциевыми солями.

Для разложения и тех и других одинаково необходимо подобрать растворитель, разлагающий эти соединения, не затрагивая строения самого белка, и уничтожающий структурность абсорбционных связей. Таким растворителем является, взятый из общепроаналитических приемов, раствор уксусной кислоты, в котором легко растворяются фосфорно-кальциевые соли. Необходимо лишь установить оптимальную концентрацию его. Слишком слабые растворы, как показывает опыт, разрушают протеинаты, но не растворяют фосфорных солей.



Слишком крепкие растворы, производя желаемое разрушение, продолжают свое действие и переводят белок в соединения его с кислотой, где белок является уже основанием:



Наиболее идеальной концентрацией является 2—3% раствор  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . При этой концентрации почти нацело разрушаются все абсорбционные соединения и растворяются соли кальция.

Сырье—в форме семян—или подвергается очистке от кожицы с предварительным однодневным настаиванием в воде—горох, фасоль, бобы, миндаль, или только промывке дистиллированной водой от посторонних солей (овес, пшеница). Обработанное таким способом сырье заливается 2—3%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  в таком объеме, чтобы кислота могла совершить разложение протеинов кальция, рассчитанных на весь вес взятых семян, и имелся бы некоторый избыток кислоты.

Двухсуточное стояние с перемешиванием через 3—4 часа и еще лучше—с повторным заливанием—достаточно для реакции кислото-действия. Семена принимают рассыпчатое, мягкое строение. Кислая реакция ясно ощущается лакмусовой бумажкой даже после долговременного промывания дистиллированной водой.

Обработанные таким способом семена промываются до отказа кислой реакции дистиллированной водой и дробятся через мясорубку.

Выбор раздробляющего аппарата важен, ибо черезчур большое размельчение вызывает сильное набухание при дальнейшей обработке клетчатки и крахмала, переводит в эмульсию жиры и затрудняет в дальнейшем получение белка; слишком крупное дробление не дает возможности хорошего выхода белкового вещества (конечно, нацело извлечь белок можно лишь при сильном раздроблении, но меня интересовал быстрый способ получения препарата, а не полный). Мясорубка, при условии двукратного или троекратного пропускания, даст результаты удовлетворительные. Раздробленные семена помещаются в банки из толстого стекла и заливаются раствором щелочи. Предварительно рассчитывают количество (приблизительно) белка в массе, масса заливается дистиллированной водой в таком количестве, чтобы объем воды над семенами был равен объему с семенами; затем после взбалтывания смесь доводится совершенно до щелочной реакции приливанием крепкой  $\left(\frac{n}{2}, \frac{n}{4}\right)$  щелочи; далее вливается такое количество раствора щелочи, чтобы оно было вполне эквивалентно всему количеству белков в массе, и чтобы общая концентрация не превышала  $\frac{E}{25}$ .

Пример: семян 100 граммов. Содержание белковых веществ 20%, следовательно 20 гр. Должно быть взято после усреднения  $\frac{n}{10}$  NaOH—160—180 к. с., при условии, что на 1 гр. белка может идти до 8 к. с.  $\frac{n}{10}$  NaOH; общий объем должен быть до 500 к. с.

Залитые щелочью семена оставляют на 24 часа при условии помешивания через 3—4 часа. Если за это время реакция раствора над семенами будет становиться кислой или слабо щелочной, то прибавляют щелочи до 25% к первоначальному объему щелочи (в примере 40—50 к. с.).

Через двое суток можно предварительную вытяжку считать законченной. Общий объем семян при этом увеличен, клетчатка разбухла, крахмал ослизнен.

Дают всему раствору отстояться. Осторожно декантацией сливают верхний, более прозрачный слой. Отфильтровывают через кисею для задержания грубых частиц. Осаждают избытком уксусной кислоты, приливая 10%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  с таким расчетом, чтобы она вытеснила все количество употребленной щелочи и дала бы перевес не больше 10—20% к этому количеству.

Пример: щелочи употреблено 300 к. с.  $\frac{n}{10}$  NaOH;  $\text{CH}_3\text{COOH}$ —10% берется эквивалентное количество + 20% его.

Белковая кислота осаждается в виде объемистого хлопьевидного осадка. Последнему дают отстояться, декантацией сливают жидкость над ним и раза два-три промывают дистиллированной водой, сливая ее декантацией же. Осадок снова растворяют в щелочи с таким расчетом, чтобы весь белок перешел в протеинат, и чтобы концентрация не была выше  $\frac{E}{50}$  (концентрация белков в молоке). Полученный раствор фильтруют через обыкновенный фильтр. Эта операция весьма медленная, ибо ведется она без давления. Применение давления настолько засоряет фильтр, что он перестает действовать, и большое количество белка остается на фильтре. Свободная фильтрация дает возможность большей полноты процесса, но и при ней приходится сменять фильтрующую поверхность. Профильтрованный

раствор протеина разводится до концентрации  $\frac{E}{100} - \frac{E}{200}$  и осаждается 10%  $CH_3COOH$  при расчете усреднения щелочи и избытка кислоты в 20%.

Оптимальными условиями осаждения, по моим наблюдениям, является концентрация около  $\frac{E}{150}$  и 18° температуры раствора протеината.

Белковая кислота осаждается в виде объемистого коагулята, при чем у некоторых семян она может быть окрашена в чуть желтый цвет.

Далее следует такая операция. Осадок помещается на фильтр, промывается дистиллированной водой до полного отказа на кислую реакцию по лакмусу. Далее к осадку приливается чистый спирт, вначале 50%, в следующих порциях 97%.

Спирт приливается с расчетом вытеснить всю воду из коагулята, заменить ее собой. Идеальным способом является заливание под конец абсолютным спиртом. Хорошие препараты получают от дегидратации при помощи метилового, но он должен быть совершенно освобожден от альдегидов.

Белковая кислота промывается после спирта эфиром для удаления жиров и спирта. После многократных заливок получают препарат белка в виде сухого мелкого порошка.

Сложность всей методики выделения состоит лишь в том, что трудно следить за ходом реакционного процесса, а недостаточно тщательное его проведение сильно отражается на конечном его результате.

В качестве испытуемых веществ брались мною препараты белка, приготовленные из овса, гороха, пшеницы и миндаля. Результаты наблюдений над этими препаратами изложены в частных описаниях.

**ОВСЯНАЯ КИСЛОТА.** Для получения ее взят был обыкновенный овес (*Avena sativa*). Отмытые от пыли и отделенные от посторонних веществ семена овса заливались в стеклянной банке, вместимостью до 750 к. с., 3%  $CH_3COOH$  и оставлялись на двое суток при помешивании через 6—12 часов. После 48 часов настаивания уксусная кислота сливалась с семян; в

ней можно было установить присутствие фосфорно-кальциевых солей и белковых веществ.

Семена овса долговременно промывались вначале водопроводной водой, под конец—дистиллированной до отсутствия кислотной реакции, затем промытые пропускались в мясорубку и заливались водой с прибавлением крепкого раствора NaOH (n) так, чтобы к общему объему семенной мязки и жидкости концентрация щелочи после полного усреднения остатков кислоты была около  $\frac{E}{75}$ .

После шестичасового стояния вливалось крепкого раствора (n) NaOH в количестве половинном к содержанию белка в овсе (эквиваленты брались 1000 белка и 40 NaOH), через шесть часов еще столько же; жидкость тщательно перемешивалась.

Через сутки получался темножелтый слой коллоидного раствора белка над двумя слоями клетчатки и крахмала. Раствор тщательно перемешивается; в случае слабощелочной реакции, а тем более нейтральной или кислой, раствор подщелачивается до сильно щелочной реакции, но не более предыдущих вливаний. Через вторые сутки отстоявшийся раствор белка декантированием переливается в колбу, овсяная кислота из раствора осаждается уксусной кислотой, приливаемой в небольшом избытке. Осадок белковой кислоты отмывается дистиллированной водой и снова растворяется в щелочи, прилитой до слабой реакции. Раствор щелочи фильтруется через бумажный фильтр под обыкновенным давлением (повышенное давление, заставляя уплотняться частицы на фильтре, крайне затрудняет фильтрование).

Профильтрованный золь овсяной кислоты осаждается уксусной кислотой, коагулят отфильтровывается на обыкновенном фильтре, отмывается от уксусной кислоты дистиллированной водой, дегидратируется спиртом, обезжиривается и деалкоголизируется эфиром. Высушенный порошок снова растворяется в щелочи с соблюдением приблизительно эквивалентных соотношений (1200 и 40); осаждается уксусной кислотой, рассчитанным количеством с небольшим избытком, отмывается от кислоты, дегидратируется спиртом, деалкоголизируется эфиром, переносится в ступку и сушится от эфира растиранием в ней.

Окончательно высушенный препарат овсяной кислоты представляет из себя желтоватый порошок с чуть заметным кислым запахом, кислым вкусом при пробе на язык.

Порошок не растворим в воде, в 10% растворе NaCl — тоже, растворяется в естественном растворителе и титруется щелочью по фенолфталеину.

На первых же препаратах овсяной кислоты подтвердилось мое предположение о существовании белковых кислот.

Трудность получения совершенно чистого препарата из овса вызывается присутствием в семенах дубильных веществ, трудно отделяемых и резко нарушающих ход коагуляции (крупные сгустки и захват посторонних веществ). Изолировать вязущие вещества возможно лишь при повторениях осаднений. Более или менее надежным является трехкратное переосаждение. Оно ведется так. Коагулят из щелочной вытяжки от уксусной кислоты промывается несколько раз декантацией в высоких цилиндрах, находится грубо вес осадка с минимальным количеством жидкости. К коагуляту приливается вода и  $\frac{n}{10}$  NaOH с таким расчетом, чтобы весь коагулят перешел в золь, и концентрация его была не выше  $\frac{E}{75}$ . Из полученного золя осаждается овсяная кислота уксусной кислотой, приливаемой в незначительном избытке. Эта вся операция растворения, промывания, коагуляции повторяется еще два раза. Коагулят, полученный после третьего приема, переносится на фильтр, промывается до полного удаления кислоты дистиллированной водой, дегидратируется спиртом, при чем коагулят подвергается растиранию со спиртом в ступке и долговременному настаиванию в спирте, деалкоголизируется эфиром и сушится в ступке растиранием.

Но и при этих условиях могут получиться препараты не пригодные к исследованию. Дело в том, что только тонко дисперсные осадки дают в результате обработки чистые препараты, обладающие свойством казеиновой кислоты. Грубые препараты могут не растворяться даже в щелочи. Огрубление же вызывается: 1) слишком концентрированным раствором белка при

осаждении уксусной кислотой (сгустки получаются слишком крупными); 2) быстрым воздействием крепкого спирта,—сгустки цистируются, покрываются оболочками; 3) неполным удалением воды,—сгустки роговеют, делаются темными; 4) высокой температурой коагуляции—крупные сгустки.

Поэтому необходимо при выделении белковой кислоты употреблять растворы, не превышающие  $\frac{E}{75}$  концентрации, промывать предварительно разбавленным спиртом, дегидратацию вести до полного удаления воды, эфир брать для промывки безводный и температуру коагуляции держать не выше  $18^{\circ}$ .

Описание ряда полученных препаратов еще резче подчеркивает эти правила.

Препарат 10. Был получен трехкратным осаждением из щелочи. Последний раствор был концентрированным, около  $\frac{E}{28}$ . Получился порошок темный, не растворившийся в естественном растворителе и растворимый лишь в щелочи.

Препарат 12. Приготовлен вторичным переосаждением сухого препарата 10. Раствор взят в концентрации  $\frac{E}{150}$ . По выполнении всех условий обработки получен почти белый порошок, растворяющийся в естественном растворителе, титруемый NaOH.

Препарат 18. Приготовлен трехкратным переосаждением. Промывался спиртом на воронке сравнительно быстро. По окончании обработки получился препарат темножелтый, совершенно нерастворимый в естественном растворителе и с трудом—в щелочи.

Препарат 19. Получен трехкратным переосаждением. Промывался спиртом постепенно и тщательно, предварительно на фильтре, после растирался со спиртом в ступке, настаивался со спиртом сутки и снова промывался свежими порциями на воронке. Окончательная обработка дала почти белый порошок, легко растворяющийся на холоду в естественном растворителе.

Для анализа хода обработки коагулята проделан был такой опыт. Большой коагулом белковой кислоты был разделен на пять порций, из которых каждая обрабатывалась по-своему.



Первая порция. Слабая промывка спиртом на фильтре. Быстрое высушивание. Темнокоричневый порошок, нерастворимый даже в щелочи.

Вторая порция. Более тщательное промывание на фильтре. Постепенная сушка. Темножелтоватый порошок, растворимый в щелочи с трудом, нерастворимый — в естественном растворителе.

Третья порция. Тщательное промывание спиртом, настаивание со спиртом. Желтоватый порошок, растворимый при нагревании в естественном растворителе.

Четвертая порция. То же, что и в третьем, но тщательнее и больше смены спирта. Желтоватый порошок, растворимый в естественном растворителе при слабом нагревании.

Пятая порция. Переосаждена из щелочи. Выделение проделано с полной тщательностью во всех частях очищения. Промывка спиртом медленная, растирание и настаивание. Настаивание с эфиром. Почти белый порошок, растворимый в естественном растворителе без нагревания.

Весь этот опыт указывает на то, что величина получающихся веймарид белковой кислоты при осаждении и полнота удаления дисперсионной среды играют решающую роль в получении чистого препарата, и что физико-химические свойства препарата и в частности растворимость и цвет его есть функции от степени дисперсности и чистоты системы; наличие двухфазности (Т+Ж—порошок и вода) меняет физико-химические свойства препарата белковой кислоты.

Мною из овса был получен ряд препаратов до 30, от разных получений семян и разными способами. Многие из этих ориентировочных препаратов получились темными, не растворялись в растворителях. В препаратах, вполне растворимых в естественном растворителе, определялись числа титрования. Бралась определенная навеска препарата, смачивалась спиртом для облегчения смачивания растворителем. Приливался естественный растворитель (5 гр.  $K_2HPO_4$ , 1 гр.  $NaCl$  и 1 гр.  $KCl$  на литр) от 10 до 20 к. с. Легко нагревалось после получасового стояния и титровалось  $\frac{n}{10}$ .  $NaOH$  с фенолфталеином 1% (4—5 капель).

Таблица № 1.

№№ препаратов.	Число титрования.	
	Количество	$\frac{n}{10}$ NaOH на нейтрализацию 1 гр. бел- ковой кислоты.
№ 12		7,6
№ 19		8,2
№ 21		8,0
№ 26		7,7
№ 29		8,7

Из этой таблицы явствует, что числа титрования для препаратов белковой кислоты из овса, овсяной кислоты, весьма близки к числам титрования казеиновой кислоты.

Последующей моей задачей было получение препаратов, наиболее тщательно, из ряда проб семян овса разного происхождения, доведенных переосаждением и очисткой до полной белизны и полной растворимости. Таких препаратов было получено 20. Все они прекрасно растворялись в естественном растворителе и титровались. Числа для них сведены в таблице № 2.

Таблица № 2.

№№ препаратов.	Числа титрования.	№№ препаратов.	Числа титрования.
№ 30	8,0	№ 40	8,1
№ 31	8,4	№ 41	8,8
№ 32	8,5	№ 42	7,6
№ 33	8,1	№ 43	7,6
№ 34	8,3	№ 44	7,8
№ 35	8,6	№ 45	8,1
№ 36	7,9	№ 46	8,1
№ 37	7,6	№ 47	8,3
№ 38	8,2	№ 48	8,2
№ 39	8,4	№ 49	8,4
			Среднее . . . . 8,15

Из этой таблицы явствует, что при получении высоко чистых препаратов овсяной белковой кислоты, их можно характеризовать теми же числами титрования, как и казеиновую кислоту, при полном сходстве среднего значения, которое равно, по таблице № 2,—8,15. Отсюда мой первый вывод о первом шаге к сходству между растительными и животными белками.

**ГОРОХОВАЯ КИСЛОТА.** Для получения препаратов белковой кислоты из семян гороха взят был обыкновенный горох (*Pisum sativum*).

Известное количество семян гороха помещалось вначале в чистую воду до полного набухания и возможности отделить кожуру. По отделении ее определенные навески половинок семян заливались в больших банках по 750 к. с. 3% раствором уксусной кислоты. Семена настаивались в течение двух суток со сменой раствора кислоты, в котором всегда можно было обнаружить фосфорно-кальциевые соли. Далее семена отмывались от кислоты дистиллированной водой до исчезновения кислой реакции и пропускались несколько раз через мясорубку. Раздробленная масса заливалась дистиллированной водой вдвое большим объемом по сравнению с объемом семян. Вода с семенами подщелачивалась до слабой реакции; а затем вливалось такое количество  $n$  NaOH, чтобы оно было вдвое больше необходимого для связывания предполагаемого присутствия белковой кислоты в семенах (расчет ведется на 1200 частей белковой кислоты и 40 частей NaOH).

После 12-часового настаивания с перемешиванием, раствор доводился до ярко-щелочной реакции. Через сутки желтоватый слой белкового золь над семенами декантировался в колбу. Золь осаждается 10% уксусной кислотой из расчета разложить протеинаты и иметь некоторый избыток для усиления коагуляции. Коагулюм снова растворялся в щелочи с расчетом непревышения концентрации, белкового соединения более  $\frac{E}{50}$ . Снова осаждался небольшим избытком уксусной кислоты. Отмывается от нее до отказа. Дегидратируется спиртом, при чем сюда же входит операция со спиртом в ступке. Обезжиривается и деалкоголизируется эфиром. Сушится в ступке растиранием.

Полученный таким способом препарат представляет из себя пухлый порошок, легко текучий, белого с легким розовым оттенком цвета, растворимый свободно в естественном растворителе и в щелочи, нерастворимый в воде и 10% NaCl. Препарат титруется щелочью по фенолфталеину.

В семенах гороха количество красящих веществ меньше, чем у семян овса; значительно менее и содержание дубильных веществ.

Щелочные вытяжки получаются розовато- или желтовато-белыми, а не темножелтыми, как у овса. Коагулят более рыхлый и цвет его белый с розовым оттенком. Белковая кислота легко переходит в щелочную вытяжку, выход ее равняется 60—70% сырого белка, тогда как у овса—30—40%.

Благодаря этим свойствам первые же препараты дали вполне удовлетворительные результаты. Чисто белые препараты гороховой кислоты легко растворялись в естественном растворителе и титровались с фенолфталеином. Переход окраски резок, ибо желтого тона, как у овсяной кислоты, скрадывающего окрашивание фенолфталеина, у растворов гороховой кислоты нет.

Мною было приготовлено из различного получения семян гороха с небольшими вариациями выделения и перекристаллизации до 20 препаратов гороховой кислоты. Некоторые из них перекристаллизованные из Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (отмечены в таблице bis). Числа растворения, полученные для этих препаратов, сведены в таблице № 3.

Т а б л и ц а № 3.

№№ препаратов и характеристика.	Число титрования.	№№ препаратов и характеристика.	Число титрования.	Повторная перекрист. препаратов.	Число титрования.
№ 1 темный	—	№ 12 белый .	8,3	№ 2 bis . . .	7,6
№ 2 темный	—	№ 13 темный	7,7	№ 11 bis . . .	8,4
№ 3 желтов.	8,9	№ 14 розоват.	8,0	№ 13 bis . . .	8,0
№ 4 розовый	8,4	№ 15 белый	8,1	№ 21 bis . . .	8,1
№ 5 темный	—	№ 16 желтов.	7,8		
№ 6 розоват.	8,2	№ 17 белый .	8,2		
№ 7 белороз.	8,5	№ 18 желтов.	7,8		
№ 8 желтов	8,0	№ 19 желтов.	8,1		
№ 9 желтов.	8,1	№ 20 желтов.	7,9		
№ 10 белый .	8,2	№ 21 белороз.	8,4		
№ 11 темный	—	№ 22 желтов.	8,0		

Среднее . . . 8,14

Из этой таблицы следует, что числа титрования для гороховой кислоты в тех же границах, как и для овсяной кислоты, и так же близки к числам титрования казеиновой кислоты. Среднее для препарата гороховой кислоты—8,14.

**ПШЕНИЧНАЯ КИСЛОТА.** Для получения пшеничной кислоты были взяты в качестве сырья зерна обыкновенной пшеницы (*Triticum sativum vulgare*).

Зерна пшеницы заливались, как и в предыдущих случаях, 3%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  и оставлялись на двое суток при условии смены кислоты и помешивания.

Отмытые от кислоты зерна пропускались в мясорубку и заливались вдвое большим количеством воды, далее приливался п раствор  $\text{NaOH}$  до полного усреднения. Сверх этого вливалось такое количество  $\text{NaOH}$ , чтобы на каждый грамм предполагаемого белка в пшенице приходилось по 1,5 к. с. п раствора  $\text{NaOH}$ .

Настаивание продолжается около двух суток при перемешивании. Над зернами образуется мутный красно-желтый золь белковой кислоты. Этот слой пронизан весьма тонкой суспензией крахмала, с трудом отстаивающейся.

Из слоя жидкости, полученной декантацией, выделяется уксусной кислотой белок, при чем он коагулирует в крайне легких желатинозных сгустках, с трудом фильтруется и промывается. Этот осадок необходимо без отмывания водой залить спиртом и оставить на несколько дней. Под спиртом он становится грубым. После этой операции осадок растворяется в щелочи, по расчету (1200 белок и 40  $\text{NaOH}$ ). Золь фильтруется, снова осаждается уксусной кислотой (осторожно, чтобы не произошло перезаряжение). Далее отмывается водой, снова растворяется в рассчитанном количестве щелочи, снова осаждается, отмывается водой до исчезновения кислой реакции. Затем дегидратируется спиртом, деалкоголизируется и обезжиривается эфиром и сушится. Высушенный осадок необходимо подвергнуть еще раз операции перекристаллизации.

В пшенице главным затруднением при получении белковой кислоты является присутствие тонкой суспензии крахмала, переходящей в осадки и золи. Она создает—1) обволакивание частиц золя белка и затрудняет коагуляцию; 2) чрезвычайно

трудно отстаивается и, фильтруясь, загрязняет фильтры, не дает простым декантированием отделить белковый золь; 3) переходя в золь, увлекается при коагуляции: при растворении коагулята щелочью снова переходит в золь белка, чем создает затруднение при отделении.

Обычно получаемые препараты отличаются темножелтым цветом и с большим трудом растворяются даже в щелочах.

Для получения вполне чистого препарата пшеничной кислоты необходимо по крайней мере трехкратное переосаждение уже высушенных препаратов.

Чистая пшеничная кислота—почти белый с мраморным оттенком порошок, легко растворяющийся в естественном растворителе и в щелочи, нерастворимый в воде и 10% NaCl, титрующийся с фенолфталеином NaOH.

Из пшеницы мною было получено около десяти препаратов, числа титрования которых были, как видно из таблицы № 4, весьма близки к числам титрования казеиновой кислоты.

Т а б л и ц а № 4.

№№ препаратов и характеристика.	Числа титрования.	№№ препаратов и характеристика.	Числа титрования.
№ 1 темный . .	—	№ 7 белый . . .	8,3
№ 2 темный . .	—	№ 8 желтоват. .	8,0
№ 3 желтоватый	7,6		
№ 4 белый . . .	8,9	Среднее . . . .	8,22
№ 5 синев.-бел. .	8,1		
№ 6 белый . . .	8,4		

**МИНДАЛЬНАЯ КИСЛОТА.** Для получения белка из миндаля (*Amygdalus communis* L.).

Около 100 гр. семян настаивались с водой для полного отделения кожуры. Освобожденные от шелухи и разделенные на дольки семена миндаля заливались 3% раствором  $\text{CH}_3\text{COOH}$  и настаивались в течение 2 суток. Семена к концу становились легко раздавливаемыми, не упругими и ломкими. Уксусная ки-

слота сливалась, и семена, промытые водой, пропускались через мясорубку несколько раз. Миндальная мязга помещалась в толстостенную банку, заливалась тройным количеством воды, усреднялась щелочью. Далее приливался  $n$  NaOH в количестве, отвечающем двойному эквиваленту на белок (1200—40). Настаивание продолжалось двое суток с проверкой реакции через 4—6 часов; в случае слабой щелочности приливалось 15% первоначального количества NaOH.

Через двое суток мутно-белый раствор, содержащий в себе, наряду с золей белка, густую жировую эмульсию, сливался декантацией.

Из него осаждалась миндальная кислота 10% уксусной кислотой, рассчитанным количеством по прилитой щелочи и с избытком до 10%. Коагулят отмывался водой и снова растворялся в рассчитанном количестве щелочи, при условии, что концентрация протеината не превышала бы  $\frac{E}{75}$ . Раствор фильтровался через обыкновенный фильтр, и из отфильтрованного золя выделяется уксусной кислотой миндальная кислота. Коагулят промывается водой, дегидратируется спиртом, обезжиривается эфиром. Порошок снова растворяется в щелочи, осаждается  $\text{CH}_3\text{COOH}$  10%, промывается, дегидратируется спиртом, dealкоголизируется эфиром и сушится в ступке.

Полученный таким способом препарат миндальной кислоты представляет совершенно белый порошок, легко растворимый в естественном растворителе и титруемый щелочью с фенолфталеином. В воде и 10% NaCl нерастворим.

При получении препаратов миндальной кислоты затруднение создается присутствием жира, который, легко омыляясь, переходит в золь, снова выделяется при коагуляции от  $\text{CH}_3\text{COOH}$  и загрязняет препарат. Вполне чистые препараты получаются длительным настаиванием со спиртом и эфиром, они совершенно белого цвета и дают прекрасные результаты при титровании.

Многочисленно было получено около девяти препаратов миндальной кислоты из семян миндаля разного происхождения. Они легко дегидратировались, нормально коагулировались и были чисто белыми по окраске. Числа титрования для них размещены в таблице № 5.

Т а б л и ц а № 5.

Название препарата.	Числа титрования.	Название препарата.	Числа титрования.
№ 1	8,4	№ 6	8,5
№ 2	7,5	№ 7	7,8
№ 3	8,2	№ 8	8,1
№ 4	8,8	№ 9	8,0
№ 5	8,3	Среднее . . . 8,18	

Как видно из таблицы, числа титрования для миндальной кислоты те же, что и в предыдущих белковых кислотах и близки к числам казеиновой кислоты. Среднее из 9 препаратов—8,18.

Главным затруднением в моей работе была сложность получения препаратов, вполне удовлетворяющих основному признаку—быть растворимым (лучше без нагревания) в естественном растворителе. Из годовой практики с различным исходным материалом выработались известные правила получения. Они вкратце таковы.

Слишком слабая уксусная кислота, приливаемая к семенам в начале процесса, не разрушает структуры семян и не разлагает химических и абсорбционных соединений белков. Кратковременное действие кислоты дает тот же эффект.

В неразрушенных структурно семенах щелочь при дальнейшей обработке дает сильное набухание, а не переход в золь. Золь будет слабый, и кислота не коагулирует из него белка.

Слишком сильная кислота ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) вызывает разбухание семян, переход в раствор белка и тем потерю его для препарата. В дальнейшей обработке трудно установить концентрацию щелочи для полного вытягивания в золь белка; присутствие большого количества солей создает поддерживательную способность для белка и мешает коагуляции.

Неотмытые от кислоты семена требуют много щелочи для усреднения и вытягивания, что отразится на осаждении кисло-



той, так как уксусно-кислые соли создадут большую поддерживательную способность. Сгусток будет ненормален, желатинозен.

Слишком концентрированный и в большом количестве взятый раствор NaOH для вытягивания вызывает набухание и уплотнение в общую массу всех семян, что совершенно уничтожает возможность выделения белковой кислоты.

Слишком слабая щелочь дает слабый эффект вытягивания, а прилитая в большом объеме дает настолько разбавленный золь, что из него не получится коагуляции от кислоты.

Слишком слабые золи подвергаются перезарядке при приливании кислоты, осадка не выпадает, а казеин переходит в золь в форме основания.

Загрязняющие посторонние вещества (крахмал, жиры, соли) нарушают все соотношения. Они выпадают в осадок и в то же время переходят в золь,—жиры в щелочи дают соли натрия и снова кислотой разлагаются. Избавиться от примесей возможно лишь путем переосаждений грубых препаратов и тщательных обработок спиртом и эфиром.

Слишком концентрированные золи белковых кислот, высокая температура коагуляции дают крупные сгустки белковых кислот, и препараты не растворяются даже в щелочи, будучи темными по окраске.

Слишком разведенные золи белковых кислот могут не дать совершенно осадка от кислоты. Происходит или перезарядка, или недостаточная пересыщенность, при которой белковая кислота остается в виде золя.

Слишком крепкий спирт в первых порциях промывки дает капсулирование сгустков, и тогда вода остается внутри агрегатов,—получается не чистый порошок Т, а двухфазная система в порошке Т+Ж. Такой препарат трудно растворить даже в щелочи.

Неудаленная из сгустков вода дает пластинчатость, крупность в порошке и темный цвет его. Тоже система Т+Ж.

Эти препараты иногда нерастворимы даже в щелочи.

Возможны абсорбционные захваты солей, жира и крахмала, которые понижают числа растворения, между тем не мешают растворению препарата в естественном растворителе.

Захваты же кислоты дают увеличение для числа титрования, почему числа титрования колеблются около среднего значения.

Лучшие препараты белковых кислот получают после переосаждения сухих порошков, в строго рассчитанных количествах реактивов и в небольших навесках, или переосажденные из естественного растворителя, или растворов солей органических кислот. В последних случаях уксусная кислота для коагуляции приливается в небольшом избытке для разрушения подерживательной способности растворяющих солей.

В общем идеальный ход очистки грубого препарата должен идти при таких условиях.

Белковый препарат растворяется в щелочи с расчетом концентрации  $\frac{E}{100}$  протеината. Уксусная кислота приливается для коагуляции из расчета разрушить протеинат и создать центры коагуляции, для чего необходим избыток ее в 10—15%.

Промывание дистиллированной водой на фильтре производится не менее 10 раз. Первые промывки спиртом ведутся 50%. Далее крепость спирта доводится до абсолютного, при чем делаются растирания со спиртом в ступке и настаивание со спиртом в течение суток.

Промывка эфиром проводится не меньше 5—6 раз. Производится растирание препарата с эфиром в ступке. Эфир должен быть свободен от спирта и воды.

Высушивание необходимо вести в ступке при постоянном растирании и размешивании.

Окончательная просушка в эксикаторе или сушильном шкафу не выше 45°.

При растворениях навесок перед титрованием, последние смачиваются спиртом.

Только терпеливое и тщательное выполнение всей этой кропотливой методики может дать чистые препараты белковых кислот.

Работа продолжается в направлении исследования ряда физико-химических констант белковых кислот растительного происхождения и сравнения их с казеиновой кислотой.

### В ы в о д ы.

1) Из ряда сырья растительного происхождения возможно выделить белковые субстанции, обладающие свойствами животного белка «казеиновой кислоты», т.-е. растворимые в естественном растворителе и нерастворимые в воде и 10% NaCl и имеющие функции белковой кислоты, титрующиеся щелочью с фенолфталеином.

2) Такое выделение ведется разложением структурного состояния уксусной кислотой, получением протеината при помощи щелочи и снова коагуляции при помощи уксусной кислоты. В препарате далее должно быть проведено полное удаление всякой дисперсионной среды и посторонней дисперсной фазы. Система должна быть только однофазная—Т.

3) Препараты белковых кислот—овсяной, гороховой, пшеничной и миндальной—являются весьма близкими по сходству с препаратами казеиновой кислоты. Среднее из чисел титрования для препаратов этих кислот чрезвычайно близко к числу титрования казеиновой кислоты 8,2, колеблясь в отдельных случаях от 7,5 до 8,9.

4) Моя работа дает новый подход к систематике белковых веществ и является преддверием к вопросу о рациональных способах отождествления и различения белков.

5) Единство растительных и животных белков подтверждается в известном отношении сходством признаков, в частности величин эквивалентного веса.

### Deductions.

1) From a series of raw materials of vegetable origin, it is possible to separate out protein substances, possessing the properties of animal protein of «casein acid», i. e. such, which dissolve in natural solutions and are insoluble in water and 10% NaCl, and have the functions of «protein acid», thus being titrated with alkaly and phenophtalein.

2) Such a separation is produced through a decomposition of the structural nature of acetic acid, and the obtaining of «proteinate» by means of alkaly and a renewed coagulation by means of acetic acid. The preparation must further be fully deprived of any dispersing medium and any foreign dispersing phase. The system must be only one-phased—T.

3) The preparations of «protein acid»—of oats, pease, wheat and almond—appear as very similar to the preparations of «casein acid». The average titration for these acids is 8.2; fluctuating in certain instances from 7,5—8,9.

4) My work gives a new approach for the systematisation of protein substances, and is a preliminary to the question of rational methods of identification and differentiation of protein.

5) The unity of vegetative and animal protein is also confirmed to a certain extent by the similarity of properties, in particular, the magnitude of equivalent weight.

### Folgerungen.

1) Aus einigen Rohstoffen vegetativen Ursprungs kann man Eiweissstoffe, welche die Eigenschaften der Tiereweisse, z. B.; der «Kaseinsäure» besitzen, scheiden; dieselben lösen sich in einer natürlichen Lösung auf; sind jedoch in Wasser oder in einer 10% NaCl-Lösung unlöslich; somit besitzen sie die Functionen einer «Eiweiss-säure», die durch Alkali in Gegenwart von Phenophtalein titriert werden kann.

2) Eine solche Abscheidung wird durch die Zersetzung des physikalischen Strukturzustandes durch Essigsäure erlangt, indem man das «Proteinat» durch Alkali extrahiert, und dann eine Koagulation mittelst Essigsäure ausführt. In dem Präparat muss dann weiter die völlige Entfernung jeglicher Dispersionsmittel und fremdartiger disperser Phasen durchgeführt werden. Das System muss nur ein einphasiges sein—T.

3) Die Präparate der «Eiweiss-säure»—des Hafers, des Weizens, der Erbse und der Mandel—scheinen sehr nahe den Präparaten der «Kaseinsäure» zu sein. Der mittlere Wert der Titrierung dieser Säurepräparate stimmt sehr nahe mit der Titrierungszahl der «Kasein-säure»—8,2, überein, und schwankt in einzelnen Fällen von 7,5—8,9.

4) Meine Arbeit giebt ein neues Merkmal für den Aufbau eines Eiweissstoffsystems, und ist als Vorstufe einer rationellen Methodik zur Identifikation und Unterscheidung der Eiweissstoffe anzusehen.

5) Die Einheit der Pflanzen- und der Tiereweissstoffe wird in gewisser Hinsicht durch die Aehnlichkeit der Merkmale, insbesondere, der Aequivalent Gewichte bestätigt.

---



# **Дисперсные свойства некото- рых солей плазмы**

**Б. А. Догадкин**



## Дисперсные свойства некоторых солей плазмы.

Коллоидное состояние вещества, по общему признанию, является наиболее благоприятной средой и материалом в жизненных процессах. С этой точки зрения для биологической характеристики того или иного соединения существенное значение представляет изучение его дисперсных свойств и, что особенно важно, выяснение условий получения золевого состояния вещества при реакциях обмена, так как последние характерны для значительного ряда биологических явлений.

В соответствии с общими задачами, которые ставит перед собой лаборатория С. С. Перова, и при его руководящих указаниях, мною была произведена работа по определению дисперсных свойств кальциевых солей фосфорной, угольной, щавелевой, лимонной, муравьиной и молочных кислот. Роль этих солей в биологии клетки общеизвестна: они или присутствуют в органических средах, или являются продуктами жизнедеятельности организмов. Незначительная растворимость трех первых из названных солей позволяла наперед предугадывать возможность золевых систем для них. Следовало лишь экспериментально определить те концентрации, в которых наиболее вероятно получение этих систем, а также выяснить условия равновесия, которое складывается между исследуемыми солями и некоторыми электролитами.

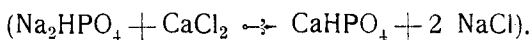
Вопреки тем выводам, которые можно сделать из работ Лоттермозера <sup>1)</sup>, методика работы получения золей сводилась к сливанию равных объемов эквивалентных водных растворов солей. Понятны причины, побуждавшие к тому. Важно было установить наличие золевого состояния и определить границы его получения из растворов высшей степени разведения, а

<sup>1)</sup> Lottermoser. Journ. f. prakt. Ch. 72 39 (1905) и 73 374 (1906).



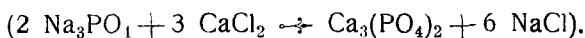
в таком случае необходима точная эквивалентность растворов. Самое сливание производилось таким образом, что 20 к. раствора  $\text{CaCl}_2$  в концентрации  $\frac{N}{X}$  равномерно и достаточно быстро вливалось в эрленмейеровскую колбу с раствором щелочной соли исследуемой кислоты при вращательном движении колбы. В зависимости от концентрации растворов и характера получающейся в результате обменного разложения соли, при этом выпадает или грубый осадок, или получается совершенно прозрачный молекулярно диспергированный раствор. В промежутке между этими формами равновесия  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{CaCO}_3$  и  $\text{CaC}_2\text{O}_4$  образуют опалесцирующие растворы, хорошо проходящие через фильтр и не выделяющие осадка в течение более или менее длительного времени. Другими словами—наблюдается момент золевого состояния этих солей, в то время, как другие из исследуемых солей, подобного состояния не обнаруживают. Степень дисперсности получающихся в результате реакций обмена солей, в зависимости от концентрации сливаемых растворов, и явления, при этом наблюдаемые, выражаются в приводимых таблицах.

Таблица 1-я.



Конц. сливаемых раств.	Конц. по отношен. к $\text{CaHPO}_4$ .	Характеристика системы.	Выпадение осадка.
$\frac{N}{60}$	$\frac{N}{120}$	Интенсивная муть.	Через 3 м. хлопьевидный осадок.
$\frac{N}{65}$	$\frac{N}{130}$	Молочный раствор.	Через 3 м. осадок.
$\frac{N}{85}$	$\frac{N}{170}$	Интенсивно - опалесцирующий раствор.	Через 2 ч. осадок.
$\frac{N}{120}$	$\frac{N}{240}$	Опалесцирующий раствор.	Через 2 ч. 30 м. осадок.
$\frac{N}{150}$	$\frac{N}{300}$	Совершенно прозрачный раствор.	Через 2 дня на стенках колбы плотный кристаллический осадок.

Таблица 2-я.



Конц. сливаемых раств.	Концен. по отношению к $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Характеристика системы.	Выпадение осадка.
$\frac{N}{325}$	$\frac{N}{650}$	Мутный раствор.	Через 5 м. легкий осадок с сильно развитой поверхностью.
$\frac{N}{350}$	$\frac{N}{700}$	Молочный раствор.	Осадок через 50 м.
$\frac{N}{400}$	$\frac{N}{800}$	Опалесцирующий раствор.	Осадок не образуется; через 3 ч. раствор делается прозрачным.
$\frac{N}{550}$	$\frac{N}{1100}$	Слабо-опалесцирующий раствор.	Тоже.
$\frac{N}{600}$	$\frac{N}{1200}$	Совершенно прозрачный раствор.	Тоже.

Таким образом, золевое состояние для  $\text{CaHPO}_4$  при комнатной температуре лежит в пределах концентрации от  $\frac{N}{130}$  до  $\frac{N}{250}$ , а для  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ —в пределах от  $\frac{N}{700}$  до  $\frac{N}{1100}$ . Следует отметить, что эти границы в известной мере являются условными, так как степень дисперсности осадка для всех солей зависит от механических условий сливания раствора. Как общее правило, быстрое сливание при медленном перемешивании способствует понижению степени дисперсности и отодвигает границы в сторону низших концентраций. Далее, степень дисперсности  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , поскольку она может быть определена по оптическим свойствам системы, для различных концентраций приблизительно одинакова, в то время как для  $\text{CaHPO}_4$  она заметно меняется при сравнительно незначительных колебаниях концентрации.

На золевой режим  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  большое влияние оказывают те процессы, которые протекают в самой молекуле вещества. Как достаточно выяснено в литературе,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  в водном растворе очень неустойчива и имеет тенденцию переходить

в кислую соль. Образуются соединения с переменным содержанием Са в молекуле и, главное, с различной степенью растворимости. В общем растворимость выпавшей в твердой фазе соли, по мере перехода ее в кислую, повышается, что и вызывает то явление исчезновения твердой фазы, которое указано в таблице.

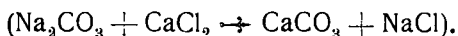
Мимоходом надлежит отметить, что получающийся при этом процессе после исчезновения твердой фазы раствор через 2 дня делается вновь помутневшим. Муть эта настолько тонка, что проходит через самый плотный фильтр и не осаждается в течение нескольких недель. Подобное явление можно объяснить или «старением» раствора с дисперсоидологической точки зрения, или же образованием  $\text{CaCO}_3$ , за счет освободившихся ионов Са и угольной кислоты из воздуха. В последнем случае можно предположить, что условия равновесия между твердой фазой и раствором складываются таким образом, что  $\text{CaCO}_3$  не выпадает при очень длительном стоянии. Система, таким образом, принимает характер суспензоида.

Как для  $\text{CaHPO}_4$ , так и для трехметаллической соли характер системы зависит от температуры. При сливании нагретых до кипения растворов  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  и  $\text{CaCl}_2$  осадок выпадает уже при концентрации  $\frac{N}{1000}$ ; границы золевого состояния лежат в интервале от  $\frac{N}{1000}$  до  $\frac{N}{2400}$ . Получающиеся при этом золи более устойчивы и седиментируют в среднем через 6 часов.

Процесс получения золевых растворов при нагревании в известных пределах обратим. Если интенсивно-опалесцирующий золь, полученный при  $t=100^\circ$ , охладить под краном через непродолжительное время (10—15 мин.), то раствор делается совершенно прозрачным. Таким же точно приемом получают золи любой степени дисперсности. Так, путем быстрого охлаждения интенсивно-выраженных золей концентрации  $\frac{N}{1400}$  удалось после многочисленных опытов получить достаточно опалесцирующий золь, выпавший в виде осадка только на третий день после сливания.

В полном соответствии с теорией Веймарна складывается равновесие для  $\text{CaCO}_3$ , как это видно из таблицы.

Таблица 3-я.



Конц. сливаемых растворов.	Концен. по отношению $\text{CaCO}_3$ .	Характеристика системы.	Выпадение осадка.
$\frac{N}{40}$	$\frac{N}{80}$	Муть.	Мгновенное выпадение кристалл. осадка.
$\frac{N}{50}$	$\frac{N}{100}$	Опалесцирующий раствор.	Дифференциация 1) осадка через 5—10 мин.
$\frac{N}{90}$	$\frac{N}{180}$	Тоже.	Тоже.
$\frac{N}{100}$	$\frac{N}{200}$	Вначале прозрачный раствор; муть через 1—2 минуты.	Выпадение осадка через 5 минут.
$\frac{N}{375}$	$\frac{N}{700}$	Прозрачный раствор.	Осадок на стенках колбы через 10 час.

Суспензоидная система, следовательно, наблюдается в пределах концентрации от  $\frac{N}{100}$  до  $\frac{N}{180}$ .

Стойкость ее по времени крайне незначительна, но хорошо выраженная опалесценция не дает повода сомневаться в наличии этой системы. Что касается  $\text{CaC}_2\text{O}_4$ , то возможное образование суспензоидного состояния лежит в концентрациях от  $\frac{N}{600}$  до  $\frac{N}{1200}$ . Нижняя граница между концентрациями, дающими при сливании суспензоидную систему и концентрациями, которые выделяют осадок из первоначально прозрачного раствора, здесь не выражается так ясно, как в растворах  $\text{Ca}(\text{PO}_4)_2$  и других.

1) Под дифференциацией осадка следует иметь в виду момент, когда отдельные твердой фазы различаются в жидкости, но еще не осели на дно.

Совершенно иным поведением обладают  $\text{Ca}(\text{HCO}_2)_2$ ,  $\text{CaC}_3\text{H}_4\text{O}_3$  и  $\text{CaC}_6\text{H}_8\text{O}_7$ . Высокая растворимость этих солей приводит к тому, что осадки выпадают из сильно концентрированных растворов без какого-либо намека на момент суспензоидного состояния. Так, лимонно-кислый Ca выпадает через 12 час. из раствора 0,5 N в виде довольно плотного осадка; молочно-кислый Ca из растворов 1/N—в виде кристаллических агрегатов; муравьино-кислый Ca из растворов 3/N—в виде хорошо образованных отдельных кристаллов. Таким образом, эти соли не могут быть причислены к пластическим веществам, т. е. к таким, которые в естественных условиях равновесия могли бы давать зольевые системы.

Второй стороной работы, как уже было оговорено, является выяснение условий равновесия, которое складывается между исследуемыми солями и некоторыми электролитами. При выборе электролитов руководящею мыслью было проследить влияние наиболее распространенных в биологических средах солей. Отсюда выбор остановился на NaCl и  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , хотя бы потому, что эти соли обязательно присутствуют в морской воде. Диссоциация названных солей велика, и естественно, что они играют роль растворителей по отношению к  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{CaHPO}_4$  и др. Однако, все факты наблюдаемого равновесия не удается подвести под объяснение с ионной только точки зрения. В стадии суспензоидного состояния кальциевых солей, между ними и электролитами ( $\text{NaCl}$  и  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) выступают молекулярные соотношения, характерные для коллоидов. Так, растворяющая способность  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  проявляется сильнее, чем у NaCl, хотя диссоциация последней соли значительнее.

Поскольку NaCl и  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  являются для кальциевых солей растворителями вообще, постольку следует ожидать, что они по отношению к суспензоидному состоянию будут играть роль поддерживателей. Проследить во времени эту роль NaCl и  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  не удается, потому что суспензоидная стадия  $\text{CaHPO}_4$  и др. кратковременна. Тем не менее можно утверждать, что  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  является несомненным поддерживательным средством; особенно хорошо это обнаруживается на оптических свойствах суспензии  $\text{CaCO}_3$ , получаемой в присутствии  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

При опытах кальциевые соли брались в суспензоидных состояниях высшей степени концентрации. Электролиты вносились или к образовавшемуся золю, или прибавлялись к раствору  $\text{CaCl}_2$  до момента сливания его с раствором соответствующей соли. Само собой разумеется, что учитывалось наличие тепловых явлений, сопровождающих растворение электролитов. В общем достаточно было 1% содержания в растворе  $\text{NaCl}$  и  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , чтобы кальциевые соли или совсем не выпадали, или выпадали из прозрачного раствора без заметной стадии золевого состояния. Понятно также, что для растворения выпавших суспензий требуется большее содержание электролита, чем для задержки выпадения их из тех же концентраций. Сказанное обнаруживается в таблицах.

Т а б л и ц а 4-я.

Сливается раствор  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  в концентрац.  $\frac{\text{N}}{350}$ ; к образовавшемуся суспензоиду приливается раствор  $\text{NaCl}$  в конц. 2 N и хорошо взбалтывается.

Концентрация $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Процентное содержание $\text{NaCl}$ .	Описание явления.
$\frac{\text{N}}{700}$	Без $\text{NaCl}$ (контроль).	Молочный раствор, разрешающийся осадком через 15–20 мин.
$\frac{\text{N}}{700}$	3%	Раствор при минутном перемешивании делается прозрачным.
$\frac{\text{N}}{700}$	1,8%	Тоже.
$\frac{\text{N}}{700}$	1,5%	Еле заметная муть остается; через ночь — прозрачный раствор.
$\frac{\text{N}}{700}$	1,2%	Тоже.
$\frac{\text{N}}{700}$	1%	Молочный раствор меньшей интенсивности, чем в контрольном случае; через несколько минут дифференциация осадка.

Т а б л и ц а 5-я.

К раствору  $\text{CaCl}_2$  в концентрации  $\frac{N}{300}$  приливается раствор  $\text{NaCl}$  в конц. 2 N; затем вливается раствор  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ .

Концентрация $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Процентное содержание $\text{NaCl}$ .	Описание явления.
$\frac{N}{700}$	Контр., без $\text{NaCl}$ .	Молочный раствор, разрешающийся осадком через 15—20 мин.
$\frac{N}{750}$	1,2%.	Прозрачный раствор.
$\frac{N}{730}$	0,8%.	Тоже.
$\frac{N}{725}$	0,75%.	Слабая опалесценция; устойчивый суспензоид.
$\frac{N}{700}$	0,7%.	Опалесценция: довольно устойч. суспензоид.

Т а б л и ц а 6-я.

Сливается  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  в концентрац.  $\frac{N}{300}$ ; к образовавшемуся суспензоиду приливается 4% раствор  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

Концентрация $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Процентное содержание $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .	Описание явления.
$\frac{N}{700}$	Контр.; без $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .	Молочный раствор, разрешающийся осадком через 15—20 мин.
$\frac{N}{700}$	1%.	Совершенно прозрачный раствор.
$\frac{N}{700}$	0,8%.	Опалесценция; осадок дифференцируется через 30—40 минут.
$\frac{N}{700}$	0,4%.	Опалесценция; раствор значительной устойчивости. Через 4 часа—делается прозрачным.

Нижеприведенная таблица указывает на интересный факт поведения  $\text{CaCO}_3$  по отношению к  $\text{NaCl}$ . В то время, как растворяющее действие  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  растет в пределах от 5% до 0,5% содержания в прямой зависимости от концентрации этой соли, действие в концентрациях близких к 1% сильнее, нежели при 5%. График действия  $\text{NaCl}$  изогнут, и вершина его лежит при концентрации 1%.

Т а б л и ц а 7-я.

К раствору  $\text{CaCl}_2$  в концентр.  $\frac{N}{50}$  прибавляется сухая соль— $\text{NaCl}$ ; после выравнивания температуры и  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  приливается раствор  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

Концентрация $\text{CaCO}_3$ .	Процентное содержание электролитов.	Действие $\text{NaCl}$ .	Действие $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .
$\frac{N}{100}$	5%.	Муть, осадок дифференцируется через 5 м.	Из прозрачного раствора выпадает через 1—2 мин. осадок.
$\frac{N}{100}$	1%.	При сливании совершенно прозрачный раствор, из которого через 15—20 м. выпадает кристаллич. осадок.	Прозрачный вначале раствор в течение минуты мутнеет и разрешается осадком.
$\frac{N}{100}$	0,6%.	При слиянии образуется золь с ярко выраженной опалесценцией. Дифференциация осадка через 5—7 мин.	Золь с ярко выраженной опалесценцией; осадок дифференцируется через 10—15 мин.
$\frac{N}{100}$	Без электролитов; контрольный.	Опалесцирующий раствор; через 5—10 мин.	Дифференциация осадка.

Влияние электролитов на  $\text{CaC}_2\text{O}_4$  выявляется в таблице (см. стр. 46).



Т а б л и ц а 8-я.

К раствору  $\text{CaCl}_2$  в концентр.  $\frac{N}{300}$  прибавляется сухая соль; после выравнивания температуры приливается раствор  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ .

Концентрация $\text{CaC}_2\text{O}_4$ .	Процентное содержание электролит.	Действие $\text{NaCl}$ .	Действие $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .
$\frac{N}{600}$	5%	Совершенно прозрачный раствор; через 5 м. кристаллический осадок.	Осадок не образуется в течение недели.
$\frac{N}{600}$	1%	Через 5 мин. раствор мутнеет и разрешается осадком.	Через 30 м.—кристаллич. осадок из прозрачного раствора.
$\frac{N}{600}$	Без электролитов.	Молочный раствор; 1—2 мин.	Дифференциация осадка.

Таким образом, для  $\text{CaC}_2\text{O}_4$  образование суспензидной стадии возможно лишь при менее, чем однопроцентном содержании электролита.

Резюмируя, делаем основные выводы из работы:

1. При реакциях обмена в водной среде дают золевые системы следующие соли и в следующих концентрациях:  $\text{CaHPO}_4$  в промежутке от  $\frac{N}{130}$  до  $\frac{N}{250}$ ;  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ —от  $\frac{N}{700}$  до  $\frac{N}{1100}$ ;  $\text{CaCO}_3$ —от  $\frac{N}{100}$  до  $\frac{N}{180}$  и  $\text{CaC}_2\text{O}_4$ —от  $\frac{N}{600}$  до  $\frac{N}{1200}$ .

2. Соли:  $\text{Ca}(\text{HCO}_2)_2$ ,  $\text{CaC}_3\text{H}_4\text{O}_3$ ,  $\text{CaC}_6\text{H}_6\text{O}_7$  не дают в водных средах золевых систем ни при каких концентрациях.

3. Электролиты  $\text{NaCl}$  и  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  по отношению к золевым системам солей:  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{CaCO}_3$  и  $\text{CaC}_2\text{O}_4$  создают поддерживающие условия.

# **Изучение физико-химических свойств белка**

**М. А. Лисицын**



# Изучение физико-химических свойств белка.

Сообщение 1.

## К вопросу о выделении белка из растительных продуктов.

Существующие в настоящее время приемы выделения белков из растения сводятся к извлечению его различными растворителями. В качестве последних употребляют воду, растворы нейтральных солей, водный спирт и слабую щелочь. Однако ни один из указанных растворителей не экстрагирует полностью всего белка, находящегося в растении, а лишь некоторую часть его,—для одного и того же растения довольно постоянную (Напр., для гороха: вода извлекает 20—25%, слабая щелочь—60—70%). Эта постоянно наблюдаемая неполнота извлечения может быть объяснена тем, что часть белка в растении находится в форме соединений, нерастворимых в перечисленных растворителях; такими нерастворимыми соединениями могут быть протеаты щелочно-земельных металлов, в частности кальция. Если последние разрушить какой-нибудь кислотой, то весь оставшийся белок, казалось бы, мог быть нацело извлечен. Из произведенных в этом направлении опытов мы получили результаты, оправдывающие такое предположение, а именно достигли полного извлечения белка из гороховой муки после обработки ее разбавленной уксусной кислотой.

Для количественного учета белка производилось определение азота в исходном материале и в вытяжках. Азот определялся по «микро-Кьельдалю»—способом, разработанным в Лаборатории Органической Химии Тимирязевской С.-Х. Академии<sup>1)</sup>.

<sup>1)</sup> Н. Я. Демьянов. Общие приемы анализа растит. веществ.

Н. Д. Прянишников. Определение азота в малых навесках. «Результаты вегетац. опытов», т. 13.

Для извлечения белка были взяты семена гороха, очищенные от оболочек. Семена измельчались на ручной мельнице частью в крупу, частью в муку 1 мм.—Взятая навеска крупы (35 гр.) заливалась водой (175 к. с.) и оставлялась на два дня набухать<sup>1)</sup>, после чего фильтровалась, промывалась, в фильтрате (вместе с промывными водами) определялся азот, а остаток обрабатывался  $\frac{N}{20}$  раствором (140 к. с.) щелочи. По мере усреднения реакции среды—щелочь прибавлялась. Извлечение щелочью велось в течение недели с определением азота через каждые 2 дня. Конечные результаты получены следующие:

Т а б л и ц а 1-я.

	Количество азота:		
	в грамм.	в %	в % от общ. азота в навеске.
В навеске . . . . .	1,008	100	100
» водной вытяжке . . . . .	0,213	21,13	21,13
» остатке по разности . . . . .	0,795	78,87	78,87
» щелочной вытяжке . . . . .	0,380	47,8	37,7
» остатке по разности . . . . .	0,415	52,2	41,17

С другой навеской крупы поступаю иначе, а именно после фильтрования водной вытяжки, остаток помещаю в 4% раствор уксусной кислоты на 2 дня, после чего фильтрую, тщательно промываю и переношу промытый остаток в  $\frac{N}{20}$  раствор NaOH. Произведя определение азота, я получил следующие данные.

<sup>1)</sup> Во всех случаях настаивания семян в растворителе производилось частое взбалтывание смеси; во избежание развития гнилостных процессов прибавлялся толуол.

Т а б л и ц а П-я.

	Количество азота:		
	В грамм.		% от общего азота.
В навеске . . . . .	0,824	100	100
» водной вытяжке . . . . .	0,210	25,6	25,6
» остатке . . . . .	0,614	(100)	74,4
» уксусно-кислой вытяжке . . . . .	0,300	48,8	36,4
» остатке . . . . .	0,314	(100)	38
» щелочной вытяжке . . . . .	0,212	67,5	25,62
» остатке . . . . .	0,102	32,5	12,38

Аналогичный опыт ставится с извлечением белка из гороха, измельченного в муку. Здесь результаты анализа таковы:

Т а б л и ц а Ш-я.

Без кислоты:				С 4% $\text{CH}_3\text{COOH}$ :		
Азот в грамм.		% от общ. количеств. азота в навеске.		Азот в грамм.		% от общ. количеств. азота в навеске.
1,008	100	100	В навеске . . . . .	1,180	100	100
0,202	20,04	20,04	» водной вытяжке . . . . .	0,236	20	20
0,806	(100)	79,96	» остатке . . . . .	0,944	(100)	80
—	—	—	» укс.-кисл. вытяжке . . . . .	0,435	46,1	26,1
—	—	—	» остатке . . . . .	0,509	(100)	53,9
0,466	67,8	46,26	» щелочной вытяжке . . . . .	0,427	83,9	46,9
0,340	42,2	33,70	» остатке . . . . .	0,082	16,1	7,0

Анализ приведенных таблиц показывает, что обработка экстрагируемого материала уксусной кислотой позволяет получать в щелочной вытяжке процентно большее количество азотистых веществ: так, действуя непосредственно щелочью—извлекаем 47,8—57,8% азота, при употреблении же уксусной кислоты щелочь извлекает 67,5—83,9% в зависимости от степени измельчения семян.

Следующий опыт произведен с применением более слабой, а именно 2% уксусной кислоты. Вся методика извлечения та же, что и в предыдущих случаях. Результаты опыта сгруппированы в таблице IV.

Т а б л и ц а IV-я.

	В на- веске.	H <sub>2</sub> O	2% C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	N/20 NaOH	Оста- ток.
Количество азота в грамм. . . . .	1,760	0,421	0,544	0,734	0,061
» » в % . . . . .	100	23,9	40,6	92,3	7,7
» » в % от содерж. азота в навеске . . . . .	100	23,9	39	41,7	3,5

Так как при работе с большими навесками гороха фильтрование идет крайне медленно, а благодаря большой поверхности испарения прибавляемый толуол быстро улетучивается,— то в целях сокращения времени фильтрования и тщательности промывки остатка от уксусной кислоты был поставлен опыт с небольшой навеской (в 10 грм.) при сохранении всех прочих условий. Распределение азота в вытяжках было таково:

Т а б л и ц а V-я.

	В на- веске.	H <sub>2</sub> O	2% уксус. к-та.	N/20 NaOH	Оста- ток.
Количество азота в грамм. . . . .	0,281	0,070	0,092	0,1188	0,0002
» » в % . . . . .	100	24,9	43,6	99,8	0,2
» » в % от всего азо- та в навеске . . . . .	100	24,9	32,7	42,3	0,1

В данном случае обнаруживается полное извлечение азотистых веществ.

В аналогичных опытах, проделанных с семенами ячменя, фасоли и лесного ореха получены (таблица VI) такие же результаты, а именно—после действия разведенной уксусной кислоты в щелочную вытяжку переходит весь оставшийся в семенах белок.

Т а б л и ц а VI-я.

	Азота в навеске.	В щелочной вытяжке в %/о/о:	
		без укс. к-ты.	с 2% укс. к-ты.
Семена ячменя . . . . .	0,8 гр.	77	90,7
» фасоли . . . . .	1,85	73,5	95,7
» лесн. ореха . . . . .	1,44	41	94,6

Таким образом, изложенные опыты подтверждают возможность полного извлечения азотистых веществ из растительных продуктов при условии последовательной обработки продукта сначала слабой (2%<sup>о</sup>) уксусной кислотой и затем слабым же

( $\frac{N}{20}$ ) раствором NaOH.

Исследование продуктов, переходящих в кислую и щелочную вытяжки, и изучение вытяжек прочих растворителей составляют предмет дальнейшей работы.