

ОБЪЯСНЕНИЕ КОЛЛОИДАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ БЕЛКОВЫХ ТЕЛ¹⁾.

Жак Леб ([†]).

I.

Живое вещество в основе своей—коллоидальной природы. Мы не можем себе представить ни одного организма, состоящего только из кристаллоидов. Этот факт заставляет нас признать, что особенные свойства коллоидального состояния обуславливают жизненные явления или связаны с ними неразрывно. Поэтому систематическое изучение сущности истинных жизненных явлений должно быть основано на научной теории состояния коллоидальных веществ. Теория, состоящая из простых предположений, или предположений, основанных только на качественных опытах, не является, по нашему мнению, научной теорией. Под научной теорией мы понимаем вывод следствий из рациональных математических формул, которые позволяют определить коллоидальные свойства с адекватной точностью.

Белковые тела представляются нам амфотерными электролитами, которые могут образовывать соли как с кислотами, так и со щелочами. Со щелочами получают *Na*-, *Ca*-протеинат, с кислотами—протеинхлорид, протеинсульфат и т. д. Выступает ли белок в качестве аниона, или катиона, это зависит от концентрации водородных ионов в растворе. Однако существует определенная концентрация водородных ионов, при которой белковое тело не соединяется заметным образом ни с кислотой, ни со щелочью. Эту концентрацию водородных ионов называют изоэлектрической точкой белка. Ее положение специфично для каждого белкового тела. Для желатины и казеина она лежит при $p_H = 4,7$ ²⁾, для кристаллизованного яичного альбумина при $p_H = 4,8$. Желатина может соединяться с кислотой только в том случае, когда p_H меньше 4,7, а со щелочью только при p_H , большем 4,7. То же самое можно видеть при действии различных солей. Если прибавить к раствору

¹⁾ Die Naturwissenschaften, Heft 12, стр. 213. 23 марта 1923 г.

²⁾ p_H —логарифм концентрации водородных ионов, взятый с обратным знаком. Таким образом, по предложению Зеренсена, характеризуется концентрация водородных ионов.

желатина $NiCl_2$, то Ni -желатинат образуется только тогда, когда p_H больше 4,7, а при прибавлении $K_4Fe(CN)_6$ образуется соединение с ферроцианом только при p_H , меньшем 4,7. Справедливость этого можно показать посредством известных методов, о которых я говорил в моей последней книге¹⁾.

Доказательство способности белковых тел соединяться стехиометрически с кислотами и основаниями можно получить из кривых титрования. Для этого (как, может быть, и вообще для всех работ в области белков) белок в качестве исходного материала должно брать при p_H = его изоэлектрической точке. Мы уже видели, что белковые тела соединяются с кислотами только при p_H , меньшем, чем p_H изоэлектрической точки, которая для желатины и казеина лежит при p_H = 4,7, а для кристаллизованного яичного альбумина при p_H = 4,8. Слабые двух- и трех-основные кислоты диссоциируют при p_H ниже 4,7, как одноосновные. При этих условиях H_3PO_4 образует H^+ и одновалентный анион $H_2PO_4^-$. Если кислота соединяется стехиометрически с изоэлектрическим белком, то надо полагать, что для того, чтобы привести к одной и той же высоте концентрацию водородных ионов, скажем p_H = 3,0 — желатины, казеина или яичного белка нужно взять в три раза больше cm^3 0,1 *n* (нормального раствора) H_3PO_4 , чем 0,1 *n* соляной или азотной кислоты. Опыт подтверждает этот вывод. Иначе обстоит дело с серной кислотой. Она отщепляет оба водородные иона и при p_H < 4,7. Поэтому нужно взять одинаковое количество cm^3 0,1 *n* серной или соляной кислоты, чтобы привести 1%-ый раствор изоэлектрического белка на ту же p_H = 3,0. Опыт подтверждает и это положение. Рис. 1 представляет кривые титрования для кристаллизованного яичного белка с четырьмя кислотами: HCl , H_2SO_4 , H_3PO_4 и щавелевой кислотой. При титровании 1 г изоэлектрического белка находился в 100 cm^3 воды, смешанной с различными количествами 0,1 *n* кислот. Количества cm^3 0,1 *n* кислоты, содержащейся в 100 cm^3 раствора, отложены на ординате кривых, на абсциссе отложены величины p_H , которые

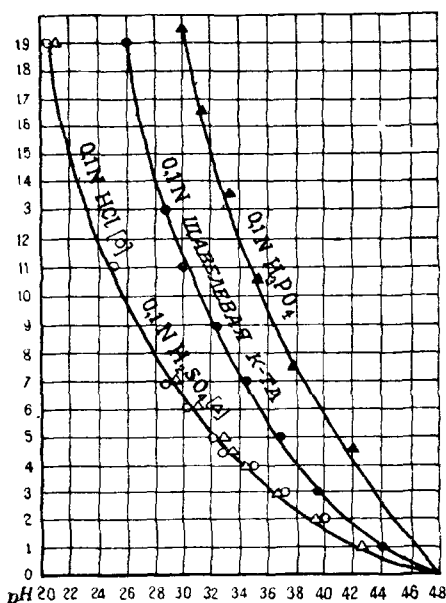


Рис. 1. Кривые титрования кристаллизованного яичного белка с соляной, серной, щавелевой и фосфорной кислотой.

Рис. 1 представляет кривые титрования для кристаллизованного яичного белка с четырьмя кислотами: HCl , H_2SO_4 , H_3PO_4 и щавелевой кислотой. При титровании 1 г изоэлектрического белка находился в 100 cm^3 воды, смешанной с различными количествами 0,1 *n* кислот. Количества cm^3 0,1 *n* кислоты, содержащейся в 100 cm^3 раствора, отложены на ординате кривых, на абсциссе отложены величины p_H , которые

¹⁾ Loe b, J. Proteins and the theory of colloidal behavior. New-York and London 1922.

принимают белковые растворы после прибавления кислоты. Для того, чтобы привести 1 г изоэлектрического белка в объеме 100 см³ на ту же самую степень p_H , каждый раз нужно взять точно в три раза более см³ 0,1 н раствора H_3PO_4 по сравнению с количеством соляной или серной кислоты. Для того, чтобы 1%-ый раствор первоначально изоэлектрического альбумина привести к $p_H=3,2$, нужно, чтобы 100 см³ раствора содержали 5 см³ 0,1 н раствора соляной кислоты и 15 см³ 0,1 н раствора фосфорной кислоты. Чтобы тот же самый белок привести к $p_H=3,4$, требуется 4 см³ 0,1 н раствора соляной или серной кислоты и 12 см³ 0,1 н раствора фосфорной кислоты и т. д.

По Гильдебранду (Hildebrand), щавелевая кислота при $p_H \leq 3,0$ одноосновна, но тем легче отщепляет второй водородный ион, чем больше растет p_H выше 3,0.

Кривые титрования показывают, что для того, чтобы привести наш раствор изоэлектрического белка на ту же самую $p_H < 3,0$, нужно взять почти вдвое больше 0,1 н раствора щавелевой кислоты, чем соляной, а для установления реакции на $p_H > 3,0$ необходимо брать не удвоенное по сравнению с соляной количество 0,1 н раствора щавелевой кислоты, а меньше.

Подобным же образом можно показать с помощью кривых титрования, что изоэлектрический белок соединяется со щелочами так же по стехиометрическим законам, как соединялась бы с теми же щелочами какая-нибудь слабая кислота, хотя бы уксусная. Если количество см³ 0,1 н раствора едкого натра, кали, известковой или баритовой воды в том же объеме 100 см³, необходимых для приведения 1%-го раствора изоэлектрического белка на одинаковую p_H , отложить на ординате, а соответствующие p_H белкового раствора — на абсциссе, то получается, что соответствующие величины для всех четырех щелочей лежат на одной кривой. Этого и следовало ожидать, если соединение происходит строго по стехиометрическим правилам.

Подобные же, говорящие за существование стехиометрических отношений, данные можно привести, по автору, для казеина и желатинины и, по Гичкоку (Hitchcock), для эдестина и сывороточного глобулина. Едва ли можно сомневаться, что подобные же отношения будут найдены и для всех белковых тел. Отсюда следует, что белковые тела реагируют с кислотами и основаниями точно так же, как аморфные кристаллоиды, наприм., аминокислоты. Если бы представители коллоидной химии применяли к своим растворам белков методы определения концентрации водородных ионов, то никому и в голову не пришла бы мысль, что реакции белков с кислотами и щелочами следуют вместо стехиометрических правил эмпирическим адсорбционным изотермам Фрейндлиха (Freundlich).

Чисто химический характер соединения белковых тел с соляной кислотой сказывается также при определении потенциала хлора в рас-

творах протеин-хлоридов. По взгляду Вернера (Werner), при прибавлении соляной кислоты к раствору NH_3 , H -ионы соляной кислоты будут связываться аммонийным ионом, а Cl -ионы останутся свободными. Такой же тип реакции оказывается и при прибавлении соляной кислоты к изоэлектрическому раствору желатины. Это следует из измерения хлорпотенциала в растворах изоэлектрической желатины. Однопроцентные растворы первоначально изоэлектрической желатины содержали в 100 см³ раствора различное количество 0,1 *n* раствора HCl . p_H растворов определялось всякий раз с помощью водородных электродов, а p_{Cl} — с помощью серебряно-хлористых электродов. На p_{Cl} желатина не оказывала никакого действия, тогда как p_H естественно повышалось. Таким образом становится ясным, что часть водорода соединилась с NH_2 - и NH -группами белковой молекулы, хлор же, наоборот, остался свободным (таблица 1). Гичкок получил подобные же результаты с кристаллизованным яичным альбумином, эдестином казеином и сывороточным глобулином. Можно считать, что эти данные имеют силу для большинства, если не для всех белковых тел.

ТАБЛИЦА 1.

$n_{10} HCl$ на 100 см ³ раствора в см ³	Раствор без желатины.		Раствор 1 г изоэлектрической желатины в 100 см ³	
	p_H	p_{Cl}	p_H	p_{Cl}
2	2.72	2.72	4.2	2.68
3	2.52	2.54	4.0	2.53
4	2.41	2.39	—	—
5	2.31	2.29	3.60	2.33
6	2.24	2.26	3.41	2.25
7	2.16	2.18	3.23	2.18
8	2.11	1.12	3.07	2.11
10	2.01	2.01	2.78	2.025
15	1.85	1.85	2.30	1.845
20	1.27	1.76	2.06	1.76
30	1.55	1.59	1.78	1.60
40	1.43	1.47	1.61	1.47

Из кривых титрования вытекает еще и другой факт: соли белковых тел в значительной степени способны гидролитически расщепляться. Если мы прибавим кислоту, хотя бы HCl , к изоэлектрическому белку, то одна часть кислоты связывается с белком, образуя протеин-хлорид, другая же часть остается свободной. Таким образом получается равновесие между свободной кислотой, протеинхлоридом и неионизи-

рованным белком (изоэлектрическим). Чем больше прибавлять кислоты к первоначально изоэлектрическому белку, тем больше образуется протеинхлорида, пока, наконец, вся масса белка не превратится в протеинхлорид. Количество свободной кислоты можно установить измерением pH , и тогда можно получить простым вычислением, сколько ее связано с белком. Насыщением белкового раствора кислотой возможно найти вес соединения белка с кислотой. Turkok нашел таким образом, что вес соединения желатины лежит около 1090.

II.

Коллоидальное состояние белковых тел проявляется в особом действии электролитов — кислот, оснований или солей — на набухание белковых гелей, осмотическое давление и вязкость белковых растворов. Электролиты влияют на эти свойства настолько сходно, что все они

могут быть сведены, по всей вероятности, к одной причине. Если мы объясним одно из этих свойств, например осмотическое давление, то вместе с тем мы поймем и все остальные явления. В наших опытах осмотическое давление определялось в белковых растворах (желатина, кристаллизованный яичный альбумин, казеин и эдестин), которые содержали 1% сухого изоэлектрического белка в 100 см³ воды, к которой было прибавлено в разных случаях различное количество 0,1*n* раствора кислоты. Растворы помещались в мешок из коллодия, а этот последний подвешивался в свободной от белка жидкости, которая при начале опыта приводилась к pH , равной pH соответствующего белкового раствора. Естественно, что кислота для этой цели употреблялась та же самая, которая прибавлялась к рас-

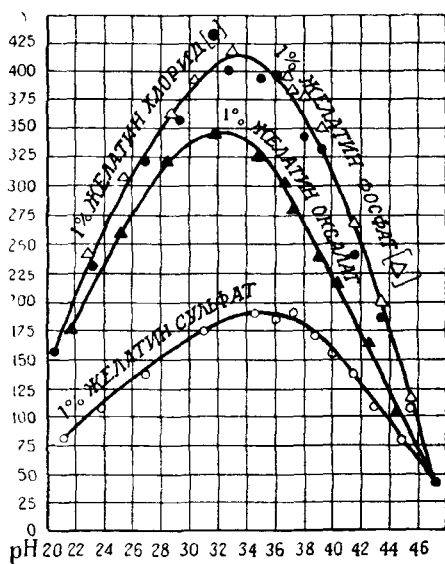


Рис. 2. Изменение осмотического давления белковых растворов под влиянием кислот. Осмотическое давление зависит от pH белкового раствора и валентности кислотного аниона

створу белка. Осмотическое давление определялось 18 часов спустя после установки. Оно зависело характерным образом от pH белкового раствора и валентности кислотного аниона. Кривые рис. 2 доказывают это для растворов желатины. Такие же кривые получаются для других белков, каковы: яичный белок, казеин, эдестин. Кривые показывают, что осмотическое давление белкового раствора имеет свой минимум в изоэлек-

трической точке белка. При прибавлении небольших количеств кислоты осмотическое давление постепенно повышается до максимума, а при дальнейшем прибавлении кислоты снова уменьшается. Далее кривые показывают, что только валентность, но не природа кислотного аниона, оказывает влияние на осмотическое давление белкового раствора. Как мы могли видеть выше из кривых титрования, анион, связанный с белком, у фосфорной кислоты одновалентен, $H_2PO_4^-$, а не PO_4^{---} ; в соответствии с этим и кривые рис. 2 показывают, что влияние на осмотическое давление кислот фосфорной и соляной одинаково, если оно относится к одному и тому же p_H белковых растворов. Затем мы видим, что нисходящая ветвь кривой действия щавелевой кислоты, которая при $p_H < 3$ является одноосновной кислотой, практически совпадает с нисходящей ветвью действия соляной кислоты. Кривая, представляющая действие серной кислоты, почти вдвое ниже кривой соляной кислоты. Из кривых же титрования протеинсульфата мы видели, что анион двухосновен. В результате опытов выяснилось, что все одноосновные кислоты: бромоводородная, азотная, уксусная и т. д. и все слабые двух- и трехосновные кислоты, как винная, малоновая, лимонная, которые при $p_H < 4,7$ диссоциируют, как одноосновные кислоты, и дают такие же кривые, как соляная кислота и фосфорная. Из всего этого мы можем заключить, что только валентность, а не природа кислотного аниона, влияет на осмотическое давление белковых растворов, далее, что по кислую сторону изоэлектрической точки белка все кислоты, ведущие себя, как одноосновные, влияют на осмотическое давление точно так же, как соляная кислота, и что, наконец, это влияние значительно больше, чем влияние сильных двухосновных кислот, какова серная.

Если к изоэлектрическому раствору белка прибавлять щелочь, то можно показать, что малое количество щелочи увеличивает осмотическое давление, при дальнейшем прибавлении давление переходит максимум и снова претерпевает уменьшение. Все одноосновные щелочные катионы, как Li^+ , Na^+ , K^+ , NH_4^+ влияют одинаково; для двухосновных ионов получается то же самое, только кривая действия щелочи при применении Ca^{++} или Ba^{++} лежит почти вдвое ниже, чем при действии одноосновных щелочей.

Наконец, что касается солей, то факты, найденные Лилли, утверждают, что соли всегда понижают осмотическое давление белков.

Кривые действия кислот и солей на осмотическое давление белковых растворов очень схожи с кривыми влияния тех же кислот и солей на набухание и вязкость одинаковых растворов белков. Эти данные очень характерны для коллоидального состояния, и всякая теория коллоидального состояния должна быть в состоянии объяснить получающиеся кривые не только качественно, но и также количественно.

Жигмонди допустил, что влияние кислот на осмотическое давление основывается на изменении дисперсности белка, находящегося

в растворе. Но так как степень дисперсности не может быть точно измерена, то это допущение представляет из себя только умозрение. Оно не дает никакого объяснения, почему вязкость и набухание изменяются подобно осмотическому давлению. Мы должны признать правильным следующее объяснение: если прилить кислоты или щелочи к изоэлектрическому раствору белка, то образуется ионизированная белковая соль из большей или меньшей части белка, смотря по прибавленному количеству кислоты. Эта ионизация обуславливает особенности коллоидального состояния вследствие неспособности белковых ионов диффундировать через перепонки, через которые легко проникают кристаллоиды. Перепонки эти могут быть из коллодиума или пергаменты, ими могут служить стенки кровеносных капилляров, а, вероятно, также и мембраны всех клеток. Далее, если диффузия одного сорта ионов задерживается перепонкой, как это имеет место для коллоидальных ионов, тогда как кристаллоидные ионы проходят без задержки, то в конце концов устанавливается неравномерное распределение способных к диффузии кристаллоидных ионов по обеим сторонам перепонки. Это впервые показал Доннан (Donnan). Неравномерное распределение способных к диффузии ионов есть основание для особенностей коллоидального состояния белковых тел.

III.

Если наполнить мешок из коллодия раствором желатинхлорида при $p_H = 3,0$ и опустить этот мешок в водный раствор соляной кислоты с таким же $p_H = 3,0$, то кислота переходит из белкового раствора во внешнюю свободную от белка жидкость. Основанием для такого неравномерного распределения противоположно заряженных ионов по обе стороны мембраны служит способность мембраны свободно пропускать H - и Cl -ионы и задерживать белковые ионы. Доннан показал на основании принципов термодинамики, что произведения концентрации противоположно заряженных ионов, способных к диффузии, H и Cl в нашем случае одинаковы по обеим сторонам мембраны, если наступило осмотическое равновесие. Если x обозначает молярную концентрацию H -ионов во внешней жидкости, y — молярную концентрацию свободных H -ионов в белковом растворе и z — концентрацию хлорионов, которые связаны с протеином, то равновесие будет определяться следующим уравнением, которое впервые предложили Проктер и Вильсон (Procter и J. A. Wilson) для объяснения влияния кислоты на набухание.

$$x^2 = y(y + z) \dots \dots \dots (1)$$

Если требуется объяснить влияние действия кислот, щелочей и солей на осмотическое давление белковых растворов, то прежде всего должно исследовать, происходят ли изменения осмотического давления вместе с соответствующими изменениями концентраций способных к диф-

фузии ионов во внутренней и внешней жидкости и могут ли быть вычислены эти различия концентраций из уравнения Доннана (1).

Автор мог установить, что такое соотношение существует на самом деле. Для доказательства его необходимо, однако, точно определить потенциалы перепонки, которые устанавливаются при осмотическом равновесии между белковым раствором и водной внешней жидкостью. До сих пор в коллоидной химии на это свойство совершенно не обращали никакого внимания.

Если уравнение Доннана написать следующим образом:

$$\frac{x}{y} = \frac{y + z}{x}$$

то $\frac{x}{y}$ есть мера молярного излишка водородных ионов по отношению к концентрации водородных ионов во внутренней жидкости и $\frac{y + z}{x}$ есть мера для молярного избытка хлорионов во внутренней жидкости по отношению к концентрации Cl^- -ионов во внешней жидкости. Доннан показал, что между внутренним и наружным растворами должна быть разница потенциала, которая при 24° С. достигает $59 \times \lg \frac{x}{y}$ милливольт или $59 \times \log \frac{y + z}{x}$. $\log \frac{x}{y}$ равен p внутренней жидкости минус p_H внешней жидкости. p_H обеих жидкостей легко определить с помощью водородных электродов. $\log \frac{y + z}{x}$ равен P_{Cl} наружной жидкости минус P_{Cl} внутренней жидкости, и обе эти величины могут быть определены титрацией или с помощью $AgCl$ -электродов. С другой стороны, разницу потенциалов между белковым раствором и внешней жидкостью на коллоидумной мембране можно определить прямо с помощью двух идентичных индифферентных каломельных электродов (и насыщенного раствора хлористого калия), пользуясь электрометром Комптона (Compton). Если при помощи уравнения Доннана действительно определяется неравномерное распределение способных диффундировать кристаллоидных ионов (наприм. H^+ и Cl^- в случае желатинхлорида) на обеих сторонах мембраны, то разница потенциалов, которую прямо определяют с помощью идентичных каломельных электродов, должна быть равна разности потенциалов, которую получают в милливольтх из отношения $59 (p_H \text{ внутри} - p_H \text{ снаружи})$ или $59 (p_{Cl} \text{ снаружи} - p_{Cl} \text{ внутри})$.

Величины p_{Cl} или p_H могут быть определены с помощью титрации и подходящего электрометрического приема. Автор поставил такие измерения и нашел, что при прибавлении различных количеств кислоты к изоэлектрическому раствору белков, наприм. кристаллизованного

яичного белка, желатины или казеина, найденный потенциал перепонки всегда согласуется с точностью до 1—2 милливольт с величиной вычисленного из уравнения Доннана, т.е. в пределах ошибок. Из измерения мембранного потенциала следует, во-первых, что находящийся в осмотическом равновесии с внешней жидкостью белковый раствор в мешке из коллодиума, пропускающем ионы кристаллоидов, но не ионы белка, содержит кристаллоидные ионы в иной концентрации, чем внешняя жидкость, и, во-вторых, что эта разница концентраций может быть вычислена из уравнения Доннана.

IV.

Теперь мы в состоянии объяснить кривые изменения осмотического давления рис. 2. Коллоидные химики полагают, что эти кривые обусловлены влиянием кислот на степень дисперсности или на другое какое-нибудь действительное или воображаемое свойство белковых тел. Прежде чем согласиться с таким объяснением, мы должны вспомнить, что кривые, которые передают наблюдаемое осмотическое давление, не есть выражение исключительно осмотического давления протеиновых частичек или молекул и протеиновых ионов, но, кроме того, могут быть вызваны легко доказываемой неравномерностью концентраций кристаллоидных ионов по обеим сторонам мембраны, согласно уравнению Доннана. Другими словами: прежде чем строить гипотезы о причине влияния кислоты, мы должны сделать поправку в измеренном осмотическом давлении на основании уравнения Доннана. Для этой цели мы хотим определить величину этой поправки. Мы начнем с кривой, которая представляет влияние соляной кислоты на осмотическое давление однопроцентного раствора первоначально изоэлектрической желатины. Мы хотим рассмотреть, как распределяются ионы при осмотическом равновесии в белковом растворе и во внешней жидкости, принимая, что электролиты вполне диссоциированы, как желатинхлорид, так и соляная кислота. Пусть будет a — молярная концентрация белковых молекул и ионов, z — концентрация связанных с ионизированным протеином Cl -ионов, y — молярная концентрация водородных ионов свободной кислоты во внутренней жидкости и y же — концентрация Cl -ионов свободной соляной кислоты. Таким образом осмотическое давление белкового раствора определяется следующей формулой:

$$a + 2y + z.$$

Отсюда мы должны вычесть осмотическое давление соляной кислоты во внешней жидкости. Если x есть молярная концентрация H^+ во внешней жидкости, то такова же будет концентрация Cl' . Отсюда следует такое выражение для осмотического давления белкового раствора:

$$a + 2y + z - 2x.$$

Фиг. 3 показывает, каким образом меняется эта величина как функция p_H белкового раствора (т.-е. y). Если мы теперь хотим подогнать к теории влияния соляной кислоты на осмотическое давление белкового раствора, то мы прежде всего должны вычислить величину выражения $2y + z - 2x$ и вычесть ее из наблюдаемого осмотического давления белкового раствора; мы предлагаем назвать эту величину поправкой Доннана. y и x могут быть определены из измерения p_H , так как p_H внутренней жидкости есть $\log y$, а p_H внешней жидкости — $\log x$. z можно вычислить из уравнения Доннана (1)

$$z = \frac{(x + y)(x - zy)}{y},$$

так как мы знаем, что x и y определяются равновесием Доннана. Вычислим теперь величину $2y + z - 2x$ для различных p растворов желатинхлорида (концентрация первоначально изоэлектрической желатины должна быть всегда одна и та же, в нашем случае желатина берется 1%) и отсюда осмотическое давление, которое получается в результате избытка кристаллоидных ионов во внутренней жидкости по сравнению с внешней жидкостью. Мы всегда находим, что вычисленные давления почти совершенно совпадают с наблюдаемыми, т.-е. что увеличение осмотического давления однопроцентного раствора первоначально изоэлектрической желатины при последовательном прибавлении небольших количеств кислоты до максимума и последующее уменьшение осмотического давления при дальнейшем прибавлении кислоты основывается не на каком-либо изменении фактических или гипотетических коллоидальных свойств белка, но исключительно на том, что ионы белка не могут проходить через легко проницаемые для кристаллоидных ионов перепонки из коллодия. Вследствие этого концентрация кристаллоидных ионов должна быть всегда больше во внутренней жидкости, чем во внешней. В связи с изменением p_H раствора желатины изменяется и численное выражение разности $2y + z - 2x$. Это вытекает из уравнения Доннана (1), по которому:

$$x = \sqrt{y^2 + yz}$$

или

$$2x = \sqrt{4y^2 + 4yz},$$

но

$$2y + z = \sqrt{4y^2 + 4yz + z^2}$$

и таким образом ясно, что

$$\sqrt{4y^2 + 4yz + z^2} > \sqrt{4y^2 + 4yz},$$

т.-е. концентрация кристаллоидных ионов во внутренней жидкости — $2y + z$ — всегда больше концентрации соответствующих ионов во

внешней жидкости. Если мы заменим выражение $2y + z - 2x$ поправки Д он на н а тождественным выражением

$$\sqrt{4y^2 + 4yz + z^2} - \sqrt{4y^2 + yz},$$

то будет очевидно, почему осмотическое давление имеет минимум в изоэлектрической точке белка, почему небольшое количество кислот повышает его до максимума, а дальнейшее прибавление снова ведет к уменьшению. На изоэлектрической точке протеин не ионизован, и так как $z=0$, то все выражение

$$\sqrt{4y^2 + 4yz + z^2} - \sqrt{4y^2 + 4yz} = 0,$$

поэтому найденное осмотическое давление на изоэлектрической точке вызывается только белком, оно очень мало ввиду высокого молекулярного веса желатины.

При незначительном прибавлении кислоты, хотя бы соляной, образуется желатинхлорид, и остается немного свободной кислоты вследствие гидролитической диссоциации; поэтому увеличивается как z (концентрация связанных с белком Cl'), так и y (Cl' кислоты свободной вследствие гидролиза), но z сначала растет быстрее, чем y , и потому получается избыток концентрации ионов внутри в сравнении с концентрацией снаружи. Это длится до тех пор, пока большая часть белка не перейдет в протеинхлорид, и тогда избыток ионов во внутренней жидкости будет максимальным. При дальнейшем прибавлении кислоты z увеличивается сравнительно мало, в то время как y возрастает значительно, поэтому z в сравнении с y можно пренебречь. Это объясняет, почему, при дальнейшем прибавлении кислоты, поправка Д он на н а снова равна нулю и почему наблюдаемое осмотическое давление так же низко, как и в изоэлектрической точке белка.

Точно так же можно объяснить действие солей. Предположим, что в мешке из коллодия находится раствор желатинхлорида при $p = 3,0$, к которому мы прибавляем хлористого натра. Тогда z (концентрация Cl -ионов, связанных с желатиной) не увеличится от прибавления соли, а y (концентрация хлоринов, не связанных с желатиной) станет больше. Величина выражения

$$\sqrt{4y^2 + 4yz + z^2} - \sqrt{4y^2 + 4yz}$$

будет все уменьшаться с возрастанием концентрации соли и, наконец приблизится к предельной величине, равной нулю.

Если мы прибавили $NaNO^3$, а не хлорид к раствору желатинхлорида, то мы можем предположить, что в растворе желатины находится желатиннитрат, для которого имеют силу те же самые соображения.

Рис. 3 показывает одновременно кривые осмотического давления и кривые поправки Д он н а н а. Обе кривые поднимаются параллельно от изoeлектрической точки белка до максимума, который для наблюдаемого давления лежит при 450 мм воды, а для кривой поправки Д он н а н а немного ниже. Наблюдаемое осмотическое давление и должно быть выше, чем вычисленное из поправки Д он н а н а, вследствие осмотического давления самих белков. Между $p_H = 4,6$ и $p_H = 3,2$ существует постоянная разница между обеими кривыми, которая исчезает при больших количествах кислоты. Исчезновение разницы при $p_H < 3,2$, по всей вероятности, сводится к тому, что, если p_H слишком мало, то неточность вычисления

второй десятой p_H обуславливает значительную ошибку при вычислении ε . Далее, рис. 3 показывает, что влияние p_H на осмотическое давление исключительно или практически исключительно обусловлено избытком кристаллоидных ионов во внутренней жидкости. Этот избыток устанавливается согласно уравнению Д он н а н а. Осмотическое давление самого белкового раствора или вообще не меняется от прибавления кислоты, или во всяком случае не настолько, чтобы могло быть доступным наблюдению. Таким образом «теории дисперсности», а также и другим

умозрениям о коллоидальном состоянии здесь совершенно нечего объяснять. Такие же результаты получены автором для кристаллизованного яичного белка и казеина, а Гичкоком для эдестина. Мы теперь понимаем, почему только валентность, а не другие свойства иона имеют значение для осмотического давления белковых растворов. Уравнение равновесия для белкового раствора с одновалентным ионом — второй степени, а с двухвалентным ионом — третьей степени. В поправку Д он н а н а входит только валентность иона, но не другие его свойства.

Если теперь мы соединим в одно все эти данные, то сможем установить следующее положение: так называемое коллоидальное состояние белковых растворов, поскольку принимается в расчет осмотическое давление, есть только следствие равновесий, как их понимает классическая

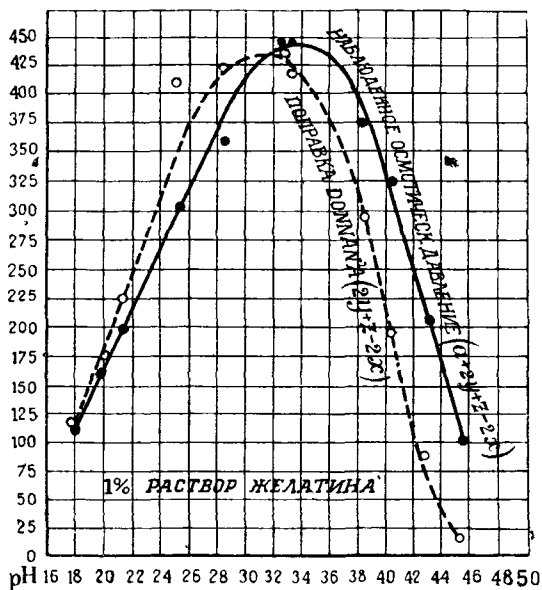


Рис. 3. Влияние соляной кислоты на осмотическое давление белкового раствора и поправка Д он н а н а.

химия. Эти равновесия обусловлены тем, что концентрация кристаллоидных ионов выше в белковом растворе, чем во внешней водной жидкости, благодаря присутствию перепонки, которая пропускает только кристаллоидные, но не белковые ионы. Поэтому коллоидальное состояние белковых тел зависит исключительно от относительной неспособности белковых ионов диффундировать через перепонку, через которую легко проходят кристаллоидные ионы. К таким перепонкам следует отнести большую часть растительных и животных перепонок, и легко себе представить, какую огромную роль должны играть белки при регулировании осмотического давления в организме.

V.

Теперь мы должны коротко показать, что набухание и вязкость белковых растворов под влиянием электролитов меняются подобно осмотическому давлению. Для того чтобы иметь возможность предсказывать результаты опытов, мы будем иметь дело с тем же самым основным свойством, а именно осмотическим давлением. В 1910 году Проктер пришел к гениальному открытию, что разбухание желатины может быть осмотическим процессом. В позднейших работах он совместно с Вильсоном подтвердил количественными опытами эту теорию, выведя рассматриваемые явления из поправки Доннана. Они показали, что разбухание твердого желатинового геля в соляной кислоте может быть количественно объяснено уравнением Доннана, если предположить, что концентрация кристаллоидных ионов (в нашем случае H^+ и Cl^-) снаружи меньше, чем внутри. Действие кислоты на разбухание объясняется повышением осмотического давления внутри геля, согласно требованию эффекта Доннана. Совпадение вычисленных теоретических величин с наблюдаемыми — поразительно.

Автор считает теорию разбухания Проктера и ее экспериментальное подтверждение Проктером и Вильсоном лучшим материалом для познания коллоидального состояния. По своему значению она идет как раз вслед за теорией мембранного равновесия Доннана. Указанные авторы не исследовали только одного, а именно, потенциала перепонки между гелем и жидкостью, находящейся с ним в равновесии. Автор настоящей статьи мог заполнить этот пробел и показал, что наблюдаемая разница потенциалов между гелем и внешней жидкостью с достаточной точностью может быть вычислена из величины p_H геля минус p_H внешней среды посредством логарифмической формулы Нернста.

VI.

Кажется странным, что влияние электролитов на вязкость определенных растворов белка объясняется точно таким же образом, но, повидимому, это верно. По формуле Эйнштейна вязкость водных

растворов белка находится в линейной зависимости от того относительного объема, который занимает растворенное вещество в растворе. Формула эта такова:

$$\tau = \tau_0 (1 - \frac{1}{2} - 2,5\varphi)$$

при чем τ — вязкость раствора, τ_0 — вязкость чистой воды и φ — отношение объемов растворенного тела и растворителя. Если прибавить небольшое количество кислоты к однопроцентному изoeлектрическому раствору желатины, то вязкость раствора повышается. С увеличением кислоты в растворе она достигает максимума и затем снова уменьшается при дальнейшем прибавлении. Отсюда следует, что изменение количества кислоты меняет тот объем, который занимает желатин в воде. Это возможно только в том случае, когда вода абсорбируется белком, и теперь весь вопрос заключается в том, как объяснить абсорбцию воды белком при действии кислоты. По взгляду Паули (Pauli), ионизированный белок окружается водной оболочкой, которая отсутствует у неионизированного белка. Если это предположение правильно, то такое действие кислот наблюдалось бы для всех растворов белков и аминокислот. Автор нашел, что этого не наблюдается для аминокислот и, по крайней мере, для одного белка, а именно кристаллизованного яичного альбумина. Если бы воззрение Паули соответствовало действительности, то последний должен был бы вести себя точно так же, как и желатина. Различие между яичным белком и желатиной заключается в том, что желатина способна образовать твердый гель при невысокой сравнительно температуре, а яичный белок нет. У желатиновых растворов предшествует образованию связного геля возникновение субмикроскопических агрегатов, которые заключают воду и способны набухать. Субмикроскопические частички, образующие предварительную ступень геля, с течением времени увеличиваются в числе и величине. Свое предположение автор доказал исследованием водных суспензий распыленной желатины. Суспензии имеют значительно бóльшую вязкость, чем свежий раствор желатины. Такой результат и следовало ожидать, если правильно предположение, что действие кислоты на вязкость растворов протеинов обусловлено набуханием субмикроскопических частичек. Это хорошо согласуется с очень малой величиной вязкости растворов яичного белка. Последнее явление объясняется отсутствием или крайне малым содержанием мицеля в растворах кристаллизованного яичного белка. Наконец, мы можем найти увеличение вязкости суспензий распыленной желатины от кислоты или щелочи совершенно так же, как находили увеличение разбухания геля или осмотического давления белковых растворов. Вязкости определялись при 20°. Если расплавить суспензию распыленной желатины и затем быстро охладить ее до 20°, то вязкость значительно уменьшится и заметить влияние кислоты больше не удастся. Эти опыты и целый

ряд аналогичных опытов обнаруживают сходство действия электролитов на вязкость растворов желатины с действием электролитов на осмотическое давление белковых растворов. Такое сходство получается потому, что вязкость может быть сведена к изменению состояния набухания субмикроскопических частичек белка. Полное доказательство такому взгляду может быть получено из установления равновесия Доннана между частичками распыленной желатины и окружающим слабым желатиновым раствором.

УП.

Было бы жаль упустить случай показать на примере, как пренебрежение определением концентрации водородных ионов ведет к ошибкам. В 1921 г. Кун¹⁾ напечатал статью, в которой пытался доказать, что различные кислоты одной и той же степени валентности различно влияют на разбухание желатины. Для доказательства этого необходимо исходить из изоэлектрического раствора желатины и сравнивать действие различных кислот на набухание желатины при одной и той же концентрации водородных ионов геля, так как только тогда гель имеет одинаковую концентрацию желатиновых ионов. Кун вообще не измерял p_H своей желатины. Однако вовсе не все равно, — прибавлять ли кислоту к изоэлектрической желатине или к желатине другой p_H . Кун не измерял и p_H геля водородными электродами, а взял концентрацию водородных ионов из таблиц Кольрауша, как если бы дело шло о разведении кислоты в чистой воде и присутствие белка не сменяло бы p_H . Из наших кривых титрования мы знаем, что после прибавления кислоты к изоэлектрической желатине p_H больше, чем после прибавления равного количества кислоты к равному объему чистой воды. Согласно равновесию Доннана также получается, что p_H внутри геля иное по сравнению с наружной жидкостью, но в работе Кун нет ни одного слова о равновесии Доннана. Вследствие всех этих ошибок, концентрации водородных ионов белковых растворов, которые Кун считал равными, были очень различны, а отсюда совершенно понятно, почему он пришел к заключению, что различные одноосновные кислоты различным образом влияют на набухание желатины. Было бы чудом, если бы Кун со своими ошибочными методами хотя бы один раз мог сравнить действие двух различных кислот при одном и том же p_H . Это же самое возражение приходится выставить против подобных же старых опытов с действием электролитов на набухание. Такие опыты заставили приписать различным анионам той же самой степени валентности различное влияние на разбухание (ряды Гофмейстера). При всех этих опытах исследователи не измеряли p_H своего геля и ошибочно сводили действия, вызванные различиями в p_H , на различия кислотных анионов.

¹⁾ Kuhn, A., Kolloidchemische Beihefte, 1921 г., 14, 147.

VIII.

Таким образом мы приходим к заключению, что химия белковых тел не отличается от химии кристаллоидов. Протеины с кислотами и основаниями соединяются по стехиометрическим правилам и образуют электролитически диссоциированные протеиновые соли. Необыкновенно большие белковые ионы и молекулы не могут диффундировать через гель или другие перепонки, легко проникаемые для маленьких кристаллоидных ионов. Поэтому при известных обстоятельствах происходит неравномерное распределение способных к диффузии ионов между белковым раствором и водной наружной жидкостью или между белковым гелем и водным раствором. При этом общая концентрация кристаллоидных ионов в белковом растворе или внутри геля всегда больше, чем в водной наружной жидкости. Этот факт объясняет коллоидальное состояние белковых растворов и гелей. Измерения потенциала перепонки показали, что теория мембранного равновесия *Доннана* правильно передает присутствие некоторого избытка кристаллоидных ионов во внутренней жидкости. Все действия электролитов на набухание, вязкость и осмотическое давление с удовлетворительной точностью выводятся из уравнения *Доннана*, которое представляет из себя не эмпирическую, а теоретическую формулу. Вместе с тем мы устанавливаем, что коллоидальное состояние белковых тел можно объяснить количественно на основании теоретических математических выводов. Так называемая коллоидная химия, которая первоначально производила впечатление новой химии, держится, повидимому, только на пренебрежении условиями равновесия классической химии, по крайней мере, поскольку можно принимать в расчет протеины. Это пренебрежение имело два основания. Во-первых, упущение измерений p_H со стороны представителей коллоидной химии, что создавало полную неопределенность фактора, который представляет важнейшую переменную во всех этих вопросах. Во-вторых, невнимание к потенциалу перепонки белковых растворов и гелей. Отсюда вытекает, что для объяснения коллоидального состояния белковых тел должна быть привлечена теория мембранного равновесия.

Перевел В. Башмаков.