

СПЕКТРОФОТОМЕТРІЯ
И ЕЯ ПРИМѢНЕНІЕ
КЪ ОПРЕДѢЛЕНІЮ СОДЕРЖАНІЯ ГЕМОГЛОБИНА
ВЪ КРОВИ.

Проф. И. Щелкова.



ХАРЬКОВЪ.

Типографія М. Ф. Зильберберга, Рыбная ул., д. № 25-й.
1888.

Опредѣленіе количества гемоглобина въ крови представляетъ важное значеніе какъ для діагноза, нѣкоторыхъ патологическихъ состояній, такъ и для опредѣленія хода болѣзненнаго процесса — его ослабленія или усиленія; скорый, точный и не требующій особаго навыка способъ количественнаго опредѣленія гемоглобина является поэтому весьма желаннымъ для клинициста. Къ сожалѣнію извѣстные нынѣ способы, которые, по ихъ несложности, могли бы быть употребляемы при клиническомъ изслѣдованіи, далеко не удовлетворяютъ указаннымъ требованіямъ. Самый простой изъ нихъ, по вмѣстѣ съ тѣмъ едва ли не самый точный, способъ Гоппе-Зейлера, основанный на опредѣленіи степени разжиженія крови водою нужной для того, чтобы получить жидкость одинаковаго цвѣта съ заранѣе приготовленнымъ образцомъ. Онъ имѣетъ однако тотъ недостатокъ, что для приготовления образца необходимо имѣть чистый гемоглобинъ, что представляетъ большія затрудненія и, кромѣ того, приготовленный образецъ очень быстро портится. Правда, было предложено замѣнить образцовый растворъ гемоглобина весьма постояннымъ растворомъ пикрокармина, но получить такой растворъ вполне одинаковымъ по цвѣту съ растворомъ крови едва ли возможно.

Другіе способы, какъ наприм. Малассе и Ф. Флейшля, хотя весьма удобны, но результаты ихъ, особенно послѣдняго, не отличаются точностью; тоже слѣдуетъ сказать и о способѣ Прейера.

Въ послѣднее время фізіологія обогатилась новымъ методомъ опредѣленія гемоглобина значительно превосходящимъ всѣ донынѣ употреблявшіеся; методомъ чрезвычайно скорымъ, необыкновенно точнымъ и требующимъ самаго незначительнаго количества крови. Это методъ спектрофотометрическій. Такъ какъ ему несомнѣнно предстоитъ блестящая будущность, то полагаемъ, что нашимъ врачамъ будетъ не безинтересно ознакомиться съ нимъ.

Каждое прозрачное тѣло, плотное или жидкое, поглощаетъ нѣкоторую часть проходящаго чрезъ него свѣта; при этомъ поглощеніе или распредѣляется одинаково на всѣ цвѣтные лучи, входящіе въ составъ смѣшаннаго бѣлаго свѣта, или нѣкоторые изъ нихъ поглощаются въ относительно большемъ количествѣ; въ первомъ случаѣ тѣло представляется безцвѣтнымъ, во второмъ — окрашеннымъ. Большая часть жидкостей организма, съ которыми приходится имѣть дѣло врачу, представляетъ водные растворы, окрашенные въ извѣстный цвѣтъ въ слѣдствіе присутствія въ нихъ того или другаго красящаго вещества; такъ, цвѣтъ крови зависитъ отъ гемоглобина, цвѣтъ жолчи — отъ жолчныхъ пигментовъ и пр.

Поглощеніе свѣта въ такихъ растворахъ зависитъ главнымъ образомъ отъ присутствія пигмента и степень его опредѣляется, — съ одной стороны, содержаніемъ этого послѣдняго, а съ другой толщиной слоя жидкости, чрезъ который свѣтъ долженъ пройти. Такъ какъ поглощеніе свѣта производится частичками красящаго вещества, то оно должно быть пропорціонально количеству послѣднихъ; поэтому количество свѣта, проходящаго извѣстной толщины слой жидкости обратно пропорціонально количеству частичекъ красящаго вещества, то есть, концентраціи раствора.

Съ другой стороны, чѣмъ толще слой жидкости, тѣмъ большая часть свѣта будетъ ею задержана; если наприм. чрезъ какой либо слой жидкости проходитъ $\frac{1}{n}$ -ая часть падающаго на него свѣта, то черезъ слой въ m разъ толще пройдетъ только $\frac{1}{n^m}$ часть.

Такимъ образомъ между количествомъ свѣта, поглощаемымъ слоемъ жидкости опредѣленной толщины, и ея концентраціей существуетъ правильное постоянное отношеніе; однако, чтобы воспользоваться этимъ обстоятельствомъ для практическихъ цѣлей необходимо пріискать какую либо величину для измѣренія свѣтопоглощенія, общую для всѣхъ вообще случаевъ. По предложенію Бунзена и Роское такой величиной служить толщина слоя изслѣдуемой жидкости пропускающаго ровно $\frac{1}{10}$ -ую часть падающаго на него свѣта. Обратная величина такой толщины слоя носитъ названіе

коэффициента свѣтоослабленія; обыкновенно онъ обозначается греческою буквою E .

Изъ предъидущаго понятно, что толщина слоя, удовлетворяющаго выше изложенному требованію, должна находиться въ обратномъ отношеніи къ концентраціи; поэтому если обозначить черезъ c и c^1 концентраціи двухъ растворовъ, а черезъ $\frac{1}{E}$ и $\frac{1}{E^1}$ толщины слоевъ ихъ, пропускающихъ $\frac{1}{10}$ -ю долю падающаго свѣта, то получается

$$c : c^1 = \frac{1}{E^1} : \frac{1}{E} \text{ или } c : c^1 = E : E^1$$

то есть: 1-е, концентраціи растворовъ пропорціональны соотвѣствующимъ коэффициентамъ свѣтоослабленія и 2-е, отношеніе между концентраціей и соотвѣствующимъ коэффициентомъ свѣтоослабленія есть величина постоянная; дѣйствительно, изъ вышеприведеннаго слѣдуетъ

$$\frac{c}{E} = \frac{c^1}{E^1}.$$

Еслибы для какой либо концентраціи былъ опредѣленъ предварительными наблюденіями коэффициентъ свѣтоослабленія, то для опредѣленія концентраціи даннаго раствора достаточно было бы узнать соотвѣствующій ему коэффициентъ свѣтоослабленія. Въ самомъ дѣлѣ, изъ приведенныхъ выше выраженій слѣдуетъ:

$$c^1 = E^1 \frac{c}{E}.$$

Постоянное отношеніе $\frac{c}{E}$ названо Фирордтомъ относительнымъ свѣтопоглощеніемъ и обозначается обыкновенно буквою A ; понятно, что оно зависитъ отъ свойства тѣла ¹⁾.

¹⁾ Строго говоря A не есть постоянная величина, а измѣняется съ концентраціей такъ напримѣръ для гемоглобина она тѣмъ болѣе, чѣмъ концентрированнѣе растворъ. Для практическихъ примѣненій это впрочемъ не имѣетъ значенія, если только при анализѣ берется такое разжиженіе крови, которое соотвѣтствуетъ концентраціи гемоглобиноваго раствора, для которой опредѣлена постоянная A .

Изложенное получаетъ весьма важное практическое значеніе въ слѣдствіе того, что въ каждомъ отдѣльномъ случаѣ коэффициентъ свѣтоослабленія E можетъ быть вычисленъ, если будетъ опредѣлена доля свѣта, пропускаемаго слоемъ изслѣдуемаго тѣла известной толщины.

Назовемъ J количество свѣта, проходящаго слой жидкости, толщина котораго равна m и предположимъ, что слой этой жидкости толщиной въ единицу пропускаетъ $\frac{1}{n}$ -ю часть падающаго на него свѣта; въ такомъ случаѣ

$$J = \frac{1}{n^m}$$

отсюда

$$n^m = \frac{1}{J} \quad (1)$$

Логарифмирование этого выраженія даетъ

$$\begin{aligned} m \log n &= -\log J \\ \log n &= -\frac{\log J}{m} \quad (2) \end{aligned}$$

Согласно сказанному выше коэффициентъ свѣтоослабленія есть обратная величина слоя жидкости, пропускающаго $\frac{1}{10}$ -ю часть падающаго свѣта, то есть, если $m = \frac{1}{E}$, то $J = \frac{1}{10}$. Введя эти величины въ выраженіе (1) получимъ

$$n^{\frac{1}{E}} = 10$$

логарифмирование его даетъ

$$\begin{aligned} \frac{1}{E} \log n &= 1 \\ \log n &= E \end{aligned}$$

Подставивъ найденную для $\log n$ величину въ выраженіе (2) получаемъ

$$E = -\frac{\log J}{m}.$$

Такимъ образомъ коэффициентъ свѣтоослабленія равенъ отрицательному логарифму силы свѣта, прошедшаго испытуюмую жидкость, раздѣленному на толщину ея слоя. Если послѣдній равенъ единицѣ, наприм. одному сантиметру, то выраженіе еще болѣе упрощается, такъ какъ означенный коэффициентъ становится прямо равнымъ отрицательному логарифму силы прошедшаго свѣта.

Для примѣненія къ дѣлу этого метода, надо только приискать способъ удобно и точно опредѣлять количество свѣта, проходящаго чрезъ испытующее тѣло. Указаніемъ такого способа наука обязана впервые извѣстному физиологу Фирордту, которому и вообще принадлежитъ честь открытія и разработки этого метода количественнаго анализа.

Большинство тѣлъ, изслѣдуемыхъ по отношенію къ ихъ свѣтопоглощенію, тѣла окрашенныя, слѣдовательно неодинаково поглощающія лучи свѣта различной преломляемости; поэтому Фирордтъ предложилъ опредѣлять свѣтопоглощеніе ихъ не для смѣшаннаго бѣлаго свѣта, а для одного изъ спектральныхъ цвѣтовъ и притомъ того именно, для котораго оно наиболѣе значительно. Цѣль этого предложенія понятна; въ томъ простомъ цвѣтѣ, въ которомъ поглощеніе всего сильнѣе, оно можетъ быть легче и точнѣе опредѣлено, чѣмъ въ свѣтѣ смѣшанномъ.

Устроенный Фирордтомъ аппаратъ состоитъ изъ спектроскопа прямого зрѣнія (*à vision directe*), щель котораго раздѣлена на двѣ половины—верхнюю и нижнюю; каждая можетъ расширяться и суживаться независимо отъ другой помощью микрометрическаго винта точно указывающаго ширину щели. Передъ щелью ставится сосудъ съ параллельными стеклянными стѣнками, содержащій изслѣдуемую жидкость; толщина слоя (разстоянія параллельныхъ стѣнокъ) составляетъ обыкновенно 1 сантиметръ. Устанавливается

сосудъ такъ, чтобы свѣтъ, прошедшій черезъ жидкость, попалъ въ одну половину щели, а въ другую проходилъ свѣтъ, не подвергнувшійся поглощенію въ жидкости. Такимъ образомъ наблюдатель видитъ въ полѣ зрѣнія аппарата, одинъ надъ другимъ, два спектра одинъ, измѣненный поглощеніемъ въ жидкости, другой—нормальный. Для сравненія избираются, какъ выше упомянуто, тѣ части спектра, въ которыхъ поглощеніе всего явственнѣе, остальные же части закрываются. Для этого въ окулярѣ имѣется непрозрачная діафрагма, состоящая изъ двухъ пластинокъ, края которыхъ соприкасаются въ серединѣ поля зрѣнія; пластинки могутъ быть раздвинуты на большее или меньшее разстояніе и такимъ образомъ выдѣляютъ изъ спектра болѣе или менѣе широкую полосу одна половина которой образуется свѣтомъ обыкновеннымъ, а другая—измѣненнымъ вслѣдствіе поглощенія. Понятно, что вторая половина будетъ менѣе свѣтла; чтобы уравнять ихъ свѣтлость надо или расширить часть щели, чрезъ которую проходитъ свѣтъ поглощенный или сѣзуть ту, которая пропускаетъ нормальный. Во всякомъ случаѣ отношеніе ширины обѣихъ половинокъ щели укажетъ на какую часть своей начальной интензивности уменьшился свѣтъ отъ поглощенія въ изслѣдуемой жидкости.

Другой спектрофотометръ устроенъ профессоромъ Гюфнеромъ и по моему мнѣнію заслуживаетъ предпочтенія. Онъ состоитъ также изъ спектроскопа прямого зрѣнія, снабженнаго въ окулярѣ раздвижной діафрагмой для выдѣленія изъ спектра полосы желаемой ширины; существенное отличіе его состоитъ въ способѣ, которымъ достигается уравниеніе свѣтлости обѣихъ половинокъ свѣтлой полосы. Гюфнеръ воспользовался для этого измѣненіемъ силы поляризованнаго свѣта при прохожденіи черезъ Николеву призму. Извѣстно, что она зависитъ отъ угла, который плоскость поляризаціи поляризованнаго луча свѣта образуетъ съ плоскостью поляризаціи Николевой призмы; при углѣ равномъ нулю свѣтъ проходитъ полностью; при увеличеніи угла онъ ослабляется и при углѣ въ 90^0 совершенно исчезаетъ. По изслѣдованіямъ Малуса интензивность свѣта измѣняется при этомъ пропорціонально квадрату косинуса упомянутаго угла. Предположивъ, что этотъ уголъ

равенъ α , что сила, падающаго на Николеву призму (поляризованнаго), свѣта равна единицѣ, а сила прошедшаго черезъ нее J , получимъ:

$$J = \cos^2 \alpha$$

Какъ мы видѣли выше коэффициентъ свѣтоослабленія $E = -\log J$; подставивъ вмѣсто J то, чему оно равно, получимъ

$$E = -2 \log \cos. \alpha.$$

Чтобы воспользоваться этимъ принципомъ, Гюфнеръ ввелъ въ спектроскопъ двѣ Николевы призмы, одна, передняя, неподвижная, поляризуетъ свѣтъ; другая, вращающаяся вокругъ оси, пропускаетъ большую или меньшую долю его, смотря по углу подъ которымъ она установлена.

Расположеніе этихъ призмъ можно видѣть на приложенномъ рисункѣ: передняя, небольшая, a , установлена въ мѣдной трубкѣ передъ щелью спектроскопа, e , и соответствуетъ ея нижней половинѣ; прошедшій черезъ нее, поляризованный свѣтъ встрѣчаетъ стеклянное тѣло, c , плоскости котораго шлифованы такъ, что лучи свѣта, падающіе на его нижнюю половину, попадаютъ въ верхнюю половину щели спектроскопа и наоборотъ, лучи обыкновеннаго свѣта, проходящіе черезъ верхнюю часть его, направляются въ нижнюю часть щели. Границу между этими двумя родами лучей свѣта составляетъ горизонтальное ребро, представляющееся въ полѣ зрѣнія спектроскопа въ видѣ очень тонкой горизонтальной линіи, дѣлящей спектръ на верхнюю и нижнюю половины. Такъ какъ діоптрическій аппаратъ спектроскопа извращаетъ образъ щели, то нижняя часть видимаго наблюдателемъ спектра образуется поляризованнымъ, а верхняя—обыкновеннымъ свѣтомъ. Вслѣдствіе нѣкотораго ослабленія свѣта Николевой призмой, нижняя половина спектра или выдѣленной изъ него полоски должна быть нѣсколько темнѣе верхней; для выравниванія ихъ служить стеклянная пластинка b , установленная предъ верхней половиной щели и состоящая изъ двухъ склеенныхъ, клиновидно отшлифованныхъ половинокъ, одна изъ простаго, другая изъ дымчатаго

стекла. Помощью зубчатки пластинка устанавливается такъ, что свѣтъ, проходитъ большую или меньшую толщину дымчатого стекла и ослабляется на столько, чтобы обѣ половинки полоски были одинаковой свѣтлости.

При *A*, между щелью и телескопомъ, въ средней части трубки спектроскопа, вращающейся на оси и снабженной на переднемъ концѣ кругомъ, дѣленнымъ на градусы, *BC*, помѣщается, непосредственно за чечевицей, дающей образъ щели, *d*, большая Николева призма, *N*; далѣе между нею и объективомъ телескопа находится система призмъ, *SS*, обыкновенныхъ въ спектроскопахъ прямого зрѣнія. Помощью рукоятокъ, находящихся съ обѣихъ сторонъ круга *BC*, онъ вмѣстѣ съ Николевой призмой можетъ быть поворачиваемъ вокругъ оси, при чемъ уголъ вращенія указывается нониусами, находящимися по обѣимъ сторонамъ круга (ф. 2-я). Весь свѣтъ, попадающій въ щель аппарата, проходитъ чрезъ большую Николеву призму, положеніе которой не имѣетъ вліянія на интенсивность обыкновеннаго свѣта, тогда какъ поляризованный ослабляется болѣе или менѣе въ зависимости отъ угла, образуемаго плоскостями поляризаций обѣихъ Николевыхъ призмъ. Призмы устанавливаются такъ, чтобы ихъ плоскости поляризации совпадали, когда нуль круга совпадаетъ съ нулемъ нониуса.

Такимъ образомъ, если половина наблюдаемой полоски, образуемая обыкновеннымъ свѣтомъ, будетъ представляться темнѣе вслѣдствіе поглощенія свѣта какой либо цвѣтной жидкостью, подвергаемой изслѣдованію, то вращеніемъ описанной призмы можно ослабить свѣтлость другой половины полоски на столько, чтобы она сравнялась съ первой; уголъ, на который поворочена при этомъ призма, даетъ точную мѣру ослабленія свѣта, а слѣдовательно дѣлаетъ возможнымъ опредѣлить величину поглощенія его въ испытуемой жидкости. Какъ и въ аппаратѣ Фирордта, наблюдение совершается надъ болѣе или менѣе узкой полоской, соответствующей точно опредѣленной части спектра. Для изолированія ея служитъ діафрагма (ф. 1-я *ik*), помѣщаемая въ окулярѣ и состоящая изъ двухъ половинокъ, края которыхъ соприкасаются въ вертикальной линіи, лежащей въ серединѣ поля зрѣнія

окуляра; это положеніе обѣихъ половинокъ діафрагмы отмѣчено нулемъ дѣленія, находящагося на краю каждой изъ нихъ и дозволяющаго всегда знать ширину щели, образуемой ихъ краями, обращенными одинъ къ другому.

Установка щели на ту или другую часть спектра дѣлается иначе, чѣмъ въ аппаратѣ Фирордта и гораздо удобнѣе. Съ передней подвижной, какъ обыкновенно, частью трубки спектроскопа, соединенъ указатель f ,двигающійся по горизонтальной дугѣ, g , снабженной дѣленіями, находящейся подъ окуляромъ ¹⁾. Установивъ край одной половинки діафрагмы на серединѣ поля зрѣнія (на нуль дѣленія) и наводя его послѣдовательно на главные фраунгоферовы линіи спектра, можно замѣтить положеніе указателя на нижней дугѣ, соотвѣтствующее каждой изъ означенныхъ линій. вмѣстѣ съ тѣмъ опредѣлится и разстояніе между фраунгоферовыми линіями, выраженное въ дѣленіяхъ этой дуги. Если затѣмъ опредѣлить отношеніе дѣленій діафрагмы къ дѣленіямъ дуги, то мы будемъ имѣть возможность раздвинуть щель на столько, чтобы изолировать точно опредѣленную по ширинѣ и положенію часть спектра. Возможность такого точнаго ориентированія въ спектрѣ имѣетъ чрезвычайно важное значеніе: для многихъ веществъ поглощеніе свѣта ограничивается преимущественно нѣкоторыми, иногда очень узкими и рѣзко ограниченными мѣстами спектра; примѣромъ можетъ служить оксигемоглобинъ, особенно его первая полоса. Понятно, что въ такихъ случаяхъ даже небольшая погрѣшность въ установкѣ аппарата можетъ весьма сильно повліять на результатъ наблюденія.

Такъ какъ для точности изслѣдованій выгодно, чтобы явленія поглощенія проявлялись возможно явственно, то для каждого вещества берется та часть спектра, въ которой всего сильнѣе производимое имъ поглощеніе. При изслѣдованіи гемоглобина берутъ поэтому тѣ части, которыя соотвѣтствуютъ двумъ полосамъ поглощенія оксигемоглобина, а именно: для первой отъ $D_{32}E$ до $D_{53}E$, а для второй $D_{63}E - D_{84}E$. Чтобы установка была всегда одинакова слѣдуетъ только замѣтить, разъ навсегда, для каждого

¹⁾ Дуга и указатель показаны отдѣльно на фиг. 3-й.

изъ этихъ мѣстъ, положеніе указателя и ширину щели. Такъ для спектрофотометра харьковскаго физиологическаго кабинета указатель долженъ быть установленъ для первой полосы на дѣленіи 47, 9, а для второй на 51, 3, при ширинѣ щели (окулярной) въ 0, 6 мм. ¹⁾.

Исследуемая жидкость наливается въ стеклянный сосудъ съ параллельными стѣнками, разстояніе между которыми равно одному сантиметру. Сосудъ устанавливается такъ, чтобы на половину щели падалъ свѣтъ прошедшій жидкость, а на другую — не подвергшійся ея вліянію. Въ настоящее время употребляются впрочемъ сосуды инаго устройства, придуманные Шульцомъ: стеклянная рамка въ видѣ буквы П отшлифована такъ, что толщина ея равна 11 миллиметрамъ; поэтому, когда на нее, съ обѣихъ сторонъ, будутъ наложены шлифованныя стекляныя пластинки, то между ними образуется пространство въ 11 милл. шириной. Внутрь сосуда вкладывается стеклянный параллелипипедъ, занимающій половину его высоты, шириною же ровно въ 10 милл.; стороны его, обращенныя къ стекляннымъ пластинкамъ, отполированы. Если такой сосудъ наполненъ жидкостью, то получается два слоя ея, верхній, толщиной въ 11 миллиметровъ и нижній — въ 1 миллиметръ; разница свѣтопоглощенія этихъ двухъ слоевъ соотвѣтствуетъ дѣйствию слоя жидкости въ 10 миллиметровъ.

Обыкновенно употребляется слой толщиной въ 1 сантиметръ, въ нѣкоторыхъ однако случаяхъ берутъ слой на половину тоньше, въ $\frac{1}{2}$ сантиметра; въ этомъ случаѣ сосudeцъ имѣетъ толщину рамки въ 6 милл., а параллелипипеда въ 5 милл.

Что касается освѣщенія, то всего удобнѣе употреблять керосиновую лампу съ круглымъ фитилемъ, дающую свѣтлое и высокое пламя. Поверхъ стекла, вмѣсто колпака или шара, устанавли-

¹⁾ Чтобы точно опредѣлить положеніе какого либо мѣста спектра, предполагаютъ, что разстояніе между сосѣдними фраунгоферовыми линіями раздѣлено на 100 частей и указываютъ какимъ изъ этихъ дѣленій соотвѣтствуетъ данное мѣсто. Такимъ образомъ выраженіе $D_{32}E - D_{53}E$ значитъ, что это мѣсто лежитъ между линіями D и E ; начинается съ 32-го и простирается до 53-го дѣленія, а каждое дѣленіе равно $\frac{1}{100}$ всего разстоянія между D и E .

ливается непрозрачный цилиндръ изъ желѣза или, какъ теперь дѣлаютъ изъ фарфора, покрытаго снаружи чернымъ асфальтовымъ лакомъ (его дѣлаютъ изъ фарфороваго цилиндра, употребляемаго для гальваническихъ элементовъ). Въ стѣнку этаго цилиндра, на высотѣ пламени лампы, вдѣлана металлическая трубка, на концѣ которой вставлено двояко выпуклое стекло, въ фокусъ котораго должно находиться пламя. Вслѣдствіе этого лучи выходятъ изъ стекла параллельными и все отверстіе его представляется ярко и равномерно освѣщеннымъ; на него и направляется спектроскопъ. Передняя щель его должна быть сѣужена на столько, чтобы получался достаточно ясный и свѣтлый спектръ; опытъ показалъ, что при указанномъ освѣщеніи ширина щели должна быть около 0,2 миллиметра. Установка щели производится помощью микрометрическихъ винтовъ, головки которыхъ снабжены дѣленіями.

Познакомившись со способомъ спектро-фотометрическаго изслѣдованія вообще, обратимся къ специально интересующему насъ вопросу — къ изслѣдованію крови.

Такъ какъ кровь въ натуральномъ видѣ совершенно непрозрачна, то ее необходимо развести; съ этой цѣлью она смѣшивается съ дистиллированной водою или, что лучше, съ слабымъ (0,1%) растворомъ углекислаго натра, который легче и лучше растворяетъ кровяныя тѣла и даетъ болѣе прозрачный растворъ. Степень разбавленія крови зависитъ, конечно, отъ содержанія въ ней гемоглобина, вообще же можно сказать, что при толщинѣ слоя въ 10 миллим. растворъ долженъ содержать отъ 0,8 до 1,5% крови; при употребленіи сосуда съ слоемъ въ 5 миллим., растворъ долженъ быть вдвое концентрированнѣе.

Изслѣдованіе такихъ слабыхъ растворовъ крови имѣетъ неудобство, что при окончательномъ вычисленіи процентнаго содержанія гемоглобина въ крови, приходится найденное наблюденіемъ число умножать на значительную цифру тѣмъ болшую, чѣмъ болѣе разбавлена кровь; при этомъ умножаются конечно и ошибки. Поэтому при приготовленіи кровянаго раствора надо соблюдать возможно боль-

шую точность. Если дано достаточное количество крови, то приготовление требуемой смѣси, при должномъ вниманіи, не представляетъ затрудненій, надо только имѣть въ виду, что употребляемые пипеты и бюреты должны быть напередъ вывѣрены, такъ какъ находящіеся въ продажѣ рѣдко бываютъ совершенно вѣрны. Больше затрудненій представляетъ изслѣдованіе крови живыхъ людей; здѣсь приходится ограничиваться очень небольшимъ количествомъ крови, одной каплей и чтобы, не смотря на то, приготовить точно опредѣленную смѣсь, необходимы особые приемы. Всего лучше было бы воспользоваться смѣсителемъ Потена, употребляемымъ при разбавленіи крови для счета тѣлецъ и при опредѣленіи гемоглобина по способу Малассе; къ сожалѣнію смѣсители этихъ аппаратовъ слишкомъ малы. Проще всего сдѣлать себѣ двѣ пипетки изъ стеклянныхъ трубочекъ; одна изъ нихъ, очень маленькая, должна вмѣщать около капли крови ¹⁾; другая, большая, около 1¹/₂ куб. сантим. Вмѣстимость пипетокъ опредѣляется повтореннымъ нѣсколько разъ взвѣшиваніемъ ртути, нужной для ихъ наполненія. Капли крови полученной изъ укола пальца или ладони, достаточно, чтобы наполнить маленькую пипетку, которая затѣмъ выпораживается въ небольшой сосудъ, куда предварительно отмѣренъ помощью большой пипетки растворъ углекислаго натра въ 0,1⁰/₀. Чтобы кровь не оставалась въ пипеткѣ, растворъ втягивается въ нее 2—3 раза и такимъ образомъ кровь смывается съ ея стѣнокъ и равномерно перемѣшивается съ разжижающею жидкостью. Приготовленнаго такимъ способомъ раствора крови совершенно достаточно для наполненія меньшаго Шultzовскаго сосуда, доставляющаго слой въ 5 миллим. ²⁾.

Наполненный сосудъ ставится передъ щелью спектрофотометра, а передъ нимъ, на разстояніи около 10 сантиметровъ, лампа.

¹⁾ Наименьшая изъ моихъ пипетокъ имѣла вмѣстимость въ 0,0275 куб. сантим., наибольшая въ 0,0556 куб. сантим.; объемъ капли крови составляетъ отъ 0,03 до 0,07 к. сантим.

²⁾ При дѣланіи укола не слѣдуетъ быть слишкомъ боязливымъ; уколъ или разрѣзъ долженъ быть такой глубины, чтобы свободно выступило достаточное количество крови. При слишкомъ маломъ уколѣ приходится выдавливать кровь, а это не только отнимаетъ время, но и ведетъ опасность измѣненія состава крови примѣсью къ ней паренхиматозной жидкости.

Хотя небольшія измѣненія разстоянія лампы отъ щели, при достаточномъ освѣщеніи, не имѣютъ особеннаго вліянія на результаты наблюденія; однако, для устраненія по возможности условій, могущихъ вліять на точность изслѣдованія, слѣдуетъ стараться, чтобы это разстояніе не измѣнялось. Само собой понятно, что лампа должна быть всегда въ порядкѣ, такъ какъ отъ этого очень много зависитъ сила доставляемаго ею свѣта.

Затѣмъ слѣдуетъ самое наблюденіе. Имѣемъ ли мы дѣло съ спектрофотометромъ Фирордта или Гюфнера, во всякомъ случаѣ прежде всего должна быть установлена передняя трубка спектроскопа и окулярная діафрагма такъ, чтобы въ полѣ зрѣнія видѣлась только та часть спектра, которая подвергается наблюденію. Выше было указано, что для опредѣленія гемоглобина изслѣдуются два мѣста спектра: положеніе перваго, соответствующаго первой полосѣ оксигемоглобина, — $D_{32}E - D_{53}E$, а втораго, отвѣчающаго второй полосѣ, $D_{63}E - D_{84}E$. Какимъ образомъ производится эта установка въ аппаратѣ Гюфнера, упомянуто выше; въ аппаратѣ же Фирордта для этого служить обыкновенная скала, отношеніе которой къ спектру опредѣлено предварительнымъ наблюденіемъ.

Когда эта установка сдѣлана и спектроскопъ будетъ направленъ на свѣтъ, то при одинаковой ширинѣ обѣихъ половинокъ щели въ аппаратѣ Фирордта въ полѣ зрѣнія будетъ видѣться цѣльная вертикальная полоска одинаковаго зеленовато-желтаго или зеленого цвѣта, смотря по тому, на какое изъ вышеуказанныхъ мѣстъ спектра направленъ аппаратъ. Въ аппаратѣ Гюфнера видимая вертикальная полоска раздѣлена на двѣ половины, верхнюю и нижнюю, тонкой поперечной линіей; одна изъ нихъ, верхняя, образуется обыкновеннымъ свѣтомъ, другая, нижняя, поляризованнымъ. Такъ какъ Николева призма задерживаетъ нѣкоторую часть падающаго на нее свѣта, то нижняя половина полоски нѣсколько темнѣе верхней; необходимо поэтому, уравнивать ихъ свѣтлость при помощи пластинки дымчатаго стекла, о которой было сказано выше. Надо, кромѣ того, провѣрить, правильно ли установлена передняя Николева призма, то есть со-

впадаетъ ли плоскость поляризаціи ея съ плоскостью поляризаціи большой вращающейся призмы, когда ноніусъ круга указываетъ нуль дѣленій. Правильность установки удостовѣряется тѣмъ, что повороту круга на извѣстный уголъ въ ту и другую сторону соотвѣтствуетъ одинаковая степень ослабленія свѣтлости нижней половины полосы. Если этого нѣтъ и для одинаковаго затемнѣнія надо повернуть кругъ въ одну сторону на большій уголъ, чѣмъ въ другую, то это указываетъ на неправильность установки передней призмы, для устраненія которой ее слѣдуетъ нѣсколько повернуть въ противоположную сторону. Впрочемъ, если разница не велика, то предпочтительнѣе не трогать призмы, а дѣлать каждый разъ двойное отчитываніе, поворачивая кругъ въ ту и въ другую сторону; среднее изъ обоихъ наблюденій будетъ свободно отъ ошибки, зависящей отъ указанной неправильности положенія передней призмы.

Когда между лампой и щелью спектроסקопа установленъ сосудъ съ растворомъ крови, то одна половина полосы становится темнѣе другой и наблюдатель долженъ сдѣлать ихъ снова одинаковой свѣтлости. Въ аппаратѣ Фирордта для этого суживается половина щели, черезъ которую проходитъ обыкновенный свѣтъ или, при употребленіи сосудовъ Шульца, та которая соотвѣтствуетъ болѣе тонкому слою кровянаго раствора; отношеніе ширины щели, при которой это наступитъ, къ первоначальной покажетъ какая доля свѣта проходитъ черезъ растворъ крови. Бываютъ однако случаи, когда однимъ суженіемъ щели нельзя достигнуть одинаковой свѣтлости половинокъ; тогда Фирордтъ ставитъ передъ половиной щели, соотвѣтствующей болѣе свѣтлой части полосы, пластинку дымчатаго стекла, свѣтопоглощеніе которой предварительно опредѣлено. Такимъ образомъ опредѣляется количество свѣта J , пропускаемое изслѣдуемымъ растворомъ, а слѣдовательно и его коэффициентъ свѣтоослабленія E , такъ какъ послѣдній выражается отрицательнымъ логарифмомъ этого количества.

Въ аппаратѣ Гюфнера уравниваніе свѣтлости обѣихъ половинокъ достигается вращеніемъ извѣстнаго намъ круга; по мѣрѣ того какъ увеличивается уголъ, на который онъ повероченъ, ниж-

ная половина полосы становится все темнѣе, пока не сравняется съ верхнею. Для возможно точнаго опредѣленія угла слѣдуетъ, какъ уже сказано выше, опредѣлять его поворотомъ круга въ обѣ стороны и, кромѣ того, повторить такое опредѣленіе два, три раза. Вся операція требуетъ такъ мало времени, что повтореніе ея не можетъ затруднить изслѣдователя, а между тѣмъ этимъ избѣгаются возможные случайныя погрѣшности и найденная средняя величина получаетъ большую вѣроятность.

Указанное опредѣленіе дѣлается послѣдовательно для обѣихъ полюсовъ оксигемоглобина, устанавливая указатель на соотвѣтствующія мѣста нижней дуги. Найденные при этомъ углы даютъ возможность вычислить для обоихъ мѣстъ величину коэффициента свѣтоослабленія E , такъ какъ она равна отрицательному удвоенному логарифму косинуса найденнаго угла.

Величина E измѣняется прямо пропорціонально концентраціи раствора; по этому, если требуется только сравнительное опредѣленіе гемоглобина въ крови, то достаточно знать эту величину для крови здороваго человѣка и крови изслѣдуемой. Иное дѣло, если требуется опредѣлить числовую величину для процентнаго содержанія гемоглобина въ данной крови; въ этомъ случаѣ надо знать, для обоихъ мѣстъ спектра, числовую величину отношенія $\frac{C}{E}$, которую мы называли выше буквою A . Опредѣленіе этихъ постоянныхъ представляетъ своеобразныя трудности, вслѣдствіе быстрой разлагаемости растворовъ гемоглобина, вызывающей необходимость особыхъ приѣмовъ для точнаго опредѣленія ихъ концентраціи ¹⁾.

Опредѣленіе постоянныхъ должно быть сдѣлано особо для каждаго инструмента, такъ какъ каждый изъ нихъ, по крайней мѣрѣ изъ спектрофотометровъ Гюфнера, имѣетъ свои особыя постоянныя. Не входя въ подробности самаго опредѣленія, такъ какъ во всякомъ случаѣ оно можетъ быть сдѣлано только въ лабораторіи, укажу для желающихъ познакомиться съ нимъ на статьи

¹⁾ Концентраціей раствора, C , называютъ въ этомъ случаѣ, по примѣру Фирордта, содержаніе гемоглобина въ граммахъ, приходящееся на одинъ кубич. сантиметръ раствора.

Гюфнера ¹⁾, Отто ²⁾ и Ф. Нордена ³⁾. Впрочемъ, если имѣется возможность сравнить инструментъ съ другимъ, постоянныя величины котораго уже опредѣлены, то можно избѣжать сложную и длинную процедуру, связанную съ самостоятельнымъ опредѣленіемъ постоянныхъ.

Чтобы дать понятіе о томъ, какъ велики разницы постоянныхъ у отдѣльныхъ спектрофотометровъ Гюфнера, приведу слѣдующіе примѣры: по опредѣленію Гюфнера, они для его аппарата имѣютъ величины: $A = 0,001330$ и $A^1 = 0,001000$ ⁴⁾; для аппарата, съ которымъ работалъ Отто, онѣ: $A = 0,001880$ и $A^1 = 0,001403$; наконецъ для аппарата, принадлежащаго физиологическому кабинету Харьковскаго университета тѣже величины равны: $A = 0,001504$ и $A^1 = 0,001125$. Что такія разницы не зависятъ отъ случайныхъ ошибокъ, видно изъ того, что, не смотря на измѣняющіяся величины для A и A^1 , отношеніе между ними остается одно и тоже; для чиселъ Гюфнера оно 1.330, для Отто—1.340, а для моихъ 1.336.

Понятно, что для опредѣленія, сколько именно содержится гемоглобина въ данной крови, необходимо знать постоянныя того аппарата, которымъ производится изслѣдованіе, иначе можно получить число, далеко отходящее отъ истиннаго. Такъ если бы, принявъ въ основаніе постоянныя Гюфнера, мы нашли въ крови 10% гемоглобина, то при постоянныхъ Отто мы бы получили 14%, а при постоянныхъ харьковскаго аппарата 13%.

Изъ вышесказаннаго видно, что при каждомъ изслѣдованіи крови помощію спектрофотометра получаютъ коэффициенты свѣтослабленія для обоихъ изслѣдуемыхъ мѣстъ спектра; затѣмъ при помощи соотвѣтствующей постоянной опредѣляется содержаніе гемоглобина. Такимъ образомъ одновременно ведется два анализа крови, контролирующіе одинъ другой, что составляетъ большое достоинство этого метода. При тщательномъ выполненіи разница обѣ-

¹⁾ Zeitschr. f. physiol. Chemie I Bd. S. 320.

²⁾ Archiv f. d. ges. Physiologie. Bd. XXXVI. S. 243.

³⁾ Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. IV. S. 8.

⁴⁾ Буквою A означаетъ постоянная для первой, буквою A^1 —для второй полосы оксигемоглобина.

ихъ полученныхъ чиселъ для процентнаго содержанія гемоглобина не должна превышать полупроцента, обыкновенно же она составляетъ одну или двѣ десятыя процента.

Въ крови гемоглобинъ находится частью въ соединеніи съ кислородомъ, какъ оксигемоглобинъ, частью въ разкисленномъ состояніи; количество того и другого не одинаково, смотря по роду крови. Обыкновенно употребляемые способы опредѣленія гемоглобина не могутъ указать относительнаго количества того и другого вида его; спектрофотометрія однако и въ этомъ случаѣ превосходить всѣ иные методы изслѣдованія. Если извѣстны постоянныя воличины не только для оксигемоглобина [A^0 и A_1^0], но и для гемоглобина несодержащаго кислорода [A^r и A_1^r], то достаточно опредѣлить коэффициенты свѣтоослабленія кровянаго раствора обыкновеннымъ способомъ, чтобы узнать содержаніе въ немъ какъ чистаго гемоглобина, такъ и кислороднаго его соединенія.

Положимъ, что найденные коэффициенты свѣтоослабленія будутъ E и E' ; такъ какъ кровь содержитъ оба вида гемоглобина, то каждый изъ нихъ будетъ принимать участіе въ поглощеніи свѣта; назовемъ E^0 и E_1^0 коэффициенты свѣтоослабленія оксигемоглобина, а E^r и E_1^r — разкисленнаго гемоглобина; получимъ

$$E = E^0 + E^r \quad \text{и} \quad E_1 = E_1^0 + E_1^r$$

припомнимъ, что $E = \frac{c}{A}$ и подставивъ вмѣсто величинъ E то, чему онѣ равны получимъ

$$E = \frac{c^r}{A^r} + \frac{c^0}{A^0} \quad \text{и} \quad E_1 = \frac{c^0}{A_1^0} + \frac{c^r}{A_1^r}$$

буквы c^0 и c^r означаютъ содержаніе въ крови оксигемоглобина и раскисленнаго гемоглобина.

Опредѣливъ c^r изъ втораго уравненія и вставивъ найденную величину въ первое, получимъ

$$c^0 = \frac{A^0 A_1^0 [E A^r + E_1 A_1^r]}{A_1^0 A^r - A^0 A_1^r}$$

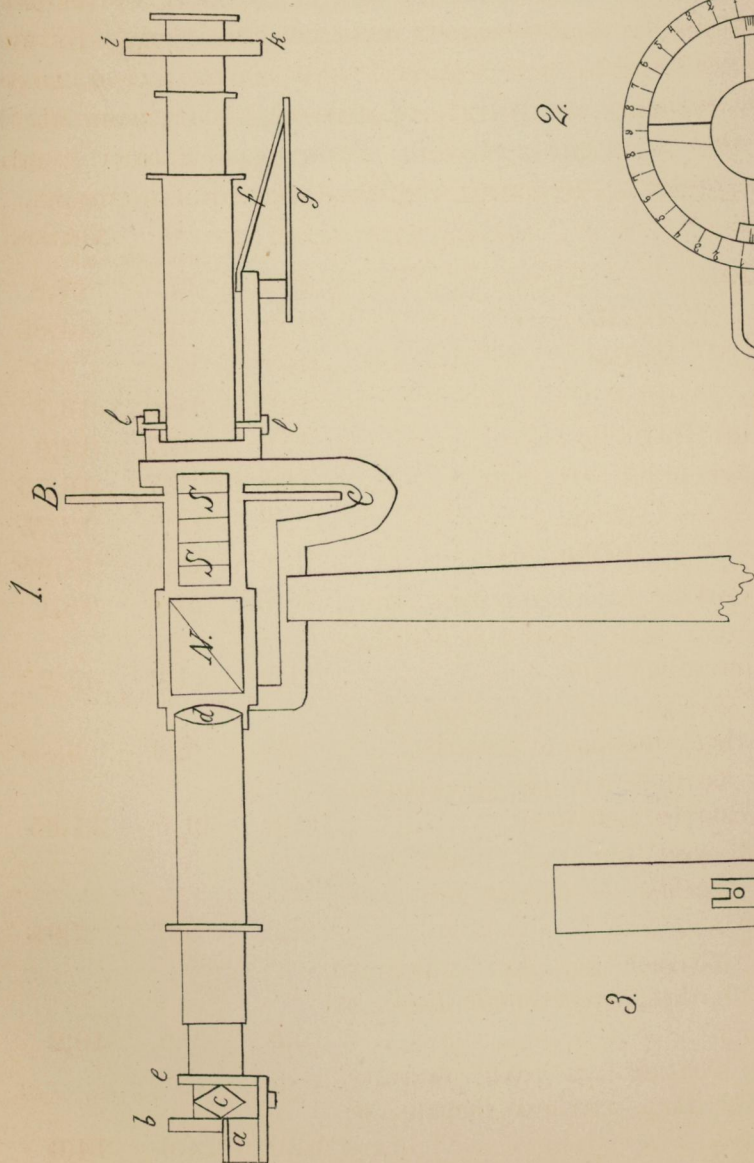
подобнымъ же образомъ опредѣлится

$$c^r = \frac{A^r A_1^r [E_1 A_1^0 - E A^0]}{A_1^0 A^r - A^0 A_1^r}$$

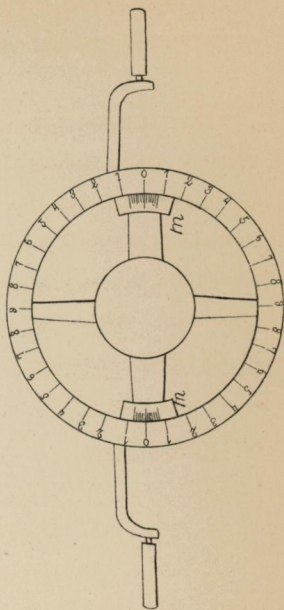
Понятно, что такого рода изслѣдованіе требуетъ особыхъ предосторожностей, устраняющихъ возможность соприкосновенія изслѣдуемой крови съ воздухомъ.

Въ заключеніе приведу нѣсколько наблюденій надъ содержаніемъ гемоглобина въ крови здоровыхъ и больныхъ субъектовъ, сдѣланныхъ мною въ прошедшемъ академическомъ году. Въ нижеслѣдующей таблицѣ подѣ буквами α и β стоятъ цифры, полученные на основаніи наблюденій въ первомъ и во второмъ мѣстѣ спектра. Онѣ приводятся для того, чтобы читатель могъ судить о степени точности результатовъ доставляемыхъ этимъ методомъ.

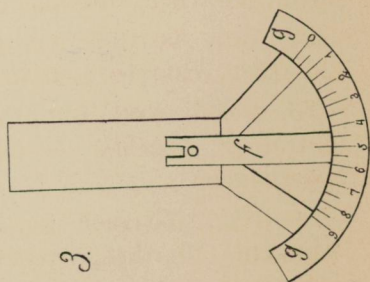
	α	β	Среднее.
	Въ процентахъ.		
1. Студентъ Г. 23 лѣтъ	17,9	17,7	17,8
2. " В. 22 "	15,0	14,7	14,85
3. " Св. 23 "	16,0	15,8	15,9
4. " С. 21 "	16,8	16,6	16,7
5. Лекаръ Прот. 29 лѣтъ	15,1	14,7	14,9
6. Профессоръ К: 33 лѣтъ	16,8	16,7	16,75
7. " А. Д.	12,8	12,7	12,75
8. " Щ. 55 лѣтъ	14,9	15,0	14,95
9. К., больной изъ терап. госп. клин.	18,8	17,4	18,1
10. К., тоже. 54 л., anaemia post haemorrh ex intestino recto	11,2	11,2	11,2
11. Дм., больной изъ фак. терап. клиники, 18 лѣтъ, anaemia ex malaria	5,8	5,9	5,85
12. Ал., больной изъ той же клиники, 24 лѣтъ, catarrh. ventriculi	11,8	11,5	11,65
13. Вовч., тоже, 29 лѣтъ, insuff. valv. mitral. et anaemia secundaria post haemorrhagiam	8,2	7,7	7,95
14. Бѣл., больной изъ фак. хирургич. клиники, 19 лѣтъ, hypertrophia lienis et leukaemia	10,5	9,9	10,2
15. Цех., больной изъ терап. факульт. клиники, 32 лѣтъ, cirrhosis hepatis atrophica	14,0	14,0	14,0



2.



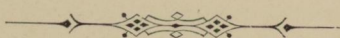
3.



БІОЛОГО-ХІМІЧЕСКІЯ СООБЩЕНІЯ О БѢЛКОВЫХЪ ВЕЩЕСТВАХЪ.

(Матеріалы для химической конституціи и
біогенеза ихъ).

Проф. А. Я. Данилевскаго.



ХАРЬКОВЪ.

Типографія М. Ф. Зильберберга, Рыбная ул., д. № 25-й.

1888.

Сообщеніе I.

О химической конституціи углеазотной группы бѣлковыхъ веществъ.

Потребность знать ближе натуру и конституцію бѣлковыхъ веществъ такъ велика, что, не смотря на чрезвычайныя затрудненія, которыя химія встрѣчала въ теченіи ряда дѣсятилѣтій при изученіи этихъ тѣлъ, отъ времени до времени наука выдвигала разборъ этого вопроса на страницы журналовъ. Въ послѣднее десятилѣтіе Пфлюгеръ, Шютценбергеръ и Лёвъ дали гипотезы по этому предмету. Но въ то время какъ первый ограничился указаніемъ нѣкоторыхъ чертъ этой конституціи, остальные два изслѣдователя сочли себя въ правѣ дать почти полную схему конституціи этихъ тѣлъ.

Подвинули ли эти гипотезы насъ впередъ на пути дѣйствительнаго знанія натуры бѣлковыхъ веществъ? Уяснили ли они намъ метаморфозы бѣлковыхъ тѣлъ внѣ и внутри организмовъ? Показали ли они намъ зависимость качествъ и взаимной превращаемости бѣлковыхъ формъ отъ ихъ химическаго состава? Къ сожалѣнію нѣтъ, потому что всѣ подобныя факты остаются и до сихъ поръ вполне необъясненными. Между тѣмъ нельзя отказать напр. Шютценбергеру, потратившему массу труда на изученіе продуктовъ распада бѣлковъ подъ вліяніемъ ѣдкаго барыта и получившаго большое количество интересныхъ продуктовъ, нельзя отказать ему въ правѣ сгруппировать результаты и связать ихъ въ одно цѣлое одной общей идеей. Онъ это и сдѣлалъ, но его схема конституціи вышла далеко не удовлетворяющей требованіямъ извѣстныхъ фактовъ. Еще менѣе удовлетворительна и менѣе правдива схема Лё-

ва. Ограничившись фактическимъ изученіемъ одной частной реакціи, даваемой бѣлками съ серебромъ, Лёвъ стремится подогнать всю гипотезу конституціи частицы къ удовлетворенію этой реакціи, упустивъ изъ виду массу другихъ фактовъ. Нужно сильно, много поработать самому въ этой области, чтобы ясно понять всю нелогичность подобныхъ приѣмовъ изслѣдованія предмета. Только изслѣдователи мало знакомые личнымъ трудомъ съ бѣлковой частицей могутъ надѣяться, что нѣсколькихъ усилій мысли и опыта, счастливо построеннаго, въ состояніи раскрыть намъ эту тайну. Также точно и малосвѣдующимъ въ этомъ вопросѣ людямъ вообще, не кажется страннымъ претензія Лёва, основанная на одной реакціи и попытка Шютценбергера, основанная хотя и на весьма почтенномъ, но совершенно одностороннемъ, а потому и недостаточномъ изученіи предмета.

Очевидно, мы еще далеко не вполне ознакомились съ натурой разныхъ долей бѣлковой частицы, чтобы можно было построить правдоподобную полную схему рациональнаго состава ея. Какъ ни желательна полная схема конституціи для руководства біолога, химика и врача въ ихъ соображеніяхъ — такая гипотеза, по моему глубокому убѣжденію, основанному на неопровержимыхъ данныхъ многолѣтнихъ трудовъ въ этой области — еще для насъ невозможна. Эти данныя состоятъ въ томъ, что огромная доля бѣлковой частицы ни при одномъ изъ до сихъ поръ произведенномъ изслѣдованіи, не исключая и работы Шютценбергера, не была получена въ такомъ состояніи, по которому можно было бы, хотя только приблизительно угадать ее нормальный видъ и натуру въ первоначальной частицѣ бѣлка. Мы даже не знаемъ, есть ли этотъ X смѣсь атомныхъ группъ и сколькихъ или однородный комплексъ атомовъ.

Достаточно одного этого факта для оправданія моего взгляда, что всякая попытка создать теперь же, во что бы то ни стало, полную схему конституціи бѣлковой частицы — не основательна и не плодотворна. Но это то и должно заставить насъ изслѣдователей стремиться къ этой цѣли, изучать частицу со всѣхъ сторонъ, копить наблюденія и пополнять пробѣлы.

Едва ли есть въ органической химіи задача сложнѣе и труднѣе этой. Но потребность біологіи въ уясненіи конституціи бѣлковаго вещества такъ настоятельна, что никакія трудности не должны останавливать изслѣдователя. Чѣмъ менѣе біологъ или біолого-химикъ знакомъ съ натурой бѣлковой частицы по собственному опыту, тѣмъ легче кажется ему вся задача. Достаточно найти новый методъ изслѣдованія, новую реакцію, улучшить старый методъ, достаточно найти этими способами что нибудь отличное отъ прежнихъ результатовъ, какъ рождаются радужныя надежды и конституція частицы уже носится въ воображеніи. И, только потративши на эту задачу долгіе годы усидчиваго труда и размышленія—приходишь къ заключенію, что тотъ или другой новый или обыкновенный способъ дѣйствительно плодотворенъ, но до желанной цѣли довести самъ по себѣ не можетъ. Правда, онъ пролилъ свѣтъ, но только на одну маленькую долю частицы. Только эта послѣдняя получаетъ въ глазахъ изслѣдователя опредѣленный, ясный обликъ, ясный химическій характеръ, въ остальномъ таже неизвѣстность и надо отыскивать новые и новые пути въ эти все еще темныя области.

Не одинъ и не два какихъ либо метода обработки бѣлковъ способны раскрыть передъ нами натуру всѣхъ разнородныхъ атомныхъ группъ, составляющихъ бѣлковую частицу, но для каждой такой группы приходится найти, изобрѣсти особый способъ.

Въ изученіи натуры и конституціи бѣлковой частицы мы можемъ, какъ это видно изъ вышесказаннаго, подвигаться впередъ лишь медленно, шагъ за шагомъ проникая все глубже въ массу атомныхъ группъ, составляющихъ ее. Какъ не необходимо намъ знаніе всей частицы, знаніе дѣйствительное, но за невозможностью его не слѣдуетъ ставить на его мѣсто знанія фиктивного и гораздо выгоднѣе довольствоваться знаніемъ отдѣльныхъ долей частицы, потому что и это знаніе можетъ принести несомнѣнную пользу біологіи. Поэтому, отстранивъ въ настоящее время задачу о конституціи бѣлка во всей ея полнотѣ, какъ задачу для рѣшенія которой время еще не приспѣло, я считаю себя вправѣ передать

последовательно, въ рядѣ сообщеній тѣ факты, которые въ состояніи познакомить читателя съ натурой и конституціей лишь нѣкоторыхъ, отдѣльныхъ мѣстъ бѣлковой частицы. Матеріалъ для этихъ сообщеній составляетъ плодъ многолѣтнихъ опытныхъ преслѣдованій одной и той же задачи, которую, не смотря на множество разочарованій и слабыя силы мои, я и теперь не въ состояніи покинуть.

Бѣлковыя вещества подобно многимъ органическимъ соединеніямъ представляютъ комплексъ разнообразныхъ атомныхъ группъ, находящихся между собою во взаимной связи. Въ отличіе отъ большинства органическихъ соединеній, бѣлковая частица во 1) содержитъ большое разнообразіе атомныхъ группъ, во 2) эти послѣднія бываютъ въ ней большой сложности, въ 3) эти атомныя группы въ большинствѣ случаевъ по выдѣленіи своемъ изъ частицы способны къ самостоятельному существованію и въ 4) заключаютъ неравномѣрное количество каждой изъ этихъ группъ.

Это послѣднее обстоятельство явствуетъ съ очевидностью изъ нѣкоторыхъ твердо установленныхъ фактовъ, о чемъ рѣчь будетъ въ одномъ изъ послѣдующихъ сообщеній.

Нѣкоторыя изъ существующихъ въ частицѣ атомныхъ группъ могутъ быть получены посредствомъ искусственнаго разрушенія частицы, другія появляются самостоятельными тѣлами лишь при распаденіяхъ бѣлковъ внутри организма, наконецъ третьи не получаютъ ни тѣмъ ни другимъ путемъ въ видѣ самостоятельныхъ тѣлъ, но быстро распадаются далѣе. Научное значеніе искусственныхъ и естественныхъ продуктовъ распада очень велико. Они въ состояніи намъ указать на ближайшія составныя части частицы бѣлка. Такъ какъ они сами сложны и въ свою очередь при своемъ распаденіи способны дать начало органическимъ соединеніямъ, хотя уже и болѣе простаго состава, то ихъ полученіе изъ бѣлковъ не можетъ прямо вести къ заключенію о предсуществованіи ихъ комплекса въ бѣлковой частицѣ. Въдѣ они могли бы быть въ свою

очередь продуктами распада еще болѣе сложной и дѣйствительно предсуществующей въ бѣлкѣ атомной группы. Достаточнымъ доказательствомъ предсуществованія въ бѣлковой частицѣ комплекса изолированного изъ нея соединенія служить то обстоятельство, если распадъ бѣлковаго вещества произошелъ при умѣренныхъ воздѣйствіяхъ на него, если данная атомная группа по натурѣ своей устойчива противъ дѣйствія примѣненнаго способа разрушенія частицы, если она встрѣчается въ органахъ животныхъ и растений или, если она способна дать при своемъ разрушеніи продукты, образующіеся изъ бѣлковъ въ животномъ организмѣ. Но еще большее подкрѣпленіе получаетъ выводъ о предсуществованіи даннаго комплекса атомовъ въ бѣлковой частицѣ, если послѣдняя даетъ реакцію, часто цвѣтную, которая является особенно характерной для этого комплекса въ его самостоятельномъ существованіи.

Къ сожалѣнію не вся серія изложенныхъ критеріевъ приложима ко всякой предполагаемой въ бѣлкахъ атомной группѣ и ко всякому получаемому изъ нихъ продукту распада. Особенно часто отсутствуетъ возможность приложенія послѣдняго критерія—цвѣтныхъ или иныхъ рѣзко характерныхъ реакцій. Есть и такіе случаи, когда какое либо вещество, встрѣчающееся въ организмѣ и несомнѣнно происшедшее изъ бѣлковыхъ тѣлъ, обладаетъ прекрасной, характерной распознавательной реакціей, между тѣмъ бѣлковое вещество никакихъ слѣдовъ этой реакціи не даетъ. Къ такимъ случаямъ принадлежатъ напр. мочевая кислота, сахаръ. Тирозинъ напр. удовлетворяетъ всѣмъ критеріямъ. Въ самомъ дѣлѣ, онъ способенъ образоваться изъ бѣлковъ при слабыхъ воздѣйствіяхъ на нихъ (напр. подъ вліяніемъ трипсина), онъ очень устойчивъ противъ ферментовъ, кислотъ и щелочей, онъ встрѣчается иногда и въ живомъ организмѣ, онъ даетъ внѣ организма при извѣстныхъ условіяхъ гидропаракумаровую кислоту, которая найдена и въ тканяхъ организма и наконецъ для него весьма характерна такъ называемая „Миллонова“ реакція, которую при равныхъ условіяхъ даютъ и бѣлковыя тѣла. Мало того, только тѣ бѣлки, которые даютъ эту реакцію, даютъ при своемъ распаде-

нии тирозинъ. Въ виду всѣхъ этихъ обстоятельствъ невозможно не признавать тирозиновый комплексъ предсуществуящимъ въ бѣлковой частицѣ. Но такое сочетаніе доказательствъ свойственно далеко не всѣмъ атомнымъ группамъ бѣлковаго вещества. Для большей части приходится довольствоваться частью этихъ доказательствъ, а для нѣкоторыхъ подыскивать другія поддержки. Иногда, не смотря на нѣкоторыя, казалось бы, вѣскія совпаденія, вопросъ о предсуществованіи данной группы атомовъ остается открытымъ. Въ такомъ положеніи находится холевая кислота. Бѣлковыя тѣла даютъ такъ называемую петтенкоферову реакцію холевой кислоты; но до сихъ поръ ни фізіологическій опытъ, ни химическая обработка бѣлковъ не подтвердили съ достаточною точностью положенія о предсуществованіи въ бѣлкѣ комплекса холевой кислоты.

Наконецъ въ этомъ вопросѣ бываютъ случаи еще менѣе благоприятные для изслѣдователя: бѣлковыя вещества даютъ рѣзкую цвѣтную реакцію; послѣдняя очень характерна для извѣстнаго химическаго соединенія; но это тѣло не можетъ быть получено изъ бѣлковыхъ веществъ искусственно и никогда не является въ организмахъ нормальнымъ продуктомъ распада бѣлковъ. Это относится къ біурету.

Неспособность бѣлковыхъ веществъ, всѣхъ безъ исключенія давать мурексидную реакцію и невозможность путемъ простаго распада бѣлковъ получить изъ нихъ мочевую кислоту не оставляетъ сомнѣнія въ томъ, что атомный комплексъ этой кислоты въ готовомъ видѣ въ частицѣ бѣлка не существуетъ. Образование внутри организма тѣлъ группы мочевой кислоты можетъ произойти путемъ синтеза, соединяющаго нѣсколько болѣе простыхъ атомныхъ группъ между собою. Фізіологическіе факты, накопляющіеся въ послѣдніе годы рѣшительно подтверждаютъ эту точку зрѣнія. Такимъ образомъ отсутствіе способности въ бѣлковыхъ веществахъ давать характерную реакцію мочевой кислоты — отчетливо предсказало фактъ, подтверждаемый теперь фізіологическими опытами. Отсюда слѣдовало бы ожидать, что рѣзкая способность бѣл-

ковъ давать такъ называемую біуретовую реакцію, должна бы указать на присутствіе этой атомной группы въ бѣлковой частицѣ. Но отчего же біуретъ не является внутри организма? отчего онъ не получается изъ бѣлковъ въ лабораторіи? Біуретъ представляетъ вещество довольно устойчивое, кристаллическое, обладающее свойствами удобными для изолированія его изъ смѣсей. Я гораздо раньше Брюкке потратилъ много усилій на попытки получить при различныхъ условіяхъ біуретъ изъ бѣлковъ при ихъ распаденіяхъ и подобно Брюкке не достигъ намѣченной цѣли. — Но труды мои не пропали совсѣмъ даромъ. Я пришелъ къ положительному выводу, что группа атомовъ бѣлковой частицы, обуславливающая такъ называемую „біуретову реакцію“ бѣлковъ, имѣетъ въ дѣйствительности строеніе сходное съ біуретовымъ, но что въ тоже время атомная группа эта не есть частичный остатокъ біурета, заключенный въ частицу бѣлка, подобно частичнымъ остаткамъ тирозина, лейцина и другихъ тѣлъ. Поэтому ни при какомъ распаденіи бѣлка эта группа, не смотря на ея огромное сходство съ біуретовымъ комплексомъ, не способна выдѣлиться въ видѣ самостоятельнаго тѣла, но распадается при своемъ освобожденіи изъ частицы на свои болѣе простыя атомныя группы.

Я бы не считалъ особенно нужнымъ останавливать вниманіе читателя на біуретовой группѣ бѣлковъ, если бы подробное изученіе ея не привели меня къ убѣжденію въ огромной важности знанія ея для уясненія многихъ сторонъ конституціи бѣлковой частицы и химизма нѣкоторыхъ извѣстныхъ превращеній бѣлковъ внѣ и внутри организма. Эти мотивы выясняются сами собою въ дальнѣйшемъ изложеніи, здѣсь же достаточно будетъ оправданія ради указать, что біуретовая группа бѣлковой частицы по отношеніямъ, существующимъ въ ней между азотными и углеродными атомами, весьма близка къ мочевины, мочевои кислотѣ и другимъ тѣламъ, происхожденіе которыхъ внутри организма составляетъ одну изъ важнѣйшихъ проблемъ фیزیологической химіи.

Біуретовая реакція бѣлковыхъ тѣлъ была уже предметомъ спеціального изученія. Брюкке ¹⁾ въ особенности понималъ ея важность для уясненія натуры бѣлковой частицы и посвятилъ этой реакціи не мало вниманія. Брюкке выразилъ лелеянную многими мысль, что если бы удалось выдѣлить изъ бѣлка біуретовую группу, — то образованіе мочевины изъ бѣлка внутри животнаго организма стало бы совершенно понятно. Неудивительно, что онъ горячо преслѣдовалъ эту задачу, особенно послѣ того какъ нашелъ, что при продолжительной пептонизаціи напр. фибрина желудочнымъ сокомъ удается изъ сгущенной массы извлечь крѣпкимъ алкоголемъ вещество, дающее крайне сильную біуретовую реакцію, почти такой же интензивности какъ и настоящій біуретъ. Брюкке сознается однако же, что, не смотря на всѣ попытки изолировать біуретъ или получить съ продуктомъ пищеваренія кристаллическое соединеніе біурета съ мѣдью — ему этого не удалось. Вещество, дававшее ему сильную біуретовую реакцію было аморфно, не образовывало кристаллическаго соединенія съ мѣдью и содержало каждый разъ неодинаковое количество постороннихъ группъ напр. оно давало реакцію Адамкевича и наконецъ получалось въ нѣсколькихъ разновидностяхъ то болѣе, то менѣе, растворимыхъ въ алкоголѣ. Брюкке далъ этому веществу, растворимому въ алкоголѣ названіе — алькофиръ, не имѣя впрочемъ въ виду обозначить этимъ именемъ какое либо хорошо химически характеризованное тѣло. Изслѣдованіе растворимости и осаждаемости, дѣйствія кислотъ и щелочей на алькофиръ не привели Брюкке ни къ какому представленію о химической конституціи этого вещества или о его значеніи для уясненія конституціи бѣлковой частицы.

Крукенбергъ ²⁾ также говоритъ въ двухъ своихъ статьяхъ о біуретовой реакціи бѣлковъ и атомной группѣ ея производящей, и предполагаетъ, что въ бѣлковой частицѣ заключаются „Complexe wahrscheinlich von der Form

$$\begin{array}{c} \text{— CO—} \\ \text{— CO—} \end{array} \text{NH, welche die Biuretreac-}$$

¹⁾ Sigungsberichte d. k. k. Akad. d. Wiss. Bd. LXXXVII. Märzheft. 1883.

²⁾ Kruckenberg, Jenaische Zeitschrift. 1885. B. 19. Supplement. Heft. II, p. 122..... и p. 133.....

tion bedingen". Я покажу тотчасъ, что подобнаго рода комплексы не могутъ обусловить этой реакціи и предположеніе Крукенберга поэтому невѣрно. Но Крукенбергъ даетъ другой, крайне интересный фактъ, касающійся нашего вопроса. Hewlet Brown подѣ его руководствомъ нашелъ, что красная жидкость получаема съ щелочнымъ растворомъ пептона по прибавленіи къ ней мѣдной соли, даетъ въ спектральномъ аппаратѣ такой же спектръ поглощенія какъ и красная жидкость, получающаяся при такихъ же условіяхъ съ настоящимъ біуретомъ. Это сходство оптическихъ свойствъ, хотя само по себѣ не есть полное доказательство тождественности атомныхъ группъ, производящихъ реакцію, но служитъ прекраснымъ поддерживающимъ фактомъ для заключеній выводимыхъ изъ нижеописанныхъ фактовъ. Затѣмъ я вполне согласенъ съ Крукенбергомъ въ его возраженіи Гофмейстеру. Послѣдній полагаетъ, что біуретовая реакція свойственна въ одинаковой степени всѣмъ бѣлковымъ тѣламъ, и что разность ея при употребленіи пептоновъ зависитъ оттого, что растворы пептоновъ легко получаются весьма густыми, между тѣмъ какъ растворы бѣлковъ, особенно ангидридныхъ, сгущаются съ трудомъ. Крукенбергъ утверждаетъ въ противность Гофмейстеру, что біуретова реакція собственно говоря свойственна только пептонамъ и „echte Eiweisskörper“ даютъ ее только послѣ того, какъ подѣ вліяніемъ щелочей перейдутъ въ пропептоны или пептоны.

Это тоже не совсѣмъ вѣрный взглядъ; ангидридные бѣлки вовсе не переходятъ въ пропептоны и пептоны подѣ вліяніемъ щелочей при умѣренномъ воздѣйствіи послѣднихъ, между тѣмъ какъ біуретовую реакцію въ ангидридныхъ бѣлкахъ можно вызвать самою разведенною щелочью при нагрѣваніи до $30-50^{\circ}$. При этой поправкѣ я вполне согласенъ съ возраженіемъ Крукенберга противъ Гофмейстера. Мнѣніе послѣдняго можетъ быть опровергнуто слѣдующимъ простымъ опытомъ: щелочной растворъ ангидриднаго бѣлка, напр. яичнаго альбумина нагрѣваютъ при $40-50^{\circ}$ съ $3-5\%$ щелочью при удержаніи нормальнаго объема жидкости; до нагрѣванія и во время послѣдняго берутъ по временамъ одинаковыя пробы, напр. 25—50 капель, разводятъ оди-

наковымъ количествомъ воды и прибавляютъ одинаковое число капель раствора мѣдной соли. При сравненіи трубочекъ ясно и даже рѣзко видно, что по мѣрѣ дѣйствія щелочи, біуретовая реакція жидкости, сохраняющей тоже количество бѣлковаго вещества, постепенно усиливается. Еще рѣзче результатъ, если въ такомъ же родѣ производитъ пептонизацію опредѣленнаго количество бѣлка.

Такимъ образомъ существующія въ наукѣ свѣдѣнія крайне скудны и даже Брюкке, болѣе всѣхъ занимавшійся попыткою разгадать ближайшій химическій характеръ атомной группы, обуславливающей въ бѣлкахъ біуретовую реакцію съ мѣдью, не пришелъ въ этомъ отношеніи къ какимъ либо удовлетворительнымъ результатамъ.

Кромѣ этихъ приведенныхъ данныхъ литературы, другихъ сколько нибудь цѣнныхъ указаній о натурѣ этой атомной группы мыѣ неизвѣстно.

Біуретовая реакція бѣлковыхъ веществъ состоитъ какъ извѣстно въ томъ, что сильно щелочной растворъ ихъ отъ прибавленія мѣдной соли принимаетъ краснофіолетовый цвѣтъ. Не смотря на простоту производства этой реакціи, въ деталяхъ и отдѣльных случаяхъ встрѣчается столько разнообразія и градацій ея интенсивности, что это не разъ было причиною разнорѣчія при оцѣнкѣ ея характера и значенія для того или другаго бѣлковаго вида.

Начать съ того, что одно и тоже бѣлковое тѣло даетъ эту реакцію съ различною интенсивностью, смотря по состоянію, въ которомъ оно находится. Ангидридные формы бѣлковъ даютъ далеко менѣе сильную біуретовую реакцію, чѣмъ формы гидратныя. Легкое нагрѣваніе бѣлковъ съ разведенною щелочью или даже продолжительное стояніе щелочнаго ихъ раствора при обыкновенной температурѣ въ состояніи рѣзко измѣнить силу реакціи въ положительную сторону. Бѣлая интенсивность или постепенное усиленіе самой реакціи выражается пятью признаками: 1) данная щелочная жидкость начинаетъ растворять все большее количество гидрата окиси мѣди, осаждаемаго изъ мѣдной соли щелочью;

2) при одномъ и томъ же количествѣ влитой мѣдной соли цвѣтъ смѣси болѣе красный; 3) первая капли мѣдной соли даютъ по раствореніи мѣдной окиси при большой силѣ реакціи чисто красный цвѣтъ; 4) избытокъ мѣдной соли даетъ все позже и позже переходъ отъ красного цвѣта въ красно-фіолетовый и отъ послѣдняго въ сине-фіолетовый и наконецъ 5) легкое подогреваніе или продолжительное стояніе щелочной смѣси, въ которой реакція уже произведена все менѣе и менѣе усиливаетъ послѣднюю ¹⁾.

Ангидридные формы бѣлковъ даютъ съ минимальнымъ количествомъ ѣдкой щелочи только весьма слабую біуретову реакцію, жидкость отъ первой капли разведенной мѣдной соли, даетъ едва замѣтную красноту и цвѣтъ уже отъ второй, третьей капли переходитъ въ сине-фіолетовый и чисто-голубой; гидратная форма того же бѣлка—его пептонъ обнаруживаетъ интензивную біуретову реакцію, при чемъ пепсиновый пептонъ даетъ болѣе сильную реакцію, чѣмъ триптонъ. Хотя реакція пептоновъ иногда бываетъ весьма сильною, но она кажется слабою сравнительно съ реакціею настоящаго біурета.

Реакція послѣдняго существенно отличается отъ той же реакціи пептоновъ еще и тѣмъ, что только съ первымъ удается получить мѣдное соединеніе въ видѣ кирпично-краснаго кристаллическаго тѣла, обуславливающаго при своемъ раствореніи характеръ „біуретовой реакціи“.

Біуретовая реакція свойственна всѣмъ безъ исключенія, бѣлковымъ и бѣлковиннымъ тѣламъ съ тѣмъ однако-же различіемъ, что одни даютъ ее прямо, другія послѣ известной обработки. Въ этомъ отношеніи біуретовая цвѣтная реакція бѣлковъ рѣзко отличается отъ другихъ цвѣтныхъ реакцій, напр. миллоновой. Есть

¹⁾ Біуретовая цвѣтная реакція была предложена для количественнаго опредѣленія бѣлковъ, особенно пептоновъ, колориметрическимъ путемъ. Но я долженъ прямо отрицать пригодность этого способа. Не говоря уже о томъ, что въ жидкостяхъ организма встрѣчаются продукты распада бѣлковъ, сохранившіе біуретовую реакцію, подобныя тѣла образуются при всякомъ протрагированномъ опытѣ пищеваренія желудочнымъ или поджелудочнымъ соками. Наконецъ ангидридные формы бѣлковъ и особенно разнородности пропептоновыя подъ вліяніемъ щелочей легко измѣняютъ интензивность своей біуретовой реакціи, что можетъ произойти во время самаго колориметрическаго опредѣленія.

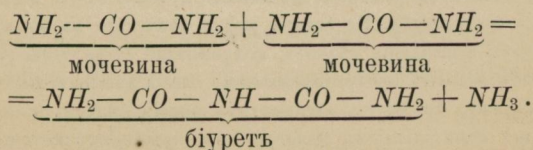
напримѣръ рядъ бѣлковыхъ тѣлъ не дающихъ миллоновой реакціи или реакціи Адамкевича, или съ соляной кислотой, или петенкофера, и ни какая обработка не въ состояніи вызвать въ нихъ эту реакцію. Напротивъ, нѣтъ такого бѣлка или бѣлкообразнаго тѣла въ составѣ тканей животнаго организма (кромѣ развѣ хитина), которое подъ вліяніемъ разведенныхъ кислотъ, или щелочей, или ферментовъ не могло бы проявить біуретову реакцію, если оно ее раньше не обнаруживало.

Сомнѣнія нѣтъ въ томъ, что каждая цвѣтная реакція бѣлковъ зависитъ отъ присутствія въ частицѣ опредѣленной атомной группы болѣе или менѣе сложной. Миллонова реакція, напр. зависитъ отъ ароматической группы или отъ нѣсколькихъ ароматическихъ группъ, потому что еще не выяснено точно участіе иныхъ группъ, кромѣ тирозиновой въ произведеніи этой реакціи. Мы еще не знаемъ отъ какихъ атомныхъ группъ зависятъ реакціи Адамкевича и фіолетовая съ соляной кислотой, потому что до сихъ поръ не были получены продукты распада бѣлковъ, дающіе эти реакціи ¹⁾.

Также точно и біуретовая реакція бѣлковъ неизбѣжно должна зависѣть отъ присутствія въ частицѣ совершенно опредѣленной атомной группы вполне отличной отъ группъ атомовъ, обусловливающихъ остальные цвѣтныя и инныя реакціи бѣлковъ. Разяснить строеніе этой ограниченной группы атомовъ, ея отношенія къ сосѣднимъ группамъ, и ея значеніе въ частицѣ составляетъ чрезвычайно интересную тему и задачу настоящей статьи.

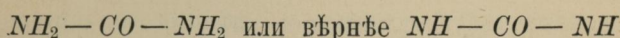
Прежде нежели мы займемся этой атомной группой бѣлковой частицы, необходимо выяснитъ вопросъ, какая группировка и какихъ именно элементовъ обладаетъ вообще свойствомъ давать такую реакцію съ мѣдью.

Строеніе біурета весьма просто какъ и его происхожденіе изъ мочевины



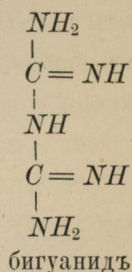
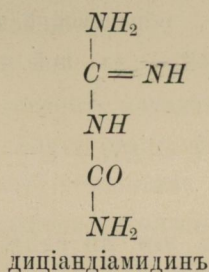
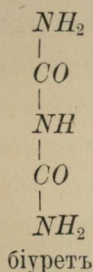
¹⁾ Во время печатанія настоящей статьи появились указанія по этому предмету со стороны Залковского.

Гораздо сложнее вопросъ отъ какихъ именно атомовъ біуретовой частицы зависитъ способность послѣдней давать свою характерную реакцію съ мѣдью. Не смотря на громадную аналогію строенія мочевины и біурета, первая не даетъ ни слѣда красной реакціи со щелочью и солью мѣди. Отсюда мы должны съ увѣренностью заключить, что группа атомовъ



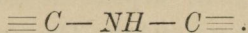
въ бѣлковой частицѣ въ такомъ именно видѣ существовать не можетъ.

Изучая ближе эту реакцію и ея распространеніе, мы встрѣчаемъ хотя и не длинный рядъ тѣлъ, дающихъ ее почти въ одинаковой степени. Сопоставляя раціональныя формулы этихъ тѣлъ



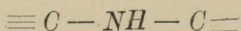
мы встрѣчаемъ въ нихъ нѣкоторыя черты общія и другія — отличныя. Прежде всего мы замѣчаемъ, что атомы или группы атомовъ, соединенныя съ углями двойною связью могутъ быть различны и это ничуть не вліяетъ на общую способность вещества давать біуретову реакцію. Такъ какъ по отношенію къ мѣди группы (O) и (NH) невозможно идентифицировать между собою, то остается принять, что группы эти, состояція каждая съ однимъ углемъ въ двойной связи, для произведенія самой реакціи не существенны. Также точно реакція не можетъ зависѣть отъ концевыхъ группъ (NH₂) потому, что тогда множество тѣлъ и прежде всего сама мочевина, заключающія эти группы часто въ положеніи весьма сходномъ съ положеніемъ ихъ въ біуретѣ — давали бы біуретову реакцію; между тѣмъ на дѣлѣ этого нѣтъ. Ни мочевины, ни амидокислоты, ни кислото-амиды, ни смѣси этихъ типовъ

не даютъ ни слѣда этой реакціи. Остается еще предположить, что характеръ реакціи зависитъ отъ группы (NH), стоящей между двумя углями, т. е. отъ атомной группы



Это предположеніе тѣмъ болѣе кажется вѣроятнымъ, что красное мѣдное соединеніе, обуславливающее внѣшній видъ біуретовой реакціи съ мѣдью, образуется замѣщеніемъ водорода имидной группы (NH) мѣдью. Но, подобную группировку атомовъ съ имидной группой между двумя углями мы встрѣчаемъ въ довольно большомъ числѣ тѣлъ, которыя тѣмъ не менѣе „біуретовой реакціи“ съ мѣдью не даютъ. Приведу нѣсколько примѣровъ.

Какую бы формулу строенія не принимать для амидодициановой кислоты — $C_2H_3N_3O$ —, образующейся при кипяченіи дицианамиды съ баритовой водой, — въ ней неизбѣжно должна находиться группа:



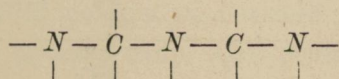
и тѣмъ не менѣе вещество это ни слѣда біуретомѣдной реакціи не даетъ.

Далѣе эта реакція не свойственна дициандiamиду, въ которомъ подобная группа атомовъ должна находиться.

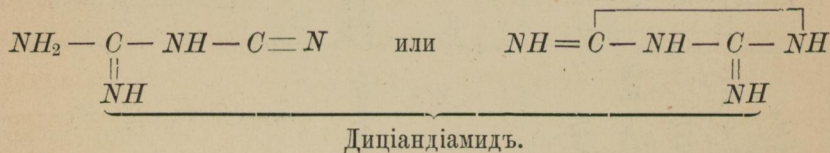
Таже группа атомовъ встрѣчается въ мочевоѣ кислотѣ и ея производныхъ, аллоксанѣ, аллоксантинѣ, аллантоинѣ, оксалуровой кислотѣ и друг., но ни одно изъ этихъ тѣлъ не даетъ съ мѣдью біуретовой реакціи, хотя нѣкоторые изъ нихъ и держатъ гидроксидъ мѣди въ щелочномъ растворѣ. Растворъ этотъ имѣетъ при всякомъ количествѣ гидроксиды мѣди чисто синій или голубой цвѣтъ. Также точно біуретовой реакціи не даютъ гуанинъ, кофеинъ, гидантоинъ, въ которыхъ такая группа атомовъ также существуетъ. Наконецъ креатинъ, креатининъ, гуанидинъ, заключающіе подобную же группировку также не даютъ этой реакціи.

Этихъ примѣровъ совершенно достаточно, чтобы отрицать за группой $\equiv C-NH-C\equiv$ или $\equiv C-N-C\equiv$ способность давать красную реакцію съ мѣдью.

Остается стало быть принять, что данная реакція зависитъ отъ всего комплекса азотовъ и углей, находящихся въ выше указанныхъ трехъ веществахъ и дающихъ біуретовую реакцію въ сильнѣйшей и типичнѣйшей степени во всѣхъ отношеніяхъ. Этотъ комплексъ атомовъ, отбросивши изъ него всѣ очевидно не существенные элементы, представится намъ въ видѣ цѣпи перемѣжающихся атомовъ азота и углерода:



Въ этомъ комплексѣ атомовъ характерной чертой должно признать ординарную связь между ними. Эта простая связь и даетъ возможность среднему азоту образовать имидную группу, водородъ которой способенъ замѣщаться металломъ. Но, что въ одной этой имидной группѣ не лежитъ причина внѣшнихъ качествъ реакціи, что родъ связей между углями и азотами имѣетъ тутъ значеніе, доказывается не способностью дициандіамида дать эту реакцію съ тѣмъ же внѣшнимъ характеромъ.



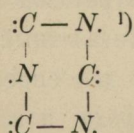
Двѣ нижеслѣдующихъ таблички представляютъ оголенные углеазотные комплексы съ тою взаимною связью между атомами, съ которою они существуютъ въ различныхъ тѣлахъ. Въ табличкѣ верхней представлены раціональныя формулы тѣлъ, а въ нижней — ихъ углеазотные комплексы.

Дающія біурет. реакц.			Не дающія біуретовой реакціи.							
$ \begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{CO} \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{CO} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{C} = \text{NH} \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{CO} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{C} = \text{NH} \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{C} = \text{NH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{NH} \\ \\ \text{C} \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{C} = \text{O} \\ \\ \text{NH} \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{NH} \\ \\ \text{C} \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{C} = \text{NH} \\ \\ \text{NH} \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{CO} \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{CO} \\ \\ \text{OH} \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{CO} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{CO} \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{CO} \\ \\ \text{OH} \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{CO} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{CO} \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CO} \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{CO} \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{CO} - \text{NH} \\ \quad \\ \text{CO} \quad \text{CO} \\ \quad \\ \text{CO} - \text{NH} \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{CO}_2 - \text{NH} \\ \\ \text{CO} \\ \\ \text{CO} - \text{NH} \end{array} $
Біуретъ.	Диціан-діамидинъ.	Дигуанидъ.	Амидодиціановая кислота.	Диціандіамидъ.	Аллофановая кислота.	Гликолилоаллофановая кислота.	Мочевина.	Барбитуровая кислота.	Аллоксанъ.	Гидантонинъ.
$ \begin{array}{c} \text{N:} \\ \\ \text{C:} \\ \\ \text{N:} \\ \\ \text{C:} \\ \\ \text{N:} \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{N:} \\ \\ \text{C:} \\ \\ \text{N:} \\ \\ \text{C:} \\ \\ \text{N:} \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{N:} \\ \\ \text{C:} \\ \\ \text{N:} \\ \\ \text{C:} \\ \\ \text{N:} \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{N:} \\ \\ \text{C:} \\ \\ \text{N:} \\ \\ \text{C:} \\ \\ \text{N:} \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{N:} \\ \\ \text{C:} \\ \\ \text{N:} \\ \\ \text{C:} \\ \\ \text{N:} \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{N:} \\ \\ \text{C:} \\ \\ \text{N:} \\ \\ \text{C:} \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{C:} \\ \\ \text{C:} \\ \\ \text{N:} \\ \\ \text{C:} \\ \\ \text{N:} \\ \\ \text{C:} \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{N:} \\ \\ \text{C:} \\ \\ \text{N:} \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{C:} \\ \\ \text{N:} \\ \\ \text{C:} \\ \\ \text{N:} \\ \\ \text{C:} \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{C:} - \text{N:} \\ \quad \\ \text{C:} \quad \text{C:} \\ \quad \\ \text{C:} - \text{N:} \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{C:} - \text{N:} \\ \quad \\ \text{C:} \quad \text{C:} \\ \quad \\ \text{C:} - \text{N:} \end{array} $

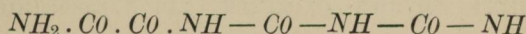
Изъ сопоставленія этихъ углеазотныхъ комплексовъ видно, что во 1) биуретовый комплексъ долженъ заключать непременно три азотныхъ и два углеродныхъ атома, во 2) атомы эти въ цѣпи должны чередоваться, въ 3) связь между ними должна быть простая.

Всякое уклоненіе отъ этихъ правилъ уничтожаетъ „біуретовый“ характеръ углеазотнаго комплекса: Такъ, напримѣръ существованіе двойныхъ связей въ амидодициановой кислотѣ, въ дициандиамидахъ; недостатокъ одного азотнаго атома въ аллофановой кислотѣ и ея производныхъ; недостаточная длина углеазотной цѣпи въ мочевилахъ и ея производныхъ.

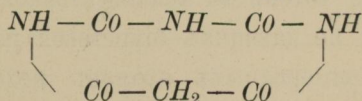
Наоборотъ, если цѣпь углеазотная изъ правильно чередующихся членовъ длиннѣе цѣпи біурета, то типъ и отношеніе къ мѣди въ щелочной жидкости можетъ въ большей или меньшей степени сохраниться. Вотъ почему, напр. ціануровая кислота въ щелочномъ растворѣ удерживаетъ гидрокись мѣди въ растворѣ и окрашивается въ фіолетовый цвѣтъ. Въ этой кислотѣ (получаемой изъ мочевины) есть основаніе принять углеазотный комплексъ такого строенія;



Также точно оксалилдимочевина:

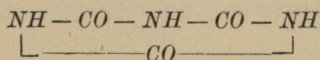


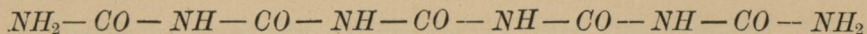
и малобіуровая кислота (или малонилбіуретъ):



даютъ отличную біуретовую реакцію, потому что содержатъ полностью углеазотный комплексъ біурета со всѣми его выше приведенными типичными признаками. Къ этой же категоріи относится и карбонилдибіуретъ:

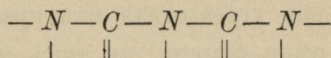
1) Может быть циануровая кислота, образующаяся при нагревании сухой мочевины, есть ничто иное как карбониль бивурет?:





Эти послѣднія тѣла, сложнѣе біурета, тѣмъ для насъ интересны, что показываютъ, что присутствіе въ частицѣ атомныхъ группъ чуждыхъ типичному углеазотному комплексу біурета не мѣшаетъ проявленію характерной реакціи съ мѣдью.

На основаніи всего выше сказаннаго, я вправѣ сдѣлать предположеніе, что въ частицѣ бѣлковыхъ веществъ, дающихъ сильную біуретовую реакцію съ мѣдью, существуетъ комплексъ углеазотныхъ атомовъ тождественныхъ съ комплексомъ настоящаго біурета, а именно:



и мнѣ остается привести дальнѣйшія доказательства его присутствія и показать способъ возникновенія этого комплекса въ бѣлковой частицѣ.

Въ самомъ дѣлѣ, многія бѣлковыя тѣла даютъ прямо только слѣды этой реакціи, но подъ вліяніемъ разведенной щелочи на примѣръ, способность къ біуретовой реакціи сильно возрастаетъ. Откуда же берется этотъ углеазотный біуретовый комплексъ въ этихъ случаяхъ? Возможны два способа появленія этой біуретовой группы: 1) Атомы углерода и азота потребные для біуретовой группы подчиняются интрамолекулярному перемѣщенію и изъ иныхъ атомныхъ группъ сходятся для образованія біуретоваго комплекса въ опредѣленномъ мѣстѣ частицы или 2) углеазотный, атомный комплексъ готовъ во всякой бѣлковой частицѣ, но въ бѣлковыхъ видахъ, не дающихъ біуретовой реакціи, этому комплексу азотныхъ и углеродныхъ атомовъ недостаетъ одного или нѣсколькихъ вышеозначенныхъ типичныхъ признаковъ углеазотной цѣпи настоящаго біурета. Всѣ ниже изложенные факты да и теоретическое обсужденіе способовъ, подъ вліяніемъ которыхъ наблюдается появленіе въ бѣлкахъ біуретовой реакціи, дѣлаютъ невозможнымъ принятіе перваго предположенія.

Напротивъ, второе предположеніе кажется теоретически болѣе вѣроятнымъ и дѣйствительно подтверждается и разъясняется при изученіи фактовъ.

Мы видѣли раньше три типическія черты, свойственныя угле-азотному комплексу настоящаго біурета. Предполагая весь угле-азотный комплекс готовымъ во всякой бѣлковой частицѣ, мы этимъ самымъ признаемъ удовлетворенными первое и второе требованіе, т. е. что готовый комплексъ содержитъ въ правильномъ чередованіи три азотныхъ и два углеродныхъ атома. Но мы видѣли на примѣръ, что комплексы углеазотныхъ атомовъ, вполне удовлетворяющихъ этимъ требованіямъ, еще не способны къ біуретовой реакціи, если не удовлетворяютъ третьему требованію, т. е. если связи между атомами комплекса не вездѣ простыя.

Принявъ пока это предположеніе, мы должны будемъ признать, что при превращеніи какого либо ангидриднаго бѣлка въ его гидратную форму, напр. въ его пептонъ, въ углеазотномъ комплексѣ перваго происходитъ мѣстами или повсемѣстно переходъ отъ двойныхъ связей между атомами азота и углерода къ простымъ. Такой переходъ возможенъ, само собою разумѣется, только при томъ условіи, если освобождающіяся сродства атомовъ могутъ быть насыщены посторонними атомами, т. е. если къ этой углеазотной группѣ произойдетъ присоединеніе новыхъ элементовъ или группъ элементовъ. Дѣйствительно, всѣ безъ исключенія химическіе случаи развитія біуретовой реакціи въ бѣлкахъ, первоначально не проявлявшихъ ея, сводятся къ условіямъ гидратации, т. е. присоединенія элементовъ воды. Нѣтъ ни одного ангидриднаго бѣлковаго вещества, которое бы давало отчетливую біуретовую реакцію, такъ точно, какъ нѣтъ гидратной бѣлковой формы, которая бы не давала болѣе или менѣе сильной реакціи. Эта послѣдняя развивается въ бѣлковыхъ тѣлахъ при ихъ переходѣ въ пептонъ лишь постепенно. Это легко проверить, сравнивая *caeteris paribus* силу этой реакціи надъ истиннымъ ангидриднымъ бѣлкомъ, на примѣръ міозиномъ, затѣмъ надъ ацидальбуминомъ, пропептонами и пептонами. Чѣмъ ближе къ пептону, тѣмъ реакція становится интенсивнѣе при одномъ и томъ же количествѣ вещества. Нагрѣваніе съ очень разведенными кислотами и щелочами приводитъ ангидридные формы бѣлковъ къ тому же результату. То же самое наблюдается при разжиженіи нерастворимыхъ первона-

чально бѣлковъ въ періодъ гвіенія ихъ. Всѣ эти факты не оставляютъ сомнѣнія въ томъ, что развитіе біуретовой реакціи въ бѣлковой частицѣ есть прямое слѣдствіе гидратаціи, направленной на самую углеазотную группу, потому что, если бы присоединеніе элементовъ воды въ описанныхъ случаяхъ произошло только въ другихъ доляхъ частицы по мимо углеазотной группы, то послѣдняя осталась бы безъ измѣненія и не могла бы обусловить появленія біуретовой реакціи, какъ она не можетъ ее вызвать, находясь въ ангидридномъ бѣлѣ. Объяснить же появленіе біуретовой реакціи лишь тѣмъ, что вслѣдствіи совершившейся гидратаціи бѣлковое вещество стало вообще растворимымъ, — невозможно, потому что и ангидридные бѣлки все же легко растворяются въ щелочахъ, пропептоны и того легче, а глутинъ, напримѣръ, растворимъ даже въ тепловатой водѣ, а тѣмъ не менѣе всѣ эти вещества даютъ сравнительно съ пептонами лишь крайне слабыя біуретовыя реакціи.

Что развитіе біуретовой реакціи бѣлковъ есть прямое слѣдствіе гидратаціи подтверждается и обратными явленіями. Если сухой пептонъ нагрѣть выше $110-120^{\circ}$ и подержать массу нѣкоторое время при этой температурѣ, то часть пептона становится нерастворимою въ водѣ и эта часть послѣ своего растворенія безъ нагрѣванія въ очень разведенной содѣ даетъ ничтожной силы біуретовую реакцію. Масса пептона при этомъ теряетъ въ вѣсѣ, стало быть нерастворимая часть есть продуктъ дегидратаціи части пептона. Въ 1881 году ¹⁾ я первый показалъ возможность перехода пептона и триптона въ пропептоновыя и альбуминовыя формы и притомъ безъ сильнаго нагрѣванія пептоновъ, что всегда ведетъ къ распаденію, къ разложенію части вещества. Образующіеся пропептоны и альбуминъ показываютъ сравнительно съ первоначальнымъ пептономъ лишь слабыя біуретовыя реакціи и притомъ продукты превращенія пептоновъ по мѣрѣ приближенія своего къ формѣ альбумина лишь постепенно теряютъ силу біуретовой реакціи. Въ всѣхъ этихъ продуктахъ превращенія пептоновъ легко возстанавливается интензивная біуретовая реакція подъ вліяніемъ нагрѣванія съ очень разведенною щелочью.

¹⁾ Archives des sciences phys. et naturelles. T. VI — VII. 1881 — 1882 и Журналъ Русск. Химич. Общ. С.-Петербургъ 1878 года.

Описанные факты вмѣстѣ съ тѣмъ показываютъ и на то важное обстоятельство, что частица бѣлковая какъ при развитіи въ ней способности давать біуретовую реакцію, такъ и при обратномъ исчезаніи послѣдней, остается цѣлою, т. е. ни въ томъ, ни въ другомъ случаѣ не происходитъ никакихъ разщепленій частицы, никакой потери какой либо доли частицы. Если бы при гидратаціи или пептонизаціи бѣлокъ терялъ какую либо часть свою, то очищенный пептонъ былъ бы неспособенъ вернуться въ первоначальное состояніе. Превращеніе ангидриднаго бѣлка въ пептонъ и послѣдняго обратно — на примѣръ въ альбуминъ, возможно произвести множество разъ надъ одною и тою же массою вещества, если для альбуминизаціи пептона употребить методъ, указанный мною впервые, а не перегрѣваніе выше 140° или нагрѣваніе съ уксуснымъ ангидридомъ ¹⁾. Развитіе пептона можетъ быть остановлено на стадіи пропептона и сила развитія біуретовой реакціи также останавливается, не достигая силы этой реакціи въ пептонѣ. Тоже замѣчается и при обратномъ превращеніи бѣлковъ. Отсюда слѣдуетъ, что переменны, происходящія въ бѣлковой частицѣ при превращеніяхъ ея въ обѣихъ направленіяхъ, ограничиваются лишь нѣкоторыми атомными группами. Что углеазотная группа частицы, отъ которой зависитъ способность бѣлка къ біуретовой реакціи, подвергается подобнымъ переменамъ не подлежитъ сомнѣнію (хотя нельзя на этомъ основаніи утверждать и факты, изложеніе которыхъ здѣсь неумѣстно ²⁾), не допускаютъ принять, что пептонизація и альбуминизація основаны лишь на переменнахъ въ одной углеазотной группѣ бѣлковъ).

И такъ развитіе біуретовой реакціи въ бѣлковыхъ тѣлахъ есть слѣдствіе гидратаціи и притомъ интрамолекулярной.

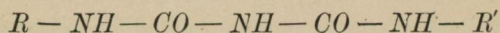
Послѣдняя происходитъ стало быть надъ углеазотнымъ комплексомъ ангидридныхъ бѣлковъ, не имѣющимъ еще вида біуретоваго

¹⁾ Heuninger. De la nature et du rôle des peptones. Paris 1878.

Hoffmeister. Zeitschr. f. physiol. Chemie. B. 2. 206 p.

²⁾ Факты эти подробно изложены въ моемъ трудѣ: Etudes sur l. constitutions des saletawes albumin. Ark. d. sciences phus. et natur. Geneve, Avril et Mai 1881 et Fevrier et Mai 1882.

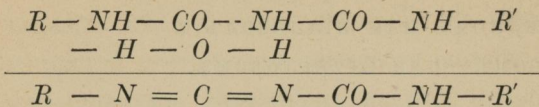
комплекса, хотя и заключающемъ полное и правильно расположенное число азотныхъ и углеродныхъ атомовъ. Мы уже видѣли раньше, что въ этомъ углеазотномъ комплексѣ мѣшающимъ обстоятельствомъ для обнаруженія реакціи съ мѣдью можно предположить небіуретовую связь между атомами комплекса. Факты указываютъ намъ, что одно простое присоединеніе элементовъ воды переводитъ эти небіуретовыя связи въ біуретовыя. Стало быть оба предполагаемыя состоянія одного и того-же углеазотнаго комплекса относятся другъ къ другу, какъ ангидридная форма относится къ гидратной. Такъ какъ намъ одна изъ этихъ формъ именно біуретовая—въ точности извѣстна, то по ней, какъ по формѣ гидратной, мы можемъ сдѣлать выводъ о формѣ ангидридной. Я долженъ здѣсь сдѣлать небольшое отступленіе. До сихъ поръ мы говорили объ углеазотномъ комплексѣ безъотносительно. Въ дѣйствительности же онъ составляетъ малую долю бѣлковой частицы—въ которой онъ находится въ связи съ другими атомными группами. Факты, часть которыхъ будетъ упомянута ниже, другая же часть будетъ предметомъ новаго сообщенія, заставляютъ меня представить этотъ углеазотный комплексъ въ его біуретовомъ (гидратированномъ) состояніи и простѣйшемъ видѣ слѣдующею формулою:



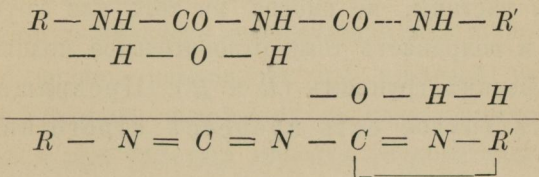
въ которой R и R' обозначаютъ какія либо постороннія, безъ азотистыя атомныя группы.

Кромѣ только что упомянутаго отношенія ангидрида къ гидрату есть еще одно обстоятельство, позволяющее намъ перейти отъ біуретоваго состоянія углеазотной группы къ искомому небіуретовому состоянію ея. Красная мѣдная реакція съ біуретомъ зависитъ, между прочимъ, отъ способности водорода средней имидной группы замѣщаться мѣдью. Если углеазотная группа не даетъ этой реакціи,—то стало быть и имидной средней группы въ ней не существуетъ. На ея мѣстѣ можетъ стоять только азотный атомъ. Если эти разсужденія вѣрны, то отнятіе отъ біуретоваго комплекса бѣлковъ элементовъ воды должно имѣть слѣдствиемъ

ной группы.

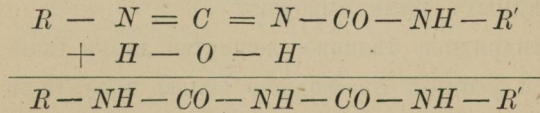


ИЛИ

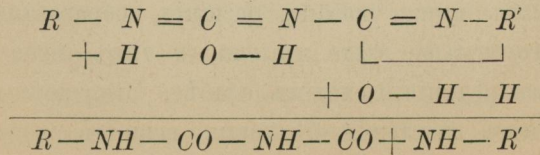


въ ціануровую кислоту.

еть элементы воды и переходить въ біуретовое состояніе:



ИЛИ



На основаніи вышесказаннаго мы можетъ принять въ бѣлковыхъ веществахъ вообще существованіе углеазотнаго комплекса въ двухъ состояніяхъ:

ангидридномъ или ціановомъ и
гидратномъ—или біуретовомъ.

Въ обоихъ состояніяхъ этотъ комплексъ остается на своемъ мѣстѣ внутри частицы, не смотря на тотъ или другой ходъ его превращенія и сохраняетъ тоже относительное положеніе и тѣже связи къ сосѣднимъ группамъ (R и R'). Превращеніе одного состоянія въ другое есть процессъ строго интрамолекулярный.

Я уже упоминалъ, что, не смотря на множество сдѣланныхъ мною попытокъ, мнѣ не удалось выдѣлить изъ пептона углеазотный комплексъ въ формѣ біурета. Я имѣю основанія надѣяться, что я буду счастливѣе въ попыткахъ выдѣлить изъ бѣлковъ ангидридную или ціановую форму того-же углеазотнаго комплекса. Факты, добытые мною до сихъ поръ, подають надежду получить его не въ такомъ именно видѣ какъ представлено выше, но въ формѣ его дериватовъ—вѣроятно тѣхъ изъ группы меламина.

Невозможность полученія біурета изъ пептона зависитъ оттого, что эта атомная группа имѣетъ большую наклонность къ окончательному распаденію, какъ это мы вскорѣ увидимъ. Прежде нежели мы займемся условіями, химизмомъ и продуктами ея распаденія, я намѣренъ указать на всѣ изученныя мною условія развитія біуретовой группы изъ ціановой въ частицѣ бѣлковыхъ тѣлъ. Эти факты имѣютъ немаловажный фізіологическій и химическій интересъ, а вмѣстѣ съ тѣмъ послужатъ дальнѣйшимъ подкрѣпленіемъ сдѣланныхъ нами выводовъ.

Всякое ангидридное бѣлковое вещество даетъ лишь слѣды красной біуретовой реакціи съ мѣдною солью и то лишь потому, что для производства реакціи употребляется щелочь, которая легко вызываетъ, какъ выше указано, развитіе, образованіе біуретовой группы. Чѣмъ меньше взято щелочи, и чѣмъ ниже температура раствора, тѣмъ реакція выходитъ слабѣе. Высушенные или долго подъ алкоголемъ лежавшія бѣлковыя вещества вовсе не даютъ

этой реакціи, если для растворенія ихъ не нагреваютъ со щелочью. Свеже-осажденные бѣлковыя тѣла ангидриднаго типа всегда даютъ слабую біуретовую реакцію, которая ясно видна при первыхъ лишь капляхъ мѣдной соли. Развитіе въ нихъ біуретоваго состоянія углеазотной группы изъ ціановаго можетъ быть достигнуто различными приѣмами. Критеріемъ полнаго превращенія всѣхъ ціановыхъ группъ даннаго вещества въ біуретовыя можетъ служить достиженіе въ жидкости максимальной силы біуретовой реакціи.

Біуретовая группа развивается изъ ціановой въ бѣлкахъ не только подъ вліяніемъ нагреванія съ разведенными кислотами и щелочами, но и при дѣйствіи многихъ гидролитическихъ ферментовъ, какъ-то: пепсина, трипсина, ферментовъ, извлеченныхъ изъ печени и почекъ. Но наиболѣе полное превращеніе происходитъ при комбинированномъ дѣйствіи на бѣлковыя и бѣлковинныя вещества гидратаціонныхъ и редукаціонныхъ условий.

Такъ, напр. нагреваніе съ 3⁰/о—5⁰/о—7⁰/о NaHO дѣйствуетъ гораздо сильнѣе и быстрѣе, если въ горячую смѣсь опустить куски цинка и желѣза, вслѣдствіе чего начинается умѣренное развитіе водорода, на счетъ разлагающейся гальваническими токами воды, кислородъ которой окисляетъ цинкъ.

Также точно и 5⁰/о сѣрная или соляная кислота дѣйствуетъ значительно полнѣе и скорѣе, если въ нагреваемой смѣси лежить цинкъ.

Пепсинъ развиваетъ болѣе сильную біуретовую реакцію въ бѣлкахъ, чѣмъ трипсинъ.

Примѣчаніе. Дѣйствіе ферментовъ какъ въ этихъ такъ и во всѣхъ послѣдующихъ опытахъ изучалось при условіяхъ полнаго исключенія возможности загниванія, прибавленіемъ къ смѣсямъ либо борной, либо салициловой, либо бензойной кислотъ.

Сѣрная кислота до 20—25⁰/о, при нагреваніи съ бѣлками постепенно усиливаетъ ихъ біуретовую реакцію, доводитъ до извѣстнаго максимума и долго удерживаетъ ее на этой высотѣ.

30—45⁰/о сѣрная кислота при 60⁰—70⁰ также сперва усиливаетъ эту реакцію, но не доводитъ ее до того же максимума и при дальнѣйшемъ нагреваніи начинаетъ ее ослаблять.

50—65% сѣрная кислота при 70° быстро усиливаетъ біуретовую реакцію, затѣмъ наступаетъ короткій періодъ колебаній ея силы, переходящій скоро въ періодъ быстрого ослабленія и окончательнаго исчезанія реакціи.

Наконецъ, нагрѣваніе бѣлковъ съ концентрированной сѣрною кислотою вовсе не усиливаетъ біуретовой реакціи ихъ и чрезъ короткое нагрѣваніе при 100—110° продукты обработки теряютъ всякую способность какимъ бы то ни было способомъ возстановить хотя бы слѣды этой реакціи.

Изъ этого очерка градивнаго дѣйствія сѣрной кислоты ясно видно, что біуретовая группа можетъ начать образовываться, достигнуть максимума развитія въ бѣлковой частицѣ и затѣмъ разрушиться. Видно, что развитіе этой группы тѣмъ полнѣе, чѣмъ полнѣе условія гидратациі среды, что разрушеніе начинается подъ вліяніемъ кислоты большей крѣпости и наконецъ видно, что при отсутствіи условій гидратациі (при дѣйствіи концентрированной кислоты) ціановая группа разрушается, не превращаясь вовсе напередъ въ біуретовую.

Что постепенное исчезаніе біуретовой реакціи въ растворѣ бѣлковаго вещества есть слѣдствіе постепеннаго распада біуретоваго углекислотнаго комплекса даннаго бѣлка, не требуетъ поясненій послѣ всего вышеприведеннаго.

Особенно поучительно дѣйствіе 30—40% сѣрной кислоты. Подъ ея вліяніемъ біуретовая реакція достигаетъ большой силы и при дальнѣйшемъ нагрѣваніи эта реакція довольно быстро ослабляется. Если развитіе реакціи зависѣло отъ гидратациі, которой подверглась углекислотная группа ангидриднаго бѣлка, то и ослабленіе реакціи и разрушеніе біуретоваго комплекса мы не можемъ не приписать тому же химическому процессу, потому что химическія условія среды остались буквально тѣми же. Стало быть таже гидратациа, которая въ началѣ образуетъ біуретовую группу изъ ціанистой, — при дальнѣйшемъ дѣйствіи разрушаетъ ее.

И въ этихъ случаяхъ замѣчается, что присоединеніе къ вліянію гидратациі вліянія водорода *in st. nasc.* значительно ускоряетъ разрушеніе готоваго біуретоваго комплекса.

Напримѣръ, 5% сѣрная кислота при 75—80° одна, слабо развиваетъ біуретовую группу изъ ціановой, съ прибавленіемъ же цинка развитіе біуретовой реакціи идетъ быстро впередъ. Также точно одна 5 или 10% кислота при 75—80° почти не ослабляетъ біуретовой реакціи, но если прибавить къ жидкости цинкъ или желѣзо—реакція явственно начинается убывать и скоро можетъ быть доведена до очень слабой степени.

Еще рѣзче это наблюдается при нагрѣваніи со щелочами. 5—10% ѣдкая щелочь съ присоединеніемъ цинка и желѣза развиваетъ интензивную біуретовую реакцію, которая при дальнѣйшемъ дѣйствіи этихъ агентовъ начинается ослабляться, т. е. біуретовая группа разрушается, чего почти не дѣлаетъ нагрѣваніе съ одною щелочью.

Разрушеніе біуретоваго углеазотнаго комплекса въ частицѣ бѣлка имѣетъ громадную біологическую важность. Одинъ взглядъ на эту группу атомовъ показываетъ, что она должна находиться въ самыхъ близкихъ генетическихъ отношеніяхъ ко всѣмъ тѣмъ азотистымъ продуктамъ метаморфоза, которые очень характерны для животнаго организма, а именно: къ мочевины, мочевои кислотѣ, веществамъ ей близкимъ, креатину и другимъ. Хотя нѣтъ твердыхъ основаній отрицать существованія въ бѣлковой частицѣ иныхъ азотныхъ атомовъ кромѣ заключенныхъ въ ея біуретовой группѣ, но сомнѣнія не можетъ быть въ томъ, что такихъ постороннихъ азотныхъ атомовъ въ частицѣ крайне мало и что громадное большинство азота принадлежитъ именно разсматриваемому углеазотному комплексу. Доказательствомъ этому можетъ служить слѣдующій опытъ: нѣкоторое количество пептона было нагрѣваемо на водяной банѣ въ ретортѣ съ 8—10% ѣдкою щелочью, при удержаніи первоначальнаго объема, до тѣхъ поръ, пока еще съ водяными парами отдѣлялось замѣтное количество амміаку. Такая дестилляція продолжалась въ сложности болѣе 50 часовъ. Не смотря на потерю нѣкотораго количества азота, остатокъ давалъ біуретовую реакцію большой интензивности. Стало быть, выдѣлявшійся при дестилляціи азотъ не могъ всецѣло принадлежать біуретовому комплексу, который разрушается одною

щелочью крайне медленно. Съ другой стороны количество азота, которое можетъ быть изгнано изъ бѣлковой частицы при нагрѣваніи съ 10⁰/о щелочью составляетъ едва $\frac{1}{5}$ долю всего азота. Поэтому можно допустить, что только очень небольшая часть азота поставлена въ частицѣ внѣ біуретоваго комплекса.

При такихъ условіяхъ генетическія отношенія біуретоваго комплекса бѣлковъ къ мочевины и мочевой кислотѣ, въ формѣ которыхъ выдѣляется изъ организма почти весь метаморфозированный азотъ бѣлковъ, являются несомнѣнными. Такъ какъ эти выдѣлительныя вещества содержатъ въ себѣ только части біуретоваго углеазотнаго комплекса, то послѣдній, присущій бѣлкамъ, долженъ напередъ распасться, чтобы дать начало нѣкоторымъ атомнымъ группамъ, входящимъ въ составъ мочевины, мочевой кислоты и другихъ тѣлъ.

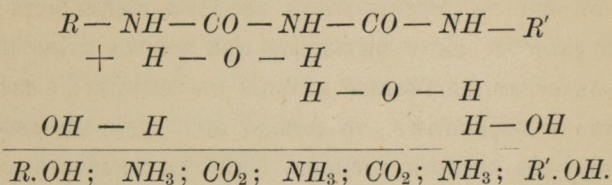
Вотъ почему крайне интереснымъ является вопросъ о химизмѣ распада біуретовой углеазотной группы бѣлковъ и о натурѣ ближайшихъ продуктовъ этого распада.

Распаденіе біуретоваго комплекса въ бѣлковой частицѣ и соответствующее этому ослабленіе біуретовой реакціи происходитъ въ большей или меньшей степени не только при нагрѣваніи пептоновъ съ разведенными кислотами и щелочами, одними или въ присутствіи насцированного водорода, но также и при продолжительномъ воздѣйствіи пищеварительныхъ ферментовъ. Во всѣхъ этихъ случаяхъ процессъ распада этой группы несомнѣнно сводится на дальнѣйшую гидратацию ея.

Теоретическій разборъ возможнаго хода гидратациі этой группы прямо указываетъ какого рода продукты могутъ при этомъ образоваться. Прибавляя максимальное количество воды до полного насыщенія всѣхъ разрозненныхъ атомовъ углеазотной группы, мы видимъ, что весь углеродъ послѣдней долженъ перейти въ CO_2 , а весь азотъ — въ NH_3 .

Эти продукты въ дѣйствительности и получаютъ, напр. при разрушеніи біуретовой группы 40 — 65⁰/о сѣрною кислотою при 70⁰. Изъ смѣси въ извѣстный моментъ начинаетъ выдѣляться углекислый газъ, а изъ жидкости по окончаніи опыта получается боль-

шое количество сѣрноаммоніевой соли. Органическіе же продукты бѣлка ни при какихъ условіяхъ не даютъ и слѣдовъ біуретовой реакціи. Для образованія этихъ окончательныхъ продуктовъ распада къ углеазотной группѣ должно присоединить значительное число частицъ воды



Одновременное образованіе угольной кислоты и амміака позволяетъ предположить, что эти продукты могли бы образовать, при благопріятныхъ условіяхъ карбаминовую кислоту, вещество, имѣющее для организма большой интересъ.

Разрушеніе углеазотной группы бѣлковъ сѣрной кислотой представляетъ условіе явно неблагопріятное для образованія карбаминовой кислоты, потому что послѣдняя неустойчива въ присутствіи минеральныхъ кислотъ. Можно было надѣяться получить ее изъ бѣлковъ при разрушеніи біуретовой группы въ щелочной средѣ. Такой способъ упомянуть уже выше, состоитъ въ нагрѣваніи бѣлковаго вещества съ 10% ѣдкою щелочью въ присутствіи пластинокъ цинка и желѣза и онъ дѣйствительно далъ ожидаемый результатъ. Нагрѣваніе продолжаютъ на водяной банѣ въ колбѣ до тѣхъ поръ, пока въ пробахъ по временамъ извлекаемыхъ изъ колбы, *caeteris paribus*, замѣчаютъ начало ослабленія біуретовой реакціи. Отфильтрованную и охлажденную жидкость осторожно насыщаютъ разведенною сѣрною кислотю (1:5) до удержанія слабо щелочной реакціи, упариваютъ на водяной банѣ до жиденькаго сиропа и извлекаютъ 80—90% алкоголемъ. Алкогольную вытяжку можно привести осторожнымъ прибавленіемъ разведенной алкоголемъ сѣрной кислоты къ слабо, кислой реакціи и оставляютъ при возможно низкой температурѣ сутки или двое, фильтруютъ, фильтратъ на водяной банѣ упариваютъ до почти полного удаленія алкоголя и остатокъ употребляютъ для пробъ на карбаминовую кислоту. Проба эта дѣлается такимъ образомъ:

Два—три куб. центим. густаго раствора разводятъ 1—3 объемами дистиллированной воды, прибавляютъ 2—3 капли амміаку, 5—6 капель средней концентраціи раствора хлористаго кальція и сильно взбалтываютъ много разъ въ теченіи полчаса или часа при комнатной температурѣ. Если въ жидкости есть готовая угольная кислота, то она въ теченіи этого времени выдѣляется въ формѣ углекислой извести. Если фильтратъ при новомъ взбалтываніи, или новомъ количествѣ хлористаго кальція въ теченіи $\frac{1}{4}$ часа остается совершенно прозрачнымъ, то можно быть увѣреннымъ, что вся готовая угольная кислота удалена. Свѣтлую жидкость нагреваютъ. Уже при слабомъ нагреваніи жидкость мутнѣетъ и скоро выдѣляетъ обильное количество полукристаллическаго или кристаллическаго осадка, состоящаго по точномъ изслѣдованіи изъ углекислой извести. Промытый осадокъ выдѣляетъ съ кислотами углекислый газъ, а съ щавелевымъ аммоніемъ даетъ щавелевую известь. Реакція основана на томъ, что карбаминовая соль натрія или аммонія при нагреваніи разлагается и освобождаетъ углекислый газъ. Это разложеніе идетъ особенно быстро и полно въ присутствіи солей кальція, съ которыми угольная кислота и соединяется въ нерастворимое тѣло.

И такъ, при разрушеніи біуретовой группы бѣлковъ въ щелочной средѣ, карбаминовая кислота несомнѣнно образуется и удерживается таковою. Но если мое предположеніе, что карбаминовая кислота есть непремѣнный переходный членъ между біуретовымъ комплексомъ бѣлка и конечными его продуктами вѣрно, то и при разрушеніи этого комплекса въ кислой средѣ карбаминовая кислота должна образоваться и тотчасъ же распасться съ образованіемъ углекислаго газа. По этому въ такой кислой средѣ именно въ періодъ развитія карбаминовой кислоты и стало быть ослабленія біуретовой реакціи съ мѣдью, должна освобождаться угольная кислота. Опыты построенные съ этою цѣлью подтвердили это ожиданіе. При нагреваніи пептона съ 5% сѣрною кислотой съ прибавленіемъ цинка, въ періодѣ усиленія біуретовой реакціи газы, отведенныя изъ колбы въ известковую или баритовую воду не измѣняютъ послѣдней; но когда біуретовая реакція достигла мак-

симума или еще лучше въ періодѣ ея ослабленія газы, освобождающіеся въ жидкости содержатъ значительное количество угольной кислоты, которая быстро мутитъ каждую свѣжую подставляемую порцію известковой воды.

Біуретовая группа бѣлковъ способна не только образоваться изъ ціановой подѣ вліяніемъ ферментовъ, пепсина, трипсина, фермента, находящагося въ печени и почкахъ, но и распасться при ихъ болѣе продолжительномъ дѣйствіи при 30—35°. И въ этихъ случаяхъ распаденіе ея совершается по тому же типу какъ и подѣ вліяніемъ кислотъ и щелочей. Въ жидкости, гдѣ происходитъ дѣйствіе ферментовъ на бѣлковыя вещества первоначально нѣтъ ни слѣда карбаминовой кислоты. Ея нѣтъ и въ періодѣ усиленія біуретовой реакціи. Слѣды ея можно найти, когда біуретовая реакція нѣкоторое время держится на максимальной высотѣ и наконецъ количество ея возрастаетъ, когда интензивность біуретовой реакціи начинаетъ уменьшаться. Это явленіе замѣчается при всякой реакціи среды, такъ какъ ферменты и сами могутъ дѣйствовать лишь въ присутствіи весьма слабой кислоты не разрушающей карбаминовую кислоту.

Для облегченія опыта нѣтъ надобности извлекать карбаминовую кислоту алкоголемъ, пробу можно дѣлать непосредственно въ опытной жидкости.

Изъ всего выше сказаннаго видно, что образованіе карбаминовой кислоты на счетъ углеазотнаго біуретоваго комплекса бѣлковой частицы не можетъ подлежать сомнѣнію. Затѣмъ, какъ теоретическій разборъ хода реакціи, такъ и условія, при которыхъ она въ различныхъ случаяхъ происходитъ позволяетъ съ увѣренностію считать весь процессъ—гидратаціей.

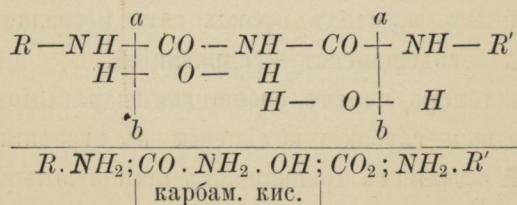
Мы имѣемъ теперь передъ собою два гидратаціонныхъ процесса, производящихъ глубокія измѣненія въ строеніи бѣлковой частицы: первый изъ нихъ превращаетъ ціановую группу ангидридныхъ бѣлковыхъ видовъ въ біуретовую форму, причемъ бѣлки становятся растворимыми въ водѣ; второй — разрушаетъ цѣлость біуретовой группы бѣлковой частицы и тѣмъ самымъ разрушается цѣлость послѣдней. Послѣ полнаго исчезанія біуретовой реак-

ции, какими бы слабыми агентами это не было достигнуто, в жидкости нет больше ни следа бѣлка или пептона и никакими дегидратационными средствами эти тѣла не могутъ быть возстановлены.

Извѣстно, что фізіолого-химики издавна недоумѣваютъ, почему бѣлковыя вещества, распадаясь внутри организма, выдѣляютъ почти весь свой азотъ въ формѣ мочевины, мочевой кислоты, а при распаденіяхъ въ организмѣ большая часть азота является въ формѣ амидокислотъ, которыхъ именно нормальный организмъ не образуетъ?

Я полагаю, что имѣю въ рукахъ факты, позволяющіе уяснить причину этой разницы.

Въ выше приведенныхъ схематическихъ формулахъ, представляющихъ одну лишь долю бѣлковой частицы, буквы R и R' обозначаютъ безъазотныя атомныя группы различныхъ составовъ. Большая часть этихъ группъ однако же намъ знакомы въ формѣ различнаго рода амидокислотъ, которыя бѣлковыя вещества способны образовать при своихъ распаденіяхъ внѣ организма. Къ этимъ тѣламъ принадлежатъ гликоколь, алланинъ, буталланинъ, лейцинъ, глутаминовая, аспарагиновая кислоты, тирозинъ, амидофеноль и друг. R' и R представляютъ ихъ безъазотистые остатки. Чтобы появиться въ видѣ азотистыхъ веществъ—амидокислотъ, они свой азотъ могутъ получить только изъ примыкающаго къ нимъ въ бѣлковой частицѣ біуретоваго углеазотнаго комплекса. По этому при образованіи амидокислотъ при непремѣнномъ участіи воды распаденіе бѣлка должно произойти по линіямъ $a-b$.



При этихъ условіяхъ, какъ видно изъ данной схемы можетъ образоваться вполнину меньше карбаминовой кислоты, чѣмъ если бы вся біуретовая группа превратилась въ этотъ продуктъ. На

самомъ дѣлѣ распадъ бѣлковъ съ образованіемъ карбаминовой кислоты (геср. CO_2) наблюдается двоякаго рода.

Въ одномъ случаѣ, когда распадъ бѣлковаго вещества совершается одною лишь гидратаціей, напр. при нагрѣваніи до 70° съ 40—60% сѣрною кислотою до полного исчезанія біуретовой реакціи, когда углеазотная группа прежде своего разрушенія проходитъ стадій біуретоваго состоянія, амміачныхъ солей въ жидкости образуется немного, потому что значительная, если даже не большая часть азота отходитъ въ появляющіяся всегда при этой обработкѣ въ огромномъ количествѣ амидокислоты, какъ то: гликоколь, глутаминовую кислоту, лейцинъ, тирозинъ, смотря по натурѣ взятаго бѣлковаго вещества. Ходъ реакцій этого распада приведенъ въ предъидущей схемѣ.

Въ другомъ случаѣ, когда вмѣстѣ съ гидратаціей на частицу дѣйствуетъ и наспированный водородъ, все равно производится ли гидратація нагрѣваніемъ съ кислотой или со щелочью—амидокислотъ вовсе не образуется и карбаминовая кислота является въ огромныхъ количествахъ. Атомныя группы R и R' въ этомъ случаѣ должны стало быть осводиться въ безъазотномъ состояніи.

Ходъ реакціи распада будетъ здѣсь такой:

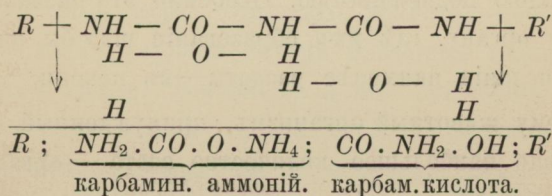


Схема показываетъ, что въ этомъ случаѣ происходитъ присоединеніе атомовъ водорода и это новое условіе позволяетъ углеазотному комплексу бѣлковъ совершенно избѣжать образованія амидокислотъ, процесса котораго стремимся избѣжать и нормальный животный организмъ. Важное значеніе этихъ фактовъ становится яснымъ, если вспомнить слѣдующія твердо установленныя въ наукѣ положенія: 1) что азотъ амміачныхъ солей принятыхъ организмомъ появляется въ мочѣ въ видѣ мочевины или мочевой кислоты и 2) что карбаминовый аммоній, согласно опытамъ Дрек-

селя, при извѣстныхъ условіяхъ способенъ перейти въ мочевины и что кровь содержитъ карбаминую кислоту.

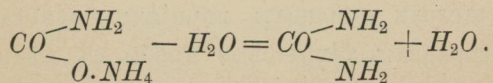
Отсюда слѣдуетъ, что карбаминная кислота и аммиакъ могли бы быть разсматриваемы какъ переходныя фазы между бѣлкомъ и мочевиной, если бы было доказано, что весь, или почти весь азотъ бѣлка способенъ появиться въ формѣ этихъ тѣлъ. Это доказательство дано настоящимъ сообщеніемъ. Выше описанные два типа распаденія углеазотнаго комплекса бѣлковъ показываютъ намъ химизмъ, который примѣняется и самимъ животнымъ организмомъ, чтобы вывести азотъ разрушенныхъ бѣлковъ въ видѣ мочевины, а не въ видѣ амидокислотъ болѣе сложныхъ органическихъ группъ. Выводъ азота въ видѣ амидокислоты не выгоденъ организму во многихъ отношеніяхъ, а именно: во 1) организмъ теряетъ съ ними большое количество способнаго къ горѣнію органическаго вещества; во 2) амидокислоты простые и болѣе сложнаго состава представляютъ тѣла вовсе не поддающіяся гидратационному процессу распаденія—процессу играющему громадную роль въ животномъ организмѣ; 3) они не особенно легко и окисляются; 4) они не обладаютъ большою растворимостью, особенно въ щелочныхъ средахъ и стало бы обладать въ тканяхъ организма малою подвижностью. Особенно это оказалось бы вреднымъ такому органу, гдѣ ихъ образованіе шло бы широко, и гдѣ процессы окисленія наименѣе развиты—въ печени.

Вотъ почему животный организмъ, принужденный выводить изъ себя ежедневно наибольшее количество азота—организмъ плотояднаго—выработалъ въ себѣ средства переводить весь азотъ разлагающихся бѣлковъ въ мочевины.

Изъ вышесказаннаго понятно, что образованію карбаминной кислоты и аммиака изъ углеазотной группы бѣлка должно предшествовать превращеніе этой группы въ біуретовую. Это совершается путемъ гидратации ангидридныхъ бѣлковъ и потому всѣ гидратныя формы бѣлковъ, т. е. пептоны содержатъ біуретовую группу готовую. Естественно полагать, что пептоны и суть тѣ бѣлковыя формы, которыя внутри организма подвергаются разрушенію, при чемъ ихъ біуретовыя группы полностью переходятъ

въ карбаминовую кислоту и амміакъ. Для такого полного перехода требуется, какъ мы видѣли комбинированное дѣйствіе гидратациі и редукиці. Есть ли такое мѣсто въ организмѣ, въ которомъ комбинація этихъ двухъ процессовъ могла бы осуществиться и гдѣ бы въ тоже время существовалъ обильный притокъ пептона? Печень представляетъ намъ органъ, въ которомъ сосредоточены всѣ условія для такого сложнаго процесса: 1) къ ней почти исключительно притекають образованные въ организмѣ пептоны; 2) она, по моимъ опытамъ, содержитъ ферментъ, который въ слабо кислой и нейтральной средѣ не только образуетъ біуретовую группу изъ ціановой, но и способенъ разрушить біуретовую группу пептоновъ съ образованіемъ карбаминовой кислоты; 3) въ ней несомнѣнно происходятъ редукиціонные процессы, какъ это видно по образованію въ ней билирубина изъ гематина; 4) она представляетъ единственный органъ, получающій сравнительно ничтожное количество крови богатой кислородомъ; 5) наконецъ опыты Шредера и Соломона показали, что превращеніе амміака въ мочевины совершается именно въ печени.

Такимъ образомъ, въ комбинированномъ дѣйствіи на пептоны или имъ аналогичныя тѣла гидратациі и редукиці, мы находимъ разъясненіе до сихъ поръ открытаго вопроса, почему бѣлковыя вещества при своемъ распадѣ внутри организма отдають весь свой азотъ въ формѣ, напр. мочевины, а внѣ организма — въ формѣ амидокислотъ, рядомъ съ которыми мочевины никогда не является. Конечно, карбаминовый аммоній не есть еще мочевины, но въ виду существованія въ самой даже печени могущественныхъ средствъ способныхъ произвести дегидратацию (напр. образованіе гликогена изъ сахара), невозможно сомнѣваться въ томъ, что эти средства, способны тѣмъ же путемъ превратить и карбаминовый аммоній въ мочевины:



Разница, наблюдаемая въ различныхъ случаяхъ распаденій бѣлковъ, зависитъ стало быть не отъ чего инаго, какъ отъ различія

химическихъ воздѣйствій на частицу. Въ обоихъ выше приведенныхъ случаяхъ гидратация представляетъ главную разрушающую силу, подъ вліяніемъ которой частица распадается на части, но въ присутствіи и отсутствіи насцированного водорода разрывъ связей, какъ показываютъ линіи на предъидущихъ схемахъ хода реакцій, происходитъ на разныхъ мѣстахъ.

Хотя всего вышеизложеннаго и было бы достаточно для доказательства существованія въ бѣлковыхъ веществахъ біуретоваго комплекса атомовъ и его интрамолекулярнаго образованія изъ иной небіуретовой группы, но я считаю не лишнимъ привести еще одинъ рядъ фактовъ, приводящихъ къ тому же результату и уясняющихъ нѣкоторыя новыя стороны дѣла.

Близкое генетическое сродство біурета и мочевины между собою дѣлало вѣроятнымъ, что оба вещества могутъ имѣть одинаковыя отношенія къ одному и тому же агенту или реакціи. Такова реакція мочевины съ бромноватистокислымъ натромъ или проще съ бромистымъ щелокомъ, при чемъ оба вещества разлагаются и изъ мочевины образуется CO_2 , $(H_2O)_2$ и N_2 . Естественно было ожидать, что біуретъ, какъ димочевина, отнесется къ бромистому щелоку подобнымъ же образомъ. Опыты произведенные съ біуретомъ вполне подтвердили это. Для цѣлей настоящаго сообщенія важна лишь качественная сторона реакціи, т. е. что біуретъ при смѣшиваніи его раствора съ бромистымъ щелокомъ при обыкновенной температурѣ разлагается съ освобожденіемъ газообразныхъ CO_2 и N_2 . Но при этой реакціи съ біуретомъ важно то обстоятельство, что посредствомъ красной реакціи его съ мѣдью мы имѣемъ возможность слѣдить за состояніемъ біурета по мѣрѣ развитія его реакціи съ бромистымъ щелокомъ, чего для мочевины мы сдѣлать не можемъ. Въ самомъ дѣлѣ, если къ раствору біурета въ слабой щелочи приливать порціями бромистый щелокъ и по временамъ устраивать біуретовыя пробы съ мѣдною солью, то послѣднія постепенно ослабляются и когда бромистый щелокъ развивается уже мало или вовсе не даетъ газа—то и біуретовая реакція жидкости очень слаба или вовсе отсутствуетъ.

Параллельность обѣихъ реакцій полная и по состоянію одной съ величайшею достовѣрностью можно предсказать состояніе другой. Я произвелъ такіе же опыты съ ціануровой кислотой (полученной нагрѣваніемъ мочевины), которая даетъ съ мѣдною гидроксью аналогичную реакцію. И здѣсь бромистый щелокъ разрушаетъ вещество и рѣзкость реакціи съ мѣдью идетъ вполнѣ параллельно съ остаткомъ неразрушенной ціануровой кислоты. Амидокислоты, какъ это уже извѣстно, и въ чемъ я опытно убѣдился, не разрушаются бромистымъ щелокомъ, даже при легкомъ нагрѣваніи. Въ жидкости не замѣтно развитія и слѣда газа. Отрицательные результаты при этой реакціи мнѣ дали: гликоколь, аланинъ, лейцинъ, аспарагиновая, глутаминовая кислоты и тирозинъ. Напротивъ, ацетамидъ, въ которомъ амидная группа поставлена въ карбоксилъ, даетъ слабое развитіе газа.

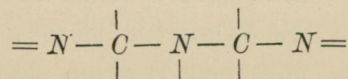
На основаніи этихъ фактовъ я долженъ былъ заключить, что если пептоны дѣйствительно заключаютъ въ себѣ біуретовый комплексъ, то и пептоны должны въ прикосновеніи съ бромистымъ щелокомъ развитъ CO_2 и N_2 , теряя при этомъ свою біуретовую реакцію съ мѣдью. Опытъ подтвердилъ это предположеніе. Мало того, оказалось, что бромистый щелокъ разлагаетъ только такую углеазотную группу бѣлковъ, которая уже находится въ состояніи біуретовомъ. По силѣ біуретовой реакціи съ мѣдью можно впередъ знать дастъ ли данное вещество много или мало газа съ бромистымъ щелокомъ.

Бѣлковыя тѣла промежуточнаго типа между ангидридными и гидратными (пептонами) даютъ ясную, но не сильную біуретовую реакцію и вмѣстѣ съ тѣмъ развиваютъ умѣренное количество газа съ бромистымъ щелокомъ, если же ихъ предварительно нагрѣть съ разведенною щелочью, то обѣ реакціи сильно возрастаютъ.

Если къ раствору ангидриднаго бѣлка въ наименьшемъ количествѣ щелочи прибавлять бромистый щелокъ при комнатной температурѣ по каплямъ, пока еще замѣтно развитіе газа, то можно довести біуретовую реакцію смѣси до очень слабой степени, но достаточно щелочной смѣси постоять полчаса или нагрѣть ее пять минутъ при 40° , какъ обѣ реакціи появляются съ большой силой.

Осторожное прибавленіе бромистаго щелока снова ослабляетъ обѣ реакціи и новое дигерированіе ихъ снова восстанавливаетъ. Это повторяется нѣсколько разъ, съ каждымъ разомъ слабѣе и наконецъ и сильное нагрѣваніе щелочной жидкости болѣе не восстанавливаетъ ни той ни другой реакціи. Описанное явленіе основано на томъ, что бромистый щелокъ не разрушаетъ углеазотныхъ группъ бѣлковой частицы, пока они существуютъ въ вышеупомянутомъ ціановомъ состояніи, изъ котораго путемъ гидратаціи развивается состояніе біуретовое этой группы атомовъ. Правильность предположенія о ціановомъ состоявіи углеазотной группы въ ангидридныхъ бѣлкахъ подтверждается косвенно тѣмъ, что бромистый щелокъ дѣйствительно не способенъ разрушить завѣдомо ціановую группу въ ея соединеніяхъ. Такъ напр. растворы ціанистаго калия, роданистаго калия, нитропруссиднаго натра нисколько не измѣняются отъ приливанія бромистаго щелока и не даютъ слѣдовъ газа. Я долженъ еще прибавить, что бромистый щелокъ относится вышеописаннымъ образомъ не только къ однимъ пептонамъ или пропептонамъ, но и ко всякимъ продуктамъ, произшедшимъ изъ бѣлковъ или пептоновъ путемъ ли распадаенія или окисленія, или редукціи, или гидратаціи, но сохранившимъ въ цѣлости свои біуретовые комплексы.

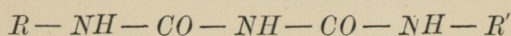
И такъ, изучая состояніе углеазотной группы въ гидратныхъ формахъ бѣлковыхъ тѣлъ, мы находимъ ее способною давать такъ называемую біуретовую реакцію съ гидрокисью мѣди. Эта способность рѣшительно отрицаетъ возможность тождества углеазотнаго комплекса пептона съ углеазотнымъ комплексомъ мочевины. Реакція эта свойственна лишь тѣламъ, углеазотный комплексъ которыхъ имѣетъ такой видъ:



Для этого комплекса существенно: минимальное указываемое схемою число правильно перемежающихся атомовъ азота и угля и простая связи между ними. Укороченіе углеазотной цѣпи или

существованіе двойныхъ связей уничтожаетъ способность давать красную реакцію съ гидрокисью мѣди.

Пептоны даютъ біуретовую реакцію. Выдѣлить въ изолированномъ состояніи біуретъ изъ пептоновъ не удалось до сихъ поръ. Тѣмъ не менѣе біуретовые углеазотные комплексы въ ихъ частицѣ существуютъ. Они не могутъ имѣть формы иной, чѣмъ въ самомъ біуретѣ. Они находятся въ связи съ другими безъазотистыми атомными группами частицы, вѣроятно такъ:



Они образуютъ связующія звенья между этими безъазотистыми группами. Приведенная выше строка или рядъ представляетъ въ простѣйшемъ видѣ частицу пептона. Въ дѣйствительности она много сложнѣе.

Вполнѣ ангидридные формы бѣлковъ не содержатъ готовой біуретовой группы. Она образуется въ ихъ частицѣ интрамолекулярной гидратаціей изъ углеазотной группы, имѣющей тоже число и постановку атомовъ угля и азота, но связанныхъ иначе. Родъ возможной связи ихъ въ ангидридномъ бѣлкѣ указываетъ на ціановый характеръ этой группы: $R - N = C = N - \underset{\text{[]}}{C} = N - R$

Ангидридное или ціановое состояніе углеазотной группы легко переходитъ въ гидратное или біуретовое и обратно.

Углеазотная группа бѣлковъ способна къ распаденію путемъ гидратаціи. Для этаго она обязательно должна пройти состояніе біуретовое. Продуктами распада бѣлковой частицы при разрушеніи біуретовыхъ ея группъ могутъ быть либо CO_2 , NH_3 и амидо-кислоты, либо карбаминовая кислота и амміакъ. Послѣдній продуктъ есть переходъ къ образованію мочевины изъ бѣлковъ. Для перехода всего азота частицы въ карбаминовый аммоній (и стало быть въ мочевины) необходимо участіе редуціонныхъ условій при разрушеніи углеазотныхъ группъ бѣлковъ.

