



W 34/57

Nr. inw. 1549

Szafa: 3

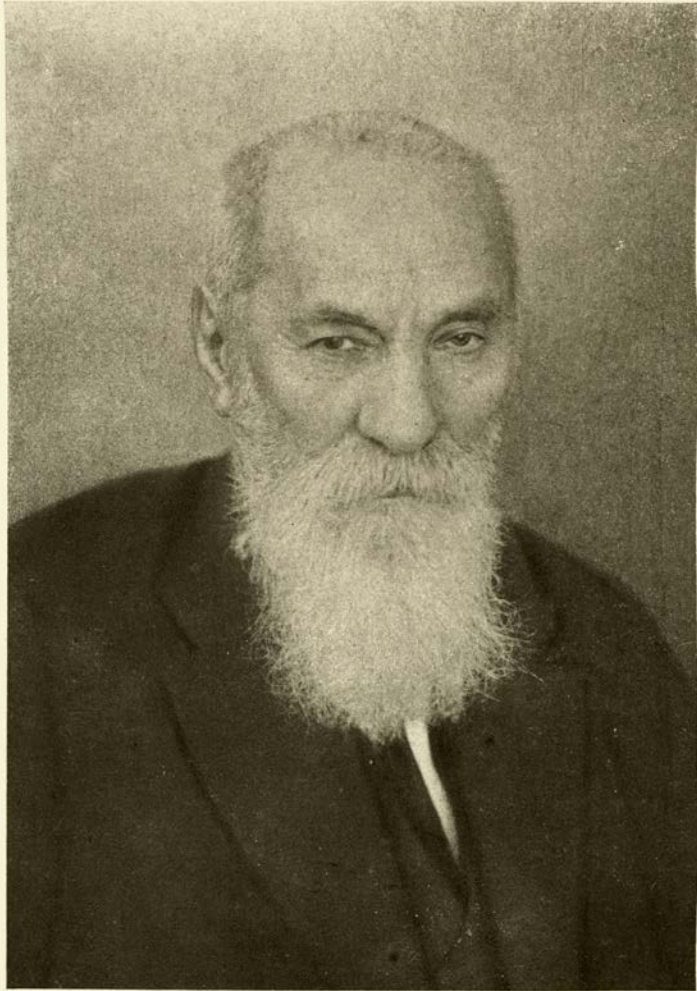
Półka: 6

Podr.









*A Fas*

АКАДЕМИЯ НАУК СССР

---

А.Н.БАХ

СОБРАНИЕ ТРУДОВ  
ПО ХИМИИ  
И БИОХИМИИ

ИЗДАТЕЛЬСТВО  
АКАДЕМИИ НАУК СССР  
МОСКВА·1950

ОТВЕТСТВЕННЫЕ РЕДАКТОРЫ:

*академик А. И. ОПАРИН,*

*академик А. Н. ФРУМКИН*



1549



---

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Цель настоящего издания — сделать доступными широкому кругу советских научных работников труды замечательного русского ученого и общественного деятеля — Алексея Николаевича Баха, основоположника советской биохимии.

Объем его исследований в области биохимии огромен; он охватывает самые общие вопросы этой науки — круговорот азота, углерода, кислорода, баланс энергии при реакциях окисления. Для А. Н. Баха биохимия была всегда в первую очередь наукой о процессах, а не о веществе. Это динамическое понимание биохимии тесно породило А. Н. Баха с современной физической химией и обусловило значение его работ для развития последней.

Труды А. Н. Баха являются замечательным примером последовательного развития материалистического мировоззрения, которое было основой всей его научной деятельности.

Первые работы Алексея Николаевича относились к ассимиляции углекислоты; им была впервые сформулирована точка зрения на фотосинтез как на окислительно-восстановительный процесс. Ее развитие мы находим и в ряде новых исследований по механизму ассимиляции. Эти работы направили внимание Алексея Николаевича на роль перекисей при биологических процессах и привели на следующем этапе к истолкованию химизма процессов дыхания и окисления на основе первичного образования перекисей. Теория медленного окисления Баха, созданная полвека тому назад, явилась ключом к раскрытию механизма процессов, протекающих под действием молекулярного кислорода. На основе большого фактического материала А. Н. Бах пришел к выводу, что активация обычно пассивного молекулярного кислорода связана с образованием перекисей, возникающих при окислении легко окисляющихся веществ. Эта теория полностью выдержала испытание временем; дальнейшие опыты принесли ряд блестящих подтверждений ее основных положений, которые широко используются современной наукой. Следующим шагом было исследование природы окислительных ферментов — катализаторов биологических процессов окисления. Благодаря этим исследованиям перекисная теория, сформулированная первоначально для более простых систем, могла быть распространена на биологические процессы дыхания. В ряде работ им был глубоко разобран механизм других важнейших энзиматических процессов, как, например, явлений сопряженного окисления и восстановления.

После Октябрьской революции создались совершенно новые условия для научной деятельности А. Н. Баха. Он получил все возможности для широкого развития своих работ, для приложения своих идей к решению больших практических задач. За теоретическими исследованиями последовало создание новых методов изучения ферментов. Идеи А. Н. Баха о механизме энзиматических процессов легли в основу

работ по технической биохимии, которые получили такое широкое и плодотворное развитие в Институте биохимии Академии Наук СССР. Понимание этого механизма позволило рационализировать многочисленные производства, связанные с переработкой биологического сырья. Эти результаты явились торжеством теоретических представлений А. Н. Баха.

Вопросы, которыми он занимался, в значительной мере сохранили свою актуальность и в настоящее время, и мы не сомневаемся, что читатель найдет в этой книге не только сводку результатов, характеризующих определенный этап развития химической науки, но и источник идей и представлений, которые могут лечь в основу новых направлений исследования.

В настоящий том вошли все основные труды А. Н. Баха в области химии и биохимии. Первая часть включает обзорные и сводные статьи, в которых А. Н. Бахом освещались определенные этапы развития исследуемых им проблем и подводились итоги отдельных циклов его работ. Вторая часть содержит экспериментальные работы по химии и биохимии, напечатанные за время с 1893 по 1936 гг. Статьи распределены по двум разделам: 1) ассимиляция углекислоты и связывание азота, 2) теория окисления. Третья часть, включающая экспериментальные работы по биохимии, опубликованные с 1902 по 1938 г., содержит три раздела: 1) окислительные процессы в живых организмах, 2) окислительно-восстановительные процессы в живых организмах и 3) количественные показатели ферментов.

В первой части и в каждом разделе второй и третьей частей статьи расположены в хронологическом порядке.

Пребывание А. Н. Баха с 1885 до 1917 г. в эмиграции сделало для него почти невозможным печатание трудов в русских дореволюционных журналах. Статьи «О происхождении перекиси водорода, находящейся в атмосферном воздухе и в атмосферных осадках», «О роли перекисей в процессах медленного окисления» и «Химизм дыхательных процессов» смогли быть напечатаны в «Журнале русского физико-химического общества» только благодаря принципиальной позиции, занятой в этом вопросе редактором журнала, покойным академиком А. Е. Фаворским. Работы А. Н. Баха появлялись поэтому в дореволюционное время по преимуществу в немецких и французских журналах. В настоящем издании они помещены в русском переводе, который был сделан еще при жизни Алексея Николаевича Баха и просмотрен им. Тогда же, при издании его избранных трудов в 1937 г., им было дано распределение статей по отдельным разделам.

*Академик А. Н. Фрумкин*

---

## АЛЕКСЕЙ НИКОЛАЕВИЧ БАХ

Академик А. И. Опарин

Алексей Николаевич Бах родился в небольшом украинском городке Золотоноше в 1857 г.

Еще гимназистом (в Киеве) он связался с революционным подпольем, с которым поддерживал тесную связь и после поступления в Киевский университет. В 1878 г. в связи с так называемыми университетскими «беспорядками» он был административно выслан в Белозерск, где и пробыл в ссылке до 1881 г. По возвращении в Киев он вступил в организацию Народной воли и, вынужденный вскоре перейти на нелегальное положение, продолжал революционную работу в ряде городов царской России. В то время им была написана популярная книжка, посвященная изложению экономического учения Карла Маркса. Книжка эта, напечатанная в подпольной типографии под названием «Царь-голод», получила широкое распространение. После разгрома народовольческой организации А. Н. Бах в 1885 г. эмигрировал за границу и в Париже, в лаборатории профессора Шютценбергера в Коллеж де Франс, он вновь вернулся к научной работе. Позднее, в 1894 г., А. Н. Бах переехал в Швейцарию, где в окрестностях Женевы оборудовал под химическую лабораторию одну из комнат занимаемой им квартиры.

В апреле 1917 г., вскоре после того как в России было свергнуто самодержавие, А. Н. Бах покинул свою тихую лабораторию на берегу Женевского озера и вернулся на родину. Ему было тогда уже 60 лет, но, несмотря на это, он с юношеской энергией начал новый период своей необычайно плодотворной жизни, советский период, который длился почти 30 лет.

В течение всей своей многолетней кипучей жизни А. Н. Бах сумел гармонически сочетать в себе деятельность революционера с деятельностью ученого.

Две великие идеи всегда освещали жизненный путь А. Н. Баха — борьба за лучшее будущее человечества и служение науке. Но до установления советской власти эти две стороны деятельности ученого и революционера были разобщены между собой. «Двенадцать лет я пробыл в подполье, — писал в своих воспоминаниях А. Н. Бах, — и когда я проходил мимо чужой лаборатории и видел пробирки с химическими реактивами, я невольно волновался. Как хотелось мне в эти минуты работать на пользу науки. Когда я был в подполье, я тосковал по научной работе, а когда сидел в лаборатории, я грустил об активной политической работе.

И только Октябрьская революция разрешила мои противоречия, только при Советской власти я смог вдохновляться в своей научной работе, ибо получил возможность посвятить ее социалистическому строительству».

Именно это гармоническое сочетание научной и общественной деятельности, постоянное стремление не только двигать науку вперед, но и возможно быстрее использовать результаты научных достижений на благо

социалистического строительства и является характерной особенностью советского периода творчества А. Н. Баха.

В конце двадцатых — в начале тридцатых годов А. Н. Бах принимал активное участие в объединении лучших, передовых представителей интеллигенции нашей страны для содействия социалистическому строительству. С 1934 г., когда химическая общественность Советского Союза объединилась во Всесоюзное химическое общество им. Д. И. Менделеева, А. Н. Бах был бессменным президентом этого общества.

В знаменательные годы великих сталинских пятилеток Алексей Николаевич живо откликался на важнейшие международные и внутривнутриполитические события. Он ставил перед советской общественностью ряд актуальных вопросов, направленных на дальнейший расцвет советской науки, на единение советской науки и социалистической практики. Особенно большое место в публицистических выступлениях уделял А. Н. Бах вопросам химизации народного хозяйства страны, планированию советской науки, внедрению научных достижений в производство, подготовке высококвалифицированных научных кадров.

В 1927 г. А. Н. Бах избирается членом ЦИК СССР, а в 1937 г. — депутатом Верховного Совета СССР первого созыва и в качестве старейшего депутата открывает первую его сессию.

Огромная общественно-политическая деятельность А. Н. Баха, органически сочетавшаяся с глубочайшими научными исследованиями, высоко оценена всем советским народом. Выражая эту высокую народную оценку научной и общественно-политической деятельности А. Н. Баха, советское правительство наградило его четырьмя орденами Ленина, орденом Трудового Красного Знамени, а в 1945 г. А. Н. Баху было присвоено высокое звание Героя Социалистического Труда.

Научный энтузиазм Алексея Николаевича заражал окружающих и привлекал к нему сердца исследователей. Очень скоро после возвращения на родину около маститого ученого образовалась группа учеников — молодых исследователей, с увлечением работавших над развитием его идей и их приложением в практике социалистического строительства.

В Советском Союзе А. Н. Бах уже не ученый-одиночка, ведущий исследования в своей маленькой частной лаборатории; он получает все возможности для организации ряда крупнейших, известных всему миру научных учреждений: Биохимического института Наркомздрава, Физико-химического института имени Л. Я. Карпова, Института биохимии Академии Наук СССР и других. Уже одно перечисление этих учреждений показывает, как широка и разностороння была научная деятельность А. Н. Баха. Многие области физической и органической химии и биохимии обязаны своим расцветом работам А. Н. Баха и его учеников. Но особенно много труда положил А. Н. Бах на создание и развитие в СССР биохимии. Эта область знания была его любимейшим детищем, и ей он посвятил большинство своих многочисленных экспериментальных работ.

А. Н. Бах создал советскую школу биохимиков, которая сейчас представляет сплоченный и мощный отряд ученых, занимающий почетное место в науке о жизни. Советской биохимии свойственны свои характерные черты развития, свои достижения и устремления.

Для того чтобы понять эти особенности советской биохимии, надо обратиться не только к предшествующему, досоветскому периоду научной деятельности А. Н. Баха, но и к более отдаленным временам в истории развития биохимии. В биохимии постоянно переплетались и взаимно дополняли друг друга два основных направления: статическое — учение о веществах, составляющих живую материю, и динамическое — учение о совершающихся в ней процессах.

Больших успехов динамическое направление в биохимии достигло уже к началу XIX в., когда был заложен фундамент современной биохимии, были установлены два важнейших биохимических процесса — ассимиляция и дыхание — начало и конец тех превращений, которым подвергается органическое вещество в организмах животных и растений. Естественно, что на этой основе возникло стремление глубже проникнуть в сущность совершающихся в организмах явлений, стремление познать детали тех превращений вещества, которые лежат в основе жизни. Этим стремлениям был, однако, в то время положен предел еще очень ограниченным знанием свойств самих изменяющихся в процессе жизни веществ. Не было еще сколько-нибудь отчетливого представления о их строении, а поэтому и суждения о их превращениях в организмах были весьма поверхностными, а нередко даже и ошибочными.

Метод анализа органических соединений при помощи их сжигания широко распахнул двери для изучения строения веществ. Это создало предпосылки для мощного развития статического направления биохимии, которое на время заслонило собой, отодвинуло на второй план изучение биохимического процесса.

Каждый год приносил открытие большого числа все новых и новых углеродистых соединений. Усовершенствование метода анализа этих соединений создало возможность количественно определять их элементарный состав, а в дальнейшем, с развитием общих химических представлений, удалось установить и строение их молекул.

К началу второй половины XIX в., когда химикам удалось глубже взглянуть в строение молекул органических веществ, создались предпосылки для их планомерного синтеза. Работами корифеев органической химии, в особенности работами Зинина, Бутлерова и других, были получены многочисленные органические соединения, входящие в состав живой материи. Этими синтезами было доказано, что образование органических веществ не требует для своего осуществления каких-то сверхматериальных сил, как это думали раньше. А вместе с тем, на основе этих синтезов, изучение отдельных компонентов живой материи достигло решающих успехов.

Таким образом, в конце прошлого века статическое направление в биохимии приобрело господствующее положение. Блестящие достижения химии естественных органических соединений, имеющие громадное самодовлеющее значение, на время заслонили собой, как уже отмечалось нами, биологическую сторону вопроса — познание химических основ жизненного процесса. На почве увлечения успехами органической химии сложилось господствовавшее тогда мнение, что путем изучения отдельных соединений, входящих в состав живых существ, можно познать и самую жизнь. Считали, что если бы нам когда-либо удалось разложить живую клетку на все ее отдельные химические компоненты и с точностью установить все свойства изолированных таким образом индивидуальных химических веществ, то мы познали бы жизнь во всех ее проявлениях.

Однако такого рода упрощенное представление, рассматривающее жизнь только как сумму отдельных компонентов живой материи, является безусловно ошибочным. Попытки пойти по этому пути вскоре привели к горьким разочарованиям. Оказалось, что отдельные органические вещества, изолированные в чистом виде из живой материи, ведут себя в колбах и пробирках химика совсем иначе, чем в живой клетке. Они хотя и могут здесь реагировать в разнообразных направлениях, хотя и обладают колоссальными химическими потенциями, но вне организма используют эти потенции крайне медленно, с исключительно малой скоростью. Если бы химические процессы совершались с такой же скоростью и внутри живых существ, они не могли бы послужить основой для бурно протекаю-

щего явления жизни. Да и самый характер химических превращений, лежащих в основе обмена веществ, их направление представляются совсем иными, чем это можно наблюдать *in vitro*.

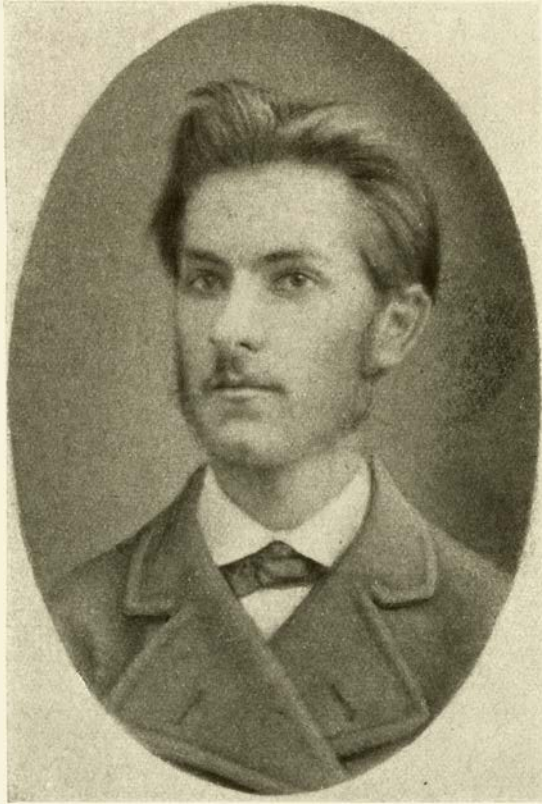
На почве этих противоречий, созданных упрощенным механистическим взглядом на жизнь, как на сумму свойств органических веществ, вновь поднял свою голову витализм. Почему органические вещества ведут себя в организмах иначе, чем вне их? У виталистов был на это готовый ответ: потому что внутри живых существ господствует особая «жизненная сила», которая не подчиняется физическим законам и не может быть познана на материалистических основах. Поэтому химия бессильна приблизить нас к познанию жизни.

В обстановке этих горячих споров между механистами и виталистами начал свою исследовательскую работу Алексей Николаевич Бах. Он сразу безоговорочно встал на путь материалистического познания жизни, но, вместе с тем, он видел также, что своеобразие живого мира в химическом отношении заключается не только в особенности его химического состава. В значительно большей степени оно проявляется в тех бесконечно разнообразных химических превращениях, которые непрерывно совершаются в живых организмах. Как выдающийся ученый-мыслитель А. Н. Бах предвидел, что прогресс нашей науки лежит на пути изучения биохимических процессов, и в течение всей своей жизни он не сходил с этого пути, всегда оставаясь убежденным и воинствующим представителем динамического направления в биохимии.

С самого начала своей исследовательской деятельности А. Н. Бах сосредоточил все свое внимание на узловых проблемах динамической биохимии, на химизме тех основных жизненных процессов, суммарное установление которых XIX век получил в наследство от XVIII в. Химизм ассимиляции и дыхания — вот те вопросы, которые сразу же привлекли к себе творческую энергию Алексея Николаевича. Таким образом, он полностью воспринял те великие традиции динамического изучения живой природы, которые были завещаны XVIII в., но воспринял их уже на новом, более высоком уровне знания. С одной стороны, данные органической химии, а с другой — учение о катализе, химической кинетике, сопряженных реакциях и т. д. позволили ему более глубоко разобраться в явлениях, происходящих в организмах и служащих основой жизненного процесса.

Углекислота и вода, сахар и кислород — это только конечные звенья длинных цепей химических превращений, лежащих в основе ассимиляции и дыхания. Для того чтобы, идя химическим путем, приблизиться к познанию жизни, надо распутать сложный клубок превращений, совершающихся в ходе обмена веществ, надо понять химический механизм этих превращений.

Существовавшие в то время теории ассимиляции не удовлетворяли А. Н. Баха; начиная с 1885 г. он стремится путем ряда систематических исследований познать этот процесс на новых основаниях. Он рассматривает ассимиляцию углекислоты не как результат ее раскисления путем отщепления молекулы кислорода, а как сопряженный окислительно-восстановительный процесс, происходящий за счет элементов воды. Образование восстановленных продуктов связано с образованием перекисей, в частности перекиси водорода. По мысли А. Н. Баха, именно перекиси являются теми соединениями, в результате вторичного разложения которых образуется молекулярный кислород. Таким образом, возникающий в процессе ассимиляции кислород — это кислород воды, а не углекислоты, — мысль, которая только недавно нашла свое полное экспериментальное подтверждение в работах советских исследователей, осуществленных изотопным методом.



А. Н. БАХ  
(1880 г.)





Не удовлетворяла А. Н. Баха и голая аналогия между дыханием и горением. Эта аналогия не затрагивает внутреннего, интимного механизма дыхания. Ведь горение может осуществляться только при таких высоких температурах, которые полностью исключают возможность жизни. При обычных же температурах тела вне организма углеводы и белки не подвергаются окислению кислородом воздуха. Напротив, в живой клетке эти дыхательные материалы быстро окисляются до своих конечных продуктов. С нашей современной точки зрения это вполне понятно. Окисление молекулярным кислородом является реакцией, требующей громадной энергии активации, преодоления громадного энергетического порога. Значительно повышая температуру, мы увеличиваем общую кинетическую энергию молекулы и тем создаем условия для преодоления этого порога. Низкие температуры принципиально исключают этот путь. Здесь осуществление процесса окисления может идти лишь обходной дорогой промежуточных реакций, дорогой, основанной на снижении энергии активации. Поэтому и невозможно понять механизм дыхания, исходя только из аналогии с горением. Путь к познанию дыхания лежит, по мнению А. Н. Баха, в изучении так называемого медленного горения, или самопроизвольного окисления.

Механизм этого окисления был разработан А. Н. Бахом еще в начале 1897 г. в его труде «О роли перекисей в процессах медленного окисления». Энергия, необходимая для активации кислорода в процессе медленного окисления, не получается извне, а доставляется самим окисляемым веществом. Поэтому при обычных температурных условиях молекулярным кислородом могут окисляться лишь химически ненасыщенные, аутоксидабельные вещества, тогда как насыщенные остаются без изменения. Аутоксидабельные вещества, приходя в соприкосновение с кислородом, не расщепляют его молекулу на свободные атомы (как это думали раньше), а превращают эту молекулу в радикал, где только одна связь является разорванной. Указанный радикал и присоединяется к окисляемому веществу. При этом неизбежно должны образовываться перекиси, которые, являясь весьма неустойчивыми и химически активными веществами, способствуют дальнейшему окислению.

Эта теория сразу же приобрела выдающееся значение и это значение сохранила и до наших дней. Новейшие достижения физической химии, данные последних лет убедительно показывают, что перекисный механизм первых этапов окисления лежит в основе ряда разнообразных реакций: окисления неорганических соединений, окисления углеводородов, спиртов, альдегидов, ароматических веществ и т. д. Он лежит в основе теории холодного пламени, явления детонации и используется в ряде других областей теоретической и прикладной химии. Но сам А. Н. Бах видел главнейшее значение своей перекисной теории в том, что она позволила ему разобратся в химизме дыхания, приблизиться к познанию жизненного процесса.

Именно на этом этапе своих исследований А. Н. Бах и встретился с учением о ферментах, с энзимологией, которой он посвятил большинство своих дальнейших работ.

Ферменты, или, как их позднее стали называть, энзимы, были открыты еще в первой половине прошлого века. Как мы теперь знаем, в любой живой клетке присутствует целый набор разнообразных ферментов, каждый из которых действует как специфический катализатор, во многие миллионы раз ускоряя ту или иную протекающую в протоплазме индивидуальную реакцию. Именно действием этих катализаторов в значительной степени и разрешается то противоречие, на которое мы указывали выше. В их отсутствие выделенные из живой клетки органические вещества

претерпевают химические изменения лишь с очень малой скоростью, тогда как в протоплазме, благодаря действию ферментов, эти превращения происходят в весьма бурных темпах. Таким образом, ферменты можно назвать двигателями биохимических процессов. Без ферментов нет жизни. Мы можем выделить из растительных или животных тканей отдельные ферменты в виде более или менее очищенных препаратов, которые полностью сохраняют свое каталитическое действие и вне живой клетки. При их помощи мы можем в колбе или пробирке химика воспроизвести в изолированном виде отдельные специфические реакции, которые свойственны живой материи. Это позволяет нам изучать эти реакции во всех их деталях, устанавливая не только их химическое уравнение, но и кинетику, зависимость их скорости от температуры, кислотности, количества фермента и т. д.

Таким образом, изучая ферменты, биохимик получил в свое распоряжение метод, позволяющий ему распутать сложный клубок превращений вещества внутри живой клетки, где сплетаются тысячи отдельных индивидуальных реакций. Это был путь для анализа не веществ, составляющих живую материю, а тех процессов, которые в ней совершаются. Если раньше биохимические явления воспринимались только суммарно, по их общему внешнему выражению, устанавливались только начальные и конечные звенья обмена веществ, то с развитием учения о ферментах создалась возможность познать все промежуточные этапы этого обмена, установить химизм отдельных жизненных явлений. И одним из первых, кто встал на этот путь, был А. Н. Бах.

Он показал, что в основе дыхания лежит ряд ферментативных окислительных и окислительно-восстановительных реакций, последовательно сменяющих друг друга в длинной цепи химических превращений. Самопроизвольное окисление, как и все медленно протекающие процессы, доступно воздействию катализаторов, во много раз увеличивающих его первоначальную скорость. В организмах такими катализаторами являются окислительные ферменты, и на их изучении сосредоточил свое внимание А. Н. Бах. Он выделил эти ферменты из большого числа разнообразных растительных объектов и подверг препараты такой совершенной очистке, какую только позволяла существовавшая тогда лабораторная техника. Наряду с оксидазами, производящими окисление при помощи кислорода воздуха, А. Н. Бах установил широкое распространение в растительном мире и другого окислительного фермента — пероксидазы. Ее физиологическая роль до работ А. Н. Баха представлялась совершенно загадочной, так как она окисляет только за счет перекиси водорода, а это соединение считалось несвойственным живой природе.

Однако, согласно А. Н. Баху, на первых этапах витального окисления всегда должны образовываться перекиси, в водной среде дающие начало перекиси водорода. Как показал А. Н. Бах, судьба этой перекиси водорода в живой протоплазме может складываться по-разному. В присутствии фермента каталазы перекись водорода разлагается на воду и инертный газообразный кислород. Напротив, при действии пероксидазы перекись используется для дальнейшего окисления. Поэтому А. Н. Бах, много работавший как с тем, так и с другим ферментом, рассматривал каталазу и пероксидазу как антагонистов, конкурирующих в живой протоплазме из-за образующейся здесь перекиси водорода.

Когда впервые были открыты оксидазы, на них в биохимии возлагали очень большие надежды. Считали, что одним только наличием этих ферментов можно будет объяснить весь процесс дыхания. Но тщательно произведенные работы А. Н. Баха показали, что ни оксидазы, ни пероксидаза не могут сами по себе окислять те органические вещества, которые являют-

ся дыхательными материалами (например, углеводы). Действие окислительных ферментов строго специфично. Оно направлено на окисление лишь таких аутооксидабельных веществ, как, например, полифенолы. Но какое же тогда значение имеют оксидазы в процессе дыхания? Многие авторы после указанных выше работ так разочаровались в оксидазах, что от чрезмерных надежд перешли в другую крайность и стали отрицать какое-либо значение этих ферментов при дыхании. По их мнению, оксидазы — это только защитные ферменты. Окисляя полифенолы, они образуют лаки, закрывающие места ранения у растений.

Но А. Н. Бах не пошел по этому пути. Он еще раньше предвидел, что дыхание не может являться каким-либо единичным химическим актом, а представляет собой целую цепь ферментативных превращений, где действие оксидаз служит лишь отдельным звеном.

Другим, не менее важным звеном дыхательного процесса являются, по А. Н. Баху, широко распространенные в живой природе окислительно-восстановительные реакции. При этих реакциях одновременно идет окисление одного вещества и восстановление другого. Специальный фермент, катализирующий эти реакции, был назван А. Н. Бахом по аналогии с пероксидазой — пергидридазой, но впоследствии за такого рода ферментами утвердилось название оксидоредуказы. Эти ферменты и способствуют окислению дыхательного материала. Но одновременно с его окислением обязательно должно идти и восстановление, акцептирование освобождающегося при окислении водорода. Здесь на первый план и выступают оксидазы. Они при помощи кислорода воздуха окисляют полифенолы, превращая их в хиноноподобные вещества, являющиеся прекрасными акцепторами водорода. Последние улавливают водород и восстанавливаются им до первоначального состояния, после чего могут вновь быть окислены при помощи оксидаз кислородом воздуха и таким образом снова получить возможность акцептировать и удалить новую порцию водорода. Аппарат, состоящий из окислительных ферментов и окисляемых им полифенолов, играет в дыхании роль акцептора водорода. При наличии таких акцепторов и соответствующих окислительно-восстановительных ферментов (оксидоредуказ) дыхательные материалы легко окисляются в живой клетке.

Эта сравнительно простая схема дыхательного процесса, лежащая в основе и современных взглядов на дыхание, могла быть создана А. Н. Бахом лишь в результате многих десятков экспериментальных работ, посвященных изучению таких окислительных ферментов как фенолаза, пероксидаза, тирозиназа, каталаза, оксидоредуказа и т. д.

А. Н. Бах при своем возвращении на родину обладал уже громадным опытом энзимолога-экспериментатора. Но, как мы видели выше, к изучению ферментов он пришел, стремясь познать химические основы жизни. Для него ферменты были интересны не сами по себе, не как определенный химический феномен, а как ключ к познанию жизненного процесса. Этот принцип А. Н. Бах положил в основу и тех работ, которые он организовал на советской почве.

В одной из первых, опубликованных в настоящем сборнике (стр. 537 сл.), работ он пишет по этому поводу следующее: «В последнее десятилетие в связи с быстрым развитием энзимологии все более и более выявляется та огромной важности роль, какую ферменты играют в жизни организмов. Более полувека тому назад Шенбейн высказал мысль, что без содействия окислительных ферментов организм задохся бы в океане кислорода, как он задыхается в бескислородной среде. Тогда эта мысль казалась парадоксальной, но теперь едва ли кто станет оспаривать то положение, что между состоянием организма и работой его ферментов существует теснейшая связь, что всякое изменение в состоянии организма или вызывается

или сопровождается изменением в работе его ферментов, а это дает возможность переходить от одного ряда явлений к другому — от изменения состояния организма к изменению деятельности ферментов, и обратно. Вполне очевидно, что точное знание этих взаимоотношений дало бы нам ответ на важнейшие вопросы физиологии и патологии, над разрешением которых бьется мысль исследователей».

Именно проблеме установления связи и зависимости между состоянием организма и работой его ферментов и посвящен обширный круг исследований А. Н. Баха и его учеников.

Используя свой громадный предшествующий опыт работы с ферментами, А. Н. Бах совместно со своими сотрудниками разработал ряд методов, позволяющих определять активность ферментов в разнообразных растительных и животных объектах. Эти методы сыграли выдающуюся роль в развитии той области энзимологии, которая в учебниках и сводках обычно обозначается как «биология ферментов». В относящейся сюда обширной серии работ советскими исследователями было показано, что активность ферментов коренным образом изменяется в зависимости как от генетической природы организма, так и от его цикла развития и физиологического состояния.

Метод количественного определения фермента в капле крови позволил А. Н. Баху ежечасно учитывать активность каталазы и протеазы в течение суток. При этом оказалось, что в крови животных и человека эта активность подвергается весьма существенным изменениям в зависимости от времени взятия проб для анализа. Этот установленный А. Н. Бахом суточный ритм ферментативной активности имеет выдающееся общепатологическое значение. Впоследствии он был подтвержден и развит в работах Института биохимии Академии Наук СССР на многочисленных растительных объектах.

Много внимания уделял А. Н. Бах той связи, которая существует между активностью ферментов и иммунитетом, этой еще столь загадочной реактивной способности животного организма. Обнаружив, что продукты глубокого расщепления белка способны функционировать в качестве соучастников восстановительных процессов, катализируемых пергидридазой, А. Н. Бах совместно с сотрудниками построил на этом новый метод обнаружения и количественного учета продуктов распада белка. Одной из областей приложения этого метода явилось изучение изменений физиологического состояния организма, которое происходит в теле животного в процессе иммунизации бактериальными токсинами.

А. Н. Бах с сотрудниками предпринял широкое изучение антиферментов, т. е. тех антител, которые вырабатываются в животном организме при иммунизации энзимами. Это, с одной стороны, углубило наше представление о взаимоотношениях ферментов с сопровождающими их («сопутствующими») веществами; с другой стороны, в области иммунологии использование ферментов в качестве антигенов привело к разработке принципиально новых приемов для изучения реакции между антигеном и антителом.

Широко разрабатывались А. Н. Бахом и его сотрудниками и вопросы, связанные с биологией ферментов у растений. Эта серия исследований была начата работой «Об образовании ферментов в прорастающих зернах». Сам А. Н. Бах так характеризовал задачу этой работы: «Для выяснения роли ферментов в экономике живого организма понимание их одновременного образования и совместной деятельности не менее существенно, чем знание свойств изолированных ферментов».

Переходящее от периода покоя к бурной жизнедеятельности прорастающее зерно являлось особенно удобным объектом для таких исследо-

ваний. В дальнейшем в сферу изучения были включены созревающие и покоящиеся семена. «Мы поставили себе задачей,— писал А. Н. Бах,— проследить количественно движение ферментов в пшеничных зернах, начиная с образования семени, переходя через периоды созревания и покоя и кончая полным его прорастанием. Другими словами, мы пытались составить себе представление о ферментативной истории пшеничного растения с того момента, как оно начинало быть зерном, до того момента, когда оно перестало быть им».

Таким образом, здесь впервые было прослежено изменение активности ферментов в течение длительного периода развития, большого отрезка жизненного цикла растения. На этой основе был установлен ряд фактов, существование которых раньше трудно было даже предполагать. Оказалось, что ферменты не возникают первично в процессе прорастания семян, как это думали раньше. Они накапливаются еще при созревании, частично поступаая в созревающее семя из материнского растения. В созревающем зерне происходит инактивирование ферментов, их переход в недейтельное состояние, с тем чтобы в процессе прорастания они вновь вывели свою мощную каталитическую деятельность.

Впоследствии было показано, что потеря гидролитической активности ферментов в созревающем зерне и в других растительных объектах происходит в результате адсорбции ферментов на клеточных структурах. Это чрезвычайно распространенное в живой природе явление в ряде случаев определяет собой регулирование ферментативного действия в живой клетке.

Изучение действия ферментов в живой клетке нашло особенно широкое развитие в организованном А. Н. Бахом в 1935 г. Институте биохимии Академии Наук СССР. Здесь на этой основе создано совершенно особое направление в энзимологии. Дело в том, что ранее действие ферментов изучалось лишь на изолированных препаратах или в тех автолитических смесях, которые получают после разрушения живых клеток. Естественно, что при этом активность ферментов, свойственная тому или другому органу или ткани, существенно, иной раз коренным образом изменялась. В зависимости от адсорбционной способности клеточных структур соотношение между ферментативным синтезом и распадом веществ может существенно смещаться как в ту, так и в другую сторону. Работами большого коллектива научных сотрудников Института биохимии было показано, что именно это соотношение между синтезом и распадом веществ, эта направленность ферментативного действия определяет собой такие свойства растений, как их урожайность, сахаристость, скороспелость, устойчивость по отношению к морозу и к засухе.

В разных сортах и в различных органах направленность ферментативного действия определяется прежде всего их породными особенностями. Но она не остается постоянной в течение всего жизненного цикла растения, а закономерно изменяется, испытывая как суточные колебания, так и сезонные и возрастные сдвиги. Кроме того, ее можно сместить в путем ряда искусственных воздействий, как, например, действием наркотиков, пониженной или повышенной температурой, созданием водного дефицита и т. д. Очень важно, что всегда параллельно с этим происходят соответствующие сдвиги и в физиологических свойствах подвергнутого данному воздействию растения.

Таким образом, руководимая А. Н. Бахом советская энзимология достигла существенных успехов в деле познания химических основ жизненного процесса и в деле установления той непосредственной роли, которая принадлежит здесь ферментам. На этой основе А. Н. Бах выдвинул перед советской энзимологией новую, несравненно более сложную задачу. Он видел эту задачу в том, чтобы не только изучить ферменты, но и овла-

деть ими, научиться управлять их действием и тем самым по своему желанию изменять течение жизненного процесса, изменять физиологические и хозяйственно важные свойства организмов в нужном нам направлении. В последнее время советским биохимикам в их совместной с генетиками-мичуринцами работе по яровизации и вегетативной гибридизации удалось установить ряд примеров наследственно закрепляемых сдвигов в обмене веществ у растений. Таким образом, в наши дни идеи А. Н. Баха находят свое воплощение в развитии советской мичуринской биологии.

Точно так же советская энзимология выполнила завет А. Н. Баха и практически разрешила задачу управления ферментативными процессами и в другой области. Речь идет о применении энзимологии в технике, о так называемой «технологии ферментов», которая наряду с «биологией ферментов» представляет то поле, на котором особенно много потрудились советские энзимологи и где они достигли решающих успехов.

А. Н. Бах никогда не разделял науку на чистую и прикладную. Он часто повторял, что нет никаких прикладных наук, а есть наука и ее применение. С жаром революционера и общественного деятеля А. Н. Бах стремился возможно полнее и возможно скорее использовать все достижения науки на благо Родины и социалистического строительства. Еще в 1936 г. он писал: «Должен сказать, что у нас есть еще очень много хороших исследователей, научных работников, которые считают, что нельзя теоретическую науку путать с прикладными науками, что теоретическая наука — это одно, а производство — это другое. Мы категорически возражаем против этого. Мы считаем, что в стране социалистического строительства теоретическая наука должна идти на помощь практике, потому что перед нашей страной стоят еще великие и трудные задачи, и нет никакого сомнения, что в тот или другой момент нам придется бороться с врагами. И поэтому наша обязанность — обязанность теоретической науки — всемерно содействовать развитию практического ее применения».

Именно работами советских энзимологов было установлено, что в основе ряда производств, имеющих дело с сырьем растительного или животного происхождения, в частности, ряда производств пищевых и вкусовых веществ лежат ферментативные процессы. При помолке зерна, томлении и сушке табака, выдавливании сока из виноградной ягоды, скручивании чайного листа на роллерах и т. д. живые клетки перечисленных объектов механически разрушаются, но заключенные в них ферменты сохраняют свою активность. В результате действия этих ферментов в различного рода производственных смесях (в тесте, в ферментирующемся чае и табаке, в пивоваренном сусле, в созревающем виноградном вине и т. д.) протекают химические изменения, которые составляют сущность технологического процесса и благодаря которым сырье превращается в готовый продукт, приобретает ценные для потребителя свойства: цвет, аромат, вкус, усвояемость. Раньше все указанные производства строились на эмпирических основах, на многолетнем опыте мастера. Но такого рода положение удовлетворяло производство только до тех пор, пока оно находилось в мелком полукустарном состоянии.

Сталинские пятилетки изменили нашу пищевую промышленность до неузнаваемости. Вместо мелких кустарных промыслов возникли крупные механизированные предприятия. Старые навыки, которые получал мастер от своих предшественников, оказались недостаточными. Крупное механизированное производство с его поточной системой и жестким графиком требует точных знаний тех явлений, которые лежат в основе технологического процесса. Только при этих условиях можно сознательно управлять производством и выпускать стандартную высококачественную продукцию.

Советские энзимологи приняли активное участие в этой работе по созданию новой пищевой промышленности. Углубленные знания ферментативных процессов позволили им расшифровать производственную роль каждого из ферментов, действующих в перерабатываемом сырье. Таким путем они дали в руки технологам практические методы для усиления полезных и ослабления вредных процессов, для контроля производства и для сознательного его регулирования. На этой основе был реконструирован ряд отраслей пищевой промышленности. Мы приведем лишь несколько примеров.

Основные курительные свойства табака приобретаются им в процессе так называемой «ферментации». Сложенные в тюки высушенные табачные листья оставляли лежать на складах в течение года (а иной раз и больше), при этом они подвергались саморазогреванию, и в них происходили нужные химические превращения. В чем состоял этот процесс ферментации, никто не знал. Он протекал стихийно и нередко приводил к порче ценного сырья. А. И. Смирнов на основе данных А. Н. Баха по окислительным ферментам подверг этот процесс детальному изучению и показал, что он происходит в результате действия ферментов, заключенных в самом табачном листе. Изучив свойства этих ферментов и условия их оптимального действия — температуру, влажность, он предложил вести ферментацию не на складах, а в специально устроенных камерах, где создаются надлежащие для действия ферментов условия. Таким путем удается искусственно управлять ферментацией и получать высококачественный табак в течение нескольких недель в любое время. Сейчас в Советском Союзе уже никому в голову не придет ферментировать табак кустарным путем. Вся наша продукция выпускается из специальных ферментационных заводов, работа которых основывается на данных А. И. Смирнова.

Аналогичное положение мы имеем и в чайной промышленности. При производстве чая молодой, слегка завяленный лист чайного дерева подвергается скручиванию на особых машинах — роллерах. Полученная таким путем влажная масса начинает бурно «ферментировать». За несколько часов она приобретает коричневую окраску, надлежащий вкус и аромат, вообще превращается в готовый чай, который нужно в дальнейшем только высушить в специальных печах. Научными работниками Института биохимии было показано, что сущность процесса ферментации чая сводится в общих чертах к следующему: при скручивании раздавливаются живые клетки листа и нарушается та последовательность, та координация окислительных и окислительно-восстановительных процессов, которые лежат в основе дыхания живого листа. В результате этого ферментному окислению начинают подвергаться дубильные вещества, что и создает надлежащие вкусовые и ароматические качества продукции. На основании этой энзимологической теории чайного производства были разработаны методы его рационального объективного контроля. Их применение на чайных фабриках позволило сознательно управлять технологическим процессом и значительно улучшить качество нашей продукции.

Несколько слов о той роли, которую сыграла энзимология в хлебопекарной промышленности. Как мы видели выше, покоящееся зерно всегда содержит в себе некоторое количество активных ферментов. При помолу зерна эти ферменты переходят в муку и при ее смешивании с водой обуславливают ряд химических превращений, совершающихся в тесте при стоянии. В зависимости от тех изменений, которым подвергаются белки и крахмал муки, меняются и коллоидные свойства теста — его упругость, вязкость, эластичность, водоудерживающая способность и т. д.

К моменту посадки теста в печь в нем должны произойти совершенно определенные изменения белков и углеводов. Если указанные изменения

не успели произойти, хлеб получается плохой, но если они зашли слишком далеко, результат точно так же получается отрицательный. В зависимости от различного содержания отдельных ферментов в тесте процессы изменения крахмала и клейковины идут здесь с различной скоростью, и технолог должен каким-то образом уловить нужный момент, чтобы получить хорошие результаты. Однако на практике это далеко не всегда удается.

Как показали исследования А. Н. Баха и его сотрудников, количество ферментов в зерне, а следовательно, и в получаемой из него муке, зависит не только от сорта зерна, но и от степени его зрелости, года и места урожая и т. д. Разные партии муки содержат поэтому весьма различное количество ферментов и требуют для своей переработки различных технологических схем. На практике этого стремятся избежать смешиванием отдельных партий, составлением так называемых валок. Однако составление этих валок вслепую далеко не всегда приводит к желаемым результатам, в особенности при наличии муки с резко пониженными хлебопекарными качествами.

Углубленное изучение ферментов зерна и муки позволило в значительной степени рационализировать процесс хлебопечения. Мы сейчас располагаем методами, позволяющими заранее определить ферменты в данной партии муки и таким образом поставить диагноз в отношении ее хлебопекарных качеств, в отношении того, как она себя поведет в процессе хлебопечения. На основании этого диагноза можно уже сознательно составлять валки муки и при помощи ряда технологических приемов даже из муки с пониженными хлебопекарными свойствами получать хлеб надлежащего качества.

Мы здесь привели только несколько примеров, но их можно было бы значительно увеличить, указав на ту помощь, которую принесли советские биохимики виноделию, витаминному, консервному производству и т. д. Тесная связь советской биохимии с запросами жизни позволила нашим ученым быстро перестроить свою работу в обстановке военного времени, включиться в ту общую борьбу, которую победоносно вела наша страна с фашистскими захватчиками, и принести в этой борьбе реальную помощь Родине.

Более шестидесяти лет отделяют нас от начала научного пути А. Н. Баха. В течение этого периода произошли решающие сдвиги в жизни человечества. Возникло и приобрело невиданную мощь Советское социалистическое государство. На путь построения социализма вступили народы многих стран. Идеи Ленина — Сталина руководят деятельностью прогрессивных людей во всем мире. Советский народ успешно строит коммунизм. Исключительный расцвет в нашей стране приобрели науки, развивающиеся на основе единственно правильной методологии — диалектико-материалистической. Бурное развитие получила в Сталинскую эпоху и биохимия, значение которой особенно возросло в связи с победой мичуринской биологии.

Основоположник советской биохимии А. Н. Бах оставил обширное научное наследие. Разумеется, что мы, советские биохимики, должны воспринимать его творчески, всемерно развивая его прогрессивные стороны и отказываясь от всего того, что в настоящее время уже устарело, что по необходимости являлось данью времени, а сейчас не способствует продвижению науки вперед.

После установления советской власти и до конца своей жизни А. Н. Бах активно боролся за торжество дела Ленина — Сталина. Те основные научные положения, которые были им высказаны, и сейчас мобилизуют советских ученых на углубленное изучение процесса обмена веществ с целью овладения этим процессом, с целью сознательного и направленного преобразования живой природы на благо человека — строителя коммунизма.



*Часть I*

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ  
ПО ХИМИИ И БИОХИМИИ

---



## О БИОХИМИЧЕСКОМ КРУГОВОРОТЕ УГЛЕРОДА

[*Sur l'évolution biochimique du carbone*] \*

С точки зрения химической механики жизнь представляет собою непрерывный расход энергии. Для того чтобы обеспечить этот расход, живые организмы накапливают энергию в виде пищевых веществ.

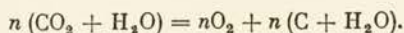
Рассматривая природу и происхождение пищевых веществ, являющихся источником энергии для живых организмов, мы отмечаем, во-первых, что они относятся к категории органических веществ, т. е. содержат углерод, и, во-вторых, что они являются продуктами жизнедеятельности хлорофилльных растений; в этом проявляется разница между животными и растениями. И те и другие нуждаются в источниках энергии для выполнения своих жизненных функций, но в то время как животные могут существовать только за счет растений, последние обеспечивают себя сами, создавая при помощи солнечных лучей из очень простых неорганических соединений чрезвычайно сложные органические, являющиеся настоящими переносчиками энергии. Животные поглощают эти органические вещества, разрушают их путем окисления для того, чтобы использовать энергию, которую они содержат, и превращают их вновь в неорганические соединения.

Таким образом, химические элементы, из которых состоят живые организмы, проходят определенный цикл превращений, переходя из состояния неорганизованного вещества в состояние живого вещества и вновь возвращаются в область неживой природы. Изучение этого круговорота составляет предмет биологической химии.

В настоящем докладе я предполагаю изложить современное состояние наших знаний, касающихся биохимического круговорота наиболее существенного из этих элементов — углерода.

К сожалению, мы еще очень далеки от понимания всех стадий этого превращения, и в наших знаниях имеются еще многочисленные пробелы. Однако даже в таком неполном виде эти данные представляют один из самых интересных разделов биологической химии.

Известно, что углерод органических соединений, вырабатываемых растениями, получается исключительно из углекислоты воздуха. Растения разлагают углекислоту, с выделением свободного кислорода, и образуют из углерода вместе с водой углеводы:

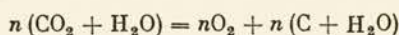


\* Доклад, сделанный 24 февраля 1898 г. в Женевском химическом обществе.— Arch. Sci. phys. nat., 5, 401 (1898).

Углеводы — сахар и крахмал — являются первым осязаемым продуктом синтеза органических соединений на основе углерода углекислоты. Каким путем происходит это превращение углерода? Различные гипотезы были высказаны по этому поводу.

Согласно Либиху, кислоты жирного ряда — муравьиная, уксусная, щавелевая, виннокаменная и т. д. — являются первыми членами восстановления углекислоты в растениях. Путем дальнейшего восстановления эти кислоты превращаются в сахар и крахмал. Гипотеза Либиха не обоснована никакими точными фактами и имеет в настоящее время очень мало сторонников.

Значительно существеннее гипотеза, высказанная 28 лет назад Ад. Бейером. Основываясь на том, что Бутлерову удалось превратить формальдегид в сахаристое вещество, Бейер пришел путем теоретических соображений к выводу, что формальдегид является первым членом восстановления углекислоты в растениях. Согласно Бейеру, эмпирическое уравнение:



превращается в точное уравнение:



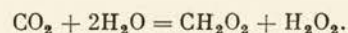
Получающийся таким образом формальдегид превращается затем в сахар и крахмал путем полимеризации.

Бейер пытался объяснить также и механизм превращения формальдегида, исходя из углекислоты. Согласно его точке зрения, углекислота разлагается на кислород, выделяющийся в свободном виде, и на окись углерода, которая связывается с хлорофиллом. Соединение хлорофилла с окисью углерода восстанавливается затем водородом *in situ nascendi* с возрождением хлорофилла и образованием формальдегида:



Водород *in situ nascendi* получается от разложения воды, но Бейер не объясняет, как происходит это разложение; таким образом, он отодвигает вопрос, вместо того чтобы разрешить его.

Я укажу еще на гипотезу, высказанную Эрленмейером. Согласно его взглядам, под действием света и хлорофилла происходит гидратация углекислоты, за которой непосредственно следует разложение на муравьиную кислоту и перекись водорода:



Аналогичным путем муравьиная кислота может восстановиться затем в формальдегид. Образующиеся таким образом две молекулы перекиси водорода разлагаются с выделением одной молекулы кислорода, так что конечный результат соответствует уравнению Бейера.

Когда я лет десять назад занялся изучением этой проблемы, я прежде всего попытался установить исходные точки зрения для своих исследований. Эти исходные положения следующие.

1. В курсах ботаники и растительной физиологии всегда говорят о системе « $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ », разлагающейся в растениях указанным выше образом. Однако, как и все другие кислые ангидриды, угольный ангид-

рид  $\text{CO}_2$ , растворенный в воде, образует кислоту  $\text{CO}_3\text{H}_2$ , или  $\text{O} = \text{C} \begin{array}{l} \text{OH} \\ \text{OH} \end{array}$ ,

которая хотя и неустойчива в свободном состоянии, но обладает всеми

характерными свойствами кислот. Поэтому углекислота претерпевает в растениях разложение не в виде  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ , а в виде  $\text{CO}_3\text{H}_2$ .

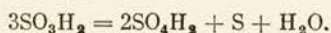
2. Существуют химические превращения, которые чрезвычайно трудно объяснить, если рассматривать только исходное состояние и конечный результат. Они, однако, становятся совершенно понятными, если принять во внимание промежуточные реакции, связывающие исходное состояние с конечным.

Я считал, что разложение углекислоты на кислород и формальдегид также происходит путем ряда промежуточных реакций, осуществляющих постепенно превращение, кажущееся нам с первого взгляда чрезвычайно трудным.

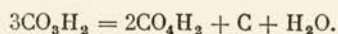
3. В настоящее время известна только одна категория соединений, способных разлагаться при комнатной температуре с выделением кислорода: это перекисные соединения. Для того чтобы углекислота могла разлагаться на кислород и формальдегид, следовательно, необходимо, чтобы образовывалась, прямо или косвенно, в качестве промежуточного продукта перекись.

Мне было известно, что Бертелло получил кислородное соединение углерода, содержащее больше кислорода, чем углекислота, и обладающее свойствами перекиси. Однако связь между всеми этими фактами стала для меня ясной только после того, как я принял во внимание приведенную ниже реакцию.

О. Лев показал, что под действием солнечных лучей сернистая кислота разлагается по следующему уравнению:

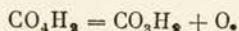


Принимая во внимание существующую между сернистой кислотой  $\text{SO}_3\text{H}_2$  и углекислотой  $\text{CO}_3\text{H}_2$  аналогию, я решил, что разложение последней под действием солнечных лучей должно происходить таким же путем, как и разложение сернистой кислоты. Мы должны были бы иметь в таком случае:

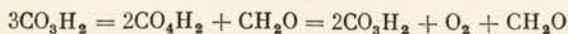


Соединение  $\text{CO}_4\text{H}_2$  содержит больше кислорода, чем углекислота, и должно соответствовать гидрату перекиси карбонила  $\text{O} = \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array}$ , т. е.

надугольной кислоте. В качестве перекиси оно может разлагаться при обыкновенной температуре на кислород и углекислоту:



Система « $\text{C} + \text{H}_2\text{O}$ », соответствующая « $\text{S} + \text{H}_2\text{O}$ », таким образом, является самым простым из гидратов углерода, т. е. формальдегидом. Мы видим, что совокупность всех этих реакций, а именно:



приводит к результату, который вполне соответствует основному уравнению Бейера.

Придя к этому выводу, я пытался проверить его экспериментально. В экспериментальном исследовании разложения углекислоты под действием солнечных лучей прежде всего необходимо принять во внимание следующие соображения:

1. Известно, что различные части солнечного спектра оказывают различное действие на ход разложения углекислоты в растениях. Это разло-

жение проходит через два максимума, находящиеся один в фиолетовой части, другой в красной части спектра. Эти два максимума соответствуют спектру поглощения хлорофилла. Это объясняется тем, что хлорофилл поглощает некоторые лучи и передает их энергию молекулам углекислоты, которые разлагаются, как было указано выше. Таким образом, можно сказать, что именно эти лучи благоприятствуют разложению углекислоты, если и не вполне для него необходимы. В среде, через которую эти лучи проходят без поглощения, разложение углекислоты будет протекать чрезвычайно медленно. Поэтому водный раствор углекислоты, являющийся прозрачным для данных лучей, не подходит для опытов разложения. Нужно проводить эту реакцию в присутствии веществ, способных поглотить и использовать для химического превращения хотя бы часть тех лучей, которые в растениях определяют разложение углекислоты.

2. Разложение углекислоты на кислород и формальдегид является обратимой реакцией, т. е. кислород и формальдегид могут легко соединиться вновь и образовать углекислоту. Поэтому разложение последней может протекать только в присутствии веществ, способных связывать по крайней мере один из продуктов реакции, если не оба.

Для того чтобы удовлетворить первому требованию, я всегда производил разложение углекислоты в растворе уксуснокислого урана. Соли этого металла очень светочувствительны и поглощают значительную часть солнечных лучей в фиолетовой части спектра, т. е. в той части, которая соответствует одному из двух максимумов разложения углекислоты в растениях. Для удовлетворения второго требования я прибавлял к раствору уксуснокислого урана различные вещества, способные связываться с формальдегидом.

Я не буду входить здесь в подробное описание многочисленных и довольно сложных опытов, которые я ставил. Достаточно сказать, что мне удалось доказать образование формальдегида при разложении углекислоты путем превращения этого альдегида в  $H_2CO_2$  в присутствии диэтиламина.

Что же касается надугольной кислоты, то мне не удалось доказать непосредственно ее образование при разложении углекислоты. Но ее суще-

ствование или по крайней мере существование перекиси карбонила  $O = C \begin{array}{l} \diagup O \\ \diagdown O \end{array}$

не вызывает никаких сомнений с тех пор, как Констану и Ганзену удалось приготовить перкарбонат калия. Правда, они приписывают этой соли другую формулу, чем та, которая соответствует кислоте  $CO_4H_2$ , но перкарбонат калия несомненно содержит группу перекиси карбонила и реагирует с водой при обыкновенной температуре, как соединение  $CO_4H_2$ , т. е. разлагается на кислород и углекислоту.

Все эти данные являются достаточно вескими доказательствами в пользу моего толкования химического механизма разложения углекислоты в растениях, для того чтобы можно было рассматривать его как чрезвычайно правдоподобное и вероятное, если и не вполне еще доказанное.

На последнем заседании Химического общества (10 февраля 1898 г.) я делал сообщение о работе, являющейся новым шагом к окончательному разрешению интересующей нас проблемы. Речь идет о зависимости, которая существует между восстановлением углекислоты водородом *in statu nascendi*, ее электролизом и фотолизом.

Исходя из того, что превращение углекислоты в углеводы в растениях несомненно является результатом восстановительного процесса, давно уже пытались выяснить восстановительное действие водорода *in statu*

nascendi на углекислоту. Для того чтобы объяснить происхождение этого водорода в растениях, допускали разложение воды электролизом или каким-нибудь другим аналогичным фактором.

Что же касается восстановления углекислоты водородом, то было отмечено, что оно происходит чрезвычайно трудно в кислом растворе и, наоборот, чрезвычайно легко — в щелочном растворе, причем муравьиная кислота является единственным продуктом реакции восстановления.

Я задал себе вопрос, почему образующаяся муравьиная кислота не восстанавливается дальше в формальдегид под действием избытка водорода *in statu nascendi*. Ответ на этот вопрос получается чрезвычайно

просто. Углекислота  $O = \begin{array}{l} \text{OH} \\ \diagup \\ \text{C} \\ \diagdown \\ \text{OH} \end{array}$  содержит два гидроксила, связанных

с карбонилем, и может, следовательно, образовать два альдегида под действием водорода *in statu nascendi*. Замещая атомом водорода один

из гидроксильных OH углекислоты, мы получаем первый альдегид  $O = \begin{array}{l} \text{H} \\ \diagup \\ \text{C} \\ \diagdown \\ \text{OH} \end{array}$ ,

т. е. муравьиную кислоту. При замещении второго гидроксила атомом

водорода получается второй альдегид  $O = \begin{array}{l} \text{H} \\ \diagup \\ \text{C} \\ \diagdown \\ \text{H} \end{array}$ , т. е. формальдегид.

Вполне очевидно, что для того, чтобы углекислота могла быть восстановлена водородом *in statu nascendi*, необходимо, чтобы оба гидроксила были свободными; однако, когда восстановление происходит в щелочном растворе, образующаяся муравьиная кислота нейтрализуется щелочью, и

получается муравьинокислый натрий  $O = \begin{array}{l} \text{H} \\ \diagup \\ \text{C} \\ \diagdown \\ \text{ONa} \end{array}$ , на который водород

*in statu nascendi* уже не может действовать.

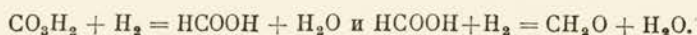
Для того чтобы восстановление углекислоты протекало нормально, оно должно происходить в присутствии как минеральных кислот, так и оснований. Я осуществил эти условия, применяя в качестве источника водорода *in statu nascendi* гидрид палладия. Действительно, при действии гидрида палладия на насыщенный раствор углекислоты в течение 30 дней я получил формальдегид, который мне удалось обнаружить в виде ангидроформальдегиданилина и бромистого производного гексаметилентетрамина.

Если водород *in statu nascendi*, выделяющийся гидридом палладия, может восстановить углекислоту в формальдегид, то можно допустить, что такое же восстановление будет произведено водородом, выделяющимся при электролизе этой кислоты. Тот факт, что при этом электролизе образуется муравьиная кислота, не может быть объяснен иначе, если не выходить за рамки общих законов электролиза.

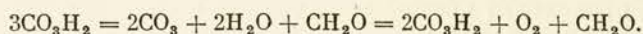
Согласно этим законам, основными стадиями электролиза являются следующие:



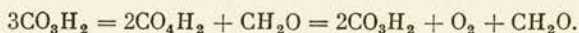
В качестве побочных реакций мы имеем:



Для того чтобы одна молекула углекислоты могла быть восстановлена в формальдегид электролитическим водородом, необходимо, чтобы две другие молекулы углекислоты разложились на ионы  $H^+$  и  $CO_3^{''}$ . Совокупность этих реакций может быть выражена следующими уравнениями:



Исходя из совершенно других соображений, я показал, как уже было сказано, что под действием солнечных лучей углекислота разлагается согласно уравнениям:



Соединение  $CO_4H_2$ , очевидно, есть не что иное, как система « $CO_3 + H_2O$ » (гидрат перекиси карбонила, надугольная кислота), получающаяся при электролизе. Так же как и эта группа, соединение  $CO_4H_2$  должно немедленно после образования разлагаться на кислород и углекислоту. Таким образом, получается, что если допускать электролитическое восстановление углекислоты, то электролиз и фотолиз углекислоты идут по той же самой схеме. Аналогия между этими двумя явлениями доходит до полного тождества — потому ли, что солнечные лучи действуют так же, как и электричество (способствуя диссоциации углекислоты на ионы), или потому, что лучистая энергия превращается в электрическую.

Все изложенные мною факты с очевидностью доказывают, что механизм разложения углекислоты в растениях не выходит за пределы известных нам химических реакций. В течение долгого времени разложение углекислоты в живой клетке приписывалось таинственному действию жизненной силы, так же как и многочисленные другие биологические явления, которые не удавалось объяснить иначе. Эта точка зрения, в более или менее обновленном виде, и сейчас еще насчитывает горячих сторонников. Однако химические исследования наносят витализму все более решительные удары, и, может быть, недалек тот день, когда от этого учения ничего не останется, по крайней мере в той части биологии, которая специально связана с химией.

Возвратимся к синтезу органических соединений в растениях. Эти органические соединения распадаются на три класса: углеводы (сахара и крахмал), жиры и белки. Углерод, входящий в состав этих различных соединений, несомненно происходит из формальдегида, образующегося в результате восстановления углекислоты, но мы чрезвычайно мало знаем о процессах, которые приводят к синтезу этих соединений.

Что касается сахаров, и в частности глюкозы, являющейся, по видимому, первым членом этого ряда, то работы Бутлерова, Толленса, Лева и Эмиля Фишера показали, что чрезвычайно легко превратить формальдегид в сахар с шестью атомами углерода. Для этого достаточно обработать его баритом, известью или поташом, вызывающими его конденсацию. Какое же вещество играет в растениях роль этого фактора конденсации по отношению к формальдегиду? Не зная ничего точного по этому вопросу, предположили, что конденсация формальдегида происходит под действием протоплазмы.

Так как я наблюдал, что белок образует с формальдегидом соединение, распадающееся вновь на свои составные части, я предположил, что именно белок и вызывает конденсацию формальдегида в сахар. Опыты, которые я поставил для выяснения этого вопроса, дали некоторые интересные результаты, касающиеся действия формальдегида на белок, но не подтвердили окончательно моего предположения. Таким образом, вопрос остается открытым.



Мы ничего не знаем также о процессе превращения сахара в крахмал, который является главным углеводным резервом растений. Но обратный процесс — превращение крахмала в сахар — был предметом бесчисленных исследований, так как он лежит в основе двух крупных отраслей промышленности — пивоварения и виноделия. Известно, что под действием растворимого фермента амилазы крахмал гидратируется, образуя ряд продуктов гидратации, доходящих до мальтозы и даже до глюкозы. Превращение глюкозы в крахмал может, следовательно, происходить только путем ряда дегидратаций. Действительно, при действии концентрированной соляной кислоты на глюкозу Эмиль Фишер получил сахар с 12 атомами углерода — изомальтозу; это единственный бесспорный синтез, который был до настоящего времени осуществлен в этом направлении. Вполне очевидно, однако, что методы дегидратации, которые мы применяем в лаборатории, не могут дать никакого представления о механизме превращения глюкозы в крахмал в растениях.

Я позволю себе сказать здесь несколько слов о работе, которую я только начал, но которая, может быть, приведет к решению интересующего нас вопроса. Некоторые соображения привели меня к выводу, что дегидратация глюкозы в растениях может происходить только при помощи специального фермента, действующего в обратном направлении, чем амилаза. Существование этих двух ферментов с диаметрально противоположными функциями не является неожиданным, так как мы теперь знаем, что в живом организме существуют один или несколько окислительных ферментов — оксидазы — и один гидрогенизирующий фермент. Если существует гидратирующий фермент, то вполне возможно существование и дегидратирующего. Следующий характерный факт делает это предположение весьма правдоподобным. Известно, что амилаза не действует на крахмал в присутствии концентрированного раствора глюкозы. Допустим, что растение содержит наряду с амилазой дегидратирующий фермент. В тот период, когда в листьях идет с полной интенсивностью процесс ассимиляции углерода и образуется глюкоза, эта последняя нашим гипотетическим ферментом превращается в крахмал. В присутствии избытка глюкозы амилаза не действует на крахмал, отложенный в листьях. Но как только ассимиляция прекращается, количество глюкозы уменьшается, и амилаза вновь приобретает активность: она превращает крахмал в растворимые сахаристые вещества, необходимые для жизнедеятельности растения.

Таким образом, механизм переноса и накопления углеродных резервов в растениях регулируется действием этих двух ферментов, один из которых начинает действовать только тогда, когда другой становится неактивным.

Предварительные опыты, которые я начал в этом направлении дали мне обнадеживающие результаты, но работа должна еще быть продолжена и углублена.

До настоящего времени мы ничего не знаем о механизме образования жиров в живом организме. На основании ряда физиологических опытов создалось убеждение, что в животном организме жиры образуются из углеводов. Так, например, если питать животное углеводами, прибавляя к ним то количество белков, которое строго необходимо для сохранения азотистого равновесия, то в тканях отлагаются большие количества жира. В растениях жиры также образуются из углеводов. Но не существует никаких химических данных, которые могли бы дать нам какие бы то ни было указания на механизм этого процесса.

Я перехожу к третьему классу органических пищевых веществ — к белкам.

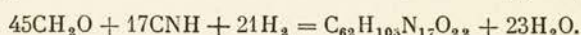
Синтез белков в растениях был предметом чрезвычайно многочисленных исследований, и в особенности — многочисленных спекулятивных

рассуждений. Я могу сказать здесь лишь несколько слов о главных гипотезах, стремящихся объяснить этот синтез.

Согласно А. Готье, белковые вещества в растениях синтезируются из синильной кислоты и формальдегида. Сама синильная кислота происходит от действия формальдегида на нитраты.

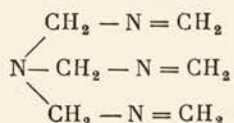
Основываясь на классических исследованиях Шютценбергера о вероятной структуре белков, А. Готье считает доказанным, что молекула белка сводится к мочеvine или оксамиду, водородные атомы которых замещены сложными имидными цепями. Мочевина и оксамид образуются путем гидратации синильной кислоты, а амидные цепи получают в результате соединения синильной кислоты с формальдегидом с последующей гидрогенизацией.

В результате всех этих спекулятивных умозаключений А. Готье без колебаний представляет синтез белковых веществ следующим уравнением:

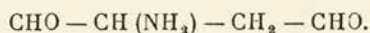


Само собою разумеется, что он не приводит в подтверждение своей гипотезы никаких экспериментальных данных.

О. Лев пытается объяснить синтез белковых веществ в растениях, исходя из твердо установленного физиологическими опытами факта, что аспарагин образует основное ядро, которое либо является исходным для построения молекулы белка, либо встречается в продуктах распада последнего. Согласно Леву, активным ядром белка является не сам аспарагин, а его гипотетический альдегид. Он допускает, что этот альдегид,  $\text{CHO} - \text{CH}(\text{NH}_2) - \text{CH}_2 - \text{CHO}$ , образуется при действии формальдегида на аммиак, совершенно не считаясь с тем, что реакция такого рода абсолютно противоречит установленным фактам: при действии формальдегида на аммиак водород, связанный с азотом, полностью выделяется, и единственный образующийся продукт — это гексаметилентетрамин:



который совершенно не похож на альдегид



Получив этот аспарагиновый альдегид, Лев, так же как и Готье, приходит к формуле альбумина при помощи совершенно произвольных и необъяснимых уравнений.

Мне казалось, что прежде чем выдвигать рискованные гипотезы о синтезе белковых веществ в растениях, надо определить природу первых четвертичных соединений, которые получают в результате действия третичных органических соединений на неорганический азот.

Азот белковых веществ, вырабатываемых растениями, происходит в значительной степени, если не полностью, из нитратов почвы, претерпевающих в растительном организме восстановление. Обычно допускают, что это восстановление происходит под действием альдегидов и кетонов, имеющих в большом количестве в растениях. Допускают также, что под действием кислотности растительного сока и разбавления нитраты, поступающие в растение, диссоциированы и что восстановлению подвергается свободная азотная кислота.

При помощи очень точных опытов было доказано, что восстановление нитратов происходит главным образом в листьях в момент ассимиляции

углерода. Можно, таким образом, сказать, что формальдегид, образующийся при разложении углекислоты, играет главную роль в этом восстановлении.

Из всех этих соображений вытекает, что проблема восстановления нитратов в растениях сводится к действию формальдегида на азотную кислоту. В чем же заключается это действие?

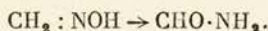
Известно, что восстановление азотной кислоты сернистой кислотой приводит к образованию гидросиламина. Это показывает, что переход от нитратного азота к аммиачному может происходить путем простого отнятия кислорода без последующей гидрогенизации азота. Формальдегид, являющийся также восстановителем, отнимающим кислород, повидимому, действует на азотную кислоту так же, как и сернистая кислота, т. е. превращает ее в гидросиламин  $\text{NH}_2\text{OH}$  путем гидратации остатка = NH азотной кислоты.

Образовавшийся гидросиламин, находясь в присутствии избытка формальдегида, непрерывно образующегося в листьях, может вступать с ним в реакцию и превращаться в формальдоксим



так как эти два соединения реагируют количественно.

Как известно, альдоксимы могут превращаться в амиды путем простой перестановки атомов в молекуле. Формальдоксим, образовавшийся при действии формальдегида на гидросиламин, таким образом тоже может превратиться в соответствующий амид, формамид:



Таким образом, формамид можно рассматривать как исходный продукт синтеза азотистых соединений в растениях.

Все эти соображения привели меня к выводу, что формальдоксим и формамид являются первыми четвертичными членами восстановления нитратов в растениях.

Когда я попытался проверить эту гипотезу на опыте, я столкнулся с очень большими трудностями. Эти трудности главным образом были связаны с разрушающим действием азотистой кислоты на гидросиламин и его производные. После многочисленных бесплодных попыток мне, наконец, удалось доказать с достаточной убедительностью образование формальдоксима при действии кислородных соединений азота на триоксиметилен  $(\text{CH}_2\text{O})_3$ , взвешенный в эфире.

Что же касается дальнейшего превращения формальдоксима в формамид, то оно могло быть доказано в условиях моих опытов только косвенно.

В настоящее время следовало бы попытаться произвести синтез более сложных азотистых соединений, исходя из формамида и формальдегида или других углеводов. Получаясь при соединении двух характерных групп CHO и  $\text{NH}_2$  и являясь типичным альдегидамином, формамид должен обладать способностью вступать в соединения посредством либо одной, либо другой из своих групп или посредством обеих. Если бы можно было достигнуть таким образом синтеза аспарагина или аналогичного вещества, то вопрос о синтезе белковых веществ в растениях существенно продвинулся бы. Я сделал в этом направлении некоторые опыты, которые до настоящего времени не дали удовлетворительных результатов; я предполагаю продолжить эти исследования.

Из всего изложенного мною ясно вытекает, насколько преждевременно, я позволяю себе даже сказать, насколько наивно пытаться выразить при помощи химических уравнений синтез белковых веществ в растениях,

принимая во внимание, что мы едва только начинаем представлять себе первые элементы этого синтеза.

Перейдем теперь к другому вопросу.

Я уже говорил, что животные могут существовать только за счет органических веществ, созданных растениями. Эти органические вещества разрушаются животными путем окисления для извлечения из них всей энергии, какую они способны выделить.

Если мы пытаемся выяснить механизм этого окисления, мы сталкиваемся с первых шагов с противоречием. С одной стороны, органические соединения — углеводы, жиры, белки, — служащие продуктами питания для животных, почти не реагируют с молекулярным кислородом. Для того чтобы окислить их, необходимо применять активный кислород, или кислород *in statu nascendi*. С другой стороны, кислород, который переносится кровью в виде оксигемоглобина, выделяется из последнего в виде молекулярного, или неактивного, кислорода. Вполне очевидно, что для того, чтобы произвести в сравнительно короткий промежуток времени окисление органических продуктов питания, животный организм должен иметь в своем распоряжении обильный источник активного кислорода, другими словами, он должен обладать способностью превращать молекулярный кислород в активный. В чем же заключается эта способность?

Начну с гипотезы Гоппе-Зейлера.

Согласно взглядам этого физиолога, водород *in statu nascendi* обладает свойством расщеплять молекулу кислорода  $O = O$  на атомы; один из атомов соединяется с водородом, а другой освобождается и тем самым становится способным производить самые энергичные окисления. Легко окисляющиеся вещества действуют на неактивный кислород совершенно так же, как водород *in statu nascendi*. Превращение молекулярного кислорода в активный в животном организме происходит, следовательно, при помощи водорода *in statu nascendi* или при помощи легко окисляющихся соединений, действующих как водород.

В пользу своей гипотезы Гоппе-Зейлер приводит некоторые опыты; наиболее убедительным является следующий.

Водород *in statu nascendi*, выделяющийся из гидрида палладия, вызывает, окисляясь на воздухе, чрезвычайно энергичные реакции окисления: он окисляет индиго в изатин, бензол в фенол, аммиак в азотистую кислоту и т. д. Если оставить на воздухе палладиевую пластинку, насыщенную водородом в присутствии индиго, последний окрашивается в желтый цвет вследствие окисления в изатин. Изменяя различным образом этот опыт, Гоппе-Зейлер доказал, что определяющей причиной этого окисления является выделение водорода *in statu nascendi*. Он сделал из этого вывод, что наблюдающееся окисление действительно обуславливается расщеплением молекулы кислорода и выделением атомного кислорода.

Углубленное исследование явлений медленного окисления привело меня к выводу, что превращение неактивного кислорода в активный может происходить посредством перекисей.

Под перекисями я подразумеваю кислородные соединения, оказывающие такое же действие, как перекись водорода, и характеризующиеся присутствием по крайней мере одной группы  $-O-O-$ . Этот последний признак является обязательным. Как бы велико ни было число атомов кислорода в кислородном соединении, если атомы не связаны между собой, то соединение не дает реакций, характерных для перекисей.

Свободные валентности группы  $-O-O-$  могут быть насыщены электроположительными или электроотрицательными одновалентными или двувалентными радикалами.

Кроме перекисей типа  $R' - O - O - R'$ , существуют перекиси типа  $R' - O - O - O - O - R'$ .

Из перекисей последнего типа наиболее известна перекись калия,  $K - O - O - O - O - K$ .

Давно уже известно, что в некоторых случаях медленного окисления в присутствии воды образуется перекись водорода. Придя к заключению, что превращение неактивного кислорода в активный может быть обусловлено образованием перекиси, я прежде всего попытался выяснить, насколько это образование может рассматриваться как нормальная реакция при любом медленном окислении. С этой целью я исследовал большое число различных соединений, подвергавшихся в течение более или менее продолжительного времени действию воздуха в присутствии или в отсутствии света. Для того чтобы обнаружить присутствие перекисей, я применял один из трех следующих реактивов:

1. Титановую кислоту в серноокислом растворе; в присутствии перекисей бесцветный раствор окрашивается в желтый цвет.

2. Гипованадиевую кислоту в серноокислом растворе, приготовленную растворением 1 г ванадиевой кислоты в 20 см<sup>3</sup> серной кислоты и разбавлением водой до 200 см<sup>3</sup>; в присутствии перекиси зеленоватый раствор окрашивается в красно-коричневый цвет.

3. Смесь: двухромовокислый калий — анилин — щавелевая кислота; в присутствии перекисей и капли водного раствора щавелевой кислоты желтоватый раствор, содержащий в 1 л 0.03 г двухромовокислого калия и 5 капель анилина, окрашивается в лиловато-розовый цвет.

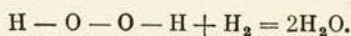
При помощи этих трех реакций, дающих совершенно надежные результаты, я установил, что почти все категории химических соединений, окисляясь на воздухе, образуют перекиси. Образование перекисей в особенности очень заметно в случае легкоокисляемых соединений.

Как объясняется это явление?

Не останавливаясь на гипотезах, предложенных различными авторами, я непосредственно изложил те выводы, к которым я пришел.

Свободный, или молекулярный, кислород  $O = O$ , будучи чрезвычайно пассивным веществом, не может вступать в соединение без того, чтобы энергия, необходимая для расщепления его на атомы, была привнесена извне. В случае трудноокисляемых соединений, т. е. соединений, находящихся в устойчивом химическом равновесии и не обладающих большим запасом энергии, для того чтобы могло произойти окисление, необходима затрата посторонней энергии — теплоты, света или электричества. Но в случае легкоокисляемых соединений, т. е. соединений, находящихся в неустойчивом химическом равновесии, собственной энергии вещества, находящегося в присутствии кислорода, достаточно для того, чтобы вывести последний из неактивного состояния. Переход кислорода из неактивного состояния в активное не может мыслиться иначе, чем путем расшатывания молекулы и разрушения связи между составляющими ее атомами. Вполне очевидно, что для того, чтобы разорвать одну из этих связей и превратить  $O = O$  в  $-O - O-$  нужно затратить меньше энергии, чем для того, чтобы расщепить молекулу на свободные атомы ( $O = O$  в  $-O - и -O -$ ). Принимая во внимание, что энергия окисляемого вещества всегда ограничена, первый случай будет наблюдаться чаще, так как он требует меньшей затраты энергии. Из этого вытекает, что когда соединение окисляется на воздухе за счет своей собственной энергии, оно сначала связывает группу  $-O - O-$ , т. е. образует перекись. Водород *in statu nascendi* образует в этих условиях перекись водорода  $H - O - O - H$ , натрий образует перекись натрия  $Na - O - O - Na$ ; калий в этих же условиях образует четырехокись  $K - O - O - O - O - K$ , очевидно, получающуюся

в результате соединения двух неполных групп  $\text{K}-\text{O}-\text{O}-\text{H}$  и  $-\text{O}-\text{O}-\text{K}$ . Разрыв второй валентности, связывающей еще атомы кислорода, и превращение перекиси в окись происходит только впоследствии, под действием еще не прореагировавшей части окисляемого соединения:



Когда окисление происходит при высокой температуре, молекулы кислорода в значительной степени должны быть диссоциированы на атомы. Там, где температура менее высока, группы  $-\text{O}-\text{O}-$  могут сохраниться и вызвать образование перекиси. Если направить водородное пламя или пламя окиси углерода в чашку, помещенную в охлаждающую смесь, в которую налито небольшое количество воды, то в воде образуется соединение, обнаруживающее все реакции перекиси. Водород образует перекись

водорода, окись углерода — перекись карбонила  $\text{O} = \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array}$ .

Последняя дает те же самые реакции, как и перкарбонат калия, найденный Констамом и Ганзенем.

Таким образом, окисляясь при обыкновенной температуре, легкоокисляемые вещества связывают не полностью диссоциированные молекулы кислорода и образуют перекиси. Последние легко разлагаются с выделением кислорода *in statu nascendi*, т. е. активного кислорода, и, следовательно, способны вызвать окисление таких веществ, которые не окисляются обычным свободным кислородом. Индиго в сернокислом растворе — трудноокисляющееся соединение, и неактивный кислород не оказывает на него никакого действия. Но если пропускать ток воздуха или кислорода через раствор индиго, к которому прибавлено легкоокисляющееся вещество — терпентин, бензальдегид и т. д., — индиго быстро окисляется в изатин. Водород *in statu nascendi*, выделенный гидридом палладия, оказывает на окисление индиго неактивным кислородом такое же влияние, как терпентин или бензальдегид. Роль, которую легкоокисляемые вещества играют при окислении неактивным кислородом трудноокисляемых соединений, может быть объяснена только двумя путями:

1) либо надо допустить, как это делает Гоппе-Зейлер, что легкоокисляемые вещества расщепляют молекулу кислорода и связывают один атом, с образованием окислов и выделением другого свободного атома;

2) либо надо допустить, как я только что изложил, что легкоокисляемые вещества образуют перекиси, действующие на трудноокисляемые вещества своим активным кислородом.

Несколько изменив опыт Гоппе-Зейлера, мне удалось доказать, что правильной является вторая гипотеза.

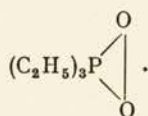
Как я уже упоминал, Гоппе-Зейлер наблюдал окисление раствора индиго, оставленного на воздухе в присутствии палладиевой пластинки, насыщенной водородом.

Для того чтобы выяснить, вызвано ли это окисление свободными атомами кислорода или перекисями, получающимися в результате окисления водорода *in statu nascendi*, я сделал следующий опыт.

Я поместил пластинку палладия, насыщенную водородом, в охлажденную пробирку, содержащую 15 см<sup>3</sup> воды, и пропускал через воду ток воздуха в течение одного часа. По истечении этого времени я извлек пластинку и прибавил раствор индиго к жидкости, содержащей продукты окисления водорода *in statu nascendi* и дающей характерные реакции перекиси. Индиго окисляется в изатин в промежуток времени от 20 мин. до 1 ч. 20 м.

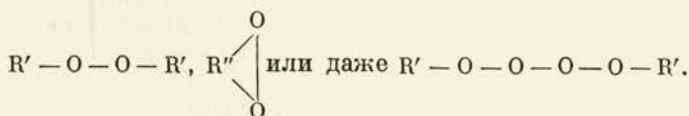
Вполне очевидно, что после удаления палладиевой пластинки в жидкости не могло иметь места ни выделение водорода *in statu nascendi*, ни расщепление молекул кислорода. Из этого вытекает, что в моем опыте окисление индиго было вызвано не свободными атомами кислорода, а перекисями — определенными химическими соединениями, образующимися в результате окисления водорода *in statu nascendi* неактивным кислородом. Некоторые аналитические данные позволяют предположить, что в указанных условиях образуется наряду с двуокисью водорода  $\text{H} - \text{O} - \text{O} - \text{H}$  четырехокись  $\text{H} - \text{O} - \text{O} - \text{O} - \text{O} - \text{H}$ , аналогичная четырехокиси калия. Таким образом, основной опыт, который Гоппе-Зейлер и его ученики рассматривают как решающий довод в пользу расщепления молекулы кислорода водородом *in statu nascendi*, может получить другое толкование, имеющее то преимущество, что оно значительно лучше соответствует установленным фактам.

Я прибавлю еще, что спустя два месяца после того как появилась моя статья «О роли перекисей в явлениях медленного окисления», Энглер и Вильд опубликовали в «*Ver. Dtsch. chem. Ges.*» (июль, 1897) заметку, в которой они сообщают, что пришли к тем же выводам, что и я, относительно механизма медленных окислений. Действуя кислородом на триэтилфосфин  $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{P}$ , они наблюдали, что каждая молекула этого соединения поглощала одну молекулу кислорода с образованием перекиси



Применим теперь к окислению органических пищевых продуктов в животном организме результаты, к которым мы пришли при изучении явлений медленного окисления вообще.

Обычно допускают, что органические пищевые продукты расщепляются в крови на легкоокисляемую и трудноокисляемую части. Легкоокисляемые органические соединения связывают не полностью диссоциированную молекулу кислорода и образуют перекиси

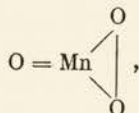


В этих перекисях один из атомов кислорода является «активным» и может, следовательно, окислять трудноокисляемые соединения. В общем явления окисления, протекающие в животном организме, должны представлять большую аналогию с окислением индиго неактивным кислородом в присутствии терпентина или бензальдегида. И в том и в другом случае легкоокисляемое вещество выводит кислород из пассивного состояния.

С точки зрения химического действия окислительные ферменты, или оксидазы, присутствие которых в живом организме установлено, могут быть только легкоокисляемыми соединениями, связывающими группы  $-\text{O} - \text{O}-$  для того, чтобы образовать перекиси. Бертран, открывший растительный окислительный фермент лакказы, нашел, что она состоит из закиси марганца, связанной с белковым веществом. Следуя теории Гоппе-Зейлера, он предполагает, что закись марганца  $\text{MnO}$  расщепляет молекулу кислорода, связывая один атом для образования двуокиси  $\text{O} = \text{Mn} = \text{O}$ ,

и освобождает другой атом, который и производит наблюдающееся окисление.

Принимая во внимание изложенные мною только что данные, кажется гораздо более вероятным, что закись марганца сначала связывает не полностью диссоциированную молекулу кислорода, образуя перекись



которая затем и производит те окисления, которые Бертран приписывал действию свободных атомов кислорода.

Под действием активного кислорода органические пищевые продукты полностью распадаются в животном организме: их углерод превращается в углекислоту, а водород в воду.

Угльный ангидрид и вода, или, что одно и то же, углекислота  $\text{CO}_2\text{H}_2$ , являются, таким образом, исходной точкой и конечным результатом биохимического круговорота углерода: конечным результатом — в животном организме, разрушающем путем окисления органические пищевые продукты для того, чтобы использовать всю ту энергию, которую они содержат в скрытом состоянии; исходной точкой — в растительном организме, который использует солнечную энергию для того, чтобы вновь создать из неактивной углекислоты легкоокисляемые и богатые энергией органические соединения.

Резюмируя вкратце наши весьма несовершенные знания о биохимическом круговороте углерода, можно сказать следующее:

Углекислота разлагается в растениях на выделяющийся кислород и формальдегид благодаря процессу, который аналогичен, если не тождественен, электролизу.

Формальдегид полимеризуется и образует глюкозу путем реакции, которая нам до сих пор неизвестна. Глюкоза превращается — по всей вероятности, под действием специального дегидратирующего фермента — в сахар ( $\text{C}_{12}$ ) и крахмал. Крахмал может вновь превратиться в растворимые сахаристые вещества под действием хорошо известного фермента амилазы.

Для синтеза жиров в живых организмах исходным веществом являются углеводы, но мы ничего не знаем о процессах, которые приводят к этому синтезу.

Действуя на азотную кислоту нитратов, формальдегид вызывает образование в растениях азотистых соединений, содержащих С, О, Н и N, первыми членами которых, повидимому, являются формальдоксим и формамид. Последние, по всей вероятности, превращаются в аспарагин, являющийся постоянным азотистым резервом в растениях. Аспарагин соединяется с углеводами и образует белковые вещества. Механизм последнего синтеза нам также неизвестен.

Все три класса органических соединений, вырабатываемых растениями, — углеводы, жиры и белки — разрушаются в животном организме путем окисления. Необходимый для этого окисления кислород предварительно переводится в активное состояние легкоокисляемыми соединениями, которые не полностью расщепляют молекулы неактивного кислорода и образуют перекиси.

Углекислота является первым членом и конечным результатом биохимического круговорота углерода.



## СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ УЧЕНИЯ ОБ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТАХ РАСТЕНИЙ

[*Ueber den gegenwärtigen Stand der Lehre von den pflanzlichen Oxydationsfermenten*] \*

[Совместно с Р. Шода]

Ферменты, принимающие участие в окислительных процессах, происходящих в живой клетке, могут быть разделены, согласно их специфическим функциям, на следующие три группы:

1. **Оксигеназы** — белковые вещества, присоединяющие кислород с образованием перекисей.

2. **Пероксидазы**, чрезвычайно повышающие окислительную способность перекисей, медленно реагирующих самих по себе при разведениях, имеющих место в живом организме. Ферменты, которые до сих пор назывались оксидазами, представляют собою не что иное, как смесь оксигеназ и пероксидаз.

3. **Каталазы**, которые разрушают перекись водорода каталитически, с выделением кислорода.

Классификация оксидаз, предложенная Буркло<sup>1</sup> [1) озон, 2) озониды, 3) истинные оксидазы, 4) косвенные оксидазы], так же как и разделение окислительных ферментов, предложенное Грюссом<sup>2</sup> [1)  $\alpha$ -оксидаза, или прямая оксидаза, 2)  $\beta$ -оксидаза, которая действует только в присутствии перекиси водорода, 3)  $\gamma$ -оксидаза, которая обладает одновременно гидролитическими и окислительными свойствами], несовместимы с фактами, которые были установлены в последнее время.

### ОКСИГЕНАЗЫ

Шода и Бах<sup>3</sup> называют оксигеназами белковую составную часть оксидаз, которая действует окисляюще только в присутствии пероксидаз или некоторых соединений марганца. В растениях оксигеназы и пероксидазы существуют одновременно и осаждаются совместно крепким спиртом. Поэтому не удивительно, что смесь их долгое время рассматривалась как однородный фермент. Данные, относящиеся к оксигеназам, переплетаются с данными, касающимися оксидаз, и поэтому нам надо дать здесь краткий обзор последних.

**Место нахождения.** Существование в растениях окисляющих соединений, подобных ферментам, которые переносят молекулярный кислород на окисляемое вещество и разрушаются при кипячении, было впервые установлено с полной ясностью Шенбейном<sup>4</sup> при помощи тех же

\* Biochem. Cbl. 1, 417 (1903).

<sup>1</sup> А. Н. Бах



реактивов, которые и сейчас еще применяются для обнаруживания оксидаз. Без преувеличения можно сказать, что не только фактическая основа учения об окислительных ферментах, но в значительной степени и теоретическое толкование находится уже в работах Шенбейна. Около 30 лет спустя Иошида<sup>5</sup> пытался объяснить образование лаков из латекса различных видов сумаха действием окислительного фермента. Бертрам<sup>6</sup>, который подробно исследовал окислительные ферменты, нашел их в многочисленных растениях и пришел к выводу, что они повсеместно распространены в растительном царстве. Однако как ни велико число растений, в которых с достоверностью установлено присутствие оксидаз, существует множество растений, которые не обнаруживают реакции на оксидазы. Во многих растениях оксидаза скрыта присутствием восстановителей (Гунгер<sup>7</sup>, Асо<sup>8</sup>) или восстановительных ферментов (Поцци-Эско<sup>9</sup>). В некоторых случаях восстановители могут быть удалены при помощи подходящих растворителей, и тогда действие оксидазы выявляется.

**Приготовление.** В отличие от уже известных способов приготовления оксидаз<sup>10</sup> Словцов<sup>11</sup> применял для выделения оксидазы из картофеля комбинированный метод, основанный на повторном осаждении серноокислым аммонием, диализе и осаждении спиртом продукта, очищенного от серноокислого аммония. После длительного хранения в эксикаторе оксидаза экстрагировалась водой и вновь осаждалась спиртом.

**Свойства.** Известные до сих пор под названием оксидаз вещества представляют собою белковые (Словцов нашел 12.8% N и 0.53% S) соединения, содержащие марганец, более или менее устойчивые в зависимости от происхождения и от условий опыта. Нагревание и воздействие различных химических агентов — минеральные кислоты, щелочи, сулема, фтористый натрий, кремнефтористый натрий (Асо<sup>12</sup>) — инактивируют оксидазы. Данные, имеющиеся о поведении оксидаз при нагревании, противоречивы<sup>13</sup>. Повидимому, при температуре около 70° C они разрушаются. Согласно Вудсу<sup>14</sup>, оксидаза из табачного сока, инактивированная кипячением, регенерирует при стоянии на воздухе. Однако, если через 4 часа после первого кипячения табачный сок кипятить вторично, он окончательно теряет свои окислительные свойства. Вудс объясняет это тем, что оксидаза образуется из зимогена, который значительно устойчивее по отношению к нагреванию, чем активный фермент. Аналогичная точка зрения высказывается также Асо<sup>15</sup>. Следует еще отметить, что препарат оксидазы тем чувствительнее к нагреванию и другим воздействиям, чем он чище.

Окислительное действие оксидаз распространяется на довольно большое число веществ, однако произведенное окисление ни в коем случае нельзя рассматривать как далеко идущее. Окисление в основном ограничивается удалением двух атомов водорода с образованием воды и в некоторых случаях присоединением одного атома хлорода. Так, например, гидрохинон окисляется в хинон, пирогаллол — в пурпурогаллин, салициловый альдегид — в салициловую кислоту. К этому же и относится установленный Шоде и Бахом<sup>16</sup> факт, что оксидазы обладают способностью выделять иод из подкисленного иодистого калия. Однако в некоторых случаях наблюдается более энергичное окисление. Казнев<sup>17</sup> указывает, что эноксидаза медленно окисляет спирт и сложные эфиры с выделением углекислоты. Согласно Бертрану<sup>18</sup> при окислении пирогаллола посредством лакказы происходит значительное выделение углекислоты. Это наблюдение было подтверждено Бахом и Шоде<sup>19</sup>.

В качестве новых реактивов на оксидазы Грюсс<sup>20</sup> предложил тетраметилпарафенилендиамин Вурстера<sup>21</sup>, сам по себе или в присутствии углекислого натрия, Кастл и Шмид<sup>22</sup> предложили фенолфталин. Последний

окисляется под действием оксидаз в фенолфталеин, который затем уже может быть определен колориметрически.

**Теория действия оксидаз.** После того как Бертран нашел, что зола лакказы содержит марганец и что окислительная способность оксидазы пропорциональна содержанию в ней марганца, он предложил для объяснения действия оксидазы следующую теорию<sup>23</sup>: оксидазы представляют собою белковые соединения марганца, способные диссоциироваться гидролитически, в которых марганец в виде закиси играет роль переносчика кислорода. Неактивная молекула кислорода расщепляется закисью марганца таким образом, что один атом кислорода идет на образование двуокиси марганца, в то время как другой переносится на окисляемое вещество (пирогаллол, гидрохинон и т. д.). Образовавшаяся двуокись марганца затем разлагается кислым радикалом оксидазы с выделением кислорода и регенерированием первоначального соединения. Эта теория опирается, таким образом, на известное представление Гопше-Зейлера<sup>24</sup> об активации кислорода и вызывает те же возражения, которые были высказаны по поводу последней теории.

Представлению Гопше-Зейлера об активации кислорода путем расщепления молекулы кислорода и освобождения атомного кислорода Бах<sup>25</sup> противопоставил перекисную теорию, согласно которой при действии молекулярного кислорода на окисляемое вещество под действием избыточной энергии последнего сначала распадается только одна из связей молекулы кислорода. Таким образом, в качестве первичных продуктов окисления всегда образуются перекиси типа перекиси водорода, которые более или менее устойчивы в зависимости от условий и в большинстве случаев превращаются в присутствии воды в перекись водорода. Часто наблюдающаяся в процессах медленного окисления активация кислорода основана, следовательно, на промежуточном образовании перекиси, а не на прямом расщеплении молекулы кислорода на свободные атомы. Так как окислительные процессы, происходящие в живых организмах, можно рассматривать только как явления медленного окисления, Бах попытался перенести на них перекисную теорию и, в частности, предположил, что оксидазы могут быть только легкоокисляемыми веществами, образующими перекиси. Через пять лет Касти и Левенгардт<sup>26</sup>, а также Энглер и Велер<sup>27</sup> определенно высказались в пользу перекисной природы оксидаз.

Правильность этих взглядов была подвергнута в последнее время Бахом и Шоуда<sup>28</sup> экспериментальной проверке. Для более детальной характеристики перекисей, образующихся при действии воздуха на оксидазы, они обрабатывали свежий сок *Lathraea squamaria*, содержащий оксидазу, током чистого воздуха, прибавляя по каплям 1%-ный раствор баритовой воды; при этом получился осадок барита, который не давал после промывания и разложения разбавленной серной кислотой известной реакции на перекись водорода с серноокислым раствором титановой кислоты, однако давал интенсивное синее окрашивание с иодокрахмальным реактивом. Так как присутствие азотистой кислоты не могло быть доказано при помощи реакции Грисса, то выделение иода из иодистого калия нужно было приписать замещенной перекиси водорода<sup>29</sup>. Аналогичный опыт, поставленный с соком *Lathraea*, ставшим неактивным при хранении, дал отрицательный результат. Таким образом, образование перекиси водорода при обработке активного сока баритовой водой должно было зависеть от присутствия оксидазы. Тот факт, что сок различных растений, окрашивающий в синий цвет гваяковую настойку, обладает также свойством выделять иод из иодистого калия, был уже доказан Шенбейном<sup>30</sup>. Однако представляло интерес выяснить, имеются ли перекисные соединения не только в выделенном соке, но также и в живой клетке, ибо Пфеффер<sup>31</sup> высказал

предположение, что окислительные процессы, наблюдающиеся в растительных соках и основанные на активации кислорода, представляют собою исключительно посмертные явления. Обработывая под микроскопом чистым раствором иодистого калия препараты картофеля, содержащие оксидазу, и подвергая их последующему плазмолизу посредством гипертонических растворов соли, Бах и Шода<sup>32</sup> смогли доказать, что выделение иода из иодистого калия, т. е. образование перекисей, имеет место также и при жизни клетки. Позже Бах и Шода<sup>33</sup>, выделив из грибов (*Russula foetans*, *Lactarius vellereus*) оксидазу, которая наряду с известными реакциями на оксидазы обладала и резко выраженной способностью выделять иод из иодистого калия, доказали, что эта способность принадлежит именно оксидазе, а не какой-либо другой составной части растений. После нагревания или отравления оксидаза совершенно не давала реакции с иодистым калием и крахмалом.

Одновременно с этим Бах и Шода<sup>34</sup> сделали важное наблюдение, что оксидазы (оксигеназы) различного происхождения активируются пероксидазами по отношению к гваяковой реакции, к выделению иода из иодистого калия или к окислению пирогаллола совершенно так же, как и перекись водорода и другие перекиси. Пероксидазы готовились сначала из тыквы (*Cucurbita Pepo*), а затем из хрена (*Cochlearia armorica*). Оказалось, что они содержат марганец, но несмотря на это не оказывают ни малейшего окислительного действия в отсутствие перекиси. Это было несовместимо со взглядами Бертрана на роль марганца при действии оксидазы, и поэтому возникал вопрос, являются ли вообще так называемые оксидазы однородными ферментами или смесями пероксидаз с соединениями, аналогичными перекисям. Опыты Шода и Баха<sup>35</sup> с полной достоверностью доказали, что правильно именно последнее предположение.

Путем фракционированного осаждения спиртом можно разложить оксидазу, извлеченную из *Russula* и *Lactarius*, на две главные фракции, из которых одна обладает окислительными свойствами лишь в слабой степени, а другая совершенно не обладает ими. Первая из них (оксигеназа) энергично активируется пероксидазами различного происхождения, последняя сама активирует перекись водорода, а также оксигеназы, более или менее свободные от пероксидазы. Оксигеназа из грибов активируется выделенной из тех же грибов пероксидазой значительно энергичнее, чем пероксидазой из хрена. Соответственно этому первая также значительно слабее активирует перекись водорода, чем вторая. Таким образом, в растениях существуют, по крайней мере две пероксидазы.

Если принять, что оксидазы являются смесью веществ, образующих и активирующих перекиси, легко объясняется тот факт, что очень многие растения не дают реакции на оксидазу, в то время как почти нет растений, которые совершенно не содержат пероксидазы. В качестве перекисей оксигеназы более или менее устойчивы в зависимости от природы радикалов, которые связаны с характерной для перекисей группой —O—O—. Менее устойчивые оксигеназы, т. е. такие, которые легко превращаются в  $H_2O_2$  в присутствии воды, потребляются в процессе дыхания немедленно после поглощения кислорода и не могут быть непосредственно обнаружены. Пероксидазы, исключительная устойчивость которых наблюдалась различными авторами, сохраняются в тканях растений и всегда могут быть обнаружены при помощи перекиси водорода.

Кроме окислительных ферментов, содержащих марганец, повидимому, существуют еще окислительные ферменты, содержащие железо. Сарту<sup>36</sup> приготовил такой фермент из *Schinus molle* и назвал его шиноксидазой. Он предполагает, что могут существовать также окислительные ферменты, содержащие медь.

## ПЕРОКСИДАЗЫ

Уже в 1856 г. Шенбейн<sup>37</sup> установил тот факт, что в животном и растительном мире чрезвычайно распространены органические соединения типа ферментов, которые активируют перекись водорода и другие перекиси, образующиеся при самопроизвольном окислении различных органических соединений (эфир, спирт, терпентиновое масло и т. д.) таким же точно образом, как платиновая чернь и сернокислая закись железа. Так, например, он нашел, что растворы перекисей, которые сами по себе не окрашивают гваяковой настойки или подкисленного иодокрахмального раствора, немедленно давали с этими реактивами темносинее окрашивание при прибавлении кровавых шариков или солодового экстракта. Согласно взглядам Шенбейна, перекиси активируются теми же самыми веществами, которые разлагают каталитически перекись водорода с выделением кислорода. Все исследователи, которые с тех пор занимались этим вопросом, принимали эту точку зрения, и только в последнее время было доказано Левом<sup>38</sup> с полной достоверностью, что способность разлагать каталитически перекись водорода принадлежит специальному ферменту — каталазе. Этим самым одновременно доказывалась индивидуальность фермента, активирующего перекиси. Линосье<sup>39</sup>, который выделил фермент, активирующий перекись водорода, из гноя и исследовал его свойства, назвал его *пероксидазой*. Буркло<sup>40</sup> считал это название неподходящим, так как оно должно было бы обозначать более энергичный окислительный фермент, чем оксидаза. Однако это возражение Буркло не обосновано, ибо, согласно обычной номенклатуре ферментов, пероксидаза должна обозначать фермент, действующий на перекиси.

**П р и г о т о в л е н и е.** Растительные пероксидазы до сих пор приготавливались таким образом, что препараты, содержащие одновременно оксидазы и пероксидазы, нагревались до температуры разрушения оксидаз. Асо<sup>41</sup> предложил применять фракционированное осаждение жидкости, содержащей оксидазы и пероксидазы, спиртом, в котором пероксидазы сравнительно растворимы, или отравление оксидаз фтористым или кремнефтористым натрием, по отношению к которым пероксидаза мало чувствительна. Ввиду того что существуют растения, совершенно не дающие реакции на оксидазы, но содержащие значительное количество пероксидазы, Бах и Шода<sup>42</sup> пытались найти такое растительное сырье, которое подходило бы для непосредственного приготовления пероксидазы. Таким материалом оказались плоды тыквы и корни хрена. Тонко измельченные куски хрена оставлялись на несколько часов и затем обрабатывались в течение нескольких дней 80%-ным спиртом, который растворяет эфирные составные части хрена. Красный спиртовой раствор сливался, а оставшаяся масса несколько раз промывалась 80%-ным спиртом и, наконец, подвергалась экстракции 40%-ным спиртом. Экстракты, дающие резко выраженную реакцию на пероксидазу, сильно упаривались в вакууме при 30°C, фильтровались и осаждались абсолютным спиртом. Выход очень незначителен.

**С в о й с т в а.** Пероксидаза из хрена представляет собою гигроскопическую массу, растворимую в воде, не дающую реакции на белки. Неочищенная пероксидаза всегда содержит восстанавливающее сахаристое соединение, которое можно полностью выделить путем повторного растворения в воде и осаждения абсолютным спиртом.

При нагревании раствора с щелочью сначала выделяется аммиак, а затем основание с запахом пиридина. Чистейшие препараты пероксидазы не содержат железа, но содержат марганец и алюминий. Не удалось выяснить, в каком виде связан марганец. Пероксидаза диализует медленно, но заметно.

В соответствии с данными Вудса<sup>43</sup>, пероксидаза, инактивированная кипячением, регенерирует через несколько часов. В спиртовом растворе она необратимо разрушается при кипячении. Аналогичное явление наблюдалось Асо<sup>44</sup> и с другими пероксидазами.

В отсутствии перекиси пероксидаза не оказывает ни малейшего окисляющего действия. Противоположный взгляд, высказанный Левом<sup>45</sup>, вероятно, основан на том, что он применял в своих опытах не свежеприготовленный пирогаллол, а уже частично окисленный, т. е. содержащий перекись. Свежеприготовленная гваяковая настойка не окрашивается пероксидазой; однако гваяковая настойка, простоявшая лишь несколько часов, окрашивается более или менее интенсивно в синий цвет раствором пероксидазы. Как уже было доказано Шенбейном<sup>46</sup>, пероксидаза активирует перекись водорода не только по отношению к гваяковой настойке, но и к крахмальному раствору с иодистым калием. Она также активирует все перекиси, образующиеся при окислении органических соединений воздухом. Новые данные Линосье<sup>47</sup>, Гунгера<sup>48</sup>, а также Баха и Шода<sup>49</sup> только подтверждают наблюдения, сделанные уже Шенбейном.

Как было упомянуто выше, в растениях существуют по крайней мере две пероксидазы. Одна из них активирует оксигеназы энергичнее, чем перекись водорода, а другая обладает противоположным свойством. Этот факт был установлен Бахом и Шода<sup>50</sup> не только качественно, но также и количественно. Из опытов, относящихся к поведению пероксидазы по отношению к различным цветным реакциям (гваяковая настойка, гваякол, парафенилендиамин, тетраметилпарафенилендиамин в присутствии  $H_2O_2$ ), Асо<sup>51</sup> выводит также заключение, что в растениях существуют по меньшей мере две пероксидазы.

Фермент, описанный Рацборским<sup>52</sup> под названием лептомин, представляет собою не что иное, как пероксидазу.

### КАТАЛАЗЫ

Как было указано выше, Левом<sup>53</sup> впервые было установлено, что давно известная способность различных объектов животного и растительного происхождения разлагать каталитически перекись водорода с выделением молекулярного кислорода связана с присутствием определенного фермента, названного каталазой.

**П р и г о т о в л е н и е.** Каталаза первоначально готовилась из листьев табака путем осаждения водного экстракта серноокислым аммонием. Этот метод пригоден также и для приготовления каталаз из других материалов. Отфильтрованные питательные жидкости из культур *Penicillium glaucum* дают при осаждении серноокислым аммонием очень активные препараты каталазы.

**С в о й с т в а.** Согласно Леву, в растениях существуют две каталазы: одна из них не экстрагируется водой ( $\alpha$ -каталаза), другая растворяется в воде ( $\beta$ -каталаза).

Однако, как было уже указано Поцци-Эско<sup>54</sup>, это разграничение не вполне обосновано, так как оно не объясняет того известного факта, что ферменты исключительно энергично связываются нерастворимыми веществами. Лев рассматривает  $\alpha$ -каталазу как нуклеопротеид и  $\beta$ -каталазу как альбумозу. Очень разбавленные кислоты действуют на обе каталазы задерживающе, разбавленные щелочи активируют их. Температура разрушения каталазы, повидимому, находится около  $80^\circ C$ .

Каталазы представляют собой, согласно Леву, слабоокисляющие ферменты, хотя они не вызывают посинения гваяковой настойки ни сами по себе, ни в присутствии перекиси водорода. Так, например, ему удалось

окислить при посредстве  $\beta$ -каталазы гидрохинон в хинон, присутствие которого можно было обнаружить по запаху. Поцци-Эско не смог подтвердить это наблюдение. Действительно, доказательство, которое Лев приводит в пользу окисляющих свойств каталазы (запах хинона), кажется нам мало убедительным.

Что касается идентификации каталазы, то Поцци-Эско<sup>55</sup> утверждает, что она представляет собою не что иное, как открытую Рей-Пэладом<sup>56</sup> гидрогеназу (или филотион), которая превращает серу в сероводород. Поцци-Эско испытал различные препараты гидрогеназы на способность разлагать перекись водорода с выделением кислорода и нашел, что они были еще активнее, чем каталаза Лева. Но поскольку гидрогенирующие вещества, как известно, очень быстро используют активный кислород перекиси водорода с образованием воды, то не вполне ясно, каким образом гидрогеназа, всегда выделяющая, согласно автору, водород *in statu nascendi*, может разлагать перекись водорода с выделением кислорода. По всей вероятности, гидрогеназы не имеют ничего общего с каталазами.

### ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ

Со времени Шенбейна почти все авторы, занимавшиеся этим вопросом, принимают, что окислительные ферменты, известные до сих пор под названием оксидаз, играют существенную роль в процессах дыхания, окисляя трудно окисляемые вещества живой клетки. Только Лев<sup>57</sup>, согласно которому неустойчивое состояние живой протоплазмы обуславливает способность окисляемых веществ непосредственно присоединять кислород и окисляться, предполагает, что функция оксидаз ограничивается обезвреживанием вредных продуктов распада типа фенолов, образующихся при частичном окислении.

Использование пероксидаз (или косвенных оксидаз) в процессах дыхания предполагает наличие перекиси водорода и других перекисных соединений в живом организме, что, однако, оспаривалось очень энергично различными исследователями, такими, как Лев, Пфеффер и др. Здесь не место вдаваться подробнее в критическое изложение этого вопроса. Следует, однако, отметить, что Лев<sup>58</sup> предполагает, что повсеместное распространение каталазы является новым аргументом против перекисной теории дыхания.

Исходя из предположения, что перекись водорода является сильным ядом для протоплазмы, Лев допускает, что функцией каталазы является энергичное разрушение малейших следов этого яда, который может образовываться в качестве побочного продукта при дыхании. Таким образом, он отрицает за перекисью водорода какую бы то ни было физиологическую роль и считает, что в протоплазме вряд ли стал бы образовываться специальный фермент, обладающий функцией разрушать вещество, которое может быть полезно для клетки.

Шода и Бах<sup>59</sup> доказали, однако, с полной достоверностью, что чистую перекись водорода никак нельзя во всех случаях рассматривать как яд для протоплазмы, ибо им удалось довести до полного развития некоторые грибы в питательных средах, с постоянным содержанием  $H_2O_2$  до 0.68%. Если приводить телеологические аргументы, то можно было бы заключить из повсеместного распространения пероксидазы о повсеместном использовании перекисей для целей окисления в живой клетке, ибо неизвестна никакая другая функция пероксидазы, кроме активирования перекисей. Образование перекисей в живой клетке было, однако, доказано Бахом и Шода значительно более надежным методом.

Если исходить из той точки зрения, что законы самопроизвольного окисления применимы также и к окислительным процессам, протекающим в живой клетке, то можно резюмировать следующим образом наши современные знания о физиологической роли окислительных ферментов<sup>60</sup>.

Образование перекисей в качестве неизбежной фазы окисления свободным кислородом принадлежит к числу постоянных факторов, которые, как свет, теплота и т. д., играют определенную роль в жизни клетки и к которым живая клетка должна определенным образом приспосабливаться. Это приспособление к перекисям происходит таким образом, что клетка создает ферменты, посредством которых образование перекисей может быть использовано, а в случае необходимости — сделано безвредным. Чтобы иметь источник перекисного кислорода, не зависящий от света, теплоты и т. д., клетка создает оксигеназу, которая присоединяет молекулярный кислород с образованием перекиси. Однако, при имеющихся в клетке разведениях, оксигеназы, так же как и другие более или менее регулярно образующиеся перекиси, реагируют чрезвычайно медленно, но благодаря тому, что они очень интенсивно активируются пероксидазами, так же как перекись водорода закисными солями железа, они становятся способны к более энергичному окислению. В определенных условиях, особенно благоприятных для образования перекисей, количество последних может превосходить потребности клетки и даже становиться вредным. В этом случае проявляется функция каталазы. Разлагая с выделением инертного кислорода перекись водорода, являющуюся наиболее распространенным продуктом превращения перекисей, каталаза действует не только как регулятор окислительных процессов, но и как фактор, превращающий в теплоту химическую энергию, содержащуюся в перекисях.

Это толкование роли окислительных ферментов в жизни организмов можно рассматривать пока еще только как гипотезу, дальнейшая разработка которой может привести к рациональной теории дыхания. Ее основным достоинством является то, что она пытается объяснить окислительные процессы, протекающие в клетке, независимо от более или менее метафизических представлений о действии протоплазмы.

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Bouguelot. C. R. Soc. Biol., 402 (1897).
2. Gruss. Ber. Dtsch. bot. Ges., 16, 129.
3. Бах совм. с Шода. Ber. Dtsch. chem. Ges., 36, 606 (1903); настоящая книга, стр. 353.
4. Schönbein. Abhandl. Münch. Akad. Wiss., 7, 723; Erdmanns Journ., LXVIII, 496; Basler Verh., I, 399; V, 3; Vierardt. Arch. physiol. Heilk., I, (1856); Zs. Biol., III, 325.
5. Yoshida. J. Chem. Soc., 43, 472 (1883).
6. Bertrand. C. R. Acad. Sci., Paris, 118, 1215 (1894).
7. Hunger. Bull. Inst. Bot. Buitenz., 8, 35, 1901; Ber. Dtsch. bot. Ges., 19, 374, 1901.
8. Aso. Bull. Coll. Agric. Tokyo, 5, 2, 230.
9. Pozzi-Escott. C. R. Acad. Sci., Paris, 134, 479 (1902).
10. Oppenheim. Die Fermente (1900); Green-Windish. Die Enzyme, 295 (1901), Berlin.
11. Словцов. Zs. physiol. Chem., 31, 227.
12. Aso. Bull. Coll. Agric. Tokyo, 5, 2, 226 (1902).
13. Асо (l. c., стр. 220--221) дает сводку известных до настоящего времени данных.
14. Woods. U. S. Dept. Agric. Bull., No 17, 18.
15. Aso. L. c. 12.
16. Бах совм. с Шода. Ber. Dtsch. chem. Ges., 35, 3943 (1902); настоящая книга, стр. 346.
17. Caze neuve. C. R. Acad. Sci., Paris, 124, 406 (1897).
18. Bertrand. Bull. Soc. Chim., 13, 361, 1895.



19. Бах совм. с Шода. *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **36**, 600, 1903; настоящая книга, стр. 349.
20. Grüss. *Woch. f. Brauer*, 310 (1901).
21. Wuster. *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **21**, 1526 (1888).
22. Schmied. *Amer. Chem. J.*, **26**, 527 (1901).
23. Bertrand. *C. R. Acad. Sci., Paris*, **124**, 1356 (1897).
24. Норре-Сейлер. *Zs. physiol. Chem.*, **2**, 1; *Pflüg. Arch.*, **12**, I, 1876.
25. Бах. *C. R. Acad. Sci., Paris*, **124**, 951 (1897); настоящая книга, стр. 242.
26. Loewenhardt. *Amer. Chem. J.*, **26**, 539 (1901).
27. Engler u. Wöhler. *Zs. anorg. Chem.*, **29**, 1, 1902.
28. Бах совм. с Шода. *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **35**, 1275, 2466, 3943 (1902); **36**, 600, 606, 1757 (1903); настоящая книга, стр. 341, 344, 346, 349, 353, 355.
29. Вауер u. Villiger. *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **33**, 858, 1569 (1900).
30. Schönbein. *Zs. Biol.*, **3**, 325; *Basler Verh.*, **5**, 3.
31. Pfeffer. *Ber. Dtsch. bot. Ges.*, **7**, 82.
32. Бах совм. с Шода. *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **35**, 2466 (1902); настоящая книга, стр. 344.
33. Бах совм. с Шода. *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **35**, 3943 (1902); настоящая книга, стр. 346.
34. Бах совм. с Шода. *L. c.* (32).
35. Бах совм. с Шода. *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **36**, 606 (1903); настоящая книга, стр. 353.
36. SARTHOU. *J. Pharm. Chim.* (6), **11**, 482; **12**, 194; **13**, 464.
37. Schönbein. *Erdmanns Journ.*, **LXV**, 96; **LXXV**, 8; **LXXXIX**; 323; *Basler Verh.*, **I**, 229; **II**, 9; **III**, 697; **V**, 34.
38. Löw. *U. S. Dept. Agric. Rep. N. 68* (1901).
39. Linossier. *C. R. Soc. Biol.*, **5**, 373 (1898).
40. Bourquelot. *C. R. Soc. Biol.*, **5**, 381 (1898).
41. Aso. *Bull. Coll. Agric., Tokyo*, **5**, 2, 233 (1902).
42. Бах совм. с Шода, *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **36**, 600 (1903); настоящая книга, стр. 349.
43. Woods. *U. S. Dept. Agric. Bull. No 8*.
44. Aso. *Bull. Coll. Agric. Tokyo*, **5**, 2, 222 (1902).
45. Löw. *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **35**, 2487 (1902).
46. Schönbein. *Basler Verh.* **I**, 467.
47. Linossier. *L. c.* (39).
48. Hunger. *L. c.* (7).
49. Бах совм. с Шода. *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **36**, 600 (1903); настоящая книга, стр. 349.
50. Бах совм. с Шода. *L. c.* (35).
51. Aso. *Bull. Coll. Agric. Tokyo*, **5**, 2, 218 (1902).
52. Рациборский. *Ber. Dtsch. bot. Ges.*, **16**, 52, 119.
53. Löw. *U. S. Dept. Agric. Bull. No 68* (1901).
54. Pozzi-Escot. «Oxydases et réductases», 99, Paris (1902).
55. Pozzi-Escot. *C. R. Acad. Sci., Paris*, **134** (1902); *Bull. Soc. Chim.*, **28**, 282.
56. Reu-Pailhade. *C. R. Acad. Sci., Paris*, **106**, 1683 (1888).
57. Löw. «*Chemie der lebenden Zelle*» (1900).
58. Löw. *L. c.* (57).
59. Бах совм. с Шода. *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **35**, 2466 (1902); настоящая книга, стр. 344.
60. Бах совм. с Шода. *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **35**, 1275 (1902); настоящая книга, стр. 341.

---

## НОВЫЕ РАБОТЫ В ОБЛАСТИ РАСТИТЕЛЬНЫХ И ЖИВОТНЫХ ОКСИДАЗ И ПЕРОКСИДАЗ

[*Neuere Arbeiten auf dem Gebiete der pflanzlichen und tierischen Oxydasen  
und Peroxydasen*] \*

Согласно современным взглядам на природу ферментативных процессов, оксидазы и пероксидазы следует рассматривать как органические катализаторы (Оппенгеймер), участвующие в окислительных процессах, протекающих в растительных и животных организмах. Они отличаются друг от друга тем, что оксидазы производят окислительное действие, перенося молекулярный кислород на окисляемые вещества, в то время как пероксидазы производят то же самое окислительное действие только посредством перекиси водорода или органических перекисей. На основании имеющихся данных, следует считать, что оксидазы являются не индивидуальными ферментами, а смесью оксигеназ и пероксидаз (Бах и Шода<sup>1</sup>). Оксигеназы представляют собою легкоокисляемые вещества, поглощающие молекулярный кислород с образованием промежуточных перекисей. Пероксидазы активируют образующиеся таким образом перекиси, а также и другие перекиси, приготовленные искусственно. Эти взгляды находятся в полном соответствии с современными представлениями о механизме медленного окисления. Являются ли оксигеназы действительно веществами, аналогичными ферментам, до сих пор окончательно не выяснено. В этом отношении номенклатура Баха и Шода не безупречна.

### ОКСИДАЗЫ

#### Растительные оксидазы

Исаев<sup>2</sup>, в полном согласии с предшествующими авторами (Толомей, Бюхнер, Эфрон, Грюс), нашел в дрожжах оксидазу, которая осаждается спиртом и разрушается при нагревании. Она содержит железо, но совершенно не содержит марганца. Дрожжи верхнего брожения содержат больше оксидазы, чем дрожжи нижнего брожения. Препараты оксидазы, приготовленные из глицериновых экстрактов дрожжей, поглощают кислород и выделяют углекислоту. Между поглощением кислорода и выделением углекислоты существует определенное соотношение. Эта оксидаза, повидимому, и обуславливает процессы окисления в дрожжах.

Исаев<sup>3</sup> исследовал также оксидазу, содержащуюся в зернах ячменя. При прорастании зерен действие оксидазы непрерывно возрастает в тече-

---

\* Biochem. Cbl., 9 (1909).

ние первых семи дней и становится постоянным, начиная с восьмого дня. Автор предполагает, что оксидаза играет существенную роль в процессе прорастания.

Нестлер<sup>4</sup> приписывает посинение плодов *Juniperus communis* окисляющему действию некоторых грибков (*Aspergillus*), которые действуют как на зрелые, так и на незрелые плоды. Ленднер<sup>5</sup> окончательно доказал, что посинение вызывается окислительными ферментами. Плоды дают слабую реакцию на оксидазу и интенсивную реакцию на пероксидазу. На основании более подробного исследования этих процессов автор приходит к выводу, что посинение вызывается соединенным действием пероксидазы и кислорода воздуха. Перекиси, необходимые для действия пероксидазы, образуются из дубильных веществ, находящихся в больших количествах в плодах. Фаррион<sup>6</sup> высказал также предположение, что дубильные вещества растений являются веществами, образующими перекиси.

Обширные исследования о «дыхательных ферментах» были выполнены в течение последних лет Палладиным<sup>7-7в</sup>. Автор исходил из соображения, что ни метод, основанный на применении отпрессованного сока, ни метод, основанный на применении ацетоновых вытяжек препаратов, не может дать полной картины ферментативных процессов дыхания, протекающих в высших растениях. В первом случае не принимается во внимание остаток после отпрессовывания, содержащий вещества, не растворимые в соке; во втором случае происходит энергичное обезвоживание, вызывающее существенное нарушение нормального состояния. Для своих опытов автор вымораживал неповрежденные части растений. С ними последовательно производились следующие операции:

- 1) оттаявшие объекты обрабатывались сначала в U-образной трубке током водорода, причем определялась выделяющаяся углекислота;
- 2) после прекращения выделения углекислоты через прибор пропускался ток воздуха и вновь определялась образовавшаяся углекислота;
- 3) объекты затем растирались в ступке, масса заливалась в эрленмейеровской колбе 20%-ным раствором пирогаллола и вновь обрабатывалась током воздуха; снова измерялась выделяющаяся углекислота;
- 4) наконец, после прекращения выделения углекислоты в колбу прибавлялся 3%-ный раствор перекиси водорода и определялось количество образовавшейся углекислоты.

Первая операция дает количество углекислоты, которое данные объекты в состоянии выделить в анаэробных условиях. Фермент (или ферменты? — А. Б.), вызывающий это выделение углекислоты, называется автором *карбоназой*. Вторая операция дает количество углекислоты, образующееся под влиянием кислорода воздуха при содействии окислительного фермента, за счет окисляющихся веществ растения. Автор называет этот фермент *оксидазой* и считает, что он отличен от обычной оксигеназы и пероксидазы (в смысле Баха и Шода). В третьей операции определяется количество углекислоты, образующееся при одновременном действии оксигеназы и пероксидазы, содержащихся в объектах (автор присоединяется к теории Баха и Шода). Количество углекислоты, полученное в четвертой операции, определяет избыток пероксидазы. Суммарное количество углекислоты, полученное в третьей и четвертой операциях, дает представление об активности пероксидазы.

Многочисленные сравнительные опыты позволили установить следующие данные, характеризующие действие окислительных ферментов:

1. Действие анаэробных ферментов (карбоназа) подготавливает вещество для последующих окислительных процессов. При недостатке окисляющегося вещества карбоназа разрушается оксидазой.

II. Объекты, выращенные на сахаре и затем убитые вымораживанием (листья), выделяют в токе воздуха больше углекислоты, чем объекты, не получавшие сахара. То же самое относится к количеству углекислоты, выделяющейся после прибавления пирогаллола и перекиси водорода.

III. Зародыши в зернах содержат большие количества пероксидазы и лишь незначительные количества оксигеназы.

IV. Фермент, временно названный *оксидазой*, почти полностью отсутствует в эмбриональных органах. Он появляется при переходе к активной жизни, и его количество уменьшается в органах, когда их рост прекращается.

В связи с этими исследованиями нужно еще упомянуть работу Красносельской<sup>8</sup> об образовании дыхательных ферментов в поврежденных луковичах *Allium sera*. Луковицы разделялись на четыре части, в которых через различные промежутки времени (1, 4, 7 и 10 дней после повреждения) определялись дыхательные ферменты по описанному выше методу Палладина. На основании этих опытов автор приходит к следующим выводам:

I. Поврежденные и замороженные луковицы не содержат оксигеназ.

II. Количество пероксидазы возрастает с той же закономерностью, как и интенсивность дыхания. Однако, когда интенсивность дыхания начинает падать, количество пероксидазы продолжает возрастать.

В дальнейшей серии работ Палладин<sup>9-9ж</sup> выдвигает теорию о роли растительных хромогенов и пытается ввести в растительную физиологию новое понятие о «дыхательных пигментах». Окрашенные на воздухе хромогены могут обесцвечиваться как химическими восстановителями (сернистый аммоний, сернистый ангидрид, цинк и уксусная кислота), так и тканями растений, убитыми хлороформом. На основании этих наблюдений Палладин приходит к выводу, что при совместном действии оксидаз и кислорода воздуха хромогены связывают кислород аналогично гемоглобину крови. Этот накопленный кислород может затем выделяться из «дыхательных пигментов» под действием «специальных ферментов, так называемых редуктаз»; при этом регенерируют первоначальные хромогены. Попеременное окисление и восстановление хромогенов можно считать идентичным по физиологическому значению с процессом, протекающим в крови животных, что и дало автору повод говорить о «крови растений»<sup>9а</sup>. Для того чтобы подчеркнуть эту тождественность, Палладин предлагает называть все дыхательные ферменты *фитогематинами*.

Следует заметить, что аналогия между красящим веществом крови и растительными хромогенами является весьма сомнительной, ибо и химическая природа этих веществ и характер связи кислорода в обоих случаях совершенно различны. Между гемоглобином и пигментами растений общим является только наличие окраски; необходимо, однако, отметить, что в большинстве случаев хромогены остаются почти совершенно бесцветными во время жизни растений. Но и независимо от этого представления Палладина сами по себе недостаточно ясны. Он считает, что кислород воздуха связывается в хромогенах посредством оксидаз и затем выделяется из них редуктазами с возрождением первоначальных соединений. Редуктазы рассматриваются, однако, как вводящие водород катализаторы, на которые кислород воздуха чрезвычайно легко действует непосредственно, так что, согласно Палладину, сложная работа оксидаз вызывает лишь только то, что кислород воздуха может выполнять и без участия оксидаз.

В заключение Палладин предлагает дополнить теорию Баха и Шода в том отношении, что «вместо гипотетических оксигеназ надо допустить

в процессах дыхания участие распространенных повсеместно дыхательных хромогенов». Что хромогены в качестве легкоокисляемых веществ присоединяют молекулярный кислород с образованием перекисей, не подлежит никакому сомнению, но они безусловно являются не единственными веществами, образующими перекиси в растениях.

В связи с изучением японского лака Чирх и Стивенс<sup>10</sup> провели некоторые наблюдения над оксидазой (лакказой), содержащейся в соке лакового дерева. Им не удалось очистить оксидазу от камедобразных веществ и, с другой стороны, получить последние свободными от азота. Поэтому они допускают, что имели в данном случае дело с соединением оксидазы с камедью, а не с их смесью. Камедь, содержащая оксидазу, не могла быть освобождена от азота даже путем гидролиза крепкими кислотами. Авторы наблюдали далее, что обнаружить азот в лакказе не удавалось при помощи обычной реакции Лассэнья, а только при помощи пирроловой реакции: при нагревании лакказы со щелочью должен выделяться исключительно пиррол, а не аммиак, как это считает Бертран<sup>11</sup>. В противоречии с этим Бах<sup>12</sup> указывает, что в оксидазе из грибов, так же как в пероксидазе из хрена, очень легко обнаружить присутствие азота при помощи реакции Лассэнья, если только применять металлический калий (а не натрий) в достаточном количестве. При нагревании оксидазы с металлическим калием выделяются пары, дающие пирроловую реакцию и обладающие резко щелочной реакцией. Ввиду того, что пиррол имеет кислую, а не щелочную реакцию, предложение Чирха и Стивенса, что пиррол является единственным азотистым продуктом перегонки пероксидаз, совершенно неправильно.

В своих исследованиях по выделению иода из иодистоводородной кислоты свежими тканями растений Бах и Шода<sup>13</sup> установили, что между гваяковой реакцией на оксидазу и выделением иода из иодистоводородной кислоты существует полный параллелизм в отношении интенсивности реакции и локализации окислительного вещества. Они сделали из этого вывод, что в обоих случаях реакции определяются одной и той же оксидазой. Этот вывод был впоследствии подтвержден тем, что они приготовили из грибов оксидазу<sup>14</sup>, обладающую, наряду с обычными реакциями на оксидазы, способностью выделять иод из иодистоводородной кислоты. Асо<sup>15</sup> пытался, со своей стороны, доказать, что вещество, вызывающее выделение иода из иодистоводородной кислоты, отлично от оксидазы. Он получил из *Sagittaria sagittifolia* сок, который давал как гваяковую, так и иодокрахмальную реакцию. После нагревания сока первая реакция исчезла, в то время как вторая сохранилась. Ввиду того, что сок содержал нитриты, Асо считает, что выделение иода из иодистоводородной кислоты можно приписать действию азотистой кислоты.

Шода и Бах<sup>16</sup> при проверке опытов Асо нашли, что после короткого нагревания сока из *Sagittaria sagittifolia* обе реакции сохраняются, но что обе они исчезают при более длительном нагревании. Присутствие нитритов не могло быть доказано в соке, обесцвеченном основным уксуснокислым свинцом. Клубни *Sagittaria sagittifolia*, которые Асо сам считает не содержащими нитрита, давали как гваяковую, так и иодокрахмальную реакцию. В заключение Шода и Бах приготовили из грибов очень активный, почти белый препарат оксидазы, который давал все реакции на оксидазы (включая выделение иода из иодистоводородной кислоты), но не давал с известными реактивами ни малейшей реакции на нитриты. Этим окончательно опровергается предположение Асо.

Во втором сообщении Асо<sup>17</sup> продолжает отстаивать свое предположение, не упоминая ни единым словом об опытах Шода и Баха, полностью его опровергающих.

Бах и Шода<sup>18</sup> установили при помощи соответственных опытов, что система «пероксидаза — перекись водорода» обуславливает те же окислительные реакции, как и непосредственные оксидазы. Буркло<sup>19</sup> подтвердил равноценность обеих окислительных систем на ряде соединений (гваякол, ванилин и т. д.). Согласно Кузену и Эриссей<sup>20</sup>, под действием оксидазы из грибов тимол дает белый осадок дитимола. Аналогичный осадок получается при действии на тимол пероксидазы с перекисью водорода.

Большой интерес представляет приведенное Бухнером и его сотрудниками<sup>21</sup> доказательство, что уксуснокислое брожение спирта определяется деятельностью оксидазы. Эту оксидазу, которая была названа алкогольоксидазой, можно получить из убитых ацетоном колоний уксуснокислых бактерий. Указанные авторы нашли в обработанных ацетоном уксуснокислых бактериях оксигеназу, пероксидазу и каталазу, и считают возможным, что алкогольоксидаза не является индивидуальным ферментом. Сок, получающийся при отжатии уксуснокислых бактерий под прессом, не оказывает никакого окисляющего действия на спирт в присутствии воздуха. Таким образом, алкогольоксидаза либо разрушается при приготовлении сока, либо, как нерастворимое вещество, остается в остатке после прессования.

Герцог и Мейер<sup>22</sup> доказали, что давно известное селективное окисление правой винной кислоты грибами плесени также основано на действии оксидазы. Путем обработки соответственных культур ацетоном они получили препараты, которые разрушают правую винную кислоту в присутствии кислорода воздуха, но действуют очень медленно на левую винную кислоту. При этом выделяется углекислота.

Многочисленные исследования были посвящены за последние годы тирозиназе — оксидазе, открытой Буркло и Бертраном<sup>23</sup>. Эта весьма распространенная в растительном и животном мире оксидаза окисляет тирозин с образованием черного пигмента, в то время как обыкновенная оксидаза (лакказы) не оказывает никакого действия на тирозин. Бертраи<sup>24</sup> нашел, что эти оксидазы можно разделить осторожным нагреванием, так как тирозиназа менее устойчива, чем лакказы. Однако позже Бертран и Муттермильх<sup>25</sup> нашли в клейковине зерен термоустойчивую тирозиназу. Тирозиназа окисляет не только тирозин, но и различные его производные (ангидрид тирозина, глицилтирозин [Шода и Штауб]<sup>26</sup>), различные фенолы, причем паракрезол принимает красно-желтое окрашивание, в то время как обыкновенные оксидазы и система «пероксидаза — перекись водорода» дают белый осадок (Шода и Штауб); при действии тирозиназы на смесь фенолов и аминокислот наблюдаются различные изменения окрашивания (Абдергальден и Гугенгейм<sup>27</sup>). Согласно Уилоку<sup>28</sup> действие тирозиназы из грибов не ослабляется облучением 50 мг бромистого радия. В некоторых случаях оно даже усиливалось.

Разница между действием лакказы и тирозиназы на тирозин позволяет предположить, что здесь имеет место специфическое действие фермента. Шода<sup>29</sup> впервые сделал наблюдение, что система «пероксидаза — перекись водорода», так же как обыкновенная оксидаза, не оказывает никакого действия на тирозин. Бах<sup>30</sup> подтвердил это наблюдение и приготовил из молодых картофельных клубней препарат тирозиназы, действие которого на тирозин можно было значительно ускорить прибавлением перекиси водорода. Естественно было предположить, что тирозиназа состоит, как обычная оксидаза, из пероксидазы и оксигеназы, которую можно заменить перекисью водорода. Разница в действии оксидаз должна, следовательно, соответствовать разнице между их пероксидазами. Ускорение действия некоторых препаратов тирозиназы перекисью водорода было сначала отмечено Жессаром<sup>31</sup>, подтверждено Бахом<sup>30</sup>, подвергнуто

сомнению Шода и Штаубом<sup>26</sup> и вновь подтверждено Фюртом и Иерузалемом<sup>32</sup>.

Этот факт, таким образом, можно считать твердо установленным, однако он не может служить доказательством сделанного выше предположения, ибо в последнее время Бахом<sup>33</sup> было с полной достоверностью доказано количественными опытами, что ускорение действия тирозиназы перекисью водорода зависит не от ускорения окисления тирозина, а от разрушения задерживающих реакцию веществ.

Для объяснения разницы между лакказой и тирозиназой можно в первую очередь привести гипотезу Гоннермана<sup>34</sup>, согласно которой тирозиназа является не окислительным, а гидролитическим ферментом, превращающим тирозин в гомогентизиновую кислоту. Известное почернение свежесквашенного сока он приписывает самопроизвольному окислению образовавшейся таким путем гомогентизиновой кислоты.

Шульце<sup>35</sup> не удалось, однако, доказать присутствия гомогентизиновой кислоты в свежесквашенном соке. К тому же тирозин имеется в нем только в ничтожном количестве. Гоннерман<sup>36</sup> отказался тогда от своей первой гипотезы и предположил, что из тирозина образуется под действием тирозиназы пирокатехин, самопроизвольное окисление которого в присутствии воздуха вызывает появление черной окраски в свежесквашенном соке.

Для того чтобы проверить гипотезу Гоннермана о гидролитических свойствах тирозиназы, Шода и Штауб<sup>6</sup> действовали тирозиназой на тирозин в течение одного часа в атмосфере углекислоты, но им не удалось получить даже качественно ускорения действия тирозиназы при последующем впуске воздуха. Бах<sup>33</sup> произвел аналогичные опыты, принимая все меры предосторожности. За ходом действия тирозиназы можно было следить количественно, путем титрования продукта реакции перманганатом калия, по методу, разработанному ранее Бахом<sup>37</sup>. Он нашел, что предварительная обработка тирозиназы тирозином в атмосфере водорода при 25° в течение 24 часов не оказывает никакого влияния на скорость последующего окисления смеси. Кипяченая смесь не окисляется ни кислородом воздуха, ни системой «пероксидаза — перекись водорода». Бах нашел далее, что эквимолекулярные смеси продуктов, которые могут образовываться при гидролитическом распаде тирозина в  $\gamma$ - и  $\beta$ -положении (фенолсерин или гидрохиноналанин, паракрезолоксиаминуксусная кислота или параоксифенилэтиловый спирт — гликоколь), не подвергаются действию ни тирозиназы, ни системы «пероксидаза — перекись водорода». Нейберг<sup>38</sup> доказал, что параоксифенилэтиламин, образующийся при расщеплении тирозина в  $\alpha$ -положении, не окисляется тирозиназой (животного происхождения). Гипотеза Гоннермана о гидролитическом расщеплении тирозина тирозиназой не имеет, таким образом, никакого экспериментального основания.

Жессар<sup>39</sup> различает также в превращении тирозина под действием тирозиназы два процесса: окисление в красное вещество, что может быть произведено как оксидазой, так и химическими окислителями (реактив Миллона), и конденсацию этого красного вещества в известный черный продукт. Последнее, согласно его гипотезе, вызывается действием минеральных составных частей тирозиназы. Согласно Баху<sup>33</sup>, это предположение также оказалось не соответствующим фактам. Пероксидаза и перекись водорода не оказывают никакого действия на тирозин; прибавление кипяченой тирозиназы ничего не меняет в этом отношении. Баху не удалось обнаружить при исследовании многочисленных растительных соков и экстрактов никакого кофермента, который был бы в состоянии вызвать окисление тирозина обыкновенной оксидазой или пероксидазой и перекисью водорода. Пероксидаза даже задерживает действие тирозиназы. Перекись водорода

ускоряет это действие только в том случае, если в смеси присутствуют задерживающие вещества. Согласно Фюрту и Иерузалему<sup>32</sup>, перекись водорода ускоряет действие тирозиназы, но не влияет на конечное состояние. На основании всех этих данных надо допустить, что тирозиназа совершенно отлична от обычной оксидазы и от системы «пероксидаза — перекись водорода»; состоит ли она из пероксидазы и оксигеназы, остается пока не выясненным. Во всяком случае она не оказывает специфического действия в том смысле, в каком это обычно понимается для ферментов. Бертран и Розенблат<sup>40</sup> показали, что синтетический *dl*-тирозин так же хорошо окисляется тирозиназой, как и природный *l*-тирозин. При этом одинаково окисляются оба компонента. Абдергальден и Гугенгейм<sup>27</sup> сделали аналогичное наблюдение.

Новый «окислительно-восстановительный фермент» был найден в картофельном соке Аблусом и Алуа<sup>41</sup>. Этот фермент оказывает окислительное действие только при одновременном наличии субстрата, способного к восстановлению. Картофельный сок, так же как и хлорат калия, в отдельности не действует на салициловый альдегид, но картофельный сок вместе с хлоратом калия окисляет салициловый альдегид в салициловую кислоту. При нагревании до кипячения это свойство исчезает. Нитрат калия оказывает более слабое действие, чем хлорат калия, азотистая кислота действует отравляюще (см. Альдегидазы, стр. 33).

### Животные оксидазы

По вопросу о существовании животной оксидазы, вызывающей посинение гваяковой настойки и другие реакции оксидаз, существует много противоречивых данных. В то время как многие авторы наблюдали непосредственное посинение гваяковой настойки в присутствии животных тканей и продуктов секреции желез, другие авторы получали реакцию на оксидазу только в присутствии перекиси водорода или жидкостей, содержащих перекиси (терпентин). Новые взгляды на природу оксидаз, принятые в течение последних лет, начинают вносить некоторую ясность в путаницу, имевшуюся в этой области (см. Животные пероксидазы, стр. 42). Так, например, упомянутые выше противоречия можно объяснить тем, что пероксидаза, всегда имеющаяся в препаратах животного происхождения, дает в присутствии перекиси те же самые реакции, как и простая оксидаза. Так как реактивы на оксидазу принадлежат к числу легкоокисляемых веществ, то при применении частично окисленного, т. е. содержащего перекиси, реактива пероксидаза оказывает действие, которое может быть ошибочно принято за действие настоящей оксидазы. Все данные о существовании в животных организмах оксидазы, действующей на гваяковую настойку, должны быть, следовательно, проверены со всеми известными предосторожностями.

Согласно новейшим данным, оксидаза, повидимому, очень распространена в животном организме. Она была обнаружена: Карно<sup>42</sup> и Словоцким<sup>43</sup> — в слюне, Карно<sup>42</sup> — в выделениях из носа, Пелом<sup>44</sup> и Карно<sup>42</sup> — в сперме, Шуммом<sup>45</sup> — в желчи, Карьером<sup>46</sup> и Шуммом<sup>45</sup> — в моче, Аблусом и Биарнесом<sup>47</sup> — в гемолимфе рака, Зибером<sup>48</sup> — в кровяной плазме лошади, Аблусом и Биарнесом<sup>47</sup> — в органах, отмытых от крови, Портье<sup>49</sup> — в лейкоцитах, Герлицка<sup>50</sup> — в зародыше лягушки, Саваре<sup>51</sup> и Феррони<sup>52</sup> — в плаценте, Шмиттом<sup>53</sup> — в коже кроликов и морских свинок.

Согласно Аблусу и Биарнесу<sup>47</sup>, можно экстрагировать оксидазу из отмытых от крови и затем измельченных органов растворами солей (10%-ными — нитрата калия, хлористого натрия, сернокислого натрия, 1–3%-ным — фто-



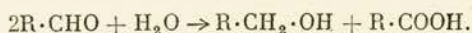
ристого натрия). При разбавлении экстрактов дистиллированной водой, выпадает осадок, что дает повод авторам причислить оксидазу к глобулинам. Зибер<sup>48</sup> приготовил оксидазу из плазмофирина (лошадиного) путем экстрагирования дистиллированной водой с последующим осаждением сернокислым аммонием или углекислотой. Осадок дает прозрачный раствор в уксусной кислоте и уксуснокислом аммонии. Приготовленная Аблусом и Биарнесом<sup>47</sup> оксидаза выдерживает 24-часовое нагревание до 58—60°, но теряет уже в течение нескольких секунд свою активность при 80—100°. Согласно Зиберу<sup>48</sup>, оксидаза ослабляется при 60° и разрушается в течение 2—3 минут при 70—78°.

С вопросом о так называемой альдегидазе, или салицилазе, которая окисляет салициловый альдегид в салициловую кислоту и является после гваяковой оксидазы самой известной животной оксидазой, дело обстоит не проще. Со времени Шмидеберга (1876) она была предметом многочисленных работ, результаты которых приводятся в учебниках физиологии. Медведев<sup>54</sup> выразил даже математически закон действия этого фермента. Однако на основании позднейших работ возникает вопрос, является ли альдегидаза оксидазой и даже вообще ферментом. Аблус и Алуа<sup>55</sup> нашли, что присутствие свободного кислорода задерживает окисление салицилового альдегида животными органами. Они считают, что необходимый для окисления салицилового альдегида кислород выделяется оксидазой из богатых кислородом соединений, находящихся в организме; введенные искусственно нитриты, однако, так же задерживают действие оксидазы, как и свободный кислород.

Дони-Эно и ван Дурен<sup>56</sup> подробно исследовали действие салицилазы. Они нашли, что метод, применявшийся предшествующими авторами, не дает надежных результатов, и пытались его улучшить. Если избежать по возможности ошибок опыта, то получаются такие маленькие количества салициловой кислоты, что очень трудно делать решающие выводы из этих опытов. Из 100 г свежей телячьей печени, обработанной фтористым натрием, получилось только 0.011 г салициловой кислоты. В согласии с Аблусом и Алуа, авторы установили, что действие салицилазы наиболее заметно в отсутствии кислорода. Скорость превращения определялась в этом случае не концентрацией фермента, а концентрацией альдегида. На основании этого наблюдения авторы ставят под вопрос ферментативную природу салицилазы. Кислород, необходимый для окисления альдегида, происходит, согласно их взглядам, из соединения, содержащегося в экстракте и легко выделяющего кислород при диссоциации. Считая это выделение кислорода побочной реакцией, авторы допускают, что и в этом случае имеет место каталитическое влияние на реакцию.

Если рассматривать эти представления с точки зрения современных взглядов, то проще всего допустить, что «соединение, легко диссоциирующее с выделением кислорода», представляет собой не что иное, как перекись, ибо в животном организме, помимо оксигемоглобина, выделяющего молекулярный кислород, не имеется богатых кислородом соединений. К тому же богатые кислородом нитраты и нитриты оказывают задерживающее действие на реакцию (Аблус и Алуа). Салицилазу следует, таким образом, рассматривать как систему «пероксидаза — перекись водорода». Опыты Дони-Эно и ван Дурена не дают еще никаких доказательств против ее ферментативной природы. Что в их опытах действие фермента определялось концентрацией субстрата, объясняется тем, что они всегда применяли фермент в большом избытке (экстракт из 100 г печени). Как известно, к действию ферментов применяется общее правило — при избытке субстрата превращение пропорционально количеству фермента, а при избытке

фермента — количеству субстрата. Однако сомнительно, чтобы салицилаза являлась оксидазой, так как ее чувствительность по отношению к свободному кислороду мало совместима с общими свойствами оксидаз. Поэтому возможно, что салицилаза является не окислительным, а гидролитическим ферментом. Как известно, ароматические альдегиды очень легко превращаются в соответственные спирты и кислоты под действием щелочей. Реакция протекает согласно следующему уравнению:



Аналогичное превращение могло бы быть вызвано гидролитическим ферментом без участия богатых кислородом соединений. С этой точки зрения представляло бы интерес обнаружить присутствие салигенина, получающегося в результате восстановления продукта гидролиза, который при обычном методе анализа должен оставаться вместе с непрореагировавшим альдегидом.

В отношении животной тирозиназы вопрос более ясен. Тирозиназа окисляет не посторонние вещества, как гваяколовую кислоту или салициловый альдегид, а нормальный продукт распада белков — тирозин. Если принять во внимание, что окисление тирозина в известное черное вещество не может быть достигнуто химическим путем (Абдергальден и Гугенгейм<sup>2</sup>), то можно считать, что тирозиназа является первой бесспорной оксидазой, найденной в животном организме.

Животная тирозиназа впервые была найдена Бидерманом<sup>57</sup> в содержимом кишечника мучного червя. Фюрт и Шнейдер<sup>58</sup> приготовили тирозиназу из крови насекомых (личинки бабочек) и выявили роль тирозиназы при так называемом меланозе крови насекомых, а также при образовании пигментов в животном организме. Впоследствии тирозиназа была найдена Пшибрамом<sup>59</sup> в свежих пигментных железах и Жессаром<sup>60, 60a</sup> — в высушенном чернильном мешке сени. Согласно Жессару<sup>61</sup>, меланотическая саркома лошади содержит не только тирозиназу, но и тирозин. Он же (1. с.) обнаружил присутствие тирозиназы в коже рыб и кротов. Дурхэм<sup>62</sup> нашел тирозиназу в коже кроликов, крыс и морских свинок. Присутствие тирозиназы, а также зависимость между образованием пигментов в покровах и действием тирозиназы было установлено Девичем<sup>63</sup> и Жессаром<sup>64</sup>. Физаликс<sup>65</sup> также приписывает пигментацию личинок действию тирозиназы. Изложенные выше взгляды Фюрта и Шнейдера, согласно которым образование природного меланотического пигмента связано с действием тирозиназы на тирозин или родственные соединения, таким образом, довольно хорошо соответствуют имеющемуся фактическому материалу.

Фюрт и Иерузалим<sup>32</sup> приводят следующие данные, касающиеся свойств животной тирозиназы. Перекись водорода ускоряет действие тирозиназы, не разрушая при этом фермента. Кислоты, даже в самых ничтожных количествах, приостанавливают действие тирозиназы; щелочи слабо ускоряют его; 1%-ный раствор сернокислого марганца ускоряет, сернокислое железо и сернокислая медь такой же концентрации, наоборот, задерживают ее действие. При малой концентрации (0.02%) сернокислое железо также определенно ускоряет реакцию.

Оксидаза, аналогичная тирозиназе, была извлечена Нейбергом<sup>38</sup> из меланомы почечной железы. Она окисляет в короткий срок адреналин в темнокоричневое вещество и действует на параоксифенилэтиламин. Экстракты из чернильных мешков сени превращают адреналин в меланиноподобные вещества, но не оказывают никакого действия на параоксифенилэтиламин.

Жессар<sup>66</sup> наблюдал образование иммунизирующей антитирозиназы при впрыскивании растворов тирозиназы в циркуляционную систему

различных животных. Антитирозиназа, образуемая под действием животной тирозиназы, оказывается недействительной против растительной тирозиназы, и наоборот. Принимая во внимание, что действие тирозиназы задерживается редуцирующими и другими подробно не исследованными веществами (Бах<sup>33</sup>) и что опыты Жессара были произведены только качественно, существование специфических антитирозиназ нельзя еще считать доказанным. Фюрт и Иерузалем, выработавшие количественный (спектрофотометрический) метод исследования действия тирозиназы (см. ниже), не подтвердили образования антитирозиназы в животном организме. Что понятием антиферментов несколько злоупотребляют, было уже отмечено Буркло и Эррисей<sup>67</sup>. Они указали на то, что некоторые химические соединения задерживают ферментативную реакцию и это может быть принято за действие настоящих антиферментов.

В связи с более старыми исследованиями Горбачевского<sup>68</sup>, Шпицер<sup>69</sup> и Винер<sup>70</sup> установили, что вытяжки различных органов, в частности печени и селезенки, содержат фермент, окисляющий с поглощением кислорода гипоксантин и ксантин в мочевую кислоту. Впервые наблюдавшееся Шиттенгельмом<sup>71</sup> превращение аденина и гуанина под действием вытяжек из органов происходит под действием двух различных ферментов: гидролитического, дезамидирующего, превращающего аденин в гипоксантин и гуанин в ксантин, и окислительного, превращающего гипоксантин в ксантин, а ксантин — в мочевую кислоту.

Окислительный фермент был подробно изучен Бурианом<sup>72</sup> и назван им ксантинооксидазой. Буриан приготовил активные вытяжки из телячьей печени путем мацерирования в воде, содержащей хлороформ, при охлаждении льдом; эти вытяжки сами по себе не вызывали практически никакого образования мочевой кислоты, т. е. содержали только следы пуриновых соединений. С этими вытяжками он произвел многочисленные исследования, определяя по методу Людвиг-Сальковского, измененному Шредером, мочевую кислоту, образующуюся из гипоксантина и ксантина. Сначала он подтвердил старые данные, согласно которым гипоксантин окисляется в ксантин, а последний в мочевую кислоту. Затем он доказал, что экстракты печени, вызывающие окисление указанных соединений, обладают также способностью разлагать образующуюся мочевую кислоту. Определение скорости реакции показало, что количество ксантинооксидазы не уменьшается сколько-нибудь заметно во время реакций. Из хода образования мочевой кислоты и ее разложения в экстрактах печени можно заключить, что ксантинооксидаза не оказывает никакого действия на мочевую кислоту.

Результаты, полученные Бурианом, были полностью подтверждены Шиттенгельмом<sup>73</sup>. Он еще раз показал, что вытяжки из легких и селезенки обладают способностью превращать, с одной стороны, гуанин в ксантин и аденин в гипоксантин, а с другой стороны, окислять гипоксантин в ксантин и последний в мочевую кислоту. При благоприятных условиях превращение аденин  $\rightarrow$  гипоксантин  $\rightarrow$  ксантин  $\rightarrow$  мочевая кислота происходит легко и количественно. Образование мочевой кислоты и ее разрушение не идут параллельно, так что можно допустить, что мы имеем здесь дело с двумя различными оксидазами. Ксантинооксидаза в состоянии производить окисление уже в присутствии незначительных количеств кислорода, как это видно из частичного превращения гипоксантина в ксантин в экстракте из легких.

Фермент, вызывающий разложение мочевой кислоты при поглощении кислорода, тесно связан с ксантинооксидазой, но не тождественен с нею. Разложение мочевой кислоты животными органами наблюдалось многочисленными авторами и приписывалось действию *уриколитического фер-*

мента. Однако, как это было показано Винером<sup>70</sup> и впоследствии Бателли и сотр.<sup>74</sup>, уриколиз нельзя рассматривать как однородный процесс, ибо в зависимости от условий опыта и исследуемых органов он протекает в различных направлениях. На основании исследований Виховского<sup>75-75a</sup> можно считать установленным, что имеющее здесь место окислительное разложение мочевой кислоты происходит с образованием аллантаина и углекислоты и должно быть приписано действию оксидазы. Эта оксидаза была названа Бателли<sup>74</sup> уриказой.

Согласно Крофтану<sup>76</sup>, уриказу можно приготовить следующим образом: измельченные органы обрабатываются пятикратным объемом спирта, образующийся осадок промывается спиртом и затем эфиром и высушивается на воздухе. Полученный порошок экстрагируется раствором поваренной соли. Кюнцель и Шиттенгельм<sup>77</sup> показали, что выгодно осаждать экстракты из селезенки уксуснокислым уранилом в щелочном растворе. При осаждении спиртом или сернокислым аммонием получают менее благоприятные результаты. Винер<sup>78</sup> осаждает экстракты из селезенки разбавленной (0.08%) уксусной кислотой. Он описывает также и другой метод, согласно которому растертая селезенка высушивается при низкой температуре и обезжиривается эфиром. Высушенное вещество экстрагируется раствором хлористого натрия. Виховский<sup>75</sup> высушивает при 30—37° растертую массу в виде тонкого слоя и обрабатывает затем растертый в порошок материал различными растворителями (толуол, ацетон, абсолютный спирт). Получающийся слабоокрашенный порошок диализируется против 0.05%-ного раствора поваренной соли. Бателли и сотр.<sup>74</sup> осаждают растертую массу трехкратным объемом спирта, отжимают, растирают осадок с 3—4-кратным объемом эфира и вновь отжимают.

По Виховскому и Винеру<sup>79</sup>, уриказа в сухом виде разлагается при 180°. В слабощелочном растворе она устойчива, в нейтральном неустойчива, а в кислом растворе (0.20% уксусной кислоты) она быстро разлагается.

Согласно Крофтану<sup>76</sup>, уриказа состоит из нуклеопротеида и альбумозы, которые в отдельности не оказывают действия на мочевую кислоту. Нуклеопроteid осаждается кислотами, альбумоза — спиртом.

Существование в различных органах веществ, задерживающих действие уриказы, было установлено Кюнцелем и Шиттенгельмом<sup>80</sup> и Бателли и сотр.<sup>74</sup>. Эти вещества разрушаются при нагревании. Согласно Бателли<sup>74</sup>, который провел за последнее время многочисленные исследования по газообмену, обусловленному уриказой (поглощение кислорода и выделение углекислоты), дыхательный коэффициент  $\frac{CO_2}{O_2}$  при окислении мочевой кислоты свежими тканями обычно равен 2, как этого и требует превращение мочевой кислоты в аллантаин. При применении препаратов уриказы, осажденных спиртом, дыхательный коэффициент снижается и приближается к единице. Действие фермента, повидимому, остается постоянным, если продолжительность опытов не слишком велика. В чистом кислороде уриказа действует значительно энергичнее, чем в атмосфере воздуха. Этилгидроперекись не оказывает никакого влияния на действие уриказы, так как последняя может использовать кислород оксигемоглобина, но не перекисей. После смерти количество уриказы в тканях не уменьшается, а, наоборот, повидимому, часто увеличивается.

#### Действие оксидаз

Р. Шода<sup>81</sup> пытался выяснить характер действия оксидазы из грибов, определяя гравиметрически пурпурогалин, образующийся при окислении пирогаллола в присутствии этого фермента по методу Баха и Шода

(см. Пероксидазы, стр. 41); он установил, что при низких концентрациях превращение пропорционально количеству фермента, а при высоких концентрациях прямо пропорционально разности между концентрациями фермента. Шода считает, что найденный им закон действия оксидазы можно выразить формулой  $ax + b$ . Тот же закон был найден вновь Шода и Штаубом<sup>23</sup> для тирозиназы. Для того чтобы по ходу реакции количественно определять действие ферментов, они сравнивали окрашивание, получающееся при окислении тирозина тирозиназой, со стандартными растворами, приготовленными из бисмаркбрауна и коралина.

Фюрт и Иерузалем<sup>32</sup> применяли для изучения действия растительной и животной тирозиназы главным образом спектрофотометрический метод, согласно которому образующиеся продукты окисления оценивались по коэффициентам экстинкции соответственных жидкостей. Они получали при этом плохо воспроизводимые и трудно объяснимые результаты, из которых они сделали вывод, что условия действия значительно сложнее для тирозиназы, чем для других ферментов.

Согласно Баху<sup>82</sup>, очень удобно определять действие тирозиназы путем титрования до полного обесцвечивания продукта реакции 0.02 *N* раствором перманганата, после подкисления. Он нашел, что в средних стадиях реакций, в которых фермент проявляет полную нормальную активность, скорость реакции прямо пропорциональна концентрации ферментов и обратно пропорциональна продолжительности реакции. Активность тирозиназы исчерпывается в течение реакции.

Фoa<sup>83</sup> предлагает определять действие оксидазы путем измерения поглощения кислорода посредством плетизмографа Мосо, но он до сих пор опубликовал результаты только некоторых предварительных опытов, которые должны доказать применимость его метода.

### Теория действия оксидаз

Исходя из взглядов Бертрана<sup>84</sup> о роли марганца при действии оксидазы, Трийа<sup>85</sup> пытался установить условия, при которых «металлический фермент марганец» действует как переносчик кислорода. Он нашел, что марганец оказывает наибольшее действие тогда, когда в системе имеются одновременно марганцовая соль, щелочь и коллоид. Трийа приравнивает эту «ассоциацию металла, основания и коллоида» к природным оксидазам и считает, что его опыты подтверждают взгляды Бертрана.

Дони-Эно<sup>86</sup> также приготовил продукт, подобный оксидазе, прибавляя щелочь к раствору гуммиарабика, содержащему марганцовую соль. Исходя из предполагаемого параллелизма с искусственно полученным продуктом, он считает, что природная оксидаза также имеет слабощелочную реакцию и не является ферментом.

Однако опыты, произведенные Трийа и Дони-Эно с так называемыми искусственными оксидазами, не могут привести ни к каким выводам относительно природы естественных оксидаз, так как между теми и другими существует принципиальная разница. Искусственная оксидаза активна только в щелочном растворе и теряет свои окислительные свойства при нейтрализации свободной щелочи. В противоположность этому, естественная оксидаза сохраняет свою активность и в кислом растворе. Эйлер и Болин<sup>87</sup> описывают препарат лакказы, который мог выдержать прибавление 10 см<sup>3</sup> 0.0001 *N* раствора соляной кислоты без снижения активности. Природная оксидаза совершенно не имеет, в противоположность предположению Дони-Эно, щелочной реакции, как это хорошо известно каждому, кто имел в руках более или менее чистый препарат. Кроме того, вопрос о том, играет ли вообще марганец какую-нибудь роль при действии

оксидазы, ни в коем случае нельзя считать решенным. В своем первом сообщении Бертрам<sup>84</sup> утверждает, что для окисления посредством оксидазы марганец не может быть заменен никаким другим металлом. Однако оксидазы, содержащие железо, но совершенно не содержащие марганца, были приготовлены Словоцовым<sup>88</sup> из картофеля, Сарту<sup>89</sup> из *Schinus molle*, Исаевым<sup>2</sup> — из дрожжей. Согласно Исаеву<sup>3</sup>, активность оксидазы из солода не повышается при прибавлении марганцовых солей. Согласно Эйлеру и Болину<sup>87</sup>, наблюдавшееся Бертраном<sup>90</sup> после прибавления марганцовых солей повышение активности оксидазы из люцерны, содержащей мало марганца, следует приписать активации марганцовых солей натриевыми солями органических кислот, содержащихся в оксидазе. Если принять еще во внимание, что Розенфельд<sup>91</sup>, Штеклин<sup>92</sup>, Бах и Черняк<sup>93</sup> приготовили препараты пероксидазы, совершенно не содержащие ни железа, ни марганца, то вполне возможно, что марганец, а может быть и железо, не имеют ничего общего с самим действием оксидазы.

Бертрам<sup>94</sup> предполагает, что действие кислот на лакказу является дальнейшим подтверждением его взглядов на роль марганца в действии оксидазы. Так как он рассматривает лакказу как соединение марганца, легко расщепляющееся гидролитически по уравнению  $R''Mn + H_2O = R''H_2 + MnO$ , то при уменьшении гидролиза должна снижаться и окислительная способность фермента. Опыт показал, что действие лакказы задерживается прибавлением ничтожных количеств кислоты. Однако только те кислоты оказывают задерживающее действие, в которых при нейтрализации выделяются по меньшей мере 12.6 ккал. Эти кислоты дают кислую реакцию и с метилоранжем. В противоположность этому кислоты, дающие реакцию только на лакмус или фенолфталеин, не оказывают действия на лакказу.

Следует еще заметить, что действие кислот на оксидазы совместимо как с теорией Бертрана, так и с теорией Баха и Шода или с любой другой, поскольку настоящая причина задерживающего действия кислот еще не выяснена. Можно допустить, что прибавление кислот вызывает разрушение неустойчивых соединений, образующих перекиси (оксигеназы), а не гидролитическое расщепление оксидазы. В пользу этого предположения говорит также и отмеченная Бертраном и Розенбандом<sup>95</sup> большая устойчивость пероксидазы по отношению к кислотам.

Я позволю себе остановиться несколько подробнее на экспериментальной работе, которая была выполнена Спенсом<sup>96</sup> для доказательства теории Баха и Шода. При исследовании паракаучука-сырца на присутствие окислительных ферментов автор наблюдал, что водные экстракты тонко измельченного материала содержат активную пероксидазу, но не содержат оксигеназы. Так как паракаучук дает сам по себе слабую реакцию на оксидазу, то автор предполагал, что оксигеназа осталась в осадке, нерастворимом в воде. Путем обработки последнего хлороформом каучук переводится в раствор; нерастворимый в этом растворителе остаток содержит азот, но не дает с пероксидазой из каучука ни одной из реакций на оксидазы. Предполагая, что при обработке хлороформом оксигеназа была разрушена, автор исследовал далее латекс из «*Funtumia elastica*» и нашел, что он содержит «полную оксидазу», т. е. пероксидазу и оксигеназу. Эту оксидазу удалось изолировать путем осаждения спиртом, но при частичном разрушении ее оксигеназы. Содержащаяся первоначально в латексе оксигеназа, таким образом, почти полностью исчезает при коагуляции, в то время как более устойчивая пероксидаза сохраняется в каучуке-сырце и может быть экстрагирована водой.

Буркло<sup>97</sup>, повидимому, придерживается теперь уже теории Баха и Шода, хотя он еще не может отказаться от терминологии Шенбейна,

оказавшейся несостоятельной уже 40 лет тому назад. Принимая во внимание тесную связь между оксидазой и пероксидазой, он считает, что «непосредственно действующая оксидаза является смесью озонида и анаэроксидазы» (т. е. пероксидазы), причем роль озонида может играть какое-нибудь вещество, обладающее свойствами фермента (оксигеназа? — А. Б.). В другом месте этой же работы встречается обозначение «peroxyde particulier» вместо «озонида», что значительно уясняет постановку вопроса.

На теоретических соображениях Энглера и Герцога<sup>98</sup>, касающихся применения развитой Энглером и Бахом перекисной теории самопроизвольного окисления к окислительным ферментам, — мы здесь останавливаться не будем.

## ПЕРОКСИДАЗЫ

### Растительные пероксидазы

Розенфельд<sup>91</sup> исследовал пероксидазу из *Raphanus sativus* и нашел, что она не содержит ни марганца, ни железа. Отсутствие этих металлов в достаточно чистой пероксидазе было подтверждено Штеклином<sup>92</sup> и Бахом и Черняком<sup>93</sup>. Присутствие марганца в первых препаратах, приготовленных Бахом и Шода<sup>18</sup>, следует, очевидно, приписать недостаточной очистке. Розенфельд очищал пероксидазу путем осаждения аммиаком ферментного раствора, содержащего фосфат кальция, с дальнейшим диализом фильтрата и осаждением спиртом. Приготовленная таким образом пероксидаза имела кристаллическую структуру, что дало повод автору предположить, что функция пероксидазы связана с кристаллическим состоянием; последнее, однако, было несомненно обусловлено высоким содержанием золы в препарате Розенфельда (сырой продукт содержал 60—70% золы).

Штеклин<sup>92</sup> пытался добиться высокой степени чистоты пероксидазы из хрена путем повторного растворения в воде и осаждения спиртом. Однако он нашел, что вскоре достигается точка, в которой фермент и загрязнения осаждаются спиртом в постоянной пропорции. Самая чистая из приготовленных им пероксидаз была аморфна и содержала 65% органического вещества, 3% азота и 22.7% золы. Она активировала примерно только двойное количество по весу перекиси водорода (об определении активирующей способности см. стр. 40).

Бах и Черняк<sup>93</sup> предложили другой способ интенсивной очистки пероксидазы: содержащий пероксидазу сок белой репы осаждается спиртом, к растворенному в воде осадку прибавляется основной уксуснокислый свинец для удаления загрязнений, фильтрат освобождается от свинца карбонатом натрия и подвергается продолжительному диализу против дистиллированной воды. Из 30 кг репы было получено 0.78 г пероксидазы, содержащей 81.6% органического вещества, 3.44% азота, только 1.47% золы и совершенно не содержащей ни железа, ни марганца. Полученная пероксидаза активировала 22.7-кратный вес перекиси водорода. Этот препарат пероксидазы, который можно считать самым чистым из всех приготовленных до сих пор препаратов, давал совершенно отчетливо биуретовую и ксантопротеиновую реакцию, но не давал реакцию Миллона. При нагревании препарата выделялись пары, которые давали реакцию на пиррол и были резкощелочными. Аналогичное наблюдение ранее было сделано Бахом<sup>12</sup>.

Относительно устойчивости чистой пероксидазы по отношению к нагреванию имеются противоречивые данные. В то время как Штеклин утверждает, что очищенная пероксидаза значительно чувствительнее к нагре-

ванию, чем неочищенная, Бах и Черняк указывают, что самая чистая приготовленная ими пероксидаза поразительно мало чувствительна к нагреванию до кипения. Чувствительность фермента возрастает при уменьшении концентрации пероксидазы.

Согласно Баху<sup>99</sup>, растительная пероксидаза также сравнительно мало чувствительна к прямому действию солнечного света. При одновременном действии света и кислорода воздуха происходит медленное снижение активности (на 15% после 76-часового облучения). Ямада и Иодлбауер<sup>100</sup> наблюдали при работе с препаратом пероксидазы, приготовленной по методу Баха и Шода из корней хрена, значительно большее снижение активности под действием солнечного света в атмосфере кислорода — на 91% после 7 часов облучения (к этому можно прибавить, что автору настоящей статьи удалось повторить свои предыдущие опыты с очень чистым препаратом, приготовленным по методу Баха и Черняка, и подтвердить эти данные).

Согласно Розенфельду<sup>91</sup>, стрихнин, бруцин и хинин задерживают действие пероксидазы, в то время как другие алкалоиды оказывают очень слабое задерживающее действие или не оказывают никакого. Штеклин<sup>92</sup> нашел, что минеральные соли и кислоты (5 см<sup>3</sup> 0.1 *N* кислоты в 100 см<sup>3</sup> реакционной смеси) не оказывают влияния на действие пероксидазы; малая чувствительность к кислоте растительной пероксидазы наблюдалась также Бертраном и Розенбандом<sup>95</sup>.

Бах<sup>101,102</sup> произвел многочисленные количественные опыты, относящиеся к действию на пероксидазу иода, гидроксилamina и синильной кислоты. Для полного прекращения действия пероксидазы нужны такие большие количества соответствующих реактивов, что здесь бесспорно имеет место не «отравление», а стехиометрическая реакция между пероксидазой и ядом. Действие пероксидазы прекращается при прибавлении одного эквивалента иода,  $\frac{1}{4}$  эквивалента гидразинсульфата (отнесенного к количеству активированной перекиси водорода) и двух эквивалентов гидроксилamina и цианистого калия. Что же касается «явления выздоровления», которое наблюдается при отравлении оксидазы цианистым калием, то интересующихся более подробными сведениями я отсылаю к оригинальной статье. Ход отравления пероксидазы в зависимости от продолжительности реакции и от концентрации реактивов изучался количественно путем весового определения пурпурогалина, образующегося при окислении пирогаллола.

Для определения активирующей способности пероксидазы, т. е. отношения, в котором перекись водорода и пероксидаза вступают в реакцию, Бах<sup>103</sup> разработал следующий метод, основанный на более детальном понимании действия пероксидазы (см. ниже): смешивают, при прочих равных условиях, избыток перекиси водорода с определенным количеством пероксидазы и пирогаллола, с одной стороны, и избыток пероксидазы с определенным количеством перекиси водорода и пирогаллола, с другой стороны, и определяют в обоих случаях весовым путем образующийся пурпурогалин. Если обозначить через *a* — количество пероксидазы, применявшееся при избытке перекиси водорода, и через *m* — количество образовавшегося при этом пурпурогалина, через *b* — количество перекиси водорода, применявшееся с избытком пероксидазы, и через *n* — количество

образовавшегося пурпурогалина, то  $\frac{bm}{n}$  представляет количество перекиси водорода, которое вступило в реакцию с количеством *a* пероксидазы, и  $\frac{bm}{an}$  — активирующую способность пероксидазы.



Пероксидаза, посредством которой перекись водорода активируется при окислении трех различных классов соединений (фенолы, ароматические амины и иодистоводородная кислота), должна была бы содержать, согласно учению о специфичности ферментов, по меньшей мере три различных фермента. Для выяснения этого вопроса Бах<sup>93, 99, 101, 102</sup> ставил многочисленные опыты. Несмотря на все попытки, ему, однако, не удалось разделить предполагаемые ферменты или хотя бы приостановить одну из функций пероксидазы, не уничтожая при этом все остальные. По отношению к нагреванию, действию света, спирта, ацетона, иода, гидроксилamina, гидразина, синильной кислоты, а также при интенсивной очистке по методу Баха и Черняка<sup>93</sup> пероксидаза ведет себя, как совершенно однородный фермент. Вольф и Штеклин<sup>104</sup>, которые рассматривали коллоидальное железистосинеродистое железо как «искусственную пероксидазу», указывают, что перекись водорода активируется этим соединением при различных окислительных реакциях, однако не при окислении иодистоводородной кислоты. Поэтому они предполагают, что активация перекиси водорода природной пероксидазой в случае окисления иодистоводородной кислоты должна быть приписана отдельному ферменту. Этот вывод неприемлем уже по одному тому, что рассматриваемая нами растительная пероксидаза совершенно не содержит железа. Делать заключение о поведении природной пероксидазы на основании действия железистосинеродистого железа так же мало допустимо, как, например, выводить законы действия инвертазы из гидролиза сахара серной кислотой.

В противоположность высказанному первоначально Бахом<sup>30, 37</sup> предположению, ускорение действия различных препаратов тирозиназы перекисью водорода еще не является доказательством существования специфической пероксидазы в тирозиназе, как было установлено им самим<sup>33</sup> при более детальном изучении этого вопроса (см. стр. 30—31 о растительной тирозиназе).

Относительно *взаимного влияния пероксидазы и каталазы* при их действии на перекись водорода имеются следующие данные.

Бах и Шода<sup>105</sup> наблюдали, что использование перекиси водорода пероксидазой при различных окислительных реакциях не нарушается присутствием каталазы, если только имеется субстрат, который может окисляться системой «пероксидаза — перекись водорода». В противном случае вся перекись водорода разлагается каталазой с выделением молекулярного кислорода.

Нейгауз<sup>106</sup> изучал, по предложению Шода, распределение перекиси водорода между пероксидазой и каталазой: для этого он окислял пирогаллол перекисью водорода и пероксидазой в присутствии различных количеств каталазы и определял образующееся количество пурпурогалина. Он нашел, что небольшие количества каталазы стимулируют пероксидазу, а большие, наоборот, задерживают ее действие.

Для изучения распределения нужно в первую очередь точно знать количественные соотношения, ибо в противном случае нельзя сделать никаких выводов о самом распределении. Для того чтобы удовлетворить этому требованию, Бах<sup>107</sup> поставил опыты с препаратами пероксидазы и каталазы, активирующая способность которых по отношению к перекиси водорода была точно известна. Активирующая способность пероксидазы определялась по указанному выше методу, в то время как разложение, вызванное каталазой, можно было установить по результатам опытов, поставленных с целью выяснения ее активности в зависимости от концентрации фермента, субстрата и продолжительности реакции. Оказалось, что присутствие 1—5 эквивалентов каталазы (отнесенной к количеству перекиси водорода, которая должна была подвергаться разложению и активации)

не оказывает никакого влияния на окисление пирогаллола системой «пероксидаза — перекись водорода». Дальнейшие опыты показали, что отсутствие распределения перекиси водорода между пероксидазой и каталазой в этом случае надо приписать разложению каталазы пирогаллолом. При применении очень больших количеств каталазы часть ее естественно избегает разрушения и разлагает перекись водорода с выделением кислорода.

Шода и Пасманик<sup>108</sup> пытались далее выяснить распределение перекиси водорода между пероксидазой и каталазой при окислении иодистоводородной кислоты. Они нашли, в противоположность результатам Нейгауза, что малые количества каталазы относительно больше задерживают действие пероксидазы, чем большие. Однако и в этом случае количественное соотношение между пероксидазой и каталазой не было учтено. Кроме того, свободный иод, как известно, чрезвычайно ядовит для каталазы, так что из этих опытов также нельзя сделать никаких выводов о распределении перекиси водорода.

Что же касается окислительного действия, которое оказывает пероксидаза совместно с перекисью водорода, следует отметить, что до сих пор еще не удалось разложить ни одного существенного, с точки зрения физиологии, вещества при помощи этой окислительной системы.

Исходя из предположения, что сахар сжигается в организме не как таковой, а лишь после предшествующего расщепления, Бах<sup>109</sup> действовал на глюкозу буюнеровской зимазой в присутствии пероксидазы и перекиси водорода. Количественные опыты показали, что вся перекись водорода разлагается с выделением свободного кислорода. Кроме того, оказалось, что пероксидаза оказывает сама по себе задерживающее действие на бесклеточное спиртовое брожение. Таким образом, и в этом случае оказалось невозможным определить распределение перекиси водорода.

### Животные пероксидазы

Из давно известных данных о том, что животные ткани, экстракты и выделения дают реакции на оксидазы в сочетании с перекисью водорода или с окисленным терпентиновым маслом (содержащим перекиси), можно было вывести, что пероксидаза чрезвычайно распространена в животном организме. Дело, однако, осложняется тем, что перекись водорода сама активируется красящим веществом крови, аналогично тому, как она активируется сернокислым железом. Кроме того, Муатессье<sup>110</sup> доказал, что активирующее действие гемоглобина прекращается при кипячении и что компоненты гематина оказывают такое же активирующее действие, как и гемоглобин. Согласно Либерману<sup>111</sup>, активирующее действие на перекись водорода оказывает не сам гемоглобин, а получающийся из него метгемоглобин. С другой стороны, Пигини<sup>112</sup> допускает, что во всех случаях активирование перекиси водорода вызывается коллоидальной гидроокисью железа, которая может появляться благодаря гидролитическому расщеплению гемоглобина. Что же касается активирующего влияния объектов животного происхождения (гной, молоко, слюна), видимо, не содержащих красящего вещества крови, то оно может быть приписано присутствию любого продукта распада гемоглобина, содержащего железо. Муатессье (l. c.) нашел, что пероксидазная реакция лейкоцитов исчезает после нагревания, что позволяет предположить в этом случае существование настоящей пероксидазы, отличной от красящего вещества крови. Согласно Линоссье<sup>113</sup>, пероксидазное действие гноя не прекращается полностью даже после длительного кипячения. Некоторый свет на эту область был впервые пролит работой Чигларжа и Фюрта<sup>114</sup>. После того как эти исследователи убедились на ряде опытов, что гваяковая реакция не дает надеж-

ных результатов, они выбрали иодистоводородную кислоту, как чувствительный реактив на пероксидазу, сам по себе не реагирующий с гемоглобином. Этот реактив уже применялся Бахом (см. стр. 44) с хорошими результатами при изучении растительной пероксидазы. Так как при высоком содержании белков в объектах животного происхождения часть иода поглощается субстратом, то понятно, что доказательными здесь можно считать только положительные, а не отрицательные результаты. Применявшаяся авторами пероксидаза была приготовлена по методу, уже употребившемуся Зибером<sup>48</sup>, а именно — путем экстракции тканей нейтральными солями ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaF}$ ). Она, повидимому, довольно чувствительна к спирту, но исключительно устойчива по отношению к повышению температуры.

В связи с высоким содержанием белков в пероксидазе животного происхождения окисление иодистоводородной кислоты не могло быть использовано для количественных опытов. Авторы поэтому выработали новый метод с применением в качестве субстрата лейкоформы малахитовой зелени. При смешивании лейкоформы в уксуснокислом растворе с пероксидазой и перекисью водорода образуется малахитовая зелень, которая определяется спектрофотометрически. Авторы исследовали таким путем, с одной стороны, активирующее действие гематина, а с другой — действие пероксидазы (из гноя) и нашли, что между ними имеется существенная разница: в то время как кривые гематина обнаруживают тенденцию к прямолинейному ходу, кривые пероксидазы загибаются после начального довольно крутого подъема и становятся почти параллельными оси абсцисс.

Эта особенность действия пероксидазы уже наблюдалась Бахом и Шо́да (см. ниже) при ее изучении. Это доказывает, что в то время как гематин ведет себя как любой другой неорганический катализатор, действие животной пероксидазы приближается к действию других ферментов.

Букмастер<sup>115</sup> подтверждает наблюдения, сделанные Чигларжем и Фюртом, и называет гемоглобин *псевдопероксидазой*, что может быть и излишне.

Бателли и сотр.<sup>116</sup> поставили подробные исследования для выяснения наличия пероксидазы в животном организме. Они прежде всего обратили внимание на то, что отсутствие реакции на пероксидазу в различных органах и выделениях следует приписать не только присутствию веществ, связывающих иод, как это считают Чигларж и Фюрт, но также и действию каталазы, содержащейся в тканях, ибо она разлагает прибавленную перекись водорода с выделением инертного кислорода. Для того чтобы избежать этого осложнения, они применяли гидроперекись этила  $\text{C}_2\text{H}_5 \cdot \text{O} \cdot \text{OH}$  вместо перекиси водорода, ибо каталаза не оказывает на нее действия, как было установлено точными опытами Баха и Шо́да<sup>105</sup>. Проведенные Бателли опыты с гидроперекисью этила и иодистоводородной кислотой показали, что почти все ткани (лимфатическая железа, печень, селезенка, легкие, почки, мускулы, щитовидная железа, тимус) и кровь дают реакцию на пероксидазу. Однако способность активировать гидроперекись этила при окислении иодистоводородной кислоты присуща также и гемоглобину, что не соответствует результатам, полученным Чигларжем и Фюртом с перекисью водорода. В чем причина различного действия гемоглобина на перекись водорода и гидроперекись этила, остается невыясненным. Бателли и сотр. пытались определить активирующую способность различных тканей, но получили невоспроизводимые результаты, которые поэтому нельзя было использовать.

Те же авторы подвергли затем более детальному исследованию вещество (впервые найденное в тканях Бателли<sup>117</sup>), активирующее перекись водорода при окислении муравьиной кислоты. Оно осаждается спиртом и оказывает энергичное действие также и в кислой среде (оптимум 0.3%

НСI на 30 г ткани печени). Его действие было изучено количественно путем определения углекислоты, образующейся при окислении муравьиной кислоты. Это действие возрастает с повышением температуры до 38—40°, а затем начинает падать и при 65° становится едва заметным. По отношению к содержанию пероксидазы все исследованные органы располагаются в следующий ряд: печень, почки, селезенка, легкие, поджелудочная железа, лимфатическая железа, мышцы, мозг, яички, собачьи мышцы, тимус, надпочечники, щитовидная железа, мышцы кролика. В присутствии гидроперекиси этила пероксидаза из печени окисляет муравьиную кислоту в нейтральной среде энергичнее, чем в кислой. Авторы склонны считать, что пероксидаза, которая активирует перекись водорода при окислении муравьиной кислоты, тождественна с той, которая действует при окислении иодистоводородной кислоты.

Однако если принять во внимание, что растительная пероксидаза, энергично активирующая перекись водорода при окислении иодистоводородной кислоты, не оказывает никакого влияния на окисление муравьиной кислоты, то имеется большее основание предполагать, что в этом случае мы имеем дело с двумя различными пероксидазами.

Работами Чигларжа, Бателли и их сотрудников вопрос о животных пероксидазах бесспорно подведен к стадии планомерного исследования.

### Механизм действия пероксидаз

После того как Бах и Шода<sup>118</sup> получили растительную пероксидазу в физиологически чистом состоянии (т. е. не содержащую других ферментов), они пытались изучить механизм действия этого фермента. Действие пероксидазы характеризовалось количеством пурпурогалина, образующегося при окислении пирогаллола перекисью водорода, и определялось весовым путем. Оказалось, что при избытке пероксидазы действие пропорционально количеству перекиси водорода, а при избытке перекиси водорода — прямо пропорционально количеству пероксидазы. Таким образом, пероксидаза и перекись водорода реагируют, повидимому, в постоянном отношении, с образованием промежуточного вещества. Далее было установлено, что пероксидаза потребляется в процессе окисления так же, как перекись водорода (о методе, выработанном Бахом для определения активирующей способности пероксидазы на основании этих данных, см. выше).

Для того чтобы изучить скорость реакции пероксидазы, Бах и Шода<sup>119</sup> исследовали действие пероксидазы на окисление иодистоводородной кислоты перекисью водорода; выделявшийся иод определялся 0.01 *N* раствором гипосульфита. Оказалось, что чем больше концентрация пероксидазы, тем скорее этот фермент выводится из строя. Кривые скорости реакции показывают в начале реакции возрастание, зависящее от концентрации фермента, а затем идут так же, как в контрольных опытах (без пероксидазы). Если выбрать сравнимые стадии реакции, т. е. сравнивать такие стадии ее, в которых фермент проявляет еще полную активность, оказывается, что действие пероксидазы несомненно следует закону действующих масс.

Бах<sup>103</sup> исследовал впоследствии с разных сторон действие пероксидазы на реакцию между иодистоводородной кислотой и перекисью водорода (подробности этого исследования см. в оригинальной статье). Упомянем здесь лишь, что при точной работе с препаратом пероксидазы из хрена Бах получил очень ясный цифровой материал, из которого можно было вывести без какой-либо натяжки ряд закономерностей. При повторении опытов с другим препаратом пероксидазы, при прочих равных условиях,

были установлены такие же четкие закономерности, но отличные от первых. Согласно Баху, это различие должно быть приписано влиянию на катализ неизвестных и неопределимых загрязнений препарата пероксидазы. Поэтому Бах вообще считает, что установление «законов действия ферментов» — преждевременно.

Чигларж и Фюрт исследовали действие растительных и животных пероксидаз спектрофотометрическим путем при применении лейкоформы малахитовой зелени и перекиси водорода в качестве субстрата. Полученные ими результаты почти полностью перекрываются результатами Баха.

### ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПЕРОКСИДАЗ И ОКСИДАЗ

Работы, появившиеся за последние годы, не дали существенного разъяснения вопроса о физиологическом значении пероксидаз и оксидаз. Известные до сих пор окислительные ферменты не вызывают глубоко идущих процессов окисления. Исключением из этого правила является приготовленная Бателли и сотр.<sup>116</sup> пероксидаза, которая в присутствии перекиси водорода окисляет муравьиную кислоту в углекислоту. Углекислота получается также при окислении пирогаллола и мочевой кислоты, однако нельзя утверждать, что эти вещества окисляются до углекислоты.

Действие пуриноксидаз, благодаря которым гипоксантин окисляется в ксантин, ксантин — в мочевую кислоту, а последняя — в аллантаин (с отщеплением углекислоты), сейчас уже почти полностью разъяснено; это позволяет предположить, что окислительный распад продуктов питания в организме идет *ступенями*, как и гидролитический распад. Зибер<sup>48</sup> наблюдала сравнительно быстрое окисление глюкозы в углекислоту животными оксидазами и пероксидазами. Это, однако, единичное наблюдение.

На защитное действие окислительных ферментов указывает наблюдение, сделанное также Зибер<sup>120</sup>, согласно которому из фибрина лошадей, иммунизированных против столбняка и дифтерии, можно приготовить оксидазы, активные по отношению к этим токсинам.

Лев<sup>121</sup>, который первоначально<sup>122</sup> считал, что перекись водорода не играет никакой физиологической роли, сейчас допускает, что пероксидаза (несмотря на присутствие каталазы) может все же использовать следы перекиси водорода, для того чтобы произвести таким путем окисление вредных органических побочных продуктов обмена веществ.

Новые теории Палладина<sup>9-91к</sup> уже изложены выше (см. стр. 28).

О попытках Оствальда разъяснить зависимость между светочувствительностью оксидаз животного происхождения и явлениями фототропизма мы здесь только упомянем.

В заключение я дословно приведу здесь сказанное Бертраном и Розенбандом<sup>95</sup> по вопросу о пероксидазе. Авторы подчеркивают тождественность окислительного действия оксидазы и системы «пероксидаза — перекись водорода»: «...повидимому, именно вследствие этого совпадения пероксидастаза часто сравнивалась с оксидазами\*. В действительности этот фермент скорее восстановительный, чем окислительный. Что же касается его физиологической роли, то ее так же мало можно свести к разложению перекиси водорода, имеющейся в клетках, как можно считать, что роль сульфатов заключается в том, чтобы осадить барий, если последний случайно попадает в организм».

\* Во французской литературе термином «диастаза» обозначаются ферменты вообще. В данном случае «пероксидастаза» в современной терминологии соответствует «пероксидазе». — *Прим. ред.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бах совм. с Шода. Современное состояние учения об окислительных ферментах растений [Ueber den gegenwärtigen Stand der Lehre von den pflanzlichen Oxydationsfermenten].— *Biochem. Cbl.*, **1**, 417 (1903); настоящая книга стр. 17.
2. Исаев. Об оксидазе дрожжей [Ueber Hefeoxydase].— *Zs. physiol. Chem.*, **42**, 132 (1905).
3. Исаев. Об оксидазе солода [Ueber Malzoxoydase].— *Zs. physiol. Chem.*, **45**, 331 (1905).
4. Nestler. Ueber das Vorkommen von Pilzen in Wechsel der Beeren.— *Ber. Dtsch. bot. Ges.*, вып. 8 (1899).
5. Lendner. Sur les causes qui déterminent la coloration des fausses baies du *Juniperus communis*.— *Bull. d. Sci. Pharmacol.*, **VII**, 113 (1903).
6. Fahrion. Theorie der Lederbildung.— *Zs. angew. Chem.*, **77**, 677 (1903).
7. Палладин. О различном происхождении углекислоты, выделяющейся при дыхании растений [Ueber den verschiedenen Ursprung der während der Atmung der Pflanzen ausgeschiedenen Kohlensäure].— *Ber. Dtsch. bot. Ges.*, **23**, 239 (1905).
- 7а. Палладин. Образование различных дыхательных ферментов в зависимости от стадии развития растений [Bildung der verschiedenen Atmungsenzyme in Abhängigkeit von dem Entwicklungsstadium der Pflanzen].— *Ber. Dtsch. bot. Ges.*, **24**, 97 (1906).
- 7б. Палладин и Костычев. Анаэробное дыхание, спиртовое брожение и образование ацетона в семенах растений [Anaerobe Atmung, Alkoholgärung und Acetonbildung bei den Samenpflanzen].— *Zs. physiol. Chem.*, **48**, 214 (1906).
- 7в. Палладин. Работа дыхательных ферментов растений в различных условиях [Die Arbeit der Atmungsenzyme der Pflanzen unter verschiedenen Verhältnissen].— *Zs. physiol. Chem.*, **47**, 407 (1906).
8. Красносельская. Образование дыхательных ферментов в поврежденных луковицах *Allium cepa* [Bildung der Atmungsenzyme in verletzten Zwiebeln von *Allium cepa*].— *Ber. Dtsch. bot. Ges.*, **24**, 134 (1906).
9. Палладин. Дыхательные пигменты растений [Die Atmungspigmente der Pflanzen].— *Zs. physiol. Chem.*, **55**, 207 (1908).
- 9а. Палладин. Кровь растений [Das Blut der Pflanzen].— *Ber. Dtsch. bot. Ges.*, **26**, 125 (1908).
- 9б. Палладин. Распространение дыхательных хромогенов в растениях [Die Verbreitung der Atmungschromogene bei den Pflanzen].— *Ber. Dtsch. bot. Ges.*, **26**, 369 (1908).
- 9в. Палладин. Об образовании дыхательных хромогенов в растениях [Ueber die Bildung der Atmungschromogene in den Pflanzen].— *Ber. Dtsch. bot. Ges.*, **26**, 389 (1908).
- 9г. Палладин. О прохромогенах дыхательных хромогенов растений [Ueber Prochromogene der pflanzlichen Atmungschromogene].— *Ber. Dtsch. bot. Ges.*, **27**, 101 (1909).
- 9д. Палладин. Роль редуктазы в процессах спиртового брожения [Beteiligung der Reduktase im Prozesse der Alkoholgärung].— *Zs. physiol. Chem.*, **56**, 81 (1908).
- 9е. Палладин. О природе дыхания растений [Ueber das Wesen der Pflanzenatmung].— *Biochem. Zs.*, **XVIII**, 151—206 (1909).
- 9ж. Палладин. К теории дыхания растений.— *Зап. Акад. Наук*, 459—546 (1909).
10. Tschich u. Stevens. Ueber den Japanlack (Ki-urusi).— *Arch. Pharm.*, **VII**, 504 (1905).
- 10а. Tschirch u. Stevens. Ueber die Gummienzyme (Gummasen), speziell den Nachweis des Stickstoffes in ihnen.— *Pharm. Cbl.*, **26**, 501 (1905).
11. Bertrand. Latex de l'arbre à laque.— *Soc. Biol.*, **46**, 478 (1894).
12. Бах. О содержании азота в окислительных ферментах [Ueber den Stickstoffgehalt der Oxydationsfermente].— *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **41**, 226 (1908); настоящая книга, стр. 428.
13. Бах совм. с Шода. Об образовании перекисей в живой клетке [Ueber die Peroxydbildung in der lebenden Zelle].— *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **35**, 2466 (1902); настоящая книга, стр. 344.
14. Бах совм. с Шода. Окислительные ферменты как вещества, образующие перекиси [Oxydationsfermente als peroxyduerzeugende Körper].— *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **35**, 3943 (1902); настоящая книга, стр. 346.
15. Aso. Which compound in certain plant juices can liberate iodine from potassium iodide?— *Beih. z. Bot. Cbl.*, **XV**, 208 (1903).
16. Бах совм. с Шода. О химической природе оксидаз [Einiges über die chemische Natur der Oxydasen].— *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **37**, 36 (1904); настоящая книга, стр. 359.
17. Aso. On the Nature of Oxidases.— *Beih. z. Bot. Cbl.*, **XVIII**, 1319 (1905).
18. Бах совм. с Шода. О пероксидазе [Ueber Peroxydase].— *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **36**, 600 (1903); настоящая книга, стр. 349.

19. Bourquelot et Marchandier. Etude de la réaction provoquée par les ferments oxydants indirects.— Soc. Biol., **56**, 589 (1904).
20. Cousin et Herissey. Oxydation du thymol par les ferments oxydants des Champignons.— Soc. Biol., **63**, 471 (1907).
21. Buchner u. Meisenheimer. Ueber die Essiggärung.— Lieb. Ann., **349**, 140 (1908).
22. Herzog u. Meier. Oxydasen der Schimmelpilze.— Zs. physiol. Chem., **57**, 35 (1908); **59**, 57 (1909).
23. Bourquelot et Bertrand. Les ferments oxydants dans les champignons.— J. Pharm. Chim., **III**, 177 (1896); Bull. Soc. mycol. de France, **XVIII**, 27 (1896).
24. Bertrand. Sur une nouvelle oxydase d'origine végétale.— Bull. Soc. Chim., **XV**, 793 (1895).
25. Bertrand u. Muttermilch. Sur l'existence d'une tyrosinase dans le son de froment.— C. R. Acad. Sci., Paris., **144**, 1285 (1907).
26. Chodat et Staub. Nouvelles recherches sur les ferments oxydants. III. La spécificité de la tyrosinase et son action sur les produits de la dégradation des corps protéiques.— Arch. Sci. phys. nat., **24** (1907).
27. Abderhalden u. Guggenheim. Versuche über die Wirkung der Tyrosinase aus *Russula delica* auf Tyrosin und tyrosinhaltige Polypeptide.— Zs. physiol. Chem., **54**, 331 (1908).
28. Willock. The action of radium rays on tyrosinase.— J. Physiol., **34**, 207 (1906).
29. Chodat R. Les ferments oxydants.— J. suisse Chim. Pharm., **46—48** (1905) (Доклад).
30. Бах. Пероксидазы как специфически действующие ферменты [Peroxydasen als spezifisch wirkende Enzyme].— Ber. Dtsch. chem. Ges., **39**, 2126 (1906); настоящая книга, стр. 404.
31. Gessard. Réactions des oxydases avec l'eau oxygénée.— Soc. Biol., **55**, 637 (1909).
32. Fürth u. Jerusalem.— Zur Kenntnis der melanotischen Pigmente und der fermentativen Melaninbildung.— Beitr. chem. Physiol. u. Pathol., **X**, 131 (1907).
33. Бах. К вопросу о тирозиназе [Zur Kenntnis der Tyrosinase].— Ber. Dtsch. chem. Ges., **42**, 594 (1909); настоящая книга, стр. 433.
34. Гонперманн. Homogentisinsäure.— Pflüg. Arch., **82**, 289.
35. Schulze. Ist bei Luftzutritt eintretende Dunkelfärbung des Rübensaftes durch einen Tyrosin- und Homogentisinsäuregehalt dieses Saftes bedingt?— Zs. physiol. Chem., **50**, 508 (1907).
36. Гонперманн. Die Anteilnahme des Brenzcatechins bei der Dunkelfärbung der Rübensäfte.— Pflüg. Arch., **123**, 635 (1908).
37. Бах. К вопросу о пероксидазе, содержащейся в тирозиназе [Zur Kenntnis der in Tyrosinase lätigen Peroxydase].— Ber. Dtsch. chem. Ges., **41**, 216 (1908); настоящая книга, стр. 413.
38. Neuberg. Enzymatische Umwandlung von Adrenalin.— Biochem. Zs., **VIII**, 383 (1908).
39. Gessard. Sur la tyrosinase.— Ann. Inst. Pasteur, **XV**, 593 (1901).
40. Bertrand et Rosenblatt. Tyrosinase et tyrosine racémique.— C. R. Acad. Sci., Paris., **146**, 304 (1907).
41. Abelous et Aloy. Existence de la diastase oxydo-réductrice chez les végétaux.— Soc. Biol., **56**, 222 (1903).
42. Carnot. Zur un ferment oxydant de la salive et de quelques autres sécrétions.— Soc. Biol., **48**, 552 (1896).
43. Словцов. К вопросу об оксидазах в животном организме. СПб. (1899). (Диссертация).
44. Roehl. Action physiologique de la spermine.— C. R. Acad. Sci., Paris., **115**, 129 (1892).
45. Schumm. Zur Kenntnis der Guajakprobe usw.— Zs. physiol. Chem., **50**, 374 (1906).
46. Carrière.— Soc. Biol., **51**, 569 (1899).
47. Abelous et Biarnès. Sur l'existence chez les Mammifères d'une oxydase-globuline etc.— Arch. physiol., **30**, 664 (1897).
48. Зибер. Einwirkung der Oxydationsenzyme auf Kohlehydrate.— Zs. physiol. Chem. **39**, 484 (1903).
49. Portier. Les oxydases dans la série animale. Paris (1898). (Диссертация).
50. Herlitzka. Sull'ontogenesi dei fermenti.— Biologica, **1**, 7 (1907).
51. Savaré. Zur Kenntnis der Fermente der Placenta.— Hom. Beitr., **IX**, 141 (1907).
52. Ferroni. Die Oxydasen des Mutterkuchens.— Ann. Ostetricia (1906) [Цит. по Biochem. Cbl., **VI**, 300 (1907)].
53. Schmitt. Existence de ferment oxydant dans la peau.— Soc. Biol., **56**, 678 (1907).
54. Медведев. Pflüg. Arch., **65**, 249 (1897).
55. Abelous et Aloy. Sur quelques conditions de l'action d'un ferment oxydant.— Soc. Biol., **55**, 891 (1903).

56. Dony - Hénauld et van Duren. Les oxydases dans les tissus animaux.— Arch. int. physiol., V, 39 (1907).
57. Biedermann. Pflüg. Arch., 72, 105 (1898).
58. Fürth u. Schneider. Ueber tierische Tyrosinasen und ihre Beziehungen zu Pigmentbildung.— Hofm. Beitr., X, 229 (1901).
59. Przißram. Цит. no v. Fürth u. Schneider (58).
60. Gessard. Tyrosinase animale.— Soc. Biol., 54, 1304 (1902).
- 60a. Gessard. Sur deux phénomènes de coloration dus à la tyrosinase.— Soc. Biol., 57, 285 (1903).
61. Gessard. Sur la formation du pigment mélanique dans les tumeurs du cheval. C. R. Acad. Sci., Paris., 138, 1086 (1903).
62. Durham. On the presence of tyrosinase in the skins of some pigmented animals.— Proc. Roy. Soc., 74, 310 (1904).
63. Dewitz. Recherches expérimentales sur la métamorphose des insectes.— Soc. Biol., 54, 44 (1904).
64. Gessard. Sur la tyrosinase dans la mouche dorée.— C. R. Acad. Sci., Paris, 139, 644 (1904).
65. Phisalix. Sur le changement de coloration des larves de *Phylodroma germanica*.— Soc. Biol., 58, 17 (1905).
66. Gessard. Etude sur la tyrosinase.— Ann. Inst. Pasteur. XV, 593 (1901).
67. Bourquelot et Herissey. Recherches relatives à la question des anti-ferments.— Soc. Biol., 55, 177 (1903).
68. Горбачевский. Monatsh. f. Chem., XII, 221 (1891).
69. Spitzer. Pflüg. Arch., 76, 192.
70. Wiener. Ueber Zersetzung und Bildung der Harnsäure im Tierkörper.— Arch. exp. Pathol. u. Pharm., 42, 375 (1899).
71. Schittenhelm. Ueber die Harnsäurebildung in Gewebeauszügen.— Zs. physiol. Chem., 42, 251; 43, 228 (1909).
72. Burian. Ueber die oxydative und die vermeintliche synthetische Bildung von Harnsäure in Rinderleberauszügen.— Zs. physiol. Chem., 43, 497 (1905).
73. Schittenhelm. Ueber die Harnsäurebildung und Harnsäurezersetzung in den Auszügen der Rinderorgane.— Zs. physiol. Chem., 45, 119 (1905).
74. Battelli u. a. Untersuchungen über die Urikase in den Tiergeweben.— Biochem. Zs. (1909).
75. Wiechowski. Die Produkte der fermentativen Harnsäurezersetzung durch tierische Organe.— Hofm. Beitr., IX, 295 (1907).
- 75a. Wiechowski. Die Bedeutung des Allantoinis im Harnsäurestoffwechsel.— Hofm. Beitr., XI, 109 (1908).
76. Croftan. Zur Kenntnis der Harnsäureumwandlung im Tier- und Menschenkörper.— Pflüg. Arch., 121, 377 (1908).
77. Künzell u. Schittenhelm. Ueber den zeitlichen Ablauf der Uricolyse. Zs. exp. Pathol. u. Therap., V, 389 (1909).
78. Wiener. Ueber Harnsäurezersetzung durch Organfermente.— Cbl. Physiol., XVIII, 690 (1905).
79. Wiechowski u. Wiener. Ueber die Eigenschaften und Darstellung des Harnsäure zerstörenden Fermente der Rinderniere und der Hundeleber. Hofm. Beitr., IX, 247 (1907).
80. Künzell u. Schittenhelm. Gegenseitige Beeinflussung der Fermente des Nucleinstoffwechsels.— Zs. exp. Pathol. u. Therap., V, 393 (1909).
81. Chodat. Mode d'action de l'oxydase.— Arch. Sci. phys. nat., XIX, 501 (1905).
82. Бах. О механизме действия тирозиназы [Ueber die Wirkungsweise der Tyrosinase].— Ber. Dtsch. chem. Ges., 41, 221 (1908); настоящая книга, стр. 423.
83. Foa. Eine Methode graphischer Registrierung einiger Gärungsvorgänge.— Biochem. Zs., XI, 382 (1908).
84. Bertrand. Sur l'intervention du manganèse dans les oxydations provoquée par la laccase.— C. R. Acad. Sci., Paris., 124, 1032, 1355 (1897).
85. Trillat. Influences activantes ou paralysantes agissant sur le manganèse envisagé comme ferment métallique.— C. R. Acad. Sci., Paris, 137; 922 94, 274 (1904).
86. Dony - Hénauld. Contribution à l'étude méthodique des oxydases.— Bull. Acad. Roy. Belg., 105 (1908).
87. Euler u. Bolin. Zs. physiol. Chem., 57, 80 (1908).
88. Словцов. Zs. physiol. Chem., 31, 227 (1900).
89. Sarthou. Sur une oxydase retirée du *Schinus mole*, la schinoxidase.— J. Pharm. Chim., VI, 11, 482 (1900).
90. Bertrand. C. R. Acad. Sci., Paris, 124, 1034 (1897).
91. Розенфельд. Оксидаза *Rad. Raphani sativi* и о действии солей алкалоидов на окислительную способность (1906), СПб. (Диссертация).
92. Stoecklin. Contribution à l'étude de la peroxydase (1907). Genève (Диссертация).



93. Бах совм. с Черняком. К вопросу об очистке пероксидазы [Zur Reinigung der Peroxydase].—Ber. Dtsch. chem. Ges., **41**, 2345 (1908); настоящая книга, стр. 429.
94. Bertrand. Influence des acides sur l'action de la laccase. — C. R. Acad. Sci., Paris, **145**, 340 (1907); Ann. Inst. Pasteur, **21**, 673 (1907).
95. Bertrand et Rozenband. Recherches sur l'action paralysante exercée par certains acides sur la peroxydase.— Ann. Inst. Pasteur, **23**, 314 (1909).
96. Spruce. On the presence of oxydases in the india rubber etc.—Biochem. J., **III**, 165 (1908).
97. Bourquelot et Marchandier. Etude de la réaction provoquée par un ferment oxydant indirect sur la vailline et la morphine.— C. R. Acad. Sci., Paris, **138**, 1432 (1904); J. Pharm. Chim., 1 января 1904.
98. Engler und Herzog. Zs. physiol. Chem., **59**, 327 (1909).
99. Бах. О действии света на пероксидазу [Ueber das Verhalten der Peroxydase gegen Licht].— Ber. Dtsch. chem. Ges., **41**, 228 (1908); настоящая книга, стр. 427.
100. Yamada u. Jodlbaue r. Die Wirkung des Lichtes auf Peroxydase und ihre Sensibilisierung durch fluorescierende Stoffe.— Biochem. Zs., **VIII**, 61 (1908).
101. Бах. О действии иода на пероксидазу [Ueber das Verhalten der Peroxydase gegen Jod].— Ber. Dtsch. chem. Ges., **40**, 230 (1907); настоящая книга, стр. 409.
102. Бах. О действии гидроксилamina, гидразина и синильной кислоты на пероксидазу [Ueber das Verhalten der Peroxydase gegen Hydroxylamin, Hydrazin und Blausäure].— Ber. Dtsch. chem. Ges., **40**, 3185 (1907); настоящая книга, стр. 413.
103. Бах. О действии пероксидазы на реакцию между перекисью водорода и подкисловодородной кислотой [Ueber die Wirkungsweise der Peroxydase bei der Reaktion zwischen Hydroperoxyd und Jodwasserstoffsäure].— Ber. Dtsch. chem. Ges., **37**, 3785 (1904).
104. Wolff et de Stoecklin. Influence comparée de certaines combinaisons du fer et des peroxydases dans la catalyse de l'acide iodhydrique par le peroxyde d'hydrogène.— C. R. Acad. Sci., Paris, **146**, 1485 (1908).
105. Бах совм. с Шода. О каталазе [Ueber Katalase].—Ber. Dtsch. chem. Ges., **36**, 1756 (1903); настоящая книга, стр. 356.
106. Neuhäus. Contribution à l'étude des ferments oxydants. Genève (1906). (Диссертация).
107. Бах. К вопросу о каталазе [Zur Kenntnjs der Katalase].— Ber. Dtsch. chem. Ges., **38**, 1878 (1905); настоящая книга, стр. 391.
108. Chodat et Pasmansk. Sur le partage dans l'action de la peroxydase en présence de catalase.— Arch. Sci. phys. nat., **23**, 13 (1907).
109. Бах. Влияние пероксидазы на спиртовое брожение [Einfluss der Peroxydase auf die alkoholische Gärung].—Ber. Dtsch. chem. Ges., **39**, 1664 (1906); настоящая книга, стр. 396.
110. Moitessier. Sur le rôle de la peroxydase dans les réactions colorées obtenues avec le sang.— Soc. Biol., **56**, 573 (1904).
111. Lieberman. Beiträge zur Kenntnjs der Fermentwirkungen. — Pflüg. Arch., **104**, 119 (1906).
112. Pighini. Sulla reazione del guajaco data del sangue.— Arch., physiol. **IV**, 57.
113. Linoossier. Contribution à l'étude des ferments oxydants. Sur la peroxydase du pus.— Soc. Biol., **50**, 373 (1890).
114. Czuhlars u. Fürth. Ueber tierische Peroxydasen.— Hofm. Beitr., **X**, 358 (1907).
115. Buckmaster. The pseudo-peroxidase reaction etc.— J. Physiol., **37** (1908).
116. Battelli u. a. Ueber die Peroxydasen der Tiergewebe.— Biochem. Zs., **XIII**, 44 (1908).
117. Battelli. Oxydation de l'acide formique par les extraits des tissus animaux en présence du peroxyde d'hydrogène.— C. R. Acad. Sci., Paris, **138**, 651 (1904).
118. Бах совм. с Шода. О механизме действия пероксидазы [Ueber die Wirkungsweise der Peroxydase].— Ber. Dtsch. chem. Ges., **37**, 1342 (1904); настоящая книга, стр. 370.
119. Бах совм. с Шода. Скорость реакции в присутствии пероксидазы [Ueber die Geschwindigkeit der Peroxydasereaktion].— Ber. Dtsch. chem. Ges., **37**, 2434 (1904); настоящая книга, стр. 370.
120. Зибер. Разрушение токсинов при помощи перекисей и пероксидаз животного и растительного происхождения.— Арх. Биол. Наук, **IX**, 2. С116.
121. Loew. Zur physiologischen Bedeutung der Katalase.— Cbl. Bacteriol., **21**, 1—3 (1908).
122. Loew. Spielt Wasserstoffsperoxyd eine Rolle in der lebenden Zelle?— Ber. Dtsch. chem. Ges., **35**, 2487 (1902).

## ХИМИЗМ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ \*

### ВВЕДЕНИЕ

Последние два десятилетия ознаменовались чрезвычайно интенсивной работой в области исследования вопроса о *химизме дыхательных процессов*. Накопилась масса материала, в котором обилие частных фактов, нередко противоречащих друг другу, затемняют общий смысл явления и вызывают бесполезные повторения и отклонения в сторону от основной цели. Для разумного направления дальнейшей работы необходимо разобраться в имеющемся материале и по возможности сделать из него общие выводы. Эту задачу и ставит себе предлагаемая монография.

В простейшем ее виде основная проблема дыхания заключается в следующем.

Для выполнения своих жизненных функций живые организмы должны производить непрерывную затрату энергии. Энергию эту они черпают из пищевых веществ, сжигая их посредством кислорода, который они поглощают из окружающей атмосферы.

Но вне организма пищевые вещества — углеводы, жиры и белки — почти совершенно безразлично относятся к свободному, *молекулярному*, кислороду. Чтобы окислить их, необходимо прибегнуть к *атомному*, или активному, кислороду. Объяснить быстрое разрушение пищевых веществ в организме окислением можно поэтому только двояким путем — или эти вещества расщепляются в организме на части, способные окисляться за счет недействительного молекулярного кислорода, или же организм обладает средством переводить свободный кислород из недействительного состояния в деятельное. Так как известные нам продукты распада пищевых веществ в общем не легче окисляются свободным кислородом, чем сами эти вещества, то первое предположение приходится отвергнуть. Остается последнее, т. е. перевод кислорода из недействительного состояния в деятельное, или так называемое *активирование* кислорода.

Вся деятельность живых организмов протекает при внутренних температурах, высший предел которых лежит около 40°. Поэтому, поскольку вопрос идет о химизме дыхания, мы имеем дело с реакциями окисления, совокупность которых известна под названием *медленного* сгорания. Очевидно, что без точного знания сущности медленного сгорания химизм дыхания должен остаться для нас закрытой книгой. И действительно, лишь после того как трудами многих исследователей сущность эта оказалась выясненной, изучение химизма дыхания могло сильно двинуться вперед.

\* ЖРФХО, 44, № 1—2 (1912).

Процессы медленного сгорания, как и все медленно протекающие реакции, доступны воздействию *каталитических агентов*, во много раз увеличивающих их первоначальную скорость. Такого рода каталитические агенты, или катализаторы, ускоряющие процессы медленного сгорания, известны уже давно, и действие их до некоторой степени изучено. Поэтому чрезвычайно важным шагом на пути к познанию химизма дыхательных процессов было открытие, что вполне аналогичные по своему действию катализаторы в большом количестве находятся в живых организмах в виде специальных ферментов. Этим устанавливалась близкая аналогия, если не тождество, между процессами медленного сгорания и процессами дыхания и давалась возможность заключать о первых по последним.

В соответствии с вышесказанным материалы по вопросу о химизме дыхания, естественно, располагаются в следующем порядке:

1. Процессы медленного окисления и связанные с ними явления катализа. 2. Данные о ферментах, участвующих в процессах медленного сгорания в живых организмах. 3. Физиологическая роль этих ферментов и общие выводы относительно современного состояния наших знаний о химизме дыхания.

В указанном порядке мною и будут рассмотрены имеющиеся материалы. Что касается библиографических указаний, то я приведу лишь наиболее существенные. Более полную библиографию вопроса читатели найдут в следующих сочинениях:

1. O p p e n h e i m e r C. Die Fermente und ihre Wirkungen.

2. B a x A. совм. с Шода Р. Современное состояние учения об окислительных ферментах растений [Ueber den gegenwärtigen Stand der Lehre von den pflanzlichen Oxydationsfermenten].—Biochem. Cbl., 1 (1903).

3. B a x A. Новые работы в области растительных и животных оксидаз и пероксидаз [Neuere Arbeiten auf dem Gebiete der pflanzlichen und tierischen Oxydasen und Peroxydasen].—Biochem. Cbl., 9 (1909).

4. K a s t l e J. The oxidases and other oxygen-catalysts concerned in biological oxidations.—Hyg. Laboratory, Bull., 59 (1909). Washington.

## I. ПРОЦЕССЫ МЕДЛЕННОГО СГОРАНИЯ

### 1. Общие замечания

Изучая процессы окисления, легко видеть, что одни из них происходят сами по себе, без помощи посторонней энергии, другие же наступают лишь тогда, когда посторонняя энергия в виде тепла, электричества и т. д. предварительно устранит химическую инерцию реагирующих веществ. Металлический натрий, фосфор, некоторые органические соединения поглощают свободный кислород уже при обыкновенной температуре; благородные металлы, дерево, каменный уголь соединяются с кислородом лишь при высокой температуре. Такие окислительные процессы, которые происходят без участия посторонней энергии, называют *медленным сгоранием* или *самопроизвольным окислением*; в отличие от процессов второго рода, которые обозначаются названием *быстрого сгорания*, или *вынужденного окисления*.

Из этого определения вытекает, что к процессам медленного сгорания надо причислить не только окисления посредством *свободного* кислорода, но также и окисления посредством *связанного* кислорода. В частности, огромную роль в дыхательных процессах играют *гидролитические* окисления, т. е. окисления за счет кислорода воды. Мы рассмотрим в отдельности эти две формы медленного сгорания.

Быстрое сгорание отличается от медленного лишь своей скоростью и обусловливаемой ею высокой температурой реакции.

При медленном сгорании скорость и температура реакции зависят от природы сгорающего вещества. Но скорость эта никогда не бывает достаточно большой, чтобы температура реакции значительно превысила температуру окружающей среды.

Основной предпосылкой всякого окисления посредством свободного кислорода является устранение его инертного, недействительного состояния. По господствующим теперь воззрениям, свободный кислород существует в виде молекул, состоящих из двух связанных друг с другом двувалентных атомов. Инертность свободного кислорода объясняется тем, что в молекуле его  $O = O$  химические сродства атомов кислорода  $O =$  и  $= O$  взаимно и полностью насыщают друг друга, причем выделяется свободная энергия. Переход кислорода из недействительного состояния в деятельное мыслим лишь как разрыв или ослабление связей, которыми удерживаются атомы в молекуле. Этот процесс называют *активированием* кислорода.

Так как образование недействительного кислорода из атомов сопряжено с выделением энергии, то обратный процесс, т. е. переход кислорода в деятельное состояние, может иметь место лишь при затрате энергии. В процессах быстрого сгорания это активирование кислорода происходит за счет теплоты, первоначально доставленной извне, и идет дальше беспрепятственно под влиянием высокой температуры реакции. Напротив того, при медленном сгорании первоначальная энергия, необходимая для выведения кислорода из его недействительного состояния, может быть доставлена лишь самими окисляющимися веществами. Другими словами, *вещества, окисляющиеся при обыкновенной температуре, обладают способностью активировать свободный, молекулярный кислород*. Мы подходим тут к узловому пункту проблемы дыхания: к механизму активирования кислорода. История развития наших знаний по этому вопросу является очень поучительной, и для лучшего понимания современных взглядов я считаю нужным сделать очень краткий обзор следовавших одна за другой теорий активирования кислорода.

## 2. Теория Шенбейна

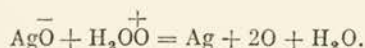
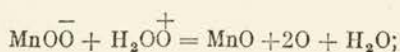
В связи с открытием озона, как активной формы кислорода, Шенбейном\* был установлен факт, что медленное сгорание многих легкоокисляемых веществ, как терпентинное масло, фосфор и т. д., в свободном кислороде сопровождается образованием активного кислорода. Посредством этого активного кислорода можно произвести окисление таких веществ, которые обыкновенным свободным кислородом не окисляются. Если, например, пропускать воздух через водный раствор индиговой краски (индигосульфонат натрия), последняя остается без изменения. Но если прибавить к этому раствору немного терпентинного масла или кусок фосфора и продолжать пропускать воздух, то синий цвет жидкости через короткое время переходит в оранжево-желтый вследствие окисления индиго в изатин. Вполне очевидно, что окислению индиговой краски в изатин при указанных условиях должно было предшествовать активирование свободного кислорода, причем активирование это могло быть вызвано только присут-

\* Работы Хр. Ф. Шейнбейна рассеяны в «Pogg. Ann.», в «J. prakt. Chem.» и в «Verhandlungen der Naturforschenden Gesellschaft zu Basel». Подробная библиография приведена у Е. Hagenbach. Christian Friedrich Schönbein, Basel, 1868. Взгляды Шейнбейна на процессы медленного сгорания подробно изложены, с указанием библиографии, в монографии: С. Engler u. J. Weissberg, Kritische Studien über die Vorgänge der Autoxydation, Braunschweig, 1904.

ствием терпентинного масла или фосфора. Спрашивается, каким путем легкоокисляемые вещества превращают инертный кислород в активный? Не вдаваясь в подробности, которые интересующиеся читатели могут найти в приведенных мною сочинениях, я изложу только сущность взглядов Шенбейна на этот вопрос.

Шенбейн нашел, что озон образуется из свободного кислорода не только под действием электрического разряда, но также и при медленном сгорании фосфора. Поэтому первой его мыслью было, что активный кислород, образующийся в процессах медленного окисления, и есть озон. Но дальше оказалось, что при медленном сгорании фосфора образуется не только озон, но и перекись водорода. Последнюю Шенбейн нашел также и во многих других изученных им случаях медленного сгорания. Особенно важен в теоретическом отношении его опыт с медленным сгоранием свинца — опыт, который является основой современного учения о медленном сгорании. Взбалтывая на воздухе свинцовые стружки с водою, подкисленной серной кислотой, Шенбейн\* нашел, что при этих условиях образуются эквивалентные количества сернокислого свинца и перекиси водорода. Другими словами, из всего количества кислорода, который вступил в реакцию, половина вступила в прочное соединение со свинцом, тогда как другая половина оказалась в виде перекиси водорода, т. е. в виде активного кислорода, связанного с водою. Исходя из положения, что озон есть первоначальная форма активного кислорода, Шенбейн думал объяснить образование перекиси водорода действием озона на воду. Но опыт показал, что озон не дает перекиси водорода с водою. Тогда Шенбейн, основываясь на известных уже тогда фактах различия между окислительным действием перекиси свинца, перекиси марганца и т. д., с одной стороны, и перекиси бария и перекиси водорода — с другой, пришел к мысли о существовании двух активных, полярных одна по отношению к другой (+ и —) форм кислорода.

При медленном окислении легкоокисляемых веществ инертный, или нейтральный, кислород (O) претерпевает такого рода изменение, что половина его превращается в положительно-активную ( $\overset{+}{O}$ ), другая половина — в отрицательно-активную ( $\overset{-}{O}$ ) форму. Отрицательно-активный кислород, как наиболее энергично действующий, соединяется с окисляемым веществом, тогда как положительно-активный образует с водою перекись водорода. Шенбейн полагал, что отрицательно-активный кислород тождествен с *озоном*, и оставил за ним это название, тогда как положительно-активный кислород он назвал *антозоном*. Как озон, так и антозон могли, по мнению Шенбейна, сохранить свои активные свойства, даже находясь в состоянии химических соединений. Соответствующие соединения Шенбейн назвал *озонидами* и *антозонидами*. К озонидам он причислял перекиси марганца и свинца, окись серебра, азотную кислоту и т. п., к антозонидам — перекиси щелочных и щелочноземельных металлов, так же как и перекись водорода. При встрече озонида с антозонидом отрицательно-активный кислород первого реагирует с положительно-активным последнего, полярность обеих активных форм нейтрализуется, и из них образуется простой нейтральный кислород. Так Шенбейн объяснил, например, разложение перекиси водорода перекисью марганца или окисью серебра:



\* J. prakt. Chem., 93, 24 (1864).

Факты, которые легли в основу взглядов Шенбейна, оказались несомненно верными, но толкование их не соответствует действительности. Нет двух полярно противоположных, способных к независимому существованию форм активного кислорода, так как из предполагаемых антозонидов, как перекись бария или перекись водорода, получается действием крепкой серной кислоты не предполагаемый антозон, а простой озон. Мы теперь знаем, что различия, которые Шенбейн устанавливает между своими озонидами и антозонидами, обуславливаются не различной природой кислорода, а формой его связи в молекуле. Так, например, перекиси мар-

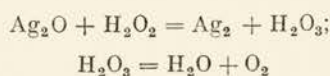
ганца («озониду») приписывается конституционная формула  $\text{Mn} \begin{array}{c} \text{O} \\ // \\ \text{O} \end{array}$ ,

а перекиси бария («антозониду») — формула  $\text{Ba} \begin{array}{c} \text{O} \\ / \quad \backslash \\ \text{O} \end{array}$ . В первом атомы

кислорода независимо друг от друга связаны с атомом металла, во втором они соединены одной валентностью с металлом, а другой между собою.

Ошибочным оказалось и предположение, высказанное Шенбейном, что антозон окисляет воду в перекись водорода. Мы знаем теперь, что воду ни при каких условиях нельзя окислить в перекись водорода и что последняя образуется лишь при прямом окислении водорода или же гидролизом перекисей типа перекиси бария.

Наконец, неверно также шенбейновское объяснение реакции между озонидами и антозонидами. Мы теперь знаем, что дело здесь не в «выравнивании полярностей», не во «взаимном раскислении озонидов», а в образовании высших, крайне неустойчивых окислов водорода, например:



Последнее объяснение было дано впервые Бертело<sup>1</sup>. Впоследствии Бейер<sup>2</sup> старался опровергнуть это объяснение. Но опыты и аргументы его не кажутся мне убедительными.

Оригинальные работы Шенбейна дали сильный толчок исследованию процессов окисления и вызвали немало спекулятивных рассуждений, которые не лишены интереса для истории развития научных идей. Но я остановился здесь только на главных этапах дальнейшего развития основных взглядов Шенбейна, на которых, как видно будет дальше, зиждется современная теория окислительных процессов.

### 3. Теория Клаузиуса

К теории Шенбейна близко примыкает теория Клаузиуса. Исходя из своих взглядов на электрическое строение молекул, Клаузиус<sup>3</sup> принимает, что молекулы элементарных газов, в том числе и кислорода, состоят по меньшей мере из двух атомов, заряженных противоположным электричеством. Подобно тому как в молекуле хлористого натрия атомы хлора и натрия держатся вместе вследствие противоположности их электрического заряда, положительные и отрицательные атомы кислорода притягиваются друг к другу, образуя молекулы инертного, нейтрального кислорода. При известных условиях часть нейтральных молекул кислорода распадается на полярно-противоположные атомы. Эти атомы и составляют озон. При медленном сгорании фосфора в соединение вступают по преимуществу

отрицательные атомы кислорода, в то время как положительные «беспрепятственно или с небольшими препятствиями летают между другими молекулами». Но после того как другими исследователями было доказано, что озон не атомный кислород, а молекула, состоящая из трех атомов, Клаузиус<sup>4</sup> изменил свой первоначальный взгляд и высказал предположение, что в момент распада молекулы кислорода на свободные атомы отрицательный атом кислорода соединяется с нейтральной молекулой, образуя *озон*, тогда как положительный атом соединяется с другой молекулой, образуя *антозон*.

Заметим здесь, что взгляд Клаузиуса на образование озона оказался верным в том отношении, что и теперь еще образование озона под действием электрического разряда объясняют распадом части молекул кислорода на атомы и присоединением последних к целым молекулам:



Из этого краткого изложения видно, что теория Клаузиуса является формулировкой теории Шенбейна, более точной и согласованной с тогдашними представлениями.

#### 4. Теория Вант-Гоффа

Вант-Гофф «обновил» теорию Клаузиуса, приспособив ее к современному учению об электролитической диссоциации. По Вант-Гоффу<sup>5</sup>, свободный кислород уже при обыкновенных условиях содержит в минимальных количествах диссоциированные на ионы  $\dot{O}$  и  $\bar{O}$  молекулы. В соприкосновении с воздухом всякое способное к окислению вещество поглощает эти ионы, вследствие чего равновесие между распавшимися и нераспавшимися молекулами кислорода нарушается, и происходит дальнейшая диссоциация. Окисляясь на воздухе, легкоокисляемые вещества (фосфор, терпентинное масло) поглощают лишь один вид ионов, тогда как противоположный вид может соединяться с трудноокисляемыми веществами (индиго) или образовывать с молекулярным кислородом озон.

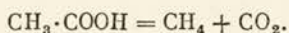
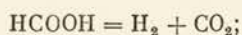
Таким образом, активный кислород образуется не под влиянием окисляющихся веществ, а предсуществует уже в свободном кислороде. Как Шенбейн и Клаузиус, Вант-Гофф предполагает существование *различных форм активного кислорода*, из которых одна окисляет только легкоокисляемые вещества, другая только трудноокисляемые. Но в то время как для первых авторов обе формы активного кислорода *вещественно* отличны друг от друга и способны к независимому друг от друга существованию (озон и антозон), Вант-Гофф сводит различие к образованию ионов  $\dot{O}$  и  $\bar{O}$ , полярно противоположных и к отдельному друг от друга существованию неспособных.

По сравнению с предшествовавшими ей концепциями теория Вант-Гоффа имеет то преимущество, что она доступна проверке посредством современных методов физико-химического исследования. Но дальнейшая разработка этой теории совершенно оставлена, так как почти одновременно с нею развитая Бахом и Энглером теория активирования кислорода отодвинула ее на задний план.

#### 5. Теория Гопше-Зейлера

Теория Гопше-Зейлера<sup>6</sup> представляет собою заметное отклонение в сторону от общего направления, которое приняло исследование процессов медленного окисления после Шенбейна. Гопше-Зейлер исходил из положения, что в живых организмах происходят наряду с окислительными процессами также и процессы восстановительные. Под влиянием этих восстано-

вительных процессов в живой клетке образуются редуцирующие, легкоокисляемые вещества и даже водород *in statu nascendi*. Когда от карбоксила  $\text{COOH}$  органических кислот отщепляется углекислый газ  $\text{CO}_2$ , как это имеет место при некоторых анаэробных процессах, то одновременно с этим должен появиться водород *in statu nascendi*. В отсутствии кислорода водород этот редуцирует разные, способные к восстановлению вещества или же выделяется в свободном состоянии. Так, например, некоторые бактерии выделяют в отсутствии кислорода водород и углекислоту из муравьиной кислоты (в виде ее солей), болотный газ и углекислоту — из уксусной кислоты:



Но когда подобного рода восстановительные процессы происходят при доступе кислорода, они вызывают энергичные окислительные процессы. Ибо редуцирующие вещества, подобно водороду *in statu nascendi*, обладают, по мнению Гоппе-Зейлера, способностью расщеплять молекулу кислорода на *свободные атомы*. Один из этих атомов соединяется с легкоокисляемым веществом, образуя окись (окисляет, например, водород в воду), другой атом кислорода остается свободным и является настоящим активным кислородом. Этот-то активный кислород и может окислять трудноокисляемые вещества, как индиго, или же — в их отсутствии — окисляет воду в перекись водорода.

Гоппе-Зейлер высказывает при этом мнение, что между атомами кислорода, на которые расщепляется молекула кислорода, *нет никакой разницы*. Но этим он подрывает в корне свою теорию. Оставляя в стороне вопрос о том, что она не объясняет появления перекиси водорода при всех процессах медленного сгорания, — вода ведь не окисляется в перекись водорода — теория Гоппе-Зейлера содержит внутреннее противоречие. Если предположить, что из двух атомов, составляющих частицу кислорода, один окисляет только легкоокисляемые вещества (терпентинное масло, фосфор, водород *in statu nascendi*), другой — только трудноокисляемые (индиго), то необходимо также допустить, что атомы эти чем-нибудь да отличаются друг от друга. Иначе непонятным становится, почему один атом окисляет только легкоокисляемые вещества, другой только трудноокисляемые. Скорее можно было бы ожидать, что при действии кислорода на смесь терпентинного масла и индигового раствора свободные атомы окислят целиком первое и оставят нетронутым последний. Но факты говорят другое. И вот, чтобы сообразовать с этими фактами теорию расщепления частицы кислорода на *свободные атомы*, необходимо или с Шенбейном и Клаузиусом допустить *вещественное* различие между атомами (озон и антозон), или с Вант-Гоффом принять *электрическое* различие между ними (положительные и отрицательные ионы кислорода). Приписывая атомам кислорода различную окислительную способность и вместе с тем отрицая какое бы то ни было различие между ними, Гоппе-Зейлер делает ошибку, которая лишает его теорию всякого значения.

С концепцией Гоппе-Зейлера мы еще встретимся в дальнейшем изложении, так как один из видных исследователей по вопросу об окислительных ферментах, Г. Бертран, положил ее в основу своей теории оксидаз.

## 6. Теория М. Траубе

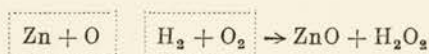
Изложенные до сих пор теории активирования кислорода основаны на предположении, что процесс активирования состоит в распаде молекулы нейтрального кислорода на две активные части, или свободные атомы.



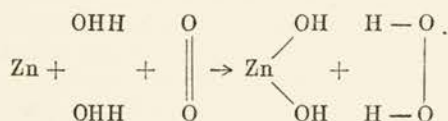
Совершенно новую и оригинальную постановку вопроса дал М. Траубе<sup>7</sup>. Он исходит из экспериментально обоснованного положения, что в отсутствии воды, повидимому, никакой окислительный процесс не может состояться: так, например, в совершенно сухом кислороде металлический натрий сохраняет свой блеск; пламя окиси углерода немедленно потухает, если внести его в атмосферу кислорода, вполне освобожденного от водяных паров. Поэтому, по мнению Траубе, вода является основным фактором всякого окислительного процесса.

Второе положение, которое выставляет Траубе, таково: в процессах медленного сгорания молекула кислорода *не распадается на отдельные атомы, а действует целиком*. Комбинируя эти два положения, Траубе строит следующую теорию активирования кислорода.

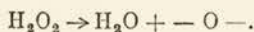
Под влиянием соединенного действия окисляемого вещества и свободного кислорода происходит прежде распад частицы воды на ее элементы — кислород и водород. Окисляемое вещество соединяется с кислородом воды, в то время как водород ее соединяется с целой частицей кислорода, образуя перекись водорода. Для окисления цинка, например, Траубе дает такую схему:



или



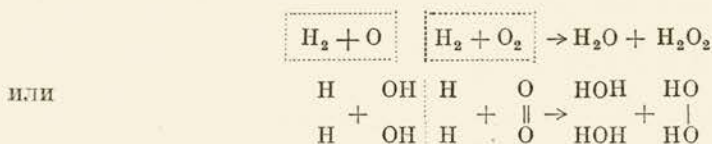
Ни цинк, ни кислород сами по себе не в состоянии разлагать воду. Распад ее происходит лишь, когда, вследствие сродства цинка к кислороду воды, а свободного кислорода — к водороду, элементы, молекулы воды притягиваются в разных направлениях и отрываются друг от друга. Указанной схемой Траубе дает точное выражение тому основному, установленному Шенбейном факту, что при медленном сгорании столько же кислорода фиксируется окисляемым веществом, сколько появляется в активном состоянии. Соединяясь со свободным кислородом, водород воды образует перекись водорода, в которой один атом, т. е. половина вступившего в реакцию кислорода, находится в слабосвязанном, активном состоянии; поэтому перекись водорода легко уступает его окисляемым веществам, сама превращаясь в воду:



Итак, характерным для теории Траубе являются предположения: 1) что окисляемые вещества окисляются не свободным, молекулярным кислородом, а связанным кислородом; 2) что перекись водорода, появляющаяся при всех процессах медленного сгорания, образуется не окислением воды, как это раньше предполагали, а присоединением молекулы кислорода к водороду воды. Поэтому активирование кислорода происходит не расщеплением молекулы кислорода на свободные атомы, а *путем образования перекиси водорода*.

Теория Траубе гораздо более приемлема, чем все предшествовавшие ей, но и против нее можно выдвинуть веские возражения. Что существуют вещества, способные окисляться за счет кислорода воды, — не подлежит сомнению. О них речь будет дальше. В частности, окисление неблагородных металлов, как свинец, цинк и т. п., при взбалтывании их с водою на воздухе идет, по всей вероятности, по схеме Траубе. Но для применения ее ко всем случаям медленного сгорания под действием свободного кисло-

рода нет достаточно оснований ни теоретических, ни фактических. Почему все легкоокисляемые вещества, совершенно независимо от их природы и их динамического состояния, обнаруживают большее сродство к *связанному* кислороду воды, чем к *свободному* кислороду атмосферы? Почему свободный кислород всегда предпочитает связанный водород воды одновременно с ним присутствующим легкоокисляемым веществом? На эти вопросы теория Траубе не дает ответа. Недостаточность ее особенно ярко обнаруживается, если применить схему Траубе к окислению водорода *in situ nascendi* свободным кислородом. По схеме Траубе окисление это идет так, что водород *in situ nascendi* соединяется с кислородом воды, давая воду, а водород последней соединяется с молекулярным кислородом, образуя перекись водорода:



Но, допуская такой ход реакции, надо также допустить и вывод из нее, а именно, что водород *in situ nascendi*, вместо того чтобы прямо соединиться со свободным кислородом, окисляется за счет воды и вытесняет из нее водород *in situ nascendi*, который с тем же свободным кислородом дает перекись водорода. Но это очевидный абсурд, и сам Траубе должен был признать, что в некоторых случаях молекулярный кислород может реагировать с окисляемыми веществами и без посредства воды. Вследствие этого *всеобщность* его теории активирования кислорода и медленного сгорания потерпела крушение.

Если, таким образом, Траубе и не удалось дать всеобъемлющую теорию процессов медленного сгорания, то его мысль о том, что в этих процессах молекула кислорода действует как целое, а не в виде свободных атомов, является чрезвычайно важным шагом вперед по пути выяснения этого вопроса. Установленному Шенбейном факту, что в процессах медленного сгорания половина кислорода, вступающего в реакцию, появляется в активном виде, Траубе дал *химическое* объяснение, допустив *первоначальное* образование перекиси водорода из молекулярного кислорода и водорода воды. Оставалось только притти к теории, охватывающей все процессы медленного сгорания при посредстве молекулярного кислорода, расширить эту концепцию в том смысле, что *все окисляемые вещества первоначально присоединяют к себе целые молекулы кислорода с образованием перекисей*.

Этот последний шаг был сделан А. Бахом<sup>8</sup> и К. Энглером<sup>9</sup> одновременно, но независимо друг от друга, причем первый выступил против концепций Гоппе-Зейлера, а последний — против теории Вант-Гоффа.

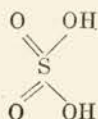
## 7. Теория Баха—Энглера

Сущность этой теории состоит в следующем.

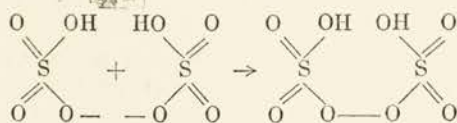
В процессах медленного сгорания, как упомянуто выше, энергия, необходимая для выведения молекулярного кислорода из его инертного состояния, получается не извне, а доставляется самим окисляемым веществом. Поэтому, между прочим, только вещества, обладающие свободной энергией, и способны соединяться с молекулярным кислородом при обыкновенной температуре. Переход молекулярного кислорода из недействительного состояния в деятельное мыслим только как частичный или полный разрыв связей, которые соединяют его атомы в молекулу. Само собою очевидно, что для разрыва одной из этих связей и превращения молекулы кислорода

$O = O$  в группу  $-O-O-$  — нужно затратить меньше энергии, чем для разрыва обеих связей и превращения молекулы  $O = O$  в свободные атомы  $-O-$  и  $-O-$ . По Оствальду, при химических реакциях, происходящих с выделением энергии, всегда образуются сначала те соединения, которые обуславливают наименьшую потерю энергии. Наоборот, если реакция совершается с поглощением энергии, то легче всего образуются те степени соединений, образование которых требует наименьшего поглощения энергии. Поэтому Оствальд<sup>10</sup> не замедлил высказаться за теорию Энглера и Баха, указав на то, что образование промежуточных, неустойчивых продуктов является не исключением, а общим правилом. На основании сказанного легко понять, что когда способное к медленному сгоранию вещество приходит в соприкосновение с молекулярным кислородом, то оно не расщепляет молекулы его на свободные атомы  $-O-$  и  $-O-$ , а превращает ее в группу  $-O-O-$ , которую и присоединяет к себе как таковую. Образующиеся таким образом соединения принадлежат к особому классу веществ, характеризующихся вполне определенными реакциями: это — *перекиси*.

Перекисями я называю здесь соединения типа перекиси водорода,  $HO-OH$ , которые содержат по меньшей мере два связанных друг с другом атома кислорода. Критерий этот не допускает исключений. Как бы велико ни было число атомов кислорода в молекуле какого-нибудь соединения, раз атомы эти не связаны между собою, соединение не дает реакций перекисей. Так, например, серная кислота, содержащая на один атом серы 4 атома кислорода, — не перекись. И действительно, по соображениям, в рассмотрение которых я не могу здесь входить, принимают, что в молекуле серной кислоты атомы кислорода связаны независимо друг от друга с атомом серы:



Но при электролизе крепкой серной кислоты через соединение двух ионов  $SO_4H'$  происходит сцепление между двумя атомами кислорода, и образуется *надсерная кислота*, которая обнаруживает все свойства перекисей.



Это сцепление атомов кислорода, которое мы искусственно производим обходным путем, предсуществует уже в молекуле кислорода. Поэтому, когда последняя соединяется с каким-нибудь окисляемым веществом при обыкновенной температуре, первичной формой соединения *должна* явиться перекись. В громаднейшем большинстве случаев такое образование перекисей при медленном сгорании легко доказать, так что здесь теория, можно сказать, вполне совпадает с опытом. Особенно характерны те случаи, когда перекись является *единственным* продуктом окисления. Так, например, трифенилметил в бензольном растворе чрезвычайно быстро поглощает свободный кислород, образуя количественно перекись трифенилметила:

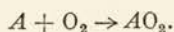


Как искусственно приготовленные, так и образующиеся при процессах медленного сгорания перекиси содержат слабосвязанный, а потому

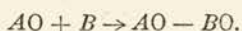
«активный» атом кислорода, который они легко отдают другим веществам. Таким образом, активирование кислорода при процессах медленного окисления обуславливается не расщеплением нейтрального кислорода на озон и антозон, как это принимал Шенбейн, не присоединением молекулярного кислорода к водороду воды, как это принимал Траубе, а *первичным, прямым образованием перекисей путем присоединения молекулярного кислорода к окисляемому веществу.*

Химическая природа окисляемого вещества не играет роли в образовании перекисей: требуется только, чтобы вещество было способно к окислению. Связанные с группой  $\text{—O—O—}$  радикалы могут быть электроотрицательными, как в надсерной кислоте, или электроположительными, как в перекиси натрия, могут быть органическими или неорганическими комплексами, — всегда перекиси могут уступить другим окисляемым веществам половину кислорода, соответствующего группе  $\text{—O—O—}$ . В общих чертах эту отдачу кислорода можно представить, по Энглеру<sup>11</sup>, следующими схемами.

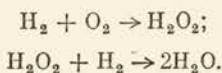
Обозначим через *A* какое-нибудь легкоокисляемое вещество, например, терпентинное масло, и через *B* одновременно с ним подвергающееся действию кислорода трудноокисляемое вещество, например индиго, которое само по себе кислородом при обыкновенной температуре не окисляется с измеримой скоростью. Первое вещество Энглер называет — очень неудачно, по моему мнению, — *автоксидатором*, второе — *акцептором*. В соприкосновении со свободным кислородом *A* присоединяет к себе молекулу его, образуя перекись:



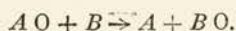
Затем образовавшаяся перекись реагирует с акцептором, причем половина кислорода, поглощенного *A*, переходит к *B*;



Так, например, при медленном сгорании водорода *in statu nascendi* образуется сначала перекись водорода, которая затем реагирует с избытком водорода, образуя воду:

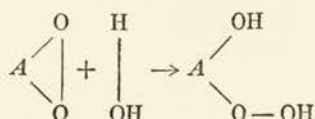


В некоторых случаях окись, остающаяся после отдачи перекисью ее активного кислорода, может отдать акцептору и второй атом кислорода с восстановлением первоначального легкоокисляемого вещества:

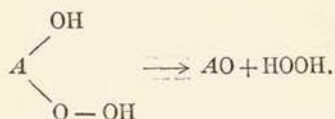


Сюда принадлежит, например, так называемое перенесение кислорода посредством мелкоиздробленной платины. По Энглеру и Велеру<sup>12</sup>, платиновая чернь поглощает молекулярный кислород, образуя перекись платины  $PtO_2$ . В присутствии акцептора перекись эта сначала разлагается на  $PtO + O$ , а  $PtO$  распадается на  $Pt$  и  $O$ .

Большинство перекисей гидролизуются водой, т. е. превращаются в соответственные окиси и перекись водорода. Превращение это происходит в двух фазах. Сначала перекись присоединяет к себе воду, образуя гидрат:



Последний распадается затем на соответствующую окись и перекись водорода:



Реакция эта обратима, так как из окисей и перекиси водорода в определенных условиях образуются соответствующие перекиси.

Приведенных выше данных достаточно, чтобы дать понятие о механизме медленного сгорания и активирования кислорода, поскольку вопрос касается окисления *in vitro* свободным кислородом при обыкновенной температуре.

### 8. Резюме теорий активирования кислорода

Суммируя все сказанное до сих пор относительно процессов медленного сгорания и активирования кислорода, мы приходим к заключению, что основоположником общепринятых теперь взглядов на этот вопрос несомненно является Шенбейн. Он первый указал на появление активного кислорода в процессах медленного окисления, он же количественными опытами показал, что при этом половина вступившего в реакцию кислорода образует с окисляемым веществом устойчивое соединение, тогда как другая половина приобретает свойства активного кислорода. Конечно, при тогдашнем состоянии знаний Шенбейн не мог дать верное объяснение этих явлений. Упорно держась за свое предположение, что возможны две полярно противоположные, но вещественно различные, способные к отдельному существованию формы активного кислорода, Шенбейн остался в стороне от истины. Но смутное, интуитивное представление об истинном смысле изучаемых явлений было у него уже и тогда. Обнаружилось оно в его указании на то, что в процессах медленного сгорания активный кислород появляется не только в виде перекиси водорода, но также и в виде «активного кислорода, связанного с органическими веществами».

Это его указание несомненно включает *in nuce* современную, теперь общепризнанную теорию Энглера—Баха.

Теория Шенбейна дала сильный толчок исследованию процессов медленного окисления и вызвала оживленную деятельность в этом направлении. Любопытно и поучительно тут то, что мысль исследователей перепробовала все *возможные* решения вопроса, раньше чем пошла по истинному пути. В общих чертах все теории окислений можно разделить на две группы. К первой группе принадлежат все те теории, которые допускают первоначальное расщепление нейтрального кислорода на равные активные части. Тут логически возможны три случая, и каждому из них соответствует отдельная теория:

1. Активные части полярно противоположны, но вещественно различны и способны к отдельному существованию (теория озона-антозона Шенбейна, Клаузиуса и др.).

2. Активные части электрически противоположны, но неспособны к независимому друг от друга существованию (теория ионизации кислорода Вант-Гоффа и его последователей).

3. Активные части ничем не отличаются друг от друга, и одна из них, все равно какая, может существовать отдельно в виде свободного атома (теория Гоппе-Зейлера и его последователей).

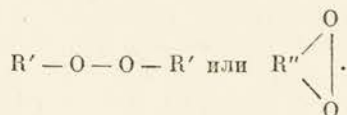
Все эти теории оказались не соответствующими фактам, и дальнейшая разработка их оставлена.

Ко второй группе принадлежат теории, основанные на предположении, что при медленном сгорании окисляемых веществ кислород не расщепляется на две активные части, а вступает в реакцию как отчасти вскрытая молекула, т. е. как группа  $—O—O—$ . Впервые это предположение было сформулировано М. Траубе, который вполне правильно сводил активирование кислорода к образованию определенного химического соединения — перекиси водорода. К сожалению, Траубе переоценил значение воды в окислительных процессах и сделал ее основным фактором всякого окисления. Согласно Траубе в процессах медленного сгорания окисляемые вещества соединяются не со свободным кислородом, а с кислородом воды, тогда как водород последней присоединяет к себе молекулу кислорода, образуя перекись водорода. Для определенных случаев эта схема верна, но обобщать ее никоим образом нельзя. В частности, в применении к медленному сгоранию водорода *in situ nascendi* она приводит к очевидному абсурду, что в конце концов должен был признать и сам Траубе.

Выход к верному решению вопроса нашли одновременно и независимо друг от друга К. Энглер и А. Бах, дав теорию, которая суммирует все случаи окисления свободным кислородом при обыкновенной температуре. Теорию эту можно формулировать так:

1. В процессах медленного сгорания молекула кислорода  $O = O$  частично диссоциирует под влиянием свободной энергии окисляющегося вещества и вступает в реакцию в виде группы  $—O—O—$ .

2. Все способные к окислению вещества, независимо от их химической природы, присоединяют к себе такие группы  $—O—O—$ , образуя первоначально перекиси



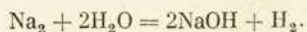
3. Образующиеся таким образом перекиси содержат половину присоединенного кислорода в слабосвязанном «активном» состоянии и потому легко уступают его другим веществам, т. е. действуют как более или менее сильные окислители.

Каким образом теория Энглера—Баха применяется к окислительным процессам, происходящим в живых организмах, будет показано ниже.

### 9. Гидролитические окисления

Как упомянуто выше, медленное сгорание может происходить не только за счет *свободного* кислорода, но также и за счет *связанного*, т. е. находящегося уже в соединении с другими элементами. Из процессов последнего рода биологического значения имеют лишь окисления за счет кислорода воды, или *гидролитические* окисления. К сожалению, теория этих окислений еще очень мало разработана; еще менее известна их роль в процессах дыхания.

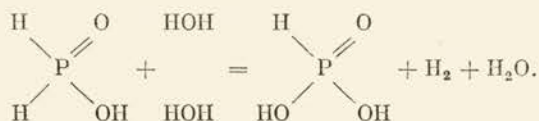
Простейшим случаем гидролитического окисления является разложение воды щелочными металлами, т. е. окисление их за счет гидроксидов воды с выделением соответствующего количества водорода:



Соображения термодинамического порядка показывают нам, что разлагать воду с выделением *свободного* водорода могут только вещества, обладающие сравнительно большим запасом свободной энергии, выражающейся в сильном родстве к гидроксилу воды. Такие случаи сравнительно

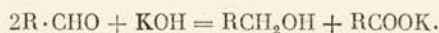
немногочисленны в химии и чрезвычайно редки в биохимии: только некоторые микробы способны окислять гидролитически низшие жирные кислоты с выделением свободного водорода.

Гораздо более часты случаи разложения воды совместным действием двух веществ, из которых одно имеет сродство к гидроксилу воды, другое же к ее водороду. Наиболее ярким и показательным примером такого рода реакций является разложение воды солями фосфорноватистой кислоты в присутствии металлического палладия. Разложение это, впервые указанное Энгелем<sup>13</sup>, было недавно подробно исследовано Бахом<sup>14</sup>. Фосфорноватистокислые соли сами по себе не разлагают воды с измеримой скоростью, так же точно как не разлагает ее металлический палладий. Но если в водный раствор какой-нибудь из этих солей внести ничтожное количество палладия в виде губки или черни, то немедленно фосфорноватистая кислота окисляется в фосфористую, и вместе с тем выделяется свободный водород:



О механизме этой реакции речь будет ниже.

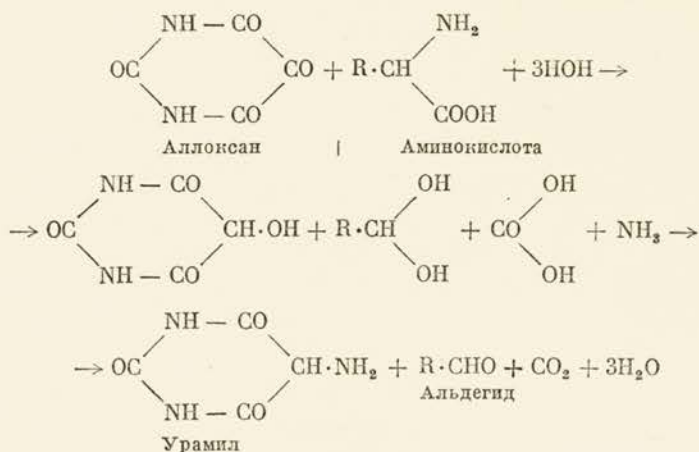
Следует заметить, что смысл гидролитических реакций, при которых происходит одновременно окисление и восстановление, чрезвычайно затемнен представлениями, сложившимися на почве простой видимости, т. е. недостаточного анализа явления. В качестве типичного примера я приведу ходячее объяснение одновременного восстановления и окисления альдегидов в присутствии щелочей. Известно, что при действии щелочей альдегиды превращаются в соответствующие спирты и кислоты:



Совершенно игнорируя гидролитическое действие едкой щелочи, реакцию эту объясняют так: будто бы одна молекула альдегида отдает свой водород другой, восстанавливая ее в спирт, сама же окисляется едкой щелочью. В соответствии с этим взаимодействие между альдегидами и способными к восстановлению веществами объясняют простым обменом водорода альдегидов на кислород восстанавливаемых веществ. Еще очень недавно Бредиг и Зоммер<sup>15</sup> объясняли восстановление метиленовой сини муравьиным альдегидом в присутствии платины тем, что «водород альдегида восстанавливает краску в лейкоформу, тогда как кислород краски окисляет муравьиный альдегид в муравьиную кислоту». Если бы Бредиг и Зоммер задались целью доказать абсурдность ходячего объяснения, они не могли бы придумать лучший пример. Дело в том, что метиленовая соль *не содержит кислорода* и не может отдавать его муравьиному альдегиду. Восстановление и обесцвечивание этой краски восстановителями основывается не на отнятии у нее кислорода, а на прибавлении водорода по месту двойной связи. Из этого следует, что окисление альдегида происходит за счет гидроксила воды, а восстановление краски за счет водорода воды по схеме, указанной для гидролитического окисления фосфорноватистой кислоты.

Из реакций гидролитического окисления большое значение для выяснения процессов дыхания имеет окисление аллоксаном аминокислот — гликоколя, аланина, лейцина, и т. д. Реакция эта была открыта Штрекером<sup>16</sup> в 1862 г., но осталась совершенно незамеченной биохимиками. Ни аллоксан сам по себе, ни аминокислоты сами по себе воды не разлагают,

но вместе они разлагают ее уже при обыкновенной температуре, причем аллоксан восстанавливается водородом воды в урамил, а аминокислоты окисляются в альдегиды с выделением аммиака и углекислоты:



В. Траубе<sup>17</sup> недавно показал, что другие кетоны, например бензохинон, тоже окисляют аминокислоты в указанном направлении.

Замечательным в этого рода реакциях гидролитического окисления является то, что большим или меньшим сродством какого-нибудь вещества к кислороду вовсе, повидимому, не предопределяется легкость, с которой оно способно окисляться за счет воды. Так, например, фосфор, который так жадно поглощает свободный кислород, совершенно индифферентен к гидроксилу воды. Напротив, фосфорноватистая кислота, которая почти индифферентна к свободному кислороду, легко окисляется (в присутствии палладия) за счет гидроксильных групп воды. То же можно сказать и об аминокислотах. Как увидим впоследствии, этим двум формам медленного сгорания соответствуют две формы дыхания живых организмов: аэробная и анаэробная.

## II. ЯВЛЕНИЯ КАТАЛИЗА ПРИ ПРОЦЕССАХ МЕДЛЕННОГО СГОРАНИЯ

### 1. Общие замечания

Катализ, по определению Оствальда<sup>18</sup>, есть изменение скорости совершающейся реакции под влиянием посторонних веществ, которые в состав окончательных продуктов реакции не входят. При нагревании с водой тростниковый сахар до незаметности медленно превращается в смесь декстрозы и левулезы. Но если прибавить к раствору небольшое количество серной кислоты, то превращение это происходит в самое короткое время, без какого бы то ни было изменения в составе окончательных продуктов реакции (образование равных частей декстрозы и левулезы). В данном случае серная кислота является катализатором.

Бредиг<sup>19</sup> сузил исчерпывающее определение Оствальда, поставив непременным условием катализа отсутствие стехиометрически эквивалентного отношения между количеством катализатора и количеством продуктов, образование которых он ускорил. Для многих случаев катализа это суженное толкование Бредига оказывается подходящим: например, небольшое количество серной кислоты может инвертировать бесконечно большое количество тростникового сахара, но исключает из области ката-



лиза целый ряд явлений, которые к ней несомненно, как увидим дальше, принадлежат.

Явления катализа могут иметь место только на почве реакций, которые происходят уже сами по себе. Поэтому Бредиг сравнивает действие катализатора с действием смазочного масла на находящиеся в движении части машин: и в том и в другом случае уничтожается или уменьшается внутреннее сопротивление. А из этого делается дальнейшее заключение, что катализатор, как и смазочное масло, *никакой работы не производит*. Этим явления катализа перебрасываются — совершенно неосновательно, по моему мнению, — из области химии в область физики. Действительно, в громадном большинстве случаев катализа трудно видеть работу катализатора. Чем доказать, что при инверсии тростникового сахара серная кислота приносит в реакцию некоторый запас энергии в той или иной форме? Но есть случаи несомненного катализа, при которых привнесение катализатором энергии в реакцию вполне очевидно. Платина в виде губки или черни каталитически ускоряет большое число процессов медленного сгорания при посредстве свободного кислорода. Мы знаем теперь, что при этом платина соединяется с молекулярным кислородом, образуя перекись, активный кислород которой идет на окисление окисляемых веществ. Но этому соединению платины с кислородом *должно* предшествовать частичное расщепление молекулы последнего в группу  $-O-O-$ , и необходимая на это энергия дается платиной.

Во всяком случае запас энергии, которую катализатор приносит в реакцию, чрезвычайно мал. Этот запас энергии может вызвать ускорение совершающейся реакции, постоянно возобновляясь в течение последней; но он не в состоянии вызвать реакции между веществами, находящимися в равновесии.

Первоначальная скорость, с которой проходит реакция, несколько не предопределяет возможности или невозможности каталитического процесса. «Законы энергетике», — говорит Оствальд, — не предписывают никакой определенной величины скорости, которая должна при этом иметь место. Они требуют только, чтобы эта величина не была равна нулю», т. е. чтобы система находилась в состоянии изменения, а не в состоянии покоя.

Процессы медленного сгорания принадлежат к реакциям, которые совершаются сами по себе и поэтому в большой степени доступны каталитическим воздействиям. В дальнейшем мы разберем те каталитические явления, которые могут уяснить нам связь между процессами медленного сгорания и ферментами, ускоряющими как процессы окисления, так и процессы восстановления в живых организмах.

## 2. Отдача активного кислорода перекисями как каталитический процесс

Рассмотрим несколько ближе случай медленного сгорания какого-либо трудноокисляемого вещества при посредстве свободного кислорода и в присутствии другого легкоокисляемого вещества, например, окисление индиговой краски на воздухе в присутствии терпентинного масла.

Индиговая краска не является абсолютно индифферентной к свободному кислороду, так как при продолжительном соприкосновении с последним она заметно «выцветает». Можно поэтому сказать, что индиго соединяется с кислородом при обыкновенной температуре, хотя и с бесконечно малой скоростью. Этот процесс окисления происходит так, что красящее вещество присоединяет к себе отчасти вскрытую молекулу кислорода и

образует перекись, активный кислород которой идет на дальнейшее окисление краски.

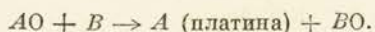
Точно так же как и индиго, но с бесконечно большей скоростью терпентинное масло присоединяет к себе кислород, образуя перекись. Что при этом действительно образуется органическая перекись, отличная от озона и перекиси водорода, было доказано Энглером и его сотрудниками. Эта перекись отдает половину присоединенного терпентинным маслом кислорода, т. е. *активный* кислород, индиговой краске, окисление которой вследствие этого чрезвычайно ускоряется. В состав продукта окисления индиго — изатина — ни терпентинное масло, ни какой-либо из его компонентов не входит. Мы имеем здесь поэтому дело со случаем, который вполне соответствует остальдовскому определению катализа: *ускорение совершающейся реакции под влиянием постороннего вещества, которое в состав окончательных продуктов реакций не входит*. Терпентинное масло является здесь *катализатором*, отдача активного кислорода индиговой краске — *каталитическим* процессом. Очевидно, что под бредиговское определение катализа этот случай не подходит, так как терпентинное масло исчезает как таковое из круга реакции (превращаясь в продукты окисления) и может ускорить окисление только эквивалентного количества индиговой краски. Но мы сейчас увидим совершенно аналогичный случай, в котором катализатор постоянно возрождается, что уничтожает всякую возможность установить принципиальное различие между катализаторами, действующими в бесконечно малых количествах, и катализаторами, производящими эквивалентные превращения.

### 3. Каталитическое перенесение всего кислорода, присоединенного легкоокисляемым веществом, на другие трудноокисляемые вещества

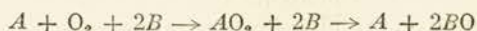
Активность половины кислорода в перекисях основана на том, что они содержат один атом его в слабосвязанном состоянии и потому легко отдают его другим веществам. Но есть легкоокисляемые вещества, которые содержат *весь* присоединенный кислород в слабосвязанном, активном состоянии и потому легко отдают его другим веществам, сами постоянно возрождаясь. Наиболее характерный пример представляет в этом отношении мелкоизмельченная платина. По Энглеру и Велеру, которые подробно исследовали этот случай, платиновая чернь поглощает на воздухе на каждый атом металла молекулу кислорода, образуя перекись платины  $PtO_2$ , которая действует, как энергичный окислитель. В присутствии окисляемого вещества (акцептора) перекись эта сначала отдает один атом активного кислорода, образуя окись  $PtO$ , или по энглеровской схеме:



Но при избытке способного к окислению вещества образовавшаяся окись платины отдает ему второй атом кислорода, возвращаясь к своему первоначальному состоянию металлической платины.



Совокупность этих реакций перенесения кислорода, а именно:



представляет собою каталитический процесс, в котором катализатор, металлическая платина, постоянно возрождается. В новейшее время этот

процесс был с блестящим успехом применен в основной химической промышленности при производстве серной кислоты (окисление сернистого ангидрида в серный при посредстве воздуха).

Раз катализатор постоянно возрождается, то понятным становится, почему малое количество его может ускорять превращение бесконечно большого количества субстрата. Чем больше скорость, с которой платиновая чернь присоединяет к себе свободный кислород и передает его в активном состоянии окисляемым веществам, тем больше несоответствие между количеством катализатора и величиною произведенного превращения.

Несоответствие между количеством катализатора и количеством превращенного субстрата обуславливается не тем, что катализатор действует вне законов химии, а тем, что он, постоянно возрождаясь, обладает как бы неограниченной массой. По окончании реакции вес кислорода, перенесенного платиной на индиго, эквивалентен не просто весу платины, а весу ее, помноженному на число циклов превращений.

Для процессов медленного сгорания такое толкование катализа, основанное на образовании *промежуточных* очень деятельных продуктов, является неоспоримым. В силу этого ограничение, внесенное Бредигом в остальдовское определение катализа, совершенно отпадает для этого рода процессов. Судя по внешности, между влиянием терпентинного масла на окисление индиго и влиянием платиновой черни на то же окисление нет никакой аналогии: терпентинное масло производит превращение, пропорциональное своей массе; о какой бы то ни было эквивалентности между количеством платины и количеством окисленного индиго не может быть и речи. Но более внимательное исследование вопроса показывает нам, что в обоих случаях активирование кислорода основано на одной и той же химической реакции: *присоединении молекулярного кислорода с образованием перекисей*. Вопрос о том, отдают ли образовавшиеся перекиси только *половину* своего кислорода, превращаясь в устойчивые окиси, или же отдают весь присоединенный кислород, возрождаясь в первоначальные вещества, решается только в зависимости от относительного средства катализатора и субстрата к кислороду. Образовавшиеся в процессе медленного сгорания продукты окисления терпентинного масла можно восстановить в первоначальные углеводороды только длинным обходным путем. Напротив того, одноокись платины легко отдает свой кислород окисляемым веществам, восстанавливаясь в металлическую платину. Сущность каталитического процесса лежит, таким образом, не в возрождении катализатора, а в *ускорении реакции, которая происходит сама по себе*. Некоторыми авторами, как Лютер и Шилов<sup>20</sup> и Энглер и Герцог<sup>21</sup>, указанные выше окислительные процессы рассматриваются как так называемые коцулированные, или индуцированные, реакции. Применяя предложенную Лютером и Шиловым номенклатуру подобного рода реакций, которые вообще часто встречаются, мы должны назвать кислород *актором*, терпентинное масло или платину *индуктором*, а индиговую краску *акцептором*. Процесс формулируется так:



Очевидно, что и эта точка зрения не дает возможности установить принципиальной разницы между реакциями, в которых индуктор разрушается, и теми, в которых он постоянно восстанавливается. Если считать реакцию, индуцированную платиновой чернью, *каталитической*, то таковой же нужно считать и реакцию, индуцированную терпентинным маслом.

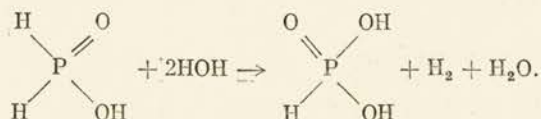
#### 4. Ускоряющее действие некоторых солей на отдачу активного кислорода перекисями

Мы только что видели, что медленное сгорание трудноокисляемых веществ (индиго) в свободном кислороде чрезвычайно ускоряется вследствие одновременного окисления легкоокисляемых веществ (терпентинное масло). Это ускорение обуславливается увеличением количества активного кислорода, который через посредство перекиси легкоокисляемого вещества доставляется трудноокисляемому веществу.

Но эта отдача активного кислорода перекисью происходит не мгновенно, а, наоборот, протекает, смотря по химической природе образующейся перекиси и трудноокисляемого вещества, более или менее медленно. Этот сам по себе более или менее медленно протекающий процесс может, в свою очередь, быть ускорен действием солей некоторых тяжелых металлов. Основные факты и здесь были уже установлены Шенбейном. Он показал, что минимальные количества солей закиси железа очень сильно ускоряют окислительное действие перекиси водорода на индиго, иодистый калий и другие вещества. Окисление этих веществ свободным кислородом в присутствии легкоокисляемых веществ (терпентинное масло, бензойный альдегид и пр.) также ускоряется действием солей закиси железа. Соли некоторых других металлов (марганец, медь) оказывают такое же ускоряющее действие на окисление как свободным кислородом, так и перекисью водорода. В качестве примера можно упомянуть здесь ускоряющее действие солей марганца на окисление жирных масел, гидрохинона и других веществ, которые уже сами по себе поглощают кислород при обыкновенной температуре с небольшой, но измеримой скоростью. Так как при медленном сгорании этих веществ несомненно образуются перекиси, то ускорение окислительного процесса этими солями надо приписать той же причине, которая вызывает ускорение окислительного действия перекиси водорода солями закиси железа. С многочисленными фактами, установленными в этой области, лучше всего согласуется предположение, что соли металлов образуют с перекисями промежуточные, неустойчивые соединения, которые отдают свой активный кислород окисляемым веществам гораздо легче, чем сами перекиси. Для перекиси водорода целый ряд таких неустойчивых соединений с металлическими и металлоидными производным и был приготовлен и изучен Меликовым и Писаржевским.

#### 5. Катализ при гидролитических окислениях

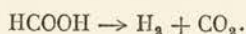
Как уже замечено выше, гидролитические окисления исследованы очень мало, но не подлежит никакому сомнению, что во многих *случаях* и *эти процессы* протекают каталитически. Наиболее простой и ясный пример такого рода катализа представляет собою уже известное нам разложение воды фосфорноватистокислыми солями в присутствии палладия:



Здесь до очевидности ясно, что окисление фосфорноватистой кислоты в фосфористую происходит за счет гидроксила воды. Если бы молекула фосфорноватистой кислоты окислялась за счет другой молекулы ее, то продуктом восстановления последней должен был бы явиться фосфористый водород. Но, как показали строго количественные определения Баха и

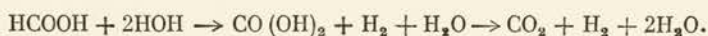
Сиверта<sup>22</sup>, в реакции выделяется не фосфористый водород, а просто водород, и *весь* фосфор фосфорноватистой кислоты оказывается в виде кислот фосфористой (95%) и фосфорной (5%).

Разложение муравьиной кислоты металлическим родием с выделением водорода и угольного ангидрида является аналогичным примером катализа при гидролитическом окислении. Но здесь смысл реакции менее ясен. Большинство химиков принимает, что родий отнимает от муравьиной кислоты водород, вследствие чего освобождается угольный ангидрид:



Будучи неустойчивым соединением, водородистый родий распадается затем на металл и свободный водород.

Гораздо более вероятным представляется предположение, что родий и муравьиная кислота действуют одновременно на воду, причем первый присоединяет к себе водород, а вторая — гидроксилы:

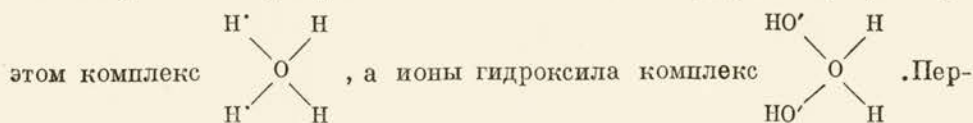


К этой же категории реакций принадлежит разложение воды альдегидами в присутствии коллоидальных металлов платиновой группы. Характерным для этой реакции является то, что она происходит лишь в присутствии акцепторов водорода, т. е. веществ, способных к восстановлению (метиленовая синь, индиговая синь и пр.). Для муравьиного альдегида, метиленовой сини и коллоидальных металлов платиновой группы реакция была подробно изучена Бредигом и Зоммером. Коллоидальная платина производит катализ, т. е. ускорение окисления альдегида в кислоту и восстановления метиленовой сини в лейкоформу, уже при обыкновенной температуре, коллоидальный палладий — при 90°. Все эти реакции, как будет показано дальше, имеют большое значение с точки зрения уяснения основанных на разложении воды окислительно-восстановительных процессов, совершающихся в живых организмах.

Что касается механизма гидролитического окисления и восстановления, то Бахом<sup>23</sup> была высказана недавно следующая теория.

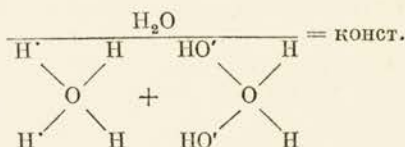
Исходя из теории электролитической диссоциации, Бах принимает, что чистая вода уже при обыкновенных условиях содержит минимальное число молекул, диссоциированных на ионы Н' и ОН'. На основании работ Брюля, Бейера, Кермана и многих других можно считать доказанным, что кислород в большом числе своих соединений, в том числе и в воде, обладает двумя дополнительными атомностями и является элементом четырехатомным. Поэтому и вода Н<sub>2</sub>>О< в значительной части своей массы является *ненасыщенным соединением* и в этом ненасыщенном состоянии воды Бах видит коренную причину электролитической диссоциации.

Принимая во внимание такое сосуществование ионов Н' и ОН' и ненасыщенных молекул воды Н<sub>2</sub>>О<, можно считать вполне допустимой мысль, что эти ионы соединяются с ненасыщенными молекулами, образуя чрезвычайно неустойчивые, подвижные комплексы. Ионы водорода образуют при



вый есть не что иное, как гипотетическая *недокись водорода* (пергидрид кислорода, *оксипергидрид*), металлические аналоги которой Me<sub>4</sub>O

известны давно; второй — гидрат перекиси водорода.\* Эти неустойчивые соединения находятся в состоянии подвижного равновесия с массой воды, т. е. постоянно образуются и распадаются, так что общее количество их (бесконечно малое) для данных условий является постоянным:

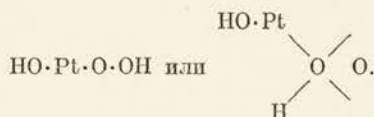


Следует заметить, что многие физико-химики (Нойес и Заммет, Джонс, Армстронг, Гольдшмидт, Бредиг и Брауне и др.) были приведены к необходимости допустить для объяснения наблюдаемых явлений образование комплексных соединений ионов с растворителями (водою и спиртом). Поэтому сделанное Бахом предположение уже и теперь имеет под собою довольно определенную фактическую основу.

Рассмотрим теперь в свете этого предположения какой-нибудь процесс гидролитического окисления и восстановления, например, изученную Бредигом и Зоммером реакцию между муравьиным альдегидом, водою и метиленовой синью в присутствии коллоидальной платины.

Ни сами по себе в отдельности, ни взятые вместе альдегиды и красящее вещество не могут со сколько-нибудь заметной скоростью разлагать воду, чтобы окислиться или восстановиться за счет ее элементов. Но реакция происходит немедленно, если к смеси этих веществ в водном растворе прибавить минимальное количество коллоидальной платины. На чем же основано ускоряющее действие платины на окислительно-восстановительный процесс?

Как было упомянуто выше, Энглер и Велер показали, что ускоряющее действие платины на процессы медленного сгорания основано на том, что платина соединяется с молекулярным кислородом, образуя перекись платины  $\text{PtO}_2$ , которая в присутствии воды дает чрезвычайно активный гидрат:



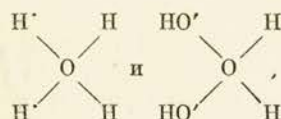
При действии мелкоизмельченной платины на перекись водорода образуется то же соединение, которое в присутствии какого-либо субстрата энергично окисляет его, в отсутствие же субстрата распадается на платину, кислород и воду (катализ перекиси водорода платиной). Вызванное прибавлением коллоидальной платины ускорение окисления муравьиного альдегида за счет воды объясняется проще всего, если допустить, что

платина образует с комплексом  $\begin{array}{c} \text{HO} \quad \text{H} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{O} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{HO} \quad \text{H} \end{array}$  гидрат перекиси платины,

которым каталитически окисляется альдегид. Само собою разумеется, что образованием гидрата перекиси платины за счет этого комплекса на-

\* В предыдущем изложении теорий медленного сгорания была принята за основу двуатомность кислорода и состав частицы  $\text{O}=\text{O}$ . Сделано это было для того, чтобы не усложнять сразу вопроса еще не вошедшими в обиход представлениями. Нетрудно видеть, что сущность вопроса не изменится от того, что частицу кислорода мы будем изображать символом  $\text{O} \equiv \text{O}$  вместо  $\text{O}=\text{O}$  и перекись водорода символом  $\text{HO} \equiv \text{OH}$  (Б р ю л ь) или  $\text{H}_2 = \text{O}=\text{O}$  (К и н г у е т) вместо  $\text{HO} - \text{OH}$ .

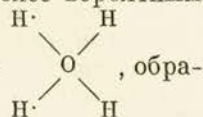
рушается равновесие между водою и комплексами



вследствие чего образуются новые комплексы, и окисление продолжается.

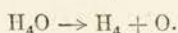
Что касается ускорения восстановительного процесса, то при способности платины и ей подобных металлов соединяться при обыкновенной температуре как с кислородом, так и с водородом, наиболее вероятным

кажется предположение, что она соединяется с комплексом



зую обладающее сильно редуцирующими свойствами производное недокиси водорода. Для палладия такое производное уже известно. Ибо приготовленный Паалем и Герумом<sup>24</sup> жидкий гидрозоль водородистого палладия есть не что иное, как палладоводородная недокись, или пергидрид палладоокиси  $\text{PdH} \cdot \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Pd} - \text{O} \equiv \text{H}_3$ . Это соединение, по всей вероятности, образуется как промежуточный продукт при разложении воды фосфорноватистой кислотой в присутствии палладия. В присутствии вещества, способного к восстановлению, например метиленовой сини, происходит при этом энергичный восстановительный процесс, в отсутствие же такого вещества водород палладоокиси пергидрида выделяется в свободном состоянии. Мы имеем здесь полную аналогию с действием платины на перекись водорода.

В самое последнее время за теорию Баха высказался в чрезвычайно интересной работе об одновременном катализе окисления и восстановления Н. Зелинский<sup>25</sup>. Восстанавливая тетрагидротерефталевый эфир водородом в присутствии палладиевой черни, Зелинский констатировал, с одной стороны, образование гексагидротерефталевого эфира (восстановительный процесс), с другой — образование терефталевого эфира (окислительный процесс). Принимая во внимание, что палладиевая чернь всегда содержит кислород и что содержание кислорода в металлических катализаторах вообще сильно благоприятствует восстановительным процессам, Зелинский склонен думать, что при действии водорода на палладий, содержащий кислород, образуется, как промежуточный продукт, недокись водорода  $\text{H}_4\text{O}$ , которая действует *восстанавливающим* и *окисляющим* образом на тетрагидротерефталевый альдегид. Что недокись водорода может действовать, как восстановитель, легко объясняется присутствием в нем двух слабосвязанных «активных» атомов водорода. Но для объяснения его окислительных свойств Зелинский допускает, что вступлением двух атомов водорода в частицу воды связи внутри частицы образовавшегося соединения настолько расшатываются, что оно распадается на кислород и водород:



Этот освобождающийся кислород и действует окислительно.

Изложенную выше теорию Баха следует рассматривать лишь как попытку ориентироваться в сложных и запутанных явлениях, которыми сопровождаются гидролитические окислительно-восстановительные процессы и их катализ.

## 6. Окислительные и восстановительные катализаторы в живых организмах

Итак, с медленным сгоранием как при посредстве свободного, так и при посредстве связанного кислорода связываются каталитические процессы тройного рода, вызываемые тройного рода катализаторами. Совершающееся

само по себе медленное сгорание трудноокисляемых веществ в свободном кислороде сильно ускоряется одновременным сгоранием легкоокисляемых веществ. Это ускорение несомненно обусловливается увеличением в круге реакций количества активного кислорода вследствие образования перекиси легкоокисляемым веществом. Легкоокисляемое вещество функционирует в этом процессе как катализатор независимо от того, исчезает ли оно в процессе как таковое или постоянно возрождается.

Отдача активного кислорода образовавшимися перекисями трудноокисляемым веществам ускоряется, в свою очередь, другого рода катализаторами, главным образом солями тяжелых металлов. Наконец, в гидролитических окислительно-восстановительных процессах мы встречаемся с третьего рода катализаторами — металлами платиновой группы. Если относительно других металлов этой группы можно сказать, что их каталитическое действие не безусловно ясно, то относительно палладия сомнения нет: он ускоряет восстановительные процессы.

Окислительные процессы, которые происходят в живых организмах, принадлежат к процессам медленного сгорания и как таковые должны быть доступны влиянию каталитических агентов. С точки зрения уяснения дыхательных процессов, в высшей степени знаменателен поэтому тот факт, что в животном и растительном организме также найдены в виде ферментов три рода катализаторов, действие которых вполне аналогично действию рассмотренных выше катализаторов медленного сгорания. Одни из этих ферментов ускоряют окисление трудноокисляемых веществ, подобно тому как терпентинное масло ускоряет окисление индиговой краски: это — *оксидазы*. Другие ускоряют окислительное действие перекисей, подобно тому как серноокислая закись железа ускоряет действие перекиси водорода: это — *пероксидазы*. Наконец, к третьей категории принадлежит фермент, который, подобно палладию, ускоряет восстановительные процессы, сопровождающие гидролитическое окисление альдегидов. Этому ферменту Бах дал название *пергидридазы*.

К группе окислительных ферментов примыкает чрезвычайно распространенный в растительном и животном организме фермент, который, подобно двуокиси марганца, двуокиси свинца и т. д., разлагает перекись водорода с *выделением молекулярного, инертного кислорода*. Фермент этот известен под названием *каталазы*. В то время как пероксидаза ускоряет действие перекиси водорода, каталаза лишает последнюю ее окислительной способности. Для оценки действия пероксидазы необходимо также ознакомиться и с каталазой.

Мы перейдем теперь к краткой характеристике выше названных ферментов.

### III. ОКСИДАЗЫ

#### 1. Общие замечания

Нахождение в растительном мире агентов, вызывающих окисление таких веществ, которые сами по себе на воздухе, повидимому, не окисляются, известно уже более столетия. В 1809 г. Булэ и Геттинг заметили, что гуммиарабик окрашивает на воздухе в синий цвет настойку гваяковой смолы, которая сама по себе на воздухе не синее. В следующем году Бланш нашел, что части свежих растений тоже окрашивают эту настойку в синий цвет и что они теряют эту способность после нагревания до температуры кипения. Мы обязаны Шенбейну установлением основных фактов, которые привели к современному учению об окислительных ферментах. Посредством тех же реактивов, которые еще и теперь употребляются для



открытия и изучения окислительных ферментов, он показал, что эти окислительные агенты широко распространены в растительном и животном мире. Он распознал их *каталитический характер*, вполне определенно указал на то, что они так же вызывают активирование и передачу кислорода, как платиновая чернь и железный купорос. Он же указал на их важное *физиологическое значение*, приписывая им роль посредников в дыхательных процессах. По его мнению, если бы не было этих агентов, активирующих и переносящих кислород, животное так же задыхалось бы в океане чистого, но недействительного кислорода, как и в пустом пространстве. Шенбейн связал действие каталитических окислительных агентов с процессами медленного сгорания и дал ему, применительно к теории озона — антозона, объяснение, которое *mutatis mutandis* еще и теперь соответствует действительности.

Но потребовалось более полувеков на более или менее методическую разработку того поля, на котором Шенбейн расставил столько вех.

Укажем здесь в нескольких общих штрихах дальнейшее развитие учения об окислительных ферментах.

Название *окислительный фермент* было дано М. Траубе, который пытался связать дыхательные процессы со своей, изложенной выше, теорией активирования кислорода. Название *оксидазы* было дано окислительным ферментам Бертраном, который впервые подверг методическому исследованию фермент, открытый Йошидой в соке японского лакового дерева. Бертран нашел, что этот фермент, который он назвал *лакказой*, широко распространен в растительном мире. Основываясь на том, что лакказа содержит марганец, Бертран построил особую теорию оксидаз. По этой теории, в основе которой лежит высказанная Гоппе-Зейлером теория активирования кислорода (стр. 55), деятельным агентом лакказы является закись марганца, которая расщепляет молекулярный кислород на свободные атомы. Одновременно с этой теорией и в противоположность ей А. Бах выставил в 1897 г. другую теорию, по которой окислительное действие оксидаз приписывается *промежуточному образованию перекисей*. Выводя, таким образом, действие оксидаз из своей (и Энглера) теории активирования кислорода, Бах тогда же указал, что окисление индиго молекулярным кислородом в присутствии терпентинного масла дает нам картину действия этих ферментов. К этой теории вскоре присоединились Каствль и Левенгардт, Энглер и Велер и др. После того как А. Бах, отчасти в сотрудничестве с Р. Шода, в многочисленных экспериментальных работах подверг весь вопрос об окислительных ферментах разностороннему исследованию, указанная теория была принята подавляющим большинством энзимологов и физиологов.

Работы Г. Бертрана дали сильный толчок исследованию вопроса об окислительных ферментах и привели к открытию целого ряда оксидаз. К. Оппенгеймер («Die Fermente und ihre Wirkungen»\*) дал следующую классификацию их: 1. фенолаза; 2. тирозиназа; 3. алкогольоксидаза; 4. альдегидаза; 5. пуриноксидазы.

Этой классификации мы будем придерживаться при описании отдельных оксидаз.

## 2. Фенолаза

Фенолаза — первая из ставших известными оксидаз. Окрашивание гваяковой настойки в синий цвет гуммиарабиком, явление, замеченное более столетия тому назад, обуславливается действием этой фено-

\* «Ферменты и их действие».

лазы. Гваяковая смола содержит фенольное соединение, так называемую гваяковую кислоту, которую фенолаза при посредстве кислорода воздуха превращает в синий продукт. Установленное Реманном и Шпицером<sup>26</sup> свойство животных тканей окислять смесь  $\alpha$ -нафтола и диметилпарафенилендиамина в щелочной среде в индофенол следует приписать действию содержащейся в них фенолазы.

Фенолаза чрезвычайно широко распространена в животном и растительном мире. Ее индивидуальность как фермента была впервые установлена Г. Бертраном<sup>27</sup>, который выделил ее из растительного сока, хотя, конечно, не в химически чистом виде.

Для приготовления фенолазы в твердом состоянии употребляют те же методы, что и для выделения других ферментов. Экстракты, содержащие фенолазу, осаждают чаще всего крепким спиртом, полученный осадок очищают дальше повторным растворением в воде и осаждением спиртом. Фенолазу можно также выделить, насыщая ее водный раствор сернокислым аммонием. В большинстве случаев выделение фенолазы из экстрактов чрезвычайно затрудняется присутствием слизистых веществ, которые делают почти невозможным фильтрование. Для устранения этого неудобства А. Бах<sup>28</sup> прибавляет к экстрактам сернокислого магния (5%) половину объема спирта. Слизистые вещества при этом выпадают, увлекая с собою только незначительные количества фермента. Осадок легко отделяется фильтрованием, и прозрачный фильтрат, содержащий фенолазу, может быть непосредственно подвергнут дробному осаждению спиртом. Полученные тем или иным путем препараты фенолазы могут быть в значительной мере очищены диализом от некоторых примесей — сахаров, солей органических и неорганических кислот и т. п.

Очищенная повторным растворением в воде и осаждением крепким спиртом фенолаза представляет собою декстринообразную массу, которая содержит азот, но реакций на белковые вещества не дает. По всей вероятности, она является продуктом распада белков. Зола фенолазы содержит фосфор, калий, магний, кальций, марганец и железо. Присутствие марганца дало повод Бертрану считать этот элемент активной составной частью фенолазы. Но А. Бах показал, что дробным осаждением по выработанному им методу можно получить активную фенолазу, не содержащую ни марганца, ни железа (см. Теория действия оксидаз, стр. 38).

Как и все другие ферменты, фенолаза разрушается кипячением. Но в некоторых случаях фенолаза возрождается из кипяченого раствора. Многие исследователи объясняют это явление тем, что кипячение разрушает уже готовую активную фенолазу, но не *профермент*, из которого она образуется. При стоянии кипяченого раствора содержащийся в нем профермент дает активную фенолазу, как в обыкновенных условиях.

По Бертрану<sup>29</sup>, фенолаза из лакового дерева чрезвычайно чувствительна к минеральным кислотам. Но Бах и Збарский<sup>30</sup> показали недавно, что фенолаза из грибов может выносить значительные дозы минеральных кислот, не теряя окончательно активности. В небольших количествах минеральные кислоты не только не ослабляют действия фенолазы, но даже усиливают его. Вопрос этот имеет большое значение для теории оксидаз (см. ниже).

Относительно нахождения фенолазы в растениях Пфэффером<sup>31</sup> был высказан взгляд, что окислительные процессы, которые наблюдаются в растительных экстрактах и которые теперь приписывают оксидазам, надо отнести к *посмертным* явлениям, ибо при раздроблении растения смешиваются между собою составные части клетки, которые при жизни никогда не приходят в соприкосновение друг с другом. Сообразно с этим, реакции окисления, наблюдаемые в экстрактах, не могут быть воспроиз-

ведены *in vivo*. В опровержение этого взгляда Бах и Шода<sup>32</sup> доказали, что фенолаза существует в *живой* клетке и уже там проявляет свое окислительное действие. Еще со времени Шенбейна известно, что периферические слои клеток картофельных клубней содержат окисляющее вещество, которое выделяет свободный иод из иодистого калия. Бах и Шода воспользовались этой реакцией, чтобы доказать присутствие фенолазы в живых клетках; поместив тонкие разрезы наружных слоев картофеля сначала в детмеровский физиологический раствор (чтобы смыть остатки разрушенных клеток), а потом в раствор иодистого калия, они констатировали под микроскопом, что зерна крахмала *внутри* клеток мало-помалу окрасились в интенсивный синий цвет. Из иодистого калия, проникшего в клетки, был, таким образом, выделен в свободном состоянии иод, который и дал характерную окраску с крахмалом. Что клетки, в которых произошло окрашивание, были еще живы, вытекало из их способности к нормальному плазмолизу по прибавлении гипертонических растворов. Если сразу употребить гипертонический раствор иодистого калия, то можно под микроскопом наблюдать одновременно окрашивание зерен крахмала в синий цвет и плазмолиз. Срезы, взятые из центральных частей клубня, этой реакции не дают, но эти части не содержат фенолазы.

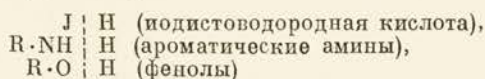
Окислительное действие фенолазы распространяется на три далеко друг от друга стоящие группы химических соединений. С помощью молекулярного кислорода фенолаза окисляет:

1. Иодистоводородную кислоту с выделением иода. Подкисленный раствор иодистого калия окрашивается фенолазой в присутствии крахмального клейстера в синий цвет.

2. Ароматические амины, с образованием красящих веществ. Простейший представитель этих соединений, анилин, в слабом уксуснокислом растворе окрашивается фенолазой в красный цвет.

3. Фенолы, с образованием окрашенных продуктов. Сюда принадлежат одноатомные фенолы, простейшим представителем которых является обыкновенный фенол,  $C_6H_5 \cdot OH$ , двухатомные фенолы  $C_6H_4(OH)_2$  (гидрохинон, пирокатехин) и трехатомный фенол  $C_6H_3(OH)_3$  (пирогаллол).

Для этих трех групп соединений:



общим является только присутствие подвижного легкоокисляемого H. Можно было бы предположить, что фенолаза представляет собою смесь трех специфических оксидаз, из которых каждая окисляет только одну группу соединений. Пока еще не удалось выделить эти гипотетические оксидазы или даже доказать их существование.

Большой теоретический интерес представляет вопрос о взаимоотношении между фенолазой и ферментом, который получил название *пероксидазы*. Как упомянуто выше, пероксидаза, которая сама по себе никакого окислительного действия не оказывает, ускоряет действие перекисей, перенося их активный кислород на окисляемые вещества.

Но замечательно здесь то, что пероксидаза в соединении с перекисью водорода или органическими перекисями производит абсолютно те же реакции окисления, что и фенолаза при помощи свободного кислорода. Между системой «фенолаза — кислород» и системой «пероксидаза — перекись» не найдено до сих пор никакой разницы ни в отношении химической природы веществ, доступных их окислительному действию, ни в отношении природы продуктов окисления. Тесная связь между обоими системами становится еще более очевидной, если принять во внимание

следующие факты. Будучи нагрета до 50 — 60°, фенолаза в значительной мере теряет свои окислительные свойства, но она приобретает их снова в присутствии перекиси водорода. В других случаях окислительное действие фенолазы может быть усилено прибавлением пероксидазы, которая без помощи перекиси никакого окислительного действия не оказывает.

Эти взаимоотношения дали Шода и Баху<sup>33</sup> основание предположить, что фенолаза состоит из двух частей, из которых одна функционирует, как легкоокисляемое вещество, присоединяющее к себе молекулярный кислород с образованием перекиси, другая же функционирует, как пероксидаза, ускоряющая окислительное действие образовавшейся перекиси. И действительно, дробным осаждением посредством спирта им удалось разложить фенолазу из грибов на две части, которые в отдельности оказывали чрезвычайно слабое окислительное действие, вместе же обнаруживали все свойства фенолазы. Шода и Бах назвали *оксигеназой* ту часть фенолазы, которая соединяется с кислородом, образуя перекись, и оставили название *пероксидазы* за другой частью, которая ускоряет действие образовавшейся перекиси. В большинстве случаев *оксигеназа*, как тело легко окисляемое, а потому неустойчивое, более или менее быстро разрушается, тогда как пероксидаза отличается сравнительно большой устойчивостью. Этим объясняется тот факт, что в животном и растительном организме находят больше пероксидазы, чем оксигеназы. В некоторых случаях оксигеназа совсем отсутствует, пероксидаза же остается, и тогда недостающую оксигеназу можно заменить перекисью водорода или органической перекисью; получается такой же результат, как с нормальной фенолазой. Однако встречаются также и довольно устойчивые оксигеназы, особенно в грибах. Из некоторых грибов (*Lactarius vellereus*, *Russula delica*) извлекается и полная фенолаза (оксигеназа + пероксидаза), которую с успехом можно подвергнуть основательной очистке.

По всем имеющимся данным растительная фенолаза тождественна с животной.

### 3. Тирозиназа

Тирозиназа была открыта в 1896 г. Буркло и Бертраном<sup>34</sup> в некоторых грибах и затем найдена ими в других растениях (картофель, георгины). В животном царстве, где она впервые была открыта Бидерманом<sup>35</sup>, она тоже широко распространена. Очень активные препараты тирозиназы можно получить из грибов (*Russula delica*), осаждая их сок крепким спиртом.

По отношению к химическим агентам и к высокой температуре тирозиназа гораздо более чувствительна, чем фенолаза. Нагревая до 55° смесь обоих ферментов в водном растворе, Бертран мог разрушить тирозиназу, а фенолаза была этим только до некоторой степени ослаблена. Однако существуют и более устойчивые при высоких температурах тирозиназы. Бертран нашел ее в отрубях.

Тирозиназа окисляет при помощи свободного кислорода тирозин

$$\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH} \cdot \text{COOH} \\ | \qquad \qquad | \\ \text{OH} \qquad \qquad \text{NH}_2 \end{array} \quad (p\text{-оксифениламинопропионовую кислоту}), \text{ который яв-}$$

ляется нормальным продуктом распада белков. Под действием тирозиназы и кислорода бесцветный раствор тирозина окрашивается сначала в красный, затем в коричневый, фиолетовый и черный цвет, причем выпадает черный осадок и жидкость опять обесцвечивается. Реакция происходит с отщеплением аммиака и углекислоты. Коричневое окрашивание хлеба, образование черной жидкости в черных мешках сепии, черный цвет так называемых меланосарком у лошадей, кожные пигменты у некоторых животных приписываются действию тирозиназы.

Помимо тирозина тирозиназа окисляет также некоторые фенолы, но она не тождественна с фенолазой, так как последняя на тирозин никакого действия не оказывает. В соответствии с этим одинаковая с фенолазой по своим свойствам система «пероксидаза — перекись водорода» оказывается тоже вполне индифферентной по отношению к тирозину. Мы имеем здесь вполне определенный случай *специфичности действия*, оказываемого окислительными ферментами. Несмотря на то, что тирозин содержит фенольную группу ( $\text{HO}\cdot\text{C}_6\text{H}_4-$ ), фенолаза, которая с такой легкостью окисляет другие фенолы, на него не действует. Присутствие связанной с фенольной группой ( $\text{HO}\cdot\text{C}_6\text{H}_4-$ ) боковой цепи —  $\text{CH}_2\cdot\text{CH}(\text{NH}_2)\cdot\text{COOH}$  защищает тирозин от окисляющего действия фенолазы, но не защищает его от окисления тирозиназой.

Для объяснения специфичности тирозиназы были выдвинуты разные гипотезы, на которых мы останавливаться не будем, так как они при экспериментальной проверке оказались не соответствующими фактам. Доказанным можно считать в настоящее время, что ни фенолаза, ни система «пероксидаза — перекись», ни какие-либо другие известные нам окислители не в состоянии превратить тирозин в черный, не растворимый ни в щелочах, ни в кислотах, ни в каких-либо других растворителях продукт, известный под названием меланина и образующийся при действии тирозиназы на тирозин. Что образование меланина является результатом окислительного процесса, не подлежит сомнению, так как в отсутствие кислорода тирозиназа не оказывает никакого действия на тирозин. Но свести этот процесс на какой-либо из известных нам окислительных процессов до сих пор не удалось.

Жессар<sup>36</sup>, а за ним Бах<sup>37</sup> констатировали, что в некоторых случаях перекись водорода ускоряет действие тирозиназы. Обработывая углекислым магнием раствор тирозиназы, Бах выделил из нее фракцию, на которой он мог количественно проследить ускоряющее действие перекиси водорода благодаря выработанному им методу количественного определения тирозиназы.

В связи с этим он предположил, что, подобно фенолазе, тирозиназа состоит из оксигеназы, образующей перекись, и пероксидазы, причем специфичность тирозиназы должна обуславливаться особенностью ее пероксидазы. Но при дальнейшем исследовании этого вопроса Бах<sup>38</sup> на основании точных количественных опытов пришел к заключению, что ускоряющее действие перекиси водорода не связано с непосредственным участием последней в окислении тирозина, а обуславливается разрушением редуцирующих примесей, задерживающих действие тирозиназы. На нормальную, в достаточной степени очищенную тирозиназу перекись водорода никакого ускоряющего действия не оказывает.

Для уяснения действия тирозиназы, так же как и окислительных ферментов вообще, большое значение имеет установленный Жессаром<sup>39</sup> факт, что превращение красного вещества, образующегося при действии тирозиназы на тирозин, в меланин, чрезвычайно ускоряется действием солей щелочноземельных и иных металлов. При окислении тирозина в красное вещество железо и марганец не играют никакой роли, так как Бах вместе с фенолазой выделил очисткой и тирозиназу, вполне свободную от этих элементов.

#### 4. Алкогольоксидаза

Закисание спиртных жидкостей при стоянии на воздухе известно с глубокой древности. Тот факт, что при этом происходит поглощение кислорода, был установлен еще Розье в конце XVIII в.

Причинная связь между образованием уксусной кислоты из спирта и присутствием уксусных бактерий была установлена Пастером. Как известно, Пастер был строгим виталистом и смотрел на брожение, как на функцию *живой* клетки. Замечательно, однако, что при объяснении уксуснокислого брожения Пастер сильно смягчил свои виталистические воззрения. Принимая во внимание тот факт, что окисление спирта в уксусную кислоту можно произвести при помощи платиновой черни и других катализаторов, он допускал возможность, что при уксусном брожении клетка *каталитически* содействует окислению спирта. Э. Бухнеру<sup>40</sup> наука обязана установлением того огромной важности факта, что уксусное брожение, как и спиртовое брожение сахара, не есть неотделимый от жизни процесс, что оно остается в силе и после умерщвления клетки. Лучшим способом для умерщвления клетки является обработка бактериальной культуры ацетоном, который не оказывает почти никакого действия на фермент, вызывающий окисление спирта в уксусную кислоту. Фермент этот Бухнер назвал алкогольоксидазой.

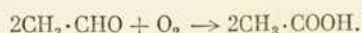
В отличие от открытой Бухнером зимазы<sup>41</sup> — фермента, содержащегося в дрожжах и вызывающего спиртовое брожение сахара, — алкогольоксидазу нельзя выделить из клеток высоким давлением. Она не переходит в сок либо потому, что она крепко удерживается элементами клетки, либо потому, что, будучи нерастворимой, она остается в выжимках.

Алкогольоксидаза не содержит марганца, но содержит железо. Она чувствительна к кислотам и окисляет 4%-ный раствор спирта лучше всего в присутствии мела. Кроме этилового спирта, она может окислять и другие спирты (амиловый).

Алкогольоксидаза была найдена в животных тканях Бателли и сотр.<sup>42</sup> Больше всего алкогольоксидазы содержит печень лошади. 100 г печени окисляют в течение часа при 40° от 0.15 до 0.20 г этилового спирта. Другие органы содержат значительно меньше этого фермента или совсем его не содержат.

Алкогольоксидаза растворима в воде. В твердом состоянии ее можно получить, обрабатывая мелкоизрубленную печень двойным объемом ацетона. Но окислительное действие этого препарата на спирт быстро уменьшается и через короткое время совсем исчезает; нагреванием до температуры кипения алкогольоксидаза разрушается.

Животная алкогольоксидаза окисляет не только этиловый, но и другие спирты. Легче всего она окисляет этиловый, труднее всего бензиловый спирты. При окислении этилового спирта образуется наряду с уксусной кислотой также и уксусный альдегид. Количество образовавшегося альдегида зависит от условий опыта. Больше всего его образуется при окислении оксидазой спирта в 0.1%-ном щелочном растворе. Повидимому, оксидаза может также окислять уксусный альдегид в уксусную кислоту. По крайней мере, Бателли заметил, что при действии алкогольоксидазы на альдегид происходит поглощение кислорода и, в связи с этим, предположил, что окисление спирта в уксусную кислоту происходит в два приема: сначала спирт окисляется в альдегид, а затем альдегид окисляется в кислоту:



Бателли и сотр. допускают, что окисления эти производятся двумя отдельными оксидазами. Как увидим ниже, животные ткани содержат фермент, вызывающий *гидролитическое* окисление альдегидов, подобно тому как палладий вызывает гидролитическое окисление фосфорновати-

стой кислоты. Существование отдельной альдегидоксидазы, окисляющей альдегиды при посредстве свободного кислорода, кажется мне мало вероятным.

### 5. Альдегидаза

Шмидеберг<sup>43</sup> показал впервые, что животные ткани обладают способностью окислять салициловый альдегид в салициловую кислоту. Жаке<sup>44</sup> показал, что окислительный агент носит характер фермента, и с тех пор многочисленные исследователи занимались изучением этого фермента, которому Якоби<sup>45</sup> дал название *альдегидазы*, а Аблус и Биарнес<sup>46</sup> — *салицилазы*. Все до самого последнего времени причисляли его к оксидазам, несмотря на то, что, как показал впервые Медведев<sup>47</sup>, свободный кислород вовсе не необходим для окислительного действия салицилазы. Аблус и Алуа<sup>48</sup> и Дони-Эно и ван Дурен<sup>49</sup> нашли даже, что свободный кислород *мешает* ее окислительному действию. Признавая эти особенности несовместимыми с общим характером оксидаз и основываясь на том факте, что альдегиды, особенно ароматические, путем гидролиза в присутствии щелочей легко превращаются в соответствующие спирты и кислоты ( $2R \cdot CHO + H_2O = RCH_2OH + RCOOH$ ), А. Бах<sup>50</sup> высказал мнение, что салицилаза принадлежит не к оксидазам, а к гидролитическим ферментам. При этом он указал на то, что если это предположение верно, то в продуктах реакции должен оказаться, рядом с салициловой кислотой, также и соответствующий ей спирт, т. е. *салигенин*. Следуя этому указанию, Бателли и сотр.<sup>51</sup> обнаружили, что в результате воздействия салицилазы на салициловый альдегид действительно образуется салигенин. Те же авторы констатировали, что ткани обладают способностью окислять и восстанавливать гидролитически другие альдегиды.

Из сказанного следует, что альдегидаза, или салицилаза, должна быть вычеркнута из списка оксидаз. По всей вероятности, она тождественна с ферментом, который ускоряет гидролитические восстановления, вызываемые альдегидами, и которому Бах дал название пергидридазы (см. ниже).

### 6. Пуриноксидазы

Пуринами называют азотистые соединения, которые образуются в организме в результате распада нуклеинов. Распад нуклеинов происходит под действием отчасти гидролитических, отчасти окислительных ферментов и может быть прослежен вплоть до такого сравнительно простого соединения, как аллантоин (диуреид глиоксиловой кислоты). Оксидазы вступают в действие лишь на последних ступенях распада. Под влиянием пепсина или трипсина от нуклеинов отщепляется нуклеиновая кислота, которая путем гидролиза распадается на четыре основания: цитозин, тимин, аденин и гуанин. Для нас интересны два последних. Под влиянием гидратирующего фермента *аденазы аденин* присоединяет к себе элементы воды и превращается в *гипоксантин*, а *гуанин* при посредстве гуаназы превращается в *ксантин*. Дальше идет окислительный распад. При действии *ксантиноксидазы* гипоксантин окисляется кислородом в ксантин, а последний в мочевую кислоту. Мочевая кислота, на которую ксантиноксидаза никакого действия не оказывает, окисляется *урикоксидазой*, с отщеплением угольного ангидрида, в *аллантоин*. Этот совершающийся под комбинированным действием гидролитических и окислительных ферментов распад нуклеинов дает нам некоторое понятие о тех процессах метаболизма, которые совершаются в живых организмах.

Пуриноксидазы найдены до сих пор только в животном организме.

## а) Ксантинооксидаза

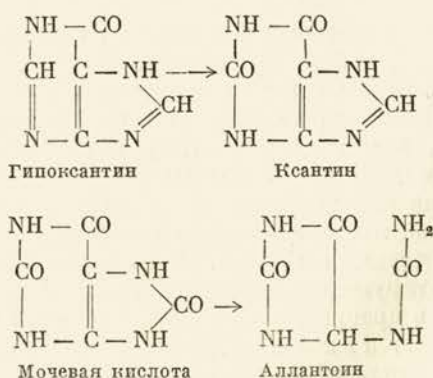
Замеченное впервые Горбачевским и затем Шпицером образование мочевой кислоты из нуклеопротеинов под действием животных тканей было в последние годы изучено Джонсом, Бурианом и Шиттенгельмом. Осаждая водный экстракт селезенки сернокислым аммонием, Шиттенгельм<sup>52</sup> получил препарат, водный раствор которого в отсутствие кислорода превращает гуанин количественно в ксантин, а в присутствии кислорода переводит его в мочевую кислоту. При тех же условиях аденин сначала превращается в гипоксантин, а последний окисляется в мочевую кислоту. Буриан<sup>53</sup>, который дал окислительному ферменту название *ксантинооксидазы*, подтвердил наблюдения Шиттенгельма и нашел, что наряду с образованием мочевой кислоты из гипоксантина и ксантина идет и разрушение ее. Дальнейшие исследования показали, что разрушение мочевой кислоты производится другой оксидазой, *урикооксидазой*, которая на гипоксантин и ксантин действия не оказывает.

Ксантинооксидаза находится во многих органах, главным образом в печени и селезенке.

## б) Урикооксидаза

Оксидаза эта найдена в разных органах, но больше всего ее в печени и почках. Она может быть выделена осаждением водных вытяжек уксуснокислым ураном в спиртовом растворе. Она довольно постоянна и сохраняется в тканях долгое время после смерти животного. Урикооксидаза окисляет мочевую кислоту в аллантаин с отщеплением угольного ангидрида.

Интересно отметить здесь *специфичность* пуринооксидаз. Ксантинооксидаза действует только на гипоксантин и ксантин, но не действует на мочевую кислоту, а урикооксидаза действует на мочевую кислоту, но не окисляет гипоксантина и ксантина. При рассмотрении структурных формул этих соединений, видно, что индивидуальности оксидаз соответствует различие атомных группировок, подлежащих окислению:



В первых двух случаях группа  $\text{N} = \text{CH}$  окисляется в группу  $\text{NH} - \text{CO}$ , во втором происходит окисление атома углерода  $= \text{C} -$  в угольный ангидрид. Само собою понятно, что сказанное является простым констатированием факта специфичности, но не объяснением его.



## 7. Малоисследованные оксидазы

Кроме перечисленных выше оксидаз, разными исследователями отмечается существование некоторых других, которые, однако, до сих пор не были подвергнуты более или менее основательному исследованию.

Казнев приписывает действию оксидазы, *эноксидазы*, болезнь вина, которая приводит к полному обесцвечиванию его с выпадением красящих веществ. Толломей предполагает, что брожение свежих маслин, при котором образуется уксусная и другие кислоты и выделяется угольный ангидрид, производит оксидаза, которую он называет *олеазой*. Дюбуа относит за счет оксидазы, которой он дал поэтическое название *люциферазы*, свечение в темноте некоторых растительных и животных организмов. Он же приписывает другой оксидазе, *пурпуразе*, образование красного пигмента в моллюске.

Герцог показал, что обработанные ацетоном по методу Бухнера культуры плесени обладают способностью окислять виннокаменную кислоту. Он предполагает здесь действие *ацидоксидазы*.

## IV. ПЕРОКСИДАЗЫ

### 1. Пероксидаза, соответствующая фенолазе

Присутствие в растениях и животных таких каталитически действующих веществ, которые ускоряют действие перекиси водорода и других перекисей, образующихся при медленном сгорании органических веществ, было установлено Шенбейном много десятилетий тому назад. Он уже тогда ясно указал на то, что кровавые шарики и соли закиси железа оказывают одинаковое влияние на химическую деятельность связанного кислорода. Под деятельным кислородом Шенбейн понимает здесь не только слабосвязанный кислород перекиси водорода, но также и «дейтельный, с органической материей связанный кислород», т. е. то, что мы теперь называем активным кислородом органических перекисей.

Ускоряющее действие растительных и животных тканей и экстрактов на перекиси было установлено Шенбейном посредством различных реакций: окислением гваяковой настойки, выделением иода из иодистого калия, окислением индиго и т. п. Эти наблюдения, как и все другие наблюдения этого выдающегося исследователя, вполне верны, но выводы, которые из них сделал Шенбейн, оказались несоответствующими действительности. Он предполагал, что ускорение окислительного действия перекиси водорода и разложение последней с выделением недейтельного, *молекулярного* кислорода происходят под влиянием одних и тех же веществ, которые он смешал с ферментами вообще. Он говорит о «правиле, в силу которого вещества, которые разлагают перекись водорода подобно платине, также окрашивают в синий цвет гваяковую настойку, содержащую перекись водорода». Этот взгляд, который продержался в науке вплоть до конца прошлого века, вызвал большую путаницу в исследованиях и дал повод к самым фантастическим умозаключениям. Только в 1901 г. Оскар Лев<sup>54</sup> установил с полной определенностью тот чрезвычайно важный факт, что свойство разлагать перекись водорода с выделением молекулярного кислорода принадлежит особому, повсюду в живых организмах распространенному ферменту, которому он дал название *каталазы*. Этим устанавливалась также химическая индивидуальность того фермента, который, подобно солям закиси железа, ускоряет действие перекиси водорода и который теперь известен под названием *пероксидазы*.

Выше уже было упомянуто, что пероксидаза, соответствующая фенолазе, находится во всех живых организмах. Часто она сопровождается оксигеназой, которая с кислородом воздуха образует перекись, и является тогда «полной» фенолазой, но она встречается и одна и в этом случае дает реакцию фенолазы только по прибавлении перекисей.

К действию физических и химических агентов пероксидаза гораздо менее чувствительна, чем оксигеназа. Поэтому их отчасти можно отделить осторожным нагреванием до 50—60°. Оксигеназа при этом во многих случаях более или менее разрушается, пероксидаза остается. Можно также частично отделить оксигеназу от пероксидазы дробным осаждением спиртом, в котором последняя гораздо более растворима, чем первая. Бах и Шода<sup>55</sup> прибегли для получения пероксидазы, свободной от оксигеназы, к совершенно иному способу. Они искали среди растений таких объектов, в которых оксигеназа отсутствует, и после некоторых поисков нашли подходящий материал в *хрене*. Мацерированием мелко-раздробленного корневища в 80%-ном спирте и осаждением экстракта абсолютным спиртом они впервые получили пероксидазу в *физиологически* чистом виде, т. е. не содержащей не только оксигеназы и каталазы, но и каких-либо других ферментов.

По отношению к реактивам, употребляемым для открытия фенолазы, пероксидаза, в достаточной степени очищенная, вполне индифферентна в *отсутствии перекисей*. Все указания на то, что пероксидаза будто бы сама по себе действует окислительно, основаны на неполном знании фактов. Реактивы на фенолазу — гваяковая настойка, пирогаллол, парафенилендиамин и т. д. — все без исключения принадлежат к легкоокисляемым веществам, которые уже сами по себе поглощают свободный кислород с образованием *перекисей*. Присутствие «активного кислорода» в находившейся в соприкосновении с воздухом гваяковой настойке было доказано еще Шенбейном. Если поэтому для открытия пероксидазы употребляют не свежеприготовленные из чистых продуктов, а уже находившиеся под действием воздуха реактивы, то пероксидаза ускоряет действие заключающейся в них перекиси, причем получается такой же окислительный эффект, как и от действия фенолазы. Факт этот, на котором в новейшее время настаивали Линссее, Бах и Шода, был уже указан Шенбейном.

В достаточной мере очищенная пероксидаза не содержит ни марганца, ни железа. Длительным процессом очищения, при котором из 130 кг рены ими было получено меньше 1 г пероксидазы, Бах и Черняк<sup>56</sup> могли вывести количество золы в пероксидазе до 1.47%. Зола содержит фосфор, кальций, магний и калий. По отношению к кислотам, щелочам и «ядам» (синеродистый калий, гидразин, гидросиламин) пероксидаза довольно мало чувствительна.

Данные относительно действия высоких температур на пероксидазу разноречивы. Очевидно, устойчивость препаратов находится в тесной связи со степенью очистки фермента от разных примесей. Установлено, что одним нагреванием до кипения пероксидаза, как и фенолаза, еще не разрушается, так как через несколько часов вскипяченный раствор опять дает характерные реакции окисления. Пероксидаза разрушается окончательно только после вторичного кипячения.

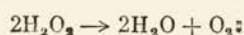
В процессе ускорения окислительного действия перекиси водорода пероксидаза мало-помалу исчезает. Отношения, в которых пероксидаза реагирует с перекисью водорода, могут быть определены количественно (см. ниже, стр. 92). Наиболее чистая пероксидаза, приготовленная Бахом и Черняком<sup>56</sup>, реагировала с 27 весовыми частями перекиси водорода.

Существование пероксидазы, соответствующей фенолазе в животном организме, отрицалось многими исследователями, главным образом на том

основании, что гемоглобин и продукты его распада могут ускорять действие перекиси водорода, так же точно как растительная пероксидаза или соли закиси железа. Но Фюрту и Чигларжу<sup>57</sup> удалось найти дифференциальный реактив на гемоглобин и пероксидазу. В то время как действие перекиси водорода на гваяковую настойку ускоряется как гемоглобином, так и пероксидазой, действие ее на иодистый калий (выделение иода) ускоряется пероксидазой, но совсем не ускоряется гемоглобином. В кинетике реакции (см. ниже, стр. 92 и сл.) замечается также большая разница между гемоглобином и пероксидазой. Теперь уже больше нет сомнения в том, что животный организм содержит не только фенлазу, но и соответствующую ей пероксидазу.

Из практических применений реакций пероксидазы можно указать так называемую «гваяковую пробу на кипяченое молоко». Свежеприготовленная гваяковая настойка не изменяет цвета под действием перекиси водорода. Но если к смеси настойки и перекиси прибавить свежего, *некипяченого* молока, то под влиянием пероксидазы, содержащейся в молоке, смесь моментально окрашивается в синий цвет. *Кипяченое* молоко этой реакции не дает, вследствие разрушения пероксидазы кипячением. Вместо перекиси водорода для гваяковой пробы употребляли старое, «озонированное» терпентинное масло. Мы теперь знаем, что старое, подвергшееся действию кислорода воздуха терпентинное масло содержит перекиси, окислительное действие которых ускоряется пероксидазой, так же точно как и окислительное действие перекиси водорода.

С физиологической точки зрения большой интерес имеет вопрос о взаимоотношении пероксидазы и каталазы, которые существуют в организме одновременно и являются едва ли не наиболее распространенными из ферментов. Пероксидаза ускоряет окислительное действие перекиси водорода, тогда как каталаза, напротив, уничтожает окислительное действие ее, переводя весь активный кислород в инертный, молекулярный:



Поэтому каталаза, разлагающая перекись водорода с величайшей энергией, должна была бы препятствовать пероксидазе утилизировать перекись водорода для реакций окисления. В действительности, это не так. Бах и Шода<sup>58</sup> показали, что реакции пероксидазы можно произвести даже в присутствии большого избытка каталазы. Если к гваяковой настойке, раствору гваякола или пирогаллола и т. п. прибавить каталазу, перекись водорода и потом пероксидазы, то окрашивания реактивов не происходит, так как в промежуток времени, протекший до прибавления пероксидазы, каталаза успела разрушить всю перекись. Но если к тем же реактивам прибавить сначала каталазы и пероксидазы, а потом уже перекиси водорода, то окрашивание получается. Отрицательный результат в первом случае и положительный во втором можно было бы объяснить тем, что при соединенном действии пероксидазы и перекиси водорода каталаза быстро разрушается.

Но это объяснение оказалось неверным, ибо опыты показали, что присутствие пероксидазы несколько не препятствует каталазе разлагать перекись водорода с выделением инертного кислорода. Вопрос об одновременном и антагонистическом действии пероксидазы и каталазы на перекись водорода разрешается следующим образом:

*При наличии субстрата, который может быть окислен системой «пероксидаза — перекись водорода», часть перекиси идет на окисление, другая часть разлагается каталазой с выделением инертного кислорода. Если такого субстрата нет, вся перекись разлагается каталазой, несмотря на присутствие пероксидазы.* Само собою разумеется, что относительные

количества обоих ферментов должны играть первенствующую роль в распределении перекиси водорода между ними. К сожалению, до сих пор еще не найден точный метод для исследования этого распределения.

## 2. Другие пероксидазы

Пероксидаза, соответствующая фенолазе, встречается сама по себе, без оксигеназы, в растениях и животных и дает при посредстве перекиси или легкоокисляемых веществ, образующих перекиси, те же реакции, что и фенолаза. Что последняя представляет собою систему «пероксидаза — оксигеназа», повидимому, неоспоримо и никем не оспаривается. Но являются ли и другие оксидазы такими же системами? Для тирозиназы, как мы видели, это до сих пор не могло быть доказано. Что касается прочих оксидаз, то вопрос этот еще очень мало обследован. Исследование сильно затрудняется тем, что в то время как фенолаза и соответствующая ей пероксидаза могли быть выделены в физиологически чистом виде и подвергнуты разностороннему изучению, пуриноксидазы и алкогольоксидазы не отделены от тканей, содержащих их, и отличаются сравнительно малой устойчивостью. Но что пероксидаза, соответствующая фенолазе, не единственная из встречающихся в живых организмах, было доказано Бателли и сотр.<sup>59</sup>, которые нашли в животных тканях пероксидазу, окисляющую при посредстве перекиси водорода муравьиную кислоту в воду и угольный ангидрид.

Пероксидаза эта находится почти во всех тканях. В смысле богатства пероксидазой органы располагаются в следующем порядке: печень, почки, селезенка, легкие, поджелудочная железа.

Из водных вытяжек тканей она может быть осаждена спиртом. Ее действие легко определяется количественно по объему угольного ангидрида, который она с помощью перекиси водорода выделяет из муравьиной кислоты. Она действует в слабнокислом растворе. Ее индивидуальность не подлежит сомнению, так как пероксидаза, соответствующая фенолазе, на муравьиную кислоту в присутствии перекиси водорода действия не оказывает.

По всей вероятности, в живом организме существует «полная» оксидаза (пероксидаза + оксигеназа), окисляющая муравьиную кислоту в угольный ангидрид и воду, так как соли муравьиной кислоты в организме окисляются довольно быстро. Но оксигеназа, вследствие ее неустойчивости, пропадает, а соответствующая пероксидаза сохраняется в тканях.

По Крофтану<sup>60</sup>, урикооксидаза состоит из двух частей, из которых каждая в отдельности на мочевую кислоту не действует, а вместе окисляют ее в аллантоин с выделением угольного ангидрида. Возможно, что и тут имеет место система «пероксидаза — оксигеназа».

## V. КАТАЛАЗА

К ферментам, которые принимают деятельное участие в окислительных процессах, совершающихся в живых существах, несомненно принадлежит *каталаза*, хотя она ни косвенно, ни прямо никакого окислительного действия не оказывает. Тенар, который открыл перекись водорода, первый заметил, что растительные и животные ткани обладают способностью разлагать ее на воду и инертный кислород. Он также констатировал, что подобное же разложение перекиси водорода производят благородные металлы, перекись марганца, перекись свинца и т. д. Шенбейн изучил более подробно каталитическое действие растительных и животных

тканей на перекись водорода. Но тот факт, что платина ускоряет окислительное действие перекиси водорода на гваяковую настойку и в то же время может разлагать перекись водорода с выделением свободного кислорода, привел его к ошибочному выводу, что обе реакции тесно связаны между собою и производятся одними и теми же «каталитически деятельными органическими веществами». Как упомянуто выше, только сравнительно недавно Леву удалось доказать, что разложение перекиси водорода на воду и молекулярный кислород есть функция особого фермента, каталазы.

В живых организмах каталаза чрезвычайно распространена: нет ткани, в которой бы ее не было, хотя распределение ее в различных органах неравномерно. По Бателли и сотр.<sup>61</sup>, которые исследовали этот вопрос, каталазы больше всего в печени.

Из растительных и животных экстрактов каталаза может быть высажена сернохлоридом аммония, спиртом или ацетоном, и полученный осадок может быть подвергнут основательной очистке повторным растворением в воде и осаждением. Лев полагает, что существуют два вида каталазы — растворимый и нерастворимый. Растворимая каталаза носит характер альбумозы, нерастворимую Лев причисляет к нуклеопротеидам. Каталазу всегда сопровождают сильно редуцирующие вещества, от которых ее можно отделить повторным растворением в воде и осаждением спиртом. Очищенная каталаза как в присутствии, так и в отсутствии перекиси водорода не оказывает ни малейшего окислительного действия. Все указания на ее окислительные свойства основаны на поверхностных наблюдениях.

Небольшие количества каталазы могут разложить сравнительно большие количества перекиси водорода. Тем не менее действие каталазы не безгранично, так как, смотря по условиям концентрации, оно более или менее быстро «исчерпывается». При большом избытке перекиси водорода каталаза разрушается раньше, чем вся имеющаяся перекись подверглась разложению.

Действие каталазы на перекись водорода начинается уже при 0°. Оно возрастает с повышением температуры до 40° (приблизительно) и затем, при дальнейшем повышении, опять уменьшается. При температуре кипения каталаза полностью разрушается. Вредное действие перекиси водорода на каталазу тоже увеличивается с повышением температуры.

Каталаза очень чувствительна к кислотам. Слабый раствор щелочей ускоряет ее действие, более крепкий — задерживает. Синеродистый калий, сероводород, иод, сулема действуют на каталазу, как сильные яды.

В высшей степени замечательно, что каталаза, которая с такой легкостью разлагает перекись водорода, не оказывает никакого действия на производные перекиси водорода, например на этилгидропероксид  $C_2H_5 \cdot O \cdot O \cdot H$ . Факт этот был установлен Бахом и Шоа и впоследствии подтвержден Бателли и сотр. Отсюда вытекает, что каталаза ни в чем не может препятствовать действию оксигеназы, так как последняя при медленном сгорании образует не перекись водорода, а ее производное в виде органической перекиси  $R \cdot O \cdot O \cdot R$  или  $R \cdot O \cdot O \cdot H$ . В соответствии с этим заключением поставленные Бахом и Шоа опыты показали, что очищенная каталаза на окислительное действие фенолазы никакого влияния не оказывает.

Громадный интерес с точки зрения теории ферментов представляет поразительная аналогия между каталазой и так называемыми неорганическими ферментами. Что благородные металлы разлагают перекись водорода, подобно растительным и животным ферментам, было замечено, как упомянуто выше, Тенаром. В последние годы Бредиг и его сотруд-

ники<sup>62</sup> подвергли этот вопрос всестороннему исследованию и пришли к результатам, которые открыли новую эру в истории ферментов.

Для своих исследований Бредиг употреблял благородные металлы не в микроскопически раздробленном состоянии, а в *коллоидальном* растворе. Растворы этого рода он получал, «распыляя» металлы с помощью проволочных электродов в вольтовой дуге под водой. Отфильтровав крупные частицы, он получал темноокрашенные жидкости, которые содержали металлы в состоянии «ложного» раствора. Такого рода растворы металлов, особенно же раствор коллоидальной платины, разлагают перекись водорода с невероятной энергией. Раствор, который содержит 1 г платины в 720 000 л воды, еще заметно разлагает перекись водорода. Многочисленными опытами Бредиг и его сотрудники показали, что те же химические агенты, которые тормозят действие каталазы, задерживают также и разлагающее действие коллоидальной платины на перекись водорода. Не поразительно ли, что ничтожные количества цианистого калия «отравляют» коллоидальную платину так же легко, как и каталазу? Если к раствору коллоидальной платины прибавить  $\frac{1}{300000}$  синеродистой кислоты, то каталитическая способность ее понижается наполовину. Но еще поразительнее тот факт, что «отравленная» синеродистым калием платина, так же как и «отравленная» каталаза, через некоторое время «выздоровливает», т. е. вновь получает способность разлагать перекись водорода. К другим «ядам» коллоидальная платина относится совершенно так же, как и каталаза. Замечу мимоходом, что за этими необычными в применении к химическим телам выражениями: «отравление» и «выздоровление» не кроется ничего метафизического. «Отравленная» платина — это синеродистая или сернистая или иодистая платина, которая перекиси водорода не разлагает. «Выздоровевшая» платина — это синеродистая и т. д. платина, которая под действием воды, кислорода и уголекислоты мало-помалу опять превратилась в коллоидально-металлическую платину.

Из своих многочисленных и разнообразных опытов, давших вполне однозначные результаты, Бредиг выводит заключение, что между природными ферментами и неорганическими катализаторами, или «неорганическими ферментами», нет никакой принципиальной разницы. Таким образом, природные ферменты следует рассматривать как органические катализаторы, которые активностью своей обязаны своему коллоидальному состоянию и обуславливаемой им огромной поверхностью.

## VI. ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТЫ. ПЕРГИДРИДАЗА

Что «органические материи» растительного и животного происхождения обладают восстановительными свойствами, в частности легко восстанавливают нитраты в нитриты, было констатировано Шенбейном<sup>63</sup> уже в 1861 г. Его замечательная прозорливость и тут не изменила ему, и он не замедлил отметить ту внутреннюю аналогию, которая существует между восстановительными свойствами этих «материй» и их каталитическими окислительными свойствами, выражением которых для него было разложение перекиси водорода. В доказательство этой аналогии он приводит факт, что кровяные шарики, которые разлагают каталитически перекись водорода, также восстанавливают нитраты в нитриты и что как восстановительные, так и окислительные их свойства в одинаковой мере исчезают под действием синильной кислоты.

Многочисленные исследователи занимались с тех пор изучением этих восстановительных процессов, и до самого последнего времени в этой области царил такой же хаос, какой царил в области окислительных фермен-

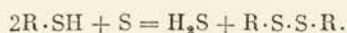
тов лет 10—15 тому назад. История повторяется, и существование восстановительных ферментов теперь отрицается с таким же жаром, с каким раньше отрицалось существование окислительных. Для характеристики положения достаточно упомянуть, что в своем чрезвычайно обстоятельном трактате: «Die Fermente und ihre Wirkunden»\* (1909 г.) К. Оппенгеймер из 800 с лишним страниц текста посвящает восстановительным ферментам всего несколько строк, в которых он высказывает сомнение в их существовании.

Впервые мысль о существовании определенной «восстановительной диастазы» в живых существах была высказана Рей-Пэладом<sup>61</sup> в 1888 г. Обработав обыкновенные дрожжи спиртом и прибавив к ним серы, он констатировал образование сернистого водорода. Он убедился, что вещество, вызывающее восстановление серы в сернистый водород, имеет свойства растворимых ферментов, и дал ему название *филотиона*\*\* . Затем он нашел, что филотион очень распространен не только в растительных, но и в животных организмах.

Оставляя в стороне ряд других работ, не имеющих значения для выяснения вопроса, мы остановимся на работах Аблуса и Рибо<sup>65</sup>. Основываясь на том, что белковые вещества обладают в различной степени способностью при нагревании выделять сероводород как сами по себе, так еще в большей степени в присутствии серы, авторы отрицают ферментативную природу филотиона. Они указывают на то, что выделение сероводорода водными вытяжками дрожжей и животных тканей в присутствии серы постоянно увеличивается с повышением температуры от 45 до 125°, а это ясно указывает на неферментативный характер процесса. Но свойство животных тканей восстанавливать нитраты в нитриты, мышьяковую кислоту в мышьяковистую, нитробензол в анилин и т. п. Аблус и Жерар<sup>63</sup> приписывают восстановительному ферменту. Фермент этот они считают растворимым в воде. Он разрушается при 71°, действует лучше всего при 40—45°. Антисептики, как хлороформ, тимол, однопроцентный раствор хлористого натрия, на него не действуют. Ввиду приведенных выше соображений Аблус отрицает тождество фермента, восстанавливающего нитраты, с филотионом; Рей-Пэлад, напротив того, утверждает это тождество.

Гефтер<sup>67</sup> подверг вопрос о восстановительных свойствах клеток несколько более обстоятельному исследованию. Он различает здесь двоякого рода восстановительные процессы. Одни из них, как восстановление нитратов в нитриты, нитробензола в анилин, задерживаются синильной кислотой и после нагревания препаратов до кипения совершенно не происходят; другие — как восстановление серы, красящих веществ и т. д. — синильной кислотой не задерживаются, а кипячением препаратов едва-едва ослабляются.

Опыты показали, что в процессах последнего рода восстанавливающим агентом являются белковые вещества, которые содержат подвижный водород в виде сульфгидрильной группы — SH. Образование сернистого водорода из этих белков при действии серы Гефтер объясняет образованием дисульфидов с отщеплением сероводорода:



Действительно, соединения, содержащие сульфгидрильные группы, как цистеин, тиогликоколь, тиомолочная кислота и т. п., легко восстанавли-

\* «Ферменты и их действие».

\*\* Филотион Рей-Пэлада соответствует открытому значительно позднее глютаинону, имеющему большое физиологическое значение. П р и м. р е д.

ливают серу, селеновые и теллуrowые соли, индиго, метиленовую синь и т. д., но не восстанавливают нитратов и нитробензола.

Пробуя реактивом на сульфгидрильные группы (нитропруссид натрия в щелочном растворе) растительные и животные препараты, дающие указанные реакции восстановления, Гейтер всюду получил положительный результат. Из этого он выводит заключение, что во всех восстановительных процессах этого порядка нет и следа действия какого-либо восстановительного фермента.

Что касается восстановления нитратов и нитробензола, то и тут Гефтер не видит основания предполагать участие какого-либо фермента. Он считает, что роль восстановителей здесь играют легкоокисляемые вещества вроде альдегидов, оксиальдегидов или аминокальдегидов и что задерживающее действие синильной кислоты просто объясняется образованием нередуцирующего продукта присоединения. В том же смысле, хотя и с несколько большими оговорками, высказываются Кэстль и Эльвов<sup>68</sup>, которые исследовали восстановление нитратов картофельными клубнями.

Вышеназванные исследователи не приняли, однако, в соображение того обстоятельства, что если наблюдаемые в растительных и животных препаратах реакции восстановления и производятся определенными химическими соединениями, как альдегиды и т. п., то это несколько не исключает возможности ускорения этих реакций соответственными катализаторами, или ферментами. Это обстоятельство тем более должно было обратить их внимание, что такого рода катализатор, или фермент, ускоряющий восстановительное действие альдегидов, был уже найден Шардингером<sup>69</sup> в 1902 г., т. е. за 6 лет до напечатания цитированной работы Гефтера. Отыскивая реактив, который дает возможность отличить кипяченое молоко от некипяченого, Шардингер заметил, что смесь муравьиного альдегида и метиленовой сини в водном растворе в несколько минут обесцвечивается при 70° свежим молоком и совершенно не обесцвечивается кипяченым. Дальнейшие опыты показали, что явление это можно воспроизвести, употребляя другие красящие вещества и другие альдегиды. Вокруг этой «реакции Шардингера» создалась целая литература, полная противоречий. Одни доказывали, что молоко само по себе может восстанавливать метиленовую синь, другие отрицали это; третьи уверяли, что реакция Шардингера обязана своим происхождением не самому молоку, а бактериям, которые оно содержит, — этого мнения придерживается, между прочим, К. Оппенгеймер; четвертые высказывают прямо противоположное мнение. Троммсдорфу<sup>70</sup> удалось положить конец спору изящной и точной работой, которой он доказал: 1) что асептически извлеченное из молочной железы молоко само по себе метиленовой сини не восстанавливает, но восстанавливает ее в присутствии альдегидов; 2) что молоко, оставленное на несколько часов после доения при комнатной температуре, приобретает свойство восстанавливать красящие вещества и в отсутствии альдегидов и 3) что кипяченое молоко не восстанавливает метиленовой сини ни само по себе, ни в присутствии альдегидов. Таким образом, не подлежит больше сомнению, что в молоке находится фермент, принимающий участие в восстановительных процессах и отличающийся от «филотона» Рей-Палада и «редуктазы» Аблуса и Жерара тем, что он сам по себе не редуцирует, а только ускоряет редуцирующее действие альдегидов.

Дальнейшим, очень важным шагом в области исследования этого вопроса была уже цитированная выше работа Бредига и Зоммера, в которой они показали, что коллоидальные металлы платиновой группы, в частности коллоидальный палладий, так же точно ускоряют реакцию Шардингера, как и свежее молоко. Помимо этого они установили между ферментом Шардингера и коллоидальным палладием такую же полную



аналогию, которую раньше Бредиг и его сотрудники установили между каталазой и коллоидальной платиной.

При изучении окислительных процессов, вызываемых окислительными ферментами, А. Бах пришел к мысли, что медленным сгоранием при посредстве свободного кислорода, повидимому, не исчерпываются окисления веществ, из которых состоит клетка. Рядом со сгоранием посредством *свободного кислорода* мыслима другая форма медленного сгорания, а именно за счет *кислорода воды*, и на это уже было указано Траубе, а за ним некоторыми другими. Всякое гидролитическое окисление сопряжено с освобождением водорода и восстановительными процессами, а поэтому восстановительные ферменты играют в гидролитических окислениях очень важную роль, ускоряя процесс разложения. Придя таким путем к необходимости изучения этих ферментов, Бах прежде всего старался выяснить химическую основу гидролитических окислительно-восстановительных процессов, протекающих каталитически. Как упомянуто выше (стр. 68), изученное им разложение воды фосфорноватистокислыми солями в присутствии палладия дает вполне ясную картину этих процессов. Если к водному раствору фосфорноватистокислой соли прибавить вместе с палладием метиленовую синь или другое вещество, способное к восстановлению, то водород воды быстро восстанавливает их. И тут с достаточной очевидностью выступает полная аналогия между этой реакцией Бредига и Зоммера и реакцией Шардингера. В самом деле, восстановление метиленовой сини одинаково происходит в трех системах, в которых при прочих равных условиях поочередно меняются то вещества, разлагающие воду, то катализаторы:

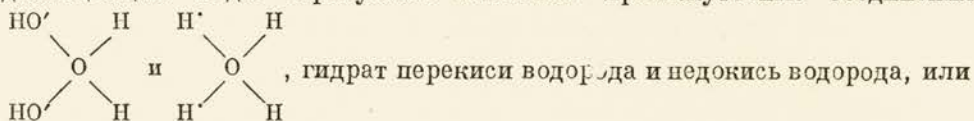
- 1) палладий — метиленовая синь — фосфорноватистокислая соль — вода;
- 2) палладий — метиленовая синь — альдегид — вода;
- 3) фермент Шардингера — метиленовая синь — альдегид — вода.

Можно почти с полной уверенностью сказать, что окислительно-восстановительное действие всех трех систем основано на одной и той же химической реакции. А так как для первой из этих систем механизм реакции вполне ясен, то и реакцию Шардингера и ей подобные нужно признать *гидролитическим процессом, в котором гидроксил воды окисляет альдегид в кислоту, а водород воды через посредство катализатора — фермента — восстанавливает метиленовую синь в лейкоформу.*

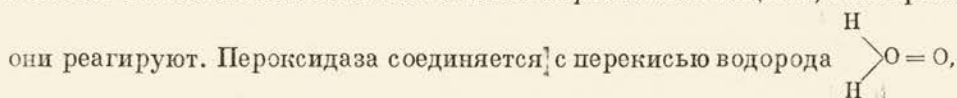
Выяснив химическую основу действия фермента Шардингера, Бах задался целью определить взаимоотношения между этим ферментом, редуктазой Аблуса и альдегидазой (стр. 79). Так как фермент Шардингера редуцирует только при посредстве альдегидов, а, с другой стороны, животные ткани содержат фермент, гидролизующий альдегиды, то представлялось возможным, что оба эти фермента тождественны друг с другом и что они также являются составной частью редуктазы, как оксигеназа является составной частью фенолазы. Поставленные Бахом опыты вполне подтвердили его предположение. Ему удалось извлечь из животных тканей фермент, который, так же как и молоко, ускоряет восстановление метиленовой сини альдегидами. При этом аналогия между фенолазой и редуктазой оказалась полная. Подобно тому как на нормальную «полную» фенолазу прибавление перекиси водорода не оказывает действия, так и прибавление альдегида к редуктазе тканей не увеличивает ее восстановительной способности или даже уменьшает ее, если альдегида прибавлено слишком много. В претерпевшей изменения фенолазе прибавление перекиси вызывает увеличение окислительной способности, в претерпевшей изменения редуктазе прибавление альдегида вызывает увеличение ее восстановительной способности. В некоторых случаях, вследствие полного отделения или

разрушения оксигеназы, от фенолазы остается одна пероксидаза, которая сама по себе никакого окислительного действия не оказывает. Так же точно в молоке мы имеем не полную редуктазу, а фермент Шардингера, который сам по себе никакого восстановительного действия не оказывает. Из этих поразительных аналогий Бах выводит заключение, что редуктаза, как и фенолаза, состоит из системы «фермент — окисляемое вещество». Но в то время как в фенолазе окисляемое вещество присоединяет к себе свободный кислород, в редуктазе оно окисляется на счет гидроксила воды.

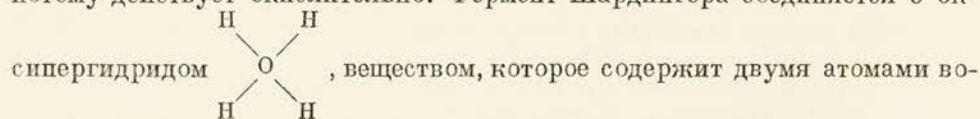
Бах идет еще дальше. Аналогичность двух систем он объясняет аналогичностью тех химических соединений, которые являются активными факторами реакций. Как изложено выше (стр. 69), Бах считает, что при диссоциации воды образуются активные промежуточные соединения



оксипергидрид. Ускоряющее действие металлов платиновой группы на гидролитические окислительно-восстановительные реакции основано на том, что, благодаря их сродству к кислороду и к водороду, металлы эти образуют неустойчивые и очень активные соединения как с гидропероксидом, так и с оксипергидридом; они функционируют здесь, как *амбo-катализаторы*. Но катализаторы в живых существах, ферменты, характеризуются своей *специфичностью*. Процессы окисления, основанные на промежуточном образовании *перекисей*, ускоряются *пероксидазой*; процессы восстановления, основанные на промежуточном образовании *пергидридов*, ускоряются *ферментом Шардингера*. Аналогия между этими ферментами основана на *сходстве химического строения* тех веществ, с которыми



веществом, которое содержит одним атомом кислорода больше, чем вода, и потому действует окислительно. Фермент Шардингера соединяется с ок-



дорода больше, чем вода, и потому действует восстановительно.

Чтобы ясно указать место, которое фермент Шардингера занимает в группе ферментов и отметить его полную аналогию с пероксидазой, Бах предложил дать ему название *пергидридазы*. Насколько можно предвидеть, пероксидаза и пергидридаза окажутся важнейшими, если не единственно важными, из тех ферментов, которые принимают *непосредственное* участие в окислительных и восстановительных процессах, совершающихся в живых организмах.

Продолжая свои исследования, Бах<sup>71</sup> нашел, что пергидридаза ускоряет восстановление альдегидами не только метиленовой сини, индиго и т. д., но и *нитратов*. Он выработал точный количественный метод для определения действия пергидридазы и изучил ход восстановления нитратов системой «пергидридаза — альдегид — вода» в зависимости от концентрации фермента, альдегида и нитрата, так же как и в зависимости от температуры. Благодаря этому количественному методу он мог установить однородность действия пергидридазы молока и пергидридазы тканей. В только что напечатанной своей последней работе Бах<sup>72</sup> показал, что кипяченые вытяжки из различных животных тканей содержат вещество,

которое само по себе не оказывает никакого восстановительного действия, но вместе с пергидридазой молока или тканей образует «полную редуктазу», восстанавливающую как красящие вещества, так и нитраты. Образующиеся при восстановлении нитратов нитриты подвергаются при этом дальнейшему восстановлению, характер которого еще не выяснен. «Кофермент» пергидридазы, т. е. вещество, разлагающее воду, находится в наибольшем количестве в печени, затем идут — почки, селезенка, мозг, легкие. Нахождение этого кофермента в тканях дает новое подтверждение высказанному выше взгляду насчет состава редуктазы.

Таково в настоящее время положение вопроса о восстановительных ферментах.

## ВII. НЕКОТОРЫЕ ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ ОБ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТАХ

### 1. Характер действия оксидаз и пероксидаз

Отличительным признаком ферментов считают то, что они в своем действии отклоняются от простых законов химической кинетики. По закону действующих масс скорость реакции пропорциональна концентрации реагирующих между собою соединений; например, при инверсии тростникового сахара посредством какой-нибудь кислоты количество инвертированного сахара (смеси глюкозы и фруктозы), которое образуется в единицу времени, пропорционально количеству еще не разложенного тростникового сахара. Нанося продолжительность реакции (в единицах времени) на оси абсцисс и количества инвертированного сахара на оси ординат, получают графическое изображение хода реакции в виде *прямой линии*. При сравнении инверсий тростникового сахара, протекающих при различных концентрациях кислоты, можно видеть, что при равных концентрациях катализатора скорость реакции прямо пропорциональна концентрациям субстрата, при равных же концентрациях субстрата она прямо пропорциональна концентрациям катализатора. Другими словами, время, необходимое для инверсии определенного количества сахарозы, тем короче, чем больше раствор содержит как сахарозы, так и кислоты.

Эти соотношения выражают формулой:

$$\left. \begin{array}{l} \text{Продолжительность реакции} \times \text{количество катализатора} \\ \text{Продолжительность реакции} \times \text{количество субстрата} \end{array} \right\} = \text{конст.}$$

Изучение характера действия ферментов показало, что у них скорость реакции не прямо пропорциональна концентрации фермента и субстрата, а уменьшается гораздо скорее, чем концентрация их. Поэтому графическое изображение действия фермента представляет собою не прямую линию, а кривую, которая мало-помалу пригибается к оси абсцисс и затем до конца реакции идет почти параллельно последней.

Это отклонение ферментных реакций от законов действующих масс подало повод к самым фантастическим толкованиям и предположениям.

Была даже высказана мысль, что ферменты вообще не химические вещества, а только *свойства* химических веществ (Артюс). Поэтому от них нельзя и требовать, чтобы они подчинялись химическим законам. Но более точное исследование показало, что отклонения от простых законов химии обуславливаются тут *химически* объяснимыми видоизменениями хода реакции. В одних случаях фермент разрушается в процессе ускорения реакции, вследствие чего скорость ее соответствует не первоначально введенному количеству фермента, а только тому количеству, которое во

всякий данный момент остается еще не разрушенным. В других случаях образующиеся продукты реакции действуют задерживающим образом на ход ее вследствие того, что они соединяются с ферментом или субстратом и тем вызывают тенденцию к состоянию равновесия. Было сделано немало попыток выразить эти отклонения в математических формулах и вывести из них законы действия ферментов. Но, как показал Бах<sup>73</sup> на примере пероксидазы (см. ниже), действие которой поддается точному определению, «законы» эти не имеют никакого значения, так как в ферментных препаратах мы имеем дело не с химическими индивидуумами, а с неопределенными смесями веществ, содержащими ферменты. Примеси посторонних веществ не остаются без влияния на ход реакции, и потому результаты, получаемые с разными препаратами одного и того же фермента, никогда не бывают вполне сравнимыми.

Окислительные ферменты обнаруживают такие же отклонения от простых законов химии, как и другие ферменты, и в этой области были уже попытки вывести «законы действия оксидазы».

Так, Словцов<sup>74</sup> нашел, что фенолаза следует в своем действии так называемому «правилу Шютца—Борисова». Согласно этому правилу, при одинаковых концентрациях субстрата скорость реакции растет не пропорционально концентрации фермента, а как квадратный корень из этой концентрации. Медведев относительно действия альдегидазы пришел к заключению, что «количество салициловой кислоты, образующейся в единице объема, прямо пропорционально квадрату концентрации фермента и обратно пропорционально квадратному корню из концентрации салицилового альдегида». Все эти математические выкладки уже по одному тому лишены большого значения, что методы анализа, употребленные авторами, не могут претендовать на точность и не отвечают требованиям, предъявляемым к физико-химическим исследованиям.

Если вывод законов, управляющих действием окислительных ферментов, представляется преждевременным, то изучение кинетики их действия может дать довольно интересные результаты, особенно если к исследованию применяются более точные методы анализа. Так, Бах<sup>75</sup> нашел, что окрашенные продукты окисления, которые образуются при действии тирозиназы на бесцветный раствор тирозина, легко обесцвечиваются марганцово-калиевой солью в кислом растворе, и основал на этом легкий и точный метод определения действия тирозиназы. Пользуясь этим методом, он показал, что тирозиназа разрушается в процессе окисления тирозина, и тем скорее, чем больше концентрация самого фермента и субстрата, т. е. чем скорее идет реакция. Сравнивая ход реакции в серии опытов с переменными концентрациями того и другого, он нашел, что в *первых стадиях реакции*, т. е. когда тирозиназа сохраняет еще всю свою активность, действие ее несомненно следует закону масс: скорость реакции тут прямо пропорциональна концентрации фермента и концентрации субстрата. Но по мере того как действие тирозиназы ослабляется, замечается все большее и большее отклонение от прямой линии.

Характер действия *пероксидазы*, соответствующей фенолазе, был изучен Бахом и Шода<sup>76</sup> на примере ускорения ею реакции между иодистым калием и перекисью водорода в кислом растворе. Выделенный под титровался при этом раствором серноватисто-кислого натрия. Полученные ими результаты вполне аналогичны указанным выше. Применяя другой метод (образование малахитовой зелени из лейкоформы), Фюрт и Чигларж (I. c.) пришли к таким же заключениям, как Бах и Шода.

В другой работе Бах задался целью изучить более обстоятельно каталитическое действие пероксидазы при реакции между иодистоводородной кислотой и перекисью водорода. Работая с препаратом пероксидазы,

извлеченной из хрена, он в целом ряде систематически поставленных опытов получил для этого фермента многочисленные цифровые данные, из которых с полной ясностью и определенностью вытекало несколько закономерностей. При повторении тех же опытов с другим, более очищенным препаратом пероксидазы получились совершенно иные закономерности, а от прежних не осталось и следа. Так, например, в первой серии количества выделенного иода возрастали, как квадратный корень из концентрации иодистоводородной кислоты; во второй серии они были прямо пропорциональны ей. Эти неожиданные результаты и привели Баха к заключению о преждевременности построения «законов действия ферментов».

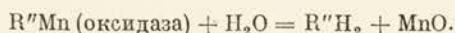
Несколько месяцев тому назад Вернон<sup>77</sup>, исследуя количественно действие животной фенолазы при образовании индофенола из  $\alpha$ -нафтаола и парафенилендиамина, тоже нашел, что, смотря по условиям опыта, действие это пропорционально квадрату концентрации фермента, просто концентрации или квадратному корню из концентрации его. Этим он полностью подтвердил высказанный раньше Бахом взгляд.

## 2. Теория действия оксидаз

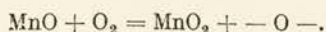
Для объяснения окислительного действия, производимого фенолазой, имеются в настоящее время две теории: Г. Бертрана и А. Баха.

Выделив впервые оксидазу из сока японского лакового дерева, Бертран сделал анализ ее минеральных составных частей и нашел в них марганец. Принимая во внимание, что соединения марганца, как давно известно, ускоряют окисление и высыхание жирных масел, Бертран попытался связать окислительную деятельность своей «лакказы» и оксидаз вообще с содержанием в них марганца. И действительно, он показал, что оксидаза из люцерны, содержащая очень мало марганца, оказывает очень слабое окислительное действие на гидрохинон и что прибавление к ней соединений марганца вызывает значительное усиление ее окислительной способности. Основываясь на этом, Бертран дал следующую теорию оксидаз.

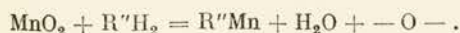
Он принимает, что оксидазы являются органическими соединениями марганца, в которых органическая часть, близкая к белковым веществам, играет роль слабой кислоты. В силу этого оксидаза под действием воды должна легко распадаться на органическую кислоту и закись марганца:



Настоящее окислительное действие оксидазы начинается только после распада ее в указанном направлении. Легкоокисляемая закись марганца расщепляет молекулу кислорода  $O = O$ , присоединяет к себе один атом, образуя двуокись марганца, и освобождает другой, который и производит окисление гидрохинона, гваяковой настойки и т. д.:



Образовавшаяся двуокись марганца разлагается затем органической, слабокислотной частью оксидазы. При этом выделяется еще один атом кислорода, и первоначальная оксидаза опять возрождается с образованием молекулы воды:



Этот второй атом кислорода, в свою очередь, производит окислительное действие, и процесс опять начинается сначала. Марганец является здесь активным элементом оксидазы, производящим не только активирование кислорода, но и перенесение его на окисляемое вещество.

В теории Бертрана надо различать два момента: процесс активирования кислорода и участие марганца в действии оксидазы.

В объяснении активирования кислорода Бертран присоединяется к теории Гоппе-Зейлера, по которой окисляемое вещество расщепляет молекулу кислорода на свободные атомы, присоединяет к себе один из них, образуя окись, в то время как другой, будучи настоящим активным кислородом, может производить всякие окисления. Бертран только несколько расширил эту теорию и, постулируя образование двуокиси марганца в качестве первого продукта окисления, он мог вывести и второй атом кислорода за скобку и превратить его в активный кислород. Это дало ему возможность подвести действие оксидазы под категорию каталитических процессов, при которых ничтожное количество активного вещества может произвести неограниченное превращение. Но мы уже видели (стр. 74—75), что оксидазы очень быстро разрушаются в процессе окисления, и факты, повидимому, не совпадают с теорией Бертрана. Поскольку эта теория кладет в свою основу гоппе-зейлеровскую концепцию активирования кислорода, она так же мало соответствует действительности, как и последняя (стр. 55 и сл.).

Что касается второго момента теории Бертрана, роли марганца в действии оксидаз, то вначале Бертран высказал взгляд, что марганец в этом отношении не может быть заменен никаким другим элементом. Для него марганец был не только активным фактором окислительного действия оксидаз, но и *единственно возможным* фактором его. Но более глубокое исследование вопроса обнаруживало факты, которые шли вразрез с теорией Бертрана. Сарту<sup>78</sup>, Словцов<sup>79</sup> и Исаев<sup>80</sup> показали, что марганец вовсе не является необходимой составной частью оксидаз. Они извлекли из различных растений оксидазы (фенолазы), которые совершенно не содержали марганца, но содержали железо. Окислительное действие этих препаратов было тождественно с окислительным действием бертрановской «лакказы». Кроме того, Исаев показал, что окислительное действие не содержащей марганца оксидазы несколько не увеличивалось от прибавления к ней солей этого металла.

Эти факты показывают, что теория Бертрана далеко не универсальна, но еще не опровергают самой теории. Действительно, в естественной классификации элементов железо стоит близко к марганцу: как последний, оно может давать различные степени окисления и потому может функционировать как активатор и переносчик кислорода в бертрановском смысле. Но и это расширенное толкование оказалось не соответствующим фактам. После многих безуспешных попыток Баху<sup>81</sup> удалось вполне очистить фенолазу из грибов (*Lactarius vellereus*) от марганца и железа с сохранением ее окислительных свойств.

Этим он доказал, что ни марганец, ни железо не являются *первичными* факторами действия оксидаз.

В одно время с Бертраном (в 1897 г.) Бах выдвинул совершенно иную теорию действия оксидаз. Как и Бертран, он связал действие оксидаз с процессами медленного сгорания и активирования кислорода. Но в то время как Бертран опирался на гоппе-зейлеровскую теорию, Бах исходил из своей собственной (и Энглера) теории активирования кислорода через *промежуточное образование перекисей*. Уже тогда он указал на то, что оксидазы обязаны своим окислительным действием промежуточному образованию перекисей и что в окислении индиго свободным кислородом в присутствии терпентинного масла мы имеем прототип действия оксидаз. О том, как эта теория была в дальнейшем разработана экспериментально Бахом (отчасти в сотрудничестве с Шода) и какие при этом получились результаты, было уже изложено выше (см. стр. 73), и мы к этому не будем возвращаться. Но в связи с теорией оксидаз нам предстоит разобрать весьма

важный вопрос о роли, которую соли, находящиеся в организме, играют в окислительных процессах, в частности в действии оксидаз.

Если присутствие солей марганца и железа вовсе не является условием *sine qua non* действия оксидаз, то из этого несколько не следует, что они не оказывают никакого влияния на их действие. Бертран первый показал, что соли марганца могут ускорять окислительное действие лакказы из люцерны на гидрохинон. Многие исследователи сделали аналогичные наблюдения, и теперь не подлежит сомнению, что не только соли марганца и железа, но и соли других металлов, в частности щелочно-земельных, ускоряют окисление. В чем же состоит их ускоряющее действие? Принимается, как само собою разумеющееся, что они окисляются за счет свободного кислорода и затем передают присоединенный кислород окисляющимся телам, возрождаясь в первоначальные соединения. Но если это объяснение допустимо для низших степеней окисления марганца и железа, которые более или менее легко окисляются в высшие и раскисляются обратно, то для солей таких металлов, как алюминий, цинк, кальций и магний, такое объяснение без большой натяжки принять нельзя. Ключ к пониманию настоящей роли, которую играют соли при окислениях, дается тем фактом, что ускоряющее действие солей наблюдалось только при медленном сгорании *легкоокисляемых веществ*. Это все те же фенолы, альдегиды, ненасыщенные углеводороды, которые уже сами по себе присоединяют кислород, образуя перекиси. А раз имеются перекиси, то ускоряющее действие солей становится понятным ввиду аналогии с ускоряющим действием солей закиси железа на перекись водорода. Соли ускоряют окисление не потому, что они поглощают кислород из атмосферы и передают его легкоокисляемым веществам, а потому, что с перекисями, образующимися при медленном сгорании легкоокисляемых веществ, они дают неустойчивые перекисные комплексы, отдающие свой активный кислород легче и быстрее, чем первоначальные перекиси. Чем легче окисляемое вещество образует перекиси, тем больше ускоряется солями его окисление на воздухе. Хлористый кальций, например, во много раз ускоряет окисление гидрохинона. Но он еще больше ускоряет его, если к раствору гидрохинона прибавить терпентинного масла, т. е. увеличить количество перекисей в реакции (еще не опубликованные опыты).

Это приводит нас к вопросу о влиянии солей на оксидазы. И тут мы имеем совершенно аналогичные явления. Ключ к их пониманию дал чрезвычайно интересный опыт Жессара<sup>82</sup>. Мы уже видели, что при действии тирозиназы на тирозин образуется сначала красное растворимое вещество, которое затем темнеет и, наконец, выпадает в виде нерастворимого черного осадка (меланин). Жессар нашел, что превращение этого красного вещества в меланин чрезвычайно ускоряется солями металлов, особенно щелочно-земельных. Иногда получают такие препараты тирозиназы, действие которых не идет дальше образования красного продукта окисления, если не прибавить к жидкости каких-либо солей. Тут представлялось возможным выяснить вопрос о том, нуждаются ли оксидазы в солях для того, чтобы при их посредстве получать кислород из воздуха, или же соли действуют на первичные, перекисные продукты окисления, даваемые оксидазами, и ускоряют окислительные процессы, подобно тому как соли закиси железа ускоряют действие перекиси водорода. Поставленные Бахом<sup>83</sup> в этом направлении опыты дали следующий результат.

Приготовив действием очень чистой тирозиназы на тирозин красный раствор, содержащий еще активный фермент, Бах разделил его на две части и в одной из них разрушил фермент нагреванием до 70°. Прибавив затем к обеим пробам одинаковое количество раствора алюминиевой соли (соли алюминия действуют гораздо энергичнее, чем соли щелочноземель-

ных металлов), он констатировал, что в обоих случаях образование меланина шло совершенно одинаково. Из этого следует, что в превращении красного вещества в меланин, для которого нужны соли, сама оксидаза уже никакого участия не принимает. В противном случае проба, содержащая активную тирозиназу, должна была бы дать больше меланина, чем проба с неактивной тирозиназой.

Совершенно такой же результат Бах получил, действуя в тождественных условиях фенолазой на пирогаллол.

Таким образом, становится ясным, что для *первичного действия оксидаз*, т. е. для присоединения молекулярного кислорода, соли металлов не нужны. Они вступают в действие лишь после того, как кислород уже закрепляется оксидазой в виде перекисных комплексов. Ускоряя окислительное действие этих перекисных комплексов, соли металлов играют здесь роль *вторичных катализаторов* медленного сгорания, о которых была речь выше.

Хотя соли металлов прямо и не участвуют в первичном действии оксидаз, тем не менее они могут *косвенно* ускорять это действие. Такое ускорение происходит тогда, когда первичные продукты окисления действуют задерживающим образом на дальнейшее присоединение кислорода, вследствие тенденции к установлению равновесия между продуктами окисления и неокисленным субстратом. Выделяя эти первичные продукты окисления из круга реакции путем превращения их в нерастворимые соединения (меланин, пурпурогаллин, хингидрон и т. д.), соли металлов устраняют препятствия к продолжению реакции и тем косвенно ускоряют действие оксидаз. Что касается механизма этого ускорения, то наиболее вероятным является предположение, что соли металлов, как и пероксидаза, соединяются с перекисями, образуя неустойчивые комплексы, которые энергично окисляют своим активным кислородом еще не окисленный субстрат.

Резюмируя вопрос, мы можем сказать, что при современном состоянии наших знаний действие оксидаз представляется в следующем виде.

Вещества или субстраты, на которые распространяется окислительное действие оксидаз, уже сами по себе обладают способностью присоединять к себе молекулярный кислород с образованием перекисей. Этот первоначальный процесс окисления может быть каталитически ускорен другими, более легко окисляемыми веществами, быстрее образующими перекиси. К этим веществам принадлежит и оксигеназа. Затем превращение первичных продуктов окисления в окончательные продукты реакции, в свою очередь, ускоряется другого рода катализаторами: солями металлов и пероксидазой. Таким образом, для ускорения медленного сгорания мы имеем две каталитические системы:

- 1) легкоокисляемое вещество (дающее перекись) — соль металла;
- 2) оксигеназа — пероксидаза.

Обе эти системы, вне всякого сомнения, построены по одному и тому же химическому принципу, ибо, комбинируя между собою элементы их, мы получаем две новые активные системы:

- 3) легкоокисляемое вещество (или перекись) — пероксидаза;
- 4) оксигеназа — соль металла.

Из этого видно, что действие оксидаз является двуфазным каталитическим процессом, протекающим под влиянием двойного рода катализаторов: *оксигеназа активировывает кислород, образуя перекиси, а пероксидаза переносит этот активированный кислород на субстрат.*

Не следует, однако, упускать из виду, что эта интерпретация в настоящее время применима лишь к *фенолазе*, в которой оксигеназу можно заметить каким-либо другим легкоокисляемым веществом или готовой перекисью, а пероксидазу — солью металла. Иначе обстоит дело с *тирозиной*.



Действие солей на даваемые ею первичные продукты окисления еще более явственно, чем при фенолазе, но заменить здесь соли пероксидазой или оксигеназу перекисью до сих пор не удалось. Что касается алкогольоксидазы и пуриноксидаз, то они еще слишком мало исследованы, чтобы можно было высказать какое-либо заключение относительно их состава.

### 3. Можно ли считать оксидазы и пероксидазы ферментами?

Причисление оксидаз и пероксидаз к категории ферментов вызвало с разных сторон немало возражений. Возражения эти распадаются на две группы. Исходя из того факта, что оксидазы и пероксидазы расходуются в процессе окисления, другими словами, обуславливают превращения, пропорционально своей массе, некоторые авторы не признают их ферментами. Ибо фермент, как настоящий катализатор, должен производить превращения, стоящие вне всяких стехиометрических отношений к его массе. Выше (стр. 68 и сл.) уже было указано, почему это положение приходится считать произвольно суживающим область катализа. Здесь отметим только, что самые настоящие ферменты вовсе не действуют безгранично, а тоже мало-помалу теряют свою активность в процессе превращения, ускоряемом ими. Поэтому между настоящими и ненастоящими ферментами разница только количественная, а не качественная. Все зависит от того, насколько легко катализатор-фермент возрождается из промежуточного продукта и как он относится к продуктам реакции.

Вторая группа возражений сводится к тому, что оксидазы и пероксидазы нет надобности возводить в ранг ферментов, так как неорганические катализаторы могут производить такое же действие, как оксидазы и пероксидазы. В доказательство верности этого положения приводился тот факт, что можно легко приготовить «искусственные» оксидазы и «искусственные» пероксидазы. Трийа<sup>84</sup> первый приготовил такую оксидазу, действуя на раствор марганцовой соли едкой щелочью в присутствии коллоида (альбумина или гумми). Эту «ассоциацию металла, щелочи и коллоида» он уподобляет бертрановской лакказе. Аналогичную «искусственную» фенолазу приготовил также Дони-Эно<sup>85</sup>, который высказывает мнение, что и лакказа Бертрана обязана своим окислительным действием «ионам гидроксила», которые стимулируют действие марганца. Вольф<sup>86</sup> нашел, что коллоидный раствор железосинеродистой закиси железа (растворимой лазури) функционирует, как «искусственная» пероксидаза.

Против выводов Дони-Эно и других можно прежде всего возразить, что «искусственная» оксидаза несколько не сравнима с естественной фенолазой. Первая действует только в щелочной среде, и при нейтрализации все ее окислительные свойства пропадают.

В щелочной среде фенолы, как известно, быстро окисляются, и соли марганца могут ускорить это окисление. Натуральная фенолаза оказывает свое окислительное действие и в сильноокислой среде. Как показали Бах и Эбарский (1. с.), чтобы остановить полностью действие фенолазы из грибов на гваякол, нужно было употребить больше 11 весовых частей серной кислоты на 1 весовую часть фермента в 30 см<sup>3</sup> раствора. Тут, очевидно, о каком бы то ни было «стимулирующем действии ионов гидроксила» на марганец не может быть и речи.

Кроме того, исключение оксидаз из категории ферментов на том основании, что действие их можно воспроизвести посредством других каталитических систем, кажется по меньшей мере странным. Из того, что соли тяжелых металлов — те же соли железа и марганца — могут инвертировать сахарозу, никто ведь не станет выводить заключения, что инвертаза не фермент.

Помимо всего этого вопрос тут ставится еще принципиально. Раньше,

чем причислять тот или иной встречающийся в живых организмах катализатор к ферментам или признавать его подлежащим исключению из этой категории, необходимо условиться насчет того, что надо понимать под названием «фермент». В поисках исчерпывающего определения этого понятия мы можем остановиться только на одном: фермент — это катализатор, встречающийся в живых организмах, принимающий участие в биохимических процессах и теряющий свою активность при кипячении. Всякое другое определение оказывается в том или ином отношении неудовлетворительным. Применяя это определение к оксидазам и пероксидазам, мы видим, что они вполне ему удовлетворяют: они действуют каталитически, находятся в живых организмах, участвуют в биохимических процессах и, наконец, разрушаются кипячением. А потому их надо причислить к ферментам, пока еще существуют ферменты как отдельная категория веществ, действие которых еще не сведено к вполне выясненным, определенным химическим реакциям.

Впрочем, вопрос о находящихся в живых организмах окислительных катализаторах несколько не становится яснее вследствие того, что оксидазы и пероксидазы будут исключены из категории ферментов. В попытках, делаемых в этом направлении, нужно видеть пережитки той эпохи, когда на ферменты смотрели, как на *внехимические* категории.

## VIII. РОЛЬ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ И ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ПРОЦЕССАХ ДЫХАНИЯ

### 1. Взгляды первых исследователей

Что «деятельный, связанный с органическими материями кислород» играет важную роль в процессах дыхания, было указано еще Шенбейном. Поскольку этот исследователь приписывал этим «материям» каталитические свойства, — он первый признал физиологическое значение тех окислительных агентов, которые мы теперь называем окислительными ферментами.

Несколько больше определенности мы находим во взглядах М. Траубе<sup>87</sup>, который ввел название *окислительный фермент*. Он считает все ферменты переносчиками кислорода и делит их по характеру их действия на две группы. К первой группе принадлежат ферменты, переносящие *свободный* кислород. Траубе называет их окислительными ферментами и причисляет к ним растительный фермент, вызывающий синее окрашивание гваяковой настойки (фенолаза), и красящее вещество кровяных шариков. Ко второй группе он относит ферменты, которые переносят *связанный* кислород, вследствие чего рядом с процессом окисления происходит процесс восстановления. Эти ферменты он называет *восстановительными*. Сюда он причисляет, например, фермент спиртового брожения, действием которого молекула глюкозы частью окисляется в угольный ангидрид, частью же в эквивалентной пропорции восстанавливается в спирт. Траубе допускает, что окислительные ферменты в большом числе находятся в живых организмах и являются участниками процессов дыхания. Окислительным ферментом он считает также сокращающееся вещество мышц и высказывает мнение, что эта субстанция обуславливает большинство окислительных процессов, происходящих в организме.

Со времени Траубе многие исследователи признавали участие окислительных ферментов в процессах дыхания. Отметим здесь обративший на себя наибольшее внимание взгляд, высказанный Шницером<sup>88</sup>.

Шпицер исследовал окислительную способность животных тканей, принимая за меру последней, с одной стороны, количество кислорода, которое ткани могли выделить из перекиси водорода, с другой — образование индофенола из смеси  $\alpha$ -нафтола и паратолуилендиамина в щелочном растворе. Из своих исследований он вывел заключение, что носителями окислительных свойств являются нуклеопротейды — белковые вещества, содержащие фосфор и железо и составляющие значительную часть ядра клетки. Это их окислительное свойство Шпицер связывает с присутствием в них железа, благодаря которому свободный кислород переносится на подлежащие окислению составные части клетки. А отсюда он делает дальнейшие выводы относительно роли, которую ядро клетки играет в процессах дыхания. Выводы Шпицера получили, повидимому, подтверждение в работах Жака Леба<sup>89</sup>, который объясняет гибель комков протоплазмы, лишенных ядра, именно низкой активностью процессов окисления. С другой стороны, лишенные ядра кусочки зеленых водорослей, ассимилирующих углекислоту и *выделяющих кислород*, остаются долгое время живыми, несмотря на отсутствие ядра.

Что ядро клетки играет важную роль в процессах дыхания, является очень вероятным (см. ниже). Но выводы, к которым пришел Шпицер, никакого отношения к его опытам над окислительной способностью тканей не имеют. Как упомянуто выше, он измерял эту способность, с одной стороны, выделением кислорода из перекиси водорода, с другой — образованием индофенола. Мы знаем теперь, что выделение кислорода из перекиси водорода производится *каталазой* (стр. 84), а образование индофенола обуславливается действием *фенолазы*. Первая лишена способности производить как бы то ни было окислительное действие, а последняя окисляет только такие вещества, которые физиологического значения не имеют. А так как вдобавок ни каталаза, ни фенолаза к нуклеопротейдам не принадлежат, то отнюдь не видно, каким образом можно, исходя из их действия, делать заключения о роли ядра клетки в процессах дыхания.

До последнего времени оценка физиологического значения окислительных ферментов делалась на основании опытов с «гваяковой оксидазой» (фенолазой), с соответствующей ей пероксидазой и с салицилазой (альдегидазой). Последняя вообще не принадлежит к окислительным ферментам, а первые две действуют окисляюще только на такие вещества, которые к нормальным составным частям тканей никоим образом причислить нельзя. Но и эти вещества они окисляют только очень поверхностно, отнимая у них исключительно легкоподвижный водород (стр. 75). К окислению пищевых веществ в углекислоту, воду и мочевину действие этих окислительных ферментов прямого отношения, повидимому, не имеет. Поэтому не было недостатка в голосах, которые отрицали значение оксидаз для процессов дыхания. Но, чтобы объяснить их нахождение в живых организмах, им пытались приписать другую роль.

## 2. Окислительные ферменты как агенты защиты организма

Наиболее обоснованной является гипотеза Портье<sup>90</sup>, по которой оксидазы играют роль не посредников дыхания, а агентов защиты организма.

Растения содержат не только ферменты, но и хромогены, которые ими окисляются при посредстве кислорода воздуха с образованием окрашенных продуктов. Быстрое окрашивание большинства свежеприготовленных растительных экстрактов на воздухе обуславливается окислением этих хромогенов. В большинстве случаев продукты окисления хромогенов конденсируются в нерастворимые, очень устойчивые соединения. Лучшим

примером этого является образование известного японского лака действием фенолазы на содержащиеся в соке лакового дерева фенольные соединения. Но замечательно здесь то, что в живом, неповрежденном растении хромоген не окисляется, несмотря на присутствие кислорода в соке. Окисляется он только тогда, когда структура растения тем или иным путем повреждается, из чего можно заключить, что *при жизни* растения хромоген и оксидаза никогда не соприкасаются, что они локализованы в *различных* клетках. Если это так, то оксидазы, которые и вне клетки могут окислять только вещества, аналогичные по своему составу хромогенам, никакой роли в процессах дыхания не могут играть. Они выступают на сцену лишь тогда, когда дело идет о возобновлении тем или иным образом поврежденных *покровов* растения. При повреждении содержимое клеток смешивается, фенолаза, хромоген и кислород приходят в соприкосновение, вследствие чего на поверхности поврежденного места образуется новый нерастворимый покров. Этим объясняется то, что больше всего фенолазы растения содержат в периферических слоях.

Еще яснее выступает защитная функция оксидаз в животном организме. По мнению Портье, оксидазы находятся только в лейкоцитах, т. е. в защитных клетках, и попадают в жидкости организма лишь после разрушения этих клеток. В доказательство защитной функции оксидаз можно привести факт, установленный Н. Зибер и др., что известные токсины разрушаются растительными и животными оксидазами.

Гипотеза Портье, которую принимают и другие исследователи, очень правдоподобна и, по всей вероятности, правильно объясняет *часть* функций окислительных ферментов. Ко времени, когда Портье высказывал свой взгляд на этот вопрос, знали, кроме фенолазы и салицилазы, только тирозиназу, и этим ферментам нельзя было приписывать существенной роли в процессах дыхания, если только придерживаться фактов. Однако с тех пор положение значительно изменилось, так как были открыты окислительные ферменты, которые к простым агентам защиты причисляемы быть не могут.

### 3. Окислительные ферменты, способствующие окислению физиологически важных веществ

Здесь принадлежат: открытая Бателли и сотр. пероксидаза, которая при посредстве перекиси водорода окисляет муравьиную кислоту в угольный ангидрид и воду (стр. 84); открытая Бухнером в уксусных бактериях и Бателли и сотр. в животных тканях алкогольоксидаза, которая окисляет при посредстве свободного кислорода спирт в уксусную кислоту (стр. 77—78), и, наконец, пуриноксидазы, окисляющие при посредстве кислорода пурины, т. е. продукты распада нуклеинов (стр. 79—80).

Особый интерес представляют пуриноксидазы, так как они совместно с некоторыми гидролитическими ферментами производят почти полный распад одной из главнейших составных частей клетки — нуклеинов — и дают некоторое представление о сущности процессов метаболизма, происходящих в живых организмах.

Как упомянуто выше, нуклеин под действием *пепсина* или *трипсина* распадается на альбумин и нуклеиновую кислоту. Последняя под действием *нуклеазы* распадается на фосфорную кислоту и четыре основания: цитозин, тимин, аденин и гуанин. Аденин под влиянием аденазы превращается в гипоксантин, а гуанин под влиянием гуаназы в ксантин. Дальнейшая деградация этих веществ идет уже путем окисления при содействии оксидаз. Под влиянием *ксантиноксидазы* гипоксантин и ксантин окисляются свободным кислородом в мочевую кислоту. Последняя под

влиянием *урикооксидазы* окисляется с выделением угольного ангидрида в аллантоин. Есть основание предполагать, что аллантоин дальше окисляется в щавелевую кислоту — последнюю ступень перед угольной.

Нижеследующая схема иллюстрирует весь процесс превращения нуклеинов.



Окисление пуриновых соединений пуринооксидазами идет гладко и количественно, начиная с гипоксантина и кончая аллантоином.

По тому же пути проходит окисление пуриновых соединений и *in vivo*; Шиттенгельм и Бевдикс<sup>91</sup> делали кроликам подкожные и ивтривенозные впрыскивания гуанина и констатировали его превращение в ксантин и мочевую кислоту.

Ввиду указанных фактов участие окислительных ферментов в дыхательных процессах не может быть больше подвергнуто сомнению. Но этим далеко не исчерпывается вопрос, ибо между суммой действий известных нам окислительных ферментов и суммой окислительных процессов, совершающихся в организме, никоим образом нельзя поставить знака равенства.

#### 4. Факты и предположения, касающиеся еще не выясненных звеньев метаболизма

Поскольку известные нам окислительные ферменты не оказывают никакого действия именно на те вещества, которые для живых организмов являются источником энергии, т. е. объектом дыхательных процессов, то перед нами опять встает вопрос: как же происходит сжигание углеводов, жиров и белков в растительном и животном организме?

Мы знаем теперь, как происходит активирование кислорода в процессах медленного сгорания, знаем также, что кислород не только активируется в живых организмах, но и встречается там с катализаторами — ферментами, которые переносят его на *некоторые* способные к окислению вещества. Очевидно, что в цепи дыхательных процессов, совокупность которых составляет так называемый *метаболизм*, или *обмен веществ*, для нас остаются невыясненными многие звенья. Но накопившийся за последние

десятилетия богатый фактический материал дает возможность и тут наметить наиболее вероятный — при современном состоянии наших знаний — путь к познанию их.

Отвергая всякие виталистические объяснения, которые ровно ничего не объясняют\*, и не покидая почвы фактов, можно относительно механизма сгорания углеводов, жиров и белков в организме сделать три предположения: а) живой организм заключает в себе крайне неустойчивые и в соответственной степени активные окислительные ферменты, которые разрушаются вскоре после смерти его и потому до сих пор выделены быть не могли; б) в организме пищевые вещества претерпевают изменения, которые делают их доступными окислению при посредстве уже известных нам окислительных ферментов; и, наконец, в) названные пищевые вещества окисляются в организме не окислительными ферментами при посредстве свободного кислорода, а гидролитически — при содействии ферментов. Рассмотрим все эти предположения в связи с фактами, на которые они опираются.

а) Смерть организма, как известно, не вызывает моментального прекращения тех элементарных процессов, которые в нем происходят при жизни. Не прекращается сразу и способность убитых, но еще не умерших организмов и их тканей поглощать кислород и выделять углекислоту.

Громадный интерес представляют в этом отношении исследования, произведенные В. Палладиным<sup>92</sup> над убитыми растениями. Для того чтобы убить растения, не изменяя их химического состава, как это имеет место при умерщвлении их посредством органических растворителей (ацетон) или высокой температуры, Палладин прибег к низким температурам. Многочисленные и разносторонние опыты, поставленные им и его учениками, показали, что замороженные и потом оттаявшие при обыкновенной температуре растения обладают способностью выделять в атмосфере водорода, т. е. *без содействия кислорода*, значительное количество угольного ангидрида. Если после полного прекращения выделения углекислоты заменить атмосферу водорода атмосферой кислорода, то опять образуются значительные количества углекислоты. В последнем случае мы имеем дело с окислением веществ, входящих в состав растений, свободным кислородом. Палладин приписывает это окисление действию особого окислительного фермента, *оксидазы*, которую он считает отличной от фенолазы (пероксидаза — оксигеназа). Замечательно, что растения, которые до опыта держались некоторое время в темноте на растворе сахарозы и потому были богаче питательными запасами, дали при действии кислорода больше углекислоты, чем растения, не получившие сахарозы.

В параллель к опытам Палладина надо поставить исследование Бателли и сотр.<sup>93</sup> над дыханием животных тканей.

Определяя обмен газов (поглощение кислорода и выделение угольного ангидрида) в мелкоиздробленных тканях при наиболее благоприятных для этих процессов условиях, они пришли к заключению, что дыхание тканей охватывает два различных процесса: главное дыхание и побочное дыхание. Главное дыхание неразрывно связано с анатомическими элементами тканей, побочное дыхание может происходить и в совершенно про-

\* Лев (l. c.), например, считает окислительные ферменты агентами защиты организма и отрицает их участие в дыхательных процессах. Окисление же сахаров, жиров и т. д., по его мнению, производится не ими, а «живой протоплазмой», которая и является оксидазой *par excellence*. Происходит это окисление так, что протоплазма, благодаря громадной свободной энергии, которой она обладает, совершенно расплывает молекулы этих веществ и делает их доступными окислению. Таким образом, Лев объясняет *одно неизвестное*, механизм окисления пищевых веществ, *другим неизвестным*, запасом энергии живой протоплазмы. Отягчающим обстоятельством в этого рода «объяснениях» является то, что они выносят вопрос за пределы экспериментальной работы. Кому и для чего они нужны, — пишущий эти строки никогда не мог понять

зрачных вытяжках из тканей. В первом случае обмен газов гораздо значительнее, чем в последнем. В живом организме оба процесса идут рядом, но после его смерти главное дыхание в тканях более или менее быстро исчезает, побочное сохраняется довольно долго. Высокая температура совершенно останавливает дыхание тканей, яды более или менее уменьшают его. Бателли и сотр. приписывают главному дыханию первенствующую роль в дыхании живого организма. Они считают, что окисления в побочном дыхании производятся оксидазами, уже известными нам; что же касается главного дыхания, они не высказываются определенно. Они нашли, что главное дыхание обуславливается наличием двух факторов: растворимого вещества, которое они назвали *пнеином*, и нерастворимого, неразрывно связанного с анатомическими элементами, которому они дали название «*основного дыхательного процесса*» (?)\*. Пнеин легко растворим в воде, меньше в спирте, легко диализирует, не разрушается при кипячении. «Основной дыхательный процесс», напротив того, очень неустойчив. Если мелко растертый мускул, например, обработать водою и отфильтровать, то в фильтрате получается пнеин, а «основной дыхательный процесс» удерживается нерастворимым осадком. Взятые отдельно фильтрат и осадок не обладают способностью дыхания, т. е. не поглощают кислород и не выделяют углекислоту; взятые вместе они показывают все особенности главного дыхания. В механизме главного дыхания «основной дыхательный процесс» играет главнейшую роль, пнеин же фигурирует только как активатор. По словам Бателли и сотр., пнеин не разрушается в процессе дыхания. Мы поэтому имеем здесь дело с катализатором, который ускоряет окисление вещества тканей «основным дыхательным процессом», подобно тому как соли металлов ускоряют окисление, производимое оксигеназой.

Из приведенных данных вытекает, что как растительные, так и животные ткани обладают способностью *post mortem* в большей или меньшей степени поглощать кислород и выделять углекислоту. В них некоторое время после смерти продолжают те окислительные процессы, которые характеризуют живой организм и которые искусственно посредством известных нам окислительных ферментов произведены быть не могут. Насколько можно судить по имеющимся данным, посмертное дыхание тканей носит ферментативный характер. Но участвуют ли в нем новые, еще не известные нам окислительные ферменты, или же не умершие еще ткани содержат ферменты, превращающие сахара и пр. в продукты, на которые могут действовать знакомые нам окислительные ферменты, остается пока открытым вопросом.

б) Что во всяком случае пищевые вещества распадаются в организме *постепенно*, что еще до своего окисления они претерпевают ряд существенных превращений, не подлежит никакому сомнению. Пример этому мы уже видели в распаде нуклеопротеидов.

Теперь мы рассмотрим поближе данные о распаде сахара в организме.

Возможность превращения сахара в углекислоту *без содействия кислорода* наглядно доказывается спиртовым брожением, которым физиологи занимались уже в конце XVIII в. Но до 70-х годов прошлого столетия оно считалось как бы исключительным, ненормальным явлением. В 1869 г. Лешателье и Беллами<sup>94</sup> показали, что в фруктах, сохраняемых в свободной от кислорода атмосфере, образуется спирт, а Пастер подтвердил это наблюдение и высказал мнение, что процесс образования спирта в плодах тождествен со спиртовым брожением сахара, вызываемым дрожжами. Вскоре после этого Пфлюгер<sup>95</sup> подверг основательному исследованию

\* Название это крайне неудачно, ибо вещество не может быть названо *п р о ц е с с о м*.

вопрос о продолжении жизни животного в бескислородной атмосфере и нашел, что первое время после отнятия кислорода выделение углекислоты держится на той же высоте, как и при жизни на воздухе. Отсюда он сделал заключение, что образование и выделение углекислоты вовсе не связаны непосредственно с поглощением кислорода. Но о параллелизме этого процесса со спиртовым брожением он не подумал. Тем временем ботаники продолжали исследования в том же направлении и все больше склонялись к мысли, что выделение углекислоты в отсутствие кислорода связано со спиртовым брожением. В 1878 г. Пфеффер<sup>96</sup> обобщил имевшиеся наблюдения и высказал мысль, что первичным актом дыхания — актом, предшествующим окислению, является реакция распада сахара, тождественная со спиртовым брожением. Так как этот первичный акт совершается без содействия кислорода, то Пфеффер назвал его *интрамолекулярным дыханием*. Обобщение Пфеффера послужило темой для многочисленных исследований, среди которых первенствующее значение бесспорно имеют новейшие работы С. Костычева<sup>97</sup> и В. Палладина (1. с.). Не имея возможности войти здесь в рассмотрение даже главнейших из этих исследований, я ограничусь указанием на то, что современное положение вопроса об интрамолекулярном, или анаэробном, дыхании можно резюмировать следующими словами Костычева: «очень вероятно, что анаэробное дыхание тождественно со спиртовым брожением во всех тех случаях, где дыхание происходит на счет углеводов». Надо ли понимать это так, что первой стадией распада сахара в живой клетке является его превращение в спирт и угольный ангидрид? Уже Годлевский<sup>98</sup> высказал мысль, что при доступе кислорода те атомные группы, которые образуются при действии зимазы на сахар, еще до соединения их в спирт окисляются кислородом или же утилизируются как строительный материал для клетки. Пфеффер<sup>99</sup> тоже говорит, что при аэробном дыхании спирт вовсе не является неизменной стадией распада сахара, что образование спирта входит в цепь реакции, которая при полном удовлетворении потребности клетки в кислороде может совершенно выпасть. Работы Костычева и Палладина дали солидное экспериментальное обоснование этим взглядам, и теперь благодаря им можно считать доказанным: 1) что прологом окисления сахара в клетке является его распад в *направлении* спиртового брожения и 2) что при наличии кислорода и, как указал Палладин, соответствующих окислительных ферментов промежуточные продукты распада подвергаются окислению раньше их превращения в спирт. В зависимости от отношения между скоростью первичного распада и скоростью окисления спирт при этом может образоваться в больших или меньших количествах или же совсем не образоваться.

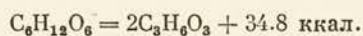
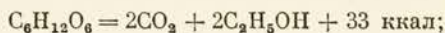
Это можно считать экспериментально доказанным для растительного организма. Для животного организма такой процесс можно принять пока только по аналогии. Наделавшие много шума несколько лет тому назад исследования Стоклязы<sup>100</sup> над нахождением зимазы в животных тканях, т. е. над их способностью быстро превращать сахар в спирт и углекислоту, не подтвердились.

Теперь встает дальнейший вопрос: каковы эти промежуточные продукты распада сахара, могущие дать углекислоту и спирт? Вопрос этот далеко еще не выяснен. Больше всего сторонников имеет взгляд, высказанный на этот счет Водем<sup>101</sup>. По его гипотезе, молекула глюкозы распадается на метилглиоксаль  $\text{CH}_3 \cdot \text{CO} \cdot \text{CHO}$  [вернее, его гидрат  $\text{CH}_3 \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}(\text{OH})_2$ ] и глицериновый альдегид  $\text{CH}_2(\text{OH}) \cdot \text{CH}(\text{OH}) \cdot \text{CHO}$ , которые затем превращаются в молочную кислоту  $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}(\text{OH}) \cdot \text{COOH}$ . Против этого предположения выдвигают тот факт, что ни метилглиоксаль, ни глицериновый альдегид, ни молочная кислота дрожжами в спирт и углекислоту



не превращаются. Но на это Воль возражает, что вся теплота, которая выделяется при распаде молекулы глюкозы, для дрожжей совершенно теряется, когда им дают вместо глюкозы готовые продукты ее распада.

По сравнению с распадом глюкозы на спирт и углекислоту распад ее на две молекулы молочной кислоты дает на 1.8 ккал больше:



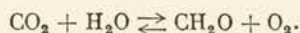
Из этого видно, что из разложения молочной кислоты на спирт и угольный ангидрид дрожжи не только не могли бы извлечь для себя энергии в виде теплоты, но еще должны были бы затратить на это разложение запас собственной энергии в размере 1.8 ккал. По этой причине они молочной кислоты и не разлагают.

Шаде<sup>102</sup> полагает, что молочная кислота образуется только в специальных условиях; в спиртовом же брожении первичный продукт, из которого она образуется, или она сама в момент образования подвергаются разложению на спирт и углекислоту. Иенсен<sup>103</sup> считает первичным продуктом распада глюкозы диоксиацетон  $CH_2(OH) \cdot CO \cdot CH_2(OH)$ , который дрожжами легко превращается в спирт и углекислоту.

Что касается вопроса о том, могут ли известные нам окислительные ферменты окислять предполагаемые продукты распада сахара или для этого требуется содействие еще не известных нам оксидаз, то дать теперь на него определенный ответ нет возможности. Если наши окислительные ферменты и не окисляют молочную кислоту или диоксиацетон, то это еще не значит, что они не в состоянии окислять эти вещества *in statu nascendi*, т. е. в момент распада глюкозы.

Оригинальную и заслуживающую серьезного внимания постановку вопроса о распаде сахара в организме дал В. Леб<sup>104</sup>. Он исходит из того положения, что синтез сахара представляет собою *обратимую реакцию*. С той же легкостью, с какою сахар образуется путем полимеризации простейших углеводов: муравьиного альдегида, гликолевого альдегида, глицеринового альдегида, диоксиацетона, — он *деполимеризуется* в организме, давая, судя по обстоятельствам, тот или другой из указанных продуктов. Леб показал, что деполимеризация глюкозы может также носить *постепенный* характер, так как ему удалось отщепить от глюкозы муравьиный альдегид и превратить ее в пентозу.

Таким образом, Леб, по моему мнению, в высшей степени удачно обобщает факты, касающиеся распада сахара, подводя их под учение об обратимости реакций. По существу, весь биохимический круговорот углерода сводится к обратимой реакции:



Под влиянием солнечных лучей хлорофильные растения превращают угольный ангидрид и воду в простейший углевод — муравьиный альдегид и свободный кислород, а углеводы и кислород дают угольный ангидрид и воду. Поэтому деполимеризация углеводов до их окисления кажется очень вероятной.

Вопроса о так называемом «гликолизе», т. е. исчезновении сахара в соотношении с животными тканями и кровью, я здесь касаться не буду, с одной стороны, ввиду его крайней спорности и неясности, с другой — ввиду второстепенности интереса, который он представляет с точки зрения физиологической роли окислительных ферментов.

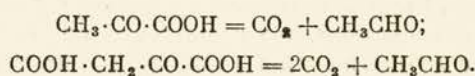
Гликолиз, если он и имеет действительно место, не является окислительным процессом, — об этом уже не спорят, — и совпадает, по всей

вероятности, с одной из тех форм первичного распада сахара, о которых речь была выше.

в) Обратимся теперь к третьему предположению — возможности гидролитического окисления тех физиологически важных веществ, которые известными нам окислительными ферментами не окисляются.

Как указано выше (стр. 90), пергидридаза ускоряет окисление альдегидов в кислоты, перенося водород воды на способные к восстановлению вещества. Это до сих пор едва ли не единственный пример гидролитического окисления при содействии фермента таких веществ, которые известными нам окислительными ферментами не окисляются. Это окисление альдегидов приобретает особое значение, если принять в соображение штрекеровскую реакцию (стр. 63), которая дает такой легкий переход от аминокислот к альдегидам. Что нормальный гидролиз белков ведет к сравнительно простым аминокислотам, как гликоколь, аланин, лейцин, тирозин и т. д., — теперь установленный факт. Но эти продукты распада белков отличаются большой устойчивостью по отношению к кислороду и, если не считать поверхностного окисления тирозина тирозиназой, окислительными ферментами не окисляются. И эти устойчивые по отношению к свободному кислороду и окислительным ферментам аминокислоты чрезвычайно легко окисляются гидролитически в альдегиды с отщеплением угольного ангидрида и аммиака. Если удастся доказать, что в организме гидролитическое окисление аминокислот идет с такой же легкостью, как *in vitro*, а это более чем вероятно, тогда мы будем иметь почти полную картину распада белков — распада, который через аминокислоты и соответствующие альдегиды ведет к жирным кислотам низшего ряда. А что животные ткани обладают способностью окислять посредством свободного кислорода жирные кислоты, — было доказано Бателли и сотр.<sup>105</sup>

По той же линии идет сделанное недавно Нейбергом<sup>106</sup> весьма интересное открытие, что дрожжи обладают способностью легко разлагать некоторые кетоокислоты, как оксалукусная и пировиноградная на угольный ангидрид и альдегид:



Брожение идет настолько гладко, что Нейберг употребляет его для демонстрации на лекциях. Он называет *карбоксилазой* фермент, под действием которого протекает разложение этих кетоокислот.

В связи с вопросом о гидролитическом окислении аминокислот и альдегидов следует упомянуть о гипотезе, высказанной В. Палладиным<sup>107</sup> о роли растительных хромогенов в процессах дыхания. Основываясь на том, что хромогены очень распространены в растительном царстве и что они представляют собою легкоокисляемые вещества, дающие после своего окисления окрашенные соединения, Палладин пытался установить аналогию между ними и пигментами крови. Подобно тому как гемоглобин крови поглощает свободный кислород и разносит его по тканям, так и хромогены, окисляясь на воздухе в пигменты, доставляют кислород в глубину тканей. Эта аналогия дает Палладину повод говорить о «крови» растений, и в ознаменование ее он предлагает назвать дыхательные пигменты растений *фитогематинами*. Уже до него некоторые исследователи (Фарион, Ленднер) указали на то, что хромогены растений, окисляясь на воздухе, дают перекиси, которые утилизируются затем пероксидазами для окислений. Другими словами, хромогены заменяют оксигеназы. Палладин же полагает, что и оксидазы поглощают молекулярный кислород и переносят

его на дыхательные хромогены. Поэтому высказываемая им дальше мысль, что «вместо гипотетической оксигеназы» Шода и Баха «мы должны признать участие дыхательных хромогенов в процессах дыхания», лишена всякого основания. Если хромогены окисляются оксидазами, то они не могут быть оксигеназами, т. е. веществами, образующими перекиси для действия оксидаз.

Затем, как уже заметил Бах, устанавливаемая Палладиным параллель между кровью животных и «кровью» растений не идет далеко, так как по своему химическому характеру и роду соединений с кислородом пигменты крови резко отличаются от растительных пигментов. Наконец, с той точки зрения, на которую стал Палладин (хромогены — оксигеназы), непонятной кажется его мысль о том, что у окисленного хромогена, являющегося резервуаром кислорода, его запас кислорода отнимается редуктазами. Но неясная на первый взгляд гипотеза Палладины приобретает большой интерес, если применить ее к *гидролитическим окислениям*. Хромогены большей частью состоят из фенолов, которые оксидазами окисляются в хиноны. А по исследованиям В. Траубе, реакцию Штрекера, т. е. гидролитическое окисление аминокислот, дают, помимо аллоксана, изатин и *бензохинон*, т. е. продукт окисления гидрохинона фенолазой. Поэтому вполне возможно, что функция хромогенов, между прочим, состоит и в том, что, окисляясь под действием оксидаз, они образуют те *способные к восстановлению вещества*, без которых *никакое гидролитическое окисление не может происходить*. С этой точки зрения, и *только с этой*, мысль Палладины об участии редуктазы (мы теперь скажем: пергидридазы) в отнятии кислорода у пигментов приобретает не только вполне определенный, но и глубокий смысл; окисляемое вещество присоединяет к себе гидроксил воды, а хинон при посредстве пергидридазы присоединяет к себе водород и превращается в гидрохинон, который опять может быть окислен фенолазой.

Мне остается сказать несколько слов об общебиологическом значении гидролитических окислительно-восстановительных процессов.

Давно известно, что протоплазма клеток обладает сильно восстановительными свойствами, тогда как ядро дает реакцию окисления. В самое последнее время П. В. Унна<sup>108</sup> в сотрудничестве с Л. Голодцом выработали прекрасный метод тинкториального анализа, дающий возможность точно и ясно установить, какие части тканей обладают окислительными и какие восстановительными свойствами. Не входя в рассмотрение чрезвычайно интересных наблюдений, которые они сделали, я укажу только на то, что они с полной очевидностью установили на первый взгляд парадоксальный факт: протоплазма, которая находится в соприкосновении с кислородом, редуцирует; ядро же, которое плотно окружено редуцирующей, а потому жадной к кислороду протоплазмой, обнаруживает окислительные свойства. Тут, повидимому, представляется двойное противоречие: протоплазма, имеющая возможность легко окисляться за счет кислорода, не должна была бы обладать редуцирующими свойствами, ядро же, лишенное всякого доступа кислорода, не должно было бы действовать окислительно. Унна пытается объяснить окислительные свойства ядра гипотезой, по которой кислород проносится через протоплазму к ядру, причем в этом процессе важную роль играет каталаза. Если даже допустить это, то все-таки редуцирующие свойства протоплазмы, сохранение которых требует непрерывного источника водорода *in statu nascendi*, остаются необъясненными.

Это двойное противоречие вполне исчезает, и вся совокупность указанных явлений получает очень простое объяснение, если только допустить, что *ядро производит приписываемые ему окисления не посредством свободного кислорода, а гидролитически, — за счет кислорода воды, водород же*

последней передается посредством пергидридазы окружающей протоплазме и обуславливает в ней образование сильно редуцирующих тел. В соприкосновении с кислородом эти сильно редуцирующие, легкоокисляемые тела, функционируя отчасти как оксигеназы, дают перекиси, которыми при посредстве пероксидазы окисляются подлежащие окислению составные части протоплазмы. Если доступ кислорода к клетке прекращается, то редуцирующие вещества накапливаются в протоплазме, устанавливается равновесие, в силу которого гидролитическое окисление в ядре прекращается и клетки «задыхаются». Таким образом, в этом процессе гидролитического окисления кислород функционирует как деполаризатор, выводящий из круга реакции один из элементов ее — водород — и тем препятствующий установлению равновесия. При полном анаэробизме, при котором все процессы окисления протекают гидролитически, устранение водорода становится вопросом жизни и смерти для клетки. К этому положению клетка приспособилась тем, что выработала механизм, дающий ей возможность выделять водород в свободном состоянии в качестве отброса дыхательного процесса. Пример этому мы видим в масляном брожении сахара, в водородном брожении муравьиной кислоты. В метановом брожении уксусной кислоты та же цель достигается тем, что водород восстанавливает метил  $\text{CH}_3$  в метан, который выделяется в газообразном состоянии. Очень вероятно, что механизм, посредством которого производится выделение свободного водорода, подобен тому, который лежит в основе разложения перекиси водорода на свободный кислород и воду. В последнем случае деятельным фактором является пероксид-каталаза, антагонист пероксидазы. Возможно, что в первом случае мы имеем дело с пергидрид-каталазой, антагонистом пергидридазы.

Мы видим, таким образом, что допущение гидролитических окислений в ядре клетки уясняет целый цикл явлений, которые иначе остаются для нас совершенно непонятными.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наши представления о сущности дыхательных процессов тесно и неразрывно связаны с познанием сущности процессов медленного сгорания вообще. До тех пор пока взгляды на химизм процессов последнего рода не соответствовали действительности, более сложные процессы дыхания неизбежно должны были казаться нам совершенно необъяснимыми и значительной своей частью выходящими за пределы известных нам законов химии и физики. Отсюда целый ряд виталистических объяснений дыхательных процессов. Но как только химическая сущность медленного сгорания оказалась выясненной, область биологического медленного сгорания, область дыхания, сразу осветилась ярким светом. Теория медленного сгорания, выработанная одновременно Бахом и Энглером и с самого же начала развитая Бахом применительно к физиологическим процессам, не только оказалась применимой к области дыхания, но и дала объяснение целому ряду физиологических наблюдений, которые вне ее казались необъяснимыми.

При современном состоянии наших знаний мы можем представить себе сущность дыхательных процессов следующим образом.

Всюду, где свободный кислород встречается со способными к окислению веществами, первичными продуктами окисления являются перекиси, которые во многих случаях дают с водой соответствующие окиси и перекись водорода. Последняя может также образоваться прямым окислением водорода *in statu nascendi*. Таким образом, первичное образование перекисей является постоянным фактором, который живая клетка изме-

нить не может и к которому поэтому она должна приспособиться. Приспособление ее в этой области выражается тройким образом.

I. Клетки производят легкоокисляемые вещества, имеющие свойства ферментов, — оксигеназы, которые присоединяют к себе молекулярный кислород с образованием перекиси и отдают половину его в активном состоянии окисляемым телам (стр. 59—60). Оксигеназы в большинстве случаев действуют *специфически*, т. е. из всякой оксигеназы образуется присоединением кислорода перекись, которая может отдать свой активный кислород только определенному комплексу атомов. Специфичность эту мы видели при тирозиназе (стр. 76) и при пуриноксидазах (стр. 79). Напротив того, в фенолазе (стр. 73 и сл.) оксигеназа может быть заменена любым легкоокисляемым веществом или готовой перекисью.

II. Окислительное действие перекисей, которые образуются из оксигеназ, может быть ускорено солями металлов, точно так же как соли закиси железа ускоряют окислительное действие перекиси водорода. В дополнение или в замену этих солей клетка производит особые ферменты — пероксидазы, которые в высокой степени ускоряют действие перекисей. Следует, однако, отметить, что до сих пор найдено всего две пероксидазы: одна из них соответствует фенолазе и в соединении с перекисями дает те же реакции окисления, что и последняя (стр. 81); другая окисляет при посредстве перекисей муравьиную кислоту в угольный ангидрид и воду (стр. 84). Состоят ли и остальные оксидазы из системы «пероксидаза — оксигеназа» или из системы «соль металла — оксигеназа», остается пока открытым.

III. Образующиеся *первичные* перекиси легко дают с водою перекись водорода, которая может также образоваться непосредственно и вследствие ее большой способности к диффузии действовать разрушительно на особо чувствительные части протоплазмы.

Чтобы предотвратить эту опасность, клетка производит настоящий защитный фермент — *каталазу*, которая с большой энергией разлагает перекись водорода на воду и инертный кислород. В высшей степени замечательно, однако, то, что в присутствии окисляемого субстрата происходит *распределение перекиси между пероксидазой и каталазой*. Поэтому каталаза вовсе не препятствует утилизации перекиси водорода пероксидазой, — она только функционирует как *регулятор* окислительных процессов.

Медленное сгорание происходит не только при посредстве *свободного* кислорода, но и при посредстве *связанного* кислорода воды. И тут мы находим, что клетка производит особый фермент — *пергидридазу*, который также ускоряет окислительно-восстановительные процессы, основанные на разложении воды, как палладий ускоряет окисление фосфорноватистой кислоты или одновременное восстановление метиленовой сини и окисление альдегидов *за счет* воды (стр. 64).

Само собою разумеется, указанные представления относительно химизма дыхательных процессов в значительной своей части являются гипотезой. Но не следует упускать из вида, что даже наиболее солидно обоснованные теории являются только *методологическим приемом*, который дает возможность классифицировать явления и выяснять дальнейшую связь между ними. В этом отношении гипотеза, которая, как мне кажется, является логическим выводом из современного положения наших знаний, вполне стоит на высоте положения: она не только помогает нам разобраться в бесчисленном множестве явлений, из которых слагаются дыхательные процессы, но и открывает широкое поле — не для метафизических спекулятивных рассуждений, а для экспериментальной работы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Berthelot. Ann. Chim. Phys., 46 (1880).
2. Baeyer u. Villiger. Ber. Dtsch. chem. Ges., 33, 2491 (1900).
3. Clausius. Pogg. Ann., 103, 644.
4. Clausius. Pogg. Ann., 121, 250, 330.
5. Van't Hoff. Zs. physik. Chem., 16, 411 (1895); Verh. Frankf. Naturforsch., 11, 107 (1897).
6. Hoppe-Seyler. Zs. physiol. Chem., 2, 1 (1878—1879).
7. Traube Moritz. Ber. Dtsch. chem. Ges., 15, 659, 2421 (1882); 18, 1877, 1890, 1894 (1885).
8. Бах. О роли перекисей в процессах медленного окисления.— ЖРФХО, 29, 373 (1897). [Du rôle des peroxydes dans les phénomènes d'oxydation lente].— C. R. Acad. Sci., Paris, 124, 951 (3 мая 1897); Mon. Sci., 11, 479 (1897); настоящая книга, стр. 242.
9. Engler u. Wild. Ueber die sogenannte Aktivierung des Sauerstoffes und über Superoxydbildung.— Ber. Dtsch. chem. Ges., 30, 1669 (1897); Engler u. Weissberg. Kritische Studien über die Vorgänge d. Autoxydation (1904). Braunschweig.
10. Ostwald. Zs. physiol. Chem., 34, 248 (1900).
11. Engler u. Weissberg. Kritische Studien über die Vorgänge d. Autoxydation (1904), Braunschweig.
12. Engler u. Weissberg. L. c.
13. Engel. C. R. Acad. Sci., Paris, 110, 786 (1890).
14. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., 42, 4463 (1909); настоящая книга, стр. 295.
15. Bredig u. Sommer. Zs. physiol. Chem., 70, 34 (1909).
16. Streckker. Lieb. Ann., 123, 363 (1862).
17. Traube. Ber. Dtsch. chem. Ges., 41, 3145 (1911).
18. Ostwald. «Ueber Katalyse» (1902).— Zs. physik. Chem., 15, 399 (1894).
19. Bredig. Zs. Elektrochem., 9, 735 (1903).
20. Luther u. Schilow. Zs. physik. Chem., 16, 177 (1903).
21. Engler u. Herzog. Zs. physiol. Chem. 59, 327 (1909).
22. Sieverts. Zs. anorg. Chem., 64, 29 (1909).
23. Бах. Biochem. Zs., 31, 443 (1911). Arch. Sci. phys. nat., 22, 27 (1911); настоящая книга, стр. 490.
24. Paal u. Gerum. Ber. Dtsch. chem. Ges., 41, 805 (1908).
25. Зелинский. Ber. Dtsch. chem. Ges., 44, 2307 (1911).
26. Rehmann u. Spitzer. Ber. Dtsch. chem. Ges., 28, 567 (1895).
27. Bertrand. C. R. Acad. Sci., Paris, 120, 266; 121, 166 (1895); Bull. Soc. Chim., 15, 795; Ann. Chem. Phys., 12, 115 (1897).
28. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., 43, 362 (1910); настоящая книга, стр. 439.
29. Bertrand. C. R. Acad. Sci., Paris, 124, 124, 1335 (1907). Ann. Inst. Pasteur, 21, 673 (1907).
30. Бах совм. со Збарским. Biochem. Zs., 34, 473 (1911); настоящая книга, стр. 490.
31. Pfeffer. «Pflanzenphysiologie».
32. Бах совм. с Шода. Ber. Dtsch. chem. Ges., 35, 2466 (1902); настоящая книга, стр. 344.
33. Бах совм. с Шода. Ber. Dtsch. chem. Ges., 36, 606 (1902); настоящая книга, стр. 353.
34. Bourquelot et Bertrand. J. Pharm. Chim., 3, 177 (1896).
35. Biedermann. Pflüg Arch., 72, 105 (1898).
36. Gessard. Soc. Biol., 55, 637 (1903).
37. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., 39, 2126 (1906); 41, 216 (1908); настоящая книга, стр. 404, 419.
38. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., 42, 594 (1909); настоящая книга, стр. 433.
39. Gessard. C. R. Acad. Sci., Paris, 57, 285 (1904).
40. Buchner. Ber. Dtsch. chem. Ges., 36, 634 (1903).
41. Buchner u. Hahn. Zymasegärung (1903).
42. Battelli u. a. Biochem. Zs., 28, 145 (1910).
43. Schmiedeberg. Arch. Pathol., 14, 288 (1881).
44. Jacquet. Arch. Pathol., 29, 386 (1892).
45. Jacoby. Virchows Arch., 157, 235 (1899).
46. Abelous et Biarnés. Arch. int. Physiol., 1, 195 (1895).
47. Медведев. Pflüg Arch., 65, 249 (1897); 74, 193 (1899).
48. Abelous et Aloy. Soc. Biol., 891 (1903).
49. Van Duuren. Bull. Acad. Roy. Belg., 537 (1907).
50. Бах. Biochem. Cbl., 9 (1909); настоящая книга, стр. 26.
51. Battelli u. a. Biochem. Zs., 29, 130 (1910).

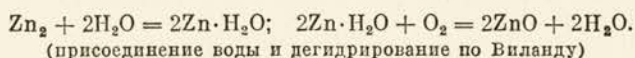
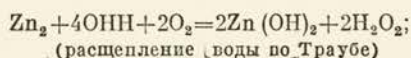
52. Schittenhelm. Zs. physiol. Chem., **46**, 354 (1905).
53. Burion. Zs. physiol. Chem., **43**, 497 (1905).
54. Löw. Catalase.— U. S. Dept. Agric. Rep., **68**, (1901).
55. Бах совм. с Шода. Ber. Dtsch. chem. Ges., **36**, 600 (1903); настоящая книга, стр. 349.
56. Бах совм. с Черняком. Ber. Dtsch. chem. Ges., **41**, 2345 (1908); настоящая книга, стр. 429.
57. Fürth V. u. Czuhlartz. Beitr. chem. Physiol. u. Pathol., **10**, 358 (1907).
58. Бах совм. с Шода. Ber. Dtsch. chem. Ges., **36**, 1756 (1903); настоящая книга, стр. 356.
59. Battelli u. a. C. R. Acad. Sci., Paris, **138**, 651 (1904); Biochem. Zs., **13**, 44 (1908).
60. Kroftan. Pflüg. Arch., **121**, 377 (1908).
61. Battelli u. a. C. R. Acad. Sci., Paris, **138**, 923 (1905).
62. Bregid. «Anorganische Fermente» (1901).
63. Schönbein. J. prakt. Chem., **84**, 193 (1861); Zs. Eiol., **3**, 140.
64. Rey-Pailhad. C. R. Acad. Sci., Paris, **106** (1883); **107**, 43, 190 (1880) и ряд других статей там же.
65. Abelour et Ribot. C. R. Acad. Sci., Paris, **137**, 95, 268 (1903).
66. Abelaus et Gérard. C. R. Acad. Sci., Paris, **129**, 1023; **130**, 420 (1900).
67. Heffter A. Hofm. Beitr., **5**, 213 (1904); Arch. exp. Pathol. u. Pharm. **253** (1908).
68. Kastle a. Elvove. Amer. Chem. J., **31**, 606 (1904).
69. Schardinger. Zs. Unters. Nahr.- u. Genussm., **5**, 22 (1902). Chem. Ztg., **28**, 704 (1904).
70. Tromsdorf. Cbl. Bacteriol., **49**, 291 (1909).
71. Бах. Biochem. Zs., **33**, 282 (1911); настоящая книга, стр. 394.
72. Бах. Biochem. Zs., **38**, 154 (1912); настоящая книга, стр. 501.
73. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., **37**, 3785 (1904); настоящая книга, стр. 378.
74. Словцов. Zs. physiol. Chem., **31**, 227 (1900).
75. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., **41**, 221 (1908); настоящая книга, стр. 423.
76. Бах совм. с Шода. Ber. Dtsch. chem. Ges., **37**, 2434 (1904); настоящая книга, стр. 370.
77. Vernon. J. Physiol., **42**, 402 (1911).
78. Sarthou. J. Pharm. Chim., **1**, 1120 (1907).
79. Словцов. Zs. physik. Chem., **31**, 227 (1900).
80. Исаев. Zs. physiol. Chem., **45**, 331 (1905).
81. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., **43**, 364 (1910); настоящая книга, стр. 441.
82. Cessard. C. R. Acad. Sci., Paris, **138**, 774 (1904).
83. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., **43**, 366 (1910); настоящая книга, стр. 443.
84. Trillat. C. R. Acad. Sci., Paris, **138**, 274 (1904).
85. Donу-Нéнаult. Bull. Acad. Roy. Belg., **105** (1908).
86. Wolff. C. R. Acad. Sci., Paris, **147**, 745 (1908).
87. Traube. Ber. Dtsch. chem. Ges., **10**, 1984 (1877).
88. Spitzer. Pflüg. Arch., **67**, 615 (1897).
89. Loeber. Arch. Entw. Mechanik d. Organismen, **8**, 689 (1899).
90. Portier. «Les oxydases de la série animale» (Диссертация).
91. Schmittenhalm u. Bendics. Zs. physiol. Chem., **43**, 365 (1904).
92. Палладин. Zs. physiol. Chem., **47**, 407 (1906); Зап. Акад. Наук, **20**, 5 (1907); Изв. Акад. Наук, **459**, (1909).
93. Battelli u. a. J. Physiol. et Pathol., **1**, 5 (1907); Biochem. Zs., **21**, 487 (1909); **13**, 315 (1911).
94. Lechâtelier et Bellamy. C. R. Acad. Sci., Paris, **69**, 466 (1869).
95. Pflüger. Pflüg. Arch., **10**, 300 (1875).
96. Pfeffer. Landw. Jb., **7**, 807 (1878).
97. Костычев. Biochem. Zs., **15**, 164; **23**, 137 (1909).
98. Godlewski. Bull. Acad. Sci., Cracovie, **115** (1904).
99. Pfeffer. «Pflanzenphysiologie», 2-е изд., I, 555 (1907).
100. Stoklasa. Ber. Dtsch. chem. Ges., **36**, 622 (1903).
101. Wohl. Biochem. Zs., **V**, 45 (1907).
102. Schade. Zs. physik. Chem., **57**, (1906).
103. Jensen. Ber. Dtsch. chem. Ges., **26**, 606 (1907).
104. Löb. Biochem. Zs., **29**, 316 (1910).
105. Battelli u. a. Biochem. Zs., **30**, 172 (1910); **31**, 478 (1911).
106. Neuberger. Ber. Dtsch. chem. Ges., **44**, 2472 (1911); Biochem. Zs., **31**, 170; **32**, 323 (1911).
107. Палладин. Изв. Акад. Наук, **447** (1908); Zs. physiol. Chem., **55**, 207 (1908).
108. Унна Р. Arch. mikroskop. Anat., **78**, 1 (1911).

## О МЕХАНИЗМЕ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ

[*Über den Mechanismus der Oxydationsvorgänge*]\*

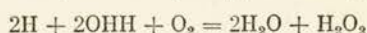
Под этим названием Виланд<sup>1</sup> опубликовал в последнем номере «*Berichte*» статью, в которой он развивает полную теорию окислительных явлений. Я позволю себе сделать по поводу этой интересной работы несколько замечаний, которые могут способствовать дальнейшим исследованиям в этой области.

1. В основе теории Виланда лежит мысль Траубе об участии воды в каждом окислительном процессе. Однако в то время как, согласно Траубе, окисление происходит вследствие расщепления воды с присоединением гидроксила к окисляемому веществу и окисления освобождающегося водорода молекулярным кислородом с образованием перекиси водорода, Виланд рассматривает этот процесс как присоединение воды с последующим отщеплением водорода. Так, например, окисление цинка выражается следующими уравнениями:



2. Против представлений Виланда я прежде всего выдвигаю принципиальное возражение, что в них не учитывается теория электролитической диссоциации и, следовательно, современные взгляды на сущность химических реакций. Рассмотрим простой случай окисления какого-нибудь вещества за счет воды, например расщепление воды щелочными металлами. Согласно теории электролитической диссоциации, реакция происходит следующим образом: щелочной металл образует с гидроксильными ионами воды, имеющимися в последней в минимальном количестве вместе с водородными ионами, гидроокись щелочного металла. Этим нарушается равновесие в воде, и происходит дальнейшая диссоциация с освобождением водорода в количестве, эквивалентном потребленным ионам  $\text{ОН}'$ . Согласно Виланду, сначала происходит присоединение воды к щелочному металлу, а затем уже продукт присоединения дегидрируется. Как надо себе представить более детально механизм этой реакции — не ясно.

3. Следующей принципиальной трудностью, являющейся препятствием к обобщению взглядов как Траубе, так и Виланда, является окисление водорода *in statu nascendi*. Если применить схему Траубе к окислению водорода *in statu nascendi*, то это приводит к абсурду, так как из реакции:



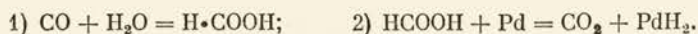
\* *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **46**, 3864 (1913).



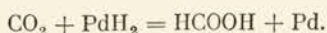
вытекает, что молекулярный кислород легче окисляет водород воды, чем водород *in statu nascendi*, и что последний вытесняет водород из воды. То же самое происходит и по отношению к схеме Виланда. Поэтому надо допустить, как это в конце концов делает Траубе, что водород может соединяться с молекулярным кислородом без посредства воды. Если это так, то нельзя не допустить возможности непосредственного окисления свободным кислородом и для других ненасыщенных соединений.

4. Образование перекисей, всегда сопровождающее, как это установлено бесчисленными опытами, медленное сгорание, совершенно не принимается во внимание Виландом в его концепциях. Конечно, можно предположить, что перекиси являются в этом случае не первичными продуктами окисления, а только вторичными, образующимися в результате действия перекиси водорода (из водорода, выделяющегося при дегидрировании, и молекулярного кислорода) на окисляемое вещество. Во многих случаях вопрос этот не удастся разрешить окончательно. Существуют, однако, окислительные реакции, для объяснения которых представления Виланда совершенно непригодны. В частности, это имеет место для окисления трифенилметила. Как известно, последний быстро окисляется в сухом бензольном растворе в присутствии воздуха и образует количественно перекись трифенилметила  $(C_6H_5)_3COOC(C_6H_5)_3$ . Если считать, что и в этом случае следы воды оказывают каталитическое действие, то нельзя себе составить ясного представления о присоединении воды, последующем дегидрировании молекулярным кислородом и заключительном превращении продукта окисления в перекись трифенилметила. Присоединение воды к трифенилметилу можно представить себе только таким образом, что одна молекула окисляется гидроксилом воды, образуя трифенилкарбинол, в то время как другая восстанавливается водородом в трифенилметан. Из этих соединений не может, однако, получиться быстро и количественно перекись трифенилметила ни под действием кислорода, ни под действием перекиси водорода. В противоположность этому, предложенная мною перекисная теория медленного сгорания дает совершенно ясную и однозначную картину окисления трифенилметила.

5. Виланд обосновывает свою теорию рядом опытов, которые сами по себе чрезвычайно интересны. Однако их можно объяснить не только теорией Виланда, но также и принятыми в настоящее время представлениями об окислительно-восстановительных реакциях, основанных на расщеплении воды. Возьмем, например, открытое Виландом окисление окиси углерода водой в присутствии палладия:



Он объясняет эту реакцию тем, что окись углерода присоединяет под влиянием палладия воду с образованием муравьиной кислоты и что последняя затем дегидрируется палладием до углекислоты. Мое объяснение проще: окись углерода присоединяет гидроксил, в то время как палладий играет роль акцептора для соответственного количества водорода. Что оба эти объяснения по меньшей мере одинаково обоснованы, кажется мне очевидным. Виланд считает подтверждением правильности своих взглядов тот факт, что ему удалось доказать образование муравьиной кислоты в реагирующей смеси. Однако еще неизвестно, является ли здесь муравьиная кислота действительно промежуточным продуктом, а не побочным. Вполне допустимо, что муравьиная кислота является продуктом восстановления образовавшейся углекислоты:



Это являлось бы вполне допустимым обращением второго уравнения Виланда.

6. Виланд переносит свою теорию дегидрирования и в область биологических окислительных процессов. Он рассматривает окислительные и восстановительные ферменты как дегидразы и высказывает предположение, что их действие не имеет ничего общего с активацией кислорода. Ему удалось в случае большинства субстратов, на которые действуют оксидазы (за исключением тирозина и мочевой кислоты), достигнуть типичного окисления посредством палладия и в отсутствии кислорода. Эти опыты показывают, что окисляемые в данном случае вещества способны окисляться не только свободным кислородом, но и за счет воды в присутствии акцепторов водорода. Из этого, однако, совершенно не вытекает, что оксидазы могут вызывать те же самые окисления в отсутствии кислорода.

Для обоснования этого предположения необходимо провести со всей строгостью опыты с окислительными ферментами (фенолазой, тирозиназой, пероксидазой) в настоящее время более подробно изученными и легко изолируемыми. Виланд установил интересный факт, что уксуснокислые бактерии, как живые, так и убитые ацетоном и эфиром, окисляют спирт с образованием уксусной кислоты (при полном отсутствии кислорода) в присутствии метиленовой сини в качестве акцептора водорода. Он считает, что ему таким образом удалось вызвать действие алкогольоксидазы без участия свободного кислорода. Однако здесь мы имеем дело не с изолированной оксидазой (до сих пор алкогольоксидаза еще не изолирована), а со всем органическим веществом бактерий, со всеми содержащимися в них ферментами. Хорошо известно в биологии, что в низших организмах возможен обмен веществ и в отсутствии кислорода. В аэробных условиях действуют оксидазы, катализирующие окисление за счет свободного кислорода, а в анаэробных — окислительные процессы происходят за счет воды, причем помимо акцептора водорода (в данном случае метиленовой сини) в процессах участвуют и восстановительные ферменты. Из факта существования последнего способа окисления еще не вытекает, что не существует первого.

7. Согласно взглядам Виланда, окислительные и восстановительные ферменты являются дегидразами, и поэтому между ними нет существенной разницы. В соответствии с этим, Виланд пытался вызвать гидрирование молекулярного кислорода восстановительным ферментом, находящимся в молоке, т. е. заставить редуказу играть роль оксидазы. Этот фермент, открытый Шардингером, известен в настоящее время под названием пергидридазы. Он восстанавливает красители в лейкоформы, нитраты в нитриты и т. д. в присутствии альдегидов, которые при этом окисляются за счет воды с образованием кислоты. Этот опыт Виланд проводил используя молекулярный кислород, вместо упомянутых выше акцепторов водорода, для дегидрирования продукта присоединения салицилового альдегида и воды под действием свежего сырого молока. Он получил в этом случае на 33% больше салициловой кислоты, чем в контрольных опытах с сырым молоком в атмосфере азота и с кипяченым молоком в атмосфере кислорода. Однако он не принял во внимание, что сырое молоко содержит наряду с пергидридазой большие количества пероксидазы, т. е. окислительный фермент. Превращение редуказы в оксидазу, таким образом, совершенно не доказывается этим опытом.

Свои выводы я формулирую следующим образом:


I. Медленное сгорание окисляемых веществ происходит как путем непосредственного поглощения молекулярного кислорода, так и путем расщепления воды с поглощением гидроксильных, при одновременном действии акцепторов водорода<sup>2</sup>.

II. Теория медленного сгорания, данная Траубе, Энглером и Бахом, охватывает все факты, относящиеся к области окислительных явлений, в том числе и факты, установленные Виландом. В противоположность этому, теория дегидрирования, данная Виландом, совершенно не позволяет объяснить многочисленные существенные явления в этой области.

17 ноября 1913 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Wieland Ber. Dtsch. chem. Ges., 46, 3327 (1913).
2. Более подробно см. мою статью «Oxydationsprozesse in der lebenden Substanz» в кн.: Oppenheimers Handb. d. Biochemie, Ergzshd. (1913) Jena.



## СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ УЧЕНИЯ О ПРОЦЕССАХ МЕДЛЕННОГО ОКИСЛЕНИЯ И АКТИВАЦИИ КИСЛОРОДА\*

### ВВЕДЕНИЕ. ТЕОРИЯ БАХА-ЭНГЛЕРА

В связи с успехами физической химии в области изучения кинетики простейших химических реакций в последнее десятилетие рядом физико-химиков, как Боденштейн, Габер и др., были сделаны попытки пересмотра и уточнения классических представлений о *механизме медленного окисления или так называемой аутоокислации и активирования молекулярного кислорода*.

В предлагаемой статье я ставлю себе целью рассмотреть вновь созданные теории окисления и выявить, насколько они соответствуют данным опыта.

История развития идей о механизме медленного окисления весьма интересна в том отношении, что исследовательская мысль перепробовала последовательно все логически возможные решения вопроса, пока пришла к единственной теории, которая до сих пор, как мы увидим, лучше всего объясняет факты. На изложении этой старой теории я считаю необходимым кратко остановиться, так как она стоит в центре дискуссии о механизме окислительных процессов.

Читателей, интересующихся историей вопроса, отсылаю к специальным источникам<sup>1-5</sup>.

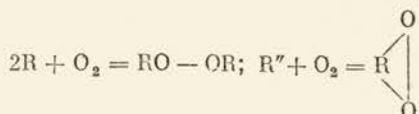
Когда я около 40 лет назад занялся химизмом процессов дыхания, я считал, что процессы окисления, лежащие в основе дыхания, надо изучать при тех же условиях, при которых они происходят в организме, т. е. при обыкновенных температурах и давлении. Переносить на процессы дыхания данные, полученные в опытах окисления при высоких температурах и низких давлениях, нельзя уже по одному тому, что повышение внутренней температуры организма на какой-нибудь десяток градусов для него — вопрос жизни и смерти.

Изучая отношение химических веществ к молекулярному кислороду в обыкновенных условиях, мы констатируем, что одни из них более или менее быстро соединяются с кислородом, другие не окисляются со сколько-нибудь измеримой скоростью. В тождественных условиях опыта соединяются с кислородом соединения химически ненасыщенные, без изменения остаются соединения насыщенные. Вполне очевидно, что решающим моментом тут является воздействие ненасыщенного соединения на молекулярный кислород, его сродство к кислороду. Это воздействие нельзя себе представить иначе, как выведение молекулы кислорода из ее инертного состояния под действием

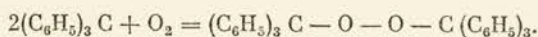
---

\* Успехи химии, 3, 177 (1934).

свободной энергии ненасыщенного соединения, т.е. как активацию молекулы кислорода. Эта активация может выразиться в том, что молекула кислорода распадается на свободные атомы —О— и —О— или же в том, что в молекуле рвется только одна из связей, соединяющих ее атомы, и молекула  $O = O$  превращается в —О—О—. Так как для разрыва одной из связей между атомами требуется меньшая затрата энергии, чем для разрыва обеих и выделения свободных атомов, наиболее вероятным является предположение, что ненасыщенное соединение в первую очередь присоединяет активированную молекулу кислорода —О—О—, образуя перекись типа перекиси водорода  $H_2O_2$ :



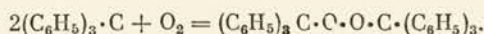
Эта теория подтвердилась с полной определенностью на сотнях примеров. Наиболее эффективным и наглядным из них является окисление радикала трифенилметила в бензольном растворе. Как показал Гомберг, под действием молекулярного кислорода трифенилметил моментально и количественно превращается в перекись трифенилметила, выпадающую из раствора:



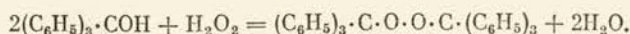
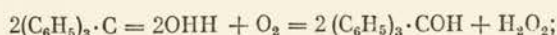
Так создалась так называемая перекисная теория процессов самопроизвольного окисления, к которой я<sup>6</sup> и Энглер<sup>7</sup> пришли одновременно и совершенно независимо друг от друга.\*

### ТЕОРИЯ ВИЛАНДА

Основным моментом, в котором теория Морица Траубе, непосредственно предшествовавшая теории Баха-Энглера, оказалась в противоречии с фактами, было предположение, что молекула воды легче расщепляется на гидроксил и водород, чем молекула кислорода на атомы, и что поэтому все процессы самопроизвольного окисления протекают за счет гидроксильной воды, а водород воды присоединяет молекулу кислорода, образуя  $H_2O_2$ . Мы теперь знаем, что между энергией расщепления воды (—115 ккал) и энергией расщепления кислорода на атомы (—117 ккал) нет существенной разницы. С другой стороны, стали известны такие случаи аутоокислации, в которых молекула воды не может играть химической роли. Трифенилметил в бензольном растворе в соприкосновении с кислородом количественно и моментально превращается в перекись трифенилметила:



По теории Траубе, следовало бы допустить, что трифенилметил сначала окисляется за счет гидроксильной воды в трифенилкарбинол, а водород с молекулярным кислородом образует перекись водорода, которая, в свою очередь, окисляет 2 молекулы трифенилкарбинола в перекись трифенилметила и воду:

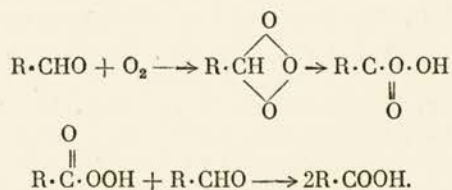


\* Моя работа была доложена в Парижской Академии наук в мае 1897 г., работа Энглера напечатана в «Berichte der Deutschen chemischen Gesellschaft» в июле того же года.

Но если теория Траубе не учитывает возможности непосредственного присоединения молекулярного кислорода к ненасыщенным соединениям с первичным образованием перекисей, то для сопряженных окислительно-восстановительных реакций, протекающих за счет элементов воды, она сохраняет всю свою силу. Можно с полной определенностью сказать, что все факты, касающиеся этой области, она объясняет лучше, чем какая бы то ни было другая теория. Тем не менее в 1912 г. Генрих Виланд<sup>8,9</sup> выступил с новой, так называемой теорией дегидрирования, которой он вносит радикальные изменения в теорию Траубе.

Известно, что металлы, ускоряющие гидрирование ненасыщенных соединений — никель, медь, платина, палладий — обладают способностью при более повышенной температуре дегидрировать насыщенные соединения. Так, например, при температуре около 200° этилен при помощи катализаторов можно легко гидрировать в этан, но при повышении температуры до 250—300° этан под действием тех же катализаторов распадается на этилен и водород. Вполне очевидно, что при пограничных температурах мы имеем дело с равновесным состоянием  $\text{CH}_2 : \text{CH}_2 + \text{H}_2 \rightleftharpoons \rightleftharpoons \text{CH}_3 \cdot \text{CH}_3$ . Так как гидрирование под действием палладия происходит и при обыкновенной температуре и так как тут тоже можно предположить наличие обратимой реакции, то Виланд поставил себе задачей исследовать, может ли палладий дегидрировать водородистые соединения и *при обыкновенной температуре*.

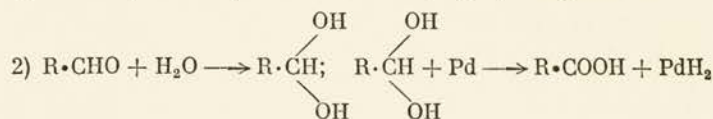
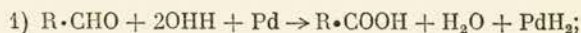
Поставленные им опыты показали, что при взбалтывании гидрохинона в водном растворе с палладиевой чернью в *отсутствии кислорода* получается хинон, который с избытком гидрохинона дает хингидрон. В параллель дегидрирующему действию палладия Виланд поставил свойство хинона отнимать водород от органических соединений с переходом в гидрохинон. Так, например, действуя хиноном на этиловый спирт, Виланд получил ацетальдегид и гидрохинон. На основе этих фактов Виланд пришел к новой теории процессов окисления, теории, центральным пунктом которой является *дегидрирование* субстратов. Виланд делает различие между «настоящим окислением» и дегидрированием. К процессам первой категории он относит присоединение кислорода к окисляемому субстрату, к процессам второй, гораздо более значительной категории он относит отнятие водорода от субстрата. Мысли Виланда, мне кажется, лучше всего выяснить на им самим избранном примере — на окислении альдегидов. Превращение альдегидов в кислоты обычно рассматривается как результат введения кислорода в их молекулу. Поскольку дело идет об аутоокислации альдегидов в отсутствие воды, Виланд признает правильность перекисной теории и принимает схему Баха:



Но гораздо более распространенным Виланд считает другой процесс превращения альдегидов в кислоты, именно отнятие двух атомов водорода от гидратированной молекулы альдегида.

Взбалтывая *влажный* ацетальдегид с палладиевой чернью в отсутствие кислорода, Виланд получил уксусную кислоту и водород, растворенный в палладии. Если к продуктам реакции допустить кислород, то водород быстро сгорает. Отсюда Виланд делает вывод, что палладий ускоряет окис-

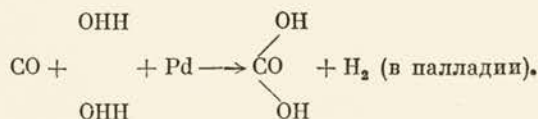
ление альдегидов воздухом, *предварительно дегидрируя их гидраты*. На этом примере ясно видно различие между теорией Траубе и теорией Виланда: первая предполагает расщепление молекулы воды как основу окисления, вторая — предварительную гидратацию субстрата с последующим дегидрированием его:



Роль палладия или кислорода как акцепторов водорода могут играть бензохинон, метиленовая синь и др. В пользу своей теории дегидрирования альдегидов Виланд приводит тот факт, что сухая окись серебра на сухой ацетальдегид не действует, тогда как в присутствии воды происходит быстрое окисление ацетальдегида в уксусную кислоту. Нетрудно видеть, что в приведенном примере роль воды может с таким же основанием быть объяснена в соответствии с теорией Траубе, как в соответствии с теорией Виланда. Но применение схемы Виланда к объяснению окисления окиси углерода в углекислоту под действием палладия в отсутствие кислорода вызвало серьезные возражения. По Виланду, окись углерода присоединяет воду, образуя муравьиную кислоту, которую палладий дегидрирует в углекислоту:



Образование муравьиной кислоты констатировано Виландом. Против этого толкования прежде всего говорит то, что к окиси углерода чрезвычайно трудно присоединяется вода с образованием муравьиной кислоты. Бертелло получил ее, пропуская CO в расплавленное едкое кали. Муравьиную кислоту еще можно получить путем пропускания CO в кипящий раствор 50%-ного KOH. Трудно думать, чтобы палладий вызвал гидратирование CO, как это полагает Виланд. То, что в продуктах реакции оказалась муравьиная кислота, Бредиг<sup>10</sup> объясняет давно известным восстановлением CO под действием содержащего водород палладия в муравьиную кислоту, которая, таким образом, является не промежуточным, а побочным продуктом реакции. Но, возражая Виланду, Вильгельм Траубе<sup>11</sup> показал, что муравьиная кислота вообще не образуется в указанной реакции. Он взбалтывал CO с палладием в спиртовом растворе едкого натра, причем образовался углекислый натрий, но ни следа муравьинокислого. С другой стороны, прибавив к реакционной смеси ничтожное количество муравьиной кислоты, он нашел ее в продуктах реакции. В противоположность схеме Виланда, схема по Морицу Траубе дает вполне удовлетворительное объяснение этой реакции:



Ни окись углерода сама по себе, ни палладий не могут разлагать воду, но в сопряженной реакции они ее разлагают, причем CO является акцептором гидроксила, а Pd — акцептором водорода.

Как упомянуто выше, Виланд предпосылает присоединение воды дегидрированию ненасыщенных соединений, тогда как насыщенные соединения дегидрируются непосредственно, без участия воды.

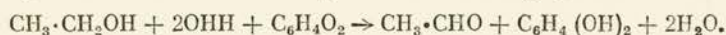
Типичными дегидрирующими агентами он считает палладий и хинон. Как пример реакции дегидрирования он приводит превращение гидрохинона в хинон при взбалтывании его водного раствора с палладиевой чернью в отсутствие кислорода.

Американский химик Джилесли повторил опыт Виланда и показал, что палладиевая чернь, приготовленная по его способу, содержала кислород, который в присутствии палладия и окислил гидрохинон в хинон. Но если приготовить палладиевую чернь так, чтобы она не содержала следов кислорода, то никакого дегидрирования она не производит. Больше того, подсчет упругости водорода над гидрохиноном и над палладием показал, что в условиях опыта Виланда палладий не мог без помощи кислорода окислить гидрохинон. Правильность результатов, полученных Джилесли, признается и самим Виландом. По отношению к другому дегидрирующему агенту насыщенных водородистых соединений, к *хинону*, Виланд приводит пример превращения этилового спирта в ацетальдегид хиноном, который при этом сам гидрируется в гидрохинон:



Это толкование механизма реакции, исключаящее участие воды в окислительно-восстановительном процессе, дает основание предполагать, что хинон будет дегидрировать спирт в полнейшем отсутствии воды. В тщательных проведенных опытах Бах и Николаев<sup>12</sup> показали, что сухой хинон не действует на сухой спирт даже на солнечном свете, а в присутствии воды окисление растет с количеством последней. В отсутствие воды хинон не окисляет пирогаллола и парафенилендиамина в спиртовом, эфирном и ацетоновом растворе.

Эти факты стоят в определенном противоречии с теорией дегидрирования Виланда и вполне соответствуют схеме М. Траубе:



Поскольку основные экспериментальные данные, на которых Виланд построил свою теорию, при проверке не подтвердились, ее нельзя признать правильной. Тем не менее в поисках данных для ее оправдания Виланд сделал ряд новых блестящих наблюдений над бескислородным окислением за счет гидроксильных групп воды, особенно в области биологического катализа, например, над окислением этилового спирта уксусными бактериями при замене кислорода метиленовой синью. Но все эти наблюдения гораздо полнее и проще объясняются теорией Траубе, чем теорией Виланда.

### ТЕОРИЯ БОДЕНШТЕЙНА

В своих представлениях о механизме процессов самопроизвольного окисления и Энглер и Бах исходили из положения, что молекулярный кислород инертен и что поэтому первым актом процесса окисления должно быть активирование молекулы кислорода за счет энергии окисляемого субстрата. Это активирование мыслилось не как распад молекулы на свободные атомы, а как разрыв или ослабление одной из двух связей, соединяющих атомы кислорода в молекулу. О необходимости предварительной активации самого окисляемого субстрата тогда вопрос определенно не ставился. Но в последние десятилетия вопрос этот подвергся основательной разработке, и Макс Боденштейну<sup>13</sup> принадлежит заслуга применения принципа активации молекул субстрата к процессам окисления и увязки его с учением о цепных реакциях. Он подверг тщательному иссле-



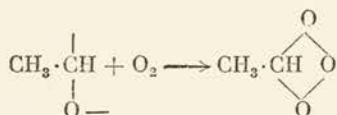
дованию кинетику окисления молекулярным кислородом ацетальдегида в газовой фазе при температуре 55 и 90° и нашел, что первым продуктом окисления является не уксусная кислота, как можно было ожидать, а над-

уксусная  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Последняя далеко не всегда реагирует с молекулой

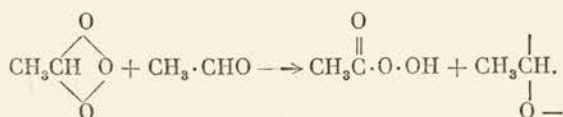
ацетальдегида, образуя 2 молекулы уксусной кислоты, часто она вовсе не реагирует и распадается в другом направлении. На основе полученных им экспериментальных данных Боденштейн пришел к заключению, что имеющиеся наблюдения можно объяснить лучше всего исходя из предположения, что с молекулярным кислородом ацетальдегид вступает в реакцию

в состоянии активированной молекулы  $\text{CH}_3\cdot\underset{\text{O}-}{\overset{|}{\text{C}}}\text{H}$ , по выражению Эрнста

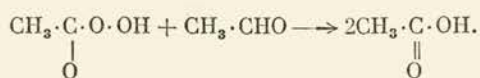
Бергмана, молекулы с «стоячей» карбонильной связью. Боденштейн принимает, что, согласно схеме Баха, карбонильная группа связывает молекулу кислорода, образуя неустойчивую перекись:



Эта перекись неустойчива, — она распадается на активную молекулу ацетальдегида и молекулярный кислород так же легко, как и образуется из них. В тех случаях, когда она реагирует с неактивированной молекулой ацетальдегида, она отдает ей молекулу кислорода, образуя молекулу надуксусной кислоты и возрождаясь в качестве активированной молекулы, являющейся носителем цепной реакции:

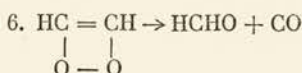
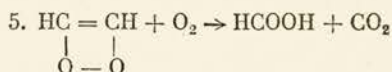
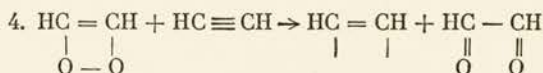
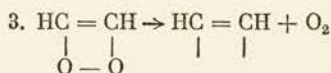
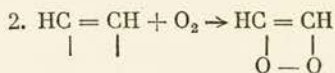
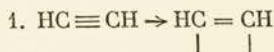


С своей стороны, надуксусная кислота реагирует с молекулой ацетальдегида, образуя 2 молекулы уксусной кислоты, на чем реакция прерывается:



В теории Боденштейна цепной характер реакции самопроизвольного окисления ацетальдегида определяется тем, что активированная молекула его *связывает молекулу кислорода и передает ее целиком* неактивированной молекуле альдегида, которая превращается вследствие этого в надуксусную кислоту, а сама активированная молекула возрождается и опять соединяется с кислородом.

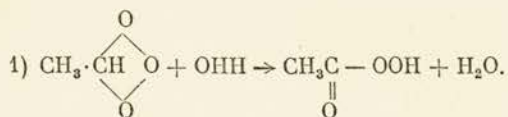
Боденштейн считал, что его схема применима к аутооксидации углеводов вообще. Полное подтверждение своих взглядов он видит в чрезвычайно интересных работах Кистяковского и Ленгера<sup>14</sup> и Спенса и Кистяковского<sup>15</sup> над окислением ацетиленом молекулярным кислородом при 320°. При этом из продуктов реакции были выделены: глиоксаль, формальдегид, муравьиная кислота, углекислота, окись углерода и водород. В соответствии со своей схемой Боденштейн формулирует все эти реакции следующим образом:



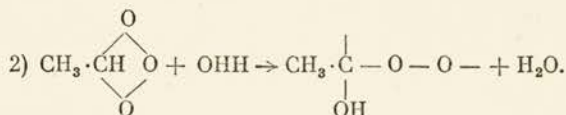
Как и в случае окисления ацетальдегида, образовавшаяся присоединением  $\text{O}_2$  к активированной молекуле ацетилен перекись  $\begin{array}{c} \text{HC} = \text{CH} \\ | \quad | \\ \text{O} - \text{O} \end{array}$  отдает молекулу кислорода другой молекуле ацетилен, образуя глиоксаль  $\begin{array}{c} \text{HC} - \text{CH} \\ || \quad || \\ \text{O} \quad \text{O} \end{array}$  и возрождаясь в активированную молекулу ацетилен.

Тут, мне кажется, лежит слабый пункт теории Боденштейна. Что присоединение молекулы кислорода к активированной молекуле ацетальдегида или ацетилен представляет собой обратимую реакцию, в этом сомнения нет. Но из обратимости ее вытекает, что компоненты ее возрождаются в *их первоначальном виде*, т. е. в виде активированных молекул субстратов и инертных молекул кислорода. Поэтому, когда первичная перекись реагирует с молекулой неактивированного субстрата, она может передать ей только инертную молекулу кислорода, *если она должна сохранить свою первоначальную энергию активации*. А неактивированный кислород на неактивированный субстрат не действует. Если же активированная молекула субстрата передает свою энергию активации молекуле кислорода, то она перестанет быть носителем цепной реакции, и цепь оборвется. С другой стороны, предположить, что при распаде перекиси первоначальная энергия активации молекулы субстрата распределяется между нею и молекулой кислорода, нет основания, не говоря уже о том, что при таком распределении первоначальной энергии активации субстрата она быстро исчерпывается, и цепная реакция оборвется. Вполне очевидно, что тут должен вступить в действие какой-то новый фактор, который изменяет характер перекиси и препятствует обратимости первоначальной реакции. Этот фактор — молекула воды, участие которой играет большую роль в процессах самопроизвольного окисления. Участие воды в рассмотренных Боденштейном процессах представляется мне в следующем виде.

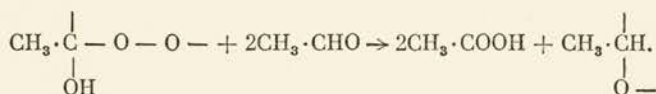
В перекиси  $\text{C}_2\text{H}_3 \cdot \text{C}_2\text{H}_3 \cdot \text{O}_2$ , которая превращается в надуксусную кислоту, гидроксил воды соединяется с водородом группы  $\text{C}_2\text{H}_3$ , а водород воды может присоединиться или к атому кислорода, находящемуся между двумя другими атомами кислорода, или к атому кислорода, связанного с углеродом. Рассмотрим оба случая:



Получается надуксусная кислота, первый продукт реакции, изолированный Боденштейном, и вода:

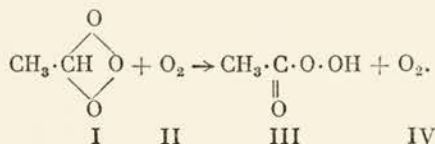


Здесь мы имеем неустойчивую, активированную форму надуксусной кислоты, которая, реагируя с двумя молекулами уксусного альдегида, дает 2 молекулы уксусной кислоты и новую активированную молекулу ацетальдегида:



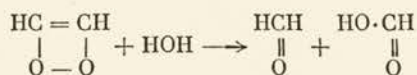
В зависимости от условий реакций превращение первичной перекиси под действием воды идет в одну или другую сторону. В. П. Иориссен, работая над окислением бензальдегида в ацетоновом растворе, получил до 80% теоретического количества устойчивой надбензойной кислоты  $\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{CO} \cdot \text{OОН}$ .

При учете действия молекулы воды на первичную перекись с превращением ее в надуксусную кислоту отпадает выдвигаемое Боденштейном предположение, что это превращение происходит под действием молекулярного кислорода:



При этом Боденштейн поясняет, что молекула  $\text{O}_2$  (II) переходит в молекулу (I), образуя молекулу (III), а в качестве молекулы  $\text{O}_2$  (IV) появляется кислород первичной перекиси.

Нетрудно видеть, что действием воды на первичную перекись ацетилена легче объясняется образование его продуктов разложения, чем реакциями, приведенными в схеме Боденштейна, например, образование формальдегида и муравьиной кислоты, глиоксаля и т. д.:



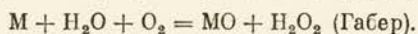
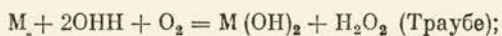
Несмотря на указанный выше недочет (распределение энергии активации между молекулой субстрата и молекулой кислорода), который, по всей вероятности, не замедлит быть исправленным, теория Боденштейна является ценным расширением теории Баха-Энглера, под которую она подводит кинетическую основу. Вместе с тем она имеет большое значение для теории явлений отрицательного окислительного катализа, основанных на обрыве цепных реакций вследствие дезактивирования реагирующих компонентов.

## ТЕОРИЯ ГАБЕРА

С точки зрения истории развития научной мысли интересно отметить, что еще в 1901 г. Габер<sup>16</sup> пытался углубить теорию Баха-Энглера допущением, что в отсутствии воды процесс аутооксидации протекает иначе, чем в присутствии воды. При «сухой аутооксидации» окисляемое вещество присоединяет непосредственно молекулу кислорода с первичным образованием перекиси. Но при «мокрой» аутооксидации кислород, растворенный в воде, реагирует с последней, образуя равновесную систему:



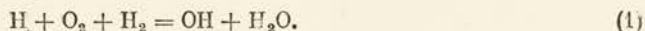
В присутствии окисляемого вещества атомы кислорода потребляются и вновь образуются вследствие восстановления вышеуказанного равновесия. Схема «мокрой» аутооксидации, предлагаемая Габером, отличается от схемы Морица Траубе тем, что по последней  $\text{H}_2\text{O}_2$  образуется присоединением водорода воды к целой молекуле кислорода, тогда как по первой  $\text{H}_2\text{O}_2$  образуется из  $\text{H}_2\text{O}$  присоединением атома кислорода диссоциированной молекулы  $\text{O} = \text{O}$ , между тем как другой атом связывается акцептором:



Впоследствии Габер отказался от своей схемы и признал, что как в присутствии, так и в отсутствии воды окисляемое вещество присоединяет целую молекулу кислорода.

Четверть века спустя Габер опять занялся проблемой аутооксидации и создал новую теорию, в основу которой он снова кладет расщепление молекулы кислорода на атомы — как первый акт окисления.

Во вступительной части своей статьи «Über die Autoxydation»\* Габер<sup>17</sup> отмечает, что теория Энглера-Баха отрицала расщепление молекулярного кислорода на заряженные и незаряженные атомы, как необходимое предварительное условие всякого процесса аутооксидации. В эпоху возникновения этой теории не имели никакого представления о количестве энергии, необходимом для расщепления молекулы кислорода на свободные атомы. Теперь мы знаем, что оно равняется 117 ккал, и из этого Габер делает вывод, что вопрос о том, участвует ли кислород в первоначальном акте окисления как молекула или предварительно расщепляется на атомы, потерял остроту. Для простейшего случая окисления, именно для реакции между молекулярным кислородом и водородом, содержащим свободные атомы, Габер дает следующую схему:



Этим уравнением Габер выражает положение, что кислород сжигает водород без промежуточного образования перекиси. Ибо в первом же акте окисления мы находим первоначальную молекулу кислорода расщепленной на два продукта реакции, из которых один представляет воду, другой — радикал гидроксила. Последний действует на молекулу водорода, выделяя из нее атом водорода, расщепляющий молекулу кислорода, как в начале реакции, и обуславливающий развертывание цепи:



Эту схему простейшего случая медленного сгорания в газовой среде Габер переносит на процессы окисления в водной среде, увязывает цепь

\* «Об аутооксидации».

ные реакции, основанные на промежуточном образовании радикалов, с явлениями катализа как неорганического, так и биологического (действия энзимов), словом, дает универсальную теорию окисления, которая должна охватить все стороны этой сложной проблемы.

Для большей ясности дальнейшего изложения я считаю нужным высказать несколько соображений по существу габеровской основной схемы.

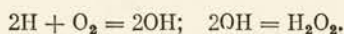
Теория промежуточного образования перекисей при действии молекулярного кислорода на окисляемые субстраты исходит из положения, что активирование молекулы  $O = O$  путем ослабления одной из двух связей, соединяющих ее атомы, требует меньшей затраты энергии, чем расщепление ее на два свободных атома. Это положение остается в силе независимо от того, какое количество энергии требуется для расщепления  $O_2$  на атомы, тем более что 117 ккал вовсе не такая малая величина. Поэтому нельзя согласиться с Габером, что вопрос о промежуточном образовании перекисей или о прямом расщеплении  $O_2$  на атомы потерял значение. Габер является сторонником теории первичного расщепления  $O_2$  на атомы. Но когда Гартель и Полани<sup>18</sup> показали, что пары натрия присоединяют молекулу кислорода с образованием перекиси натрия, Габер и Сакс<sup>19</sup> подвергли эту реакцию глубокому кинетическому исследованию и пришли к заключению, что для «исследованного ими единичного случая» теория Энглера-Баха получила кинетическое подтверждение.

Гораздо более ярко против основной схемы Габера говорят тщательные опыты, проведенные Гейбом и Гартеком<sup>20</sup> над окислением атомарного водорода молекулярным кислородом при очень низких температурах. До них Бем и Бонгеффер, действуя атомным водородом на молекулярный кислород и охлаждая продукты реакции в сосуде с жидким воздухом, получили продукт, содержащий в среднем 60% перекиси водорода. Принимая во внимание, что атомный водород применялся в избытке (20%), кажется непонятным, почему перекись водорода в газовой фазе не была восстановлена в воду. Поэтому Гейб и Гартек предположили, что перекись водорода образовалась путем непосредственного присоединения двух атомов водорода к молекуле кислорода *на стенках охлажденного сосуда*. Чтобы проверить это предположение, они провели опыты в аппарате, в котором кислород встречался с атомным водородом лишь при температуре жидкого воздуха. Изменяя количественные отношения реагирующих газов, охлаждая сосуды от  $-190$  до  $-252^\circ$  (в жидком водороде), они неизменно получали на стенках стекловидный продукт (1—2 г), который содержал водород и кислород в отношении 1 : 1. Спектр поглощения его ничем не отличался от спектра поглощения обычной  $H_2O_2$ . Каких-либо спектроскопических указаний на присутствие ОН получено не было. При температурах выше  $-190^\circ$  содержание  $H_2O_2$  в продукте колебалось от 73 до 100%, средняя 22 опытов — 85%  $H_2O_2$ . В трех опытах при  $-252^\circ$  они получили продукт реакции, содержащий 98,2; 99,5 и 100%  $H_2O_2$ .

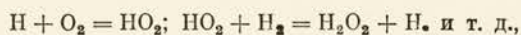
Во всех своих опытах, проведенных при температурах ниже  $-190^\circ$  Гейб и Гартек констатировали в высшей степени замечательный факт, что, когда температура поднималась до  $-115^\circ$ , полученный ими твердый продукт частично разлагался с бурным выделением кислорода. Остаток представлял собою обыкновенную перекись водорода с содержанием 70—82%  $H_2O_2$ . Авторы приходят к заключению, что этот разлагающийся при температуре выше  $-115^\circ$  продукт представляет собою неустойчивую форму  $H_2O : O$ , которая при повышении температуры, частично разлагаясь, переходит в  $HO \cdot OH$ . К этому вопросу я еще вернусь.

Нетрудно видеть, что экспериментальные данные, установленные Гейбом и Гартеком, резко противоречат схеме Габера. Из того, что в спектре водородного пламени наблюдаются полосы поглощения, соответствующие

гидроксилу, Габер заключает, что атомы водорода расщепляют молекулы кислорода с образованием гидроксильных, которые действуют как носители цепной реакции. Этот же механизм он приписывает окислению водорода при обыкновенной температуре, несмотря на то, что при действии атомного водорода на молекулярный кислород при обыкновенной температуре Бонгеффер и Габер не могли установить наличия спектра поглощения гидроксильного. Поэтому вполне возможно, что при горении водорода гидроксил получается не как первичный продукт расщепления молекулы кислорода водородом, а как продукт разложения под действием высокой температуры первично образовавшейся перекиси водорода. Недавно Тэйлор показал, что под действием ультрафиолетовых лучей перекись водорода разлагается на гидроксилы. Не исключена возможность, что в опыте Габера спектр поглощения был вызван продуктами распада перекиси водорода. В своей схеме Габер совершенно не принимает во внимание постоянного образования перекиси водорода при окислении водорода как при низких, так и при высоких температурах, рассматривая ее как побочный продукт реакции, образующийся путем соединения двух гидроксильных при разрыве цепи. Но тот факт, что в среднем в 22 опытах Гейб и Гартек получили продукт с содержанием 85%  $H_2O_2$ , что понижением температуры ниже  $-190^\circ$  содержание  $H_2O_2$  в продукте повышается и приближается асимптотически к 100%, ясно показывает, что в указанных условиях перекись водорода может быть только *первичным, основным, а не побочным продуктом* реакции между атомным водородом и молекулярным кислородом. Ибо, если принять схему Габера, то надо допустить, что под действием атомного водорода молекула кислорода сначала расщепляется на атомы, которые тут же воссоединяются, чтобы образовать перекись водорода:



Так как для такого допущения нет достаточных оснований, придется признать, что схема цепной реакции окисления водорода, предложенная Маршаллом и поддерживаемая Н. Н. Семеновым:



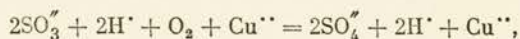
кажется более обоснованной.

Такова новая теория процессов окисления, разрабатываемая Габером, таковы возражения, которые она встречает. Я не сторонник этой теории, но, само собой разумеется, я ничуть не считаю, что этими возражениями исчерпывается вопрос в сторону отрицания ее. Вполне возможно, что те факты, которые не укладываются при современном состоянии наших знаний в схему Габера, найдут объяснение, более благоприятное для нее. С другой стороны, дальнейшая разработка ее может выявить новые факты, которые послужат к ее подтверждению. Вот почему попытка, с которой выступили Ф. Габер и Р. Вильштеттер<sup>21</sup> применить новую теорию к объяснению механизма действия окислительно-восстановительных катализаторов как неорганических, так и биологических (ферментов), заслуживает самого серьезного внимания.

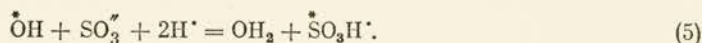
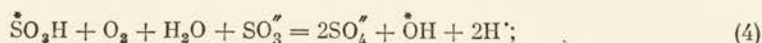
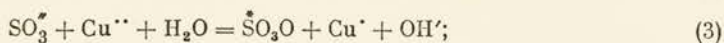
Как пример цепной реакции окисления, протекающей в водном растворе, они берут открытое Титовым ускорение окисью меди окисления молекулярным кислородом сернистой кислоты в щелочном растворе. Что мы здесь имеем дело с цепной реакцией, с полной ясностью доказал Бахстром<sup>22</sup>, установивший, что такое же действие, как двувалентный ион меди, оказывает ультрафиолетовый свет, причем каждый поглощенный световой квант вводит в действие десятки тысяч молекул кислорода. Он же показал, что потребление молекулярного кислорода сульфитом сразу

возрастает в момент прибавления какого-либо окислителя к раствору, в том числе перекиси водорода.

Реакцию окисления сульфита, выражаемую суммарным уравнением:



Габер и Вильштеттер расчленяют на следующие ступени:

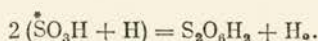
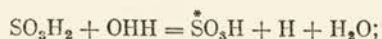


Цепной характер реакции обуславливается тем, что радикал  $\dot{\text{S}}\text{O}_3\text{H}$  (монотионовая кислота), который образуется вследствие отнятия атома водорода от сернистой кислоты  $\text{SO}_3\text{H}_2$  катализатором, реагирует с водой, молекулой кислорода и молекулой сернистой кислоты, давая 2 молекулы серной кислоты и радикал  $\dot{\text{O}}\text{H}$ . Последний реагирует с новой молекулой сернистой кислоты, возрождая радикал  $\dot{\text{S}}\text{O}_3\text{H}$ , и т. д.

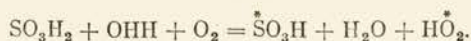
Новым в этой схеме является не только характер реакционной цепи, но и то, что катализатору приписывается участие только в самой начальной фазе реакции, в образовании радикала путем одновалентного окисления субстрата. Дальнейшее разветвление реакционной цепи ни в каком отношении к катализатору не стоит. Больше того, возрождение катализатора возможно только путем потребления радикала  $\dot{\text{O}}\text{H}$ , т. е. путем обрыва цепи.

Сама схема далеко не представляет единственно возможного объяснения фактов, касающихся аутоокислации сернистой кислоты. Габер упоминает, что, действуя ультрафиолетовыми лучами на раствор сернистокислого натрия при *полном отсутствии кислорода*, он получил дитионовую кислоту и водород.

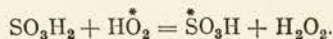
Объяснить эту реакцию можно только так, что гидроксил молекулы воды, распадающейся под действием ультрафиолетовых лучей, окисляет сернистую кислоту в монотионовую, а водород выделяется, причем два радикала  $\dot{\text{S}}\text{O}_3\text{H}$  соединяются в дитионовую кислоту, а два атома водорода — в молекулу водорода:



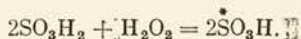
На этом реакция заканчивается, потому что радикал  $\dot{\text{S}}\text{O}_3\text{H}$  может окисляться дальше за счет гидроксила воды лишь в сопряженной реакции с акцептором водорода, каким является кислород. При этом в качестве промежуточных продуктов образуются, с одной стороны, радикалы, с другой стороны, — перекись водорода, которая, действуя на  $\text{SO}_3\text{H}_2$ , в свою очередь вызывает цепную реакцию: под действием светового кванта сернистая кислота окисляется за счет гидроксила воды, образуя радикал  $\dot{\text{S}}\text{O}_3\text{H}$ , а атом водорода присоединяется к молекуле кислорода:



Реагируя с новой молекулой  $\text{SO}_3\text{H}_2$ , радикал  $\text{HO}_2^\bullet$  дает  $\dot{\text{S}}\text{O}_3\text{H}_2$  и перекись водорода:



Перекись водорода, образование которой в этой реакции установлено и признается Габером, в свою очередь вызывает цепную реакцию, окисляя 2 молекулы сернистой кислоты в 2 молекулы монотионовой:



Образование перекиси водорода при действии молекулярного кислорода на сернистую кислоту давно установлено и никем не оспаривается. Таким образом, окисление сернистой кислоты молекулярным кислородом как под действием света, так и под действием окиси меди можно представить себе как цепную, разветвляющуюся (согласно теории Н. Н. Семенова) реакцию, не прибегая к помощи гидроксила, образование которого при обыкновенной температуре не доказано.

Следует отметить, что все вышеприведенные реакции целиком и полностью укладываются в классическую теорию Морица Траубе о роли воды в процессах окисления и являются новым подтверждением ее правильности.

Перехожу теперь к габер-вильштеттеровскому объяснению механизма действия биологических окислительно-восстановительных катализаторов. Применение схемы цепной реакции, основанной на промежуточном образовании радикала, к окислению сульфита в водном растворе в присутствии окиси меди, привело Габера к необходимости считать, что катализатор участвует только в самой начальной фазе реакции, создавая из субстрата радикал путем одновалентного окисления его, сама же цепная реакция проходит без содействия катализатора. Этим устанавливается полная аналогия между действием двувалентного иона меди и действием светового кванта. По отношению к данному случаю эта концепция не стоит в противоречии с фактами. Но применение ее к объяснению механизма разложения перекиси водорода под действием энзимов пероксидазы и каталазы неизбежно влечет за собой — в силу строгой специфичности этих катализаторов — выводы, которые совершенно расходятся с экспериментальными данными.

Свойство растительных и животных тканей ускорять окислительное действие перекиси водорода и в то же время разлагать ее с выделением молекулярного кислорода долгое время приписывалось «органическим материям» вообще, а затем всем энзимам вообще. В начале текущего столетия из растений были выделены два специфических энзима, из которых один — *каталаза* (О. Лев, 1901 г.) разлагает, подобно платине, перекись водорода с выделением молекулярного кислорода, другой — *пероксидаза* (А. Бах и Р. Шюда, 1903 г.) ускоряет, подобно двувалентному иону железа, окислительное действие перекиси водорода. Относительно механизма действия этих энзимов до сих пор ничего определенного не выяснено. Предполагалось, что пероксидаза образует с  $\text{H}_2\text{O}_2$  промежуточный продукт, аналогичный перекисным соединениям металлческих окислов, окислительный потенциал которого выше окислительного потенциала  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

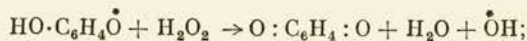
Габер и Вильштеттер определенно отрицают какое-либо активирование перекиси водорода пероксидазой. Подобно тому как в системе «окись меди — сернистая кислота — молекулярный кислород» катализатор реагирует в первую очередь не с кислородом, а с субстратом, превращая его в радикал, так и в системе «пероксидаза — перекись водорода — субстрат»



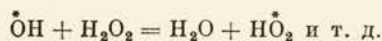
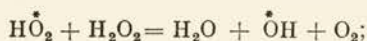
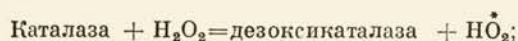
(например, гидрохинон) пероксидаза реагирует не с  $\text{H}_2\text{O}_2$ , а с гидрохиноном, отнимая у него атом водорода и восстанавливаясь:



Дальше образовавшийся радикал реагирует с  $\text{H}_2\text{O}_2$ , давая воду и гидроксил, который моновалентно окисляет гидрохинон в радикал, и т. д.:

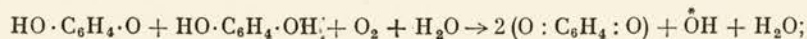


Для каталазы, которая разлагает перекись водорода на воду и молекулярный кислород и у которой в отличие от пероксидазы другого субстрата кроме  $\text{H}_2\text{O}_2$  нет, Габер и Вильштеттер дают следующую схему цепной реакции:

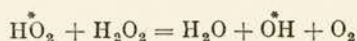
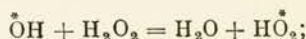


Посмотрим теперь, как экспериментальные данные, касающиеся действия пероксидазы и каталазы, согласуются с теорией Габера-Вильштеттера.

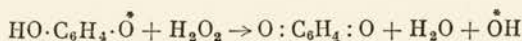
Если допустить, что пероксидаза вступает в реакцию не с перекисью водорода, а с субстратом, образуя из него радикал, то последний в отсутствие  $\text{H}_2\text{O}_2$  должен был бы, согласно основной схеме, быть в состоянии в качестве носителя цепной реакции реагировать с молекулярным кислородом и водою:



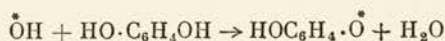
Другими словами, пероксидаза должна была бы обладать способностью окислять субстрат *не только посредством перекиси водорода, но и посредством молекулярного кислорода*. Но этого нет. Бах и Шода показали, что впервые выделенная ими растительная пероксидаза после очистки повторным растворением в воде и осаждением посредством спирта нисколько не ускоряет окисления молекулярным кислородом тех субстратов, окисление которых перекисью водорода она так энергично ускоряет. Факт этот подтвержден разными исследователями и вошел в литературу. Но ввиду того, что со времени моих первых опытов очистка ферментов достигла больших успехов (Вильштеттер получил препараты пероксидазы в 25—30 раз более активные, чем мои), я<sup>23</sup> счел нужным повторить свои опыты с препаратом, очищенным по самому усовершенствованному современному способу. И опять оказалось, что те субстраты, которые сами по себе не поглощают с измеримой скоростью молекулярного кислорода, первично образуя перекиси, пероксидазой в отсутствие  $\text{H}_2\text{O}_2$  не окисляются, те же субстраты, которые сами по себе образуют перекиси, окисляются *лишь по мере образования последних*. Поэтому предположение о промежуточном образовании радикала при действии пероксидазы на субстрат отпадает. Также отпадает предположение, что при действии радикала на перекись водорода образуется гидроксил как носитель цепной реакции. Если бы он образовался, то по вышеприведенным реакциям для каталазы:



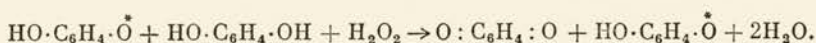
пероксидаза должна была также разлагать  $\text{H}_2\text{O}_2$ , с выделением молекулярного кислорода, как и каталаза. Но, как впервые было установлено Бахом и Шода<sup>24</sup>, пероксидаза в отличие от каталазы не выделяет из перекиси водорода ни следа молекулярного кислорода, — наблюдение, подтвержденное самим Вильштеттером<sup>21</sup> на его чистейших препаратах пероксидазы. Чтобы обойти это затруднение, Габер и Вильштеттер заменяют два уравнения:



и



одним уравнением



Этим они выражают положение, что первый радикал  $\text{HO} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \dot{\text{O}}$ , образовавшийся при действии пероксидазы на субстрат  $\text{HO} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{OH}$  в тройном столкновении с молекулой перекиси водорода и молекулой первоначального субстрата, сам претерпевает окончательное окисление в хинон, а из субстрата возрождает радикал. Но эта упрощенная схема мало чем отличается от обычного представления, по которому пероксидаза, гидрохинон и перекись водорода образуют комплекс, который распадается с образованием хинона, двух молекул воды и с возрождением активной пероксидазы:



Шансов встречи молекул для тройного столкновения в первом случае не больше, чем во втором, с тем отягчающим для схемы Габера и Вильштеттера обстоятельством, что длительность существования их радикала должна превышать частоту встречи трех молекул.

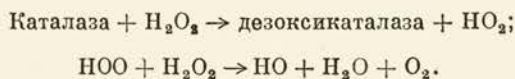
Применение схемы Габера и Вильштеттера к объяснению механизма действия каталазы на перекись водорода тоже наталкивается на серьезное затруднение. Если носителями цепной реакции разложения  $\text{H}_2\text{O}_2$  являются такие энергичные радикалы, как  $\dot{\text{H}}\text{O}_2$  и  $\dot{\text{O}}\text{H}$ , то всякое способное к окислению вещество, внесенное в систему «каталаза —  $\text{H}_2\text{O}_2$ », должно было бы, по имеющимся экспериментальным данным (Христиансен, Бакстром и др.), действовать как ингибитор, перехватывающий радикал и обрывающий цепную реакцию. Иначе говоря, система «каталаза —  $\text{H}_2\text{O}_2$ » должна была бы проявлять такие же окислительные свойства, как и система «пероксидаза —  $\text{H}_2\text{O}_2$ ». Первые исследователи каталазы склонны были приписывать этому энзиму окислительные свойства. Но теперь принято считать, что это не соответствует действительности. С своей стороны, после напечатания статьи Габера и Вильштеттера, я еще раз проверил этот вопрос и показал, что те субстраты (например, гваякол), на которые перекись водорода в отсутствие пероксидазы действует очень медленно, системой «каталаза —  $\text{H}_2\text{O}_2$ » вообще не окисляются и не влияют на скорость разложения  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Что же касается субстратов, на которые  $\text{H}_2\text{O}_2$  действует с измеримой скоростью (например, гидрохинон), то их окисление не только не ускоряется каталазой, но сильно замедляется вследствие быстрого разложения  $\text{H}_2\text{O}_2$  с выделением инертного кислорода.

Итак, пероксидаза не ускоряет окисления субстратов молекулярным кислородом, как она должна была бы действовать, если бы первой фазой реакции было моновалентное окисление субстрата пероксидазой с образованием радикала по схеме Габера и Вильштеттера. Пероксидаза не разлагает перекиси водорода с выделением молекулярного кислорода, как она должна была бы делать, если бы промежуточным продуктом реакции был гидроксил. Каталаза не ускоряет окислительного действия  $H_2O_2$ , как она должна была бы делать, если бы промежуточными радикалами в реакции были  $HO_2$  и  $\dot{O}H$ . Схемой Габера и Вильштеттера механизм разложения перекиси водорода под действием пероксидазы и каталазы еще не установлен.

Катализаторы как неорганические, так и биологические, способны изменять скорость только таких реакций, которые в определенных условиях могут протекать сами по себе. Поэтому в механизме действия пероксидазы и каталазы на перекись водорода решающим моментом являются те направления, по которым может пойти разложение  $H_2O_2$  само по себе. Этих направлений три:

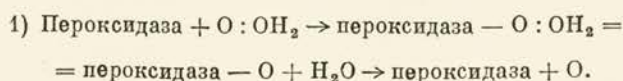
- 1)  $H_2O_2 = HO_2 + H \dots \dots \dots 67$  ккал;
- 2)  $H_2O_2 = HO + OH \dots \dots \dots 49$  ккал;
- 3)  $H_2O_2 = H_2O + O \dots \dots \dots 35$  ккал.

При действии каталазы Габер и Вильштеттер принимают распад молекулы  $H_2O_2$  в направлении  $H$  и  $HO_2$  и дальнейший распад  $HO_2$  в направлении  $O$  и  $OH$ :



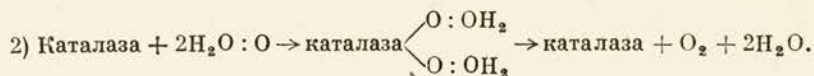
Что касается действия пероксидазы, то в первом варианте схемы допускается образование радикала  $OH$  из  $H_2O_2$ , а во втором вообще не указывается, как происходит разложение  $H_2O_2$ .

В предположении, что при действии каталазы  $H_2O_2$  распадается в направлении  $H$  и  $HO_2$ , Габер и Вильштеттер опираются на «сравнительно скромную энергию», которая требуется для отрыва атома водорода от  $H_2O_2$ . Но если считать с тепловыми величинами, то распад  $H_2O_2$  на  $O + H_2O$  требует вдвое меньше энергии, чем распад на  $H + O_2H$ , а если принять еще во внимание существование между  $H_2O_2$  и  $H_2O + O$  вышеупомянутого промежуточного продукта  $H_2O : O$ ; образование которого из  $H_2O_2$  требует еще меньше энергии, чем распад на  $H_2O + O$ , то покажется весьма вероятным, что и пероксидаза и каталаза реагируют непосредственно не с устойчивой формой перекиси водорода  $HO \cdot OH$ , а с ее активированной формой  $HO_2 : O$ , и тогда достаточно допустить, что первая способна реагировать только с одной молекулой  $H_2O : O$ , а вторая только с двумя одновременно, чтобы дать представление о механизме действия и о характере специфичности этих двух ферментов:



Пероксидаза образует с молекулой активной перекиси комплекс, который при наличии окисляемого субстрата распадается на пероксидазу,

атомный кислород и воду. В отсутствии окисляемого субстрата этот комплекс довольно устойчив, кислорода в свободном виде не выделяет и только по прошествии некоторого времени теряет свои окислительные свойства вследствие медленного разрушения пероксидазы активным кислородом:



В малоустойчивом комплексе, образуемом каталазой с двумя молекулами  $\text{O} : \text{OH}_2$ , активные атомы кислорода вследствие пространственной близости реагируют между собой скорее, чем с прибавленным окисляемым субстратом, и поэтому комплекс выделяет молекулярный кислород, не производя никакого окислительного действия.

Активирование молекулы перекиси водорода, превращение ее из  $\text{HO} \cdot \text{OH}$  в  $\text{O} : \text{OH}_2$  происходит в случае пероксидазы за счет энергии, выделяющейся при окислении субстрата, в случае каталазы — за счет энергии, выделяющейся при соединении двух атомов кислорода в молекулу.

В связи с действием пероксидазы и каталазы на перекись водорода интересно отметить, что в силу своей специфичности биологические катализаторы, ферменты являются более совершенным орудием исследования определенных сторон гетерогенного катализа, чем неорганические катализаторы, которые строго определенной специфичностью не отличаются. Например, коллоидальная платина или платиновая чернь быстро и количественно разлагают перекись водорода на воду и молекулярный кислород, т. е. действует, как каталаза. Если к системе «платина — перекись водорода» прибавить окисляемое вещество, то происходит энергичное окисление его, т. е. платина тут действует, как пероксидаза, ускоряя окислительное действие перекиси водорода. Вместе с тем та же коллоидальная платина, или платиновая чернь, энергично ускоряет окисление субстратов молекулярным кислородом, т. е. действует, как «оксигеназа». Только благодаря строгой специфичности пероксидазы и каталазы можно было доказать, что к этим ферментам схема гетерогенного катализа Габера-Вильштеттера не применима и что вся схема нуждается в серьезном пересмотре.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изложенные в этой статье факты и соображения дают, мне кажется, возможность составить себе более или менее ясное представление о современном состоянии проблемы аутоокислации и активации молекулярного кислорода.

Основные положения теории Энглера-Баха, согласно которым отношение химических соединений к молекулярному кислороду при обыкновенной температуре определяется их насыщенным или ненасыщенным состоянием, их степенью родства к кислороду, а не случайным появлением атомов кислорода или водорода, остается в полной силе. Сродство ненасыщенных химических веществ к кислороду находит свое выражение в том, что благодаря своей свободной энергии они могут вывести молекулярный кислород из его инертного состояния, активировать его, чего насыщенные вещества не могут осуществить с измеримой скоростью. При этом в первую очередь активированная молекула кислорода, как целое, присоединяется к субстрату, образуя перекись. Упомянутые выше новейшие кинетические опыты Бодлендера, Поланьи и Гартека полностью подтвердили взгляды Баха и Энглера.

Применение Бодлендером принципа цепных реакций к процессам аутооксидации несомненно является удачным углублением теории Баха-Энглера в определенных случаях. Дальнейшим этапом развития этих идей является разработанная Н. Н. Семеновым теория разветвляющихся цепных реакций. Но далеко не все реакции аутооксидации носят цепной характер, как это показывает пример окисления трифенилметила. Из того, что непременным условием всякого окислительного процесса при обыкновенной температуре является наличие в окисляющемся веществе свободной энергии в количестве, достаточном для активирования молекулы кислорода, вытекает, что нельзя делать заключения на основании процесса окисления насыщенного соединения при повышенной температуре о механизме окисления его при обыкновенной температуре, ибо энергетическое состояние насыщенного соединения при повышенной температуре далеко не то, что при обыкновенной. Исследуя диссоциацию насыщенных углеводородов при повышенной температуре в отсутствие кислорода, Нюит нашел, например, что гексафенилэтан около  $500^{\circ}$  распадается на метан, водород и ненасыщенные соединения. Нет никакого сомнения, что активирование молекулы насыщенного углеводорода, начало его распада на ненасыщенные элементы происходит при еще более низкой температуре. А из этого следует, что насыщенные углеводороды находятся при повышенной температуре в таком же состоянии, как ненасыщенные при обыкновенной, и с молекулярным кислородом реагируют, как последние, т. е. присоединяют молекулу с первичным образованием перекиси. Механизм первоначальной реакции в обоих случаях один и тот же, но дальнейший ход ее различен, так как образовавшаяся перекись реагирует при повышенной температуре быстрее и иначе, чем при обыкновенной. То же относится и к другим продуктам реакции. Поэтому при горении водорода из первично образовавшейся перекиси водорода может получиться гидроксил, который при действии атомного водорода на молекулярный кислород при обыкновенной температуре не образуется.

Что касается исследований о роли тяжелых металлов, в частности железа, как переносчиков кислорода в процессах аутооксидации, то этот вопрос должен стать предметом отдельного обзора. Но тут есть много оснований считать, что железо не переносит молекулярный кислород, а активирует перекиси, образующиеся при действии ненасыщенных субстратов на молекулярный кислород.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бах. О роли перекисей в процессах медленного окисления.— ЖРФХО, **29**, 373 (1897); настоящая книга, стр. 242.
2. Бах. Окислительные процессы в живой клетке [Oxydationsprozesse in der lebenden Substanz]. В кн.: Oppenheimers Handb. d. Biochemie. Ergzshd., 178 (1913) Jena.
3. Бах. Химизм дыхательных процессов.— ЖРФХО, **44**, № 1—2 (1912); настоящая книга стр. 50.
4. Bodländer. Über langsame Verbrennung.— Samml. chem. u. chem.-techn. Vortr., **3**, 385 (1899).
5. Engler u. Weissberg. Kritische Studien über die Vorgänge der Autoxydation. (1904) Braunschweig.
6. Бах. О роли перекисей в процессах медленного окисления [Du rôle des peroxydes dans les phénomènes d'oxydation lente].— C. R. Acad. Sci., Paris, **124**, 951 (1897); настоящая книга, стр. 242.
7. Engler u. Wild. Ber. Dtsch. chem. Ges., **30**, 660 (1897).
8. Wieland. Über Hydrierung u. Dehydrierung.— Ber. Dtsch. chem. Ges., **45**, 679 (1912).
9. Wieland. Über d. Mechanismus d. Oxydationvorgänge.— Ergebn. Physiol., **20**, 477 (1922).

10. Bredig u. Sommer. *Zs. physiol. Chem.*, **70**, 34 (1909).
11. Traube u. Willilange. *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **59**, 2860 (1926).
12. Бах и Николаев. *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **64**, 2769 (1931); ДАН СССР, **11**(1932); настоящая книга, стр. 312.
13. Bodenstein. *Zs. physik. Chem. (B)*, **12**, 151 (1930).
14. Kistiakovski u. Lenner. *J. Amer. Chem. Soc.*, **52**, 3785 (1930).
15. Kistiakovski u. Spence. *J. Amer. Chem. Soc.* (1930).
16. Haber. *Zs. physik. Chem.*, **34**, 513 (1900); **35**, 609 (1900).
17. Haber. *Naturwissensch.*, **19**, 450 (1931).
18. Hartel u. Polanyi. *Zs. physik. Chem. (B)*, **11**, 97 (1928).
19. Haber u. Sachs. *Zs. physik. Chem.*, Bodenstein Festschrift, 831 (1931).
20. Geib u. Harteck. *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **65**, 1551 (1932).
21. Haber u. Willstätter. *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **64**, 2844 (1931).
22. Backstrom. *J. Amer. Chem. Soc.*, **40**, 1460 (1927).
23. Бах. *Журн. физ. хим.*, **4**, 505 (1933); настоящая книга, стр. 318.
24. Бах. [совм. с Шодал]. О пероксидазе [Über Peroxydase].— *Ber. Dtsch. chem Ges.*, **36**, 600 (1903); настоящая книга, стр. 349.

---

## БИОЛОГИЧЕСКОЕ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ \*

В основе главнейших жизненных явлений лежат химические процессы, катализируемые ферментами. Этим обусловлен тот исключительный интерес, который возбуждает изучение ферментов. Обратимость ферментативного действия зависит не от объемных концентраций субстрата, а от тех концентраций, которые имеют место на несущих фермент поверхностях. Важным с общепарафизиологической точки зрения является изучение ферментативных синтезов, в особенности в живой клетке. Большой интерес представляет изучение ферментативного комплекса, обуславливающего фиксацию азота у некоторых микроорганизмов. С этим связаны ведущиеся исследования по превращению глюкозы в щелочной среде в присутствии катализаторов. Исключительное значение имеют ферменты в технологии ряда пищевых производств.

Цель доклада — выявить общие линии как теоретической, так и практической научно-исследовательской деятельности Института биохимии, созданного год тому назад в Биологической группе Академии Наук, и вместе с тем дать краткий обзор тех работ, которые были сделаны в течение истекшего года в этом Институте.

В основе жизненных явлений — дыхания, питания, роста, размножения — лежат процессы химического превращения веществ, главным образом органической природы, входящих в состав живой клетки. Эти органические вещества (белки, углеводы, жиры), которые в организме претерпевают очень быстрые превращения, вне организма являются значительно более устойчивыми. Из этого следует, что вне организма эти вещества не встречаются с теми факторами, действие которых обуславливает их быстрое превращение. Эти факторы принадлежат к категории так называемых биологических катализаторов, ферментов или энзимов, систематическое исследование которых было начато более ста лет тому назад и продолжается до сих пор. Несмотря на вековую исследовательскую работу, до сих пор мы о ферментах знаем очень мало, мало знаем о их химической природе, мало знаем о сущности их специфических свойств. С конца прошлого века, после того как школой Вильгельма Оствальда вопрос о ферментах был поставлен на почву катализа и коллоидной химии, почти все энзимологи обращали исключительное внимание на химическое и физико-химическое изучение ферментов, оставляя несколько в тени их действие в самом организме. Между тем действие фермента изолированного, более или менее очищенного, переведенного в водный раствор, т. е. действие того препарата, который мы получаем путем различных физико-химических операций, значительно отличается от действия того же фермента в живом организме. Как показали опыты А. И. Опарина, значительная часть каж-

---

\* Доклад, сделанный на заседании Биологической группы Академии Наук СССР 27 января 1936 г. [Изв. АН СССР, сер. биол., № 4, 627 (1936)].

дого из ферментов живой клетки находится в адсорбированном состоянии на коллоидных частицах. Поскольку эти ферменты адсорбированы, они неактивны в отношении гидролитического действия, т. е. они не действуют на свои субстраты в смысле разложения этих субстратов на более простые части; но вместе с тем обнаружено, что в этих условиях выявляется обратимость действия ферментов, т. е. превращение продуктов гидролиза в первоначальный субстрат. Таким образом, активность ферментов в живой клетке зависит в значительной степени от состояния адсорбции, в котором они находятся. Все то, что содействует переводу ферментов из адсорбированного состояния в свободное, из макрогетерогенного состояния в микрогетерогенное, содействует процессу распада; все то, что действует в противоположном направлении, помогает обратному процессу, т. е. процессу синтеза.

Эти соображения о характере действия ферментов в живой клетке легли в основу одного из главных направлений в работе Института биохимии. Работы эти начаты А. И. Опариным и его группой несколько лет тому назад. В текущем году, в порядке плановой работы, в нашем Институте выполнен ряд исследований, принесших чрезвычайно ценные экспериментальные подтверждения тем взглядам, которые были высказаны о характере деятельности ферментов в живой клетке. Работами А. Л. Курсанова о синтезе сахара в живых листьях было показано, что путем искусственного внедрения в живой лист раствора инверта или сахарозы можно исследовать равновесие между указанными монозами и биозой в условиях живой клетки. Введение в живой лист препарата инвертазы лишь ускоряет наступление равновесия, но не смещает его. Напротив, такого рода воздействия, как, например, завяливание, действие наркотиков и т. д., смещают это равновесие в сторону гидролиза.\* Д. М. Михлиным была выполнена работа по синтезу молочного сахара из глюкозы и галактозы под действием препарата фермента из молочной железы и установлены интересные закономерности, касающиеся синтезирующего и гидролизующего действия этого фермента.\*

Другим направлением исследовательской работы Института биохимии является работа о роли окислительно-восстановительных ферментов в живой клетке. Вопросом об окислительно-восстановительных процессах и катализаторах, которыми они управляются, я занимаюсь уже несколько десятков лет. Когда 15 лет назад А. И. Опарин вступил в сотрудничество со мной, он занялся изучением этих процессов. В течение всего времени, которое прошло с тех пор, он не терял эти явления из вида при исследовании роли пигментов в процессе дыхания. Когда у нас в Союзе стало развиваться производство чая из чайного листа, А. И. Опарин в контакте с Институтом чайного хозяйства и со всеми заинтересованными организациями поставил ряд работ частью на местах, частью в пределах Института. Содержание этих работ изложено в статье А. И. Опарина. Я укажу здесь только на то, что в основном чайное производство покоится на окислительных процессах. Поэтому предшествующее углубленное исследование этих процессов позволило Опарину разобратся в весьма сложной картине тех явлений, которые имеют место при производстве чая. В результате этих работ были установлены определенные методы механической обработки чайного листа. Надо сказать, что вопрос о технологических процессах в этой отрасли производства изучен чрезвычайно слабо. За границей, в капиталистических странах, эти процессы не вышли еще из стадии примитивной техники.

\* Указанные работы опубликованы в «Известиях Академии Наук СССР, серия биологическая» за 1936 г.



С изучением биокаталитических окислительно-восстановительных процессов связаны работы, которые были поставлены мной в сотрудничестве с Э. В. Ермольевой по вопросу о биологическом связывании атмосферного азота в условиях обыкновенной температуры и давления. Вопрос этот представляет огромный интерес с следующей точки зрения. Присматриваясь к тем технологическим процессам, которые до некоторой степени могут быть сравниваемы с биологическими, мы констатируем, что в то время как живая клетка чрезвычайно экономно обращается с источниками энергии, техника тратит источники энергии довольно широко. Возьмем, в частности, вопрос о связывании азота. Для того чтобы связать атмосферный азот с водородом и превратить его в аммиак, техника требует давления в 1000 атмосфер и температуры в несколько сот градусов. Между тем живая клетка использует для этой цели то сравнительно ничтожное количество энергии, которое она получает при окислении глюкозы или маннозы, прибавленной в культуру бактерий. Она осуществляет этот процесс при обыкновенной температуре и обыкновенном давлении. Кроме того, в технике водород, который присоединяется к азоту, получается особо, и это — процесс, который требует еще дополнительной затраты энергии. Живой организм, живая клетка должны сами получить в свободном виде тот водород, который соединяется с азотом для получения аммиака.

В чем коренная причина этой разницы? Почему живой организм, живая клетка могут осуществлять путем сравнительно небольшой затраты энергии такие химические реакции, которые в технике требуют огромных затрат? Так как мы отвергаем какие-либо виталистические объяснения, то единственная рабочая гипотеза для объяснения этого явления заключается в том, что живая клетка обладает способностью использовать энергию, которая освобождается в процессе реакции, использовать эту энергию ранее, чем она превратится в тепло, использовать ее как концентрированную химическую энергию, дающую возможность осуществлять реакции, которые в технике требуют очень высокого напряжения. Вот эта коренная проблема, интересующая и биологию, и биохимию, и физическую химию, меня давно волновала и интересовала, и в качестве подхода к ней я остановился на процессе связывания азота. Почему именно на этом процессе? Все сведения, которые имеются в настоящее время, указывают на то, что в живых клетках фактором, обуславливающим энергетические изменения, является не сама клетка, как единое живое целое, а те ферменты, или биокатализаторы, которые ускоряют химические реакции клетки. Поэтому представлялось интересным выделить из бактерий те активные ферменты, благодаря изучению которых можно было бы получить сведения о химических и физико-химических процессах, происходящих при связывании азота. Кроме того, конечно, определяющим фактором являлась и практическая сторона этого процесса.

В сотрудничестве с Ермольевой и Степаньян была поставлена работа в Институте имени Баха, который в настоящее время перешел в ведение ВИЭМ, и там было установлено, что путем бухнеровского метода можно извлекать из культур азотобактера соки, которые не содержат никаких жизнеспособных элементов, но могут связывать атмосферный азот, превращая его в аммиак, если им дать в качестве источника энергии глюкозу или маннозу.

Если с точки зрения микробиологической эта работа в течение истекшего года не дала желаемых результатов, то на ее основе была проведена в Физико-химическом институте им. Л. Я. Карпова интересная работа, которая проливает совершенно новый свет на один из коренных вопросов обмена веществ в живой клетке. Исследование различных ферментных препаратов показало, что те препараты, которые давали меньше аммиака

выделяли в процессе своего действия водород, если к ним добавляли глюкозу. Это было проверено на ряде опытов. Возник чрезвычайно интересный вопрос, откуда берется этот водород. Это было тем более интересно, что давало возможность подойти к вопросу о том, как живая клетка может предполагать водородом, который она извлекает из воды.

Я поставил предварительные опыты в Институте им. Л. Я. Карпова, заменив ферментный препарат платиновой чернью. Оказалось, что если прибавить к раствору глюкозы платиновую чернь в слабощелочном растворе и пропускать воздух, то в некоторых случаях идет частичное поглощение кислорода, а затем начинается выделение водорода, и чем быстрее идет реакция окисления, т. е. чем активнее платина, тем скорее и тем в большем количестве выделяется водород. В сотрудничестве с Алексеевой и Древингом эти реакции были подвергнуты мною всестороннему изучению. Прежде всего мы поставили опыты в высоком вакууме, в абсолютном отсутствии кислорода с полным учетом продуктов реакции. Оказалось, что даже в этих условиях, если обрабатывать глюкозу в щелочном растворе платиновой чернью, то выделяется водород в значительных количествах. Например, при обработке 10 г глюкозы выделялось 230—240 мл водорода.

Исследование продуктов реакции показало, что почти половина исчезнувшей при реакции глюкозы превратилась в глюконовую кислоту; никаких других, ни летучих, ни нелетучих кислот в смеси не было найдено, но зато было обнаружено значительное количество продукта восстановления глюкозы — сорбита. Сорбита образовалось около двух третей от количества найденной в смеси глюконовой кислоты. Оказывается, что водорода выделяется как раз столько, сколько необходимо для того, чтобы путем восстановления глюкозы привести количества глюконовой кислоты и сорбита к эквивалентности. Другими словами, изменение глюкозы под действием платиновой черни, т. е. первая фаза превращения глюкозы, заключается в том, что гидроксил окисляет молекулу глюкозы в глюконовую кислоту, в то время как другая молекула глюкозы водородом воды восстанавливается в сорбит. Следует отметить, что, как я установил на основе опыта, в таких реакциях процесс восстановления идет гораздо медленнее процесса окисления. Если взять, например, формальдегид, то в присутствии слабых щелочей он превращается в муравьиную кислоту и метиловый спирт. По мере увеличения концентрации щелочи количество образующейся муравьиной кислоты очень быстро возрастает, но выделяющийся водород не успевает превращать альдегид в метиловый спирт и выделяется в виде газа. Образующаяся муравьиная кислота эквивалентна количеству образовавшегося метилового спирта и выделившегося водорода, т. е. наблюдается то же явление, как и в случае превращения глюкозы.

Описанную реакцию мы изучили с точки зрения влияния концентрации щелочей, концентрации катализатора, температуры и т. д. Интересно, что когда реакция протекает в высоком вакууме при температуре 15—25°, получается, как я говорил, глюконовая кислота, сорбит и такое количество водорода, какое должно быть потреблено для того, чтобы сорбит был эквивалентен глюконовой кислоте. Если же мы ведем реакцию при 45°, то картина меняется, и продукты распада получают другие. В литературе по вопросу о действии металлов платиновой группы на глюкозу и вообще на углеводы есть только одна работа Виланда, который в связи со своей теорией дегидрирования проверял действие палладия на глюкозу при нагревании. Он также наблюдал выделение водорода и получил целый ряд продуктов разложения, природу которых, однако, не изучал. Это единственное указание в литературе по вопросу об образовании водорода из углеводов.

Кроме глюкозы, мы поставили опыты с другими альдозами (галактозой и арабинозой) и получили такие же результаты, т. е. в условиях мягкого воздействия — высокого вакуума и обыкновенной температуры — мы наблюдали реакции, приводящие к образованию продуктов восстановления субстрата и продуктов его окисления. Следует отметить, что несколько лет тому назад Мюллер открыл так называемую «глюкооксидазу», т. е. такой окислительный фермент, который, по его мнению, окисляет глюкозу только в глюконовую кислоту, не давая других продуктов реакции. Так как он не искал продуктов восстановления, он их и не обнаружил, а нашел только глюконовую кислоту. Эта глюконовая кислота образуется, однако, не в результате кислородного окисления глюкозы, а благодаря первичной реакции распада, о которой я говорил.

Мы в самое последнее время поставили опыты над окислением глюкозы в тех же условиях концентрации гидроксильного иона, но в атмосфере кислорода. Мы пропускали кислород через щелочный раствор глюкозы в присутствии платиновой черни и также наблюдали образование сорбита и выделение газообразного водорода.

Итак, опыты, которые мы проводили, показывают, что в первой фазе не происходит распада молекулы глюкозы на триозы, а происходит лишь разрыв того кислородного мостика, который соединяет первый и пятый атомы углерода; при этом образуется истинный альдегид, который подвергается каталитическим реакциям за счет элементов воды. За счет гидроксила он окисляется в глюконовую кислоту, а за счет водорода восстанавливается в сорбит. Некоторая доля водорода выделяется в молекулярном состоянии.

Мы проделали те же опыты с фруктозой и выделили из продуктов ее окисления арабионовую кислоту, метиловый спирт и небольшое количество муравьиной кислоты, так что и тут в первую очередь происходит передвижение элементов воды.

Следует напомнить здесь ту мысль, которую А. Бейер высказал в 1871 г., а именно, что в биохимических процессах, в процессах брожения и т. д. происходит передвижение элементов воды — гидроксила и водорода. Уже давно указывалось на то, что в процессах дыхания анаэроботические процессы предшествуют окислительным процессам, в которых участвует кислород. Это соображение безусловно правильно в том отношении, что действительно первый акт распада углевода заключается в том, что посредством передвижения элементов воды он превращается в продукты восстановления и продукты окисления.

Я хочу еще остановиться на следующем. Те опыты, о которых я вам рассказывал, интересны и с более широкой, философской точки зрения.

Наш уважаемый коллега, академик Вернадский, недавно очень обстоятельно развил и обосновал тот взгляд, что свободный кислород в земной атмосфере появился лишь в результате действия растений и что жизнь на земле началась раньше, чем появился свободный воздух. Повидимому, первоначальной формой жизни на земле был анаэробизм. У нас сейчас принято считать, что анаэробизм — регрессивное явление и что в основном жизнь связана с окислением кислородом. В свете того коренного факта, который приводит академик Вернадский, в свете того, что первым актом жизни является анаэробизм, нужно думать, что анаэробизм — не продукт регрессивной эволюции, а начальный этап эволюции в жизни на земле.

Я изложил направления тех работ, которыми мы занимались с точки зрения теоретической. Но мы не упустили из вида и целого ряда вопросов прикладного характера. Я уже указывал, что А. И. Опарин, изучая окислительно-восстановительные процессы *in vitro*, пришел к изучению этих же процессов в чайном производстве, где они играют решающую

роль. Ведь получение чая из чайного листа основано исключительно на окислительно-восстановительных процессах. Но об этом вам здесь доложит сам А. И. Опарин.

Затем мы, много работая над такими ферментами, как амилаза и др., натолкнулись на ту мысль, что эти ферменты должны играть громадную роль в биохимических производствах, в ряду которых на первом месте стоит производство хлеба. Нужно сказать, что производство хлеба в нашей стране — это такое производство, равного которому нет нигде в мире. Достаточно сказать, что наша страна производит ежедневно около 150 млн. кг хлеба, для того чтобы удовлетворить колоссальные потребности населения.

Если мы взглянем на историю процесса хлебопечения, то увидим, что совершенствуются месильные машины, механизмуется подача теста в печь и т. д., но химизм процесса, его биохимическая основа, остается пока в стороне. Поэтому мы считаем, что пора биохимии, в частности нашему Институту, стать поближе к этому производству с целью создания строго научных основ хлебопечения. Сейчас научно обоснованного технического контроля в хлебном производстве еще нет. Сырье стандартизируется лишь в том отношении, что хорошие практики смешивают разного рода муку (так называемая валка), но они руководствуются при этом своей интуицией, а не научными данными.

В основе производства печеного хлеба лежат два фактора: фактор микробиологический и фактор энзимологический. Мука содержит все те ферменты, которые содержит зерно. И эти ферменты в зависимости от условий производства, в зависимости от их предварительной истории могут играть положительную или отрицательную роль, и между этими двумя факторами — фактором микробиологическим и фактором энзимологическим — должна быть установлена тесная координация. Мука может быть очень хорошей с точки зрения энзимологической, но микробиологический фактор может не подходить к ее энзимологическим свойствам, и наоборот. О работах в области хлебопечения более подробно вам расскажет А. Островский.

Кроме работы в этой отрасли промышленности, мы заняты разрешением целого ряда других практических вопросов. Должен сказать, что мы, биохимики, в этом отношении находимся в благоприятных условиях, потому что, занимаясь теоретическими проблемами природы и действия ферментов, мы невольно наталкиваемся на такие вопросы, которые очень живо интересуют биохимические производства, играющие очень видную роль в народном хозяйстве.

Из этого вытекает, что центральным стержнем работы Института является изучение биологического катализа и использование наших знаний в этой области для разрешения коренных вопросов биологии и технологии. Этим определяются задачи нашего Института. Но одного этого еще недостаточно для определения его лица. Я хочу остановиться несколько на отношении между теорией и практикой в работах всех исследовательских институтов и, в частности, нашего.

Вопрос этот заострен. Мы стоим на той точке зрения, что наука вытекает из потребностей производства. Вся история науки, в частности химии, нагляднейшим образом доказывает, что наука развивается в тесной и непрерывной связи и взаимодействии с производством. Производство ставит проблемы перед теоретической мыслью. Теоретические исследования наталкиваются на такие явления, которые воздействуют на производство.

В этом отношении очень интересно то, что было некогда сказано великим Пастером. Пастер, как известно, в начале своей деятельности был крупным физиком. Он первый открыл оптические свойства органических соеди-

нений. Враги Пастера упрекали его в том, что он, крупный теоретик, занялся вдруг лечением шелкоичных червей, которых он никогда в глаза не видел, и целым рядом других прикладных вопросов, в которых он ничего не смыслил. Пастер им на это ответил, что нет никаких прикладных наук, а есть наука и ее применения. Этот великий исследователь природы был приведен к стихийному материалистическому пониманию мира.

Должен сказать, что у нас есть еще очень много хороших исследователей, научных работников, которые считают, что нельзя теоретическую науку путать с прикладными науками, что теоретическая наука — это одно, а производство — это другое. Мы категорически возражаем против этого. Мы считаем, что в стране социалистического строительства теоретическая наука должна идти на помощь практике, потому что перед нашей страной стоят еще великие и трудные задачи, и нет никакого сомнения, что в тот или другой момент нам придется бороться с врагами. И поэтому наша обязанность — обязанность теоретической науки — всемерно содействовать развитию практического ее применения.

Если взять еще современное стахановское движение, которое выявило огромнейшую производительность нового труда, то нет никакого сомнения в том, что на нас, работниках науки и техники, лежит обязанность всемерно содействовать поднятию устарелых технологических процессов до уровня новой динамики труда. Только в тесном единении, я скажу, в слиянии науки с трудом, лежит залог успеха, залог победы.

---

**ВСТУПИТЕЛЬНОЕ СЛОВО**  
**НА СОВЕЩАНИИ ПО ВОПРОСАМ БИОХИМИИ СОРТА**  
**И НАСЛЕДОВАНИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ \***

Выдвинутая товарищем Сталиным задача — доведение сборов хлеба по Союзу до 7—8 миллиардов пудов — сделалась основным лозунгом сельскохозяйственного производства нашей страны.

Решение этой задачи требует объединенных усилий работников всех отраслей сельскохозяйственной науки и производства и мобилизации всех сил и знаний.

Решающую роль в борьбе за высокие устойчивые урожаи должен сыграть правильный выбор сортов, о чем, в частности, свидетельствует внимание, которое уделяется партией и правительством вопросам селекции и семеноводства наших важнейших сельскохозяйственных культур.

И действительно, задачи, стоящие перед селекционной работой в нашей стране, чрезвычайно усложнились. Помимо высокой урожайности, сорта должны располагать и целым рядом других свойств. Сорта должны давать продукты высокого качества, характеризующиеся максимальным содержанием ценных в производственном отношении веществ и, одновременно, отсутствием веществ вредных. Сорта должны характеризоваться максимальным иммунитетом по отношению к болезнетворным агентам, отличаться устойчивостью к неблагоприятным климатическим условиям (жаро-, холодо- и засухоустойчивость), способностью к длительному хранению.

В создании таких сортов большую помощь селекции может и должна оказать биохимия, пути приложения которой в этой области обширны и многообразны.

Разрабатывая эффективные, но вместе с тем доступные методы для массового исследования растительного сырья, биохимия может принять участие в отборе для селекции исходного материала с высокими показателями питательной и технической ценности. Огромную роль должно сыграть изучение биохимических основ важнейших физиологических признаков растений, как иммунитет к микроорганизмам, устойчивость к засухе и холоду, скороспелость и т. д. Изучение особенностей ферментной системы различных видов и сортов растений приведет к отысканию объективных показателей, связанных с тем или иным из ценных свойств растения.

В особенности крупное значение приобретают эти исследования в области селекции, под которую они подводят новую, биохимическую основу.

Весьма перспективным является также изучение закономерностей в образовании веществ при скрещивании и отдаленной гибридизации,

---

\* Совещание, созванное Биологическим отделением Академии Наук СССР 16—18 апреля 1937 г. [Изв. АН СССР, серия биол., № 6, 1601 (1937)].

которое должно дать в руки селекционеру научные методы сознательного подбора пар.

Важнейшее значение имеет, наконец, изучение закономерностей в географической изменчивости химического состава растений, результаты которого найдут свое приложение при районировании культур, и т. д.

Совещание по биохимии сорта, созванное президиумом Биологической группы совместно с Институтом биохимии Академии Наук СССР (16—18 апреля 1937 г.), позволило установить, что по всем перечисленным направлениям в Советском Союзе осуществляется большая и напряженная работа. В особенности отрядным является тот факт, что и на опытных станциях, вдали от центров, зачастую ведутся работы, представляющие крупнейший научный интерес. Во многих случаях результаты проделанной работы настолько важны, что они уже в настоящее время могут претендовать на использование их в практической селекционной работе.

Одновременно на совещании был выявлен и ряд существенных недостатков проводимой на местах работы, из которых наибольшее значение следует придать разобщенности отдельных работников, отсутствию плановой координации и недостаточной разработанности некоторых методических вопросов.

Совещанием был принят ряд решений, осуществление которых в жизни должно повести к тесному сплочению как теоретических, так и практических работников, связанных с этой отраслью биохимии, и помочь им с честью справиться с возлагаемыми на нее по этой линии задачами.

## ПЕРЕКИСНАЯ ТЕОРИЯ ОКИСЛЕНИЯ \*

При изучении научных дисциплин в высшей степени важно не только уяснить себе то состояние, в котором дисциплина находится в данную эпоху, но также выяснить тот путь, которым она пришла к теперешнему состоянию, выявить ход развития идей, которые составляют научное творчество.

Я постараюсь очень кратко осветить историю идей о процессах медленного сгорания и об активации кислорода.

При ознакомлении с этой проблемой выносите впечатление, что основоположником всех идей, которые теперь считаются признанными в данном вопросе, был Шенбейн<sup>1</sup>. Шенбейн первый открыл тот факт, что при окислении легкоокисляемого вещества часть кислорода активируется, т. е. приобретает способность окислять такие вещества, которые не окисляются обыкновенным кислородом.

Он первый произвел блестящий количественный опыт, которым доказал это явление. Взбалтывая свежие стружки свинца с серной кислотой в присутствии кислорода, он нашел, что одновременно с образованием сернокислого свинца в растворе накапливается эквивалентное количество перекиси водорода. Таким образом, он подвел химическую основу под загадочное явление активации кислорода.

Дальше Шенбейн открыл озон. В то время озон не считался состоящим из трех атомов кислорода, как потом оказалось. Предполагали, что это новая модификация кислорода. Шенбейн получил озон не только действием тихого разряда на кислород, но констатировал также, что озон образуется при окислении фосфора в присутствии воды. Он доказал, что в растворе образуется при этом перекись водорода.

Это открытие привело его к мысли, что активирование кислорода обусловливается тем, что кислород состоит из двух модификаций, полярно противоположных. Одна из них тождественна с озоном, а другая тождественна с тем кислородом, который находится в перекиси водорода и который он назвал *антозоном*. Должен указать на то, что, изучая эти явления аутоокислации, Шенбейн установил, что активирование кислорода происходит не только путем образования перекиси водорода, но и путем образования соединений, которые он назвал «органическими веществами, ассоциированными с активным кислородом». Другими словами, в то время когда органические перекиси еще не были известны, он интуитивно предвидел их существование.

Само собой разумеется, что в то время состояние знаний было недоста-

---

\* Доклад на конференции, посвященной 40-летию перекисной теории Баха-Энглера в мае 1937 г. [Проблемы кинетики и катализа, 4, 18 (1940)].



точным, для того чтобы все концепции Шенбейна соответствовали действительности.

В частности, существование полярно противоположных соединений не выдержало критики. Точно так же мысль Шенбейна о том, что озон и антозон существуют в соединениях (например, озон в перманганатах и в двуокиси свинца, антозон — в двуокиси бария), не подтвердилась опытом.

Тем не менее уже из того, что сказано выше, можно видеть, что Шенбейн действительно сделал первые шаги к уяснению явлений медленного сгорания.

Сторонником Шенбейна был Клаузиус<sup>2</sup>, который тоже допускал существование озона и антозона, но потом, когда было открыто, что молекулы кислорода состоят из двух атомов, он пришел к выводу, что обычный кислород составлен из двух полярно противоположных атомов, подобно тому как хлористый натрий составлен из положительного натрия и отрицательного хлора.

Относительно озона он высказал правильную мысль, что озон образуется вследствие присоединения атома кислорода к молекуле кислорода.

Вант-Гофф<sup>3</sup> модернизировал в значительной степени в применении к аутоокислации эту концепцию, согласно которой кислород состоит из двух противоположно заряженных атомов. Он предположил, что в свободном кислороде имеются в равновесном состоянии молекулы, диссоциированные на два иона — положительный и отрицательный. Отрицательный ион гораздо легче соединяется с окисляемыми веществами и при этом освобождает второй ион, который также является активным кислородом.

Все эти теории при тщательном исследовании не дали сколько-нибудь положительных результатов. В частности, теория Вант-Гоффа была довольно скоро оставлена.

До сих пор мы рассматривали теорию Шенбейна (озон и антозон) и теорию Вант-Гоффа (кислород, распадающийся на ионы). Согласно этим теориям, считалось, что предварительным условием окисления является распад кислорода на две активные частицы.

Гоппе-Зейлер<sup>4</sup> пошел дальше. Он исходил из чисто биологических наблюдений, что вживой клетке происходят энергичные восстановительные процессы. В частности, он считал, что когда при распаде органических кислот выделяется углекислота, должен выделяться также и водород.

Этот атомарный водород обладает способностью расщеплять молекулу кислорода на атомы, связываясь с одним и освобождая другой. Гоппе-Зейлер считал, что атомы кислорода ничем не отличаются друг от друга, но тогда непонятно, почему один из этих атомов способен окислять трудноокисляемые, а другой — легкоокисляемые вещества.

Эта теория тоже не дала при проверке сколько-нибудь серьезного результата и была оставлена.

Тогда выступил со своей теорией Мориц Траубе<sup>5</sup>. Он исходил из положения, что без участия воды никакого окисления не происходит. Он указал, что, например, в абсолютно сухом кислороде натрий сохраняет свою блестящую поверхность и окись углерода не горит.

Он произвел такой опыт. Пламя окиси углерода он вносил в большую бутылку, содержащую невысушенный кислород. Там окись углерода продолжала гореть. Однако при перенесении пламени в бутылку, наполненную совершенно сухим кислородом, оно гасло.

Отсюда Траубе сделал вывод, что окисление происходит за счет гидроксидов воды, причем кислород соединяется с освобождающимся водородом и дает перекись водорода. Он считал, что даже водород *in statu nascendi* не может окисляться в отсутствие воды. Другими словами, интерпрети-

ровать его концепцию можно было только так, что атомный водород вытесняет из воды водород и соединяется с гидроксидом, образуя воду, а вытесненный водород соединяется с кислородом, образуя перекись водорода.

Тогда непонятно, почему атомный водород не соединяется непосредственно с кислородом, а продельывает своеобразное *perpetuum mobile*.

Между прочим, сам Траубе вскоре признал, что он не прав и что его теория не может считаться охватывающей все явления аутоокисации.

Что касается тех процессов самопроизвольного окисления, которые происходят в водных растворах, то здесь теория Траубе, несомненно, во многом соответствует действительности.

Следовательно, у Траубе было то преимущество, что он, как и Шенбейн, подвел химическую основу под активирование кислорода, признав единственным источником активирования расщепление  $H_2O$  на  $OH$  и  $H$  и окисление водорода молекулярным кислородом.

Для того чтобы все-таки объяснить все процессы самопроизвольного окисления, надо было только сделать допущение, которого Траубе не сделал, а именно, что всякое ненасыщенное соединение способно соединяться с молекулой кислорода, образуя перекись.

Это предположение было сделано одновременно мною<sup>6</sup> и Энглером<sup>7</sup> независимо друг от друга.

Таким образом, была создана та теория, которая названа перекисной теорией самопроизвольного окисления.

В чем она состоит? Она, во-первых, констатирует ошибочность предположения Траубе, что вода расщепляется гораздо легче, чем молекулы кислорода, что окисляемому веществу гораздо легче окисляться за счет гидроксидов воды, чем за счет молекулярного кислорода.

Второе положение требует, чтобы кислород был активирован. Кислород сам по себе не окисляет огромного количества веществ, и если присмотреться к тем веществам, которые окисляются свободным кислородом, то можно заметить, что все эти вещества — ненасыщенные соединения и обладают большой свободной энергией. Благодаря наличию этой энергии молекулярный кислород выводится из инертного состояния, что дает ему возможность присоединяться к окисляемому веществу.

Активацию кислорода можно было представить как расщепление молекулы кислорода на свободные атомы или как разрыв одной из двух связей, которые соединяют атомы кислорода в молекуле. В последнем случае образуется группа из двух соединенных между собой атомов кислорода, которая присоединяется к окисляемому веществу, причем получается перекись.

Это явление было подтверждено огромным количеством экспериментальных фактов: во всех случаях активированные атомы кислорода находились в виде перекиси.

Когда наша теория была опубликована, она не встретила никаких возражений в течение нескольких лет. Можно было подумать, что перекисная теория действительно никуда не годится, раз она никого не задевает.

Первым выступил Габер<sup>8</sup> в 1904 г. Он высказался не против нашего принципа активирования кислорода, но он считал, что есть две формы самопроизвольного окисления — в отсутствие воды и при ее наличии.

«Сухая» аутоокисация идет по схеме перекисной теории, но в случае примеси воды последняя принимает участие в реакции. Кислород распадается на два атома, причем один из атомов окисляет воду в перекись водорода, а другой активируется и производит окисление.

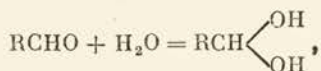
Каких-нибудь фактов в подтверждение этой теории Габер не приводил и в скором времени сам от нее отказался. Вторично Габер выступил лишь через 25 лет.

Таким образом, наша теория была принята большинством исследователей. Из нее были сделаны очень интересные выводы. Например, Фаррион доказал, что высыхающие масла образуют перекиси ненасыщенных жирных кислот. Он эти перекиси выделил и исследовал.

Только в 1912 г. Виланд<sup>9</sup> выступил с новой теорией — теорией дегидрирования. Заключается она в том, что для реакций, которые происходят в водных растворах, отрицается активирование кислорода. Виланд предполагает, что активируется водород и что этот активированный водород субстратом легко отдается «акценторам водорода». Последними могут быть хинон, метиленовая синь или молекулярный кислород. Виланд называет этот процесс дегидрированием и проводит свою точку зрения очень последовательно, особенно в вопросе о роли воды в биологии.

Он обосновывает ее следующим образом. Катализаторы, которые ускоряют гидрирование при определенной температуре, при другой температуре обладают противоположной способностью — ускорять дегидрогенизацию.

Отсюда Виланд делает вывод, что есть такая температура, при которой наблюдается равновесное состояние. Подобное равновесное состояние водорода в органических веществах может существовать при обыкновенной температуре, и тогда происходит гидрирование. Платина, например, по его словам, может от гидрохинона отнять водород, превратив его в хинон. Хинон может отнять водород от спирта, превратив последний в альдегид. Хинон, присоединив водород, превращается в гидрохинон, который с хиноном дает хингидрон. Альдегиды при окислении присоединяют воду



и затем водород одного гидроксила и водород, связанный с углеродом, отщепляются. В результате дегидрирования получается кислота.

Все это было бы очень хорошо, если бы опыты Виланда соответствовали действительности. К сожалению, опыты с дегидрированием гидрохинона были подвергнуты серьезной критике американским исследователем Джилеспи, который указал, что палладий Виланда содержал кислород. Этот кислород окислял гидрохинон, причем никакого дегидрирования палладием не было. Когда Джилеспи приготовил абсолютно чистый палладий, то никакого действия на гидрохинон в отсутствие кислорода палладий не оказал. Кроме того, Джилеспи указал, что палладий вообще не может дегидрировать гидрохинон. В другой работе Виланд пытался доказать, что хинон может дегидрировать этиловый спирт.

В сотрудничестве с Николаевым<sup>10</sup> очень точными опытами мы показали, что абсолютно сухой хинон и абсолютно сухой спирт не реагируют между собой. Окисление происходит со скоростью, приблизительно пропорциональной количеству прибавленной воды.

Вообще хинон как окислитель лишен каких-либо окислительных свойств в отсутствие воды. Хинон очень бурно окисляет пирогаллол и амины, но в полностью обезвоженных органических растворителях, например, в абсолютно сухом эфире, ацетоне и т. д., как мы показали, окисление не имеет места.

Другими словами, теория Виланда не соответствует фактам.

Например, реакцию Канниццаро Виланд объясняет взаимодействием двух молекул альдегида. Одна молекула альдегида дегидрирует другую, причем получаются спирт и кислота.

Если мы возьмем формальдегид, то сам по себе он не дегидрируется,

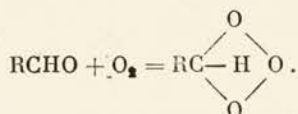
но в присутствии щелочи реакция идет очень быстро, причем спирт и кислота получают в эквивалентных количествах.

При повышении концентрации щелочи происходит выделение водорода. Объясняется это тем, что здесь реакция происходит по Морицу Траубе, за счет элементов воды, причем гидроксил окисляет одну молекулу альдегида, а водород восстанавливает другую. При увеличении концентрации щелочи окисление ускоряется, и быстро освобождающиеся водородные атомы легче соединяются друг с другом, чем с молекулами альдегида.

Таким образом, теория Виланда, действительно, совершенно не дает рационального объяснения тем фактам, которые происходят при окислении за счет элементов воды.

Эта теория наделала очень много шума в биологических науках, особенно в физиологии. Теперь это увлечение идет на убыль, так как доказано, что ряд фактов теорией Виланда не может быть объяснен.

Очень интересна дальнейшая разработка перекисной теории Боденштейном<sup>11</sup> на основе цепной теории. Он попытался применить ее к окислению альдегидов, предположив образование промежуточной перекиси. Как я указал, при действии молекулярного кислорода на альдегид происходит сразу присоединение целой молекулы, причем в силу строения альдегидов молекула кислорода может присоединяться только так, как присоединяется синильная кислота. В последнем случае водород соединяется с кислородом карбонила, а группа CN соединяется с углеродом. Точно так же, при окислении, молекула кислорода присоединяется одной связью к кислороду, а другой связью к углероду. Получается то, что можно назвать озонидом, — цепь из трех атомов кислорода:



Когда Бейер искусственно приготовил замещенные перекиси водорода, например, бензоилгидропероксид, он предложил мне и Энглеру согласиться с тем, что первым продуктом аутоокислации бензальдегида является именно это соединение  $\text{C}_6\text{H}_5\text{C} \cdot \text{O} \cdot \text{O} \cdot \text{OH}$ . Энглер в ряде очень изящных опытов показал следующее. Он приготовил бензоилгидропероксид, как обычно, и, с другой стороны, окислением бензойного альдегида. Оказалось, что при одинаковой концентрации связанного активного кислорода то соединение, которое получилось действием кислорода на альдегид, гораздо более активно и несомненно действует с большей скоростью, чем бензоилгидропероксид. Бензоилгидропероксид является устойчивой формой перво-

начальной перекиси  $\text{RC} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \diagdown \\ \text{--- H ---} \\ \diagdown \text{O} \diagup \end{array}$ .

Надо сказать, что голландский химик Йориссен<sup>12</sup> нашел условия, при которых около 80% всего бензойного альдегида могут быть превращены в бензоилгидропероксид.

Боденштейн, принимая озонидную структуру первичной перекиси, считает, что эта форма перекиси очень неустойчива и склонна переходить обратно в альдегид, отщепляя кислород.

Предпосылкой окисления бензальдегида Боденштейн считает наличие активированной молекулы самого альдегида, превращение  $\text{RCHO}$  в  $\text{RCH} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \diagdown \\ \text{---} \\ \diagdown \text{O} \diagup \end{array}$ .

Активированная форма альдегида присоединяет молекулу кислорода с образованием неустойчивой перекиси.

При столкновении этой активной молекулы с молекулой бензальдегида перекись отдает свой кислород молекуле альдегида и восстанавливается, причем получается активированная молекула альдегида.

Против последнего предположения я возражаю. Если реакция обратима, тогда должны восстановиться в первоначальном виде оба компонента. Так как одним компонентом был активированный альдегид, а другим компонентом — молекулярный кислород, то при обращении реакции должны получиться активированный альдегид и инертная молекула кислорода. Если активная молекула альдегида передала свою энергию активации молекуле кислорода, то она не может возродиться в активной форме, если же она сохранила свою энергию активации, тогда молекулярный кислород не в состоянии окислить неактивный альдегид.

Как Боденштейн объясняет это противоречие, — для меня непонятно. Он ссылается, между прочим, на работу Кистяковского<sup>13</sup> по исследованию окисления ацетилена. Там приводится изящный механизм, в котором, однако, не предполагается такой распад активированной молекулы, чтобы кислород стал окислять и в то же время ацетилен возродился в своей активированной форме.

Так обстоит дело с теорией Боденштейна.

Теперь я перейду к более новой теории Габера<sup>14</sup>. Габер в процессах самоокисления исходит из положения, что атом водорода при тройном столкновении с молекулами кислорода и водорода дает гидроксил и молекулу воды:  $H + O_2 + H_2 = HO + H_2O$ .

Дальше гидроксил реагирует с молекулой водорода, причем снова образуется атомный водород:  $OH + H_2 = H_2O + H$ .

По схеме Габера, активными центрами цепной реакции являются гидроксил и атом водорода.

Против наличия в этом случае цепной реакции, конечно, возражать нельзя, так как за это говорит ряд твердо установленных фактов. Точно так же нельзя возражать против того, что реакция может идти через радикалы.

Но на чем основывает Габер свою схему? Основной довод его заключается в том, что при горении водорода он констатировал образование гидроксила по спектру пламени. Исходя из этого, он строит свою теорию цепного окисления, считая, что при обыкновенной температуре атомарный водород действует так же, как водород при высокой температуре, т. е. расщепляет молекулярный кислород на атомы и образует с одним из них гидроксил.

Против этого взгляда можно возражать. Бонгеффер при действии избытка атомарного водорода на молекулярный кислород не нашел гидроксила не только при обыкновенной температуре, но даже при температуре  $700^\circ$ . Он пытается объяснить это тем, что гидроксильных образуются мало, почему их и не удается обнаружить. Тем не менее факт остается фактом. Бонгеффер не нашел гидроксильных, но нашел в продуктах реакции свыше 60% перекиси водорода.

Его ученик и друг Гартек был удивлен тем, что при избытке атомарного водорода перекись водорода могла сохраниться. Он пришел к выводу, что, повидимому, перекись водорода образовалась только на охлажденных частях аппарата, где реакция окисления не идет.

Гартек в сотрудничестве с Гейбом<sup>15</sup> построил очень остроумный прибор, в котором атомарный водород и молекулярный кислород реагируют при температуре жидкого воздуха. Они нашли, что в этих условиях кислород и водород соединяются, образуя в больших количествах перекись во-

дорода. В некоторых опытах они получали 100% перекиси водорода. Ясно, что нельзя считать, что перекись водорода получается от соединения гидроксильных групп, как это думал Габер. В самом деле, если все образующиеся гидроксильные группы соединяются, образуя перекись водорода, то никакой цепной реакции не может быть.

Вообще против теории Габера я возражаю следующим образом. Нельзя на основе изучения реакций, которые происходят при высокой температуре горения водорода, выводить заключения о механизме низкотемпературного окисления.

Когда я спрашиваю, почему при высокой температуре происходят реакции окисления, не идущие при обыкновенной температуре, мне отвечают, что это вопрос кинетики: при высокой температуре реакции идут гораздо быстрее. Но почему же они идут быстрее? Можно ли считать, что насыщенный углеводород, на который кислород при обыкновенной температуре не действует, при повышенной температуре обладает теми же свойствами, что и при обыкновенной температуре? Ведь теперь уже есть целый ряд работ, которые показывают, что углеводороды при невысоких, сравнительно, температурах претерпевают термическую диссоциацию. Следовательно, при повышении температуры молекулы углеводорода изменяются: насыщенные углеводороды превращаются в ненасыщенные, их динамическое состояние не то, что при обыкновенной температуре.

Поэтому вывод Габера, что при обыкновенной температуре процессы окисления происходят по тому же механизму, что и при температуре повышенной, неправилен. При обыкновенной температуре нет термической диссоциации субстрата, нет распада молекулы кислорода на атомы.

Верно обратное предположение: при повышенной температуре реакции окисления происходят по тому же механизму, что и при обыкновенной, но продукты реакции изменяются быстрее.

Габер пытался вместе с Вильштеттером<sup>16</sup> применить свой цепной механизм к действию всех ферментов. Однако эта попытка провалилась: выводы теории Габера-Вильштеттера не были подтверждены опытом. Вышеприведенные соображения теоретического порядка заставляют также отказаться от этой теории.

Можно думать, конечно, что радикалы существуют и принимают активное участие в процессах самопроизвольного окисления. Работы Н. Н. Семенова<sup>17</sup> дали особенно важные указания на возможность образования разветвленных цепей, что может чрезвычайно ускорить окислительный процесс.

В 1897 г. и еще раньше я считал, что при окислении атомарного водорода кислородом образуется радикал  $\text{HO}_2$ , и два таких радикала могут соединиться с образованием промежуточного очень неустойчивого соединения, состоящего из двух атомов водорода и четырех атомов кислорода — аналог того, что потом Бейер считал озоновой кислотой.

Несомненно, что радикалы и цепные реакции существуют. Полного объяснения их вне перекисной теории я не вижу.

Правда и то, что перекисная теория не дает объяснения очень важным явлениям, которые изучаются Н. Н. Семеновым и его сотрудниками. Я имею в виду существование пределов по давлению. Перекисная теория не дает этого объяснения, но и другие теории тоже не дают. Н. Н. Семенов предложил теорию, основанную на предположении, что реакции идут при участии атомов кислорода.

Каким образом получают первичные атомы кислорода, Н. Н. Семенову, как он сам сказал, все равно.

Однако меня именно этот вопрос и интересует.

К сожалению, атомы кислорода обычно не появляются сами собой. Если вы ставите, например, опыты окисления этилового спирта и этилового альдегида молекулярным кислородом в абсолютно тождественных условиях, то ацетальдегид моментально начинает поглощать кислород, а этиловый спирт не поглощает.

Если причиной окисления является неизвестно откуда взявшийся атомарный кислород, почему же он появляется только в том сосуде, где есть ацетальдегид, а не в том, где находится спирт?

Из этого вытекает с абсолютной логичностью следствие, что именно ненасыщенное соединение, благодаря своему энергетическому состоянию, действует на молекулярный кислород, расщепляя одну из его связей. Именно потому, что одна из связей расщепляется, и может происходить реакция присоединения.

В своей последней работе об аутооксидации, появившейся после длительного перерыва, Габер замечает, что когда Бах и Энглер создали свою теорию ничего не было известно об энергии диссоциации и потому говорить о расщеплении нельзя было. А теперь мы знаем, что энергия, необходимая для разрыва связей молекулы кислорода, равна только 117 ккал, и поэтому с энергетической стороны вопрос потерял остроту.

Против этого положения я возражаю. Вопрос идет не о том, какое количество энергии нужно для того, чтобы диссоциировать молекулу кислорода. Я только утверждаю, что для разрыва одной связи в молекуле кислорода, причём два атома остаются связанными между собой, нужна меньшая энергия, чем для диссоциации молекулы на свободные атомы, независимо от того, какое абсолютное количество энергии при этом будет затрачено. Согласно Оствальду, который первый признал мою теорию, в первую очередь образуются те соединения, которые требуют меньшей затраты энергии. На первой стадии окисления образуются группы  $-O-O-$ , а не свободные атомы кислорода. Возражения Габера бьют, таким образом, мимо цели.

И вот я жду, чтобы новое развитие перекисной теории, основываясь на химической физике, дало объяснение всем опытным фактам, учитывая, что перекись водорода и другие перекиси всегда образуются при окислении.

Только тогда будет решена задача, которую поставил и неудачно пытался решить Боденштейн, и перекисная теория ляжет в основу разработки химического механизма цепных реакций.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Schönbein. J. prakt. Chem., **93**, 24 (1864).
2. Clausius. Pogg. Ann., **103**, 644 (1858).
3. Van't Hoff. Zs. physik. Chem., **16**, 411 (1895).
4. Норре-Сейлер. Zs. physiol. Chem., **21** (1878).
5. Traube M. Ber. Dtsch. chem. Ges., **15**, 659, 2421 (1882).
6. Бах. ЖРФХО. **29**, 373 (1897); C. R. Acad. Sci., Paris, **124**, 951 (1897); настоящая книга, стр. 242.
7. Engler. Ber. Dtsch. chem. Ges., **30**, 660 (1897).
8. Haber. Zs. physik. Chem., **34**, 513 (1900); **35**, 609 (1900).
9. Wieland. Ber. Dtsch. chem. Ges., **45**, 697 (1912).
10. Бах и Николаев. ДАН СССР, **11** (1932).
11. Bodenstein. Zs. physik. Chem. (B) **12**, 151 (1930).
12. Jorissen et van der Beck. Rec. tr. chim. Pays-Bas, **49**, 138 (1930).
13. Kistiakovskiy a. Lehner. J. Amer. Chem. Soc., **52**, 3785 (1930).
14. Haber. Naturwiss., **65**, 450 (1931).
15. Geib u. Harteck. Ber. Dtsch. chem. Ges., **65**, 1551 (1932).
16. Haber u. Willstätter. Ber. Dtsch. chem. Ges., **64**, 2844 (1931).
17. Семенов. Цепные реакции, ГХТИ (1934).





*Часть II*

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ  
РАБОТЫ  
ПО ХИМИИ И БИОХИМИИ**

---



---

## Раздел I

# АССИМИЛЯЦИЯ УГЛЕКИСЛОТЫ И СВЯЗЫВАНИЕ АЗОТА

## ИССЛЕДОВАНИЯ ХИМИЧЕСКОГО МЕХАНИЗМА АССИМИЛЯЦИИ УГЛЕКИСЛОТЫ ХЛОРОФИЛЬНЫМИ РАСТЕНИЯМИ

[*Recherches sur le mécanisme chimique de l'assimilation de l'acide carbonique par les plantes à chlorophylle*] \*

### А. ОБЩАЯ ЧАСТЬ

#### Некоторые замечания о химических гипотезах, относящихся к ассимиляции углекислоты растениями

Современная химия доказала, что многие явления, происходящие в живых организмах, по существу своему идентичны с теми, которые происходят в неорганизованном веществе. В связи с этим в биологии появилось определенное стремление свести все физиологические явления — в особенности те, которые относятся к ассимиляции и диссимиляции, — к тем же физико-химическим законам, которым подчиняется неорганизованное вещество. Понятно, что такой существенный процесс, как ассимиляция углекислоты растениями, не остается в стороне от этого течения. Различные гипотезы стремятся объяснить химическими реакциями восстановление углекислоты и накопление в растениях энергетически высокоценных химических соединений, являющихся единственными продуктами питания для животных.

Не входя в изложение истории этого вопроса, я приведу здесь некоторые соображения, относящиеся только к тем гипотезам, которые непосредственно связаны с темой моей работы.

Согласно Либиху, кислоты жирного ряда — муравьиная, щавелевая, виннокаменная и т. д. — являются первыми продуктами восстановления углекислоты и превращаются при дальнейшем восстановлении в сахар и крахмал. Эта точка зрения, не соответствующая совокупности известных нам фактов, была оставлена вскоре после того, как А. Бейер высказал гипотезу, дающую значительно лучшее решение этой проблемы.

Основываясь на открытии Бутлерова, показавшего, что формальдегид полимеризуется под действием щелочей и превращается в сахаристое вещество, Бейер<sup>1</sup> предполагает, что первым продуктом восстановления углекислоты в растениях является формальдегид, который затем конденсируется и образует углеводы. С точки зрения разложения углекислоты все происходит так, как будто молекула углекислоты реагирует с молекулой воды, образуя молекулу формальдегида и молекулу кислорода:

---

\* Mon. sci., (4), 7, 669 (1893).



Возникает вопрос, происходят ли оба освобождающихся атома кислорода от полного восстановления углекислоты до углерода, который затем гидратируется, образуя формальдегид, или наполовину от углекислоты, восстанавливающейся до окиси углерода, и наполовину от воды, причем оба остатка CO и H<sub>2</sub> соединяются, чтобы образовать CH<sub>2</sub>O. Бейер и большинство авторов вслед за ним склоняются ко второму предположению. Проводя аналогию между хлорофиллом и гемоглобином крови, который, как известно, фиксирует окись углерода, он считает, что под действием солнечных лучей молекула углекислоты расщепляется так же, как и при высокой температуре, на окись углерода, которая связывается хлорофиллом, и на свободный кислород. С другой стороны, для того чтобы получить недостающий атом кислорода и свободный водород, необходимый для отщепления окиси углерода от хлорофилла и образования формальдегида, он допускает, что молекула воды распадается, не объясняя механизма этого разложения.

Несмотря на то, что присутствие формальдегида в зеленых листьях никогда не было доказано, существует целый ряд косвенных доказательств этой гипотезы. С одной стороны, работами Толленса, Лева и Фишера было определенно установлено, что формальдегид легко превращается в сахар типа глюкозы, в так называемую формозу; с другой стороны, Бокорни доказал, что растения могут непосредственно превращать формальдегид в крахмал. Для того чтобы выяснить, способны ли растения ассимилировать формальдегид, Бокорни<sup>2</sup> выращивал водоросли Spirogyra в отсутствие углекислоты, в искусственных питательных средах, к которым прибавлялся оксиметилсульфоновокислый натрий, разлагающийся на формальдегид и сернистокислый натрий. При этом наблюдалось значительное накопление крахмала, который мог образоваться только в результате превращения формальдегида.

Если формальдегид может заменять углекислоту в питании растений, давая тот же самый продукт ассимиляции, т. е. крахмал, то очевидно, что между этими двумя соединениями существует определенная связь и что формальдегид действительно является первым членом синтеза углеводов в растениях, независимо от того, образуется ли он в результате гидратации элементарного углерода или гидрогенизации окиси углерода. Однако, если основные принципы ассимиляции углекислоты, которые выдвигает гипотеза Бейера, не вызывают сомнений, то объяснение, которое она дает химическому механизму этого явления, совершенно неудовлетворительно.

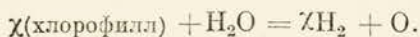
Как мы увидим ниже, вопрос о том, восстанавливается ли углекислота до окиси углерода или до углерода, совершенно несуществен, ибо углекислота участвует в реакции в виде гидрата CO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, или CO  $\begin{matrix} \text{OH} \\ \diagdown \\ \diagup \\ \text{OH} \end{matrix}$ .

Независимо от того, выделяется ли атом кислорода, связанный с углеродом, и один гидроксильный кислород или оба атома кислорода, связанные с гидроксильными, в результате образуется формальдегид и выделяется кислород. Поэтому нет никакой необходимости уподоблять хлорофилл гемоглобину, тем более что в действительности между ними нет аналогии. Способность гемоглобина связывать окись углерода приписывается присутствию в нем железа, — хлорофилл же не содержит, как это доказал Готье<sup>3</sup>, ни следа железа. Что же касается разложения воды, то оно остается необъясненным.

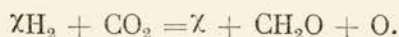
А. Готье<sup>4</sup> принадлежит попытка дать чисто химическое объяснение механизма ассимиляции углекислоты. Ему удалось избежать привлече-

ния таинственных причин для объяснения разложения воды, что необходимо в гипотезе Бейера, и является в конце концов лишь проявлением витализма. К сожалению, вполне последовательное объяснение, данное Готье, находится в явном противоречии с установленными химическими понятиями.

Так же как и Бейер, А. Готье<sup>5</sup> допускает, что система «CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O» разлагается, образуя формальдегид и кислород. Основываясь на том, что растения не ассимилируют окиси углерода, он предполагает, что хлорофилл разлагает воду под влиянием солнечных лучей, причем образуется бесцветный гидрид хлорофилла и выделяется кислород:



Далее он предполагает, что этот гидрид является промежуточным продуктом, восстанавливающим углекислоту, превращаясь вновь в зеленый хлорофилл:



А. Готье получил искусственно это водородное соединение, подвергая хлорофилл действию водорода *in statu nascendi*. С другой стороны, Тимирязев<sup>6</sup> установил, что восстановленный хлорофилл, находящийся в присутствии CO<sub>2</sub> в запаянной трубке, становится вновь зеленым под действием солнечных лучей, в то время как в темноте он остается желтоватым или красноватым. Тимирязев также показал, что в этиолированных растениях имеется восстановленный хлорофилл, который зеленеет при окислении на свету<sup>7</sup>. На основании этих фактов Готье приходит к выводу, что восстановление углекислоты в растениях действительно определяется присутствием восстановленного хлорофилла, который он сравнивает с белым индиго.

Тот факт, что водород *in statu nascendi* восстанавливает хлорофилл, или что последний имеется в этиолированных растениях, никоим образом не доказывает, что хлорофилл способен разлагать воду, в особенности с выделением кислорода. До сих пор неизвестно ни одного органического соединения, способного гидрироваться за счет водорода воды, с выделением кислорода последней. До тех пор, пока точные факты не докажут возможности такой реакции, приходится рассматривать предположение Готье как выходящее за пределы установленных химических понятий.

Механизм разложения углекислоты восстановленным хлорофиллом еще более неправдоподобен, чем механизм разложения воды. Можно еще допустить, что восстановленный хлорофилл способен разложить углекислоту и вновь стать зеленым, но очень трудно представить себе, что именно окись углерода отнимает у него водород для образования формальдегида, в то время как выделяется свободный кислород. Такая окислительная способность совершенно не соответствует свойствам окиси углерода. Готье сравнивает восстановленный хлорофилл с белым индиго; однако белое индиго превращается в синее только под действием кислорода.

Как видно, высказанные до сих пор гипотезы, пытающиеся объяснить химический механизм ассимиляции углекислоты, лишь отодвинули вопрос, — проблема же, как и раньше, остается неразрешенной. Большая заслуга этих гипотез заключается, однако, в том, что вопрос правильно поставлен в плоскости химических реакций; это единственный путь, который может привести к его удовлетворительному решению.

В настоящей статье я изложу новую гипотезу, объясняющую химический механизм ассимиляции углекислоты проще и правдоподобнее, чем изложенные выше гипотезы, и приведу опыты, которые я поставил для ее проверки.

### Новая гипотеза о химическом механизме ассимиляции углекислоты растениями

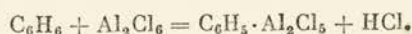
При изучении химического механизма ассимиляции углекислоты хлорофильными растениями следует прежде всего принять во внимание следующие обстоятельства:

1. Большинство авторов, высказывающихся по этому вопросу, рассматривает систему « $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ » и ее восстановление в зеленых частях растений с образованием одной молекулы  $\text{CH}_2\text{O}$  и выделением одной молекулы  $\text{O}_2$ . Длительно обсуждается вопрос о том, получают ли оба атома кислорода в результате полного восстановления молекулы  $\text{CO}_2$  до углерода, который затем уже гидратируется, образуя  $\text{CH}_2\text{O}$ , или один из них получается из  $\text{CO}_2$ , другой из  $\text{H}_2\text{O}$ , а оба остатка —  $\text{CO}$  и  $\text{H}_2$  — соединяются, образуя молекулу  $\text{CH}_2\text{O}$ .

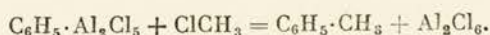
Все, что мы знаем о свойствах углекислоты, убеждает нас в том, что она участвует в ассимиляции в виде гидрата  $\text{CO}_3\text{H}_2$  и что у нас не больше оснований рассматривать в данном случае систему « $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ », чем говорить о системе « $\text{SO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ » для обозначения сернистой кислоты. Углекислота растворяется в воде с выделением теплоты (5.6 ккал), легко образует пересыщенные растворы, причем она значительно отклоняется от законов растворимости газов<sup>8</sup>; ее нельзя выделить полностью из водного раствора даже продолжительным кипячением; она образует кислые соли, как и все другие двуосновные кислоты. Все эти факты вполне доказывают, что углекислота существует в водном растворе в виде гидрата  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , который отличается от других кислот только своей относительной неустойчивостью\*.

Несмотря на кажущуюся тривиальность, различие, которое я провожу между системой « $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ » и гидратом  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , имеет очень существенные последствия в смысле разъяснения интересующей нас проблемы. Оно значительно упрощает ее и позволяет установить аналогии, которые были бы невозможны, если бы мы продолжали приписывать углекислоте особое место среди других кислотных ангидридов.

2. Существует большое число химических превращений, которые возможны только благодаря промежуточным реакциям или значительно облегчаются такими реакциями. В качестве примера я приведу блестящие синтезы, осуществленные Фриделем и Крафтсом в ароматическом ряду при помощи хлористого алюминия<sup>9</sup>. Превращение бензола в толуол достигается, например, взаимодействием хлористого метила с бензолом в присутствии безводного хлористого алюминия. Реакция распадается на две последовательные стадии. В первой стадии хлористый алюминий реагирует с бензолом, образуя, с выделением хлористого водорода, органометаллическое соединение:



Во второй стадии органометаллическое соединение реагирует с хлористым метилом, образуя соединение, распадающееся на толуол и хлористый алюминий:



Мы имеем здесь пример одного из видов промежуточных реакций.

В растительных и животных организмах, в которых химические соединения очень многочисленны и чрезвычайно сложны, промежуточные

\* Настоящая работа была уже закончена, когда я ознакомился с работой Балло [Ver. Dtsch. chem. Ges., 6 (1884)], в которой автор также высказывает мнение, что в процессах ассимиляции углекислота вступает в реакцию в виде гидрата  $\text{H}_2\text{CO}_3$ .

реакции должны играть первостепенную роль. Если вспомнить, что белок, без которого невозможен ни один биологический процесс, обладает огромным молекулярным весом и что он имеет, по всей вероятности, очень многочисленные и разнообразные химические функции, легко представить себе, что он входит в разнообразнейшие, более или менее устойчивые соединения. При современном состоянии наших знаний мы едва можем предугадывать их природу. Благодаря образованию временных соединений, участвующих в кажущейся очень сложной, но в действительности, вероятно, сравнительно простой системе промежуточных реакций, растительному и животному организму удается осуществить при комнатной температуре такие синтезы, которые мы бессильны воспроизвести искусственно, своими несовершенными экспериментальными методами.

3. В настоящее время нам известен только один класс соединений, способных распадаться при комнатной температуре с выделением кислорода: это перекисные соединения. Для того чтобы углекислота могла разложиться в зеленых частях растений с выделением кислорода, надо, следовательно, чтобы она образовала, прямо или косвенно, в качестве промежуточного продукта малоустойчивую перекись. Мы увидим дальше, какова должна быть природа этой перекиси.

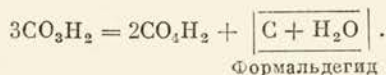
Изложенные соображения привели меня к следующей гипотезе, хорошо объясняющей химический механизм ассимиляции углекислоты растениями и подтверждающейся рядом экспериментальных данных.

Опыты Лева показали, что под действием солнечных лучей сернистая кислота превращается в серную, с освобождением серы и выделением воды:



Так как разложение углекислоты в растениях происходит также под действием солнечных лучей и так как, с другой стороны, углекислота участвует в ассимиляции в виде гидрата  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , аналогичного по своему химическому составу сернистой кислоте  $\text{H}_2\text{SO}_3$ , то можно предположить, что разложение гидрата  $\text{H}_2\text{CO}_3$  протекает так же, как и гидрата  $\text{H}_2\text{SO}_3$ .

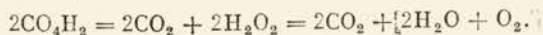
В таком случае мы должны иметь:



Сравним продукты обеих реакций:

Соединение  $\text{CO}_4\text{H}_2$ , аналогичное  $\text{SO}_4\text{H}_2$ , можно рассматривать как гидратированную надугольную кислоту, соответствующую надугольному ангидриду  $\text{CO}_3$ . Бертелло<sup>10</sup> предполагает, что этот ангидрид образуется при действии электрического разряда на углекислоту или на смесь углекислоты с кислородом.

В отличие от серной кислоты, которая обладает большой устойчивостью, надугольная кислота должна быть очень неустойчивой; ее состав позволяет предвидеть, что она должна разлагаться, самопроизвольно или под действием соединений, находящихся в растениях, на углекислоту, воду и кислород, с промежуточным образованием перекиси водорода:



Другие два продукта разложения интересующих нас кислот также отличаются в отношении устойчивости: в то время как сера, выделяющаяся из сернистой кислоты, не образует гидрата или образует гидрат, который сейчас же распадается на серу и воду, углерод, выделенный из углекислоты, может в этих условиях образовать очень устойчивый гидрат, а именно формальдегид.

Таким образом, допуская аналогию между разложением сернистой кислоты и углекислоты, мы получаем продукты реакции, свойства которых можно легко предвидеть; эти свойства проливают яркий свет на явление восстановления углекислоты растениями и удовлетворяют требованиям гипотезы Бейера. Из трех вступающих, согласно моей гипотезе, в реакцию молекул углекислоты две претерпевают своего рода внутримолекулярное окисление за счет двух атомов кислорода третьей, которая при этом восстанавливается до формальдегида. Образовавшиеся две молекулы надугольной кислоты затем разлагаются с выделением кислорода и регенерацией углекислоты, которая вновь может вступить в реакцию. Таким образом, *из трех молекул углекислоты одна разлагается так, как этого требует гипотеза Бейера.*

Следует заметить, что на присутствие в растениях перекиси водорода или другого окислителя указывал уже Клермон<sup>11</sup>, Беллучи<sup>12</sup> оспаривал этот факт, который был вновь подтвержден Вурстером<sup>13</sup> и затем вновь подвергнут сомнению Бокорни<sup>14</sup>.

Вурстер установил при помощи тетраметилпарафенилендиамина присутствие энергичного окислителя в листьях. Азотистая кислота — единственное соединение, кроме перекиси водорода, которое может дать эту реакцию. Так как присутствие азотистой кислоты не было обнаружено при помощи реактива Гриса, автор считает, что имевшийся в листьях окислитель был действительно перекисью водорода.

Против утверждения Вурстера Бокорни выдвигает аргументы, которые отнюдь не кажутся мне убедительными. Он нашел, что клетки спирогиры, содержащие значительные количества крахмала и таннина, не дают окраски ни с раствором иодистого калия (реакция на свободный иод), ни с раствором сернокислой закиси железа (образование дубильнокислого железа), и делает из этого вывод, что в растениях совершенно нет перекиси водорода. Однако ничто не доказывает, что иодистый калий и сернокислая закись железа не образуют с органическими веществами, находящимися в растениях, таких соединений, в которых они теряют способность окисляться.

К тому же синяя окраска крахмала далеко не устойчива. Она исчезает, например, сравнительно быстро под действием солнечных лучей, как я имел случай непосредственно наблюдать. То же самое относится и к дубильнокислому железу.

Бокорни пытался также извлечь перекись водорода из растений путем диализа; тот факт, что это ему не удалось, он приводит как аргумент против теории Вурстера. Ничто не доказывает, однако, что перекись водорода, находящаяся в растениях в качестве промежуточного соединения, не разлагается, прежде чем пройти сквозь мембрану диализатора.

Мои опыты с диметиланилином и диэтиланилином, которые будут описаны ниже, в экспериментальной части (см. стр. 168 и 170), показывают, что при разложении углекислоты под действием солнечных лучей действительно образуется окислитель, который может быть только надугольной кислотой или перекисью водорода. По всей вероятности, то же самое соединение образуется и при разложении углекислоты в зеленых частях растений.

Продукты распада сернистой кислоты — сера и серная кислота — могут реагировать между собой только в особых условиях. Реакция, приводящая к распаду, необратима и может, следовательно, протекать в среде, содержащей только растворенную сернистую кислоту. Совсем другие условия мы имеем при разложении углекислоты. Если моя гипотеза правильна, то оба продукта разложения, т. е. окислитель (надугольная кислота) и восстановитель (формальдегид) чрезвычайно склонны соединиться:





А. Н. БАХ  
(1890 г.)



Поэтому распад углекислоты может иметь место только в присутствии веществ, способных связывать хотя бы временно, если не оба, то, по крайней мере, один из продуктов реакции. Каковы же эти вещества, находящиеся в растениях и способные давать с надугольной кислотой и формальдегидом временные соединения? Что эти соединения неустойчивы, мы знаем потому, что при ассимиляции кислород выделяется, а формальдегид полимеризуется, образуя углеводы. В качестве простого предположения, опирающегося только на предварительные опыты, я позволю себе высказать следующую точку зрения.

Так как крахмал появляется первоначально в среде, очень богатой белками, и так как белок, повидимому, образует определенное соединение с формальдегидом, возможно, что последний связывается по мере своего образования белком и что это промежуточное соединение распадается затем на углеводы и белок.

Что касается надугольной кислоты (активный кислород), то я предполагаю, что она соединяется с железом, образуя перекись, которая впоследствии распадается с выделением кислорода и восстановлением исходного соединения. Действительно, известно, что железо играет существенную роль в химизме действия хлорофилла. В отсутствие железа хлорофилл не образуется, растение этиолируется, и, следовательно, нет ассимиляции углекислоты. Но достаточно прикоснуться к этиолированному листу кисточкой, смоченной раствором соли железа, чтобы на этом месте появились зерна хлорофилла. Сам хлорофилл железа не содержит. С другой стороны, гипотеза Бейера не приписывает железу никакой роли. Возможно, что оно препятствует воссоединению продуктов распада углекислоты, временно связывая надугольную кислоту или активный кислород. Этот вопрос должен быть разрешен прямыми опытами. Следовало бы выяснить, какая существует аналогия между ролью железа в животном и в растительном организме. Как бы то ни было, для того чтобы воспроизвести *in vitro* разложение углекислоты под действием солнечных лучей, совершенно необходимо проводить реакцию в присутствии соединений, способных связать либо активный кислород, либо формальдегид.

В несколько иной области существует еще один фактор, с которым необходимо считаться при экспериментальном исследовании интересующей нас реакции. Известно, что различные части солнечного спектра действуют различно на разложение углекислоты в растениях. Было установлено, что это разложение имеет два максимума; один из них находится в красной, другой в фиолетовой части спектра. Эти два максимума соответствуют спектру поглощения хлорофилла, что объясняется следующим образом: хлорофилл поглощает некоторые лучи и передает их энергию молекулам углекислоты, которые разлагаются по указанной выше схеме (см. стр. 159). Можно считать, что действие лучей этой длины волны, если и не необходимо, то во всяком случае благоприятно для разложения углекислоты; в среде, сквозь которую лучи проходят без поглощения, эта реакция не имеет места или протекает чрезвычайно медленно. Поэтому простой водный раствор углекислоты, будучи прозрачным для указанных лучей, не подходит для опытов по разложению. Необходимо проводить реакцию в присутствии соединений, поглощающих хотя бы часть тех лучей, которые в растениях вызывают разложение углекислоты. Этими соображениями я и руководствовался при выборе опытов, которые я поставил для проверки высказанной мною гипотезы.

Прежде чем перейти к изложению экспериментальной части, я хочу остановиться на двух возражениях, высказанных мне в частных разговорах и заслуживающих, как мне кажется, внимания.

Первое возражение основывается на периодическом законе элементов.

Согласно этому закону, атом углерода, соединяющийся с 4-мя атомами водорода, может образовывать только следующие кислородные или кислородно-водородные соединения:

|                         |                           |                        |                    |
|-------------------------|---------------------------|------------------------|--------------------|
| $C(OH)_4$               | $CH(OH)_3$                | $CH_2(OH)_2$           | $CH_3(OH)$         |
| Ортоугольная<br>кислота | Ортомуравьиная<br>кислота | Метиленовый<br>гликоль | Метиловый<br>спирт |
| $CO(OH)_2$              | $HCO \cdot OH$            | $CH_2O$                |                    |
| Метаугольная<br>кислота | Метамуравьиная<br>кислота | Формальдегид           |                    |
|                         | $CO_2$                    | $CO$                   |                    |
|                         | Угольный<br>ангидрид      | Муравьиный<br>ангидрид |                    |

Этот закон не предвидит существования надугольной кислоты  $CO_4H_2$ , которую невозможно вывести из приведенных соединений ни путем гидратации, ни путем дегидратации.

На это я отвечаю:

4-я группа менделеевской системы содержит наряду с углеродом четырехвалентный элемент титан, который образует, так же как углерод, хлориды  $TiCl_4$  и  $Ti_2Cl_6$  и соединения  $Ti(OH)_4$  (ортотитановая кислота),  $TiO(OH)_2$  (метатитановая кислота),  $TiO_2$  (титановый ангидрид) и, вероятно,  $TiO$  (окись титана). Как видно, аналогия между этими двумя элементами довольно близкая. Однако титан образует и соединение  $TiO_3$  (надтитановый ангидрид), которому соответствуют надтитановый гидрат  $TiO_4H_2$  и надтитановые соли. Это соединение было выделено и проанализировано, и его существование не подлежит никакому сомнению. Кроме того, кислород надтитанового ангидрида и его фторпроизводного  $TiO_2F_2$  (пероксифторид титана) оказывает такое же действие, как кислород перекиси водорода, т. е. разлагает марганцовокислый калий с выделением кислорода. Таким образом, это соединение, или вернее его гидрат, обладает теми же свойствами, которые я приписываю надугольной кислоте, превращающейся, как мы видели, в перекись водорода или действующей, как последняя.

Таким образом, периодический закон не только не подрывает высказанной мною гипотезы, но даже существенно подтверждает ее. Он, правда, не предвидит существования надугольной кислоты; но он также не предвидит и надтитановой кислоты, что, однако, не мешает ее существованию.

Второе возражение относится к возможности сосуществования формальдегида и надугольной кислоты или перекиси водорода в качестве продуктов разложения углекислоты. Мне возражают, что в присутствии активного кислорода формальдегид будет окислен до углекислоты и воды или, по крайней мере, до муравьиной кислоты.

Я уже говорил выше, что, по всей вероятности, продукты разложения углекислоты образуют промежуточные соединения, которые временно фиксируют их и способствуют их дальнейшим превращениям. Можно представить себе, что в этих условиях формальдегид не подвержен окисляющему действию активного кислорода. Но, помимо этого соображения, существуют факты, которые прямо указывают на то, что формальдегид вполне может существовать в присутствии кислорода и даже перекиси водорода. Известно, что испарение эфира на солнце в присутствии воды приводит к образованию перекиси водорода. Изучая эту реакцию, Дунстан и Даймонд<sup>15</sup> подвергли действию солнечных лучей 50 г эфира, 50 г воды и 400 см<sup>3</sup> кислорода в запаянных трубках. После достаточно продолжительного облучения они нашли в трубках заметные количества перекиси водо-

рода, формальдегида и уксусной кислоты. К тому же сосуществование в свободном (или кажущемся нам в настоящее время свободном) состоянии двух продуктов расщепления, которые в обычных условиях очень быстро реагируют между собой, часто наблюдается в биологической химии. Так, например, желудочный сок имеет кислую реакцию и содержит от 1 до 4 г соляной кислоты в литре, в то время как ткани желудочной слизистой оболочки, выделяющие этот сок, имеют щелочную реакцию и содержат углекислый натрий. Так как соляная кислота и сода происходят от расщепления хлористого натрия, то очевидно, что в какой-то момент оба вещества находились одновременно в ткани, не вступая в реакцию.

## Б. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Расщепление углекислоты в присутствии раствора уксуснокислого урана

Как я указывал выше, расщепление углекислоты под действием солнечных лучей может быть воспроизведено искусственно только при следующих условиях: 1) реакция должна протекать в присутствии вещества, поглощающего, хотя бы частично, те лучи, которые в растениях вызывают разложение углекислоты; 2) по крайней мере один из продуктов расщепления — либо надугольная кислота (активный кислород), либо формальдегид — должен быть связан, для того чтобы реакция не могла идти в обратном направлении.

После некоторых поисков я остановился на солях урана, которые казались подходящими для моих исследований. Эти соли имеют полосы поглощения в фиолетовой части спектра, т. е. в той части, которая соответствует одному из двух максимумов разложения углекислоты в растениях. Можно было, следовательно, ожидать, что углекислота будет хотя бы частично расщепляться под действием лучей, поглощенных раствором урановой соли. С другой стороны, эти соли являются очень чувствительным реактивом на перекись водорода. Я считал, что надугольная кислота, появляющаяся вследствие разложения углекислоты, должна образовывать с урановой солью надуглекислый уран, неустойчивое соединение, которое сейчас же по образовании должно распасться на углекислоту и перекись урана. Таким образом, расщепление углекислоты, протекающее по предложенной мною схеме, должно было сказаться в появлении осадка перекиси урана.

Опыт был проведен следующим образом.

Я приготовил насыщенный на холоду и отфильтрованный раствор уксуснокислого урана и подверг его в трех эрленмейерских колбах *a*, *b* и *c* прямому действию солнечных лучей. Колба *a* оставалась закрытой пробкой, через колбы *b* и *c* пропускался ток углекислоты, предварительно проходящий, для тщательной очистки, через две промывалки с углекислым калием. Для того чтобы определить действие углекислоты на уксуснокислый уран в отсутствии солнечных лучей, колба *c* была завернута в серую бумагу.

Необходимо отметить, что эти опыты, так же как и описанные дальше, дают удовлетворительные результаты только при прямом и интенсивном облучении. В диффузном свете расщепление углекислоты совсем не происходит или происходит чрезвычайно медленно.

В многочисленных опытах, проделанных в указанных условиях, я всегда констатировал, что через 30—60 минут после начала операции желтый прозрачный раствор, содержащийся в колбе *b* (одновременное действие

углекислоты и солнечных лучей), начинал мутнеть и приобретал зеленоватое окрашивание.

По истечении некоторого времени мутность усиливалась, и при прекращении тока углекислоты образовывался незначительный осадок, частично желто-коричневый, частично лилово-коричневый, который, будучи перенесен на фильтр и промыт, окрашивался в серо-лиловый цвет. Оставленный на фильтре на воздухе осадок окрашивался в светложелтый цвет и превращался в гидрат окиси урана. Этот осадок растворялся в уксусной кислоте, образуя желтый уксуснокислый уран, и оставлял на фильтре желто-коричневое пятно, нерастворимое в избытке уксусной кислоты, но исчезающее при прибавлении капли соляной кислоты. Осадок представляет собой, следовательно, не что иное, как ту же смесь гидратов окиси и закиси урана, которая получается при освещении солнечными лучами раствора щавелевокислого урана; возможно, что осадок содержит еще следы перекиси урана, так как появляется нерастворимое в уксусной кислоте желто-коричневое пятно.

*В закрытой колбе а и в колбе с, завернутой в серую бумагу, раствор остался совершенно прозрачным, и никакого осадка не образовалось.*

Образование осадка в колбе *b* не могло быть следствием распределения основания между углекислотой и уксусной кислотой, так как в колбе *c*, защищенной от солнечных лучей, никакого изменения раствора не произошло. Оно также не может быть приписано действию одного излучения, так как в колбе *a* раствор остался без изменения. Таким образом, мы должны признать, что образование осадка в колбе *b* обусловлено одновременным действием углекислоты и солнечных лучей.

В свете высказанных мною предположений изменение, происшедшее в растворе уксуснокислого урана, было бы вполне понятным, если бы осадок состоял из перекиси урана. Действительно, при расщеплении углекислоты на формальдегид и надугольную кислоту образовался бы надуглекислый уран, который затем разложился бы на углекислоту и перекись урана, нерастворимую в уксусной кислоте.

Но как объяснить в таком случае восстановление перекиси в гидраты окиси и закиси урана? Газ, выходящий из склянки, был, как я удостоверился повторными анализами, чистой углекислотой и не содержал ни следа кислорода. Указанное восстановление не могло быть, таким образом, следствием разложения перекиси с выделением кислорода; оно может быть объяснено, как мне кажется, вполне удовлетворительно следующим образом.

Так как муравьиный альдегид *in statu nascendi* очень энергичный восстановитель, я подумал, что образовавшаяся перекись урана вполне могла быть восстановлена им с образованием низших окислов. Действительно, светложелтый осадок перекиси урана, приготовленный прибавлением нескольких капель перекиси водорода к раствору уксуснокислого урана, сначала становился под действием солнечных лучей в присутствии нескольких капель формальдегида зеленоватым, а потом превращался в фиолетово-коричневое вещество, полностью растворимое в уксусной кислоте. Без формальдегида перекись урана в тех же условиях не меняется в цвете и остается нерастворимой в уксусной кислоте, даже если подвергать ее действию солнечных лучей в течение нескольких дней. Таким образом, я имею некоторые основания предполагать, что аналогичное восстановление происходит при расщеплении углекислоты в присутствии раствора уксуснокислого урана.

Так как при современном уровне наших знаний приведенные факты не находят другого объяснения, кроме того, которое я им дал, то я могу рассматривать их как подтверждающие до известной степени высказанную мною гипотезу.

### Расщепление углекислоты в присутствии раствора уксуснокислого урана, содержащего аммиачную окись серебра

Результаты, полученные в предыдущих опытах, привели меня к мысли прибавить к раствору уксуснокислого урана легко восстанавливаемое вещество, для того чтобы избежать восстановления перекиси урана и доказать, таким образом, расщепление углекислоты. Для этой цели я испробовал свежеприготовленный аммиачный раствор окиси серебра.

К насыщенному на холоду и отфильтрованному раствору уксуснокислого урана я прибавил аммиачной окиси серебра до постоянного помутнения. Окись серебра должна быть растворена в возможно меньшем количестве аммиака, так как избыток последнего мешает реакции. Мутная жидкость, из которой выпал небольшой желтый осадок (комплексное соединение гидрата окиси урана, аммиака и серебра), была разлита в три колбы *a*, *b* и *c* и оставлена на солнце. Опыт был поставлен так же, как и в предыдущий раз, т. е. колба *a* осталась закрытой, а через колбы *b* и *c* пропускался ток углекислоты, причем последняя колба была завернута в серую бумагу.

Через несколько минут после начала опыта осадок в склянках *b* и *c* растворился под действием углекислоты (вероятно, вследствие образования растворимых двойных углекислых солей), и желтая жидкость стала совершенно прозрачной.

После действия солнечных лучей в течение часа светложелтый раствор в колбе *b* начал темнеть и приобретает коричневый оттенок, и затем из него выпал черный осадок металлического серебра. Однако осадка перекиси урана не образовалось, вероятно потому, что он растворим в аммиаке. Ни в колбе *a*, ни в колбе *c* я не мог обнаружить ни малейшего восстановления серебряной соли.

Через 24 часа из растворов в колбах *b* и *c* выпал осадок, покрывающий дно и стенки колб плотным, пристающим к стеклу слоем мелких, твердых кристаллов. Я слил чистые растворы и после прибавления нескольких капель кислоты для нейтрализации аммиака смешал их с раствором хлористого натрия. В растворе *b* не обнаружилось ни следа серебра, тогда как в растворе *c* образовался небольшой осадок хлористого серебра.

Осадки в колбочках были обработаны уксусной кислотой.

Осадок *c* полностью растворился, с выделением углекислоты, в то время как осадок *b* оставил черный порошок металлического серебра. При прибавлении хлористого натрия раствор *c* сразу заметно помутнел, в то время как раствор *b* остался совершенно прозрачным. Таким образом, под комбинированным действием углекислоты и солнечных лучей вся аммиачная окись серебра, прибавленная к раствору уксуснокислого урана, была восстановлена до металлического серебра.

Тот факт, что в колбочке *a* серебро частично находилось в виде твердого соединения, тогда как в двух других колбах оно было в растворе, мог до известной степени подвергнуть сомнению мои выводы. Действительно, опыты были не вполне сравнимы в том отношении, что солнечные лучи, может быть, сами по себе вызвали бы восстановление серебряной соли в колбе *a*, если бы соль находилась в растворенном состоянии, так же как и в колбе *b*.

Чтобы опровергнуть это возражение, я провел следующий опыт. Я приготовил раствор уксуснокислого урана, к которому прибавил аммиачной окиси серебра до образования осадка. Полученная смесь была обработана в течение нескольких минут углекислотой на холоду до почти полного исчезновения мути. Слегка мутная жидкость была разлита в три колбочки и дальше обработана, как описано выше. Как только жидкость

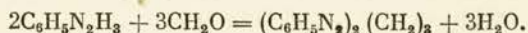
в колбах *a* и *b* была подвергнута действию солнечных лучей, она стала прозрачной и яркожелтой.

С этим раствором в качестве исходного мне было легко определить, какая роль в восстановлении серебряной соли принадлежит действию солнечного света и какая роль — свободной углекислоте. Результат был такой же, как и в предыдущем опыте: появление осадка серебра в колбе *b* и никаких изменений в двух других колбах. Это доказывает, что восстановление соли серебра действительно обусловлено комбинированным действием излучения и углекислоты, т. е. одним из продуктов распада последней.

Какой же восстановитель получается при расщеплении углекислоты? С точки зрения моей гипотезы, это мог быть только формальдегид или перекись водорода, получающаяся при распаде надугольной кислоты. Чтобы изучить восстанавливающее действие этих двух соединений, я взял две порции по 15 см<sup>3</sup> раствора, с которым был проведен опыт, и прибавил несколько капель формальдегида к первой и несколько капель перекиси водорода ко второй. В обоих случаях произошло восстановление соли серебра; но в то время как в растворе с перекисью водорода получился лишь легкий серый налет на стекле, в присутствии формальдегида получился черный осадок, аналогичный тому, который был получен при обработке углекислотой под действием солнечных лучей. Впрочем, я не придаю решающего значения этому результату, так как даже если бы углекислота распалась на окись углерода и кислород, то эффект мог бы получиться тот же, ибо окись углерода восстанавливает аммиачную окись серебра. Однако следующий вывод явно вытекает из этого опыта: под действием солнечных лучей углекислота разложилась на два продукта, каждый из которых в отдельности мог вызвать восстановление соли серебра. Если одним из продуктов расщепления была перекись водорода или другое перекисное соединение, то очевидно, что одновременно должно было получиться восстанавливающее соединение углерода, которое могло быть только окисью углерода или формальдегидом. Для проверки моей гипотезы мне пришлось выяснить, является ли действительно этот восстановитель формальдегидом.

#### Расщепление углекислоты в присутствии раствора уксуснокислого урана и уксуснокислого фенилгидразина

Если действовать фенилгидразином в разбавленном уксуснокислом растворе на формальдегид, то тотчас же выпадает желтый или желтовато-белый осадок микроскопических игл. Эта весьма чувствительная реакция протекает по следующей схеме<sup>16</sup>:



Я попытался использовать эту реакцию для того, чтобы выяснить, не приводит ли расщепление углекислоты под действием солнечных лучей к образованию формальдегида. Я приготовил раствор уксуснокислого урана и прибавил к нему 1% фенилгидразина в уксуснокислом растворе. Полученная прозрачная желтая жидкость была налита в три колбы *a*, *b* и *c* и обработана, как было описано выше.

Вскоре после начала опыта жидкость в колбах *a* и *b* помутнела и после продолжительного действия солнечных лучей выделила незначительный осадок, красно-коричневый в колбе *a* и желтый в колбе *b*. В колбе *c* (действие углекислоты в отсутствии солнечных лучей) никакого изменения не наблюдалось. Содержимое колбы *b* было отфильтровано, желтый осадок был промыт сначала разбавленной уксусной кислотой, для удаления

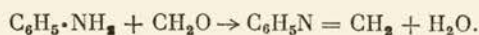


избытка фенилгидразина и гидратов урана, которые могли образоваться, и затем водой. Обработанный таким образом осадок мог содержать перекись урана наряду с фенилгидразиновым соединением формальдегида. Чтобы разделить их, я обработал осадок 80°-ным спиртом; осадок полностью растворился.

Спиртовой раствор давал характерные реакции урановых солей, что доказывает, что я имел дело с более или менее сложным органометаллическим соединением, а так как его было лишь ничтожное количество (едва набралось несколько миллиграммов), то мне не удалось изучить подробнее его природу. Изучение этой реакции осложнялось тем, что облучение само по себе вызывало разложение жидкости (колба *a*); так как я был связан временем, то я отложил дальнейшее изучение этой реакции и стал искать более верную и более скорую реакцию.

### Расщепление углекислоты в присутствии раствора уксуснокислого урана и анилина

Этот ряд опытов был не более успешным, чем предыдущий. Я пытался фиксировать формальдегид при помощи анилина, который образует с ним, согласно Толленсу<sup>17</sup>, белый кристаллический осадок ангироформальдегиданилина:



Анилин, повидимому, образует с уксуснокислым ураном двойную соль, дающую в воде раствор, окрашенный в красновато-желтый цвет. Я приготовил раствор такого рода, прибавляя 1% анилина к насыщенному на холоду и отфильтрованному раствору уксуснокислого урана; раствор был налит в три колбы *a*, *b* и *c* и обработан так же, как в предыдущих случаях.

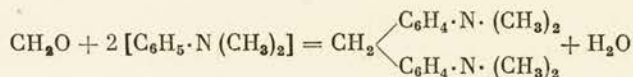
Как только колбы были выставлены на солнце, жидкость в колбе *a* стала темнеть; через некоторое время она выделила тонкий темнокрасный порошок, который впоследствии стал совершенно черным. В колбе *b* после 10—15-часового облучения образовалась легкая белая муть, подобная той, которая наблюдается, если прибавить следы формальдегида к водному раствору анилина; однако даже после очень продолжительного облучения мне не удалось получить заметного количества осадка.

Жидкость все время сохраняла красновато-желтый цвет; это доказывает, что углекислота или продукты ее расщепления препятствуют образованию того красно-коричневого вещества, которое получилось в растворе в колбе *a*. В колбе *c* раствор остался неизменным в течение двух или трех недель.

Две причины способствовали неудаче описанных опытов: значительная неустойчивость фенилгидразина и анилина под действием солнечных лучей и крайняя медленность, с которой, вероятно, происходит расщепление углекислоты в условиях, в которых я ставил опыт. Нужно было бы действовать углекислотой и солнечными лучами чрезвычайно долго, для того чтобы получить формальдегид в достаточном количестве для аналитического определения. В то же самое время неустойчивость среды может привести к образованию соединений, маскирующих присутствие производного формальдегида или даже превращающих его в другие вещества. Эти соображения привели меня к попытке обнаружить присутствие формальдегида при помощи достаточно чувствительной цветной реакции. Пользуясь советом А. Трийа, недавно описавшего очень чувствительную реакцию на формальдегид<sup>18</sup>, я использовал свойство последнего образовывать с диметиланилином основание, которое легко превращается в краситель.

### Расщепление углекислоты в присутствии раствора уксуснокислого урана и диметиланилина

При действии раствора формальдегида на диметиланилин образуется светлорыжий осадок тетраметилдиамидофенилметана:



Уксусная кислота и перекись свинца превращают это основание в соответственное гидроксильное соединение.

Вначале я в точности следовал методике, указанной Трийа для обнаружения формальдегида.

Я растворил 15 г диметиланилина в 300 см<sup>3</sup> воды, подкисленной 15 см<sup>3</sup> серной кислоты, налил раствор в три колбы *a*, *b* и *c* и провел опыт дальше, как обычно. Через 2—3 часа я отобрал по 30 см<sup>3</sup> жидкости из каждой колбы, подщелочил едким натром и удалил избыток диметиланилина кипячением.

После фильтрования и промывания водой, для удаления избытка щелочи, я обработал перекисью свинца осадки на фильтре, предварительно смоченные уксусной кислотой. В десятке опытов, проведенных таким образом, я всегда получал более или менее яркое синее окрашивание в колбе *b* и очень слабое окрашивание в колбах *a* и *c*.

Однако более углубленное изучение этого метода показало, что его результаты не имеют абсолютного значения, в особенности в интересующем меня случае.

С одним и тем же раствором синее окрашивание то появлялось на фильтре, то не появлялось, в зависимости от того, как долго я кипятил нейтрализованную жидкость для удаления избытка диметиланилина; присутствие избытка соды также оказывало влияние на получаемый результат. С другой стороны, во многих случаях я получал синее окрашивание при обработке по методу Трийа чистого диметиланилина в присутствии следов формальдегида.

Очевидно, что для получения однозначных результатов надо было избежать сложных операций, которые могли обусловить изменение присутствующих веществ.

Если диметиланилин уже благоприятствовал, как казалось, расщеплению углекислоты под действием солнечных лучей, то расщепление должно было быть значительно заметнее в присутствии раствора уксуснокислого урана, к которому прибавлен диметиланилин. Многочисленные опыты, сделанные мною в этом направлении, дали результаты очень интересные, хотя и спорные с точки зрения проверки моей гипотезы.

В каждую из трех колб *a*, *b* и *c* я налил по 100 см<sup>3</sup> раствора уксуснокислого урана, к которому был прибавлен 1 г свежерегнанного диметиланилина. Ход опыта был такой же, как и в предыдущих случаях.

В отличие от анилина, диметиланилин не образует растворимого соединения с уксуснокислым ураном. Если взболтать смесь, она мутнеет вследствие образования маслянистых капель, но вскоре вновь разделяется на два слоя, причем снизу остается прозрачный раствор уксуснокислого урана, а сверху — диметиланилин. Однако под действием углекислоты диметиланилин, повидимому, соединяется с уксуснокислым ураном, образуя двойную углекислую соль, выпадающую в виде легкого, хлопьевидного лимонножелтого осадка.

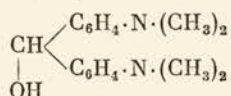
Цвет осадка, образовавшегося в колбах *b* и *c* в течение нескольких минут в начале опыта, не изменялся в течение первых 4—5 часов действия солнечных лучей. По истечении этого времени весь осадок начал приобре-

тать синевато-зеленый цвет, а затем, переходя через синевато-серый и лило-вато-серый, стал, наконец, после 12—15-часового облучения яркофиолетовым. За это же самое время в колбе *a* образовался смолистый, грязно-коричневый осадок, в котором я не мог отметить ни малейшего синего или фиолетового оттенка.

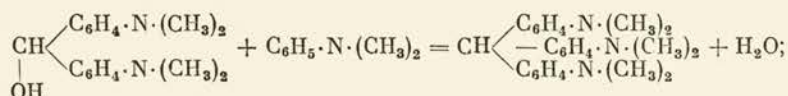
Что касается колбы *c* (действие углекислоты в отсутствии солнечного света), то ее содержимое сохранило тот же лимонножелтый цвет, какой оно имело после образования указанного выше осадка.

Очевидно, что фиолетовое окрашивание, полученное в присутствии диметиланилина в колбе *a*, может быть вызвано только комбинированным действием солнечных лучей и углекислоты. Однако его появление может быть объяснено различными способами:

1. Можно считать, что формальдегид, получающийся вследствие расщепления углекислоты, соединяется с диметиланилином, образуя, согласно известной реакции, тетраметилдиамидофенилметан; образовавшееся основание окисляется затем под действием надугольной кислоты или активного кислорода, который она содержит, так же как оно окисляется под действием перекиси свинца, превращаясь в бензгидрол:



который и придавал более или менее яркое синее окрашивание содержимому колбы *b* в определенный момент реакции; наконец, согласно реакции, указанной Керном, бензгидрол соединяется с избытком диметиланилина, образуя гексаметилтриамидотрифенилметан (гексаметиллейканилин):



наконец, гексаметиллейканилин вновь окисляется, превращаясь в метилвиолет.

В этом объяснении нет ничего, что не было бы в строгом согласии с давно известными фактами\*.

2. Можно также допустить, что фиолетовое окрашивание получается в ряде реакций, аналогичных тем, которые имеют место при приготовлении метилвиолета по способу Лаута, с той разницей, что диметиланилин окисляется не кислородом воздуха, а кислородом, выделяющимся при расщеплении углекислоты.

Согласно гипотезе Е. и О. Фишер, подтвержденной Нелтингом, при окислении диметиланилина хлорной медью одна из метиловых групп амида окисляется до формальдегида. Последний реагирует затем с диметиланилином и дает соединения, которые я только что описал.

В частном случае, который нас интересует, вопрос, следовательно, ставится следующим образом:

Образуется ли формальдегид, из которого берется центральный атом углерода, в результате расщепления углекислоты или в результате окисления диметиланилина?

Для выяснения этого вопроса я поставил нижеследующий опыт.

Ток воздуха, освобожденного от углекислоты, пропускался через колбу, содержащую 100 см<sup>3</sup> раствора уксуснокислого урана, к которому

\* См. замечательный доклад Нелтинга о красителях, производных трифенилметана (Mop. sci., май и июнь 1892 г.), в особенности стр. 332—334, которые проливают яркий свет на опыты, описанные в двух последних частях настоящей статьи.

был прибавлен 1 г диметиланилина. Колба была выставлена на солнце, и опыт проведен параллельно с описанным выше. Через несколько дней в колбе появился грязно-коричневый осадок, и раствор стал светложелтым, но не было ни следа синего или фиолетового окрашивания. Так как этот отрицательный результат мог быть приписан тому, что в условиях опыта, кислород воздуха был недостаточно активен для окисления диметиланилина, то я сделал следующий опыт.

К 100 см<sup>3</sup> раствора уксуснокислого урана я прибавил 1 г диметиланилина и 10 см<sup>3</sup> 6%-ной перекиси водорода и пропускал ток воздуха, чтобы размешивать смесь и приблизиться, таким образом, к условиям опыта с углекислотой. Образовался светложелтый осадок, который остался почти неизменным в течение всего опыта (облучение в течение 30 часов), но смесь не окрасилась.

Этот результат не внушил мне доверия, так как я предположил, что окисление было слишком энергичным и что красители могли разрушаться по мере своего образования. Опыт вполне подтвердил это предположение, как это видно из следующих данных.

Ток воздуха, очищенного от углекислоты, пропускался через 100 см<sup>3</sup> раствора уксуснокислого урана, к которому было прибавлено 1 г диметиланилина и только 1 см<sup>3</sup> перекиси водорода. Эта смесь прошла через те же последовательные окраски, как и смесь, находившаяся под действием углекислоты, и через несколько дней стала яркофиолетовой.

Этот опыт показывает, что формальдегид, давший с диметиланилином фиолетовое окрашивание в колбе *b*, мог происходить от расщепления углекислоты, так же как и от окисления диметиланилина. Опыты с диметиланилином, таким образом, неубедительны в смысле подтверждения моей гипотезы. Но из них безусловно следует, что в присутствии раствора уксуснокислого урана, к которому прибавлен диметиланилин, углекислота расщепляется под действием солнечных лучей, образуя вещество, обладающее, в условиях моих опытов, приблизительно такой же окисляющей способностью, как 1 см<sup>3</sup> 6%-ной перекиси водорода.

#### Расщепление углекислоты в присутствии уксуснокислого урана и диэтиланилина

В длинном ряде опытов Нелтинг<sup>19</sup> неопровержимо доказал, что только те производные анилина, которые содержат метиловую группу, способны давать фиолетовую окраску. Производные, содержащие этиловые, пропиловые и другие группы, не способны образовать формальдегид, дающий центральный углеродный атом красителя, и поэтому они не дают при окислении никакой фиолетовой окраски. В другом ряде опытов этот ученый доказал, что из всех соединений, способных давать центральный атом углерода, только формальдегид может конденсироваться с диэтиланилином, образуя тетраэтилдиаминодифенилметан, который, будучи окислен в присутствии избытка диэтиланилина, дает фиолетовый краситель.

Исходя из этих фактов, мне легко было выяснить, действительно ли углекислота расщепляется под действием солнечных лучей с образованием формальдегида, как этого требует моя гипотеза. Появление фиолетового окрашивания при действии солнечных лучей на углекислоту в присутствии раствора уксуснокислого урана и диэтиланилина бесспорно должно доказать образование формальдегида в результате расщепления углекислоты.

Я приготовил раствор уксуснокислого урана, к которому прибавил 1% свежеперегнанного диэтиланилина, и налил эту смесь в три колбы *a*, *b* и *c*. Дальнейший ход опыта был такой же, как уже неоднократно описывавшийся. Предварительно я убедился в том, что диэтиланилин не содержал

ни следа диметиланилина. С этой целью к 10 см<sup>3</sup> диэтиланилина, растворенного в воде, подкисленной серной кислотой, были прибавлены 2 см<sup>3</sup> формальдегида; затем производилась реакция на формальдегид по методу Трийа. Так как диэтиланилин значительно медленнее соединяется с формальдегидом, чем диметиланилин, появление синего окрашивания при действии перекиси свинца и уксусной кислоты могло быть приписано только образованию гидрола тетраметилдиамидодифенилметана. На фильтре не получилось ни следа синего окрашивания.

Так же как и в присутствии диметиланилина, в присутствии диэтиланилина через несколько минут после начала опыта в колбах *b* и *c* появился лимонножелтый осадок (образование двойной углекислой соли). Но, как и следовало ожидать, превращение смеси, находившейся в колбе *b*, протекало медленнее, чем в моих опытах с диметиланилином. После действия солнечного света в течение 8—10 часов смесь стала синеваато-зеленой, и синие точки появились на трубке, подводящей углекислоту. После 15—18 часов облучения смесь стала серо-синей. В это время я взял из колбы *b* пробу в 10 см<sup>3</sup> и прибавил к ней несколько капель уксусной кислоты и небольшое количество перекиси свинца. Смесь растворилась с яркосиней окраской. Я вылил раствор в маленькую чашку и положил в нее кусок хлопчатобумажной ткани, протравленной танином. Через несколько минут ткань адсорбировала всю синюю краску, оставив раствор почти бесцветным. Под действием солнечных лучей ткань скоро обесцветилась. Я имел, следовательно, дело с настоящим гидролом.

После 22—25-часового действия солнечных лучей серо-синяя окраска смеси перешла в сине-фиолетовую.

В колбе *a* (солнечные лучи в отсутствии CO<sub>2</sub>) образовался смолистый грязно-коричневый осадок и желтый налет на стекле; содержимое колбы *c* (действие CO<sub>2</sub> в отсутствии солнечных лучей) сохранило лимонно-желтую окраску. Следовательно, фиолетовое окрашивание в колбе *b* получилось вследствие комбинированного действия углекислоты и солнечных лучей.

Для того чтобы выяснить, не могло ли фиолетовое окрашивание получаться, в условиях моего опыта, вследствие окисления диэтиланилина в отсутствии углекислоты, я сделал следующие опыты.

1. Ток воздуха, очищенного от углекислоты, пропускался через колбу, содержащую 100 см<sup>3</sup> раствора уксуснокислого урана, к которому был прибавлен 1 г диэтиланилина. Колба была выставлена на солнце одновременно с другими. После 25-часового действия солнечных лучей содержимое этой колбы ничем не отличалось от содержимого колбы *a*.

2. Ток воздуха, очищенного от углекислоты, пропускался через ряд колб, содержащих 100 см<sup>3</sup> раствора уксуснокислого урана, 1 г диэтиланилина и количества перекиси водорода, возрастающие от 1 до 10 см<sup>3</sup>. После 25-часового действия солнечных лучей ни в одной из колб не было синего или фиолетового окрашивания.

Фиолетовый краситель появился в колбе *b* при комбинированном действии углекислоты и солнечного света.

Только формальдегид способен давать основной атом углерода, необходимый для образования лейкоанилиновых оснований.

Необходимый формальдегид не может получаться вследствие окисления диэтиланилина.

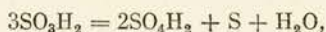
Следовательно, в условиях моих опытов углекислота расщеплялась на формальдегид, соединявшийся с диэтиланилином с образованием лейкооснования, и на окислитель, превращавший лейкооснования в красители.

Таким образом, высказанная мною гипотеза относительно химического механизма расщепления углекислоты под действием солнечных лучей подтверждается в основных своих частях.

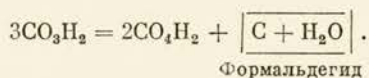
## ВЫВОДЫ

I. В процессе ассимиляции углекислота реагирует в виде гидрата  $\text{CO}_2\text{H}_2$ . Для того чтобы расщепляться под действием солнечных лучей с освобождением кислорода, углекислота должна образовывать, в качестве промежуточного продукта, малоустойчивое перекисное соединение.

II. По аналогии с сернистой кислотой  $\text{SO}_2\text{H}_2$ , которая расщепляется под действием света согласно реакции



можно допустить, что расщепление углекислоты протекает по схеме



III. Легко предвидеть свойства продуктов расщепления углекислоты; эти свойства показывают, что расщепление в точности соответствует гипотезе Бейера: из трех молекул углекислоты, вступающих в реакцию, одна расщепляется на кислород и формальдегид.

IV. Распад углекислоты может протекать только в присутствии соединений, способных связывать либо активный кислород, либо муравьиный альдегид.

V. Расщепление углекислоты может происходить только в присутствии соединений, способных поглотить хотя бы часть тех лучей, которые определяют в растениях распад углекислоты.

VI. Урановые соли обладают необходимыми свойствами для проведения опытов по расщеплению углекислоты под действием солнечных лучей.

VII. В присутствии раствора уксуснокислого урана углекислота распадается на окислитель и восстановитель.

VIII. В присутствии раствора уксуснокислого урана, к которому прибавлена аммиачная окись серебра, из углекислоты образуется соединение, восстанавливающее серебряную соль до металлического серебра.

IX. В присутствии раствора уксуснокислого урана, к которому прибавлен диметиланилин, из углекислоты образуется окислитель, превращающий диметиланилин в метилвиолет. В условиях моих опытов этот окислитель произвел такое же действие, как  $1 \text{ см}^3$  6%-ной перекиси водорода.

X. В присутствии раствора уксуснокислого урана, к которому прибавлен диэтиланилин, углекислота также образует фиолетовый краситель. Так как диэтиланилин может образовать фиолетовый краситель, только соединяясь с формальдегидом, дающим основной атом углерода, то очевидно, что в моем опыте углекислота расщепилась на формальдегид, соединившийся с диэтиланилином для образования лейкооснований, и на окислитель, превративший эти основания в красители. Этим соединением могла быть только надугольная кислота или перекись водорода.

Таким образом, этот опыт подтверждает в основных ее частях гипотезу, которую я высказал относительно химического механизма расщепления углекислоты под действием солнечных лучей.

3 августа 1893 г.

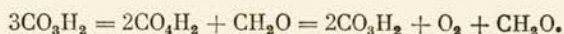
## ЛИТЕРАТУРА

1. Baeyer. Ber. Dtsch. chem. Ges., **3**, 63 (1870).
  2. Bokorny. Ber. Dtsch. chem. Ges., **25**, 471 (1892).
  3. Gautier. C. R. Acad. Sci., Paris, **79**, 862 (1874).
  4. Gautier. Cours de Chimie, 3. Chimie biologique, Paris (1892).
  5. L. c., стр. 24 и 26.
  6. Тимирязев. C. R. Acad. Sci., Paris, **89**, 863 (1880).
  7. Тимирязев. C. R. Acad. Sci., Paris, **109**, 414 (1890).
  8. Pralezzi. Ber. Dtsch. chem. Ges., **25**, 200 (1892); Gaz. chim. ital., **22**, 493.
  9. Triedel et Krafts. Mon. Sci., 169 (1887).
  10. Berthelot. Ann. Chim. Phys., **5**, 17 (1878).
  11. Clermout. C. R. Acad. Sci., Paris, **80**, 1591 (1875).
  12. Belluei. Ber. Dtsch. chem. Ges., **12**, 136 (1879).
  13. Wurster. Ber. Dtsch. chem. Ges., **21**, 1525 (1888).
  14. Bokorny. Ber. Dtsch. chem. Ges., **21**, 1848 (1888).
  15. Dunstan a. Dymonel. J. Chem. Soc., 988 (1890).
  16. Wellington u. Tollens. Ber. Dtsch. chem. Ges., **18**, 3300 (1885).
  17. L. c
  18. Trillai. C. R. Acad. Sci., Paris, **115**, 290 (1892); Mon. Sci., 489 (1893).
  19. Noelting. Mon. Sci., 333—334 (1892).
-

## О ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ФОРМАЛЬДЕГИДА С БЕЛКОМ

[*Action de l'aldehyde formique sur l'albumine \**]

Описанные ниже опыты были поставлены с целью выяснить один из непонятных моментов в вопросе о разложении углекислоты и ассимиляции углерода растениями. Как я уже показал раньше<sup>1</sup>, углекислота распадается под действием солнечных лучей на перекисное соединение (надугольную кислоту) и на восстановитель (формальдегид). Все происходит так, как если бы три молекулы углекислоты реагировали между собой, образуя путем интрамолекулярного окисления две молекулы надугольной кислоты и одну молекулу формальдегида. Будучи очень неустойчивой перекисью, надугольная кислота затем распадается на углекислоту и кислород таким образом, что конечный результат реакции соответствует известной гипотезе Бейера:



Так как эта реакция обратима, то возникает вопрос, почему оба продукта распада, кислород *in statu nascendi* и формальдегид, не соединяются вновь, как только они образуются, регенерируя углекислоту. Ответ на этот вопрос усматривали в предположении, что формальдегид немедленно полимеризуется, превращаясь в сахаристые вещества и крахмал. Действительно, работы Бутлерова, Толленса, Лева и Фишера показали, что формальдегид легко полимеризуется, превращаясь в сахар.

Однако эта полимеризация не происходит самопроизвольно; предоставленный самому себе, формальдегид никогда не дает ни следа сахара. Он полимеризуется только в присутствии некоторых веществ (барит, поташ и т. д.), играющих роль агентов конденсации. Для того чтобы формальдегид, получающийся при разложении углекислоты в растениях, избежал окисления, ему необходимо находиться в присутствии веществ, способных временно связывать его, либо образуя промежуточные соединения, либо вызывая полимеризацию. Какое же вещество играет такую роль по отношению к формальдегиду в зеленых частях растений?

Я писал по этому поводу в цитированной выше статье<sup>2</sup> следующее:

«В качестве простого предположения, основанного только на предварительных опытах, я позволю себе высказать следующие соображения: так как крахмал первоначально появляется в среде, содержащей большое количество белковых веществ, и так как белок образует, повидимому, определенное соединение с формальдегидом, то возможно, что по мере

\* Mon. Sci., февраль, 1897 г.



образования последнего он связывается с белком и что это промежуточное соединение впоследствии распадается на углеводы и белок».

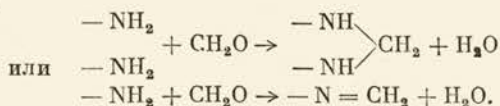
Эти соображения привели меня к изучению взаимодействия формальдегида с белком. Опыты, начатые в 1893 г., дали некоторые интересные результаты; они до сих пор еще не были опубликованы, так как я предполагал представить уже законченную работу.

Недавно Блюм<sup>3</sup> напечатал заметку, в которой он сообщает об открытии нового производного белка, получающегося при взаимодействии формальдегида с некоторыми растворимыми белками. Результаты, опубликованные Блюмом, значительно менее полны, чем имеющиеся у меня уже в течение некоторого времени. При этих условиях я вынужден, для того чтобы оставить за собой право продолжать начатые опыты, опубликовать мои данные, хотя я и не могу еще в настоящее время сделать никаких точных выводов относительно природы реакции, происходящей между формальдегидом и белком.

Прежде чем описать мои опыты, я считаю полезным резюмировать сообщение Блюма.

Изучая действие формальдегида на животные ткани (с некоторого времени формалин применяется для фиксирования анатомических препаратов), Блюм столкнулся с вопросом о взаимодействии формальдегида с растворенными белками. Он установил, что после прибавления формальдегида яичный белок теряет способность коагулировать при нагревании, сохраняя остальные белковые свойства. Эту новую модификацию белка он приготовляет, обрабатывая формальдегидом яичный белок, предварительно разбавленный водой и отфильтрованный для отделения глобулина.

Для удаления избытка формальдегида он кипятит смесь до тех пор, пока дистиллят не перестанет окрашивать реактив Шиффа, а остаток не перестанет восстанавливать аммиачную окись серебра. Получается желто-коричневая жидкость, дающая после упаривания в отсутствии воздуха желтую коллоидальную массу, полностью растворимую в горячей воде. Если выпаривание производить на воздухе, то получается нерастворимый в воде белок. Спирт и ацетон высаживают это соединение из растворов, но осадок растворим в воде. Кислоты также дают осадок, растворимый в воде и в избытке кислоты. Это вещество дает все реакции на белок. Блюм не пытался ни получить его в чистом виде, ни изучить его химические свойства, но он предполагает, что оно является представителем нового класса белковых соединений, получающихся при действии формальдегида на амидные группы белка:



Прежде чем начать упомянутые выше опыты, я приготовил некоторое количество сравнительно чистого белка, пользуясь методом Вюрца. 500 см<sup>3</sup> яичного белка были сбиты с холодной водой, оставлены на 24 часа и затем профильтрованы через полотно. Фильтрат, разделенный на несколько порций, был обработан уксуснокислым свинцом; отфильтрованный осадок промывался холодной водой. Для выделения белка осадок, взвешенный в воде, обрабатывался углекислотой; выпавший углекислый свинец был отделен фильтрованием. Отфильтрованная жидкость обрабатывалась сероводородом для удаления последних следов свинца. Так как сернистый свинец, взвешенный в белке, проходит через самые плотные фильтры, жидкость нагревалась, чтобы вызвать начало коагуляции. Через некоторое время коагулированный белок оседал, увлекая с собой почти весь сернистый свинец.

Таким образом я получил раствор белка, дающий, после упаривания досуха и сжигания в платиновом тигле, ничтожные следы минерального остатка. Приготовленный этим методом раствор применялся в следующих опытах. К 750 см<sup>3</sup> раствора, содержащего около 6% белка, было прибавлено 10% сорокапроцентного раствора формальдегида (продажный формалин); вся смесь была разделена на пять порций по 150 см<sup>3</sup>. Первые четыре порции были налиты в длинногорлые колбы и нагревались на водяной бане при 50° в течение нескольких дней. Пятая порция была выставлена в эрленмейеровской колбе на солнце, на южном окне лаборатории.

При проведении этих опытов я обнаружил, что белок, обработанный формальдегидом, теряет способность коагулировать при нагревании. Вследствие несовершенства регулировки температура бани случайно поднялась до 92° вместо 50°. Полагая, что опыт погиб вследствие коагуляции белка, я извлек одну из колб и с удивлением констатировал, что раствор остался неизменным. Тогда я вскипятил несколько миллилитров этого раствора в пробирке, — белок не коагулировал. Проверка показала мне, что жидкость давала все реакции белка: фиолетовое окрашивание с серноокислой медью и едким кали (биуретовая реакция), красное окрашивание реактива Миллона, желтое окрашивание концентрированной азотной кислотой и т. д. Первая пришедшая мне в голову мысль была, что при длительном нагревании в присутствии формальдегида белок превратился в пептон. Это превращение было мало вероятно, но все же возможно. Однако при подкислении жидкости уксусной кислотой и прибавлении раствора серноокислого магния образовался очень объемистый белый осадок. Как известно, пептоны в этих условиях осадка не дают.

Вначале я не придавал большого значения тому, что после взаимодействия с формальдегидом белок теряет способность коагулировать при нагревании, так как эта способность не является неизменным свойством яичного белка. Это свойство может исчезать и вновь появляться, без того чтобы можно было связать это с каким бы то ни было изменением химического состава белка. Так, например, белок, высушенный в тонком слое на солнце, дает осадок, полностью растворимый в воде и не коагулирующий при нагревании. Но если прибавить к раствору несколько капель уксусной кислоты, он вновь приобретает способность коагулировать. Белок, высушенный при низкой температуре, теряет способность коагулировать при нагревании и вновь приобретает ее после пропускания углекислоты. Во всех этих опытах меня главным образом интересовало выяснить, не обусловил ли белок полимеризацию формальдегида. Поэтому я обработал раствор избытком уксуснокислого фенилгидразина, но не получил, кроме фенилгидразинового производного формальдегида, никаких кристаллизующихся озазонов. Впоследствии я вновь занялся изучением действия формальдегида на белок, надеясь изолировать соединение, получающееся в результате этой реакции. Я не пытался удалить избыток формальдегида кипячением жидкости, как это делал позже Блюм. Продолжительное кипячение неизбежно должно вызвать некоторое разложение продукта реакции; кроме того, мне казалось невозможным полностью удалить формальдегид из раствора таким путем. Когда выпаривается водный раствор формальдегида, вода удаляется, но формальдегид в значительной части остается в виде триоксиметилена. Для того чтобы выделить избыток формальдегида и очистить продукты реакции, я использовал его свойство довольно хорошо растворяться в разбавленном спирте и выпадать в присутствии избытка спирта.

Следующий опыт показывает разницу в растворимости или, вернее, в осаждаемости спиртом между обычным белком и белком, обработанным формальдегидом. Две порции по 10 см<sup>3</sup> раствора яичного белка были на-

литы в пробирки; одна из них нагревалась после прибавления 0.5 см<sup>3</sup> формалина в течение нескольких минут в кипящей водяной бане. К каждой порции затем прибавлялся из бюретки 95%-ный спирт до появления молочной мути. Для раствора, не содержащего формальдегида, на это потребовалось 2.2 см<sup>3</sup> спирта, в то время как на обработанный формальдегидом раствор пошло 63.5 см<sup>3</sup>.

Для очистки продукта смесь белка с формальдегидом осаждалась избытком 95%-ного спирта; осадок фильтровался, промывался спиртом, растворялся в горячей воде и вновь осаждался спиртом. После промывания спиртом второй осадок был растворен в горячей воде и к раствору прибавлялся спирт до появления постоянной мути, которая затем была вновь растворена прибавлением нескольких капель воды. Из медленно выпаривавшегося при обыкновенной температуре раствора выпали по истечении довольно продолжительного времени маленькие, сильно преломляющие, плоские пластинки и вязкая полупрозрачная масса. Количество осадка было слишком мало, чтобы можно было еще раз очистить его. Более спешная работа заставила меня на некоторое время отложить эти опыты. Недавно я вновь взялся за них, в надежде получить указанным выше методом кристаллический продукт. Как известно, Гофмейстеру<sup>4</sup> удалось получить кристаллизованный белок, подвергая его фракционированному осаждению раствором сернистого аммония: он обрабатывает белок насыщенным раствором сернистого аммония, дает ему осесть при комнатной температуре, вновь растворяет образовавшийся осадок и осаждает его раствором сернистого аммония той же концентрации; эта операция повторяется, пока белок не начнет кристаллизоваться. С. Габриэль<sup>5</sup> ввел в этот метод видоизменение, заключающееся в том, что он обрабатывает белок насыщенным раствором сернистого аммония до появления постоянной мути, которую затем растворяет в нескольких каплях воды.

Мой метод основан на том же принципе, как и методы Гофмейстера и Габриэля, с той разницей, что природа вещества, с которым я имею дело, позволяет мне применять спирт вместо сернистого аммония.

Водный раствор продукта, очищенного спиртом по описанному способу, представляет собой бесцветную, слегка опалесцирующую жидкость, обладающую сладким вкусом. После выпаривания жидкости в вакуумном эксикаторе остаются светложелтые полупрозрачные пластинки. Помимо общих свойств белка раствор обладает особенностью давать с фенолом и анилином белые осадки, растворимые в спирте.

Мне остается сказать еще несколько слов о пятой порции исходной смеси белка с формальдегидом. Она была оставлена на окне до полного исчезновения запаха формальдегида, на что потребовалось более четырнадцати месяцев. Затем раствор, внешний вид которого не изменился в результате такого длительного действия солнечных лучей, был обработан избытком уксуснокислого фенилгидразина и нагрет на водяной бане. При этом образовался обильный желтый осадок, состоящий из микроскопических игл. Так как осадок очень плохо фильтровался, я обработал смесь спиртом, в надежде, что спирт растворит образовавшиеся озазоны и останется белок, осажденный фенилгидразином. Однако осадок полностью растворился и дал желтый, прозрачный раствор. Из оставленного в эксикаторе раствора выпало значительное количество желтых игл, которые были отфильтрованы и высушены. Точка плавления кристаллов колебалась между 120 и 140°. Кристаллы вели себя не как однородное вещество и обугливались при плавлении. Чтобы очистить этот продукт, я растворил кристаллы в разбавленном спирте и дал выпариться раствору над серной кислотой в вакуум-эксикаторе. К несчастью, вследствие лабораторной аварии

пропало все исследуемое вещество. Я начал опыты вновь, но в настоящее время они еще не закончены.

8 декабря 1896 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бах. Mon. Sci., 669 (1893); настоящая книга, стр. 155.
  2. L. c., стр. 674.
  3. Blum. Zs. physiol. Chem., 22, 127 (1896).
  4. Hofmeister. Zs. physiol. Chem., 14, 165 (1890).
  5. Gabriel. Zs. physiol. Chem., 15, 456 (1891).
-

## О СВЯЗИ МЕЖДУ ВОССТАНОВЛЕНИЕМ, ЭЛЕКТРОЛИЗОМ И ФОТОЛИЗОМ УГОЛЬНОЙ КИСЛОТЫ \*

*Получено 4 февраля 1898 г., доложено 5 февраля*

По поводу появившейся в 1895 г. статьи проф. Либена<sup>1</sup> «Ueber Reduction der Kohlensäure bei gewöhnlicher Temperatur»\*\* Н. Н. Бекетов напечатал заметку<sup>2</sup>, содержащую указание на то, что еще в 1869 г., подвергая действию электрического тока в продолжение нескольких недель раствор уголекислоты, содержащий небольшое количество двууглекислого натрия, он получил в качестве продукта восстановления муравьиную кислоту.

Рассматривая этот результат с точки зрения современных теорий электролиза, я пришел к заключению, что он может быть объяснен только побочным действием на уголекислоту освобождающегося при электролизе водорода. Я обратился поэтому к изучению восстановления уголекислоты водородом в момент выделения. Сопоставляя затем все факты, касающиеся восстановления, электролиза и фотолиза уголекислоты, я нашел совершенно неожиданно, что между этими тремя категориями реакций существует поразительная связь, которая бросает новый свет на процесс разложения уголекислоты в зеленых частях растений.

Не вдаваясь в разбор опытов, произведенных до 1895 г. над восстановлением уголекислоты водородом в момент выделения, я вкратце остановлюсь на вышеупомянутой работе Либена, в которой интересующиеся найдут обзор литературы вопроса.

Либен повторил прежние опыты Кольбе, Шмитта и Мали и постарался выяснить вопрос посредством дальнейших очень многочисленных опытов, в которых он менял то источник водорода в момент выделения, то реакцию среды. В качестве источников водорода он пользовался амальгамами натрия, калия, бария, алюминия и цинком в присутствии едкого кали или аммиака. Опыты восстановления он вел или в кислой среде — в присутствии минеральных кислот, или в щелочной среде. В результате всех этих опытов он пришел к следующим заключениям:

- 1) В водном растворе уголекислота вообще не восстанавливается водородом в состоянии выделения.
- 2) Двууглекислые соли щелочных и щелочноземельных металлов (кроме магния), особенно в момент образования, легко восстанавливаются водородом в момент выделения в муравьинокислые соли.
- 3) Всякий раз, как было констатировано образование муравьиной кислоты, оно происходило по п. 2.

\* ЖРФХО, 30, 297 (1898).

\*\* «О восстановлении уголекислоты при обыкновенной температуре».

4) Свет не играет никакой роли в восстановлении углекислоты водородом в момент выделения.

5) Единственным продуктом восстановления углекислоты является муравьиная кислота.

Последний результат стоит, повидимому, в противоречии с установившимися взглядами на восстановление органических кислот, согласно которым образовавшаяся муравьиная кислота должна была бы подвергнуться дальнейшему восстановлению под действием избытка водорода в момент выделения.

Оставляя в стороне опыты, давшие Либену отрицательные или мало удовлетворительные результаты, значение которых не всегда ясно, интересно было выяснить причину, по которой восстановительный процесс остановился на муравьиной кислоте, тогда как восстановление углекислоты в муравьиную кислоту совершилось с чрезвычайной легкостью.

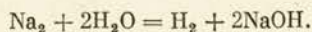
Рассматривая условия, в которых были произведены опыты Либена, не трудно было открыть эту причину.

Углекислота  $O = C \begin{matrix} \text{OH} \\ \text{OH} \end{matrix}$  — кислота карбоксильная, и как таковая она должна дать альдегид при замене гидроксила водородом. Но она отличается от других карбоксильных кислот тем, что содержит не один, а два гидроксила, связанных с карбонилем. В соответствии с этим углекислота может дать не один, а два альдегида.

Заменяя атомом водорода один из гидроксильных угольной кислоты, мы получим первый альдегид ее  $O = C \begin{matrix} \text{H} \\ \text{OH} \end{matrix}$  муравьиную кислоту. Все свойства этой кислоты объясняются ее двойным характером альдегида и кислоты. При замене другого гидроксила атомом водорода мы получим второй альдегид углекислоты  $O = C \begin{matrix} \text{H} \\ \text{H} \end{matrix}$  муравьиный альдегид.

Само собою разумеется, для того чтобы углекислота могла быть восстановлена водородом в момент выделения, оба гидроксила ее должны быть нетронутыми, т. е. она должна находиться в свободном состоянии. Этого как раз и нет в опытах Либена.

Когда он восстанавливает углекислоту амальгамами в щелочных растворах, на всякую частицу освобождающегося водорода образуются две частицы едкой щелочи:



Эта щелочь насыщается частью углекислотой, частью муравьиной кислотой, образующейся при восстановлении углекислоты. Очевидно, что муравьинокислые соли, например:  $O = C \begin{matrix} \text{H} \\ \text{ONa} \end{matrix}$ , не содержа свободного гидроксила, не могут больше быть восстановлены водородом в момент

выделения, так же как и средняя углекислая соль  $O = C \begin{matrix} \text{ONa} \\ \text{ONa} \end{matrix}$ , которую Либен почему-то тоже счел нужным подвергнуть действию амальгамы натрия, конечно, без всякого результата. С другой стороны, понятно, почему двууглекислые соли  $O = C \begin{matrix} \text{OH} \\ \text{OMe} \end{matrix}$  легко восстанавливаются водородом

в момент выделения в муравьинокислые соли  $O = C \begin{matrix} \text{H} \\ \text{OMe} \end{matrix}$ , без всякой возможности дальнейшего восстановления последних.

Таким образом опыты Либена показывают, что для нормального восстановления углекислоты следует избегать и кислой и щелочной среды, так как присутствие минеральных кислот вообще задерживает процесс восстановления, щелочи же нейтрализуют образовавшуюся муравьиную кислоту и предохраняют ее от дальнейшего восстановления.

Чтобы удовлетворить этим условиям, я взял источником водорода водородистый палладий. Как известно, это соединение медленно разлагается при обыкновенной температуре с выделением водорода, причем главное удобство его заключается в том, что металлический палладий относится безразлично к слабым кислотам и не может поэтому нейтрализовать образующуюся муравьиную кислоту.

10 г губчатого палладия и пластинка того же металла, весившего 2.85 г (это все, чем я располагал), были нагружены водородом или электролитически, или же действием тока водорода при 120—130°. Полученное водородистое соединение было внесено в стеклянный цилиндр, содержащий 20 см<sup>3</sup> воды, предварительно прокипяченной и охлажденной в струе углекислого газа. Цилиндр закрывался каучуковой пробкой с двумя отверстиями: через одно проходила газопроводная трубка, а в другое была вставлена открытая манометрическая трубка, содержащая в нижнем изгибе известное количество ртути. Это приспособление давало возможность насыщать воду в цилиндре углекислым газом под некоторым давлением. Во все время опыта цилиндр находился в сообщении с аппаратом для углекислого газа, причем вода насыщалась последним регулярно каждые три дня.

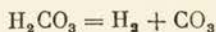
По прошествии 30 дней жидкость из цилиндра отфильтровывалась и обрабатывалась анилиновой водой. Через некоторое время образовался белый осадок, который был промыт водой и растворен в большом количестве эфира. При медленном испарении эфирного раствора осели тонкие, длинные иглы, которые по их точке плавления (136.5—138°) и внешнему виду были тождественны с кристаллами ангидроформальдегиданилина  $\text{C}_6\text{H}_5\text{N}=\text{CH}_2$ , полученными при действии муравьиного альдегида на анилин (Толленс).

В другом опыте к профильтрованной жидкости прибавлялся избыток аммиака, жидкость выпаривалась досуха в водяной бане, остаток растворялся в очень небольшом количестве воды и обрабатывался бромной водой. Образовался желтый осадок, который Либен считает вполне характерным для гексаметилентетрамина.

Опыты эти показывают, что восстановление углекислоты в водном растворе при отсутствии оснований, могущих нейтрализовать образовавшуюся муравьиную кислоту, действительно приводит к муравьиному альдегиду. Результат вполне подтверждает изложенные выше соображения об отношении между углекислотой, муравьиной кислотой и муравьиным альдегидом.

Применим теперь полученный результат к электролизу углекислоты.

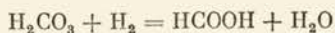
По общему правилу, при электролизе углекислоты в водном, т. е. в чрезвычайно разбавленном, растворе господствующими фазами являются следующие:



и



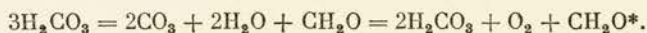
Как побочные реакции, мы имеем:



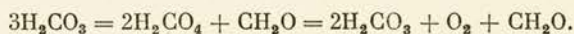
и



Для того чтобы одна частица углекислоты могла быть восстановлена в муравьиный альдегид, нужно, чтобы две другие частицы этой кислоты были разложены на ионы. Совокупность этих реакций может поэтому быть выражена следующими уравнениями:



Исходя из соображений совершенно другого порядка, я показал в статье, напечатанной в 1893 г.<sup>3</sup>, что под действием солнечных лучей углекислота разлагается согласно уравнению:



Соединение  $\text{H}_2\text{CO}_4$  есть, очевидно, не что иное как группа  $(\text{CO}_3 + \text{H}_2\text{O})$  (гидрат перекиси карбонила), образующаяся при электролизе, которая должна немедленно после своего образования распасться на углекислоту и кислород. В своей статье: «О роли перекисей в процессах медленного окисления»<sup>4</sup> я дал несколько указаний насчет способа образования и реакций перекиси карбонила. Я напому здесь только, что надугольнокислый калий, недавно открытый Констаном и Ганзенем, относится при обыкновенной температуре к воде совершенно так же, как и соединение  $\text{H}_2\text{CO}_4$  или группа  $(\text{CO}_3 + \text{H}_2\text{O})$ , т. е. распадается на углекислоту и кислород.

Таким образом, если предположить, что при электролизе углекислота восстанавливается освобождающимся водородом, то окажется, что электролиз этой кислоты совершенно совпадает с фотолизом ее. Аналогия между этими двумя категориями реакций превращается в полное тождество, потому ли что солнечные лучи действуют точно так же, как электричество (благоприятствуя распадению  $\text{H}_2\text{CO}_3$  на ионы), потому ли что энергия их превращается в электричество.

Добавлю еще, что существование электрических токов в растениях можно считать доказанным и что мысль о превращении солнечной энергии в электричество была уже высказана Балло<sup>5</sup>, именно в применении к процессу разложения углекислоты в растениях, причем предполагалось, что водород, освобождающийся при электролизе водных растворов, идет на восстановление углекислоты.

1/13 февраля 1898 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Liben. Monatsh. f. Chem., 211—248 (1895).
2. Бекетов. ЖРФХО, 26, 321 (1894).
3. Бах. С. R. Acad. Sci., Paris, 116, 1145 (1893); Mon. Sci., 669 (1893); настоящая книга, стр. 155.
4. Бах. ЖРФХО, 29, 373 (1897); настоящая книга, стр. 242.
5. Ballot. Ver. Dtsch. chem. Ges., 17, 10 (1884).

\* Н. Н. Бекетов получил при электролизе углекислоты только муравьиную кислоту. Но он производил электролиз в присутствии двууглекислого натрия, т. е. поставил опыт в такие условия, где образовавшаяся муравьиная кислота могла быть нейтрализована углекислой щелочью.



---

## К ВОПРОСУ О РАЗЛОЖЕНИИ УГЛЕКИСЛОТЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ СВЕТА

[*Zur Kenntniss der Zersetzung der Kohlensäure unter  
dem Einflusse des Lichtes*] \*

В опубликованной недавно работе «К вопросу о процессах ассимиляции» Эйлер<sup>1</sup> описывает, между прочим, некоторые опыты, которые я произвел несколько лет тому назад, исследуя разложение углекислоты под действием света. Я позволю себе сделать следующие замечания к статье Эйлера:

1. **Опыты с уксуснокислым ураном.** При пропускании углекислоты через раствор уксуснокислого урана, подвергнутый прямому действию солнечных лучей, я наблюдал восстановление уксуснокислого урана с образованием смеси гидрата окиси и закиси урана. При освещении в отсутствие углекислоты или при пропускании углекислоты в темноте раствор уксуснокислого урана оставался без изменения. Эйлер повторил этот опыт и нашел, что раствор уксуснокислого урана восстанавливается на солнечном свете даже в отсутствие углекислоты или при пропускании азота. В противоположность этому я утверждаю, что использованный мною раствор уксуснокислого урана мог оставаться в течение многих дней на солнечном свете без того, чтобы наступало малейшее восстановление.

Как было указано в работе, которую я опубликовал еще в 1893 г.<sup>2</sup>, опыт многократно повторялся при прибавлении различных веществ. Ни в одном случае не наблюдалось восстановления уксуснокислого урана в отсутствие углекислоты. Тот факт, что Эйлер получил противоположный результат, повидимому, следует приписать присутствию постороннего вещества или в его препарате уксуснокислого урана, или в моем. Я предполагаю в ближайшем будущем выяснить этот вопрос путем детальных исследований.

2. **Опыты с диметиланилином.** Приведенная выше подробная статья, в которой я, между прочим, описывал опыт с диметиланилином, не была известна Эйлеру. Он мог бы избавить себя от необходимости опровергать этот опыт, так как я признал уже одиннадцать лет тому назад<sup>3</sup> при помощи опытов, которые вполне аналогичны тем, которые произвел в последнее время Эйлер, ненадежность применявшегося мною метода Трийа для обнаруживания формальдегида.

3. **Электролитические опыты.** Эйлер пишет: «нет никакой необходимости рассматривать здесь электролитические опыты Баха»; в этом действительно нет совершенно никакой необходимости, ибо

---

\* Ber. Dtsch. chem. Ges., 37, 3985 (1904).

я до сих пор не опубликовал еще ни одного электролитического опыта. В статье, цитированной Эйлером, я лишь указал на возможную идентичность явления фотолиза и электролиза углекислоты.

22 октября 1904 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Euler. Ber. Dtsch. chem. Ges., **37**, 3411 (1904).
2. Бах. Исследование химического механизма ассимиляции углекислоты хлорофильными растениями [Recherches sur le mécanisme chimique de l'assimilation de l'acide carbonique par les plantes à chlorophylle].—Mon. Sci., [4], **7**, 669 (1893); настоящая книга, стр. 155.
3. Л. с., стр. 168.

---

## ДЕЙСТВИЕ СВЕТА НА УКСУСНОКИСЛЫЙ УРАНИЛ

[*Einwirkung des Lichtes auf Uranylacetat*]\*

Тринадцать лет тому назад я наблюдал<sup>1</sup>, что при пропускании углекислоты через раствор уксуснокислого уранила, непосредственно освещенный солнечными лучами, происходит восстановление соли с образованием смеси гидрата закиси и окиси урана. При освещении в отсутствие углекислоты или при пропускании углекислоты в темноте раствор уксуснокислого уранила оставался без изменения; это позволило предположить, что восстановление надо приписать одновременному действию света и углекислоты, т. е. разложению последней. Эйлер<sup>2</sup> недавно повторил эти опыты и нашел, что уксуснокислый уранил восстанавливается и в отсутствие углекислоты и что углекислота играет здесь только ту роль, что она вытесняет кислород, препятствующий восстановлению.

Я сначала повторил опыт в тех же условиях, которых придерживался ранее, и подтвердил полученные тогда результаты. 35 см<sup>3</sup> 1.5%-ного раствора уксуснокислого уранила были подвергнуты прямому действию солнечного света в закрытой пробкой эрленмейеровской колбе на 100 см<sup>3</sup>. После 180-часового освещения жидкость оставалась совершенно прозрачной, в то время как при пропускании углекислоты она уже заметно мутнела через 30 минут. Дальнейшие опыты показали, однако, что здесь имеет место случайное равновесие между восстанавливающим действием света и окисляющим действием кислорода. Точка зрения Эйлера, таким образом, совершенно правильна.

Опыты производились в хорошо прокалиброванных тонкостенных пробирках с четырьмя различными препаратами уксуснокислого уранила. Результаты этих опытов вкратце следующие:

1. При одинаковом освещении и равной концентрации уксуснокислого уранила время, необходимое для появления заметной мути в жидкости, обратно пропорционально высоте слоя жидкости. Если отношение между диаметром (поверхность соприкосновения с воздухом) и высотой слоя достигает определенного значения, то восстановление уксуснокислого уранила совершенно не имеет места.

2. При равном освещении, диаметре и высоте слоя продолжительность реакции обратно пропорциональна концентрации уксуснокислого уранила. Горячие насыщенные растворы уксуснокислого уранила почти моментально мутнеют под действием света.

3. Препараты, полученные путем фракционированного восстановления насыщенных растворов уксуснокислого уранила на свету, последующего

---

\* Ber. Dtsch. chem. Ges., 39, 1672 (1906).

окисления на воздухе промытых осадков и растворения в уксусной кислоте, обнаруживают те же свойства по отношению к действию света, как и первоначальный уксуснокислый уранил. Таким образом, нет никаких оснований предполагать, что уксуснокислый уранил содержит фотокатализатор, ускоряющий разложение этой соли таким же образом, как азотнокислое серебро ускоряет разложение галоидных солей серебра.

20 апреля 1906 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ба х. Mon. Sci., [4], 7, 669 (1893); настоящая книга, стр. 155.
  2. Ба х. Ber. Dtsch. chem. Ges., 37, 3985 (1904); настоящая книга, стр. 183.
-

## О ДЕЙСТВИИ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА НА УГЛЕКИСЛЫЕ СОЛИ И О НОВОЙ ТЕОРИИ АССИМИЛЯЦИИ УГЛЕКИСЛОТЫ РАСТЕНИЯМИ \*

(Совместно с Э. Э. Ивановским)

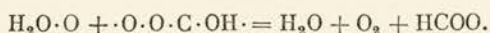
В статье «Die Reduktion der Kohlensäure durch Hydroperoxyd als Grundlage der pflanzlichen Assimilation»\*\*, напечатанной в 1918 г., Г. Вислиценус<sup>1</sup> выступает с новой и довольно неожиданной теорией ассимиляции углекислоты растениями. Основываясь на сделанном им наблюдении, что перекись водорода будто бы восстанавливает углекислые соли в муравьинокислые с выделением кислорода, он предполагает, что и в растениях первым актом ассимиляции является такое же восстановление углекислоты перекисью водорода. Последняя же всюду распространена в качестве промежуточного продукта всякого процесса медленного окисления, в том числе и дыхания. И так как перекись водорода является эндотермическим соединением (—21.7 ккал), то, по мнению Вислиценуса, восстановление углекислоты в муравьиновую кислоту происходит «без затраты энергии» (под этим следует разуметь энергию солнечных излучений) и становится даже экзотермическим процессом.

Чтобы объяснить это восстановление углекислоты перекисью водорода, он высказывает предположение, что, вследствие «перегруженности» атома углерода кислородом, угольный ангидрид  $\text{CO}_2$  и особенно ионы

$\text{O} = \text{C} \begin{matrix} \text{O} \\ \text{OH} \end{matrix}$  и  $\text{O} = \text{C} \begin{matrix} \text{O} \\ \text{O} \end{matrix}$  носят как бы перекисный характер. Поэтому они

раскисляются под действием перекиси водорода с выделением кислорода, подобно тому как это происходит с окисью серебра или перекисью марганца.

Реакцию эту он выражает предположительно четырьмя различными уравнениями, из которых наиболее простым и понятным является следующее:



Что касается дальнейшего восстановления образовавшейся муравьиной кислоты до муравьиного альдегида, то о механизме его Вислиценус высказывается довольно неопределенно. При обыкновенной температуре, по его наблюдениям, восстановление муравьиных солей перекисью водорода совсем не происходит или идет крайне медленно. Поэтому тут он допускает

\* Сб. работ по чистой и прикладной химии.—Тр. Хим. ин-та им. Л. Я. Карпова, 1, 75 (1923).

\*\* «Восстановление углекислоты перекисью водорода как основа ассимиляции углекислоты растениями».

необходимость участия посторонней энергии (света) или катализатора (хлорофилла). Но, по его мнению, новым и самым важным в его теории является то, что первый и самый трудный шаг ассимиляции — превращение неорганического углерода в органический, углекислоты в муравьиную кислоту, — который до сих пор рассматривался как эндотермический процесс, может всюду непосредственно осуществляться путем «перекисного восстановления», без затраты внешней энергии, и стать экзотермическим процессом.

Чтение этой работы вызвало ряд сомнений как теоретического, так и методологического характера. Совершенно необоснованными и мало вероятными показались следующие предпосылки теории Вислиценуса.

### ПЕРЕКИСНЫЙ ХАРАКТЕР УГЛЕКИСЛОТЫ

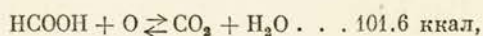
К перекисям принято причислять такие высшие степени окисления, которые содержат легкоотщепляемый кислород и потому действуют как окислители. Сюда принадлежат двуокись свинца, двуокись марганца, хромовая кислота и др. Их восстановление перекисью водорода объясняется тем, что эти кислородные соединения металлов присоединяют к себе перекись водорода, образуя высшие, неустойчивые металлические окислы. Распадаясь, последние теряют не только кислород, присоединенный от перекиси водорода, но и свой собственный подвижный кислород, раскисляясь до устойчивой окиси.

Так, перекись свинца  $PbO_2$  превращается в  $PbO$ ,  $CrO_3$  в  $Cr_2O_3$  и т. д. Применить эту реакцию к углекислоте нет никаких оснований. Углекислота не содержит легкоотщепляемого кислорода и раскисляется в окись углерода только при высокой температуре. Считать углекислоту перекисным соединением по признаку «перегруженности кислородом» тоже нет оснований. В серной кислоте атом серы более нагружен кислородом, чем атом углерода в углекислоте, а тем не менее перекись водорода действует на серную кислоту не восстанавливающим, а окисляющим образом.

### ПЕРЕКИСНОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ УГЛЕКИСЛОТЫ КАК ЭКЗОТЕРМИЧЕСКИЙ ПРОЦЕСС

В предположении, что под действием перекиси водорода углекислота раскисляется в муравьиную кислоту с выделением тепла, кроется, повидимому, грубое недоразумение.

Так как при реакции окисления муравьиной кислоты в  $CO_2$  и  $H_2O$  выделяется:

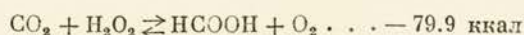


то такое же количество калорий потребно для восстановления углекислоты в муравьиную кислоту.

При распаде перекиси водорода выделяются:



Поэтому реакция:



не только не может сопровождаться выделением тепла, но и вообще не может осуществиться без притока энергии извне.

Сравнивать перекисное восстановление углекислоты с таким же восстановлением окиси серебра или двуокиси свинца, как это делает Вислиценус, никоим образом нельзя, так как количество перемещенной энергии в этих случаях меньше того количества, которое перекись водорода содержит в скрытом состоянии:



Поэтому восстановление этих соединений перекисью водорода действительно протекает экзотермически.

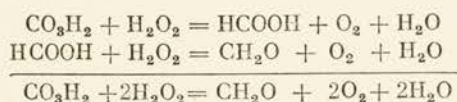
### ОТНОШЕНИЕ $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$ В ПРОЦЕССЕ АССИМИЛЯЦИИ

Новейшими классическими исследованиями Вильштеттера<sup>2</sup> установлено с полной определенностью, что при всех обстоятельствах в процессе ассимиляции на каждый объем разложенной углекислоты выделяется один объем кислорода. Так как образование формальдегида при фотохимическом разложении углекислоты теперь вполне доказано, то знаменитая гипотеза ассимиляции, предложенная Бейером:



стала теперь общепризнанным фактом.

Если принять теорию перекисного восстановления углекислоты, выдвигаемую Вислиценусом, то на каждую молекулу разложенной углекислоты выделились бы 2 молекулы кислорода:



Теория Вислиценуса и в этом отношении противоречит фактам.

Что касается экспериментального обоснования этой теории, то оно поражает своей скудостью. В ряде опытов Вислиценус определял количество кислорода, которое выделяется из смеси перекиси водорода и двууглекислых щелочей при разных условиях, но точного количественного определения образовавшейся муравьиной кислоты он не производил. По его собственным словам, муравьиной кислоты было настолько мало, что точное количественное определение представлялось невозможным. Присутствие ее он устанавливал качественно — восстановлением аммиачной окиси серебра. Но так как перекись водорода тоже восстанавливает этот реактив, то Вислиценус пытается доказать, что восстановление перекисью водорода качественно отличается от восстановления муравьиной кислотой.

Ввиду важности вопросов, затронутых статьей Вислиценуса, мы решили проверить приведенные им наблюдения.

Для первоначальной ориентировки мы поставили следующий опыт, точно придерживаясь указаний Вислиценуса. 0.84 г двууглекислого натрия были смешаны при обыкновенной температуре с 10 мл 15%-ной перекиси водорода (пергидрол Мерка). Выделение кислорода началось через 2 минуты.

Через 24 часа щелочная смесь была упарена, количественно переведена в небольшую колбу Вюрца, подкислена разбавленной серной кислотой и подвергнута перегонке в струе пара. Так как дистиллят дал крайне слабую

реакцию с аммиачным раствором азотнокислого серебра, то к нему было прибавлено небольшое количество едкого натра для закрепления муравьиной кислоты, и смесь была упарена на водяной бане до 2 см<sup>3</sup>. К 1 см<sup>3</sup> этого раствора был прибавлен одинаковый объем аммиачно-серебряного реактива. После двухминутного кипячения получилось светлое коричневатожелтое окрашивание.

Чтобы составить себе понятие о количестве муравьинокислого натрия, которому соответствовало полученное окрашивание, мы приготовили титрованный раствор чистого муравьинокислого натрия и систематическим разбавлением получили ряд растворов, к которым мы прибавляли в одинаковых условиях аммиачно-серебряный реактив и наблюдали возникавшее после двухминутного нагревания окрашивание. Оказалось, что

|          |   |        |                     |                                                |
|----------|---|--------|---------------------|------------------------------------------------|
| 0.001    | г | HCOONa | в 1 см <sup>3</sup> | дает коллоидальную коричневую муть;            |
| 0.0001   | „ | HCOONa | „ 1 „ „             | „ „ „ коричневато-серую муть;                  |
| 0.00005  | „ | HCOONa | „ 1 „ „             | „ „ „ слабое желтовато-коричневое окрашивание; |
| 0.000001 | „ | HCOONa | „ 1 „ „             | „ „ „ еле заметное окрашивание.                |

Следует заметить, что точное колориметрирование этих растворов в высшей степени затруднительно, так как окрашивание здесь зависит не только от количества восстановленного серебра, но и от величины коллоидальных частиц, обусловливаемой случайными, не поддающимися контролю причинами.

Полученное нами в первом опыте светлое коричневатожелтое окрашивание приблизительно соответствовало содержанию 0.00005 г HCOONa в 1 см<sup>3</sup>.

Чтобы устранить всякий источник ошибок, мы проверили наши реактивы и воду на содержание веществ, восстанавливающих аммиачную окись серебра. Оказалось, что и двууглекислый натрий, и едкий натр, и дистиллированная вода в условиях опыта заметно действовали восстанавливающим образом на реактив. Ввиду этого бикарбонат был очищен следующим образом.

Чистый препарат Кальбаума был растворен в воде, раствор кипятился почти до полного удаления слабосвязанной углекислоты и при сильном охлаждении насыщался углекислотой. Выпавший двууглекислый натрий отфильтровывался и три раза промывался холодной водой. После такой обработки он не давал более реакции с аммиачной окисью серебра.

Едкий натр был приготовлен из металлического натрия, вырезанного из середины большого куска.

Дистиллированная вода была очищена перегонкой из подкисленного раствора марганцовистокислого калия.

С этими реактивами, не содержащими восстанавливающих веществ, было сделано несколько опытов, давших вполне однозначные результаты. Для примера мы приведем следующий.

3.2 г NaHCO<sub>3</sub> были растворены в 40 см<sup>3</sup> воды и к раствору прибавлено 10 см<sup>3</sup> чистой 15%-ной перекиси водорода. Выделение пузырьков газа началось через 2 минуты и продолжалось около 30 часов (при комнатной температуре). По истечении этого времени проба с подкисленным раствором иодистого калия и крахмала обнаружила присутствие значительного количества перекиси водорода в смеси. По прошествии 48 часов смесь содержала только следы перекиси. Смесь была тогда подкислена разбавленной серной кислотой и подвергнута перегонке в струе водяного пара, причем было собрано 150 см<sup>3</sup> дистиллята, не дававшего кислой реакции на лакмус; последний был подщелочен чистым едким натром и упарен до



объема в 3 см<sup>3</sup>. К 1 см<sup>3</sup> полученного раствора было прибавлено несколько капель аммиачного раствора окиси серебра, но даже после 2-минутного кипячения не наблюдалось сколько-нибудь заметных признаков восстановления серебра.

На основании приведенных опытов можно с полной уверенностью утверждать, что в условиях, указанных Вислиценусом, двууглекислый натрий не восстанавливается в муравьинокислый натрий под действием перекиси водорода. Как мы уже указали выше, такое «перекисное восстановление» углекислоты по теоретическим соображениям представляется совершенно невозможным. Отпадает поэтому вся новая теория ассимиляции, выдвигнутая Вислиценусом.

#### ЛИТЕРАТУРА

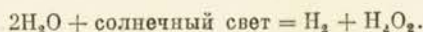
1. Wislicenus. Ber. Dtsch. chem. Ges., **51**, 942 (1918).
  2. Wilstätter. Ber. Dtsch. chem. Ges., **50**, 1800 (1917).
-

## МНИМОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ УГЛЕКИСЛОТЫ В ФОРМАЛЬДЕГИД ПЕРЕКИСЬЮ ВОДОРОДА И ТЕОРИЯ АССИМИЛЯЦИИ ТУНБЕРГА \*

(Совместно с А. М. Моносоном)

Несколько лет тому назад Г. Вислиценус<sup>1</sup> выступил с новой теорией ассимиляции углекислоты растениями — теории, основанной на сделанном им наблюдении, что перекись водорода восстанавливает углекислые и двууглекислые соли в муравьинокислые. По этой теории, первым и наиболее трудным шагом ассимиляции является именно «перекисное восстановление» угольной кислоты в муравьиновую, и это восстановление почему-то рассматривается Вислиценусом как экзотермический процесс. Крайняя неправдоподобность такой реакции побудила А. Н. Баха и Э. Э. Ивановского<sup>2</sup> подвергнуть опыты Вислиценуса основательной проверке, причем выяснилось, что в указанных им условиях не образуется и следа какого-либо соединения, восстанавливающего аммиачную окись серебра, если только озаботиться тщательной очисткой исходных материалов и полным удалением перекиси водорода из продуктов реакции.

Недавно Т. Тунберг<sup>3</sup> опубликовал работу под заглавием: «Новый путь от углекислоты к формальдегиду. К теории ассимиляции углекислоты». В ней он выставляет новую теорию ассимиляции и пытается подкрепить ее опытом. Исходя из так называемой «дегидрогенизационной» теории окислительных процессов, выдвинутой Виландом, он рассматривает восстановление углекислоты как *процесс гидрогенизации* и предполагает, что объектом фотохимического воздействия является не молекула углекислоты, а вода, причем из последней образуется свободный водород и перекись водорода:



Восстановление углекислоты является уже вторичным, чисто химическим процессом, в котором молекула углекислоты присоединяет свободный водород и водород перекиси водорода с образованием метиленгликоля (формальдегидгидрата) и освобождением кислорода:



Чтобы подкрепить эту гипотезу, Тунберг пытался восстановить различные углекислые соли действием перекиси водорода в надежде получить таким образом формальдегид. Опыты дали отрицательные результаты за одним исключением: при перегонке взвеси основного углекислого свинца

\* Сб. работ по чистой и прикладной химии. — Тр. Хим. ин-та им. Л. Я. Карпова, 3, 66 (1924).

с перекисью водорода получился дистиллят, в котором присутствие формальдегида могло быть доказано с полной определенностью.

Т. Вейгерт<sup>4</sup>, считая на основании опытов Тунберга восстановление углекислоты в формальдегид вполне доказанным, приступил к электронному толкованию гипотезы и дал для процесса ассимиляции ряд весьма сложных уравнений. Однако он оставляет еще открытым вопрос о том, «происходит ли восстановление углекислоты в окончательном счете действием свободного водорода и гидроксильных групп или же молекул  $H_2$  и  $H_2O_2$ ».

Нас интересовала здесь чисто химическая сторона вопроса — возможность восстановления углекислоты в формальдегид действием перекиси водорода. Если, как показал термохимический подсчет и как было подтверждено опытами Баха и Ивановского, перекись водорода не в состоянии восстановить угольную кислоту в муравьиную, то еще меньше можно ожидать, что этот путь приведет к формальдегиду, так как для восстановления угольной кислоты в формальдегид потребуется большая затрата энергии, чем для восстановления ее в муравьиную кислоту. Ввиду этого мы решили подвергнуть опыты Тунберга тщательной проверке.

Прежде всего мы повторили основной его опыт и получили тот же результат, что и Тунберг: при перегонке водной взвеси основного углекислого свинца с перекисью водорода (из пергидрола «для тропиков» Мерка) в дистиллят переходит вещество, которое дает характерные реакции формальдегида. Приблизительное колориметрическое определение формальдегида в разных пробах дало 0.0005—0.001 мг  $CH_2O$  в миллилитре. В дальнейшем обнаружилось, однако, что образование формальдегида никоим образом не может быть отнесено за счет восстановления углекислоты перекисью водорода, ибо взвесь основного углекислого свинца, предварительно освобожденная полностью от углекислоты действием слабой серной кислоты и кипячением, а затем обработанная чистым раствором едкого барита до слабощелочной реакции, дала при перегонке с перекисью водорода такое же количество формальдегида, как и первоначальная углекислая соль.

Мы поэтому предположили, что формальдегид получился из пергидрола «для тропиков», к которому, согласно патенту, прибавляется как консервирующее средство барбитуровая кислота. На эту возможность обратил внимание также и Тунберг, но он не остановился на ней по тем соображениям, что «указанная реакция получается и с другими препаратами перекиси водорода, например, с шведской перекисью и оксигенолом. Едва ли можно допустить, что во всех этих препаратах содержится одна и та же примесь, которая дает формальдегид при перегонке с углекислым свинцом».

При медленном прибавлении перекиси водорода к взвеси углекислого свинца замечается, что всякая прибавленная капля вызывает преходящее бурое окрашивание, которое указывает на промежуточное образование перекиси свинца. Естественно было предположить, что последняя участвует в реакции в качестве катализатора при окислении органического вещества, прибавленного к пергидролу для увеличения его устойчивости. Чтобы убедиться в правильности этого предположения, мы подвергли перегонке 50 см<sup>3</sup> 6%-ного раствора этой перекиси в присутствии 0.1 г перекиси свинца и нескольких капель баритовой воды и получили столько же формальдегида, сколько и при применении 5 г основного углекислого свинца. Переганная сама по себе (без прибавления перекиси свинца) проба пергидрола не дала в дистилляте реакции на формальдегид, что уже было замечено Тунбергом.

Американский препарат перекиси водорода, содержащий ацетанилид

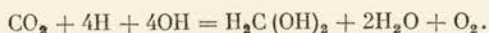
в качестве консервирующего средства, дал при перегонке с углекислым свинцом положительную реакцию на формальдегид. Но такая же реакция была получена и при перегонке этой перекиси водорода с перекисью свинца в отсутствии углекислоты.

С чистым, не содержащим никаких консервирующих средств пергидролом Мерка (из парафинированных флаконов) мы, в противоположность указаниям Тунберга, не получили ни следа формальдегида. Мы несколько раз повторили опыт все с тем же отрицательным результатом. Но если к той же смеси, которая не дала формальдегида, прибавить мерковский пергидрол «для тропиков» и продолжать перегонку, то опять получается в дистилляте формальдегид.

Из этих опытов вытекает с полной определенностью, что образование формальдегида, наблюдавшееся Тунбергом при действии перекиси водорода на основной углекислый свинец, было обусловлено окислением органических веществ, прибавленных к пергидролу в качестве консервирующих средств, а не восстановлением углекислоты перекисью водорода. Тот факт, что с другими углекислыми солями Тунберг не получил реакции на формальдегид, объясняется тем, что отсутствовал катализатор (перекись свинца), необходимый для окисления органического вещества перекисью водорода в формальдегид.

Таким образом, новая теория ассимиляции углекислоты, выдвинутая Т. Тунбергом, оказывается лишенной всякого опытного основания. Перекись водорода может быть побочным продуктом ассимиляции углекислоты, но не агентом восстановления последней в формальдегид.

Впрочем, для нас вообще непонятно, зачем Тунберг прибегает к предположению, что перекись водорода принимает прямое участие в восстановительном процессе. Если верно, что фотохимическое расщепление молекулы воды является предварительным условием восстановления углекислоты, то гораздо проще допустить, что последнее протекает по реакции:



Образуется ли при этом перекись водорода как промежуточный продукт или нет, не имеет никакого значения для восстановительного процесса.

### ОПИСАНИЕ ОПЫТОВ

1) Взвесь 5 г основного углекислого свинца (Кальбаума) в 100 см<sup>3</sup> воды, согласно указаниям Тунберга, при медленном прибавлении 50 см<sup>3</sup> 6%-ного раствора перекиси водорода, приготовленного из пергидрола Мерка «для тропиков», была подвергнута перегонке. Отогнаны 5 проб, по 10 см<sup>3</sup> каждая. Как реактивы на формальдегид были применены обесцвеченный сернистым газом раствор фуксина по Вильштеттеру и Штолю и реактив Римини-Шривера. Все пробы дали положительный результат. Приблизительное колориметрическое определение путем сравнения с разбавленными растворами, содержащими определенные количества формальдегида, показало, что исследованные пробы содержали 0.0005—0.001 мг СН<sub>2</sub>О.

2) Взвесь 5 г основного углекислого свинца в 100 см<sup>3</sup> воды была подкислена серной кислотой и по отгонке 40 см<sup>3</sup> обработана чистым (не содержащим углекислоты) раствором едкого барита до слабощелочной реакции и затем подвергнута перегонке с перекисью водорода («для тропиков»), как было указано выше. Получены такие же количества формальдегида, как и с углекислым свинцом.

3) 50 см<sup>3</sup> 6%-ного раствора перекиси водорода (приготовленного из пергидрола «для тропиков»), 100 см<sup>3</sup> воды, 0.1 г перекиси свинца и 3 капли чистого раствора едкого барита были подвергнуты дробной перегонке, причем было получено 5 проб, по 10 см<sup>3</sup> каждая. Все пробы дали такие же количества формальдегида, как и в первом опыте. Параллельный опыт, без прибавления свинца, дал отрицательный результат.

4) 5 г основного углекислого свинца, 100 см<sup>3</sup> воды, 25 см<sup>3</sup> 1.5%-ного раствора перекиси водорода фирмы The Oakland Chemical Co., New York (содержал ацетанилид в качестве консервирующего средства) подвергнуты перегонке, как выше указано. Положительная реакция на формальдегид получена во всех пробах.

5) 25 см<sup>3</sup> 1.5%-ного раствора той же перекиси водорода, 100 см<sup>3</sup> воды, 0.1 г перекиси свинца, 3 капли раствора едкого барита подвергнуты перегонке. Положительная реакция на формальдегид получена во всех пробах дистиллята, как в предыдущем опыте.

6) 5 г основного углекислого свинца, 100 см<sup>3</sup> воды, 50 см<sup>3</sup> 6%-ного раствора перекиси водорода (приготовленного из чистого пергидрола Мерка) при перегонке не дали ни следа формальдегида.

7) Тунберг указывает, что при употреблении чистого пергидрола (из парафинированных флаконов) иногда не наблюдается образования формальдегида, вследствие чересчур быстрого каталитического распада перекиси. Это неудобство можно устранить прибавлением борной кислоты, действующей, как отрицательный катализатор. Мы поэтому в точности выполнили указания Тунберга: 5 г основного углекислого свинца, 60 см<sup>3</sup> воды, 30 см<sup>3</sup> 3%-ного раствора борной кислоты, 10 см<sup>3</sup> чистого пергидрола были перегнаны, как указано выше. Но и тут не получилось ни следа формальдегида.

К остатку в дистилляционной колбе было прибавлено 50 см<sup>3</sup> 6%-ного раствора пергидрола «для тропиков», и перегонка была возобновлена. Как и прежде, получился формальдегид во всех пробах.

Опыты с чистой перекисью водорода были повторены несколько раз, но все они дали отрицательные результаты.

8) Перегонялись 25 см<sup>3</sup> 6%-ной чистой перекиси водорода (из парафинированного флакона), 0.1 г ацетанилида, 3 капли раствора едкого барита. В дистилляте получена сильная реакция на формальдегид.

9) Перегонялись 25 см<sup>3</sup> 6%-ной чистой перекиси водорода, 0.1 г барбитуровой кислоты, 0.1 г перекиси свинца, 3 капли едкого барита. В дистилляте формальдегида не получено. Так как пергидрол «для тропиков», будто бы содержащий, по указанию фирмы Мерка, барбитуровую кислоту, в тех же условиях дал 0.0005—0.001 мг формальдегида в 1 см<sup>3</sup> дистилляте, то, повидимому, применяемое фирмой консервирующее средство в действительности не то, которое ею указывается.

1924 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Wislicenus. Ber. Dtsch. chem. Ges., **51**, 942 (1918).
2. Бах совм. с Ивановским. Сб. работ по чистой и прикл. химии.—Тр. Хим. ин-та им. Л. Я. Карпова, **1**, 75 (1923); настоящая книга, стр. 187.
3. Thunberg. Zs. physik. Chem., **106**, 305 (1923).
4. Weigert. Zs. physik. Chem., **106**, 313 (1923).

---

## О МЕХАНИЗМЕ ВОССТАНОВЛЕНИЯ АЗОТНОКИСЛЫХ СОЛЕЙ И ОБРАЗОВАНИЯ АЗОТИСТЫХ СОЕДИНЕНИЙ В РАСТЕНИЯХ

[*Sur le mécanisme de la réduction des nitrates et de la formation de matières azotées quaternaires dans les plantes*] \*

### А. ОБЩАЯ ЧАСТЬ

Известно, что азот, входящий в состав азотистых соединений, образующихся в растениях, происходит в значительной степени, если не полностью, из азотнокислых солей почвы, восстанавливающихся в растительном организме. Это восстановление нитратов — одно из самых интересных явлений в химии растений. Оно интересно для физиолога, так как его непосредственным следствием является образование белковых веществ, существование которых есть необходимое условие всякого жизненного процесса. Оно интересно также и для химика, так как им обуславливаются синтезы, которые до настоящего времени не удается осуществить в лаборатории. Но несмотря на все значение этой проблемы, она до сих пор еще не получила сколько-нибудь удовлетворительного решения.

Внимательное изучение условий, в которых протекает восстановление нитратов в растениях, привело меня к некоторым выводам, касающимся химического механизма этого явления. В течение долгого времени мне не удавалось подтвердить эти выводы соответственными опытами: результаты, которые я получал, были недостаточно резко отрицательными, для того чтобы опровергнуть мои выводы, но, с другой стороны, они и не подтверждали их с достаточной определенностью. Лишь в самое последнее время мне удалось найти метод, дающий вполне убедительные доказательства правильности моей гипотезы.

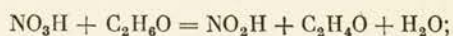
Прежде чем перейти к изложению этой гипотезы и к описанию опытов, поставленных для ее подтверждения, я считаю полезным кратко пересмотреть главнейшие гипотезы, относящиеся к химизму восстановления нитратов и образования азотистых соединений в растениях, и дать, таким образом, обзор современного состояния наших знаний по этому существеннейшему вопросу химии растений.

### Гипотеза А. Готье

Гипотеза Готье, изложенная им в его «Биологической химии»<sup>1</sup>, дает полную картину синтеза белковых веществ в растениях, основанного на азотнокислых солях почвы. Согласно этому автору, синильная кислота является первым продуктом восстановления нитратов в растениях. Он

\* Mon. sci., (4), II, 5 (1897).

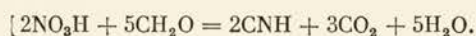
приходит к этому выводу на том основании, что синильная кислота получается при восстановлении азотной кислоты самыми разнообразными органическими соединениями и, в частности, спиртом (приготовление гремучей кислоты, этилового эфира, азотистой кислоты и т. д.). Реакцию он представляет себе как протекающую в двух стадиях: сначала азотная кислота реагирует со спиртом, образуя азотистую кислоту и уксусный альдегид:



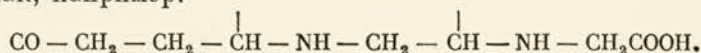
затем альдегид реагирует с азотистой кислотой, образуя синильную кислоту, муравьиную кислоту и воду:



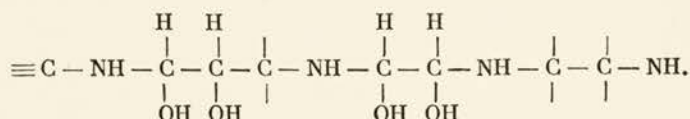
Согласно Готье, аналогичные реакции протекают в растениях, где азотная кислота нитратов восстанавливается формальдегидом, получающимся при разложении углекислоты под действием солнечных лучей:



Тот факт, что во многих растениях синильная кислота находится иногда в больших количествах, рассматривается Готье как подтверждение его гипотезы. Для того чтобы объяснить синтез белковых веществ в растениях, Готье считает, опираясь на блестящие исследования Шютценбергера о строении белков, что молекула белка сводится к мочеvine и оксамиду, водородные атомы которых частично или полностью замещены сложными цепями, как, например:



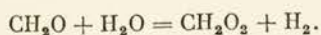
Он считает, что в этой цепи группа  $-\text{CH}_2-$  является радикалом формальдегида, а группа  $-\text{CH} - \text{NH}-$  «просто связана с синильной кислотой», отличаясь от нее только тем, что в последней на один атом водорода меньше. Отсюда легко перейти к предположению, что такие амидные цепи являются результатом соединения формальдегида с синильной кислотой, причем сначала должны образовываться цепи, состоящие исключительно из двух первых членов,  $\text{CNH}$  и  $\text{CH}_2\text{O}$ :



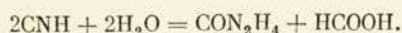
Первое и последнее звено этой цепи могут легко превратиться в  $\text{CO}-$  и  $\text{COOH}$  путем гидратации, тогда как группы  $\overset{\text{H}}{\underset{\text{OH}}{\text{C}}}$  и  $\text{CNH}$  легко могут

перейти в  $\overset{\text{H}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}$  и  $\overset{\text{H}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}} - \text{NH}$  под действием водорода *in statu nascendi*.

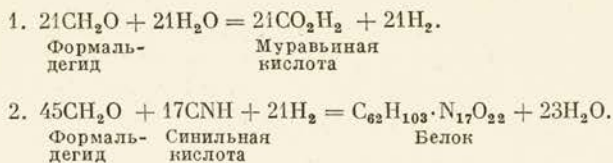
Последний, очевидно, получается в результате реакции:



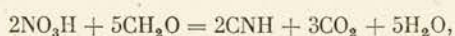
Что касается мочевины и оксамиды, то они должны образоваться в результате гидратации синильной кислоты:



«Для упрощения» А. Готье записывает все эти реакции при помощи двух уравнений:



Предположение, лежащее в основе гипотезы А. Готье, а именно — «образование небольшого количества синильной кислоты» при восстановлении азотной кислоты спиртом — правильно, но автор не указывает, путем какого механизма происходит это восстановление. Если понимать буквально указанную реакцию:



то нужно предположить, что молекула формальдегида теряет один атом водорода и один атом кислорода и фиксирует один атом азота, для того чтобы образовать одну молекулу синильной кислоты. До настоящего времени неизвестна ни одна реакция такого рода. Поэтому надо думать, что в этом процессе имеется какая-то промежуточная реакция, приводящая к образованию синильной кислоты. Мы увидим дальше, каково происхождение синильной кислоты, образующейся при восстановлении азотной кислоты формальдегидом. Что касается образования белка в растениях из синильной кислоты и формальдегида, то возможно, что оно и происходит так, как это указывает А. Готье, но он не приводит никаких экспериментальных доказательств, подтверждающих многочисленные и весьма сложные реакции, которые он описывает. При этих условиях «синтез белковых веществ» становится — на бумаге — делом столь же легким, сколь бесполезным. Делом легким — ибо после всех этих гидратирований, гидрогенизаций, интрамолекулярных превращений и т. д. неизбежно получается формула белка, которая ни на один момент не терялась из вида. Делом бесполезным — так как все эти ухищрения не продвигают сколько-нибудь заметно наши знания.

### Гипотеза О. Лева

Гипотеза, предложенная О. Левом для объяснения механизма восстановления нитратов и образования белков в растениях, вытекает из другой, более общей гипотезы, высказанной этим автором около двадцати лет тому назад. Я вынужден поэтому изложить здесь взгляды О. Лева в целом; эти взгляды бесспорно отмечены определенной оригинальностью, но носят, как выразился физиолог Бауман, несколько авантюристический характер<sup>2</sup>.

Исходной точкой гипотезы О. Лева послужило сделанное им замечательное открытие, что протоплазма некоторых растительных клеток обладает способностью восстанавливать азотнокислое серебро в щелочном растворе. Этим свойством протоплазма обладает только в том случае, пока клетки еще живые. Клетки, убитые любым способом — антисептиками, нагреванием, охлаждением, высушиванием и т. д., немедленно теряют способность производить это восстановление. Какое же вещество, находящееся в живой протоплазме, восстанавливает азотнокислое серебро? Согласно О. Леву, это не могут быть обычные восстановители — альдегиды, кетоны, перекиси, находящиеся в клеточном соке, так как эти соединения должны были бы восстанавливать азотнокислое серебро и после смерти клетки.



Можно было бы возразить, что эти восстановители не существуют постоянно в растительном соке, а что они вырабатываются живой протоплазмой и сейчас же исчезают, превращаясь в другие соединения, не действующие на азотнокислое серебро. На это Лев отвечает, что живая протоплазма восстанавливает еще очень заметным образом чрезвычайно разбавленные растворы (1/15700) азотнокислого серебра, на которые обычные восстановители уже не действуют, и что, следовательно, роль последних в интересующем нас явлении исключена.

Лев считает, что восстановительное действие живой протоплазмы должно быть приписано некоторому «активному белку», являющемуся промежуточным членом между обычным белком и «организованным белком» живой протоплазмы. Этот белок имеет такой же состав, как и обычный пассивный белок, но отличается от него расположением элементов, определяющим большой запас энергии активного белка, но в то же время и его крайнюю неустойчивость. Переходя из активного состояния в пассивное, белок выделяет энергию в виде теплоты. Причиной повышения температуры, наблюдающегося в животном организме через некоторое время после смерти, и является это превращение «активного белка» в «пассивный белок».

Для того чтобы «активный белок» обладал восстановительной способностью, он должен иметь альдегидные свойства. С другой стороны, для того чтобы он мог выделять энергию в результате интрамолекулярного перемещения атомов, нужно, чтобы в присутствии альдегидных групп активного белка находились другие группы, с которыми они могли бы реагировать внутри молекулы. Как известно, альдегиды чрезвычайно легко соединяются с амидами. Так как амидная природа белка не вызывает никаких сомнений, то Лев считает, что «активный белок» содержит в несвязанном виде многочисленные альдегидные и амидные радикалы и поэтому имеет большой запас энергии. Как только оба типа радикалов соединяются, «активный белок» теряет свойства альдегида\* и становится «пассивным», выделяя энергию. Эта энергия играет, как мы скоро увидим, существенную роль в восстановлении нитратов.

Чтобы объяснить механизм синтеза протеиновых веществ в растениях, Лев исходит из установленного многочисленными физиологами факта, что аспарагин — единственное азотистое соединение, которое всегда можно обнаружить в растениях. Аспарагин не только имеется нормально в корнях, клубнях, стеблях, почках и в прорастающих растениях, но всегда появляется в растениях, когда они вынуждены поддерживать свое существование исключительно за счет протеиновых запасов, т. е. когда нехватает углеводов для дыхания. С другой стороны, если эти растения получают достаточное количество углеводов, количество аспарагина резко уменьшается и он превращается в белок и живую протоплазму. Из этого Лев делает вывод, что аспарагин является основным ядром молекулы белка, которое либо служит для построения молекулы, либо встречается в качестве продукта ее распада.

Как образуется аспарагин в растениях?

Так как грибы могут использовать в качестве углеродистого продукта питания не только сложные органические соединения, но даже и метиловый спирт и метилсульфонат натрия (соединения формальдегида с бисульфитом натрия), то Лев считает доказанным, что синтез органических соединений может начинаться с группы соединений, содержащих только один атом углерода. Этой группой может быть только формальдегид или его

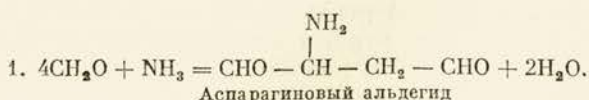
\* Переходя из активного состояния в пассивное, белок, теряя характер альдегида, сохраняет характер амида. Лев даже вычислил, что «пассивный белок» содержит еще треть белка в виде амидных групп.

двувалентный изомер СНОН. Следовательно, в отношении углерода исходным элементом синтеза аспарагина в растениях является формальдегид. Что же касается азота, то источником его могут быть или нитраты, или аммиачные соли. Лев установил прямыми опытами, что аспарагин накапливается в гораздо больших количествах в растениях, получающих в качестве азотистого питания аммиачные соли, а не нитраты. Из этого он выводит заключение, что азот участвует в синтезе аспарагина в виде аммиака. Таким образом, нитраты должны быть восстановлены в аммиак, прежде чем вступать в реакцию с формальдегидом для образования аспарагина.

Чтобы объяснить восстановление нитратов в аммиак, Лев привлекает каталитическую способность «активного белка». Сначала он констатирует, что кислотность растительного сока недостаточна для того, чтобы выделить азотную кислоту из нитратов, и что альдегиды не восстанавливают нитратов при обычных условиях. Чтобы восстановление имело место, необходимо участие посторонней энергии, которая нарушила бы химическое равновесие, распатала бы атомы и сделала бы их способными вступать в новые соединения в других сочетаниях. Эта энергия доставляется «активным белком». Для доказательства по аналогии этой гипотезы Лев<sup>3</sup> обрабатывал в течение 6 часов при 60° 0.5 г азотнокислого калия в 100 см<sup>3</sup> воды пятью граммами глюкозы в присутствии 50 г свежеприготовленной платиновой черни. По истечении этого времени жидкость была отфильтрована и упарена: она давала характерную реакцию на аммиак. Для объяснения этих данных он допускает, что содержащая много энергии платиновая чернь вызывает вблизи себя интенсивные колебания атомов, благодаря чему происходит обмен атомов между азотнокислым калием и глюкозой — азотнокислый калий отдает кислород и калий глюкозе и получает в обмен атомы водорода в достаточном количестве для образования аммиака. Восстановление нитратов в живой клетке происходит согласно аналогичному механизму, с «активным белком» в качестве источника энергии.

Таким образом, аспарагин образуется в растениях из формальдегида и аммиака. В белке  $C_{72}H_{112}N_{18}SO_{12}$  (формула Либеркюна) атомы углерода и азота находятся в отношении 4 : 1. Следовательно, то же самое отношение должно существовать в группах атомов, образующих при конденсации молекулу белка. Однако растения, питающиеся избытком аммиачных солей, накапливают в качестве азотистого резерва аспарагин, содержащий один лишний атом азота и не обладающий резко выраженной способностью конденсироваться. Чтобы отвести это возражение, Лев высказывает предположение, что из аммиака и формальдегида образуется сначала не аспарагин, а его гипотетический альдегид. Этот альдегид частично конденсируется в белок, частично соединяется с аммиаком, превращается путем окисления в аспарагин, который и накапливается в клетке в виде азотистого резерва. Соответственно, прежде чем участвовать в синтезе белка, аспарагин, существующий уже в растениях, должен превратиться путем восстановления в соответствующий альдегид.

Обойдя таким образом все трудности, Лев считает возможным представить синтез белков в растениях, исходя из формальдегида и аммиака, при помощи следующих уравнений:



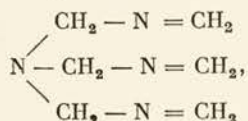
Конденсация «промежуточного продукта» в белок должна происходить по типу пинаконовых превращений, т. е. с сохранением групп СНО и  $\text{NH}_2$ . Понятно, что при этих условиях, продукт конденсации есть не что иное, как «активный белок».

Не входя в критику всех гипотез Лева, я считаю необходимым сделать несколько замечаний относительно тех из них, которые относятся к механизму восстановления нитратов и образования азотистых соединений в растениях.

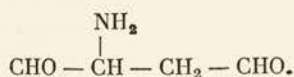
Прежде всего, в условиях, которые определяют восстановление нитратов в растениях, освобождение азотной кислоты из азотнокислых солей, как мы увидим дальше, почти не вызывает сомнений, и поэтому несколько таинственное участие «активного белка» совсем не кажется оправданным. Далее, опыт с глюкозой, азотнокислым калием и платиновой чернью — опыт, призванный доказать роль каталитического действия, — не кажется мне убедительным. Лев объясняет восстановление нитратов каталитическим действием платиновой черни\*. Не следует ли предположить также, что при комбинированном действии азотнокислого калия и кислот, получающихся путем окисления части глюкозы в присутствии платиновой черни, свежеприготовленная чернь образует, хотя бы в минимальном количестве, соединение, которое уже легко восстанавливается глюкозой? Это соединение облегчало бы переход кислорода от нитрата к глюкозе.

Гипотеза Лева, согласно которой исходными веществами при образовании азотистых соединений являются формальдегид и аммиак, не только вполне произвольна, но находится в резком противоречии с известными химическими фактами. Я не буду настаивать на том, что аспарагиновый альдегид совершенно неизвестен, так как если он и не был до сих пор изолирован, он все же может существовать, но он наверное не может образовываться в условиях, указанных Левом, т. е. путем соединения формальдегида с аммиаком.

Во-первых, единственным известным до сих пор продуктом присоединения формальдегида к аммиаку является гексаметилентетрамин:



который совершенно непохож на гипотетический аспарагиновый альдегид:



Во-вторых, для того чтобы соединение, аналогичное аспарагиновому альдегиду, могло образоваться из аммиака и формальдегида, необходимо, чтобы группа  $\text{NH}_2$  аммиака была сохранена, а это совершенно несовместимо с тем, что нам известно о взаимодействии альдегидов с аминами. Реакция между этими двумя классами соединений возможна только за счет кислорода альдегидной группы одних и водорода аминных групп других. Лев, которому эти факты известны, недооценивает значение возражений, возникающих в связи с этим против его гипотезы.

Что же касается дальнейшего превращения аспарагинового альдегида в белок, то это уже не гипотеза, а простое манипулирование формулами, не основанное ни на точных фактах, ни даже на аналогиях. Польза такого рода манипулирования всецело ускользает от меня.

\* Лев prepares it, restoring platinum chloride with formaldehyde.

### Гипотеза Виктора Мейера и Е. Шульце

Эта гипотеза, которую можно сформулировать в нескольких строках, была изложена в небольшой заметке о действии гидроксилamina на растения, опубликованной Виктором Мейером и Е. Шульце в 1884 г.<sup>4</sup> Заметка прошла совершенно незамеченной; во всяком случае, ни А. Готье, ни Лев не приняли ее во внимание.

В. Мейер и Е. Шульце считали, что если бы восстановление нитратов в растениях приводило к образованию гидроксилamina, последний немедленно соединялся бы с альдегидами и кетонами, имеющимися в растительном соке. Таким образом должны были бы образоваться оксими, существование которых было открыто незадолго до этого В. Мейером. Путем восстановления оксимидной группы  $=N-OH$  в оксимах должны образовываться амины типа аланина, которые и должны быть основой синтеза протеиновых веществ в растениях.

Если бы гидроксилamin действительно был исходным соединением при образовании азотистых веществ в растениях, он должен был бы быть для них прекрасным азотистым питанием. Для проверки этого предположения авторы поставили ряд физиологических опытов, давших отрицательный результат. Гидроксилamin оказался сильным ядом для растений. Однако они считают, что это несколько не опровергает их гипотезы, так как, вследствие своей исключительной реакционной способности, гидроксилamin не может существовать в растениях в свободном состоянии и действовать на них токсически. По мере образования он вступает в соединения, не обладающие токсичностью по отношению к растительным клеткам.

В. Мейер и Е. Шульце не объясняют механизма восстановления нитратов в гидроксилamin в растениях и не приводят никаких химических уравнений, объясняющих превращение аминов типа аланина в белок.

### Гипотеза автора

В то время, когда я установил основные линии своей гипотезы, я не был еще знаком с работой Мейера и Шульце. Ряд соображений, которые будут изложены ниже, привел меня к выводам, аналогичным выводам этих авторов, но более уточненным и, кроме того, в значительной степени подтвержденным опытами.

При изучении механизма восстановления нитратов в растениях прежде всего возникает вопрос о том, восстанавливается ли азотная кислота нитратов в свободном или в связанном состоянии. С первого взгляда кажется невозможным, чтобы слабой кислотности растительного сока было достаточно для вытеснения азотной кислоты из нитратов. Исходя из этого соображения, Лев и выдвинул гипотезу об обмене атомов между нитратами и восстановителями под каталитическим действием «активного белка». Однако существует ряд фактов, доказывающих, что невозможность тут скорее кажущаяся, чем действительная. Во-первых, нитраты находятся в клеточном соке в виде чрезвычайно разбавленных растворов, что, как известно, способствует диссоциации солей. Во-вторых, вследствие окислительных процессов, протекающих в клетках (дыхание), клеточный сок содержит большие количества углекислоты, которая может, согласно закону действующих масс, вытеснить некоторое количество азотной кислоты из нитратов. Наконец, в-третьих, раствор азотнокислого калия, подвергнутый действию солнечных лучей, разлагается, как показал Лоран<sup>5</sup>, с выделением кислорода и образованием азотистокислого калия. Так как листья представляют собою наиболее совершенный из всех мыслимых фотохимических приборов, можно предположить, что разложение нитра-

тов может протекать в них значительно легче, чем *in vitro*. Азотисто-кислые соли, получающиеся при этом, уже легко могут быть разложены кислотами растительного сока. Все эти соображения дают почти полную уверенность, что восстановлению подвергается именно свободная азотная или даже свободная азотистая кислота.

Повидимому, это восстановление происходит за счет альдегидов и кетонов, находящихся в растениях в значительных количествах. Согласно классическим исследованиям Бертелло и Андре<sup>6</sup>, наиболее энергичное восстановление нитратов происходит в листьях, являющихся также местом разложения углекислоты.

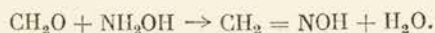
Я показал уже в ряде исследований<sup>7</sup>, что углекислота распадается под действием солнечных лучей на перекисное соединение (надугольную кислоту) и восстановитель (формальдегид). Отсюда следует, что главная роль в восстановлении нитратов в растительном организме должна выпасть на долю формальдегида.

Таким образом, проблема восстановления нитратов в растениях сводится к более простому вопросу: к действию формальдегида на азотную кислоту. В чем оно заключается? Известно, что восстановление азотной или азотистой кислоты сернистой или гидросернистой кислотой приводит к образованию гидроксиламина. Это ясно указывает на то, что переход от азота азотной кислоты к аммиачному азоту может происходить путем простого отщепления кислорода, без последующей гидрогенизации азота.

При отщеплении кислорода азотная кислота  $\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{N} - \text{OH} \end{matrix}$  превращается последовательно в азотистую кислоту  $\text{O} = \text{N} - \text{OH}$  и азотноватистую  $\text{O} = \text{N} - \text{H}$ , в которой атом водорода должен уже быть непосредственно связан с атомом азота, для того чтобы валентность последнего была удовлетворена\*. Дальнейшее отщепление кислорода должно привести к двухвалентному радикалу  $=\text{NH}$ , который немедленно должен соединиться с элементами молекулы воды и образовать гидроксиламин  $\text{H}_2\text{N} - \text{OH}$ . Мне кажется, что только такое толкование может объяснить образование гидроксиламина при восстановлении азотной кислоты не гидрогенизирующими восстановителями.

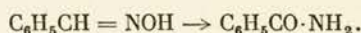
Как видно, действие формальдегида на азотную кислоту должно быть аналогично действию сернистой кислоты, т. е. должно привести к образованию гидроксиламина. Но в то время как при восстановлении азотной кислоты сернистой гидроксиламин получается в виде сульфата, при восстановлении формальдегидом судьба гидроксиламина совершенно иная.

Обладая большой реакционной способностью и находясь в присутствии избытка формальдегида, непрестанно образующегося в листьях и также обладающего большой реакционной способностью, гидроксиламин может только соединяться с формальдегидом, образуя формальдоксим, согласно известной реакции:

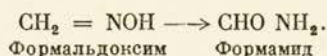


\* Моя работа была уже закончена, когда появилось очень интересное исследование Г а н т ш а и К а у ф м а н а (Liebig's Annalen der Chemie, 1896, 317) над азотноватистой кислотой, которую им удалось изолировать в твердом состоянии в виде белых пластинок. Изучение химических и физических свойств этой кислоты привело их к выводу, что она представляет собой диазотированное соединение, формула которого  $\text{HO} - \text{N} = \text{N} - \text{OH}$ . Однако авторы допускают, что азотноватистая кислота может также перейти в «таутомерную полумолекулярную форму»  $\text{O} = \text{N} - \text{H}$ , представляющую собой альдегид азотистой кислоты  $\text{O} = \text{N} - \text{OH}$ , которой соответствует эфир  $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}$  (нитрозобензол).

Как известно, альдоксими могут превращаться в амиды путем простого интрамолекулярного перемещения (Бекмановское превращение). Так, например, бензальдоксим превращается в бензамид<sup>8</sup>:



Полученный указанным только что образом формальдоксим может также претерпеть аналогичное превращение и перейти в соответствующий амид, т. е. формамид:



Последний можно рассматривать как исходный материал для синтеза азотистых соединений в растениях.

Таковы соображения, которые привели меня к выводу, что формальдоксим и формамид являются первыми членами восстановления нитратов в растениях. Опыты, которые я поставил для проверки этой гипотезы, доказали, что формальдоксим действительно получается при восстановлении азотной кислоты формальдегидом. Что же касается формамида, то ввиду невозможности изолировать его в тех условиях, в которых я работал, я мог получить только косвенные доказательства его существования.

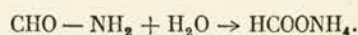
Как мы видели выше, Готье считает, что синильная кислота лежит в основе синтеза белков в растениях, не указывая, каков механизм ее образования из формальдегида и азотной кислоты. Исходя из только что изложенных мной фактов, очень легко объяснить образование синильной кислоты.

Действительно, Шоль<sup>9</sup>, первый приготовивший формальдоксим, показал, что он очень легко превращается в синильную кислоту, теряя молекулу воды:



Эта реакция была даже недавно предложена для качественного и количественного определения формальдегида. Вполне вероятно, что образовавшаяся таким образом синильная кислота может играть некоторую роль в синтезе белковых веществ в растениях, но при настоящем уровне наших знаний мы можем составить себе лишь самое смутное представление об этой роли.

Так же как образование синильной кислоты объясняется разложением формальдоксима, образование аммиака, являющегося постоянным членом в разложении азотной кислоты, объясняется разложением формамида. Под действием даже очень слабых кислот, щелочей, щелочных карбонатов и т. д. формамид связывает молекулу воды и превращается в муравьинокислый аммоний:



Формамид надо рассматривать до некоторой степени, как идеальный тип амидо-альдегида, так как он получается путем соединения двух типичных радикалов CHO и NH<sub>2</sub>. Действуя одновременно и альдегидной и амидной группой, он должен обладать во много раз большей способностью реагировать и конденсироваться, чем синильная кислота. Очень удивительно, что О. Лев не вовлек это давно уже известное соединение в круг своих соображений. Вместо того чтобы выводить свой «активный белок» из аспарагинового альдегида, привлекая реакции, противоречащие установленным химическим фактам, он мог бы использовать для своего синтеза формамид, прибавляя к нему необходимое число атомов углерода и водорода. Наши знания от этого, конечно, не продвинулись бы, но его гипотеза выиграла бы в правдоподобности. Что действительно продвинуло бы наши

знания, — это углубленное изучение продуктов конденсации формальдеоксида и формамида с различными классами соединений, которые могут существовать в растениях. Можно только пожелать, чтобы внимание компетентных химиков обратилось к этой плодотворной и широкой области исследований.

### Б. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Я показал выше, путем каких рассуждений я пришел к тому выводу, что проблема восстановления нитратов в растениях сводится к действию формальдегида на азотную кислоту и что первыми членами этого действия могут быть только формальдоксим и формамид. Для того чтобы проверить экспериментально этот вывод, я пытался выяснить, какие азотистые соединения образуются при взаимодействии формальдоксима и формамида.

Я напомним, что действие альдегидов и кетонов на азотную кислоту уже изучалось различными исследователями, но они не получили решающих данных, освещающих характер превращения, которое претерпевает азот под влиянием этих восстановителей. Некоторые указания мы находим в опубликованной недавно очень интересной работе Беренда<sup>10</sup>. Ему удалось изолировать при взаимодействии азотной кислоты и ацетона в качестве промежуточных азотистых продуктов изонитрозоацетон  $\text{CH}_3\text{COCH} = \text{NO}_2$  и ацетилметилнитроловую кислоту  $\text{CH}_3 - \text{CO} - \overset{\text{NO}_2}{\underset{|}{\text{C}}} = \text{NOH}$ . Он пытался получить аналогичный продукт, исходя из уксусного паральдегида и азотной кислоты. Несмотря на все усилия, это ему, однако, не удалось, что заставило его предположить, что альдегиды вообще неспособны образовывать с азотом из азотной кислоты соединений, аналогичных тем, которые дают кетоны.

Что же касается действия формальдегида на азотную кислоту, то оно до сих пор не было изучено; по крайней мере я не нашел никаких литературных данных по этому вопросу.

#### Действие формальдегида в водном растворе на азотную кислоту

25 см<sup>3</sup> 40%-ного раствора формальдегида (формалина), 115 см<sup>3</sup> воды и 10 см<sup>3</sup> чистой концентрированной азотной кислоты были налиты в колбу на 250 см<sup>3</sup>. В таком разбавлении взаимодействие этих двух соединений при комнатной температуре происходит чрезвычайно медленно. Но если нагреть смесь до 80° на водяной бане, то начинается бурная реакция, продолжающаяся после того, как колба снята с водяной бани. Выделяются углекислота, окислы азота, закись азота, свободный азот и газ, обладающий острым эфирным запахом и горящий зеленоватым пламенем. Этот газ представляет собою азотистый метил.

При перегонке смеси в вакууме отгоняются неизменный формальдегид, кислородные соединения азота, муравьиная кислота и метиловый спирт; в колбе остается несколько капель маслянистой коричневой жидкости с карамельным запахом (полимеризованный триоксиметилен  $[(\text{CH}_2\text{O})_3]_n$ , полученный Ренаром при электролизе глицерина, подкисленного серной кислотой) и несколько очень растекающихся кристаллов азотнокислого аммония.

Обработанный едким кали остаток выделяет небольшое количество аммиака и метиламина, который можно узнать по запаху. Метиламин, очевидно, получается в результате разложения едким кали гексаметилен-тетрамина, образовавшегося при действии аммиака на формальдегид.

Кроме очень слабой реакции на формальдоксим (в дальнейшем я укажу на реакции, характерные для этого вещества), мне не удалось обнаружить ни в остатке, ни в отгонах никаких соединений, состоящих из азота, углерода, водорода и кислорода.

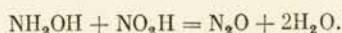
### Действие взвешенного в воде триоксиметилена на азотную кислоту

Для того чтобы выяснить, получились ли азотистый метил и метиловый спирт из самого формальдегида или из какого-нибудь загрязнения, имеющегося в продажном формалине, я повторил тот же опыт с чистым триоксиметиленом вместо формалина.

К взвеси 10 г триоксиметилена в 140 см<sup>3</sup> воды было прибавлено 10 см<sup>3</sup> чистой концентрированной азотной кислоты. Смесь была затем перелита в реторту с притертой пробкой и нагрета на водяной бане до 80°. Под действием азотной кислоты триоксиметилен растворился в несколько минут, вероятно сначала деполимеризовавшись до формальдегида. Среди продуктов реакции я не мог обнаружить ни азотистого метила, ни метилового спирта; из этого следует, что в предшествующем опыте они образовались за счет какой-нибудь примеси, содержащейся в формалине. Любопытно, что формалин, подвергнутый фракционированной перегонке в отсутствие азотной кислоты, не дал никакой фракции, перегоняющейся при 66° (метиловый спирт). Повидимому, метиловый спирт находится в формалине в виде соединения с формальдегидом (метилаль); это соединение разлагается под действием азотной кислоты с освобождением метилового спирта, который частично превращается в азотистый метил и частично перегоняется без изменений.

Что же касается других продуктов реакции, то триоксиметилен дал в точности те же результаты, как и формалин. Для того чтобы не было избытка кислоты, я подбирал такие условия опыта, при которых азотная кислота вводилась в жидкость маленькими порциями: 1) азотная кислота падала по каплям во взвесь триоксиметилена в воде; 2) азотная или азотистая кислота образовывалась в самой жидкости в результате реакции между падающей по каплям серной кислотой и взвесью триоксиметилена в растворе азотнокислого бария, азотнокислого кальция или азотистокислого кальция. Продукты реакции были перегнаны в вакууме и подвергнуты медленному упариванию в колбе с широким боковым отводом на водяной бане при 80°. Наконец, я повторил те же опыты, подвергая смесь действию солнечных лучей, собранных при помощи вогнутого зеркала. Я проделал более пятидесяти опытов, меняя каждый раз условия, но результат всегда был один и тот же: слишком слабая реакция на формальдоксим, чтобы можно было с уверенностью заключить об его существовании, и недостаточно слабая, чтобы утверждать, что его нет.

Для меня было очевидно, что либо сам формальдоксим, либо гидроксилламин, из которого он образуется, почти полностью разлагается под действием избытка кислородных соединений азота, в частности, под действием азотистой кислоты. Как известно, в этих условиях гидроксилламин разлагается с образованием закиси азота и воды:



Закись азота, обильно выделяющаяся во всех моих опытах, вполне могла получаться при разложении гидроксилламина или формальдоксима азотистой кислотой. Для того чтобы избежать этого, надо было свести к минимуму количество кислородных соединений азота, которые в каждый



данный момент находились в присутствии формальдегида, ускорить этим их восстановление и не давать накапливаться азотистой кислоте в жидкости. В описанном ниже опыте это было, насколько возможно, осуществлено. Полученные результаты были вполне убедительны в отношении образования формальдоксима при восстановлении формальдегидом кислородных соединений азота.

### Действие взвеси триоксиметилена в эфире на кислородные соединения азота

Взвесь 5 г триоксиметилена в 100 см<sup>3</sup> эфира насыщалась в течение 25 часов при 20° очень медленным током газа, выделяющегося из сухого азотистокислого натрия под действием серной кислоты. В избытке кислородных соединений азота эфир окрашивается в синий или зеленый цвет; одновременно выделяется закись азота. Опыт производился в соединенной с холодильником реторте с притертой пробкой. Часть эфира конденсировалась в сосуде, на стенках которого иногда наблюдалось образование белого аморфного осадка.

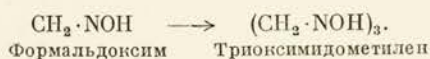
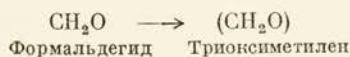
После 25-часовой обработки эфирный раствор фильтровался и оставлялся в открытых пробирках. Через некоторое время выпадал белый аморфный осадок, прилипающий к стеклу. Слитая и тщательно нейтрализованная содой жидкость дала следующие реакции на холоду:

1. С раствором хлорного железа: красное окрашивание.
2. С раствором сернистой меди: зеленое окрашивание.
3. С раствором Фелинга: зеленое, затем коричневое окрашивание и, наконец, осадок закиси меди.
4. С раствором азотнокислого серебра: немедленное восстановление.
5. С раствором хлорной ртути: желтый осадок, быстро превращающийся в хлористую ртуть.

Согласно Шюлю<sup>11</sup>, который впервые приготовил формальдоксим, совокупность этих реакций полностью характеризует его. Белый осадок в пробирках промывался спиртом и эфиром путем декантации; нагретый до 130° на масляной бане, он улетучивался; в то же время на стенках пробирки конденсировалась жидкость, дающая реакции формальдоксима. При быстром нагревании ее на газовой горелке, она улетучивалась, разлагаясь со взрывом и выделяя синильную кислоту, которую легко узнать по характерному запаху.

Получившееся белое аморфное вещество является, следовательно, не чем иным, как триоксимидометиленом, из которого Шоль исходил для приготовления формальдоксима в жидком и газообразном состоянии.

Триоксимидометилен так относится к формальдоксиму, как триоксиметилен к формальдегиду.



Таким образом, этот опыт неопровержимо доказывает, что восстановление кислородных соединений азота, или, что то же самое, восстановление азотной кислоты формальдегидом, приводит к образованию формальдоксима. Надо, однако, заметить, что выход формальдоксима чрезвычайно низок, отчасти потому, что он очень легко улетучивается с парами эфира, как это было уже отмечено Шолем.

### Действие формальдегида или триоксиметилена на азотную кислоту в присутствии хлорной ртути

Установив присутствие формальдоксима в продуктах восстановления азотной кислоты формальдегидом, я пытался доказать экспериментально возможность превращения формальдоксима в формамид. А priori было очевидно, что формамид не может встречаться как таковой среди продуктов реакции, ввиду того что он разлагается в кислой среде с образованием муравьиной кислоты и аммиака. Азотнокислый аммоний, присутствие которого я всегда констатировал в остатке после отгонки, весьма вероятно, и получался вследствие такого разложения формамида. Поэтому я пытался получить какое-нибудь характерное и сравнительно устойчивое производное формамида, для того чтобы выяснить, получается ли аналогичное соединение на каком-нибудь этапе восстановления азотной кислоты формальдегидом. В первую очередь я подумал о соединении с хлорной ртутью, аналогичном тому, которое получается с ацетамидом ( $\text{CH}_3\text{CO} \cdot \text{NH}_2 \cdot \text{HgCl}_2$ ) и впервые было приготовлено Андре<sup>12</sup>.

При действии раствора хлорной ртути на формамид при нагревании или при солнечном свете выпадает густая масса маленьких перламутровых пластинок. По окончании реакции осадок промывался до тех пор, пока промывные воды не перестали давать мути с азотнокислым серебром. Обработанный серной кислотой осадок выделял небольшое количество аммиака. В то же время он вел себя как соль закиси ртути и, следовательно, не был тем соединением  $\text{СНО} \cdot \text{NH}_2 \cdot \text{HgCl}_2$ , которое я надеялся получить. Высушенный при  $100^\circ$  до постоянного веса осадок потерял весь азот, который он содержал, и дал при анализе результаты, в точности соответствующие хлористой ртути.

Я хочу сказать несколько слов о методе, который я применял для анализа этого соединения. Известно, насколько сложны и неудобны обычные методы определения ртути. Я пользовался методом, который недавно был предложен Шойтеном и заключается в том, что исследуемое вещество обрабатывается перекисью натрия, после чего взвешивается выпавшая металлическая ртуть. Если соединение содержит хлор, то можно определить последний в отфильтрованной жидкости. Прежде чем применить этот метод, я проверил его на чистой хлорной ртути; полученный результат был вполне удовлетворительным.

Для анализа 0.5 г осадка растирались в чашке с небольшим количеством воды, после чего чашка была закрыта опрокинутой воронкой. Перекись натрия вводилась небольшими порциями, причем воронка каждый раз приподнималась. Когда вся масса приобрела темносерую окраску, чашка была помещена на водяную баню и слегка нагрета, пока пары воды не начали конденсироваться в трубке воронки. После этого воронка была промыта и все содержимое чашки переведено на взвешенный фильтр. Осадок ртути промывался до тех пор, пока промывная вода не перестала окрашивать фенолфталеин, и оставлен на фильтре в эксикаторе до постоянного веса. Эксикатор помещался в прохладном месте, в темноте.

Фильтрат и соединенные промывные воды были подкислены азотной кислотой и осаждены азотнокислым серебром.

Получены следующие результаты:

#### Анализ чистой хлорной ртути (в %)

|    | Получено | Теоретически<br>$\text{HgCl}_2$ |
|----|----------|---------------------------------|
| Hg | 73.29    | 73.80                           |
| Cl | 26.37    | 26.20                           |

## Анализ осадка (в %)

|    | I     | II    | III   | Теоретически<br>HgCl <sub>2</sub> |
|----|-------|-------|-------|-----------------------------------|
| Hg | 84.08 | 84.13 | 84.39 | 84.93                             |
| Cl | 15.02 | 15.01 | 15.38 | 15.07                             |

Из этого опыта вытекает, что соединение формамида с хлорной ртутью, повидимому, быстро восстанавливается под действием альдегидной группы формамида.

Осадок, вполне идентичный тому, который только что описан, был получен при взаимодействии формальдегида или триоксиметилена с азотной кислотой в присутствии хлорной ртути. Осадок содержал аммиачный азот, часть которого терялась при промывании, а остальное при сушке, и превращался в хлористую ртуть.

Идентичность хода реакции в обоих случаях может рассматриваться как косвенное доказательство предполагаемого превращения формальдеоксида в формамид.

### Действие формальдегида или триоксиметилена на азотную кислоту в присутствии хлорной платины

Так как мне не удалось приготовить соединения формамида с хлорной ртутью, я попытался выяснить, нельзя ли получить лучший результат с хлорной платиной.

Если обработать формамид раствором хлорной платины и затем подвергнуть смесь действию солнечных лучей, то желто-коричневое окрашивание жидкости мало-помалу исчезает и заменяется красивым зеленым окрашиванием. Через некоторое время жидкость темнеет, из нее выпадает металлическая платина и затем она опять становится желто-коричневой. Все мои попытки изолировать это зеленое соединение были безуспешны. Зеленый раствор, нагретый на водяной бане или оставленный в темноте в эксикаторе, восстанавливается, выделяя платину, и вновь становится желто-коричневым.

Среди соединений платины только соль Магнуса и ее производные с органическими радикалами окрашены в зеленый цвет. Весьма вероятно, что зеленое вещество, полученное при действии хлорной платины на формамид, более или менее приближается по своему составу к соли Магнуса (хлороплатинит платозодиаммония). К тому же существует некоторая аналогия между полученным зеленым веществом и производным, полученным при действии хлорной ртути на формамид. Как мы видели, хлорнортутное производное восстанавливается под действием альдегидной группы формамида и превращается в хлористое ртутное производное, легко теряющее азот и переходящее в хлористую ртуть. Весьма вероятно, что при действии хлорной платины на формамид образуется сначала хлороплатиновое производное, быстро восстанавливающееся в хлористоплатиновое соединение, которое, в свою очередь, разлагается с выделением металлической платины. Какова бы ни была природа зеленого соединения, оно несомненно содержит аммиачный азот.

Восстанавливая азотную кислоту формальдегидом в присутствии хлорной платины, я наблюдал явления, аналогичные тем, которые наблюдаются при обработке формамида хлорной платиной.

25 см<sup>3</sup> 40%-ного раствора формальдегида, 10 см<sup>3</sup> азотной кислоты и 0.5 г хлорной платины в 115 см<sup>3</sup> воды были подвергнуты действию

солнечных лучей в эрленмейеровской колбе\*. Для того чтобы усилить реакцию, колба была помещена в фокусе вогнутого зеркала, диаметром 15 см. По истечении 3—4 часов смесь приобрела красивый зеленый цвет, который сохранялся в течение трех дней. После экстрагирования зеленой жидкости эфиром и сливания эфирного слоя я перевел водный слой в реторту с широкой боковой трубкой, соединенную с холодильником, и оставил ее медленно выпариваться на водяной бане при 80°. Зеленый цвет жидкости исчез через несколько мгновений, и в то же время образовался осадок металлической платины. В качественном отношении газообразные и жидкие продукты реакции были те же, как и в предшествующих опытах. При окончании упаривания, продолжавшегося 17 часов, когда в реторте оставалось только 2 см<sup>3</sup> жидкости, произошла бурная реакция, сопровождавшаяся выделением едких паров. Я продолжал нагревание до тех пор, пока полностью не прекратилась отгонка. Остаток в реторте состоял из металлической платины, кристаллического золотисто-желтого порошка (хлороплатинат аммония) и нескольких капель маслянистой жидкости, растворимой в воде. Обработанная едким кали часть остатка выделила аммиак и метиламин.

Остальная часть была вновь растворена в воде; желтый раствор был упарен при слабом нагревании. Микроскопические яркожелтые кристаллические крупины и иглообразные кристаллы выпали в количестве, недостаточном для анализа. На выпариваемом растворе образовалась белая кристаллическая корка азотнокислого аммония и несколько капель маслянистой жидкости с запахом карамели.

Эфирный экстракт дал слабую реакцию на формальдоксим.

Отмечу мимоходом, что конденсированные порции давали с хлорным железом красное окрашивание и с азотнокислым серебром белую муть, которая при нагревании окрашивалась в красный цвет.

В другом опыте смесь триоксиметилена (10 г), азотной кислоты (10 см<sup>3</sup>) и хлорной платины (0.5 г в 140 см<sup>3</sup> воды) была оставлена на четыре месяца при обыкновенной температуре и от времени выставлялась на солнце. В последний раз зеленая жидкость была выставлена на солнце на три дня, после чего она стала темносиней и из нее выпали черные зерна, образующие сферические комки, легко скользящие по дну колбы. После выпадения этого черного осадка (около 0.2 г) синяя жидкость обесцветилась и в конце концов стала желтой. Черный осадок был отфильтрован и фильтрат обработан, как указано выше. Продукты реакции были те же, как и в первом опыте, но количество аммиака, полученное при обработке остатка едким кали, было значительно больше.

Черный осадок был высушен при обыкновенной температуре. При нагревании нескольких крупинок этого осадка на платиновой пластинке произошел сильный взрыв. Весьма вероятно, что это было не что иное, как гремучая платина. Этот факт тем более интересен, что согласно Шолю<sup>11</sup>, между формальдоксимом и гремучей кислотой существует тесная связь.

Описанный опыт доказывает, что при восстановлении азотной кислоты формальдегидом в присутствии хлорной платины образуется то же самое зеленое соединение платины, которое получается при действии хлорной платины на формамид. Так как ход реакции в обоих случаях одинаков,

---

\* Во всех фотохимических опытах я пользуюсь эрленмейеровскими колбами из бемского стекла, так как я наблюдал, что при прочих равных условиях фотохимические реакции гораздо скорее протекают в конических колбах, чем в цилиндрических или других. Это, вероятно, происходит оттого, что наклонные стенки эрленмейеровских колб облегчают поглощение лучей жидкостью.

то можно рассматривать это как косвенное доказательство образования формамида при восстановлении азотной кислоты формальдегидом.

## ВЫВОДЫ

I. Прежде чем восстанавливаться в растениях, нитраты почвы подвергаются под комбинированным влиянием разбавления, кислотности сока и, может быть, солнечного излучения распаду, при котором они превращаются в сравнительно малоустойчивые нитриты.

II. Наиболее энергичное восстановление нитратов имеет место в листьях, где происходит также и разложение углекислоты. Как было доказано предшествующими исследованиями, углекислота разлагается под действием солнечных лучей на перекисное соединение (надугольную кислоту) и восстановитель (формальдегид.) Из этого вытекает, что главную роль в восстановлении нитратов должен играть формальдегид.

III. Вопрос о восстановлении нитратов в растениях сводится, таким образом, к действию формальдегида на азотную кислоту.

IV. При действии на азотную кислоту, негидрогенизирующие восстановители, например, сернистая или гидросернистая кислота, образуют гидросиламин, так же как и гидрогенизирующие восстановители. Переход от нитратного азота к аммиачному может, следовательно, осуществляться простым отщеплением кислорода, без последующей гидрогенизации, причем остаток  $=\text{NH}$  азотноватистой кислоты  $\text{O}=\text{NH}$  присоединяет молекулу воды и образует гидросиламин.

V. Действие формальдегида на азотную кислоту должно быть аналогично действию сернистой кислоты, т. е. оно должно приводить к образованию гидросиламина.

VI. Образовавшийся гидросиламин, находясь в присутствии избытка беспрестанно образующегося в листьях формальдегида, должен соединяться с ним, согласно известной реакции, и образовывать формальдоксим.

VII. Как и другие альдоксимы, формальдоксим может превратиться путем интрамолекулярного перемещения в соответственный амид, формамид.

VIII. Изложенные соображения приводят нас к выводу, что формальдоксим и формамид представляют собою первые члены в процессе восстановления нитратов в растениях.

IX. При действии формальдегида или триоксиметилена на водную азотную кислоту возникающие азотистые углеродные соединения разлагаются под действием азотистой кислоты, образующейся при восстановлении азотной кислоты, — получается едва заметная реакция на формальдоксим.

X. Результат получается удовлетворительный, если пропускать очень медленный ток окислов азота через взвесь триоксиметилена в эфире. В этих условиях получают заметные количества формальдоксима и триоксимидометилена.

XI. Так как формамид разлагается в кислой среде, то он не может находиться как таковой в продуктах реакции между формальдегидом и азотной кислотой. Чтобы обнаружить его, приходится прибегать к косвенным реакциям. При взаимодействии формальдегида с азотной кислотой в присутствии хлорной ртути получают перламутровые пластинки, содержащие аммиачный азот. Тот же самый продукт реакции образуется и при взаимодействии хлорной ртути с формамидом.

При восстановлении азотной кислоты с формальдегидом в присутствии хлорной платины или при взаимодействии формамида с хлорной платиной

образуется зеленое соединение, которое ведет себя совершенно одинаково в обоих случаях.

Все эти факты до известной степени доказывают, что формамид образуется в качестве промежуточного продукта при восстановлении азотной кислоты формальдегидом.

10 ноября 1896 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Gautier A. Cours de Chimie, 3. Chimie biologique, 61—68 (1892). Paris.
2. Гипотезы Лева разбросаны в большом числе работ, напечатанных им в различных журналах, например: Pflüg. Arch. **22**, 503; Flora, 117 (1892); 68 (1895); Ber. Dtsch. chem. Ges., 2508 (1881); 675 (1890); Chem. Ztg., 143 (1896).
3. Loew. Ber. Dtsch. chem. Ges., **23**, 675 (1890).
4. Meyer u. Schulze. Ber. Dtsch. chem. Ges., **17**, 1554 (1884).
5. Laurent. Bull. Acad. Roy. Belg. [3], **21**, 337; Ber. Dtsch. chem. Ges., **24**, 520 (1894).
6. Berthelot et Andre. C. R. Acad. Sci., Paris, **93**, 591 (1884).
7. Бах. Mon. Sci., 609 (1893); настоящая книга, стр. 155.
8. Beckmann. Ber. Dtsch. chem. Ges., **19**, 988 (1886); **20**, 1507, 2580, 2766 (1887).
9. Scholl. Ber. Dtsch. chem. Ges., **24**, 573 (1891).
10. Behrend. Lieb. Ann., **277**, 310—339 (1893).
11. Scholl. Ber. Dtsch. chem. Ges., **24**, 573 (1891).
12. André. C. R. Acad. Sci., Paris, **112**, 115 (1891).

## О ФОРМАЛЬДОКСИМЕ

[*Sur la formaldoxime*] \*

В одной из прежних работ<sup>1</sup> я изложил теоретические и экспериментальные данные, из которых вытекает, что формальдоксим является первым членом синтеза азотистых соединений в растениях, исходящего из нитратов почвы. Вполне очевидно, что формальдоксим не вступает в молекулу белковых соединений как таковой, ибо последние содержат амидные и имидные радикалы и не содержат радикала оксима. С другой стороны, весьма убедительными физиологическими опытами установлено, что некоторые аминокислоты, в частности аспарагин и его производные, образуют, повидимому, основное ядро, из которого строится при помощи углеводов молекула белка и которое встречается в продуктах распада последней.

Поэтому интересно было выяснить условия, в которых формальдоксим может превращаться в амиды кислот. Опыты, которые я поставил с этой целью, не привели еще к желаемому результату, но при их проведении я сделал ряд наблюдений, представляющих тем больший интерес, что формальдоксим — сравнительно мало изученное соединение. Формальдоксим был приготовлен впервые в 1891 г. Шолем, и до настоящего времени о нем напечатано всего две или три работы.

Прежде всего я скажу несколько слов о приготовлении формальдоксима.

Шоль приготовил его в чистом состоянии путем действия формальдегида на солянокислый гидроксилламин, предварительно разложенный необходимым количеством углекислого натрия; смесь экстрагировалась эфиром, после чего эфирная вытяжка выпаривалась. Получающиеся при этом методы выходы чрезвычайно низки. Во-первых, эфир неполностью экстрагирует формальдоксим, во-вторых, последний чрезвычайно летуч с парами эфира.

Я попытался улучшить выход, упразднив экстрагирование эфиром. С этой целью я разложил солянокислый гидроксилламин в спиртовом растворе необходимым количеством этилата натрия и после отделения осадка хлористого натрия обработал жидкость теоретическим количеством формальдегида. Однако оказалось, что приготовленный таким образом раствор формальдоксима содержал еще хлористый натрий. Чтобы избежать этого, я применил следующий метод, давший мне хорошие результаты. Я растворил солянокислый гидроксилламин в спирте, обработал раствор необходимым количеством этилата натрия и после фильтрования перегнал его. Последняя треть погонов состоит почти исключительно из свобод-

\* Mon. sci., 13, 251 (1899); Arch. Sci. phys. nat. 7. 296 (1899).

ного гидроксилamina. Если прибавить к этой жидкости формальдегид в стехиометрической пропорции, то получается чистый формальдоксим. Последний перегоняется, переходя около  $80^{\circ}$ , и застывает при охлаждении в твердую массу, состоящую из полимеризованного формальдоксима или триоксимидометилена.

Приготовленный таким образом раствор формальдоксима, повидимому, очень устойчив. По крайней мере я наблюдал, что оставленный на несколько месяцев под действием прямых солнечных лучей раствор не изменился за это время. Я сделал из этого вывод, что для того чтобы вызвать превращение формальдоксима, необходимо присутствие конденсирующего агента — кислоты или щелочи.

Первый опыт, сделанный с соляной кислотой, дал мне любопытный результат. Вместо того чтобы приготовить формальдоксим, как описано выше, и обработать его затем соляной кислотой, я просто смешал эквивалентное количество формальдегида и солянокислого гидроксилamina. Под действием формальдегида из солянокислого гидроксилamina освобождается соляная кислота, что является довольно неожиданным, если учесть основные свойства гидроксилamina. Мы увидим ниже, чем это объясняется.

Прошлым летом я выставил на солнце на четыре месяца (июнь — сентябрь) смесь из  $10 \text{ см}^3$  40%-ного формальдегида, 10 г солянокислого гидроксилamina и  $40 \text{ см}^3$  воды. Смесь находилась в маленькой эрленмейеровской колбе, свободно закрытой ватой, не мешавшей медленному испарению. По истечении указанного срока содержимое склянки представляло собой очень густой коричневый сироп, в котором находилось несколько кристаллов в виде очень длинных и тонких пластинок. Очищенные по возможности от покрывавшего их сиропа и обработанные разбавленным раствором сернокислой меди и несколькими каплями едкого кали, они окрасились в яркофиолетовый цвет. Я предположил, что это окрашивание обуславливается биуретовой реакцией и что формальдоксим претерпел глубокое изменение. Действительно, согласно исследованию Шиффа<sup>2</sup>, биуретовая реакция свойственна только веществам, содержащим две группы  $-\text{CO} = \text{NH}-$ , связанные с одним атомом С или N или связанные между собой в открытой цепи одним или несколькими радикалами.

Отделенный сироп содержал неизмененный формальдоксим, аммиак и муравьиную кислоту, но мне не удалось его выкристаллизовать.

В ожидании, пока будет возможно повторить опыт в описанных выше условиях, я пытался повторить его, заменив действие солнечных лучей действием теплоты. С этой целью эквимолекулярная смесь формальдегида и солянокислого гидроксилamina была подвергнута перегонке на водяной бане. Погон содержал неизмененный формальдоксим, а остаток в колбе представлял собою коричневый сироп, идентичный описанному выше. При температуре кипящей водяной бани сироп не затвердевал, сколько бы ни продолжалось нагревание. При более высокой температуре он обугливался с выделением запаха карамели.

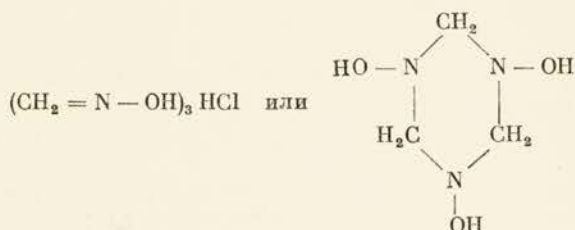
После нескольких попыток мне, наконец, удалось извлечь из смеси формальдегида и солянокислого гидроксилamina кристаллизованное вещество, применяя следующий метод.

К 40%-ному раствору формальдегида прибавлялось необходимое количество солянокислого гидроксилamina: после фильтрования смесь оставлялась в вакуум-эксикаторе над серной кислотой и едким кали. По истечении некоторого времени из растворов выпали кристаллы в виде длинных игл, по большей части собранные в сферические агрегаты. Отделенные от маточного раствора, кристаллы были очень легко растворимы в воде, растворимы в метиловом спирте, менее растворимы в этиловом спирте и нерастворимы в эфире. Перекристаллизованное в горячем мети-



ловом спирте вещество получалось в виде маленьких плоских и твердых призм, образовывавших корку на дне кристаллизатора. Соединение улетучивалось уже при  $70^\circ$  в открытой чашке, так что мне не удалось определить точно его точку плавления. В капилляре оно улетучивалось при температуре выше  $124^\circ$ . Погружая трубку с термометром непосредственно в серную кислоту, нагретую до  $130^\circ$ , и продолжая быстро нагревать, можно было заметить, что оно плавилось между  $134-136^\circ$ .

Так же как и кристаллы, полученные в первом опыте, это новое вещество давало фиолетовое окрашивание с сернистой медью и едким кали и одновременно все характерные для формальдоксима реакции. Оно содержало хлор, и после растворения в воде не выкристаллизовывалось, как бы высока ни была концентрация раствора. Последний содержал свободную соляную кислоту. Таким образом, это вещество, по видимому, было солянокислой солью, распадавшейся в воде на формальдоксим и свободную соляную кислоту. Определение хлора подтвердило это предположение и показало, что исследуемое соединение является триоксимидометиленом.

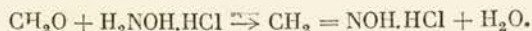


|                                    |                                                                  |
|------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| 0.325 г вещества дали 0.266 г AgCl | Теоретически $(\text{CH}_2 = \text{N} - \text{OH})_3 \text{HCl}$ |
| Cl . . . . . 20.02%                | Cl . . . . . 20.69%                                              |

Полученный мною солянокислый гидроксилламин, по видимому, тождественен с полученным недавно Дунстаном и Босси<sup>3</sup> при действии сухого хлористоводородного газа на эфирный раствор формальдоксима, с последующей перекристаллизацией продукта в метиловом спирте, к которому понемногу прибавлялся эфир. Я приготовил солянокислый гидроксилламин, растирая вместе эквимолекулярные количества триоксиметилена и солянокислого гидроксилламина и перекристаллизовывая полученный продукт в горячем метиловом спирте. Это наиболее удобный способ приготовления этого соединения.

Существование этого соединения объясняет нам выделение соляной кислоты при действии формальдегида на солянокислый гидроксилламин.

По всей вероятности, в первую очередь образуется продукт присоединения одной молекулы формальдегида к одной молекуле солянокислого гидроксилламина с выделением одной молекулы воды:



Однако, вследствие введения радикала  $\text{CH}_2$  в молекулу гидроксилламина, основные свойства нового соединения чрезвычайно ослаблены; образовавшийся солянокислый формальдоксим малоустойчив и легко разлагается водой. Необходимо, чтобы три молекулы формальдоксима связывали одну молекулу соляной кислоты, чтобы образовать более устойчивый солянокислый триоксимидометилен. Но и это соединение устойчиво только в отсутствии воды.

Таким образом, выделение соляной кислоты при действии формальдегида на солянокислый гидроксилламин обусловлено диссоциирующим

действием воды на образующийся в первую очередь солянокислый формальдоксим.

Как я уже говорил выше, солянокислый триоксимидометилен дает с разбавленной серноокислой медью и едким кали фиолетовое окрашивание. Свободный формальдоксим обладает тем же свойством. Это весьма четкая и чрезвычайно чувствительная реакция, которая может быть использована для обнаруживания чрезвычайно малых количеств меди. В этом случае следует производить реакцию нижеследующим образом.

Реактив готовится путем смешивания эквимолекулярных количеств 20%-ного раствора формальдегида и солянокислого гидроксиламина. Раствор этот, повидимому, может сохраняться неограниченное время. Для того чтобы обнаружить присутствие меди в растворе, обрабатывают 15 см<sup>3</sup> последнего 0.5 см<sup>3</sup> раствора формальдоксима и прибавляют 0.5 см<sup>3</sup> 15%-ного раствора едкого кали. В зависимости от количества меди, имеющейся в растворе, получается более или менее интенсивное фиолетовое окрашивание. В растворе, содержащем одну часть кристаллизованной серноокислой меди на 10 000 частей воды, формальдоксим вызывает настолько интенсивное окрашивание, что жидкость едва пропускает свет.

Даже в растворе, содержащем всего одну часть серноокислой меди на 1 000 000 частей воды, фиолетовое окрашивание еще вполне заметно.

Прежде чем исследовать жидкость на присутствие меди, следует выделить металлы группы железа, дающие с формальдоксимом различные окрашивания.

В концентрированном растворе соли меди, прибавление формальдоксима и едкого кали вызывает зеленое окрашивание; приходится прибегать к разбавлению водой для того, чтобы появилось фиолетовое окрашивание.

Что касается реакции, протекающей между формальдоксимом и серноокислой медью в присутствии едкого кали, то сначала я предполагал, что она тождественна с биуретовой реакцией. Однако, сравнивая их более внимательно, я отметил, что между ними имеются некоторые различия.

В первую очередь, различия в окраске: окраска, вызванная формальдоксимом, — черно-фиолетовая, в то время как вызванная чистым биуретом — розовая.

Во-вторых, разница в чувствительности: при равном содержании серноокислой меди в растворах первая реакция гораздо чувствительнее второй. В то же время между обеими реакциями наблюдается и поразительная аналогия. Шифф, специально изучавший биуретовую реакцию, показал, что фиолетовый раствор, полученный при действии медной соли на калийное производное биурета, поглощает углекислоту из воздуха и обесцвечивается с выделением закиси меди. Фиолетовый раствор, полученный с формальдоксимом, ведет себя точно так же. Кроме того, Шифф показал, что из всех металлов только никель может давать с биуретом и едким кали реакцию, аналогичную той, которую дает медь. В этом случае получается желто-оранжевое окрашивание. Формальдоксим вызывает в растворе серноокислого никеля в присутствии едкого кали аналогичное окрашивание. Однако окрашивание здесь более темное и реакция значительно более чувствительна, — ее можно было бы даже использовать для обнаруживания никеля.

Я прибавлю еще, что продукт, который получается при действии формальдегида на цианистый калий в порошке, дает весьма характерную биуретовую реакцию.

Принимая во внимание тесную связь, которая существует между формальдоксимом и синильной кислотой, этот факт, — который, насколько мне известно, не был еще нигде указан, — также доказывает аналогию между реакцией формальдоксима и биуретовой реакцией.

Метод, который я предлагаю для обнаруживания весьма малых количеств меди, мог бы быть полезным и в физиологических исследованиях. Медь, повидимому, является нормальной составной частью животного организма, но до сих пор еще абсолютно ничего не известно о ее физиологической роли.

1 марта 1899 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бах. Mon. Sci., 238 (1897).
2. Schiff. Ber. Dtsch. chem. Ges., 29, 298 (1896).
3. Dunstan a. Bossi. J. Chem. Soc., 383 (1898).

---

## СВЯЗЫВАНИЕ АТМОСФЕРНОГО АЗОТА ПРИ ОБЫКНОВЕННОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ И ДАВЛЕНИИ ПРИ ПОСРЕДСТВЕ ЭНЗИМОВ, ИЗВЛЕЧЕННЫХ ИЗ АЗОТНЫХ БАКТЕРИЙ \*

(Совместно с З. В. Ермольевой и М. П. Степанян)

Синтез аммиака из азота и водорода осуществляется в технике путем катализа при высоких температурах и давлениях, т. е. с очень большой непроизводительной затратой потенциальной энергии. С другой стороны, тот же синтез осуществляется некоторыми микроорганизмами при обыкновенной температуре и давлении, несомненно, с гораздо более целесообразными затратами потенциальной энергии. Если о механизме технического синтеза аммиака мы знаем очень мало, то о механизме биологического синтеза нам известно и того меньше. Единственное, что можно утверждать, это то, что и здесь катализ играет первенствующую роль. Мы поставили себе задачей подвергнуть биологический синтез аммиака систематическому исследованию. Подобно тому как теоретическое изучение механизма полета птиц привело к построению летательного аппарата, более тяжелого, чем воздух, мы надеемся путем теоретического изучения сопряженного действия биологических окислительно-восстановительных катализаторов, обуславливающего связывание атмосферного азота бактериями, выявить наиболее благоприятные условия для технического синтеза аммиака.

После ряда предварительных опытов мы избрали как объект исследования чистые культуры *Azotobacter chroococcum*. И прежде всего нам предстояло разрешить вопрос, является ли биологический синтез аммиака результатом деятельности всего живого комплекса микроорганизма, как в свое время Пастер понимал роль дрожжевой клетки в спиртовом брожении, или же результатом действий тех биологических катализаторов, энзимов, которые содержатся в микроорганизме. Многочисленные опыты, проведенные нами в течение года, не оставляют сомнений в том, что сок, извлеченный из культур *Azotobacter* посредством бухнеровского пресса и не содержащий жизнеспособных клеток, дает синтез аммиака так же, как и живые бактерии, которые, однако, быстро переводят аммиачный азот в общий.

Для иллюстрации этого положения мы кратко опишем последнюю серию опытов, произведенных нами в июле 1934 г.

Посев азотобактера производился на среде, содержавшей в литре 0.2 г двухкальевого фосфата и 20 г маннита или такое же количество глюкозы. Среда выливалась по методу Виноградского на гель кремнекислоты, посыпанный углекислым кальцием. Посеянные в 60 больших чашках Петри

---

\* ДАН СССР, 1 (1934).

чистые культуры выращивались при 30°. По прошествии нескольких дней производился в стерильных условиях сбор образовавшихся колоний, которые тщательно растирались со стерилизованным кварцевым песком и отжимались в бухнеровском прессе. Полученный опалесцирующий сок был разделен пополам. Одна половина была профильтрована через свечу Шамберлена («фильтрованный сок»), другая была пастеризована в течение 2 часов в водяной бане («пастеризованный сок»).

Для опытов энзиматического связывания азота брались 5 см<sup>3</sup> сока, 22.5 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора маннита или глюкозы и 22.5 см<sup>3</sup> раствора фосфата рН = 7.2. В контрольных опытах вместо растворов сахаров брались соответствующие количества воды. В начале опыта в реакционной смеси определялось содержание аммиачного и общего азота, и затем анализы производились через определенные промежутки времени в пробах в 1 см<sup>3</sup>, содержавших 0.2 см<sup>3</sup> выжатого из культур сока. Аммиачный азот определяется по методу Лонги (отгон аммиака с магниезией под уменьшенным давлением), общий азот — иодометрически по микрометоду Кьелдаля. При взятии каждой пробы без исключения реакционная жидкость испытывалась на стерильность посевом. В следующей таблице приведены результаты двух серий опытов.

| Дата опыта | Контроль   |                | + маннит   |                | + глюкоза  |                |
|------------|------------|----------------|------------|----------------|------------|----------------|
|            | общий азот | аммиачный азот | общий азот | аммиачный азот | общий азот | аммиачный азот |

(мг связанного азота на 1 см<sup>3</sup> отжатого сока)

1. Фильтрованный сок

|                  |       |       |        |       |        |        |
|------------------|-------|-------|--------|-------|--------|--------|
| 10.VII . . . . . | 1.976 | 0.622 | 2.005  | 0.653 | 2.104  | 0.588  |
| 13.VII . . . . . | 1.981 | 0.565 | 5.187  | 5.082 | 11.295 | 8.195  |
| 16.VII . . . . . | 2.139 | 0.646 | 8.545  | 6.833 | 14.086 | 10.460 |
| 19.VII . . . . . | 2.783 | 0.551 | 10.645 | 8.259 | 14.683 | 10.679 |

2. Пастеризованный сок

|                  |       |       |       |       |       |       |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 10.VII . . . . . | 2.544 | 0.627 | 2.739 | 0.622 | 2.944 | 0.528 |
| 13.VII . . . . . | 2.826 | 0.565 | 8.088 | 4.603 | 8.488 | 4.426 |
| 16.VII . . . . . | 2.993 | 0.646 | 8.753 | 5.583 | 8.540 | 6.406 |
| 19.VII . . . . . | 3.304 | 0.918 | 9.544 | 5.873 | 9.911 | 7.341 |

Из приведенных данных можно сделать следующие выводы.

I. Прибавление маннита или глюкозы к отжатому соку бактерий увеличивает во много раз количество связанного азота в сравнении с контрольным опытом без прибавления сахаров как источника энергии. Опыты с маннитом дали в 15 раз, а с глюкозой в 19 раз больше связанного аммиачного азота, чем в контрольных опытах.

II. В результате связывания азота под действием энзимов образуется почти исключительно аммиак.

III. Профильтрованный через свечу Шамберлена сок дает заметно лучшие результаты, чем пастеризованный.

К этому надо прибавить, что в опытах с глюкозой производился учет затраченной глюкозы по отношению к связанному азоту. В то время как в живых культурах азотобактера Виноградский получил на 1 г глюкозы

0.0025 г, другие же — 0.016 г связанного азота, мы получили с отжатым соком того же микроорганизма на 1 г глюкозы 0.276 г общего азота, в том числе 0.223 г аммиачного азота.

Параллельно с этими исследованиями мы изучаем бактерии, которые обладают способностью пользоваться молекулярным водородом как источником энергии. Если нам удастся выделить из их культур соответственные энзимы, мы попытаемся комбинировать их с энзимами азотобактера для непосредственного получения аммиака из смеси воздуха с избытком водорода.

21 ноября 1933 г.

---

## ТЕОРИЯ ОКИСЛЕНИЯ

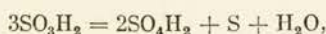
О ПРОИСХОЖДЕНИИ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА, НАХОДЯЩЕЙСЯ  
В АТМОСФЕРНОМ ВОЗДУХЕ И В АТМОСФЕРНЫХ  
ОСАДКАХ \*

В своей недавно напечатанной статье «Zur Frage über das Vorkommen des Wasserstoffhyperoxyds in der atmosphärischen Luft und den atmosphärischen Niederschlägen»\*\* Э. Б. Шене<sup>1</sup> касается вопроса о происхождении перекиси водорода, обнаруживаемой в воздухе, и как на возможный источник ее указывает на окисление под влиянием солнечных лучей различных летучих органических соединений, выделяемых растениями. Основывает он свое предположение на том, что нахождение перекиси водорода в воздухе в большой мере зависит от действия солнечных лучей и что годичный максимум перекиси соответствует летним месяцам (июлю), т. е. совпадает с полным развитием растительности.

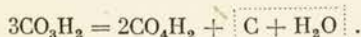
Не входя в разбор этой гипотезы, так же как и других, которые в свое время были предложены по этому вопросу, я позволю себе в настоящей заметке воспользоваться фактами, установленными Э. Б. Шене, чтобы дать происхождению перекиси водорода в воздухе другое объяснение.

В заметке, представленной от моего имени имени проф. Шютценбергером в Парижскую Академию наук в мае прошлого года<sup>2</sup> и в статье, напечатанной в сентябре того же года в «Moniteur scientifique»<sup>3</sup>, я изложил новую гипотезу относительно разложения углекислоты под влиянием солнечных лучей, и эта гипотеза, как мне кажется, дает удовлетворительный ответ на вопрос о происхождении атмосферной перекиси водорода.

Различные соображения, о которых здесь не место распространяться, привели меня к заключению, что по аналогии с сернистой кислотой, которая под влиянием солнечных лучей разлагается по уравнению:



углекислота (т. е. гидрат, а не ангидрид; в присутствии воды часть ее всегда находится в связанном состоянии) разлагается в тех же условиях следующим образом:

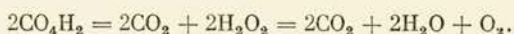


Группа  $\boxed{\text{C} + \text{H}_2\text{O}}$  =  $\text{CH}_2\text{O}$  есть, очевидно, муравьиный альдегид. Что касается соединения  $\text{CO}_4\text{H}_2$ , аналогичного  $\text{SO}_4\text{H}_2$ , то оно есть не что иное,

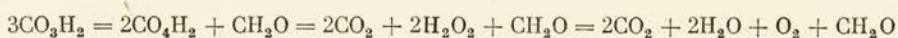
\* ЖРФХО, 26, 101(1894);

\*\* К вопросу о происхождении перекиси водорода в воздухе и атмосферных осадках.

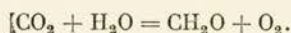
как надугольная кислота, ангидрид которой  $\text{CO}_3$  (anhydride percarbonique) был впервые указан Бертелло<sup>4</sup>. Уже один состав надугольной кислоты показывает, что она — соединение крайне неустойчивое и что произвольно или под влиянием солнечных лучей она разлагается на угольный ангидрид, воду и кислород, вероятно, с образованием перекиси водорода, как промежуточного продукта:



Сумма этих реакций —



дает результат, который вполне соответствует знаменитой гипотезе Бейера, согласно которой процесс разложения углекислоты в зеленых частях растений совершается по уравнению:



Таким образом, из трех частиц углекислоты, которые принимают участие в реакции, две претерпевают род интрамолекулярного окисления за счет двух атомов кислорода третьей, которая вследствие этого восстанавливается в муравьиный альдегид. Образовавшаяся таким образом надугольная кислота разлагается затем, как указано выше.

Я не могу остановиться здесь ни на заключениях, которые вытекают из аналогии между разложением сернистой и угольной кислоты, ни на опытах, посредством которых я доказал разложение углекислоты под влиянием солнечных лучей на два продукта, из которых один носит характер окислителя, а другой — восстановителя. Но я желал бы в нескольких словах указать на опыт, которым я установил образование муравьиного альдегида как продукта разложения углекислоты.

К насыщенному при обыкновенной температуре и профильтрованному раствору уксуснокислого урана\* я прибавил 1% чистого и свежеперегнанного диэтиланилина и распределил смесь в три конические колбы, выставленные на солнце. Первая колба *a* была хорошо закупорена и оставлена для контроля, а во вторые две — *b* и *c* — я пропускал ток хорошо очищенной углекислоты, предварительно плотно обернув последнюю колбу *c* серой бумагой. После 20—25-часовой иррадиации содержимое колбы *b* окрасилось в глубокий сине-фиолетовый цвет, тогда как в колбе *c* (действие  $\text{CO}_2$  в отсутствии света) смесь оставалась без всякого изменения (светло-желтый осадок, вероятно, двойная углекислая соль урана и диэтиланилина), а колба *a* содержала светлобурый смолистый осадок и желтую жидкость. Ни в одной из двух последних колб нельзя было подметить ни следа синего или фиолетового окрашивания. Таким образом, сине-фиолетовое окрашивание в колбе *b* можно было приписать только комбинированному действию солнечных лучей и углекислоты, т. е. продуктам разложения последней.

Опытами Нелтинга<sup>5</sup> было доказано с полной очевидностью, во-первых, что, в противоположность диметиланилину, сам диэтиланилин не дает фиолетового красящего вещества при окислении, во-вторых, что один только муравьиный альдегид способен, по известной реакции, соединиться с диэтиланилином, чтобы дать производное трифенилметана, которое при окислении дает фиолетовое красящее вещество. Из этого следует, что фиолетовое окрашивание в колбе могло образоваться только лишь при

\* Основания, по которым я употребил эту соль для моих опытов, так же как подробное описание последних, приведены в «Moniteur scientifique», 672—685 (1893).



условии разложения углекислоты под влиянием солнечных лучей на *муравьиный альдегид*, который дал с диэтиланилином лейкооснование, и на *окислительное вещество*, которое превратило последнее в красящее вещество. Это окислительное вещество, в смысле моей гипотезы, могло быть только или надугольной кислотой, или перекисью водорода.

Теперь, если моя гипотеза относительно разложения углекислоты под действием солнечных лучей верна, то происхождение атмосферной перекиси водорода получает довольно простое объяснение. Перекись водорода является продуктом разложения надугольной кислоты, т. е. результатом одновременного восстановления и окисления различных частиц углекислоты под влиянием солнечных лучей. Те условия, с которыми, по наблюдениям Э. Шене, связано образование перекиси водорода в воздухе, вполне соответствуют и разложению углекислоты в указанном мною смысле. Чем интенсивнее и продолжительнее иррадиация, тем больше образуется надугольной кислоты, тем больше атмосфера содержит перекиси водорода. Очень возможно, что способность некоторых веществ давать перекись водорода под действием солнечных лучей зависит от присутствия в них и разложения углекислоты. По крайней мере до сих пор этот фактор был совершенно упущен из вида.

Свободная надугольная кислота — если только она может существовать в свободном состоянии — должна, как можно предвидеть, давать те же реакции, как и перекись водорода, и, по всей вероятности, во многих случаях первую должны были бы принимать за последнюю, подобно тому как надугольный ангидрид должны были бы принимать за озон. Что касается другого продукта разложения углекислоты, т. е. муравьиного альдегида, то присутствие его в воздухе ускользает от анализа, во-первых, потому что до сих пор нет достаточно чувствительной реакции для этого соединения, во-вторых, потому что последнее обладает в высокой степени способностью соединяться с разнообразными веществами и, между прочим, с аммиаком.

На это мое объяснение происхождения перекиси водорода в воздухе можно, однако, сделать одно веское на вид возражение. Если действительно углекислота разлагается под действием солнечных лучей так, как это представляется по моей гипотезе, то почему разложение это не идет в воздухе в больших размерах, почему в воздухе находятся только следы перекиси водорода?

Как я показал в моей вышеупомянутой статье, для разложения углекислоты под влиянием солнечных лучей существенно необходимы двоякого рода условия: во-первых, среда, способная воспринимать определенные лучи и утилизировать их энергию для химического действия, во-вторых, присутствие веществ, способных соединяться с продуктами разложения углекислоты — хотя бы с образованием промежуточных, легко разлагающихся соединений — и воспрепятствовать, таким образом, тому, чтобы реакция шла в обратную сторону (сжигание  $\text{CH}_2\text{O} + \text{O}_2$  в  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ ). Хотя зеленые части растений представляют собою прекрасный аппарат для сравнительно быстрого разложения углекислоты под влиянием солнечных лучей, но *вне растений*, в природе почти не происходит стечения условий, благоприятных для этого разложения, и поэтому последнее совершается в атмосферном воздухе чрезвычайно медленно и в ограниченных размерах. Следовательно, с точки зрения моей гипотезы, нет ничего удивительного в том, что перекиси водорода так мало в воздухе. К этому надо еще прибавить и то, что перекись водорода разлагается солнечными лучами, так же как и многими веществами, из которых по крайней мере некоторые находятся в воздухе, что еще должно уменьшить количество ее в атмосфере.

В заключение я желал бы сказать несколько слов об опытах, которые я предпринял, имея в виду приготовление натриевой соли надугольной кислоты.

Исходя из предположения, что при разложении углекислотою перекиси бария, разведенной в воде, образуется сперва надугольная кислота, которая затем разлагается на угольный ангидрид и перекись водорода, я пропускал ток углекислоты в колбу, содержащую перекись бария и воду и поставленную в лед. По истечении 1—2 часов я сливал жидкость в хорошо охлажденную воронку с краном, взбалтывал с сильно охлажденным эфиром, быстро фильтровал эфирный раствор через охлажденный фильтр в поставленную в лед колбу и осторожно прибавлял к нему охлажденный алкогольный раствор едкого натра.

При этом в форме тонких кристаллических пластинок с перламутровым отливом выделялось вещество, которое содержало углекислоту и активный кислород и которое при прибавлении воды разлагалось, выделяя кислород. К сожалению, мне до сих пор не удалось сделать точного анализа этого вещества. Уже при отфильтровывании смеси эфира и алкоголя оно разлагается с выделением газа и остается на фильтре в виде белоснежной пористой массы углекислого натрия.

Представляет ли собою это соединение искомый надугольноокислый натрий или только кристаллизованную смесь углекислого натрия и перекиси натрия — остается пока невыясненным.

20 января 1894 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Шене. Ver. Dtsch. chem. Ges., **27**, 304 (1894); ЖРФХО, **26**, 20 (1894).
2. Бах. С. R. Acad. Sci., Paris, **116**, 1145 (1893).
3. Бах. Исследования химического механизма ассимиляции углекислоты хлорофильными растениями [Recherches sur le mécanisme chimique de l'assimilation de l'acide carbonique par les plantes à chlorophylle].— Mon. Sci., [4] **7**, 669 (1893); настоящая книга, стр. 155.
4. Berthelot. Ann. Chim. Phys., **5**, 17 (1872).
5. Noelting. Mon. Sci., 233 (1892).

---

## О СУЩЕСТВОВАНИИ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА В ЗЕЛЕННЫХ РАСТЕНИЯХ

[*Sur l'existence de l'eau oxygenée dans les plantes vertes*] \*

Вопрос о существовании перекиси водорода в зеленых растениях много обсуждался за последние годы, но не получил до сих пор удовлетворительного решения.

В последних работах Вурстер дает на этот вопрос положительный ответ, а Бокорни — отрицательный. Вурстер<sup>1</sup> нашел, что бумажка, пропитанная водным или уксуснокислым раствором тетраметилпарафенилендиамина, окрашивается в присутствии малейших следов азотистой кислоты или перекиси водорода. При помощи этой реакции он искал перекись водорода в различных жидкостях растительного и животного происхождения и обнаружил ее почти везде, в частности в соке зеленых листьев. Так как реактив Грисса не указывал на присутствие азотистой кислоты в исследованных им жидкостях, Вурстер утверждает, что в растениях действительно имеется перекись водорода.

Бокорни<sup>2</sup> придерживается противоположной точки зрения. Во-первых, он оспаривает значение реакции Вурстера, так как наблюдал, что уже при взбалтывании чистой воды на воздухе появляется то окрашивание, которое Вурстер считает характерным для перекиси водорода. Кроме того, его собственные опыты дали вполне отрицательный ответ на вопрос о присутствии перекиси водорода в зеленых растениях. Решающими он считает следующие два опыта: 1. Нити *Spirogyra*, выращенные в питательной среде, содержащей крахмал, не вызывают синего окрашивания последнего в присутствии иодистого калия. 2. После того как зеленые листья были подвергнуты диализу, в диализате не было обнаружено ни следа перекиси водорода (очевидно, при помощи иодистого калия и крахмала; автор не указывает, каким он пользовался реактивом). Мы увидим дальше, каково значение этих аргументов.

В опубликованной недавно статье<sup>3</sup> я высказал по поводу химического механизма восстановления углекислоты в зеленых растениях новую гипотезу, согласно которой три молекулы гидрата углекислоты  $\text{CO}_2\text{H}_2$  реагируют между собой, образуя одну молекулу формальдегида и две молекулы надугольной кислоты  $\text{CO}_4\text{H}_2$ . Последняя, в свою очередь, распадается на углекислоту, воду и кислород, образуя в качестве промежуточного продукта перекись водорода. Точными опытами, произведенными *in vitro*, я показал, что под действием солнечных лучей углекислота распадается

---

\* Mon. sci., (4), 8, 572 (1884).

на формальдегид и окислитель, действие которого аналогично действию перекиси водорода.

В связи со всеми этими результатами было интересно выяснить, действительно ли растения содержат перекись водорода в момент ассимиляции. В прошлом мае я предпринял ряд исследований по вопросу о существовании перекиси водорода в зеленых растениях, рассчитывая привести в пользу высказанной мною гипотезы доказательства из области физиологии.

Прежде всего я пытался выяснить, в какой мере обычно применяемые реакции на перекись водорода могут быть использованы для ее обнаружения в растениях. Результаты этих исследований и являются предметом настоящей заметки.

Существует шесть наиболее известных реактивов для обнаруживания перекиси водорода:

1. Тетраметилпарафенилендиамин (реактив Вурстера);
2. Гваяковая настойка в присутствии диастазы;
3. Иодистый калий — крахмал в присутствии серноокислой закиси железа;
4. Двуокись титана в серноокислом растворе;
5. Уксуснокислый уран в 1%-ном водном растворе;
6. Двухромовокислый калий — афир.

#### ТЕТРАМЕТИЛПАРАФЕНИЛЕНДИАМИН

Вурстер считает, что он доказал существование перекиси водорода в растениях при помощи именно этого реактива. Однако автор сам признает, что его чувствительность настолько велика, что тетраметилпарафенилендиаминовая бумажка окрашивается уже в присутствии хлористого кальция и глицерина вследствие поглощения ими кислорода. Как мы упомянули выше, Бокорни утверждает, что чистая вода, взболтанная на воздухе, уже вызывает окрашивание реактива. Такая чувствительность бесспорно больше, чем этого требует поставленная цель, и, очевидно, что полученные при помощи такого реактива результаты с полным основанием могут оспариваться\*.

#### ГВАЯКОВАЯ НАСТОЙКА В ПРИСУТСТВИИ ДИАСТАЗЫ

Гваяковая настойка окрашивается перекисью водорода в синий цвет только в присутствии диастазы или солода; азотистая кислота окрашивает ее даже в отсутствие диастазы, — этим и различаются эти две формы активного кислорода. Так как листья всегда содержат разные виды диастазы, то окрашивание гваяковой настойки, так же как и тетраметилпарафенилендиаминовой бумаги, можно приписывать перекиси водорода только в том случае, если доказано отсутствие азотистой кислоты. Но и помимо этого затруднения, к результатам испытаний с гваяковой настойкой нужно относиться с осторожностью вследствие чрезвычайной чувствительности реактива и сложности его приготовления, связанного с возможностью большого количества ошибок. Так, например, характерное окрашивание может получиться в чистой воде при взбалтывании ее на воздухе: 1) если смола, из которой готовится настойка, не была взята из середины большого куска; 2) если спирт, в котором растворялась смола, подвергался действию света; 3) если проделывать реакцию в присутствии аммиака или другой щелочи, и т. д.

\* Вследствие малой доступности тетраметилпарафенилендиамина я не проделал с ним опытов, но думаю, что перечисленных выше причин вполне достаточно для того, чтобы отказаться от этого реактива.

Для того чтобы мои результаты были неоспоримы и могли быть проверенными, я отказался также и от этого реактива, тем более что совершенно неизвестно, какое влияние могут иметь на него различные соединения, находящиеся в растениях.

### ИОДИСТЫЙ КАЛИЙ — КРАХМАЛ В ПРИСУТСТВИИ СЕРНОКИСЛОЙ ЗАКИСИ ЖЕЛЕЗА

В отсутствии азотистой кислоты можно было бы считать появление синего окрашивания реактива в присутствии сока или водного экстракта листьев доказательством наличия перекиси водорода. К сожалению, на ряде опытов я убедился, что именно в присутствии различных веществ, находящихся в листьях, этот реактив теряет всякое значение для определения перекиси водорода.

Установив, что вытяжка из листьев, приготовленная, как будет указано ниже, дает характерные реакции перекиси водорода с двуокисью титана и уксуснокислым ураном, я захотел проверить присутствие перекиси водорода при помощи крахмала с иодистым калием. К моему удивлению, этот реактив не показал ни следа синего окрашивания, но так как в то время я еще считал, что приведенные выше реакции действительно вызваны присутствием перекиси водорода (впоследствии выяснилось, что это не так), то я подумал, что вытяжка из листьев содержит ненасыщенные соединения, поглощающие выделенный иод и таким образом препятствующие появлению синего окрашивания.

Чтобы проверить это предположение, я проделал следующий опыт.

К 5 см<sup>3</sup> раствора иодистого калия с крахмалом, содержащего следы сернокислой закиси железа, я прибавлял из бюретки очень разбавленный раствор перекиси водорода и отмечал количество, необходимое для появления синего окрашивания. Затем к 5 см<sup>3</sup> того же реактива я прибавил 5 см<sup>3</sup> вытяжки из листьев (количество, дающее положительную реакцию с двуокисью титана и уксуснокислым ураном) и вновь определил количество перекиси водорода, необходимое для появления окрашивания.

Полученные результаты приведены в нижеследующей таблице:

|                                | На 5 см <sup>3</sup> реактива пошло 0.7 см <sup>3</sup> раствора Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub> |     |   |   |      |   |   |                               |
|--------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|---|---|------|---|---|-------------------------------|
| На 5.0 см <sup>3</sup> вытяжки | + 5                                                                                            | »   | » | » | 56.8 | » | » | Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub> |
| » 0.1 »                        | »                                                                                              | + 5 | » | » | 1.2  | » | » | Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub> |
| » 0.2 »                        | »                                                                                              | + 5 | » | » | 2.3  | » | » | Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub> |
| » 0.3 »                        | »                                                                                              | + 5 | » | » | 3.5  | » | » | Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub> |
| » 0.4 »                        | »                                                                                              | + 5 | » | » | 4.8  | » | » | Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub> |

С другой вытяжкой, полученной при более длительной обработке листьев, результаты еще более резко выражены:

|                                | На 5 см <sup>3</sup> реактива пошло 0.7 см <sup>3</sup> раствора Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub> |     |   |   |      |   |   |                               |
|--------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|---|---|------|---|---|-------------------------------|
| На 5.0 см <sup>3</sup> вытяжки | + 5                                                                                            | »   | » | » | 73.5 | » | » | Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub> |
| » 0.1 »                        | »                                                                                              | + 5 | » | » | 1.4  | » | » | Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub> |
| » 0.2 »                        | »                                                                                              | + 5 | » | » | 2.9  | » | » | Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub> |
| » 0.5 »                        | »                                                                                              | + 5 | » | » | 7.2  | » | » | Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub> |

Таким образом, в присутствии вытяжки из листьев количество перекиси водорода, необходимое для появления синего окрашивания крахмала, возросло от 0.7 см<sup>3</sup> до 56.8 см<sup>3</sup> в одном случае и до 73.5 см<sup>3</sup> в другом, т. е. реактив стал приблизительно в сто раз менее чувствительным. Кроме того, синее окрашивание реактива, достигнутое прибавлением необходимого

количества перекиси водорода, быстро исчезает, если прибавить вытяжку из листьев. Эти данные показывают, что иодо-крахмальная реакция совершенно непригодна для обнаруживания перекиси водорода в растениях. Они показывают также, что возражения Бокорни против наличия перекиси водорода в растениях, опирающиеся на результаты, полученные с этой реакцией, лишены всякого основания.

### ДВУОКИСЬ ТИТАНА В СЕРНОКИСЛОМ РАСТВОРЕ

Общепризнано, что двуокись титана в сернокислом растворе дает наиболее достоверную и в то же время чрезвычайно чувствительную реакцию на перекись водорода. Раствор не окрашивается в присутствии азотистой кислоты, нечувствителен к действию света и может храниться продолжительное время без изменений. При помощи этой реакции я и предполагал установить присутствие или отсутствие перекиси водорода в зеленых растениях, рассматривая другие реакции лишь как вспомогательные методы проверки полученных результатов.

Отметив в предварительных опытах, что раствор окиси титана дает характерное для перекиси водорода окрашивание с соком и водной вытяжкой зеленых листьев, собранных в середине дня, я решил подвергнуть эти данные систематическому исследованию.

Для приготовления раствора я придерживался следующего метода.

10 г двуокиси титана обрабатывались 200 см<sup>3</sup> чистой концентрированной серной кислоты; после прибавления 800 см<sup>3</sup> воды смесь оставлялась на 24 часа. По истечении этого времени прозрачный, бесцветный раствор сливался; если в нем еще оставались взвешенные частицы, я фильтровал его через стеклянную вату или асбест.

Для количественного определения перекиси водорода, выделенной из растений, я приготовил ряд проб, содержащих каждая 5 см<sup>3</sup> раствора двуокиси титана и различные, но точно определенные количества перекиси водорода в 5 см<sup>3</sup> воды. Полученная таким образом колориметрическая шкала охватывала концентрацию от 0.00004 до 0.00096 г H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на 5 см<sup>3</sup>, т. е. от 0.008 до 0.192 г. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в литре; она позволяла быстро и с достаточной точностью определять то, что я считал содержанием перекиси водорода в листьях.

В своем исследовании о существовании перекиси водорода в растениях Вурстер утверждает, что она быстро разлагается при соприкосновении с хлорофиллом, т. е. когда раздавливаются листья; я пытался поэтому извлечь перекись водорода из листьев не путем давления, а путем мацерирования. С этой целью я употреблял в каждом опыте на 350 см<sup>2</sup> листьев (вырезанных прямоугольниками 4 × 3.5 см) 50 см<sup>3</sup> 10%-ного раствора глицерина, содержащего 0.1% серной кислоты. Последняя прибавлялась для нейтрализации щелочности среды, вызывающей быстрое разложение перекиси водорода; что касается глицерина, то он заметно способствует сохранению перекиси водорода\*. Следующий опыт иллюстрирует влияние серной кислоты и глицерина на экстракцию перекиси водорода или какого-то другого вещества, дающего с раствором двуокиси титана то же самое окрашивание.

В час дня, в ясную погоду, я собрал 100 вишневых листьев и вырезал из них 100 прямоугольников по 14 см<sup>2</sup> каждый; эти 100 прямоугольников были разделены на четыре партии, помещенные каждая в чашку емкостью

\* Я имел случай убедиться в большой устойчивости растворов перекиси водорода с глицерином, широко применявшимся как антисептическое средство.

в 150 см<sup>3</sup>. В первую я налил 50 см<sup>3</sup> воды, во вторую 50 см<sup>3</sup> 0.1%-ного раствора H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, в третью 50 см<sup>3</sup> 10%-ного глицерина и, наконец, в четвертую 50 см<sup>3</sup> 10%-ного глицерина, содержащего 0.1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Плотно закрытые чашки были помещены в темную комнату.

От времени до времени я отбирал из каждой чашки по 5 см<sup>3</sup> жидкости и переливал в пробирки, содержащие по 5 см<sup>3</sup> титанового раствора. Сравнивая каждый раз полученное окрашивание с контролем, легко было определить количество экстрагированной перекиси водорода и следить за ходом экстракции.

Полученные результаты приведены в следующей таблице:

|                    | I                                | II                                     | III                              | IV                                                              |
|--------------------|----------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
|                    | Вода                             | 0.1%<br>H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 10%<br>глицерин                  | 10% гли-<br>церин +<br>+ 0.1%<br>H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> |
|                    | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> мг | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> мг       | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> мг | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> мг                                |
| Вначале . . . . .  | 0                                | 0                                      | 0                                | 0                                                               |
| Через 2 ч. . . . . | Сомнит.<br>следи                 | Следи                                  | Следи                            | 0.04                                                            |
| » 6 » . . . . .    | Следи                            | 0.06                                   | 0.04                             | 0.24                                                            |
| » 12 » . . . . .   | 0.04                             | 0.09                                   | 0.06                             | 0.36                                                            |
| » 24 » . . . . .   | 0.04                             | 0.09                                   | 0.06                             | 0.36                                                            |

Как видно, по экстрагирующей способности подкисленный глицерин в 9 раз активнее воды, в 4 раза активнее подкисленной воды и в 6 раз активнее глицерина.

Заметив, что экстракт IV содержал через 12 часов количество перекиси водорода, которое уже можно определять по реакции с уксуснокислым ураном, я обработал 5 см<sup>3</sup> экстракта 5 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора урановой соли. Смесь приобрела коричневую окраску, оставаясь прозрачной. Через некоторое время раствор помутнел; при прибавлении уксусной кислоты коричневая окраска исчезла, и в жидкости появилась характерная желто-зеленая муть, которая получается, если прибавить следи перекиси водорода к раствору уксуснокислого урана.

Таким образом, у меня были все основания предполагать, что я действительно имел дело с перекисью водорода, экстрагированной из листьев.

Я проделал некоторое количество опытов с различными зелеными растениями, и во всех случаях находил, применяя описанный выше метод, от 0.00004 до 0.00036 г перекиси водорода на 5 см<sup>3</sup> глицеринового экстракта из 350 см<sup>2</sup> листьев. Однако, исследуя ореховые листья, я отметил столь значительную и быструю экстракцию перекиси водорода, что я предположил, что зеленые листья содержат какое-то другое вещество, дающее с двуокисью титана такую же реакцию, как и перекись водорода. Так как ореховые листья содержат большие количества таннина, я в первую очередь испытал это вещество, и действительно, прибавляя 5 см<sup>3</sup> раствора таннина к 5 см<sup>3</sup> титанового раствора, получил к своему большому разочарованию желто-коричневое окрашивание. Меняя концентрацию раствора таннина, я приготовил с титановым раствором колориметрическую шкалу, совершенно подобную той, которую я получал при прибавлении перекиси водорода к титановому раствору. Я прибавил к экстрактам из листьев разбавленный раствор окисной соли железа и без труда установил, что все они содержат более или менее значительные количества таннина.

Из этого вытекает, что окрашивание, вызванное в титановом растворе экстрактами, могло быть обусловлено присутствием в листьях таннина,

так же как и перекиси водорода. Однако реакция с уксусноокислым ураном, которую я в некоторых случаях наблюдал в экстрактах из листьев, позволяла предположить, что они содержат наряду с таннином и перекись водорода. Но, как мы сейчас увидим, эта реакция настолько ненадежна, что из полученных данных нельзя делать никаких серьезных выводов.

### 1%-НЫЙ ВОДНЫЙ РАСТВОР УКСУСНООКИСЛОГО УРАНА

Если прибавить к 1%-ному раствору уксусноокислого урана очень незначительное количество перекиси водорода, то появляется зеленовато-желтая муть, которая не исчезает при прибавлении уксусной кислоты, а медленно выпадает в виде аморфного осадка. Если количество перекиси водорода ничтожно, то помутнение появляется лишь через 24 часа. Гартлей, указавший на эту реакцию, рекомендует прибавлять для повышения чувствительности к раствору уксусноокислого урана несколько капель спирта.

Применяя эту реакцию для обнаруживания перекиси водорода в вытяжках из листьев, я наблюдал в некоторых случаях (при обработке большого количества листьев возможно меньшим количеством слегка подкисленной воды) то помутнение, которое Гартлей считает характерным для перекиси водорода. Раствор сначала окрасился в красновато-коричневый цвет, оставаясь прозрачным. По истечении некоторого времени жидкость помутнела; при прибавлении уксусной кислоты красновато-коричневое окрашивание исчезло и осталась легкая зеленовато-желтая муть.

Совершенно одинаковый результат я получил, обрабатывая уксусноокислый уран раствором таннина и прибавляя затем уксусную кислоту. Результат получается еще более четкий, если прибавить к жидкости несколько капель спирта.

Уксусноокислый уран также мутнеет в присутствии небольшого количества белка, причем помутнение не исчезает полностью при прибавлении уксусной кислоты.

Как общее правило, для обнаруживания ничтожных следов какого-либо вещества пригодны только цветные реакции; все другие реакции позволяют в лучшем случае лишь подтвердить результаты, полученные с цветными реакциями, в особенности, если приходится иметь дело с такими сложными системами, как растительные соки. По этим причинам реакция с уксусноокислым ураном почти лишена значения для обнаруживания перекиси водорода в растениях.

### ДВУХХРОМОВОКИСЛЫЙ КАЛИЙ — ЭФИР

Эта реакция слишком мало чувствительна для того, чтобы применять ее при исследовании растений на присутствие перекиси водорода; ее чувствительность едва достигает 1 на 8000. Какое бы ни было происхождение перекиси водорода в растениях, нельзя, конечно, предполагать, что растительные соки или вытяжки из листьев могут содержать ее в таких значительных количествах. К тому же я проверил непосредственно, что эта реакция, сама по себе уже мало чувствительная, становится еще значительно менее чувствительной в присутствии вытяжки из листьев или таннина. В обоих случаях таннин, повидимому, поглощает кислород перекиси водорода и препятствует появлению синего окрашивания эфира.



## ВЫВОДЫ

Данные, изложенные в настоящей работе, приводят к следующим выводам относительно присутствия и способов обнаруживания перекиси водорода в растениях:

I. Тетраметилпарафенилендиамин слишком чувствителен для того, чтобы появление окрашивания могло служить доказательством присутствия перекиси водорода (окрашивание появляется в присутствии хлористого кальция и глицерина вследствие поглощения ими кислорода и даже при взбалтывании воды на воздухе).

II. Гваяковая настойка с диастазой представляет те же неудобства, как и тетраметилпарафенилендиамин.

III. Реакция с иодистым калием, крахмалом и сернокислой закисью железа теряет в значительной степени свою чувствительность в присутствии растительных соков и экстрактов из листьев вследствие поглощения иода ненасыщенными соединениями, находящимися в них. Раствор, окрашенный в синий цвет при наличии следов перекиси водорода, обесцвечивается при прибавлении водной вытяжки из листьев.

IV. Двуокись титана в сернокислом растворе дает с раствором таннина совершенно такую же реакцию, как с перекисью водорода.

Во всех приготовленных мною вытяжках из листьев всегда можно было установить присутствие таннина.

V. Уксуснокислый уран дает с таннином и белками после прибавления уксусной кислоты такое же помутнение, как и следы перекиси водорода.

VI. Реакция с двуххромовокислым калием и эфиром сама по себе мало чувствительна и становится еще значительно менее чувствительной в присутствии вытяжки из листьев или раствора таннина.

## ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ни одна из известных реакций на перекись водорода не может дать достоверных и неоспоримых данных для обнаруживания перекиси водорода в растениях.

3 июля 1894 г.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Wurster. Ber. Dtsch. chem. Ges., **21**, 1525 (1888).
2. Вокорну. Ber. Dtsch. chem. Ges., **21**, 1848 (1888).
3. Бах. Mon. Sci., 669 (1893); настоящая книга, стр. 155.

---

**О НОВОЙ РЕАКЦИИ, ПОЗВОЛЯЮЩЕЙ ДОКАЗАТЬ  
СУЩЕСТВОВАНИЕ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА  
В ЗЕЛЕННЫХ РАСТЕНИЯХ**

[*Nouveau réactif permettant de démontrer l'existence de l'eau  
oxygénée dans les plantes*] \* [vertes]

В недавно опубликованной работе<sup>1</sup> я показал, что ни одна из общепринятых реакций на перекись водорода не позволяет сделать окончательных выводов относительно ее присутствия в зеленых растениях.

Некоторые реакции дают положительный результат, как, например, окрашивание тетраметилпарафенилендиамина, гваяковой вытяжки с диастазой, сернокислого раствора двуокиси титана и помутнение уксуснокислого урана. Необходимо, однако, отметить, что тетраметилпарафенилендиамин (реакция Вурстера) окрашивается не только перекисью водорода, но и слабосвязанным кислородом (например, поглощенным хлористым кальцием) и даже просто растворенным кислородом; гваяковая настойка с диастазой окрашивается аммиаком и другими веществами, не имеющими ничего общего с перекисями; сернокислый раствор двуокиси титана дает с таннином такое же окрашивание, как с перекисью водорода; наконец, 1%-ный раствор уксуснокислого урана так же мутнеет в присутствии таннина и белка, как и в присутствии перекиси водорода.

Что же касается реакций, дающих отрицательный результат, то реакция на иод — крахмал с сернокислой закисью железа теряет всякий смысл в присутствии ненасыщенных соединений, способных поглощать иод, которые всегда встречаются в зеленых растениях; реакция с двухромовокислым калием и эфиром, сама по себе уже недостаточно чувствительная, становится еще значительно менее чувствительной в присутствии раствора таннина.

В связи со всеми этими затруднениями я поставил себе целью найти для перекиси водорода такую реакцию, на которую не влияли бы различные вещества, находящиеся в растениях. Описанная ниже система «двухромовокислый калий — анилин — щавелевая кислота», повидимому, полностью удовлетворяет требованиям, которые мы ставим в этих специальных условиях.

В настоящей статье я привожу свойства этой новой реакции и опыты, которые я провел, пользуясь ею, для того чтобы выяснить, содержат ли зеленые растения перекись водорода или другие перекиси, оказывающие такое же действие, как перекись водорода.

---

\* Mon. sci. (4), 8, 241 (1894).

### НЕКОТОРЫЕ ДАННЫЕ О НОВОЙ РЕАКЦИИ

Заметив, что надхромовая кислота в эфирном растворе легко превращает в присутствии свободной кислоты анилин в фиолетовый краситель, я пытался использовать эту реакцию для обнаружения перекиси водорода, применяя раствор двуххромовокислого калия, к которому прибавлен анилин и кислота. Как известно, двуххромовокислый калий сам по себе способен превратить в присутствии свободной кислоты анилин в фиолетовый краситель. Однако, ввиду малой устойчивости надхромовой кислоты, можно было рассчитывать, что в очень разбавленных растворах ее действие на анилин обнаружится значительно раньше, чем действие двуххромовокислого калия. Действительно, в очень разбавленном растворе двуххромовокислого калия, содержащем анилин и щавелевую кислоту, я наблюдал фиолетово-розовое окрашивание при малейших следах перекиси водорода, в то время как в ее отсутствии раствор оставался неизменным в течение нескольких часов.

Многочисленные опыты, которые я проделал с этим новым реактивом, дали следующие результаты.

#### Разбавление раствора двуххромовокислого калия

Так как раствор двуххромовокислого калия сам по себе окрашен в красно-желтый цвет, то а priori очевидно, что для интересующей нас реакции можно применять только очень разбавленные растворы. Наилучшие результаты получаются, как я установил, с раствором, содержащим 0.03 г двуххромовокислого калия на литр: это бледножелтый раствор, в котором хорошо видно появление розового окрашивания, вызванное перекисью водорода. Раствор готовится доведением 30 см<sup>3</sup> основного раствора, содержащего 1 г на 1 л, — до 1 л.

#### Необходимое количество анилина

Количество анилина, прибавленное к раствору двуххромовокислого калия, сильно влияет на чувствительность реактива, как это видно из следующих опытов.

К десяти порциям раствора 0.003%-ного  $K_2Cr_2O_7$  я прибавил соответственно от 1 до 10 капель анилина (от 0.25 до 2.5 г на 1 л) и затем отобрал от каждого из полученных растворов дважды по 5 см<sup>3</sup>; эти пробы я налил в две серии пробирок. К каждой из пробирок первой серии я прибавил по 5 см<sup>3</sup> разбавленного раствора перекиси водорода (содержащего приблизительно 0.005%  $H_2O_2$ ) и по 1 капле 5%-ного раствора щавелевой кислоты. В пробирки второй серии я налил по 5 см<sup>3</sup> воды и по 1 капле раствора щавелевой кислоты. Отмечая в каждом случае промежуток времени до изменения окраски, я мог оценить, с одной стороны, влияние количества анилина на чувствительность реактива и, с другой стороны, влияние щавелевой кислоты в присутствии возрастающих количеств анилина.

Чтобы не обременять настоящую статью таблицами, я укажу лишь, что в пробирках второй серии (влияние щавелевой кислоты) не наблюдалось никакого изменения окраски даже через 24 часа. Что касается пробирок первой серии, то только две первые (растворы, содержащие 1 и 2 капли анилина на 200 см<sup>3</sup>, т. е. 0.25 и 0.5 г на 1 л), окрасились через 2—3 мин. Содержимое третьей окрасилось через 3 часа, четвертой — через 4 часа 40 мин. пятой — через 6 часов. Все остальные пробирки остались бесцветными.

Из этих опытов вытекает, что если количество анилина и казалось без-

различным с точки зрения действия щавелевой кислоты, то оно играет существенную роль в отношении чувствительности реактива. В растворе 0.003%  $K_2Cr_2O_7$  эта чувствительность быстро падает, если употреблять более 10 капель анилина на литр. В своих опытах я брал 5 капель анилина на 1 л раствора 0.003%-ного двухромовокислого калия.

### Влияние кислот

Влияние кислот является слабым местом этой реакции, так как в некоторых случаях кислоты могут сами обусловить окрашивание реактива, разлагая двухромовокислый калий, т. е. хромовую кислоту. Таким образом, все зависит от относительного количества двухромовокислого калия, анилина и щавелевой кислоты в растворе.

Установив предварительно, что раствору, содержащему 0.03 г  $K_2Cr_2O_7$  и 5 капель анилина на 1 л соответствует наибольшая чувствительность, я хотел выяснить далее, какая кислота и в какой пропорции дает наилучшие результаты.

С этой целью я прибавил к отдельным пробам, состоящим из 5 см<sup>3</sup> раствора двухромовокислого калия с анилином и 5 см<sup>3</sup> разбавленного раствора перекиси водорода, эквивалентные количества серной, соляной, азотной, виннокаменной, лимонной, яблочной и щавелевой кислот и отметил время, протекающее до появления розовой окраски. Оказалось, что из всех этих кислот щавелевая дает наиболее быстрые и наиболее четкие результаты.

Чтобы выяснить, какое количество этой кислоты надо прибавить к реактиву, для того чтобы выявить действие перекиси водорода, я проделал две серии опытов.

В первой серии я изучил влияние пропорции щавелевой кислоты на чувствительность реактива. С этой целью я налил в 12 пробирок по 5 см<sup>3</sup> раствора двухромовокислого калия с анилином и 5 см<sup>3</sup> разбавленного раствора перекиси водорода. Кроме того, я прибавил в пробирки возрастающие количества щавелевой кислоты, указанные в нижеследующей таблице (как и в предшествующем случае, я отмечал время до появления розового окрашивания):

| № опыта | Прибавленная щавелевая кислота (5%-ный раствор) (число капель) | Время, истекшее до появления окрашивания (мин.) |
|---------|----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| 1       | 1                                                              | 6                                               |
| 2       | 2                                                              | 4                                               |
| 3       | 3                                                              | 3                                               |
| 4       | 4                                                              | 2                                               |
| 5       | 6                                                              | 1                                               |
| 6       | 8                                                              | 1/2                                             |
| 7       | 10                                                             | Немедленное окрашивание                         |
| 8       | 12                                                             | » »                                             |
| 9       | 14                                                             | » »                                             |
| 10      | 16                                                             | » »                                             |
| 11      | 18                                                             | » »                                             |
| 12      | 20                                                             | » »                                             |

Из этого опыта вытекает, что чем больше прибавлено щавелевой кислоты, тем скорее протекает реакция и, следовательно, тем чувствительнее реактив. Однако нельзя очень повышать количество щавелевой кислоты, так как она сама может вызвать окрашивание реактива. Пришлось, сле-

довательно, определить ту пропорцию кислоты, которая может еще применяться при данном разбавлении раствора двуххромовокислого калия с анилином.

С этой целью я проделал такую же серию определений, как и предыдущая, с той только разницей, что вместо раствора перекиси водорода я прибавлял к 5 см<sup>3</sup> реактива 5 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. В параллельном опыте я подверг той же обработке 5 см<sup>3</sup> реактива без прибавления воды.

Полученные результаты приведены в нижеследующей таблице:

| № опыта | Прибавленная щавелевая кислота (5%-ный раствор) (число капель) | Время, истекшее до появления окрашивания                             |                                     |
|---------|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
|         |                                                                | 5 см <sup>3</sup> реактива + 5 см <sup>3</sup> дистиллированной воды | 5 см <sup>3</sup> реактива без воды |
| 1       | 1                                                              | 78 час.                                                              | 18 час.                             |
| 2       | 2                                                              | 36 »                                                                 | 6 »                                 |
| 3       | 3                                                              | 15 »                                                                 | 59 мин.                             |
| 4       | 4                                                              | 9 »                                                                  | 28 »                                |
| 5       | 6                                                              | 50 мин.                                                              | 15 »                                |
| 6       | 8                                                              | 48 »                                                                 | 10 »                                |
| 7       | 10                                                             | 37 »                                                                 | 7 »                                 |
| 8       | 12                                                             | 29 »                                                                 | 6 »                                 |
| 9       | 14                                                             | 25 »                                                                 | 4 »                                 |
| 10      | 16                                                             | 22 »                                                                 | 3 »                                 |
| 11      | 18                                                             | 18 »                                                                 | 2 »                                 |
| 12      | 20                                                             | 12 »                                                                 | 1 »                                 |

Эти данные показывают, что щавелевая кислота начинает оказывать на реактив быстрое действие только при сравнительно высокой концентрации (10 капель 5%-ного раствора). Следовательно, если предположить, что для реакции между перекисью водорода и системой «двуххромовокислый калий — анилин» требуется от 30 минут до 1 часа, то можно прибавлять до 8 капель щавелевой кислоты (опыт № 6) без опасения приписать перекиси водорода окрашивание, вызванное действием щавелевой кислоты на двуххромовокислый калий. В своих опытах я применяю только 1—2 капли щавелевой кислоты, т. е. нахожусь в таких условиях, когда окрашивание, вызванное щавелевой кислотой, появляется только через 78 или 36 часов.

Из этой таблицы видно также, что действие щавелевой кислоты на двуххромовокислый калий с анилином значительно замедляется при разбавлении. Так, например, в 5 см<sup>3</sup> реактива 2 капли щавелевой кислоты (опыт № 2) вызвали изменение окраски через 6 часов, в то время как при разбавлении равным объемом воды изменение окраски наступило только через 36 часов. Во всех других опытах видна такая же разница. Таким образом, эти опыты подтверждают предположение, сделанное мною в начале этого исследования, что в системе «двуххромовокислый калий — анилин — щавелевая кислота» действие последней может быть замедлено разбавлением настолько, чтобы изменение окраски, вызванное ею, не могло появиться одновременно с окрашиванием, обусловленным перекисью водорода.

### Предел чувствительности реакции

Предложенная реакция менее чувствительна, чем реакция с тетраметилпарафенилендиамином, с гваяковой настойкой и диастазой или с подистым калием и крахмалом, но значительно чувствительнее других обычных реакций на перекись водорода.

Я выяснил предел чувствительности реакции следующим образом. От 5 до 15 см<sup>3</sup> раствора перекиси водорода были доведены водой до 100 см<sup>3</sup>; точное содержание Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> определялось при помощи титрованного раствора марганцовокислого калия. Разбавляя постепенно этот раствор, я дошел до такого разведения, при котором розовое окрашивание не появляется даже через час; предшествующее разведение считалось пределом чувствительности реакции. Три определения, сделанные таким образом, дали:

|                                                                          |  |
|--------------------------------------------------------------------------|--|
| I. 0.000 68 г Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub> на 1 л, т. е. 1 на 1 470 000 |  |
| II. 0.000 74 » Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub> » 1 » » 1 » 1 350 000       |  |
| III. 0.000 80 » Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub> » 1 » » 1 » 1 250 000      |  |

---

Среднее 0.000 72 г Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> на 1 л, т. е. 1 на 1 400 000

Надо, однако, отметить, что определение предела чувствительности в колориметрических анализах имеет лишь относительное значение, так как восприятие цвета различно у разных людей и сильно зависит от степени привычки глаза.

При помощи этой новой реакции легко доказать, что при одновременном действии солнечных лучей и воздуха многочисленные органические соединения образуют перекиси, действие которых аналогично действию перекиси водорода.

Свежеперегнанные метиловый и этиловый спирт, эфир, фенол, скипидар не окрашивают двухромовокислого калия с анилином и щавелевой кислотой, но достаточно подвергнуть их в течение некоторого времени действию солнечных лучей, чтобы они немедленно стали давать характерную для перекиси водорода реакцию. Глицерин ведет себя так же, как и перечисленные выше соединения.

Любопытно отметить, что 33%-ный раствор формальдегида в метиловом спирте, хранящийся у меня в течение полутора лет и подвергавшийся от времени до времени действию рассеянного света, дает резко выраженное окрашивание с двухромовокислым калием в присутствии анилина и щавелевой кислоты. Это доказывает, что, как я уже указывал ранее<sup>2</sup>, формальдегид вполне может существовать в присутствии перекиси водорода или аналогичных перекисей, не разрушая их и не окисляясь сам.

Наконец, следует подчеркнуть, что окрашивание наблюдается только с разбавленными растворами перекиси водорода. Так, например, 5 см<sup>3</sup> 0.5%-ного раствора Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>, прибавленные к 5 см<sup>3</sup> реактива в присутствии 2 капель 5%-ного раствора щавелевой кислоты, не дали окрашивания ни непосредственно, ни через час; характерное окрашивание появляется только после разбавления водой.

### Действие окислителей и других веществ

Азотистая кислота и окислы азота не окрашивают реактива ни сами по себе, ни в присутствии щавелевой кислоты. Я не изучал действия озона, но, вероятно, он не дает положительной реакции, так же как и с системой «двухромовокислый калий — эфир».

С другой стороны, так же как и анилин, описываемый мною реактив окрашивается в присутствии гипохлоритов и хлорноватистой кислоты. Смесь хлора и хлорноватистого ангидрида, получающаяся при действии соляной кислоты, также окрашивает его в лилово-розовый цвет. Однако эти окислители вызывают окрашивание даже в отсутствии щавелевой кислоты, в отличие от перекиси водорода, которая окрашивает раствор только в присутствии щавелевой кислоты. Совокупность всех этих данных указывает, что в точно установленных условиях окрашивание раствора двухро-

мовокислого калия, содержащего анилин и щавелевую кислоту, является вполне характерной реакцией на перекись водорода.

Что касается соединений, не являющихся окислителями, то я нашел, как я уже имел случай отметить это для системы «двуххромовокислый калий — эфир», что танин уменьшает чувствительность реакции. Это необходимо принимать во внимание при исследовании на присутствие перекиси водорода жидкостей растительного происхождения.

Многочисленные другие исследованные мной вещества не оказывали действия на реактив.

### Теория реакции

В отсутствие щавелевой кислоты перекись водорода не вызывает окрашивания раствора двуххромовокислого калия с анилином ни непосредственно, ни через большой промежуток времени, даже если прибавлять ее в значительном количестве. С другой стороны, щавелевая кислота сама по себе вызывает окрашивание в не слишком продолжительный срок только в очень больших количествах. Надо прибавить 12 капель 5%-ного раствора щавелевой кислоты к 5 см<sup>3</sup> реактива, разбавленного равным объемом воды, чтобы наблюдать начало окрашивания через полчаса, в то время как в присутствии перекиси водорода достаточно одной капли. Это можно объяснить следующим образом.

Под действием перекиси водорода из двуххромовокислого калия образуется надхромовая кислота. Сама по себе эта кислота не в состоянии окислить анилин, либо потому, что она слишком устойчива для того, чтобы отдавать активный кислород окисляемому веществу, либо потому, что она образует с хромовой кислотой более или менее устойчивое соединение, например,  $CrO_3 \cdot CrO_4 = Cr_2O_7$  (аналогичное  $Mn_2O_7$ ), из которого надхромовая кислота освобождается только под действием свободной кислоты.

Как бы то ни было, образовавшаяся надхромовая кислота разлагается под действием щавелевой кислоты и действует на анилин, образуя фиолетовый краситель. В очень разбавленных растворах он окрашен в розовый, слегка лиловатый цвет.

Действие щавелевой кислоты на хромовую кислоту происходит значительно медленнее и в условиях наших опытов проявляется не ранее 36 часов.

Краситель, образующийся при действии перекиси водорода на наш реактив, по видимому, тот же самый краситель, который получается при действии избытка щавелевой кислоты и при действии гипохлоритов на анилин. Во всех трех случаях окраска исчезает через некоторое время. Эта неустойчивость красителя не позволяет приготовить колориметрическую шкалу для количественного определения перекиси водорода.

### Способ употребления нового реактива

Я считаю полезным привести здесь точное описание способа употребления нового реактива для обнаруживания перекиси водорода.

Растворяют 1 г двуххромовокислого калия в 1 л воды и затем доводят водой 30 см<sup>3</sup> до 1 л; к последнему раствору прибавляют 5 капель чистого анилина и взбалтывают, — анилин вскоре растворяется. С другой стороны, приготавливают 5%-ный раствор щавелевой кислоты, который хранят в капельнице, дающей 20 капель на 1 см<sup>3</sup>.

Чтобы произвести определение, в пробирку наливают 5 см<sup>3</sup> раствора двуххромовокислого калия с анилином и 5 см<sup>3</sup> испытуемого раствора, затем прибавляют 2 капли раствора щавелевой кислоты и взбалтывают 2—3 раза.

В присутствии перекиси водорода раствор окрашивается в лиловатозеленый цвет. В зависимости от количества перекиси водорода окрашива-

ние появляется более или менее скоро. В моих исследованиях над зелеными растениями я считал, что жидкость не содержит перекиси водорода, если окрашивание не появлялось в течение 30 мин.— 1 часа.

Для того чтобы лучше следить за изменением окраски, одновременно делают контрольный опыт с 5 см<sup>3</sup> реактива, 5 см<sup>3</sup> воды и 1 каплей раствора щавелевой кислоты. Я неоднократно имел случай убедиться, что изменение окраски этого раствора наступает только через очень продолжительный промежуток времени, даже если увеличить в 3—4 раза количество прибавленной щавелевой кислоты.

Надо еще отметить, что во всех этих опытах необходимо соблюдать строжайшую чистоту. Следы разложившегося реактива, оставшегося от предшествующего опыта, могут полностью исказить результаты.

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА В ЗЕЛЕННЫХ РАСТЕНИЯХ

Пользуясь этой новой реакцией, я вновь пытался разрешить вопрос о существовании перекиси водорода в зеленых растениях.

К сожалению, к тому времени, когда я закончил предварительное изучение реакции, было уже слишком позднее время года, для того чтобы поставить обширное исследование над растениями, находящимися в нормальных физиологических условиях. Тем не менее полученные уже мною результаты настолько определены, что я считаю желательным их опубликование.

Так как чувствительность новой реакции падает в присутствии танина, можно применять ее для стоящей передо мною цели только при условии сведения к минимуму или полного упразднения перехода танина в вытяжки из листьев.

В предыдущих опытах<sup>3</sup> я пользовался для экстрагирования перекиси водорода из зеленых листьев 10%-ным раствором глицерина, содержащим 0.1% серной кислоты, так как я нашел, что глицерин и серная кислота способствуют сохранению перекиси водорода. В интересующем нас случае этот способ экстракции неприемлем, так как, с одной стороны, серная кислота, как и другие разбавленные неорганические кислоты, вызывает разложение содержащихся в растениях глюкозидов танина с освобождением последнего и, с другой стороны, глицерин, повидимому, способствует экстракции танина.

Так как чистая вода вследствие ее легкой щелочности непригодна для экстракции перекиси водорода из листьев, я решил подкислять ее 0.1% щавелевой кислоты; это имело то преимущество, что в реакционную смесь не вводилась посторонняя кислота. Ни в одной из вытяжек, полученных с этой подкисленной водой, я не мог обнаружить присутствия танина.

Для приготовления вытяжек я выбирал здоровые, развивающиеся растения и срывал с них листья или стебли всегда в один и тот же час (полдень), тщательно выбирая яркозеленые и неповрежденные части. Листья, частично окрашенные в коричнево-красный или коричневый цвет, часто дают окрашенные вытяжки, непригодные для определения перекиси водорода при помощи упомянутого реактива.

Опыты производились следующим образом: 25 г листьев каждого сорта помещались в фарфоровую чашку емкостью в 250 см<sup>3</sup> и заливались 75 см<sup>3</sup> воды, подкисленной 0.1% щавелевой кислоты. Чтобы избежать возможного окисления под действием света, чашки, закрытые сверху, сохранялись в темной комнате. Через определенные промежутки времени от каждой вытяжки отбирались по 5 см<sup>3</sup> жидкости, которая быстро фильтровалась через фильтр и наливалась в пробирку, содержащую 5 см<sup>3</sup> раствора двухромовокислого калия с анилином. После прибавления 2 капель 5%-ного



раствора щавелевой кислоты содержимое пробирки взбалтывалось 2—3 раза и оставлялось. Если розовое окрашивание появлялось ранее чем через 1 час, я считал, что отобранная проба содержит перекись водорода. Во всех случаях делался контрольный опыт с 5 см<sup>3</sup> реактива, 5 см<sup>3</sup> подкисленной воды, в которой экстрагировались листья, и двумя каплями щавелевой кислоты. Этот контроль позволял не только легче определить по сравнению появление окрашивания в основной пробе, но и проверить, что щавелевая кислота сама по себе не вызывает окрашивания за данный промежуток времени.

Полученные результаты сведены в приведенной ниже таблице.

| Дата и состояние погоды                                     | №  | Название растений                                       | Наблюдающееся окрашивание  |                            |                            |                            |                             |
|-------------------------------------------------------------|----|---------------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
|                                                             |    |                                                         | После 1 часа мацерирования | После 2 час. мацерирования | После 4 час. мацерирования | После 6 час. мацерирования | После 27 час. мацерирования |
| 14 октября:<br>t° в 12 часов: 123°. Небо ясное<br>Ветра нет | 1  | Реза ( <i>Brassica rapa</i> ) . . . . .                 | 0                          | 0                          | Слабое                     | Слабое                     | —                           |
|                                                             | 2  | Морковь ( <i>Daucus carota</i> ) . . . . .              | 0                          | Очень слабое               | Резкое                     | Резкое                     | —                           |
|                                                             | 3  | Свекла ( <i>Beta vulgaris</i> ) . . . . .               | 0                          | Слабое                     | Очень резкое               | Очень резкое               | 0                           |
|                                                             | 4  | Люцерна ( <i>Medicago sativa</i> ) . . . . .            | 0                          | 0                          | 0                          | 0                          | 0                           |
|                                                             | 5  | Герань ( <i>Geranium rotundi folium</i> ) . . . . .     | Сомнит. следы              | Резкое                     | Очень резкое               | Очень резкое               | 0                           |
| 15 октября:<br>t° в 12 часов: 119°. Небо ясное<br>Ветер С—В | 6  | Плющ ( <i>Hedera helix</i> ) . . . . .                  | 0                          | Очень слабое               | Слабое                     | Слабое                     | 0                           |
|                                                             | 7  | Лавровишня* ( <i>Laurus cerasus</i> ) . . . . .         | 0                          | Слабое                     | Резкое                     | Резкое                     | Слабое                      |
|                                                             | 8  | Дикий цикорий ( <i>Cychorium intybus</i> ) . . . . .    | 0                          | 0                          | 0                          | 0                          | 0                           |
|                                                             | 9  | Латук ( <i>Lactuca sativa</i> ) . . . . .               | 0                          | Чрезв. слабое              | Чрезв. слабое              | 0                          | 0                           |
|                                                             | 10 | Овес ( <i>Avena sativa</i> ) . . . . .                  | 0                          | 0                          | 0                          | 0                          | 0                           |
| 16 октября:<br>t° в 12 часов: 121°. Небо ясное<br>Ветра нет | 11 | Астра . . . . .                                         | 0                          | Очень слабое               | Очень слабое               | Слабое                     | 0                           |
|                                                             | 12 | Настурция ( <i>Tropaeolum peruvianum</i> ) . . . . .    | 0                          | Слабое                     | Слабое                     | 0                          | 0                           |
|                                                             | 13 | Хризантема ( <i>Chrysanthemum balsamita</i> ) . . . . . | Очень слабое               | Резкое                     | Резкое                     | Резкое                     | Слабое                      |
|                                                             | 14 | Молочайник ( <i>Mercurialis annua</i> ) . . . . .       | Очень слабое               | Резкое                     | Очень резкое               | Резкое                     | Слабое                      |
|                                                             | 15 | Крапива ( <i>Urtica urens</i> ) . . . . .               | Очень слабое               | Яркое                      | Резко яркое                | Очень яркое                | Слабое                      |

\* Растущее на свежем воздухе.

| Число и состояние погоды                                               | №      | Название растений                                   | Наблюдающееся окрашивание  |                            |                            |                            |                             |
|------------------------------------------------------------------------|--------|-----------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
|                                                                        |        |                                                     | После 1 часа мацерирования | После 2 час. мацерирования | После 4 час. мацерирования | После 6 час. мацерирования | После 27 час. мацерирования |
| 17 октября:<br>t° в 12 часов: 114°. Небо ясное Ветра нет               | 16     | Калла* ( <i>Calla palustris</i> ) . . .             | Очень слабое               | Резкое                     | Резкое                     | Слабое                     | Очень слабое                |
|                                                                        | 17     | Бобы ( <i>Vicia Faba</i> ) . . . . .                | Очень слабое               | Слабое                     | Слабое                     | Резкое                     | Очень слабое                |
|                                                                        | 18     | Мак ( <i>Papaver rhoeas</i> ) . . . . .             | 0                          | Очень слабое               | Слабое                     | Слабое                     | 0                           |
|                                                                        | 19     | <i>Sisymbrium nasturtium</i> . . . . .              | Чрезв. слабое              | Очень слабое               | Слабое                     | Слабое                     | Слабое                      |
|                                                                        | 20     | Фиалка ( <i>Viola odorata</i> ) . . . . .           | 0                          | 0                          | 0                          | 0                          | 0                           |
| 18 октября:<br>t° в 12 часов: 91°. Сильная облачность, дождь Ветер Ю-З | 21     | Вика ( <i>Vicia</i> ) . .                           | 0                          | 0                          | Чрезв. слабое              | Чрезв. слабое              | 0                           |
|                                                                        | 22     | Лилия ( <i>Lilium bulbiferum</i> ) . .              | 0                          | 0                          | 0                          | 0                          | 0                           |
|                                                                        | 23     | Гвоздика ( <i>Dianthus caryophyllus</i> ) . . . . . | 0                          | 0                          | 0                          | 0                          | 0                           |
|                                                                        | 24     | Петрушка ( <i>Apium petroselinum</i> )              | 0                          | 0                          | 0                          | 0                          | 0                           |
|                                                                        | 25     | Клубника ( <i>Fragaria vesca</i> ) . .              | 0                          | Чрезв. слабое              | Чрезв. слабое              | Чрезв. слабое              | 0                           |
| 19 октября:<br>t° в 12 часов: 161°. Легкая облачность Ветер Ю-З        | 21 bis | Вика ( <i>Vicia</i> ) . .                           | 0                          | Чрезв. слабое              | Чрезв. слабое              | 0                          | 0                           |
|                                                                        | 22 bis | Лилия ( <i>Lilium bulbiferum</i> ) . .              | 0                          | 0                          | 0                          | 0                          | 0                           |
|                                                                        | 23 bis | Гвоздика ( <i>Dianthus caryophyllus</i> ) . . . . . | 0                          | Очень слабое               | Очень слабое               | Очень слабое               | 0                           |
|                                                                        | 24 bis | Петрушка ( <i>Apium petroselinum</i> )              | 0                          | Чрезв. слабое              | Слабое                     | Слабое                     | Слабое                      |
|                                                                        | 25 bis | Клубника ( <i>Fragaria vesca</i> ) . .              | 0                          | Очень слабое               | Слабое                     | Резкое                     | Резкое                      |

Как видно, из 25 исследованных растений в 20 случаях обнаружена перекись водорода, и в 5 случаях (№ 4, 8, 10, 20 и 22 bis) получен отрицательный результат. Даже если признать сомнительными те случаи, в которых наблюдалось «очень слабое окрашивание» (№ 9 и 21 bis), все же можно считать, что в 18 случаях из 25 присутствие перекиси водорода доказано. К тому же надо отметить, что в опытах № 20 и 22 физиологическое состояние растений было неудовлетворительным.

Вытяжки № 1, 2, 14, 15, 17 и 21 bis приобрели через 20 часов более или менее интенсивное коричневое и красно-коричневое окрашивание, не по-

\* Выращенное в комнате растение было тщательно вымыто за 4 часа до опыта и выставлено на окно на Ю-В.

зволяющее производить определение. Последний столбец таблицы показывает, что в большинстве случаев перекись водорода исчезает через 20 часов.

Так как избыток кислотности в вытяжках, обусловленный содержанием кислоты в листьях, мог вызвать окрашивание реактива даже в отсутствии перекиси водорода, то необходимо было проверить кислотность. Я определил ее в тех экстрактах, которые дали наиболее резкое окрашивание, и во всех случаях нашел, что перечисленная на щавелевую кислоту кислотность примерно равна кислотности воды, служившей для экстрагирования. Кроме того, прибавляя к контрольным опытам в два-три раза больше щавелевой кислоты, чем при экстракции, я отметил, что окрашивание в них всегда наблюдалось на несколько часов позже, чем в основном опыте. Это доказывает, что окрашивание, обусловленное экстрактом из листьев, действительно зависит от присутствия перекиси водорода.

Опыты № 21—25, произведенные 18-го октября, в дождливую и довольно холодную погоду, все дали отрицательные или сомнительные результаты. Так как на следующий день восстановилась хорошая, довольно теплая погода, я решил повторить опыт с теми же растениями; я надеялся выявить влияние температуры и интенсивности облучения на количество перекиси водорода, содержащееся в растениях (№ 21 bis — 25 bis). Опыт № 21 bis остался сомнительным, № 22 bis отрицательным, остальные три дали положительный результат.

Эти результаты показывают, что действительно существует зависимость между температурой и интенсивностью излучения, с одной стороны, и количеством перекиси водорода в растениях, — с другой. Существует ли также зависимость между количеством перекиси водорода и интенсивностью ассимиляции углекислоты растениями, т. е., другими словами, является ли перекись водорода продуктом распада углекислоты под действием солнечных лучей, как это следует из моей теории? Позднее время года не позволило поставить физиологические исследования для выяснения этого вопроса. Я рассчитываю заняться вновь этим вопросом будущей весной.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бах. C. R. Acad. Sci., Paris, **119**, 289 (1894); Mon. Sci., **8**, 572, (1894); настоящая книга, стр. 225.
2. Бах. Mon. Sci., 669 (1893); настоящая книга, стр. 155.
3. Бах. Mon. Sci., **8**, 572 (1894); настоящая книга, стр. 225.

---

## О РОЛИ ПЕРЕКИСЕЙ В ПРОЦЕССАХ МЕДЛЕННОГО ОКИСЛЕНИЯ \*

При изучении процесса ассимиляции углерода растениями<sup>1</sup> мне пришлось, между прочим, уяснить себе вопрос о предполагаемой аналогии между хлорофиллом и гемоглобином. Как известно, Ад. Бейер, которому мы обязаны столь плодотворной альдегидной теорией ассимиляции, исходил из этой аналогии, для того чтобы объяснить механизм образования муравьиного альдегида из углекислоты в зеленых частях растений. Основываясь на том, что окись углерода не разлагается растениями, Бейер предполагает, что под влиянием солнечных лучей угольный ангидрид разлагается, так же как и при действии высокой температуры, на кислород и окись углерода. Последняя соединяется с хлорофиллом, который будто бы способен давать, как и гемоглобин, соединение с окисью углерода, из которого затем под действием водорода в момент выделения образуется муравьиный альдегид и возрождается хлорофилл.

Разбирая данные, которые мы имеем в настоящее время относительно химической природы и физиологических функций хлорофилла и гемоглобина, я пришел к заключению, что никакой аналогии не существует между этими двумя веществами. Как я показал в другом месте, аналогия эта, если бы даже и существовала, не имеет никакой связи с механизмом образования муравьиного альдегида в растениях. Да и вообще, если она и представляет некоторый интерес, то разве только в том смысле, что может быть рассматриваема как отдаленное доказательство общего происхождения животного и растительного царств.

Ознакомление с физиологической функцией гемоглобина привело меня к изучению механизма окислительных процессов, совершающихся в животном организме, и процессов медленного окисления вообще. Таково происхождение предлагаемой работы.

### ОБ АКТИВИРОВАНИИ КИСЛОРОДА В ЖИВОТНОМ ОРГАНИЗМЕ

Животная жизнь характеризуется с химической точки зрения очень интенсивными окислительными процессами. Органические пищевые вещества — углеводы, жиры, белковые вещества, — которые поступают в организм, претерпевают в нем полное окисление в сравнительно короткий промежуток времени. Механизм этого окисления сильно затемняется двумя обстоятельствами: с одной стороны, вне организма органические вещества, которые служат ему пищей, почти индифферентны к свободному, или пассивному, кислороду — для окисления их надо прибегнуть к кислороду в момент выделения, или так называемому «активному» кислороду. С другой стороны, кислород, который поглощается кровью из окружаю-

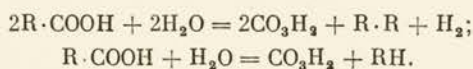
\* ЖРФХО, 29, 373 (1897).

щей атмосферы, выделяется из оксигемоглобина в молекулярном, или пассивном, состоянии. Ясно, что для совершения энергичных окислений, которые лежат в основе большинства жизненных отравлений, организм должен располагать обильным источником активного кислорода; другими словами, он должен обладать средством активировать кислород, который он извлекает из атмосферы.

Различные гипотезы были предложены для объяснения этого активирования.

Я остановлюсь только на гипотезе Гоппе-Зейлера, не только потому, что она опирается, повидимому, на серьезные опытные данные, но еще и потому, что большинство других гипотез заимствуют у нее ее основную идею.

Изучая процессы гниения, Гоппе-Зейлер<sup>2</sup> убедился, что они сопровождаются резко выраженными восстановлениями. Основываясь на том, что при гниении муравьиной, молочной и глицериновой кислот всегда выделяется свободный водород, Гоппе-Зейлер предполагает, что эти восстановления следует приписать освобождающемуся при процессе гниения водороду. Когда органическая кислота гидратируется при одновременном выделении углекислоты, как это происходит при всяком брожении, водород карбоксила должен или выделиться в свободном состоянии, или же соединиться с радикалом кислоты:



В том и другом случае водород действует как «активный» водород, т. е. как находящийся в момент выделения (*in statu nascendi*).

Наряду с восстановлением при гниении, как и при брожениях вообще, происходят и процессы окисления. Гоппе-Зейлер старается подвести последние под ту же причину, от которой зависят первые, т. е. он их приписывает действию водорода в момент выделения. По его мнению, водород в момент выделения способен восстанавливать кислород так же, как он восстанавливает всякие другие вещества. Восстановление кислорода происходит так, что водород расщепляет частицу его на атомы, причем он берет себе один атом, образуя воду, тогда как другой становится свободным и может производить самые энергичные окисления.

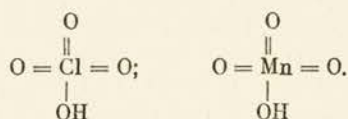
Уподобляя жизнь процессу брожения, Гоппе-Зейлер приходит к заключению, что окисления, которые совершаются в животном организме, вызываются той же причиной, что и окисления, наблюдаемые при гниении: они являются косвенным последствием восстановительного действия водорода в момент выделения. Расщепление частицы кислорода водородом в момент выделения является, таким образом, по Гоппе-Зейлеру, источником активного кислорода в организме.

Как будет показано дальше, изучение процессов медленного окисления привело меня к заключению, что активирование кислорода может происходить при посредстве *перекисей*, которые являются постоянным фактором всякого процесса медленного окисления, какова бы ни была природа окисляющегося тела.

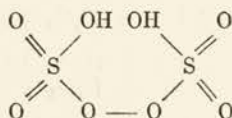
### ХАРАКТЕР И СПОСОБ ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРЕКИСЕЙ

Перекисями называют безразлично высшие степени окисления и окислы, содержащие активный кислород. Одно не вытекает necessarily из другого. Существует масса высших окислов, не содержащих вовсе активного кислорода. С другой стороны, есть вещества, например, калий, которые дают целый ряд окислов, содержащих активный кислород. В этой работе я остав-

ляю название перекисей исключительно за теми кислородными соединениями, которые функционируют как перекись водорода и характеризуются присутствием по крайней мере одной группы  $—O—O—$ . Последний критерий, повидимому, не допускает исключений. Каково бы ни было число атомов кислорода, заключающихся в известном соединении, но если только ни одна пара кислородных атомов не связана между собою, —соединение не дает реакций перекисей. Хлорная и марганцовая кислоты заключают в себе каждая по 4 атома кислорода, и если придавать хлору и марганцу их обычные атомности, то пришлось бы признать, что в этих кислотах атомы кислорода должны быть связаны между собой, а между тем они не функционируют как перекиси. Объясняется это тем, что, как уже давно допускают, хлор и марганец функционируют в этих кислотах как семивалентные элементы. Следовательно, каждый атом кислорода связан обоими своими атомностями с хлором или с марганцем:



То же применимо и к серной кислоте, в которой сера признается шестивалентной. Но в надсерной кислоте:



появляется уже группа  $—O—O—$  и приносит с собою характерные особенности перекисей.

Как увидим дальше, это определение перекисей дает в некотором смысле ключ к уразумению их способа образования при окислении химических соединений свободным кислородом при обыкновенной температуре.

Давно уже известно, что при медленном окислении некоторых тел в присутствии воды образуется перекись водорода. Но насколько мне известно, лишь один М. Траубе<sup>3</sup> стремился приписать образованию перекиси водорода определенную роль при окислении «самоокисляемых» тел пассивным кислородом.

Придя к заключению, что образование перекисей может служить источником активного кислорода в организме, я раньше всего постарался уяснить себе, насколько это образование перекисей является постоянным фактором во всяком процессе медленного окисления. С этой целью я исследовал на перекиси большое число химических веществ, которые подверглись более или менее продолжительному действию кислорода воздуха при содействии или без содействия света. Для открытия перекисей я пользовался следующими реактивами, которые дают абсолютно надежные показания.

1) Титановая кислота в сернокислом растворе. Я приготавливаю этот реактив, обрабатывая 1 г титановой кислоты 20 мл<sup>3</sup> чистой концентрированной серной кислоты, оставляя стоять в течение 24 часов, разбавляя водой до 100 мл<sup>3</sup> и фильтруя на асбесте. В присутствии перекисей бесцветный раствор принимает желто-бурую окраску.

2) Гипованадиевая кислота в сернокислом растворе. 1 г ванадиевой кислоты растворяют в 20 см<sup>3</sup> серной кислоты и разбавляют водою до 200 см<sup>3</sup>. При прибавлении воды раствор из

темнокрасного становится синим и затем принимает изумрудно-зеленый цвет. Последний раствор очень стойкий. В присутствии перекисей он окрашивается в красно-бурый цвет.

3) Комбинация «двуххромовоокислый калий — анилин — щавелевая кислота». Реактив этот был предложен мною для открытия перекисей в растениях<sup>4</sup>. Он содержит в литре 0.03 г двуххромовоокислого калия и 5 капель анилина. В присутствии перекисей и капли 5%-ного раствора щавелевой кислоты слабозелтый раствор принимает розовато-фиолетовую окраску.

Следующие вещества, из которых некоторые были взяты из старой коллекции чистых химических препаратов, дали несомненные реакции на перекиси:

Спирты: метиловый, этиловый, изопропиловый, глицерин.

Альдегиды: муравьиный, уксусный, бензойный, глюкоза.

Кетоны: ацетон.

Органические кислоты: уксусная, щавелевая, винная.

Амины: диметиланилин, диэтиланилин, фенилгидразин.

Амиды: формамид, ацетамид.

Фенолы: фенол, резорцин, пирокатехин, танин, пирогалловая кислота.

Углеводороды: бензол, петроль.

Летучие масла: терпентинное, коричное.

Алкалоиды: сернокислый хинин, уксуснокислый морфин, брунни, стрихнин.

Металлоиды: фосфор. Фосфор выставлялся на воздух в тонких пластинках, отчасти погруженных в воду.

Водород в момент выделения. (Опыт с водородом будет описан далее).

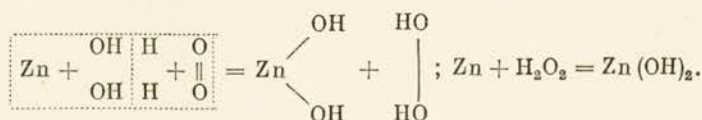
Металлы: натрий, калий, цинк, железо, медь, свинец. Натрий и калий были выставлены в тонких стружках на воздух зимою в холодную и сухую погоду. С калием мне пришлось несколько раз наблюдать образование желтых или оранжевых пятен четырехоксида. Цинк взбалтывался на воздухе с водою, остальные металлы взбалтывались с слегка подкисленной водою.

Как видно из этого, почти все классы химических веществ дают перекиси при окислении на воздухе.

Различные гипотезы были высказаны по поводу образования «перекиси водорода» при процессах медленного окисления. Не входя в подробности этих гипотез, исходящих из ни на чем не основанного предположения об окислении воды активным кислородом, я остановлюсь несколько на гипотезе Траубе, которая на первый взгляд кажется более рациональной и последовательной, чем другие.

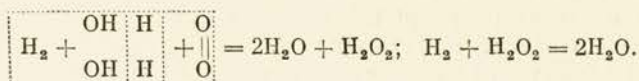
Основываясь на том, что окисление даже легкоокисляемых веществ, по-видимому, не происходит в отсутствии воды (в совершенно сухом воздухе натрий и калий сохраняют свой металлический блеск), Мориц Траубе<sup>5</sup> сводит все процессы окисления к разложению воды, частица которой, по его мнению, гораздо легче разлагается, чем частица кислорода.

Сообразно с своей валентностью окисляющиеся вещества соединяются с одним или несколькими гидроксилами, образующимися вследствие разложения соответствующего числа частиц воды, в то время как водород последних в момент выделения соединяется с частицей кислорода, давая перекись водорода. Перекись водорода затем разлагается новым количеством окисляющегося вещества, причём образуется окись. Окисление цинка, например, идет таким образом:



Следовательно, по Траубе, свободный кислород, вступая в реакцию, окисляет сначала не окисляемое вещество, а водород воды. Только затем

уже кислород соединяется с окисляемым веществом при посредстве образовавшейся перекиси водорода. Цинк не действует в отдельности ни на кислород, ни на воду. Но он способен разлагать последнюю, если средство свободного кислорода к водороду воды (?) приходит ему на помощь. Сообразно с этим Траубе допускает<sup>6</sup>, что даже окисление водорода в момент выделения идет по той же схеме:



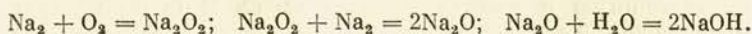
Факт, положенный в основу гипотезы Траубе, а именно, необходимость воды для процессов окисления, сам по себе верен, но следствия, которые из него выводит Траубе, вовсе не неизбежны. Можно допустить с такой же правдоподобностью, что вода играет второстепенную роль, но необходимую в том смысле, что без ее содействия реакция между окисляемым веществом и кислородом не может идти до конца. Сохраняемость металлического блеска калием и натрием в сухом воздухе зависит, очевидно, от того, что они покрываются в этих условиях тонким слоем окиси (скорее, перекиси), которая защищает металл от дальнейшего действия кислорода. Слой этот может быть так тонок, что металлический блеск только слабо изменяется им. Мне кажется, впрочем, что сам Траубе доводит гипотезу *ad absurdum* допущением, что вода необходима для окисления водорода. Если, как он объяснил это по поводу окисления цинка, металл может разлагать воду лишь в том случае, когда средство свободного кислорода к водороду воды приходит ему на помощь, то то же рассуждение, примененное к окислению водорода, приведет нас к заключению, что свободный кислород имеет более средства к водороду воды, чем к водороду в момент выделения и что последний разлагает воду с выделением водорода. Надо полагать, что если присутствие воды и необходимо для окисления водорода, то никак не в том смысле, в каком это признает Траубе.

На мой взгляд, процессы медленного окисления и наблюдаемое при них образование «перекиси водорода» могут быть объяснены гораздо проще.

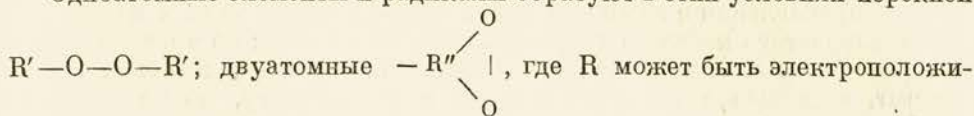
Свободный, или так называемый молекулярный, кислород  $\text{O}=\text{O}$ , будучи веществом весьма пассивным, может вступить в соединения лишь в том случае, когда энергия, необходимая для разъединения его атомов, сообщается ему извне. При трудноокисляемых веществах, т. е. таких, которые находятся в устойчивом химическом равновесии и не обладают запасом свободной энергии, содействие посторонней энергии — теплоты, света, электричества — необходимо для совершения окисления. Но когда дело идет о легкоокисляемых веществах, которые находятся в неустойчивом равновесии и атомы которых обладают сильным колебательным движением, то собственной энергии вещества, соприкасающегося с кислородом, может быть достаточно для того, чтобы вывести последний из пассивного состояния. Переход пассивного кислорода в активный нельзя себе представить иначе, как в виде распада его частицы, разрыва связей, соединяющих его атомы в частицу. Ясно, что для разрыва одной из этих связей и превращения  $\text{O}=\text{O}$  в  $-\text{O}-\text{O}-$  нужно меньше энергии, чем для разрыва обеих связей и превращения  $\text{O}=\text{O}$  в  $-\text{O}-$  и  $-\text{O}-$ . Так как свободная энергия окисляющегося вещества по необходимости ограничена, то при окислении пассивным кислородом чаще всего представится первый случай, как требующий меньшей затраты энергии. Из этого следует, что когда вещество окисляется на воздухе в силу собственной своей энергии, оно фиксирует сначала группу  $-\text{O}-\text{O}-$ , т. е. образует сразу перекись. Только затем уже



происходит, под влиянием нового количества окисляемого вещества, разрыв второй связи, еще соединяющей атомы первоначальной частицы кислорода, и превращение перекиси в окись:



Одноатомные элементы и радикалы образуют в этих условиях перекиси

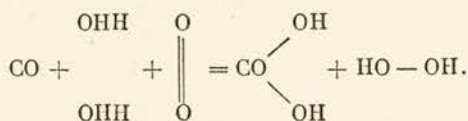


тельным или электроотрицательным. Кроме перекисей этого типа, могут еще образоваться путем соединения двух неполных групп  $\text{R}'-\text{O}-\text{O}-$  и  $-\text{O}-\text{O}-\text{R}'$  и перекиси типа  $\text{R}'-\text{O}-\text{O}-\text{O}-\text{O}-\text{R}'$ , представителем которых является давно известная четырехокись калия  $\text{K}-\text{O}-\text{O}-\text{O}-\text{O}-\text{K}$ .

Таким образом, образование перекисей и, косвенно, перекиси водорода при окислении различных химических веществ объясняется само собою, если допустить, что частица кислорода не сразу расщепляется на атомы, но что последние остаются еще связанными между собою одной атомностью. Соединяясь с окисляющимся веществом, такая не вполне диссоциированная частица кислорода неизбежно должна давать перекись.

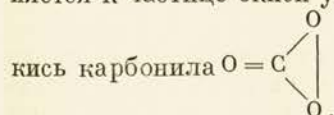
Когда окисление совершается при высокой температуре, т. е. когда происходит быстрое сгорание, частицы кислорода находятся большей частью в вполне диссоциированном состоянии, и потому окисление может давать непосредственно окиси. Но там, где температура почему-либо менее высока, группы  $-\text{O}-\text{O}-$  могут уцелеть и давать перекиси. Если направить пламя газовой горелки, водорода или окиси углерода в фарфоровую чашку, хорошо охлажденную и содержащую немного воды, последняя насыщается продуктом, который дает все реакции перекисей.

Считаю интересным дать здесь несколько указаний насчет перекиси, которая образуется при горении окиси углерода. По Траубе<sup>6</sup>, перекись эта — все та же перекись водорода, которая образуется по его излюбленной схеме:



Мне кажется, что ход окисления окиси углерода при высокой температуре объясняется гораздо проще с той точки зрения, на которой я стою.

Если тепловая энергия пламени достаточно велика для того, чтобы расщепить частицу кислорода на атомы, частица окиси углерода может сразу соединиться с атомом кислорода и дать угольный ангидрид, или окись карбонила  $\text{O}=\text{C}=\text{O}$ . Но в более холодных частях пламени частица кислорода диссоциируется не вполне, и группа  $-\text{O}-\text{O}-$  присоединяется к частице окиси углерода, давая надугольный ангидрид, или пере-



Приписывая большое значение роли, которую перекись эта играет в ассимиляции углерода растениями и, может быть, также в окислительных процессах, совершающихся в животном организме, я давно уже стараюсь найти какую-нибудь реакцию, которая позволила бы отличать перекись карбонила от других перекисей. До сих пор я еще не достиг своей цели;

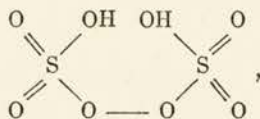
тем не менее считаю нелишним сообщить полученные мною результаты.

В моих опытах я направлял пламя окиси углерода в фарфоровую чашку, поставленную в охлаждающую смесь и содержащую немного воды, и к полученной жидкости прибавлял различные вещества с целью получить какую-нибудь характерную реакцию окрашивания. Оказалось, что при прибавлении к жидкости капли слабого едкого кали и капли раствора хлористого кобальта получался зеленый раствор: по прошествии некоторого времени из него осаждался зеленый же осадок, который, будучи промыт, содержал активный кислород и угольную кислоту, но не заключал в себе калия. Такой же точно раствор и осадок я получил, насыщая угольным ангидридом раствор перекиси водорода и прибавляя затем к жидкости едкого кали и хлористого кобальта. Казалось вполне вероятным, что зеленый осадок был надугольноокислый кобальт.

Недавно Констан и Ганзен открыли способ приготовления *надугольноокислого калия* в больших количествах посредством электролиза концентрированных и хорошо охлажденных растворов угольного калия. Благодаря любезности Констан, который прислал мне некоторое количество своего продукта, я мог сравнить реакцию надугольноокислого калия с реакциями продукта окисления окиси углерода. Оказалось, что с хлористым кобальтом надугольноокислый калий дает зеленый осадок, который, будучи промыт ледяной водой и высушен в безвоздушном пространстве, представляет темнозеленую массу с блестящим раковистым изломом, содержащую активный кислород и угольный ангидрид, но не заключающую в себе калия. Вследствие большой непрочности этого соединения я до сих пор не получил еще точных аналитических данных, точно так же как раньше<sup>7</sup> я не мог прийти к точным результатам с надугольноокислым натрием. Но мне кажется, что имеется серьезное основание предполагать, что перекись, которая образуется при горении окиси углерода, и есть перекись карбонила.

Прибавлю еще несколько слов относительно строения надугольной кислоты. Констан и Ганзен приписывают своему *перкарбонату* формулу  $C_2O_6K_2$ , вероятно, по аналогии с надсерными солями, ибо до сих пор они еще не получили своего продукта в чистом виде.

Так как надсерной кислоте дают формулу:



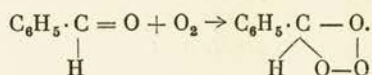
то, по мысли Констан и Ганзена, перкарбонат соответствует формуле:



Но, как показал Траубе<sup>8</sup>, надсерная кислота — это соединение перекиси сульфурила с серной кислотой. Если надсерную кислоту обрабатывать баритовой водой, осаждается серноокислый барий и выделяется свободный кислород. Если же действовать надсерной кислотой на фосфорнокислый барий, то осаждается серноокислый барий, а перекись сульфурила остается растворенной в освобожденной фосфорной кислоте. Фильтруя фосфорнокислый раствор и определяя в нем активный кислород и  $SO_3$ , Траубе нашел между ними точное соотношение 1 : 5.

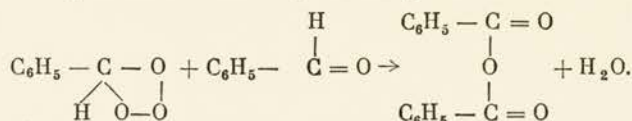


как показал еще Шенбейн, характеризуется легким образованием перекисей:

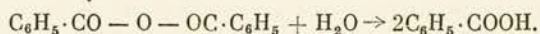


Присоединение кислорода может происходить в нем только через разрыв двойной связи в карбониле.

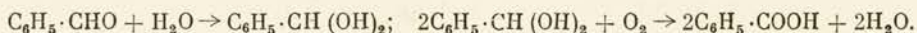
В следующей фазе перекись эта действует на новую частицу альдегида, причем активный кислород окисляет водород альдегидных групп, и в результате, как и при окислении натрия, получается окись:



В третьей фазе образовавшаяся окись — бензойный ангидрид — присоединяет к себе частицу воды и дает гидрат, т. е. две частицы бензойной кислоты:



Замечу мимоходом, что такой ход окисления альдегидов, который соответствует общему типу медленных окислений, кажется гораздо более правдоподобным, чем тот, который обыкновенно принимают. Предполагается, что альдегид присоединяет к себе сначала частицу воды и затем уже происходит окисление двух водородов:



Или еще допускают (Нассе), что альдегид сначала разлагает воду, присоединяя к себе гидроксил и освобождая атом водорода, который вместе с водородом альдегидной группы окисляется кислородом:



Первый случай предполагает окисление гидроксильного водорода, а второй — разложение воды альдегидом. И тот и другой одинаково невероятны. Итак, при избытке окисляемого вещества образовавшиеся перекиси разрушаются, давая окиси. Но, содержа активный кислород, перекиси обладают настолько большой окислительной энергией, что, находясь в присутствии трудноокисляемых веществ, они окисляют их в такой же мере, как и легкоокисляемые вещества. Индиго в кислом растворе принадлежит к числу веществ, на которые пассивный кислород не оказывает никакого действия. Но если пропускать ток воздуха через индиговый раствор, к которому предварительно было прибавлено немного чистого и свежеперегнанного скипидара, то индиго быстро окисляется в изатин. В одном опыте я пропускал ток чистого воздуха через 15 см<sup>3</sup> 0.1%-ного индигового раствора, смешанного с 2 см<sup>3</sup> чистого скипидара. По прошествии 25 минут индиго был вполне окислен. Бензойный альдегид производит то же действие, что и скипидар. Водород, выделяющийся из водородистого палладия, играет при окислении индиго пассивным кислородом ту же роль, что и названные выше легкоокисляемые вещества. Гоппе-Зейлер рассматривает этот последний факт, как неопровержимое доказательство в пользу его теории расщепления частицы кислорода водородом в момент выделения.

Роль, которую легкоокисляемые вещества играют при окислении пассивным кислородом трудноокисляемых веществ, допускает только два объяснения.

Или надо допустить, что легкоокисляемые вещества образуют на воздухе перекиси, которые действуют своим активным кислородом на трудноокисляемые вещества, как было указано выше.

Или же надо принять с Гоппе-Зейлером, что легкоокисляемые вещества расщепляют, как водород в момент выделения, частицу кислорода, причем берут себе один атом для образования окиси, тогда как другой атом — настоящий активный кислород — приобретает способность производить самые энергичные окисления.

Внимательное изучение опытов, на которых зиждется гипотеза Гоппе-Зейлера, привело меня к заключению, что они не только не убедительны, но скорее прямо противоречат его гипотезе. Приводим эти опыты.

Металлический натрий, оставленный на воздухе в присутствии петролейного эфира (фракция 65—75°), окисляет последний в кислоты жирного ряда. Водород, выделяющийся из водородистого палладия, окисляясь, может вызвать самые энергичные окисления: он окисляет индиго в изатин, аммиак в азотистую кислоту, бензол в фенол, выделяет иод из иодистого калия и др. Наибольшее значение для гипотезы Гоппе-Зейлера имеет опыт с водородистым палладием и индиго, так как он послужил темой длительного научного спора между Гоппе-Зейлером<sup>9</sup> и Траубе<sup>10</sup>, спора, из которого победителем вышел несомненно первый. В течение этого спора опыт этот многократно повторялся и был, наконец, поставлен в такие условия, что заключения Гоппе-Зейлера казались неопровержимыми.

По поводу окисления индиго кислородом воздуха в присутствии водородистого палладия Траубе заметил, что Гоппе-Зейлер упустил из вида очень важный факт, а именно, что водород в момент выделения соединяется с кислородом, образуя перекись водорода, которая и могла произвести окисления, приписываемые Гоппе-Зейлером свободным атомам кислорода.

На это возражение Гоппе-Зейлер ответил рядом метких аргументов и опытов. Он прежде всего отметил, что перекись водорода — вещество сравнительно пассивное, которое даже в отдаленной степени не обладает той окислительной энергией, которая характеризует настоящий активный кислород. В очень слабых растворах перекись водорода и совсем не действует на индиго. Если принять во внимание, что палладий разлагает перекись водорода с выделением *пассивного* кислорода, то никак нельзя допустить, чтобы эта перекись могла окислить индиго в вышеупомянутом опыте. К тому же Гоппе-Зейлер вообще убедился, что сколько бы ни взбалтывали водородистый палладий с водою на воздухе, количество образующейся перекиси водорода обыкновенно не превышает 2 мг на 1 л. Максимум, который он когда-либо получил, выбрав самые благоприятные условия, был 6 мг на 1 л. Очевидно, не это ничтожное количество перекиси водорода могло окислить индиго.

Продолжая свои исследования, Гоппе-Зейлер показал в очень красивом опыте, что окисление индиго обусловливается не количеством перекиси водорода, а количеством водорода, выделяющегося из палладия. Помещая пластинки палладия, более или менее насыщенные водородом, в растворы индиго, к которым были предварительно прибавлены различные (минимальные) количества перекиси водорода, он заметил, что эти последние не оказывали никакого действия на быстроту окисления. Но когда он прокаливал пластинки палладия на воздухе, раньше чем внести их в растворы индиго, то, несмотря на присутствие перекиси водорода, окисления не происходило.

Траубе должен был признать, что перекись водорода не могла окислить индиго в опыте Гоппе-Зейлера. Он постарался обойти это затруднение предположением, что палладий играет по отношению к перекиси водорода роль «активатора» кислорода. Однако опыты, которыми он думал подтвер-

дить свою мысль, были очень запутаны и малоубедительны, тогда как опыты Гоппе-Зейлера казались точными и отчетливыми.

Придя в моей работе к этому пункту, я оказался перед альтернативой — признать гипотезу Гоппе-Зейлера со всеми ее последствиями или же убедиться, что приведенные факты допускают другое объяснение, чем то, которое дает им Гоппе-Зейлер. Разбирая значение каждого из факторов в опыте Гоппе-Зейлера, я попал на путь, который привел меня к настоящему решению задачи. Факторов этих было пять: индиго, перекись водорода, палладий, водород в момент выделения и кислород.

Результат, полученный Гоппе-Зейлером, нельзя было приписать каким-нибудь особым свойствам окисляемого вещества — *индиго*, которое он употреблял, ибо окислительное действие водорода в момент выделения сказалось и на других трудноокисляемых веществах: аммиаке, бензоле и др.

Что касается *перекиси водорода*, то можно было возразить, что перекись, образующаяся при окислении водорода в момент выделения, обладает, может быть, другими свойствами, чем продажная перекись водорода, употребленная Гоппе-Зейлером. Но за отсутствием доказательств в пользу этого предположения пришлось оставить в стороне и перекись водорода.

*Палладий* в опыте Гоппе-Зейлера функционировал, очевидно, только как источник водорода в момент выделения, ибо предварительно прокаленный палладий не оказывал никакого действия на индиго в присутствии или отсутствии перекиси водорода.

Центр тяжести опыта лежал, таким образом, только во взаимодействии двух остальных факторов — *кислорода* и *водорода в момент выделения*. Каковы условия этого взаимодействия? Гоппе-Зейлер приводит эти условия в одной из заметок<sup>11</sup>, напечатанных в ответ на нападки Траубе:

1) окисление индиго прекращалось, как только водород переставал выделяться; 2) окисления не происходило, когда водород выделялся чересчур быстро, — водород в этом случае не встречает достаточного количества кислорода; 3) окисление было наиболее быстрым, когда водород выделялся медленно и находился в присутствии *большого избытка кислорода*.

Последний пункт навел меня на мысль, что все факты, приведенные Гоппе-Зейлером, отлично объясняются с моей точки зрения, если только допустить, что, окисляясь, *водород в момент выделения может давать не только двуокись водорода, но еще и высшие перекиси*.

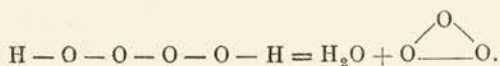
Существование высших перекисей водорода может считаться если не абсолютно доказанным, то во всяком случае в высшей степени вероятным.

Действуя перекисью водорода на раствор марганцовокислого калия при низкой температуре ( $-12^{\circ}$ ), Бертело<sup>12</sup> заметил, что раствор обесцветился *без всякого выделения кислорода*; но как только температура поднялась, кислород стал бурно выделяться. Бертело объясняет это явление образованием триоксида водорода  $H_2O_3$ , которая устойчива при низкой температуре, но разлагается при более высоких температурах. Образование этой триоксида в высшей степени удовлетворительно объясняет взаимное восстановление перекиси водорода и марганцовокислого калия.

Недавно Брюль<sup>13</sup> несколько неожиданно изолировал вещество, которое по своим свойствам могло быть только высшей перекисью водорода. Как известно, перегоняя в безвоздушном пространстве растворы перекиси водорода, можно получить почти безводную перекись. Можно также получить очень концентрированные растворы  $H_2O_2$ , извлекая эфиром продажную перекись водорода и перегоняя эфирные вытяжки в безвоздушном пространстве. Имея в своем распоряжении 50%-ный раствор перекиси водорода, Брюль подверг ее снова систематической обработке эфиром и перегонке. При перегонке выделялся в больших количествах газ, который

оказался озоном. В конце операции Брюль получил около 2 см<sup>3</sup> густой маслянистой жидкости, бесцветной, без запаха и нелетучей даже в струе кислорода при 100°. Платиновой пластинкой Брюль взял несколько капель жидкости, не вызвав ее разложения, но когда он притронулся к ней неоплавленной стеклянной палочкой, произошел страшный взрыв. Так как даже безводная перекись водорода абсолютно не взрывчата и так как вещество, полученное Брюлем, гораздо менее летуче, чем двуокись, то Брюль уверен, что он имел дело с высшей перекисью водорода. Он объясняет образование ее действием эфира. По моему мнению, она заранее существовала в продажной перекиси водорода и происходила от разложения трех- или четырехоксида бария, которая образовалась наряду с двуокисью при накаливании барита в струе воздуха, Брюль же только отделил ее от воды и двуокиси водорода, и вот почему я так думаю: летучесть кислородных соединений водорода, повидимому, уменьшается с увеличением числа атомов кислорода. Вода более летуча, чем перекись водорода, а последняя, в свою очередь, более летуча, чем вещество, полученное Брюлем. С другой стороны, растворимость в эфире кислородных соединений водорода идет в обратном порядке, т. е. она увеличивается с увеличением числа атомов кислорода. Вода мало растворима в эфире, перекись водорода хорошо растворима, а вещество, полученное Брюлем, должно быть еще более растворимо. Ясно, что при систематическом извлечении эфиром больших количеств продажной перекиси водорода и перегонке эфирных вытяжек в остатке от перекиси неизбежно должна была накапливаться высшая перекись водорода, — этим и объясняется результат, полученный Брюлем.

То, что при перегонке эфирного раствора выделился озон, делает весьма вероятным предположение, что перекись, которую получил Брюль, была четырехокисью водорода, аналогичной четырехокиси калия. Действительно, четырехокись водорода, которая, как озон, должна содержать один атом активного кислорода, разлагается, вероятнее всего, по уравнению\*:



Все эти факты показывают, что я имел некоторое основание предполагать, что при окислении водорода в момент выделения могла образоваться высшая перекись, а именно, четырехокись водорода  $\text{H}-\text{O}-\text{O}-\text{O}-\text{O}-\text{H}$ , происходящая от соединения двух неполных групп  $\text{H}-\text{O}-\text{O}-$  и  $-\text{O}-\text{O}-\text{H}$ . Если допустить, что именно эта перекись произвела окисления, замеченные Гоппе-Зейлером, то становится понятным, почему нужен был избыток кислорода для окисления индиго.

Чтобы проверить на опыте мое предположение, мне нужно было доказать, что продукты окисления водорода, выделяющегося из водородистого палладия, могут точно так же окислить индиго, как и сам водород в момент выделения в присутствии кислорода. С этой целью я повторил опыт Гоппе-Зейлера, разбив его на две фазы: 1) окисление водорода в момент выделения; 2) окисление индиго продуктами окисления водорода.

Раньше чем приступить к этим опытам, я счел нужным уяснить себе действие перекиси водорода на индиго. Гоппе-Зейлер не дает никаких точных указаний на этот счет. Он говорит неопределенно об «очень разбавленных» растворах перекиси водорода, которые не оказывают никакого

\* Вообще образование озона в процессах медленного окисления, например, при окислении фосфора, объясняется, на мой взгляд, гораздо легче распадом высших перекисей, содержащих по меньшей мере цепь  $-\text{O}-\text{O}-\text{O}-\text{O}-$  (один атом кислорода должен остаться при окисляющемся теле), чем окислением частицы кислорода, неизвестно чем вызванным.

действия на «очень разбавленные же» растворы индиго. Было важно определить пункт, где прекращается действие перекиси водорода на индиго.

Исходя из раствора продажной перекиси водорода, содержащей 2.69%  $H_2O_2$ , я приготовил ряд все более и более разбавленных растворов. От каждого раствора я отлил в пробирку  $15\text{ см}^3$ , прибавил  $1\text{ см}^3$  0.1%-ного раствора индиго и отметил, по возможности, точно время, прстекшее до перемены первоначального цвета растворов и до окончательного окисления индиго. В другом опыте я взял такие же растворы, но перекись водорода я сам приготовил из чистой (осажденной) перекиси бария. Привожу полученные мною результаты:

| $H_2O_2$<br>(г в 1 л) | Время, протекшее до перемены первоначального цвета |                 | Время, протекшее до полного окисления индиго |                      |
|-----------------------|----------------------------------------------------|-----------------|----------------------------------------------|----------------------|
|                       | Продажная $H_2O_2$                                 | Чистая $H_2O_2$ | Продажная $H_2O_2$                           | Чистая $H_2O_2$      |
| 0.0052                | 3 ч. — м.                                          | 3 ч. 20 м.      | Раствор не окислился                         | Раствор не окислился |
| 0.0105                | 2 » 15 »                                           | 2 » 5 »         | То же                                        | То же                |
| 0.0210                | 1 » 45 »                                           | 1 » 20 »        | 8 ч. 15 м.                                   | 11 ч. 30 м.          |
| 0.0420                | — » 45 »                                           | — » 45 »        | 6 » 45 »                                     | 8 » 30 »             |
| 0.0840                | — » 30 »                                           | — » 35 »        | 4 » 30 »                                     | 5 » 30 »             |
| 0.1681                | — » 20 »                                           | — » 25 »        | 2 » 45 »                                     | 2 » 35 »             |
| 0.3362                | — » 10 »                                           | — » 15 »        | 1 » 10 »                                     | 1 » 15 »             |
| 0.6725                | — » 6 »                                            | — » 8 »         | — » 33 »                                     | — » 36 »             |
| 1.3450                | — » 4 »                                            | — » 7 »         | — » 21 »                                     | — » 22 »             |
| 2.6900                | — » 1 »                                            | — » 1 »         | — » 16 »                                     | — » 17 »             |

Из этих опытов следует, что действие перекиси водорода на индиго тем медленнее, чем меньше растворы содержат  $H_2O_2$ . Растворы, содержащие меньше 0.010 г  $H_2O_2$  на 1 л, повидимому, совсем не действуют на индиго.

Установив этот пункт, я приступил к опыту с водородистым палладием и индиго. Вначале я старался изолировать продукты окисления водорода, пропуская ток *чистого* воздуха в баритовую воду, в которую я поставил пластинку водородистого палладия. Действительно, образовался белый осадок, который давал все реакции на перекиси. Полученный продукт быстро окислял индиго, но результат был недостаточно отчетлив по следующим причинам: во-первых, баритовая вода уже сама действует на индиго, окисляя одну половину его и восстанавливая другую; во-вторых, как я убедился опытом, едкий барит содержит довольно значительное количество перекиси. Вследствие этого я избрал другой путь, который и привел меня к намеченной цели.

Принимая во внимание, что опыты эти имеют капитальное значение для решения вопроса, который нас занимает, считаю необходимым описать их подробнее. Тонкий лист палладия, который я употребил для опыта, весил 2.85 г и имел около 12 см в длину и 4 см в ширину. Чтобы приготовить водородистое соединение, я нагревал в течение полутора часов до начала красного каления лист в тугоплавкой трубке, через которую пропусклся ток чистого водорода. Водород готовился из чистого (абсолютно свободного от мышьяка) цинка и чистой серной кислоты, разбавленной пятью объемами воды. После полуторачасового нагревания водородистый палладий охлаждался в струе водорода, причем обращалось внимание на то, чтобы давление водорода не уменьшалось к концу опыта. Свернутый в трубку лист вставлялся затем в длинную и узкую пробирку, содержащую



15 см<sup>3</sup> чистой воды, подкисленной серной кислотой. Пробирка закрывалась пробкой с отводной и приводной трубками; последняя была оттянута в капилляр, так что воздух входил в воду в виде мельчайших пузырьков. Пробирка помещалась в ледяную или холодную воду (в моих опытах температура не превышала +6°) и через нее пропускался ток воздуха, промытого в едком кали. По прошествии часа палладий вынимался из пробирки и к воде, содержавшей в растворе продукты окисления водорода, приливался 1 см<sup>3</sup> 0.1%-ного раствора индиго, и наблюдалось время, протекавшее до полного окисления индиго. Индиговый раствор был приготовлен растворением чистого продажного индиго (от Мерка в Дармштадте) в 10 частях дымящей серной кислоты и прибавлением воды в количестве, необходимом для получения 0.1%-ного раствора. Одновременно с главным опытом я всякий раз делал проверочный опыт, пропуская ток воздуха в подкисленную воду, но без водородистого палладия, и прибавляя затем 1 см<sup>3</sup> индигового раствора.

В десятке опытов, таким образом проведенных, я неизменно находил, что *вода, содержавшая продукты окисления водорода в момент выделения, окисляла индиго без помощи водородистого палладия*. Индиговый раствор менял цвет по прошествии 5—20 мин. после прибавления и окислялся в изатин по прошествии 30 мин. — 1 ч. 10 м. В проверочных опытах индиговый раствор оставался без всякого изменения.

Очевидно, что после удаления водородистого палладия не могло быть ни выделения водорода, ни расщепления частиц кислорода. А так как нелепо было бы предположить, что свободные атомы кислорода остались в воде, в которой был раньше водородистый палладий, то необходимо было прийти к заключению, что *окисление индиго вызвали продукты окисления водорода — определенные химические соединения, а не свободные атомы кислорода*.

Однако в моих опытах могла заключаться ошибка вот какого рода: Бунзен показал, что при горении водорода на воздухе образуются небольшие количества азотистой кислоты. Если бы и при медленном окислении на воздухе водорода в момент выделения образовывалась азотистая кислота, то она тоже могла бы вызвать окисление индиго. Чтобы проверить это, я окислял водород, как было указано выше, и с водой, содержавшей продукты окисления, проделал реакцию на азотистую кислоту. Последней не оказалось.

Опыты эти с полной несомненностью показывают, что гипотеза Гоппе-Зейлера не соответствует фактам. Но каковы продукты окисления водорода, вызвавшие окисление индиго? Бросив взгляд на вышеприведенную таблицу, мы находим, что для изменения цвета индигового раствора в промежуток времени от 5 до 20 мин. и окисления индиго в 30 мин. — 1 ч. 10 м. нужно употребить растворы перекиси водорода, содержащие 0.6725—0.3362 г в 1 л; максимум же, который Гоппе-Зейлер когда-либо получил, взбалтывая на воздухе водородистый палладий с водою, не превышал 0.006 г на 1 л. Я сам нашел несколько более перекиси водорода, а именно 0.012—0.018 г на 1 л. Но даже эти количества очень далеки от 0.3362—0.6725 г, необходимых для получения одинакового окислительного эффекта.

Как объяснить разницу между количеством Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>, найденной при анализе, и тем окислительным действием, которое она произвела? Разница эта может быть объяснена только образованием высших перекисей водорода, а именно, четырёхоксида.

В своих опытах Гоппе-Зейлер определял перекись водорода по обыкновенному способу, т. е. посредством марганцовокислого калия. Мои определения были тоже сделаны по этом способу. При титровании перекиси водорода раствором КМnО<sub>4</sub> всякий атом кислорода, выделенный последним,

соответствует одной частице  $H_2O_2$ , т. е. одному атому активного кислорода. Предположим теперь, что титруется не двуокись водорода, а четырехокись. Последняя, содержа, как озон, только один атом активного кислорода, будет действовать на марганцовокислый калий этим одним атомом, так как два другие атома кислорода соединятся в частицу при самом начале разложения.

Из этого следует, что титрование раствором  $KMnO_4$  дает такие же результаты с  $H_2O_2$ , как и с  $H_2O_4$ . А между тем последняя должна обладать гораздо большей окислительной энергией, чем первая.

Наставив на разнице, которая существует в смысле окислительной энергии между перекисью водорода и активным кислородом (свободными атомами), Гоппе-Зейлер<sup>14</sup> говорит, что, будучи соединением предельным, перекись водорода по необходимости должна обладать меньшей энергией, чем свободные атомы. Мне кажется, что предельность перекиси водорода здесь ровно не при чем. Озон настолько же предельное соединение, как и перекись водорода, что не мешает ему, однако, быть одним из самых энергичных окислителей. Причина необыкновенной активности озона заключается, вероятно, в его строении, в силу которого атом активного кислорода связан с двумя другими атомами кислорода.

Четырехокись водорода  $H-O-O-O-O-H$ , которая, подобно озону, заключает группу  $-O-O-O-$ , должна, по аналогии, обладать большой активностью. Вот почему продукты окисления водорода в момент выделения, содержа мало активного кислорода, производят, однако, сравнительно значительное окислительное действие.

Конечно, как и расщепление частицы кислорода водородом в момент выделения, образование четырехокси водорода есть только гипотеза. Но она имеет перед гипотезой Гоппе-Зейлера то преимущество, что она опирается на очень серьезные аналогии и находится в соответствии с фактами, которые никакой другой гипотезой объяснены быть не могут\*.

### О МЕХАНИЗМЕ ОКИСЛЕНИЙ, ПРОИСХОДЯЩИХ В ЖИВОТНОМ ОРГАНИЗМЕ

Сопоставляя вышеизложенные факты и соображения, — какие же выводы мы можем сделать из них по отношению к механизму окислений, происходящих в животном организме?

Заметим прежде всего, что эти окисления совершаются всегда при избытке кислорода. По Сеченову, артериальная кровь человека содержит 21.2% по объему кислорода. Так как количество крови у взрослого человека может быть принято за 5—6 л, то количество кислорода, который она приносит организму при всяком обороте, превышает 1 л. Кровь делает два оборота в минуту. Следовательно, в 24 часа она доставляет организму около 3000 л кислорода\*\*. К такому же приблизительно результату можно прийти, вычисляя количество кислорода на основании количества гемоглобина в крови и поглотительной способности последнего по отношению к кислороду.

\* Замечу, что четырехокись водорода, по всей вероятности, могла бы быть приготовлена в больших количествах разложением сухой и хорошо охлажденной четырехокси калия сухим хлористоводородным газом в эфирном растворе:  $K_2O_4 + 2HCl = 2KCl + H_2O_4$ . Моя лаборатория, к сожалению, непригодна к такого рода работам. Тем, кто желал бы заняться приготовлением  $H_2O_4$ , напомним о необходимости некоторых предосторожностей [см. В г ü h l, Ber. Dtsch. chem. Ges., 2847 (1895)].

\*\* Само собою разумеется, цифры эти только грубо приближительны.

В том виде, в каком кислород выделяется из оксигемоглобина, он не действует на органические пищевые вещества — углеводы, жиры, белки, которые поступают в организм: он должен быть раньше активирован. Это активирование может происходить при посредстве легкоокисляемых веществ.

Обыкновенно принимают, что под влиянием известных агентов, функционирующих как ферменты, пищевые вещества распадаются в крови на легкоокисляемую и трудноокисляемую части. Александр Шмидт показал, что кровь удушенных животных поглощает кислород в гораздо большей степени, чем нормальная венозная кровь. Он выводит из этого заключение, что в крови постоянно образуются легкоокисляемые вещества, которые немедленно разрушаются под влиянием избытка кислорода. При недостатке кислорода, как в случае удушения, легкоокисляемые вещества накапливаются в крови и увеличивают ее поглотительную способность по отношению к кислороду.

Каков бы ни был химический характер этих легкоокисляемых веществ, они действуют своей энергией на кислород, разрывая прежде всего одну из двойных связей, соединяющих его атомы в частицу, и присоединяя к себе группу —  $O-O-$ , т. е. образуют перекиси. В последних один из атомов кислорода «активен» и может поэтому окислять даже трудноокисляемые вещества, с которыми он находится в соприкосновении. В общих чертах окислительные процессы, совершающиеся в животном организме, должны представлять большую аналогию с окислением индигового раствора пассивным кислородом в присутствии скипидара или бензойного альдегида. В том и другом случае легкоокисляемые вещества выводят кислород из его пассивного состояния, образуя с ним перекиси. Перекиси эти могут быть типа  $R'-O-O-R'$  или даже типа  $R'-O-O-O-O-R'$ .

Характер радикалов, связанных с группой  $-O-O-$  в перекисях, зависит, конечно, от состава легкоокисляемых веществ, из которых они образуются. Но так как в конце концов и сами органические перекиси должны обратиться в угольный ангидрид и воду, то очень возможно, что легкоокисляемые вещества, назначение которых — активировать кислород посредством образования перекисей, сами обладают очень несложным характером и вполне распадаются под влиянием избытка кислорода. В этом случае образующиеся перекиси будут те же, что и при окислении окиси углерода и водорода; углерод органического вещества даст перекись карбонила, а водород — перекись или перекиси водорода. Эти перекиси отдадут затем свой активный кислород трудноокисляемым веществам и превратятся в угольный ангидрид и воду, которые являются конечным и вместе с тем исходным пунктом биохимического круговорота углерода; конечным — в животном организме, который разрушает окислением органические вещества, чтобы утилизировать для своих отравлений выделяемую ими энергию; исходным — в растительном организме, который приготовляет, пользуясь солнечной энергией, сложные и окисляемые вещества из неокисляемой углекислоты.

Если позволительно из реакций, которые мы получаем *in vitro*, заключать о реакциях, которые происходят в живых организмах, то не надо забывать, что наши лабораторные приемы в высшей степени грубы и несовершенны и что результаты, которые мы получаем, даже отдаленно не приближаются к результатам, достигаемыми живыми организмами. Дело в том, что в своей эволюции в течение сотен тысяч лет живые организмы неизбежно должны были выработать наиболее благоприятные — оптимальные условия для тех химических реакций, которые лежат в основе их жизненных отравлений. Так, например, при нынешнем состоянии наших знаний мы едва-едва можем доказать посредством качественных

реакций, что под влиянием солнечных лучей углекислота разлагается с образованием вещества, которое имеет свойства муравьиного альдегида. А между тем, выставив на свет в присутствии углекислоты обрезок зелено-голиста или волокно Spirogyra, можно по истечении короткого времени констатировать, с одной стороны, выделение кислорода, с другой — образование крахмала.

Сказанное применимо также и к процессам окисления, которые происходят в животном организме. Легкоокисляемых веществ, с которыми можно проделывать опыты окисления трудноокисляемых веществ, немного, и окисления, которые они производят, довольно ничтожны. Если в животном организме окисления идут бесконечно энергичнее, то это объясняется тем, что организм вырабатывает вещества, которые своим окислением вызывают окисление трудноокисляемых веществ. В новейшее время открыли в животном и растительном организме целый ряд окислительных ферментов (оксидаз), способных переносить кислород воздуха на трудноокисляемые вещества. С точки зрения их химического действия эти ферменты не могут быть ничем иным, как только легкоокисляемыми веществами, которые присоединяют к себе группы  $-O-O-$  и передают затем свой активный кислород трудноокисляемым веществам. Разрушаются ли они сами при этом или выходят неизменными из реакции, — это не имеет большого значения. Вопрос этот, насколько мне известно, не выяснен. Скорее можно, впрочем, предположить, что эти «ферменты» непрерывно вырабатываются кровью и непрерывно же разрушаются в процессе окисления. В этом смысле действие их будет аналогично действию скипидаара или бензойного альдегида при окислении индиго.

13 июня 1897 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бах. Mon. Sci., 669 (1893); 8, 572 (1894); 154 (1895); 357 (1897); ЖРФХО, 26, 101 (1894); настоящая книга, стр. 155, 225, 221.
2. Hoppe-Seyler. Pflüg. Arch., 1 (1876); Zs. physiol. Chem., 1 (1878).
3. Traube. Ber. Dtsch. chem. Ges., 15, 659 (1882).
4. Бах. Mon. Sci., 154 (1895).
5. Traube. Ber. Dtsch. chem. Ges., 15, 659 (1882).
6. Traube. Ber. Dtsch. chem. Ges., 16, 123 (1883).
7. Бах. ЖРФХО, 26, 101 (1894); настоящая книга, стр. 221.
8. Traube. Ber. Dtsch. chem. Ges., 24, 1717 (1891).
9. Hoppe-Seyler. Ber. Dtsch. chem. Ges., 12, 1551 (1879); 16, 117, 1917 (1883); 22, 2215 (1889); Zs. f. physiol. Chem., 22 (1878); 35 (1886).
10. Traube. Ber. Dtsch. chem. Ges., 15, 659 (1882); 16, 23, 1201 (1883); 18, 1877 (1885); 22, 1496 (1889).
11. Hoppe-Seyler. Ber. Dtsch. chem. Ges., 22, 2215 (1889).
12. Berthelot. Ann. Chim. Phys., 21, 177 (1880).
13. Brühl. Ber. Dtsch. chem. Ges., 28, 2847 (1895).
14. Hoppe-Seyler. Zs. physiol. Chem., 10, 35.

## О ВЫСШИХ ПЕРЕКИСЯХ ВОДОРОДА (I)

[*Ueber höhere Wasserstoffsperoxyde*] \*

В связи с исследованиями о медленном окислении водорода *in statu nascendi*, выделяющегося из гидрида палладия, которые я опубликовал три года тому назад<sup>1</sup>, я сделал наблюдение, что продукты окисления, отделенные от палладия, окисляют раствор индиго скорее, чем растворы перекиси водорода, которые содержат то же количество активного кислорода. Это привело меня к предположению, что при медленном окислении водорода образуется перекись более высокой степени, а именно, четырехокись водорода  $H_2O_4$ , которая соответствует давно известной четырехокиси калия.

Для того чтобы выяснить экспериментально вопрос о существовании высших перекисей водорода, я поставил в последнее время ряд опытов, результаты которых, как мне кажется, подтверждают существование окиси  $H_2O_4$ . Эти результаты я здесь и привожу.

Образование трехокиси водорода  $H_2O_3$  уже предполагалось Бертелло<sup>2</sup>. Титруя перекись водорода раствором марганцовокислого калия при низкой температуре, он заметил, что раствор перманганата обесцвечивался без выделения кислорода. При повышении температуры выше известного предела кислород энергично выделялся. Бертелло объясняет этот факт предположением, что при действии перманганата на перекись водорода образуется промежуточный продукт  $H_2O_3$ , устойчивый только при низкой температуре. В последнее время Брюль<sup>3</sup> получил при перегонке в вакууме 50%-ной перекиси водорода (полученной в результате экстракции эфиром продажной перекиси водорода и отгонкой эфира в вакууме) сиропообразное вещество, которое он считает высшим перекисным соединением водорода. В то время как безводная двуокись водорода  $H_2O_2$  не взрывчата, полученное им вещество интенсивно взорвалось при соприкосновении с расплавленной стеклянной палочкой\*\*.

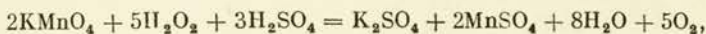
Насколько мне известно, это единственные имеющиеся в литературе данные о существовании высших перекисных соединений водорода.

### МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ И АППАРАТУРА

Одновременное титрование раствором перманганата и измерение выделяющегося кислорода представляют подходящий метод определения высших перекисей водорода. Так как реакция между перманганатом и перекисью водорода протекает согласно уравнению:

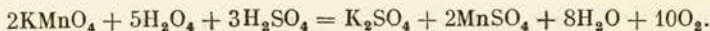
\* *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **33**, 1506 (1900).

\*\* Согласно Нефу (*Nef*, *Lieb. Ann.*, **298**, 274; *Chem. Cbl.*, 1898, 318), Брюль, очевидно, имел в руках перекись ацетила.



то при этом выделяется одна молекула кислорода на каждый активный атом кислорода, имеющийся в перекиси водорода.

Четырехокись водорода  $\text{H}\cdot\text{O}\cdot\text{O}\cdot\text{O}\cdot\text{O}\cdot\text{H}$ , содержащая, так же как и озон, только один активный атом кислорода ( $\text{H}_2\text{O}_4 = \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 + \text{O}$ ), должна восстанавливать столько же перманганата, как и двуокись водорода. Однако при титровании перманганатом она выделяет на каждый активный атом кислорода не одну молекулу кислорода, как двуокись водорода, а две, ибо:



Следовательно, если жидкость содержит четырехокись водорода наряду с двуокисью, то количество кислорода, выделяющееся при титровании перманганатом, должно быть больше, чем соответствует отношению  $2\text{KMnO}_4 : 5\text{H}_2\text{O}_2$ .

Исходя из этих соображений, была собрана аппаратура, позволяющая одновременно титровать перекись и измерять выделяющийся кислород.

Исследуемый раствор перекиси помещается в сосуде для разложения *b*, емкостью в  $35 \text{ см}^3$ , закрытом резиновой пробкой с двумя отверстиями. Этот сосуд соединяется, с одной стороны, с бюреткой *a*, с другой стороны, с газовой бюреткой *c*. Газовая бюретка и уравнительная трубка *d* наполняются водой. После того как уровень устанавливается, раствор перманганата по каплям наливается в сосуд *b*. Сосуд энергично встряхивается движением штатива, на котором он закреплен. После установления постоянного розового окрашивания встряхивание продолжают еще 5—8 минут; после окончательной установки уровня производится отсчет увеличения объема. За вычетом объема прибавленного раствора перманганата и при учете температуры и барометрического давления, увеличение объема соответствует влажному кислороду и перечисляется на сухой газ при  $0^\circ$  и 760 мм ртутного столба.

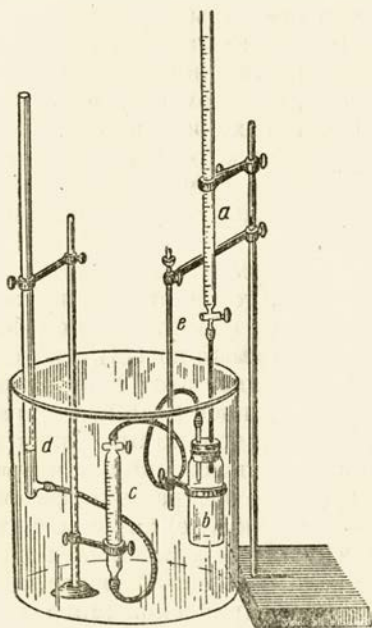


Рис. 1

Во избежание колебаний температуры сосуд для разложения и измерительная аппаратура помещались в большой сосуд с водой. Все опыты производились при постоянной температуре. Температура воды в сосуде оставалась постоянной в течение многих часов, и так как объем реакционного сосуда *b* сравнительно невелик, то ошибки, происходящие от колебаний температуры, почти полностью исключались.

Чтобы получить строго сравнимые результаты, все опыты производились с одинаковой продолжительностью в 10 минут, т. е. через 10 минут после начала титрования установившийся уровень считался окончательным, и отсчитывалось увеличение объема.

## ПРОДАЖНАЯ ПЕРЕКИСЬ ВОДОРОДА

Для того чтобы испытать надежность метода, я поставил несколько серий опытов с продажной перекисью водорода. Все эти опыты дали хорошие, но всегда несколько слишком низкие результаты. Наблюдаемое выделение кислорода ни в одном случае не достигло вычисленного количества. Таким образом, ошибки опыта давали отклонения не в пользу моей гипотезы.

В виде примера я привожу здесь результаты серии измерений, при которых было получено наибольшее выделение кислорода.

10 см<sup>3</sup> 2.76%-ного раствора перекиси водорода были разбавлены нормальной серной кислотой до 100 см<sup>3</sup>; 4 см<sup>3</sup> этого раствора титровались перманганатом калия в описанной выше аппаратуре. Результаты приведены в следующей таблице:

*Титр раствора перманганата: 1 см<sup>3</sup> = 0.000821 г O*

| Количество перекиси водорода (см <sup>3</sup> ) | Потребленный раствор перманганата (см <sup>3</sup> ) | Температура (°C) | Давление (мм) | Выделившийся кислород (см <sup>3</sup> ) |
|-------------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------|---------------|------------------------------------------|
| 4                                               | 6.3                                                  | 7                | 720           | 7.9                                      |
| 4                                               | 6.2                                                  | 7                | 720           | 7.8                                      |
| 4                                               | 7.0                                                  | 7                | 720           | 8.4                                      |
| 4                                               | 6.2                                                  | 7                | 720           | 7.8                                      |
| 4                                               | 6.2                                                  | 7                | 720           | 7.8                                      |
| 4                                               | 6.3                                                  | 7                | 720           | 7.7                                      |
| 4                                               | 6.3                                                  | 7                | 720           | 7.7                                      |
| 4                                               | 6.3                                                  | 7                | 720           | 7.9                                      |
| 4                                               | 6.2                                                  | 7                | 720           | 7.8                                      |
| 4                                               | 6.3                                                  | 7                | 720           | 7.7                                      |
| Среднее:                                        | 6.31                                                 | —                | —             | 7.92                                     |

Количество кислорода на 1 см<sup>3</sup> потребленного раствора перманганата . . . . . 1.12 см<sup>3</sup>  
 Вычислено из отношения 2KMnO<sub>4</sub>:5H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> . . . . . 1.14 »

Таким образом было доказано, что аппаратура дает вполне удовлетворительные результаты.

## ПРОДУКТЫ ОКИСЛЕНИЯ ВОДОРОДА IN STATU NASCENDI

Как уже было упомянуто, я наблюдал, что продукты окисления водорода из гидрида палладия окисляют растворы индиго скорее, чем растворы перекиси водорода, восстанавливающие то же количество перманганата; это позволяет предположить образование четырехокси водорода\*.

\* В прекрасно составленной монографии «О медленном сгорании» Бодлендер приводит, между прочим, мою теорию медленного окисления (первичное образование перекиси путем присоединения группы ·O·O·, в противоположность теории Траубе, приписывающего окисление гидроксилам воды и косвенному образованию перекиси водорода путем присоединения кислорода к выделяющемуся водороду). Бодлендер противопоставляет моему предположению об образовании четырехокси водорода при медленном окислении водорода из гидрида палладия взгляды Траубе, согласно которому более энергичное действие продукта окисления водорода по сравнению с перекисью

Поставленные мною новые определения были произведены следующим образом:

Около 11 г палладиевой пластинки были насыщены чистым водородом, помещены в узкую и длинную пробирку и покрыты 15 см<sup>3</sup> нормальной серной кислоты; посредством трубки, вытянутой в капилляр, через раствор пропускался ток чистого воздуха. Кислая жидкость, слитая с палладия, титровалась раствором перманганата в описанной аппаратуре; палладий вновь покрывался 15 см<sup>3</sup> нормальной серной кислоты и насыщался воздухом. Продолжительность пропускания воздуха колебалась от 1 часа до 12 часов.

Хотя полученные таким образом результаты оказались положительными, но количество образовавшейся перекиси настолько мало, что опыты нельзя считать убедительными. Тем не менее я приведу здесь две серии опытов, не в качестве доказательства предложенной мною гипотезы, а как количественные данные, относящиеся к медленному окислению водорода *in statu nascendi* из гидрида палладия.

Гипр раствора перманганата: 1 см<sup>3</sup> = 0.000821 г O

| Продолжительность пропускания воздуха (в часах) | Потребленный раствор перманганата (см <sup>3</sup> ) | Температура (°C) | Давление (мм) | Выделившийся кислород (см <sup>3</sup> ) |
|-------------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------|---------------|------------------------------------------|
| 3                                               | 0.5                                                  | 7                | 725           | 0.7                                      |
| 2                                               | 0.5                                                  | 7                | 725           | 0.8                                      |
| 1                                               | 0.7                                                  | 7                | 725           | 0.8                                      |
| 1                                               | 0.7                                                  | 7                | 725           | 0.9                                      |
| 1                                               | 0.4                                                  | 7                | 725           | 0.4                                      |
| 12                                              | 0.0                                                  | 6                | 722           | 0.0                                      |

Если оставить в стороне два последних опыта, то в среднем на 1 см<sup>3</sup> потребленного раствора перманганата получается количество кислорода в 1.19 см<sup>3</sup> (приведенное к 0° и 760 мм). Вычислено 1.14 см<sup>3</sup>.

В другой серии ток воздуха пропускался в течение 1 часа. Полученные результаты были значительно ровнее.

водорода приписывается присутствию частиц палладия, действующих как катализаторы. Эта точка зрения была уже окончательно опровергнута Гоппе-Зейлером. Я повторил опыты последнего и могу только подтвердить их.

В две пробирки было налито по 15 см<sup>3</sup> раствора перекиси водорода, содержащего 0.52 г на 1 л, и по 1 см<sup>3</sup> 0.1%-ного раствора индиго; в одну из пробирок была помещена палладиевая пластинка, не содержащая водорода (прокаленная). Обесцветивание обоих растворов протекало довольно равномерно и закончилось в обоих случаях одновременно. Опыты с растворами, содержащими 0.032 и 0.016 г перекиси водорода, дали аналогичный результат. Палладий действует каталитически на перекись водорода, но с выделением молекул кислорода, а не атомов.

Бодлендер заключает свое изложение следующими словами: «Существование соединения Н<sub>2</sub>О<sub>4</sub> все же не невозможно. Оно только не было еще доказано опытами Баха» (стр. 475). Я же вообще высказывал только предположение. На стр. 491 моей статьи, напечатанной в «Moniteur scientifique» и цитированной Бодлендером (стр. 473 его монографии), сказано: «... конечно, так же как и расщепление кислорода водородом *in statu nascendi*, образование четырехоксида водорода только гипотеза. Однако она имеет перед гипотезой Гоппе-Зейлера то преимущество, что она опирается на весьма существенные аналогии и что она соответствует фактам, которые не может объяснить ни одна из других гипотез».



Титр раствора перманганата:  $1 \text{ см}^3 = 0.000821 \text{ г О}$

| Продолжительность пропускания воздуха (в часах) | Потребленный раствор перманганата (см <sup>3</sup> ) | Температура (°C) | Давление (мм) | Выделившийся кислород (см <sup>3</sup> ) |
|-------------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------|---------------|------------------------------------------|
| 1                                               | 0.7                                                  | 8                | 722           | 0.9                                      |
| 1                                               | 0.7                                                  | 8                | 722           | 0.9                                      |
| 1                                               | 0.7                                                  | 8                | 722           | 0.8                                      |
| 1                                               | 0.6                                                  | 8                | 722           | 1.0                                      |
| 1                                               | 0.6                                                  | 8                | 722           | 1.0                                      |
| 1                                               | 0.7                                                  | 8                | 722           | 0.9                                      |
| 1                                               | 0.7                                                  | 8                | 722           | 0.9                                      |
| 1                                               | 0.7                                                  | 8                | 722           | 0.8                                      |
| Среднее:                                        | 0.67                                                 | —                | —             | 0.90                                     |

Количество кислорода на  $1 \text{ см}^3$  потребленного перманганата . . . . .  $1.22 \text{ см}^3$  (испр.)  
 Вычислено для  $2\text{KMnO}_4 : 5\text{H}_2\text{O}_2$  . . . . .  $1.14$  » »

Применяя большие количества палладия, может быть, было бы возможно получить более удовлетворительные результаты.

#### ПЕРЕКИСЬ ВОДОРОДА ИЗ ЧЕТЫРЕХОКИСИ КАЛИЯ

Если четырехокись водорода может существовать в свободном состоянии, то она должна получиться при разложении четырехокси калия кислотами:



Для приготовления четырехокси калия свеженарезанные кусочки калия помещались в серебряной лодочке в печь для сжигания, нагревались и обрабатывались сначала сухим воздухом, освобожденным от углекислоты, а затем током кислорода. Полученная оранжевая кристаллическая масса сохранялась в плотно закрывающихся сухих сосудах.

Около 3 г четырехокси калия вводились по частям в  $50 \text{ см}^3$  сильно охлажденной нормальной серной кислоты, находящейся в охлаждающей смеси, таким образом, чтобы температура раствора не поднималась выше  $7^\circ$ . Этот раствор титровался перманганатом описанным выше способом порциями по  $5 \text{ см}^3$ ; выделяющийся кислород при этом измерялся, как указано выше.

Другая серия измерений, поставленная таким же образом, дала на  $1 \text{ см}^3$  раствора перманганата  $1.47 \text{ см}^3$  (испр.) кислорода вместо вычисленного количества  $1.14 \text{ см}^3$ .

Несмотря на хорошее охлаждение при приготовлении раствора перекиси из четырехокси калия, наблюдаемое выделение кислорода было значительно меньше, чем предполагалось. Это можно объяснить следующим образом:

1) четырехокись калия всегда содержит некоторое количество закиси калия или металлического калия, которое разлагает образующуюся перекись при растворении; 2) от лодочки отделяются черные частички серебра, которые разлагают каталитически раствор перекиси; 3) уже при отборе пробы пипеткой из раствора перекиси наблюдается заметное разложение.

Тип раствора перманганата:  $1 \text{ см}^3 = 0.000821 \text{ г О}$

| Количество перекиси водорода ( $\text{см}^3$ ) | Потребленный раствор перманганата ( $\text{см}^3$ ) | Температура ( $^{\circ}\text{C}$ ) | Давление (мм) | Выделившийся кислород ( $\text{см}^3$ ) |
|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|------------------------------------|---------------|-----------------------------------------|
| 5                                              | 7.0                                                 | 8                                  | 720           | 10.8                                    |
| 5                                              | 7.2                                                 | 8                                  | 720           | 11.4                                    |
| 5                                              | 7.1                                                 | 8                                  | 720           | 11.3                                    |
| 5                                              | 7.0                                                 | 8                                  | 720           | 11.0                                    |
| 5                                              | 7.0                                                 | 8                                  | 720           | 11.2                                    |
| 5                                              | 7.1                                                 | 8                                  | 720           | 10.9                                    |
| 5                                              | 7.0                                                 | 8                                  | 720           | 11.0                                    |
| 5                                              | 7.0                                                 | 8                                  | 720           | 10.6                                    |
| Среднее:                                       | 7.05                                                | —                                  | —             | 11.02                                   |

Количество кислорода на  $1 \text{ см}^3$  потребленного перманганата . . . . .  $1.43 \text{ см}^3$  (испр.)  
 Вычислено для  $2\text{KMnO}_4 : 5\text{H}_2\text{O}_2$  . . . . .  $1.14$  » »

Первые два источника ошибок не могут быть устранены. Последнего можно избежать, если наливать непосредственно в сосуд, в котором происходит разложение, небольшое количество нормальной серной кислоты и вводить в него четырехокись калия при погружении в охлаждающую смесь. Полученные таким образом результаты были несколько лучше.

Тип раствора перманганата:  $1 \text{ см}^3 = 0.000821 \text{ г О}$

| Потребленное количество перманганата ( $\text{см}^3$ ) | Температура ( $^{\circ}\text{C}$ ) | Давление (мм) | Выделившийся кислород ( $\text{см}^3$ ) |
|--------------------------------------------------------|------------------------------------|---------------|-----------------------------------------|
| 8.1                                                    | 7                                  | 728           | 14.3                                    |
| 3.2                                                    | 7                                  | 728           | 5.2                                     |
| 5.4                                                    | 7                                  | 728           | 8.6                                     |
| 7.2                                                    | 7                                  | 728           | 10.8                                    |
| 10.5                                                   | 7                                  | 728           | 16.8                                    |
| Среднее: 6.68                                          | —                                  | —             | 11.14                                   |

Количество кислорода на  $1 \text{ см}^3$  потребленного перманганата . . . . .  $1.53 \text{ см}^3$  (испр.)  
 Вычислено для  $2\text{KMnO}_4 : 5\text{H}_2\text{O}_2$  . . . . .  $1.14$  » »

### ПЕРЕКИСЬ ВОДОРОДА ИЗ ДВУОКИСИ НАТРИЯ

Принимая во внимание аналогию между натрием и калием, можно было ожидать, что существуют высшие перекиси натрия, которые должны содержаться в продажной двуокиси натрия. При разложении кислотой высшие перекиси металла должны превращаться в высшие перекиси водорода.

Около  $5 \text{ г}$  двуокиси натрия, сохранявшейся в хорошо закрытой банке, были растворены в  $100 \text{ см}^3$  нормальной серной кислоты при охлаждении в охлаждающей смеси; различные количества кислого раствора были

подвергнуты анализу. Четыре серии опытов дали во всех случаях больше кислорода, чем соответствует отношению  $2\text{KMnO}_4 : 5\text{H}_2\text{O}_2$ . В качестве примера можно привести следующую серию:

Титр раствора перманганата:  $1 \text{ см}^3 = 0.0007326 \text{ г О}$

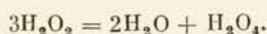
| Количество перекиси водорода (см <sup>3</sup> ) | Потребленное количество перманганата (см <sup>3</sup> ) | Температура (°С) | Давление (мм) | Выделившийся кислород (см <sup>3</sup> ) |
|-------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------------|---------------|------------------------------------------|
| 1.5                                             | 6.5                                                     | 6                | 724           | 9.1                                      |
| 1.5                                             | 6.7                                                     | 6                | 724           | 8.9                                      |
| 1.5                                             | 6.6                                                     | 6                | 724           | 9.0                                      |
| 1.5                                             | 6.6                                                     | 6                | 724           | 8.6                                      |
| 1.5                                             | 6.5                                                     | 6                | 724           | 8.3                                      |
| 1.5                                             | 6.6                                                     | 6                | 724           | 8.4                                      |
| Среднее:                                        | 6.58                                                    | —                | —             | 8.71                                     |

Количество кислорода на 1 см<sup>3</sup> потребленного перманганата . . . . . 1.20 см<sup>3</sup> (испр.)  
 Вычислено для  $2\text{KMnO}_4 : 5\text{H}_2\text{O}_2$  . . . . . 1.02 » »

Из остальных серий опытов одна дала несколько слишком низкие и другая — слишком высокие результаты.

### КИСЛОТА КАРО

Как известно, Каро<sup>4</sup> открыл новый окислитель, который он получил при действии серной кислоты на персульфат калия. Бейер<sup>5</sup> недавно нашел, что тот же окислитель получается также при действии концентрированной кислоты на перекись водорода. Он рассматривает это новое вещество как соединение серной кислоты с перекисью водорода и называет его *кислотой Каро*. Так как этот новый окислитель ведет себя в разбавленном состоянии иначе, чем перекись водорода в разбавленной серной кислоте, то можно было предположить, что кислота Каро представляет собою соединение серной кислоты с высшей перекисью водорода, а именно, с четырехокисью водорода. Последняя может получиться при обезвоживании перекиси водорода серной кислотой:



Если это так, то соединение, аналогичное кислоте Каро, должно получаться также и при действии на перекись водорода других дегидратирующих веществ. Так, в действительности оказалось, что при обработке сильно охлажденной перекиси водорода сухим хлористым водородом образуется соединение, которое дает с ацетоном кристаллический осадок перекиси ацетона. То же самое соединение образуется также и при действии концентрированной соляной кислоты на перекись водорода при охлаждении. Однако реакция, повидимому, идет значительно медленнее.

Мне казалось поэтому целесообразным подвергнуть кислоту Каро анализу в описанном приборе.

Для краткости здесь приведены только опыты с теми препаратами, которые дали наилучшие результаты. Кислота Каро, применявшаяся в этих исследованиях, была приготовлена следующим образом: к 15 см<sup>3</sup>

2.69%-ного раствора перекиси водорода, охлажденной в охлаждающей смеси, прибавлялось по каплям 30 см<sup>3</sup> концентрированной серной кислоты (уд. в. 1.84) настолько медленно, что температура жидкости не поднималась выше 0°. Для анализа отбирались пробы по 2 см<sup>3</sup> этого раствора.

*Титр раствора перманганата: 1 см<sup>3</sup> = 0.0007326 г O*

| Количество перекиси водорода (см <sup>3</sup> ) | Потребленное количество перманганата (см <sup>3</sup> ) | Температура (°C) | Давление (мм) | Выделившийся кислород (см <sup>3</sup> ) |
|-------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------------|---------------|------------------------------------------|
| 2                                               | 3.2                                                     | 6                | 725           | 6.8                                      |
| 2                                               | 3.2                                                     | 6                | 725           | 6.6                                      |
| 2                                               | 3.4                                                     | 6                | 725           | 6.4                                      |
| 2                                               | 3.3                                                     | 6                | 725           | 6.1                                      |
| 2                                               | 3.3                                                     | 6                | 725           | 5.9                                      |
| 2                                               | 3.3                                                     | 6                | 725           | 5.7                                      |
| 2                                               | 3.4                                                     | 6                | 725           | 6.0                                      |
| 2                                               | 3.4                                                     | 6                | 725           | 6.0                                      |
| 2                                               | 3.4                                                     | 6                | 725           | 6.0                                      |
| 2                                               | 3.3                                                     | 6                | 725           | 5.9                                      |
| Среднее:                                        | 3.32                                                    | —                | —             | 6.14                                     |

Количество кислорода на 1 см<sup>3</sup> потребленного перманганата . . . . . 1.69 см<sup>3</sup> (испр.)  
 Вычислено для 2KMnO<sub>4</sub>:5H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> . . . . . 1.02 » »

Другой препарат кислоты Каро, приготовленный таким же образом, дал при титровании другим раствором перманганата следующие результаты:

*Титр раствора перманганата: 1 см<sup>3</sup> = 0.000821 г O*

| Количество перекиси водорода (см <sup>3</sup> ) | Потребленное количество перманганата (см <sup>3</sup> ) | Температура (°C) | Давление (мм) | Выделившийся кислород (см <sup>3</sup> ) |
|-------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------------|---------------|------------------------------------------|
| 2                                               | 3.1                                                     | 6                | 726           | 6.3                                      |
| 2                                               | 3.1                                                     | 6                | 726           | 6.3                                      |
| 2                                               | 3.1                                                     | 6                | 726           | 6.1                                      |
| 2                                               | 3.2                                                     | 6                | 726           | 6.3                                      |
| 2                                               | 3.1                                                     | 6                | 726           | 6.1                                      |
| 2                                               | 3.2                                                     | 6                | 726           | 6.4                                      |
| Среднее:                                        | 3.16                                                    | —                | —             | 6.25                                     |

Количество кислорода на 1 см<sup>3</sup> потребленного перманганата . . . . . 1.84 см<sup>3</sup> (испр.)  
 Вычислено для 2KMnO<sub>4</sub>:5H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> . . . . . 1.14 » »

### ВЫВОДЫ

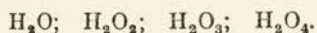
Из описанных выше опытов вытекает, что существуют растворы перекиси водорода, которые при титровании перманганатом выделяют больше кислорода, чем соответствует отношению 2KMnO<sub>4</sub>:2H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Если мы при-

мом, что выделение кислорода из двуокиси водорода равно единице, то для исследуемых продуктов получают следующие количества кислорода:

| Двуокись<br>водорода | Продукты<br>окисления<br>водорода<br>in statu<br>nascendi | Перекись<br>водорода<br>из двуокиси<br>натрия | Перекись<br>водорода<br>из четырех-<br>окиси калия | Кислота<br>Каро |
|----------------------|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------|
| 1                    | 1.07                                                      | 1.17                                          | 1.28                                               | 1.65            |

Эти результаты могут быть истолкованы только в том смысле, что соответственные растворы перекиси содержат высшие перекиси водорода, а именно, трехокись водорода  $H_2O_3$  и предполагаемую мною четырехокись водорода  $H_2O_4$ . Легко увидеть, что в большей части исследованных мною случаев присутствовала не трехокись, а четырехокись. Только в растворе перекиси водорода из двуокиси натрия могла находиться трехокись водорода, образовавшаяся при разложении трехокиси натрия. Что же касается перекиси водорода из четырехокиси калия, то а priori чрезвычайно мало вероятно, что при разложении четырехокиси калия серной кислотой получается  $H_2O_3$ , а не  $H_2O_4$ . В кислоте Каро активный кислород может быть только в виде четырехокиси водорода уже хотя бы потому, что трехокись не обладает окислительной способностью. В сравнении с водой трехокись водорода содержит два избыточных, связанных между собою атома кислорода, которые легко выделяются в виде молекулы кислорода\*. Что же касается кислоты Каро, то она вполне выраженный, хотя и не очень энергичный окислитель. Так, например, она окисляет анилин с образованием нитрозобензола.

Таким образом, мои опыты, повидимому, показывают, что четырехокись водорода может существовать. Ряд кислородных соединений водорода должен, следовательно, состоять из следующих членов:



К этому нужно было бы прибавить закись водорода  $H_4O$ , аналогичную

\* Поразительную аналогию с трехокисью водорода представляет соединение, играющее чрезвычайно существенную роль в жизнедеятельности животного организма: оксигемоглобин. Как известно, оксигемоглобин содержит кислород не просто в виде поглощенного газа, а в слабосвязанном состоянии. Как бы слаба ни была эта связь, это все же химическое соединение, и так как оксигемоглобин получается из гемоглобина при медленном окислении, то, согласно современному воззрению, оксигемоглобин является перекисью, т. е. активирует кислород при своем образовании. Однако ни одно из этих предположений здесь не подтверждается. Кислород не активируется при образовании оксигемоглобина, и последний не является перекисью в обычном смысле этого слова: он не содержит активного кислорода и, как уже доказал Гошпе-Зейлер, не превосходит молекулярный кислород своей окислительной способностью. Это противоречие, однако, полностью устраняется, если допустить, что оксигемогло-

бин является перекисью  $R \cdot O \cdot O \cdot O \cdot R_1$ , или  $R_{11} \begin{array}{c} O \\ \diagdown \quad \diagup \\ O \end{array} O$ , аналогичной трехокиси водорода.

Физиологическая целесообразность такого строения совершенно понятна, ибо если бы гемоглобин был перекисью, содержащей активный кислород, он никогда не мог бы доставлять в глубь ткани необходимое количество кислорода для протекающих там окислительных процессов.

закисям натрия, калия и серебра. Если гипотеза Брюля относительно четырехвалентности кислорода правильна, то вода может присоединять к себе водород. Мне казалось, что гидрид палладия является подходящим восстановителем для осуществления этого присоединения. Однако все попытки доказать образование закиси водорода не дали результатов. Только один раз мне удалось получить при длительном хранении гидрида палладия в чистой, прокипяченной воде в отсутствии воздуха жидкость, которая давала с аммиачной окисью серебра яркочерное окрашивание, которое, повидимому, соответствовало образованию закиси серебра или коллоидального серебра\*.

При многократном повторении этого опыта ни разу не наблюдалось появления окрашивания.

Может быть, можно было бы получить лучший результат, если употребить очень большие количества гидрида палладия.

8 мая 1900 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Б а х. О роли перекисей в процессах медленного окисления [Du rôle des peroxydes dans les phénomènes d'oxydation lente].— C. R. Acad. Sci., Paris, **124**, 954 (1897); Mon. Sci., 479 (1897); настоящая книга, стр. 242.
2. Berthelot. Ann. Chim. Phys., 146 (1880).
3. Brühl. Ber. Dtsch. chem. Ges., **28**, 2847 (1895).
4. Caro. Zs. angew. Chem., 245 (1898).
5. Baeyer. Ber. Dtsch. chem. Ges., **33**, 124 (1900).

---

\* Вода, насыщенная водородом при комнатной температуре, не действует на аммиачную закись серебра.

## О ВЫСШИХ ПЕРЕКИСЯХ ВОДОРОДА (II)

[*Ueber höhere Wasserstoffsperoxyde*] \*

Сообщение, напечатанное мною в настоящем журнале под этим же названием<sup>1</sup>, вызвало со стороны Армстронга<sup>2</sup> и Бейера и Виллигера<sup>3</sup> критические замечания, имеющие целью показать, что моими опытами еще не доказано существование высших перекисей водорода.

Я позволю себе вкратце изложить здесь эти замечания и одновременно привести опыты, которые дают новое подтверждение моей точки зрения.

Армстронг утверждает, что исследованная мною кислота Каро представляет собой смесь надсерной кислоты и перекиси водорода и что при титровании с перманганатом реагирует только перекись водорода, в то время как надсерная кислота разлагается каталитически и выделяет тот избыточный кислород, который я измерял. Для того чтобы объяснить результаты моих опытов с растворами перекиси водорода, полученной из двуокиси натрия и четырехокиси калия с нормальной серной кислотой, Армстронг высказывает гипотезу, что и в этом случае образовывалась надсерная кислота, в результате действия перекиси водорода на нормальную серную кислоту.

Возражение, касающееся моего опыта с кислотой Каро, совпадает с критическими замечаниями Бейера и Виллигера, о которых я еще буду говорить ниже. Что же касается опытов с перекисью водорода из двуокиси натрия и четырехокиси калия, то мне кажется, что Армстронг упустил из вида мои контрольные опыты с перекисью водорода и нормальной серной кислотой.

Я поставил эти опыты с целью доказать надежность моего метода и нашел, что растворы перекиси водорода, разбавленные нормальной серной кислотой, дают с перманганатом количество кислорода, близкое к теоретическому, но всегда меньше последнего. Ни в одном случае количество выделенного кислорода не достигало теоретического, а тем более — не превышало его.

Если бы утверждение Армстронга было правильным, то я получил бы в контрольных опытах такой же избыток кислорода, как в растворах перекиси водорода из четырехокиси калия. В последнем случае тем менее могло иметь место образование надсерной кислоты, что вследствие нейтрализации части серной кислоты основанием раствор кислоты был еще более разбавленным, чем в контрольных опытах.

Бейер и Виллигер высказывают против моих опытов с кислотой Каро то же возражение, как и Армстронг, т. е. утверждают, что я имел дело со смесью кислоты Каро и перекиси водорода. Избыток кислорода, полу-

\* Ber. Dtsch. Chem. Ges., 33, 3111 (1900)

ченный мною при титровании перманганатом, происходит, по их мнению, не в результате простой химической реакции, а вследствие каталитического распада кислоты Каро. Бейер и Виллигер показали в специальных опытах, что, в зависимости от условий, можно получить с кислотой Каро не только в два раза больше теоретического объема кислорода, но и 2.6-, 3.5- и 4.6-кратное количество.

Этот опыт был проведен следующим образом.

К порциям в  $10 \text{ см}^3$  подкисленного перманганата, которые должны были выделить с перекисью водорода ровно  $10 \text{ см}^3$  кислорода, прибавлялись различные, но во всех случаях избыточные, количества кислоты Каро (кислота Каро:  $\text{KMnO}_4 = 4 : 1; 10 : 1; 4 : 1; 6 : 1$ ); смеси взбалтывались при различной температуре, и выделяющийся кислород собирался. При  $0^\circ$  выделялось  $26.11 \text{ см}^3$  при  $18^\circ - 35.61 \text{ см}^3$  и при  $34^\circ - 46.35 \text{ см}^3$  кислорода вместо теоретического количества  $10 \text{ см}^3$ . Реакция заканчивалась в 15—20 минут.

Выводы, которые Бейер и Виллигер делают из этих опытов в опровержение моих взглядов, были бы совершенно неоспоримы, если бы кислота Каро не восстанавливала перманганат. Действительно, в таком случае было бы ясно, что в моем опыте с кислотой Каро, приготовленной из перекиси водорода и концентрированной серной кислоты, перманганат восстанавливался бы попросту перекисью водорода, в то время как найденный мною избыток кислорода нужно было бы приписывать каталитическому разложению надсерной кислоты. Однако ввиду того что кислота Каро восстанавливает, хотя и не очень быстро, перманганат, опыт Бейера — Виллигера можно также толковать в том смысле, что часть кислоты Каро реагирует с перманганатом, согласно моей точке зрения, и выделяет двукратный объем кислорода ( $20 \text{ см}^3$ ), в то время как избыток кислоты Каро выделяет еще дальнейшее количество кислорода под влиянием сернокислого марганца. Точно так же в моем опыте кислота Каро и перекись водорода могли восстанавливать одновременно перманганат, и если я при этом получил количество кислорода только в 1.7 раза, а не в 2 раза больше теоретического, то это можно объяснить тем, что присутствие перекиси водорода снижает относительное количество кислорода.

Для того чтобы опровергнуть мои взгляды, Бейер и Виллигер должны были бы доказать, что кислота Каро выделяет при прибавлении точно стехиометрического количества перманганата (кислота Каро:  $\text{KMnO}_4 = 1 : 1$ ) только теоретический объем кислорода. Но и в этом случае нельзя было бы рассматривать вопрос как окончательно решенный, ибо Бейер и Виллигер работали всегда с разбавленной кислотой Каро, в то время как я титровал непосредственно неразбавленную кислоту. Оказывается, что кислота Каро, как это видно из изложенного ниже, ведет себя различно при реакции с перманганатом, в зависимости от того, разбавлена она или нет.

В сообщении о бензоилперекиси водорода Бейер и Виллигер<sup>4</sup> утверждают, что кислота Каро не оказывает никакого действия на перманганат. При прибавлении раствора перманганата к неразбавленной кислоте Каро, приготовленной из персульфата и концентрированной серной кислоты, я наблюдал очень энергичное восстановление перманганата. Сначала я объяснил это явление, предположив, что в результате значительного повышения температуры происходит гидролиз надсерной кислоты, распадающейся на перекись водорода и серную кислоту, и что перекись реагирует, как обычно, с перманганатом. Вскоре, однако, выяснилось, что и сухой перманганат восстанавливается так же быстро, как и раствор перманганата, под действием кислоты Каро, с промежуточным образованием зеленого раствора.



Это зеленое соединение могло быть только ангидридом марганцовой кислоты; мне казалось интересным изучить ближе эту реакцию и применить ее для количественных опытов, где это возможно.

Я нашел, что ангидрид марганцовой кислоты, приготовленный из сухого перманганата калия и концентрированной серной кислоты, реагирует почти моментально с неразбавленной кислотой Каро при взаимном разложении и выделении кислорода; таким образом, титрование обеих жидкостей производится чрезвычайно удобно.

Растворы, применявшиеся для количественных опытов, были приготовлены следующим образом.

1 г чистейшего, растертого в порошок перманганата калия был смешан в склянке с стеклянной пробкой с 100 см<sup>3</sup> чистейшей серной кислоты (уд. в. 1.84) и оставлен на ночь; после однократного взбалтывания ярко-зеленая жидкость была перелита в бюретку, закрывающуюся хлоркальциевой трубкой. Для установления титра жидкость титровалась солью Мора до постоянного красного окрашивания.

Приготовленный таким образом раствор довольно устойчив при хранении. Он не выделяет кислорода, и его титр остается постоянным в течение многих дней\*. Для приготовления кислоты Каро 8 г персульфата были растерты с 20 см<sup>3</sup> чистейшей концентрированной серной кислоты. Полученная таким образом жидкость также сохранялась в бюретке, закрытой хлоркальциевой трубкой.

При смешивании обеих жидкостей каждая капля марганцового ангидрида быстро обесцвечивается с выделением кислорода.

Последняя капля вызывает быстро проходящее коричнево-желтое окрашивание, и в конце концов жидкость окрашивается в розовый и синефиолетовый цвет.

Конец титрования определяется так же резко, как и при титровании перманганатом. При достаточно быстром прибавлении растворов марганцового ангидрида титрование можно закончить в течение 30 секунд. При этом не наблюдается сколько-нибудь заметного повышения температуры.

Так как при этих условиях не может быть и речи о гидролизе, то нужно допустить, что восстановление марганцового ангидрида производится самой кислотой Каро.

Обе жидкости были протитрованы одна другой в описанном ранее приборе<sup>5</sup> и выделяющийся при этом кислород измерен. В более чем 50 опытах были получены объемы кислорода, составляющие 1.3—1.5-кратные от объема, который должен был бы теоретически выделиться при реакции марганцового ангидрида с перекисью водорода.

Мне кажется излишним описывать здесь более подробно эти опыты. Я позволю себе только привести одну серию опытов, поставленных с целью выяснения судьбы активного кислорода персульфата при прибавлении кислоты Каро.

В этих опытах я считал целесообразным готовить кислоту Каро в самом приборе для разложения, так как это позволяло работать с гораздо большей точностью, чем при отборе реактива из бюретки.

Точная навеска в 0.4 г измельченного в тонкий порошок персульфата смешивалась в сосуде для разложения с 2—3 см<sup>3</sup> концентрированной серной кислоты; сосуд соединялся с прибором и многократно встряхивался

\* Ввиду известной взрывчатости ангидрида марганцовой кислоты я вначале принимал особые меры предосторожности. Однако оказалось, что при соблюдении описанной выше методики этот ангидрид совершенно безопасен. Я употребил около одного литра этого раствора для различных опытов, и ни разу при этом не случилось взрыва.

в течение 10—15 минут. После установления уровня быстро производилось титрование раствором марганцового ангидрида; после энергичного взбалтывания и повторного установления уровня отсчитывался объем кислорода. Вся операция продолжалась не более 1—2 минут.

Если продолжать взбалтывание после появления фиолетового окрашивания, то не наблюдается измеримого увеличения объема кислорода.

Содержание активного кислорода в персульфате определялось титрованием горячим раствором соли Мора. Таким путем были получены следующие результаты:

*Титр раствора марганцового ангидрида: 1 см<sup>3</sup> = 0.0021978 г О*

| Количество персульфата                                          | Количество марганцового ангидрида (см <sup>3</sup> ) | Температура (°C) | Давление (мм) | Выделившийся кислород (см <sup>3</sup> ) |
|-----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------|---------------|------------------------------------------|
| По 0.4 г персульфата, содержащего 0.02316 г активного кислорода | 6.2                                                  | 14               | 726           | 28.5                                     |
|                                                                 | 6.2                                                  | 14               | 726           | 28.8                                     |
|                                                                 | 6.1                                                  | 14               | 726           | 28.7                                     |
|                                                                 | 6.2                                                  | 14               | 726           | 28.8                                     |
|                                                                 | 6.3                                                  | 14               | 726           | 28.9                                     |
|                                                                 | 6.2                                                  | 14               | 726           | 28.8                                     |
| Среднее . . .                                                   | 6.2                                                  | —                | —             | 28.76                                    |

Выделившийся кислород, приведенный к 0° и 760 мм . . . 25.49 см<sup>3</sup>

С перекисью водорода то же количество марганцового ангидрида выделило бы . . . . . 18.94 »

Избыток кислорода . . . . . 6.55 см<sup>3</sup>

$$\frac{\text{Вычисленный объем кислорода}}{\text{Найденный объем кислорода}} = \frac{1}{1.33}$$

При титровании кислота Каро полностью разложилась. Если вычесть из найденного объема кислорода количество кислорода, соответствующее потребленному марганцовому ангидриду (0.01362 г = 9.47 см<sup>3</sup>), то получается 16.02 см<sup>3</sup> = 0.02302 г кислорода, т. е. все количество активного кислорода (0.02316 г), которое имелось во взятом количестве персульфата.

При титровании кислоты Каро это количество кислорода распределяется следующим образом:

0.01362 г. кислорода соответствует восстановленному марганцовому ангидриду и 0.00937 г кислорода — избытку, найденному в газовой бюретке.

Откуда происходит этот избыток кислорода? Тут возможны только два объяснения: он получается либо от каталитического распада части кислоты Каро, либо от нормального разложения высшей перекиси, которая содержит три атома кислорода, связанных между собою.

Уже тот факт, что титрование и полное разложение кислоты Каро происходит в течение нескольких секунд, указывает на то, что здесь не имеет место каталитический распад. Прямые опыты доказали, что допущение каталитического распада в этом случае полностью отпадает.

К 2 см<sup>3</sup> кислоты Каро были прибавлены 0.02 г сернистой закиси марганца (растертой с концентрированной серной кислотой), смесь была оставлена в приборе для разложения и после установления уровня часто

взбалтывалась. По истечении 3 часов уровень оказался практически неизменным.

Тот же опыт был проведен еще и другим способом. 6 см<sup>3</sup> раствора марганцового ангидрида титровались в приборе кислотой Каро до полного обесцвечивания. После выделения кислорода в жидкости, находящейся в сосуде для разложения, были прибавлены еще 2 см<sup>3</sup> кислоты Каро, и уровень был вновь установлен. По истечении 3 часов опять не оказалось заметного выделения кислорода.

Таким образом, неразбавленная кислота Каро не разлагается заметно при обыкновенной температуре ни сернистым марганцем, ни жидкостью, остающейся после титрования.

Этим доказывается, что избыток кислорода, найденный при титровании марганцовым ангидридом, может происходить только от разложения высшей перекисной кислоты.

Что касается природы этой кислоты, то мыслимо, что она получается из трех молекул надсерной кислоты таким же образом, как соль Шене из двух молекул перекиси водорода и одной молекулы двуокиси калия. Как известно, Шене<sup>6</sup> приготовил соединение  $K_2O_2 \cdot 2H_2O_2$ , которое очень легко переходит в четырехокись калия при отщеплении воды. В четырехокиси калия имеется только один активный атом кислорода, ибо при смешивании с водой или разбавленными кислотами она дает одну молекулу кислорода и одну молекулу двуокиси калия или перекиси водорода, — в последнем случае, по всей вероятности, с промежуточным образованием четырехокиси водорода. Следовательно, три активных атома кислорода этих трех молекул перекиси связаны в четырехокиси калия в соединение, аналогичное озону.

Таким же образом из трех молекул надсерной кислоты может получиться под действием высокой концентрации тройная молекула  $(HO_3S \cdot O \cdot O \cdot SO_3H)_3$ , которая содержит только один активный атом кислорода, реагирует с марганцовым ангидридом и при этом выделяет в 2 раза больше кислорода, чем вычисляется теоретически.

Если работать, согласно Бейеру, с  $H_2SO_4 + H_2O$ , то происходит частичный гидролиз с отщеплением серной кислоты и образуется  $(HO_3S \cdot O \cdot OH)_3$ , т. е. неразбавленная кислота Каро. При сильном разбавлении последняя распадается на простые молекулы  $HO_3S \cdot O \cdot OH$ , которые медленно реагируют с раствором перманганата и разлагаются катализаторами\*.

Кроме этих соображений, существуют еще и другие, подтверждающие, что неразбавленная кислота Каро содержит три соединенных между собой атома кислорода, или кислородное кольцо.

Если, например, прибавить концентрированной серной кислоты к двуокиси натрия при обыкновенной температуре, то выделяются большие количества озона. Если же проделать то же самое при сильном охлаждении, то выделения озона совершенно не происходит или происходит лишь очень слабо, и образуется кислота Каро. С другой стороны, кислота Каро самопроизвольно разлагается с выделением озона при стоянии.

Однако еще более характерный факт был отмечен Е. Бамбергером<sup>7</sup>: если нейтрализовать разбавленную кислоту Каро карбонатом калия и нагревать ее в присутствии катализатора — окиси серебра, двуокиси марганца и т. д., — то образуется озон. Таким образом, нейтрализованная

\* При обычной формуле перекиси водорода, рассматриваемой как два соединенных гидроксила, невозможно дать рациональные формулы для этих реакций. С моей точки зрения, все свойства перекисей лучше всего выражаются предложенной Книггетом формулой  $H_2O : O <$  на основе теории Брюля о четырехвалентности кислорода.

кислота Каро выделяет озон в тех же условиях, в которых другие перекиси выделяют просто кислород.

На основании всех этих соображений я решаюсь утверждать, что мои взгляды на кислоту Каро так же обоснованы, как и взгляды Бейера и Виллигера, но только мои взгляды относятся к неразбавленной кислоте, тогда как установленные Бейером и Виллигером факты относятся к разбавленной кислоте Каро. Это, однако, не означает, что неразбавленная кислота состоит исключительно из тройных молекул, в то время как разбавленная содержит только простые молекулы. Приведенные выше результаты анализа, с одной стороны, и опыт Бамбергера — с другой, показывают что обе формы существуют как в неразбавленной, так и в разбавленной кислоте, но только в первой содержится больше тройных молекул, чем во второй.

20 октября 1900 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., **33**, 1506 (1900); настоящая книга, стр. 259.
2. Armstrong. Proc. Chem Soc., **16**, 134 (1900).
3. Baeyer u. Williger. Ber. Dtsch. chem. Ges., **33**, 2491 (1900).
4. Baeyer u. Williger. Ber. Dtsch. chem. Ges., **33**, 1569 (1900).
5. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., **33**, 1506 (1900); настоящая книга, стр. 259.
6. Schoene. Lieb. Ann., **193**, 241 (1898).
7. Bamberger. Ber. Dtsch. chem. Ges., **33**, 1959 (1900).

## О ДЕЙСТВИИ БЕЗВОДНОЙ СЕРНОЙ КИСЛОТЫ НА СУХОЙ ПЕРСУЛЬФАТ КАЛИЯ

[*Ueber die Einwirkung von wasserfreier Schwefelsäure auf  
trocknes Kaliumpersulfat*] \*

В сообщении, появившемся ранее в настоящем журнале<sup>1</sup>, было показано, что при действии концентрированной серной кислоты на персульфат калия образуется жидкость, которая энергично реагирует с сухим перманганатом или с ангидридом марганцовой кислоты в сернокислом растворе при взаимном разложении и выделении кислорода. Одновременное титрование раствором марганцового ангидрида с известным содержанием активного кислорода и измерение выделяющегося кислорода показали, что при этом:

- 1) весь активный кислород, содержащийся в данном количестве персульфата, переходит в измерительную трубку и
- 2) выделенное количество кислорода на  $\frac{1}{3}$  превосходит количество, вычисленное по отношению  $Mn_2O_7 : 5 O$  (акт.):

$$\frac{\text{Вычисленное количество кислорода}}{\text{Найденное количество кислорода}} = \frac{1}{1.33}.$$

Как было показано специальными опытами, это количество выделяющегося кислорода не могло происходить от каталитического разложения образовавшейся надсерной кислоты; в условиях, в которых я производил опыты, вообще не бывает заметного каталитического разложения последней. Поэтому было сделано предположение, что в образующейся первоначально надсерной кислоте (перекисная серная кислота) происходит сначала процесс конденсации вследствие высокой концентрации: три молекулы надсерной кислоты образуют соединение, аналогичное соли Шене ( $K_2O_2 \cdot 2H_2O_2$ ) и четырехокси калия, которое содержит так же, как и последняя, тройное кислородное кольцо или цепь с одним только активным атомом кислорода. Под влиянием водной серной кислоты эта высшая надсерная кислота должна гидролизаться с отщеплением серной кислоты и частичным распадом на простые молекулы моносульфонадкислоты, которая была найдена Бейером и Виллигером в реактиве Каро.

Так как присутствие воды влияет на характер распада этой гипотетической высшей надсерной кислоты, то мне казалось желательным исследовать влияние серной кислоты на персульфат калия также и в отсутствие воды; я надеялся получить при этом такое вещество, которое бы давало с марганцовым ангидридом в 2 раза больше кислорода, чем рассчитанное теоретически из отношения  $Mn_2O_7 : 5 O$ .

\* Ber. Dtsch. chem. Ges., 34, 1520 (1901).

Опыты были произведены следующим образом:

Применявшаяся безводная серная кислота была приготовлена путем прибавления к чистой продажной серной кислоте, которая, как известно, содержит 1—2% воды, вычисленное количество дымящей серной кислоты. Для каждого опыта отвешивалось точно 0.4 г персульфата калия, хранившегося в эксикаторе над серной кислотой; персульфат калия помещался в тщательно высушенный сосуд для разложения описанного ранее прибора<sup>2</sup> (см. стр. 260) и смешивался с 2—3 см<sup>3</sup> безводной серной кислоты, после чего сосуд соединялся с измерительной аппаратурой. Вместо воды в газовую бюретку наливалась высушенная ртуть. После 20—60 минут стояния при многократном размешивании содержимое сосуда титровалось раствором марганцового ангидрида описанным выше способом, и выделявшийся газ собирался. За вычетом объема прибавленного перманганата и после пересчета на нормальные температуры и давление увеличение объема газа в газовой бюретке рассматривалось как соответствующее выделению сухого кислорода. Раствор марганцовокислого ангидрида приготовлялся путем растворения 1 г тонкоизмельченного сухого перманганата в 100 см<sup>3</sup> безводной серной кислоты. Содержание активного кислорода в этом растворе определялось титрованием солью Мора. Содержание активного кислорода в персульфате калия определялось при помощи горячего раствора соли Мора.

В следующей таблице приводятся полученные результаты.

*Титр раствора марганцового ангидрида: 1 см<sup>3</sup> = 0.002645 г O*

| Количество персульфата                                          | Количество раствора перманганата (см <sup>3</sup> ) | Температура (°C) | Давление (мм) | Выделяющийся кислород (см <sup>3</sup> ) |
|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|------------------|---------------|------------------------------------------|
| По 0.4 г персульфата, содержащего 0.02214 г активного кислорода | 5.0                                                 | 10               | 728           | 26.4                                     |
|                                                                 | 5.1                                                 | 10               | 728           | 26.7                                     |
|                                                                 | 4.9                                                 | 10               | 728           | 26.2                                     |
|                                                                 | 5.0                                                 | 10               | 728           | 26.4                                     |
| Среднее . . .                                                   | 5.0                                                 | —                | —             | 26.45                                    |

Выделившийся кислород, приведенный к 0° 760 мм . . . . . 24.25 см<sup>3</sup>

Объем кислорода, вычисленный по отношению

Mn<sub>2</sub>O<sub>7</sub> : 5 O (акт.) . . . . . 18.38 »

Избыток кислорода . . . . . 5.87 см<sup>3</sup>

$$\frac{\text{Вычисленное количество кислорода}}{\text{Найденное количество кислорода}} = \frac{1}{1.31}$$

И здесь имело место выделение всего активного кислорода, имеющегося в применявшемся персульфате.

Если предположить, что наблюдавшийся избыток кислорода принадлежит высшей надсерной кислоте и что каждая избыточная молекула кислорода соединяется с одним активным атомом кислорода, образуя озоноподобное тройное кольцо, то можно вычислить, что около  $\frac{5}{8}$  активного кислорода, содержащегося в персульфате, превращаются в высшую надсерную кислоту и  $\frac{3}{8}$  — в простую надсерную кислоту.

Эти данные в основном аналогичны тем, которые были получены с водной серной кислотой. Присутствие воды, как это ни странно, повидимому

не оказывает никакого влияния на образование и на распад надсерной кислоты, реагирующей с марганцовым ангидридом; понятно, что это имеет место только для данной продолжительности опыта и данного количества воды.

В связи с этим следует упомянуть совершенно неожиданный факт, что продукт воздействия безводной серной кислоты на сухой персульфат калия дает с титановой кислотой, растворенной в безводной серной кислоте такую же реакцию, как перекись водорода: при растирании сухого персульфата калия с сухой титановой кислотой и прибавлении безводной серной кислоты густая масса немедленно приобретает коричнево-желтое окрашивание. Так как надсерная кислота сама по себе не реагирует с титановой кислотой и так как о гидролизе надсерной кислоты с распадом на перекись водорода и на серную кислоту здесь не может быть и речи, то естественно напрашивается вывод, что при действии безводной серной кислоты на персульфат калия образуется соединение, которое ведет себя по отношению к марганцовой кислоте и титановой кислоте, как перекись водорода. Это тем более замечательно, что после разбавления при охлаждении льдом это соединение не дает больше реакции на титановую кислоту и очень медленно реагирует с перманганатом. По имеющимся до сих пор данным, можно было бы ожидать диаметрально противоположного поведения.

Во всяком случае это наблюдение вполне совместимо с допущением образования и последующего частичного распада высшей перекисной кислоты.

Вопрос о том, действительно ли распад надсерной кислоты является только частичным, т. е. содержит ли разбавленный продукт реакции (известная кислота Каро) еще молекулы высшей надсерной кислоты или ее производных, будет решен в дальнейших опытах.

14 мая 1901 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., **33**, 3111 (1900); настоящая книга, стр. 269.
2. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., **33**, 1506 (1900); настоящая книга, стр. 259.

---

## О МЕХАНИЗМЕ ДЕЙСТВИЯ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА НА МАРГАНЦОВУЮ КИСЛОТУ

[*Zur Kenntniss des Mechanismus der Einwirkung von Hydroperoxyd  
auf Permangansäure*] \*

В настоящее время для объяснения действия перекиси водорода на марганцовокислый калий в кислом растворе — реакции неоднократно описанной, но все еще загадочной, имеются две до известной степени противоположные гипотезы: гипотеза Траубе, согласно которой восстановление марганцовой кислоты обуславливается легкой окисляемостью водорода перекиси водорода, и гипотеза Бертелло, которая пытается объяснить одновременное восстановление перекиси водорода и марганцовой кислоты промежуточным образованием неустойчивой трехокиси водорода. В то время как первая из них до сих пор не имеет еще никакого экспериментального обоснования, вторая основывается на известном результате действия перекиси водорода на марганцовую кислоту при очень низких температурах. До последнего времени этот опыт казался достаточно убедительным, и гипотеза Траубе имела очень немного сторонников.

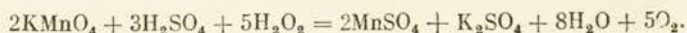
Бейер и Виллигер<sup>1</sup> повторили недавно опыт Бертелло и нашли, что прекращение выделения кислорода из перекиси водорода и марганцовой кислоты при  $-12^{\circ}$  обусловлено не образованием трехокиси водорода, устойчивой при этой температуре, а исключительно явлением пересыщения. Они считают ввиду этого гипотезу Бертелло несостоятельной и выступают как сторонники взглядов Траубе с следующим утверждением: «мы считаем, что при современном уровне наших знаний точка зрения Траубе лучше всего соответствует установленным фактам, и считали бы целесообразным, чтобы она была введена в элементарные учебники».

Я позволю себе привести, в противовес, наблюдения, которые, может быть, представляют некоторую ценность для понимания механизма действия перекисей водорода на марганцовую кислоту.

Я пытался подойти ближе к решению вопроса об этом механизме экспериментальным путем следующим образом.

В опубликованных за последнее время замечательных работах Бейера и Виллигера описан ряд производных перекиси водорода, одно из которых — этилзамещенная перекись водорода — казалось мне подходящим материалом для постановки опытов, имеющих целью суждение о гипотезе Траубе.

Как известно, перекись водорода реагирует с подкисленным раствором перманганата согласно следующему уравнению:



\* Ber. Dtsch. chem. Ges., 34, 3851 (1901).



Это уравнение так же подходит для гипотезы Бертелло, как и для гипотезы Траубе. Дело обстоит иначе, если употреблять вместо перекиси водорода однозамещенную перекись с трудноокисляемым радикалом, как гидроперекись этила. Если взгляды Траубе правильны, т. е. если реакция между перекисью водорода и марганцовой кислотой обуславливается только окисляемостью водорода перекиси, то при титровании гидроперекиси этила, которая должна содержать только один окисляемый атом водорода, должно расходоваться вдвое меньше раствора марганцовокислого калия, чем при титровании перекиси водорода.

Таким образом, если взгляды Траубе правильны, то при определении активного кислорода в точно отвешенных количествах гидроперекиси этила иодометрически, а затем титрованием перманганатом, — титрование перманганатом должно дать вдвое меньше активного кислорода, чем иодометрически. Само собою разумеется, что при этом необходимо учесть также и возможное окисление этиловой группы или этилового спирта, образующегося из гидроперекиси этила, которое надо определить в отдельных контрольных опытах.

Опыты, которые, принимая все меры предосторожности, я поставил с раствором гидроперекиси этила, приготовленной и очищенной по методу Бейера и Виллигера, дали приблизительно одинаковые результаты при иодометрическом титровании и при титровании перманганатом. Однако оказалось, что эти результаты нельзя рассматривать как решающие, ни против гипотезы Траубе, ни в пользу гипотезы Бертелло по следующим причинам:

При титровании гидроперекиси этила раствором перманганата наблюдается, что реакция идет вначале чрезвычайно медленно. Только по истечении 1—2 часов восстановление перманганата становится более энергичным и, наконец, происходит так же быстро, как при титровании перекиси водорода\*. Разумно было предположить, что образовавшийся сернокислый марганец играет существенную роль в ускорении реакции. Действительно, если прибавить заранее сернокислого марганца к гидроперекиси этила, то последняя ведет себя при титровании совершенно как перекись водорода. Поэтому весьма вероятно, что гидроперекись этила гидролизуеться в присутствии сернокислого марганца с образованием перекиси водорода, что лишает полученный выше результат его убедительности.

Таким образом, весьма трудоемкие опыты с гидроперекисью этила не привели к цели.

Для решения интересующего нас вопроса лучше исходить из сделанного мною ранее наблюдения<sup>2</sup>, что продукт реакции между безводной серной кислотой и персульфатом калия очень энергично реагирует с раствором марганцового ангидрида при взаимном разложении и выделении кислорода.

Этот продукт реакции представляет собою однозамещенную перекись водорода — моносульфонадкислоту  $HO_2S \cdot O \cdot OH$ , которая восстанавливает марганцовый ангидрид в условиях, в которых ее гидролиз с образованием перекиси водорода исключен. Согласно взглядам Траубе, это соединение должно потреблять вдвое меньше раствора марганцового ангидрида, чем раствор перекиси водорода с соответственным содержанием активного кислорода.

Описанные ранее опыты<sup>3</sup> выполнялись следующим образом: к 0.4 г сухого персульфата калия, содержащего 0.02214 г активного кислорода, прибавлялась безводная серная кислота; смесь титровалась раствором

\* Бейер и Виллигер [Ber. Dtsch. chem. Ges., 33, 2492 (1900)] наблюдали аналогичное явление при действии перманганата калия на разбавленную кислоту Каро.

марганцового ангидрида в безводной серной кислоте в отсутствии влаги, и соответственное количество выделяющегося кислорода собиралось над ртутью.

Раствор перекиси водорода с тем же содержанием активного кислорода должен был бы потреблять  $8.3 \text{ см}^3$  раствора марганцового ангидрида ( $1 \text{ см}^3 = 0.002645 \text{ г}$  кислорода) и выделять при этом  $30.8 \text{ см}^3$  кислорода. Если допустить, что водородный атом однозамещенной перекиси окисляется марганцовым ангидридом, то исследуемый продукт реакции должен был бы потреблять  $4.15 \text{ см}^3$  раствора марганцового ангидрида (вместо  $8.3 \text{ см}^3$ ), но выделять при этом  $30.8 \text{ см}^3$  кислорода (ибо, согласно Траубе, выделяющийся кислород получается только из группы  $\text{O} \cdot \text{O}$  перекиси).

Однако при титровании пошло  $5 \text{ см}^3$  раствора марганцового ангидрида и выделилось только  $24.25 \text{ см}^3$  кислорода (приведенного к  $0^\circ$  и  $760 \text{ мм}$ ).

Таким образом, продукт реакции потреблял больше марганцового ангидрида и выделял меньше кислорода, чем это соответствует гипотезе Траубе.

Этот недостаток кислорода ( $6.55 \text{ см}^3$ ) показывает уже, что кислород, освобождающийся при действии марганцовой кислоты на перекись водорода, выделяется не исключительно из группы  $\text{O} \cdot \text{O}$ , так как в противном случае выделение кислорода должно было бы быть при этом титровании независимым от потребления марганцового ангидрида и должно было бы составлять  $30.8 \text{ см}^3$ .

Как было указано выше, продукт реакции потреблял  $5 \text{ см}^3$  раствора марганцового ангидрида вместо  $8.3 \text{ см}^3$ , т. е. на  $3.3 \text{ см}^3$  меньше, чем раствор перекиси водорода с соответствующим содержанием активного кислорода. Если сопоставить этот недостаток марганцового ангидрида ( $0.008728 \text{ г} = 6.05 \text{ см}^3$  кислорода) и недостаток кислорода ( $6.25 \text{ см}^3$  кислорода), то оказывается, что обе величины почти в точности равны. Таким образом, недостаток кислорода определялся меньшим количеством потребленного марганцового ангидрида\*.

Таким образом, в противоположность взглядам Траубе, в выделении кислорода участвуют, повидимому, как марганцовая кислота, так и перекись водорода, причем каждый активный атом кислорода первой реагирует с одним активным атомом кислорода последней, образуя молекулу кислорода.

Если принять еще во внимание, что продукт реакции потреблял больше марганцового ангидрида, чем это необходимо для окисления одного атома водорода, то надо прийти к выводу, что в единственном случае, в котором взгляды Траубе можно было проверить экспериментально, полученные результаты не подтверждают эти взгляды.

Если учесть все факты, относящиеся к реакции между перекисью водорода и марганцовой кислотой, то гипотеза Бертелло кажется значительно рациональнее и более вероятной, чем гипотеза Траубе. Тот факт, что опыт Бертелло не доказывает еще существования трехокси водорода, ни в коем случае не может выдвигаться как аргумент против этой гипотезы, ибо известно много реакций, в которых промежуточные продукты реакций совершенно не могут быть изолированы. Так как в остальных отношениях

---

\* Причиной уменьшенного потребления марганцового ангидрида, по всей вероятности, является образование более высокой перекисной кислоты — производной чetyрехокси водорода, — так как при этом часть активного кислорода становится неактивной вследствие образования из трех атомов озоноподобного соединения, в котором только один атом кислорода активен.

гипотеза Бертелло почти безукоризненна, чего нельзя сказать о гипотезе Траубе\*, то не вполне понятно, почему нужно отдать предпочтение последней перед первой.

Во всяком случае для элементарных учебников ни та, ни другая гипотеза еще не подходит.

5 ноября 1901 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Баеуег и Williger. Ber. Dtsch. chem. Ges., **33**, 2488 (1900)
2. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., **33**, 3111 (1900); **34**, 1520 (1901); настоящая книга, стр. 269, 275.
3. Л. с. (2).

---

\* Допущение, что перекись водорода содержит легкоокисляющийся водород, непосредственно связанный с активным кислородом, кажется чрезвычайно мало вероятным.

## К ВОПРОСУ О СУЩЕСТВОВАНИИ ВЫСШИХ ПЕРЕКИСЕЙ ВОДОРОДА

[Zur Frage nach der Existenz höherer Hydroperoxyde] \*

В опубликованной недавно статье, Рамзей<sup>1</sup> утверждает, что он может доказать при помощи простых опытов, что в растворах перекиси, в которых я предположил существование высших перекисей водорода<sup>2</sup>, последние совершенно не могут существовать. В основе этого утверждения Рамзея лежит, как будет видно из изложенного ниже, любопытное недоразумение.

Рамзей нашел, что если прибавлять перекись водорода к избытку раствора перманганата в разбавленной серной кислоте, то выделяется больше кислорода, чем если наливать раствор перманганата в раствор перекиси, подкисленной серной кислотой. 2.2 см<sup>3</sup> раствора перекиси водорода, прибавленные в подкисленный раствор перманганата, выделили 43.49 см<sup>3</sup> и 43.76 см<sup>3</sup> кислорода. Если к 2.2 см<sup>3</sup> того же раствора перекиси водорода, подкисленного серной кислотой, прибавлять перманганат, то выделяется 33.47 см<sup>3</sup> и 33.59 см<sup>3</sup> кислорода. Соответственно этому в первом случае потребляется также больше перманганата, чем во втором; 2.2 см<sup>3</sup> перекиси водорода потребили после прибавления серной кислоты 20.1 см<sup>3</sup> перманганата калия, с другой стороны, на 40 см<sup>3</sup> подкисленного раствора перманганата идет 2.2 см<sup>3</sup> исходного раствора перекиси водорода. Если же применять уксусную кислоту вместо серной, то выделяется правильное количество кислорода и потребляется правильное количество перманганата, независимо от того, прибавляют ли раствор перекиси к подкисленному раствору перманганата или нейтральный раствор перманганата к подкисленному раствору перекиси. Эти опыты доказывают образование надсерной кислоты при действии перекиси водорода на серную кислоту.

Основываясь на своих наблюдениях, Рамзей думает объяснить полученные мною результаты, допуская, что сначала я титровал обычным способом подкисленный серной кислотой раствор перекиси водорода перманганатом, а затем определял освобождающийся кислород прибавлением исходного раствора перекиси водорода к подкисленному перманганату\*\*.

\* Ver. Dtsch. chem. Ges., 35, 158 (1902).

\*\* Соответственное место гласит: «Результаты Баха становятся понятными. Прибавляя перманганат известной концентрации к смеси перекиси водорода и серной кислоты, он думал, что определяет концентрацию перекиси в растворе. Но в действительности он употребил слишком мало перманганата, вследствие образования надсерной кислоты, и таким образом считал, что количество перекиси меньше, чем оно было в действительности. Кислорода, полученного при прибавлении перекиси к смеси перманганата и серной кислоты, было, следовательно, слишком много для кажущегося количества перекиси в растворе, и таким образом он предположил, что существует перекись водорода, содержащая больше кислорода, чем двуокись».

Конечно, при таких условиях я получил бы избыток кислорода. Но в действительности, как подробно указано в напечатанной мною работе<sup>2</sup>, мой метод исследования как раз в том и состоит, что в одной и той же операции титруют перекись перманганатом, а выделяющийся при этом кислород собирают и измеряют. Я даже собрал для этой цели аппаратуру, которая позволяет удобно и точно производить это определение.

Соображения Рамзея не имеют, таким образом, никакого отношения к моим опытам.

В связи с моим ответом<sup>3</sup> на критику, которой Армстронг<sup>4</sup> подверг мои выводы, я хочу привести здесь некоторые опыты, которые непосредственно доказывают, что при действии нормальной серной кислоты на перекись водорода не образуется, в противоположность взглядам Армстронга, надсерной кислоты. Так как, согласно Рамзею, применение уксусной кислоты при титровании перекиси водорода перманганатом дает несомненно правильные результаты, я поставил для сравнения опыты с нормальной уксусной кислотой.

Порции по 10 см<sup>3</sup> раствора чистой перекиси водорода были разбавлены (А) нормальной серной кислотой и (В) нормальной уксусной кислотой до 100 см<sup>3</sup>; пробы по 5 см<sup>3</sup> этих растворов титровали в описанном мною приборе раствором перманганата, при одновременном собирании выделяющегося кислорода. Полученные результаты приведены в нижеследующей таблице.

Титр раствора перманганата: 1 см<sup>3</sup> = 0.000952 г О

|                                                                                        | Потреблен-<br>ный раствор<br>перманганата | Выделившийся кислород<br>(10°, 719 мм) | Выделившийся кислород<br>(0°, 760 мм) | Вычислено          |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------|--------------------|
| (в см <sup>3</sup> )                                                                   |                                           |                                        |                                       |                    |
| (А)                                                                                    |                                           |                                        |                                       |                    |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> (N) . . .               | { 10.9<br>10.9<br>10.9<br>10.8            | { 15.6<br>15.3<br>16.4<br>15.3         | { —<br>—<br>—<br>—                    | { —<br>—<br>—<br>— |
| Среднее . .                                                                            | 10.87                                     | 15.4                                   | 14.05                                 | 14.40              |
| (В)                                                                                    |                                           |                                        |                                       |                    |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> (N) . . . | { 10.9<br>10.9<br>10.9<br>10.9            | { 15.2<br>15.5<br>15.3<br>15.3         | { —<br>—<br>—<br>—                    | { —<br>—<br>—<br>— |
| Среднее . .                                                                            | 10.9                                      | 15.33                                  | 13.93                                 | 14.44              |

Из этих опытов вытекает, что растворы перекиси водорода выделяют при титровании перманганатом в присутствии как нормальной серной, так и нормальной уксусной кислоты количество кислорода, соответствующее теории. При действии нормальной серной кислоты на перекись водорода, следовательно, не образуется соединения, которое неспособно реагировать с перманганатом («надсерная кислота»). Этот результат был далее подтвержден титрованием перманганата перекисью водорода.

10 см<sup>3</sup> исходного раствора перекиси были разбавлены водой до 100 см<sup>3</sup> (B), и полученный раствор перелит в бюретку прибора. Затем 21.8 см<sup>3</sup> раствора перманганата (количество в два раза больше теоретического) были налиты в сосуд для разложения вместе с 10 см<sup>3</sup> нормальной серной кислоты, после чего было прибавлено 5 см<sup>3</sup> раствора перекиси водорода. Получены следующие результаты:

(B) 13.2 13.6 13.4 13.1 см<sup>3</sup>; среднее 13.32 см<sup>3</sup> O (привед.)  
вычислено 14.44 »

Из сказанного надо сделать вывод, что избыток кислорода, который я получил при анализе раствора перекиси, приготовленного из четырехоксида калия и нормальной серной кислоты, происходит не от каталитического распада соединения, не реагирующего с перманганатом.

23 декабря 1901 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ramsay. J. Chem. Soc., 1326 (1901).
2. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., **33**, 1506 (1900); настоящая книга, стр. 259.
3. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., **33**, 3111 (1900); настоящая книга, стр. 269.
4. Armstrong. Proc. Chem. Soc., **16**, 134 (1900).

---

## О ДЕЙСТВИИ ХРОМОВОЙ КИСЛОТЫ НА ПЕРЕКИСЬ ВОДОРОДА

[*Ueber das Verhalten der Chromsäure gegen Hydroperoxyd*] \*

Количественное изучение действия хромовой кислоты на перекись водорода было поставлено с целью получить данные, касающиеся механизма действия окислителей на перекись водорода<sup>1</sup>.

В настоящей статье я изложу полученные мною результаты.

Хромовая кислота ведет себя различно по отношению к перекиси водорода в зависимости от того, протекает ли реакция в отсутствии или в присутствии кислот. В то время как в первом случае хромовая кислота может разложить неограниченные количества перекиси водорода при образовании красно-коричневого промежуточного продукта\*\* и сама при этом не восстанавливается, во втором случае между обоими соединениями протекает обыкновенная химическая реакция: хромовая кислота восстанавливается в соли окиси хрома при промежуточном образовании известного синего соединения.

### ДЕЙСТВИЕ ХРОМОВОЙ КИСЛОТЫ НА ПЕРЕКИСЬ ВОДОРОДА В ОТСУТСТВИИ КИСЛОТ

Если смешать чистую хромовую кислоту с чистой перекисью водорода, не содержащей кислоты, то желто-оранжевая жидкость приобретает темный коричнево-красный цвет, который понемногу исчезает при выделении кислорода и уступает место первоначальному оранжевому окрашиванию.

Количественные опыты проводились следующим образом.

Раствор хромовой кислоты, содержащий в 10 см<sup>3</sup> 19.2 мг свободного кислорода, приготовлялся путем разложения точной навески чистой бихромата калия стехиометрическим количеством децинормальной серной кислоты. По титру этой хромовой кислоты устанавливался раствор гипосульфита, а по последнему — раствор иода. С другой стороны, был приготовлен раствор перекиси водорода, содержащий в 1 см<sup>3</sup> 5 мг активного кислорода. В сосуд для разложения описанного ранее аппарата<sup>2</sup> наливались различные, но точно отмеренные количества раствора перекиси водорода, после чего в него прибавлялось из бюретки по 10 см<sup>3</sup> раствора хромовой кислоты; раствор взбалтывался до полного прекращения выделения кислорода. После отсчета объема кислорода жидкость переводилась в стакан, сосуд промывался 150 см<sup>3</sup> воды, и в соединенных растворах

\* Ber. Dtsch. chem. Ges., 35, 872 (1902).

\*\* Образование этого промежуточного продукта уже было отмечено Бертело (C. R. Acad. Sci., Paris, 108, 477).

титровалась иодометрически неразложившаяся хромовая кислота. Таким путем были получены следующие результаты (в мг):

| Свободный кислород в растворе хромовой кислоты | Активный кислород в растворе перекиси водорода | Выделившийся кислород | Свободный кислород в реакционной жидкости |
|------------------------------------------------|------------------------------------------------|-----------------------|-------------------------------------------|
| 19.2                                           | 5.0                                            | 4.62                  | 18.81                                     |
| 19.2                                           | 10.0                                           | 9.26                  | 18.40                                     |
| 19.2                                           | 15.0                                           | 14.17                 | 18.63                                     |
| 19.2                                           | 20.0                                           | 19.46                 | 18.76                                     |

Как видно из этих данных, при действии хромовой кислоты на перекись водорода в отсутствии кислот выделяется количество кислорода, соответствующее содержанию активного кислорода в перекиси водорода. Хромовая кислота при этом практически не изменяется.

#### ДЕЙСТВИЕ ХРОМОВОЙ КИСЛОТЫ НА ПЕРЕКИСЬ ВОДОРОДА В ПРИСУТСТВИИ КИСЛОТ

Бауман<sup>3</sup> разработал газообъемный метод количественного определения хромовой кислоты, основанный на предположении, что при действии хромовой кислоты на перекись водорода в присутствии серной кислоты на каждую молекулу хромовой кислоты выделяются 4 атома кислорода. Согласно Мархлевскому<sup>4</sup>, предположение Баумана не вполне правильно, так как при этой реакции всегда выделяется несколько меньше кислорода. Мои опыты подтвердили данные Мархлевского и показали, что на каждую молекулу хромовой кислоты выделяются не 4, а точно  $3\frac{1}{2}$  атома кислорода.

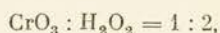
Опыты проводились с теми же растворами и в тех же условиях, как и выше, с той только разницей, что в сосуд для разложения одновременно с раствором перекиси водорода вводилось 5 см<sup>3</sup> нормальной серной кислоты. Полученные результаты приведены в следующей таблице.

| Свободный кислород в растворе хромовой кислоты | Активный кислород в растворе перекиси водорода | Выделившийся кислород | Кислород из хромовой кислоты, вступивший в реакцию |                | Отношение<br>$\text{CrO}_3 : \text{H}_2\text{O}_2$ |
|------------------------------------------------|------------------------------------------------|-----------------------|----------------------------------------------------|----------------|----------------------------------------------------|
|                                                |                                                |                       | Газоволюмометрически                               | Иодометрически |                                                    |
| (в мг)                                         |                                                |                       |                                                    |                |                                                    |
| 19.2                                           | 5.0                                            | 8.56                  | 3.56                                               | 3.70           | 1:2.10                                             |
| 19.2                                           | 10.0                                           | 16.66                 | 6.66                                               | 6.84           | 1:2.25                                             |
| 19.2                                           | 15.0                                           | 25.98                 | 10.98                                              | 10.22          | 1:2.09                                             |
| 19.2                                           | 20.0                                           | 34.34                 | 14.34                                              | 15.04          | 1:2.08                                             |
| 19.2                                           | 25.0                                           | 43.34                 | 18.34                                              | 18.26          | 1:2.04                                             |
| 19.2                                           | 30.0                                           | 44.88                 | 19.20<br>(избыток перекиси водорода)               |                | 1:2.00*                                            |

\* В этом случае вступивший в реакцию кислород из перекиси водорода определялся из разности между выделившимся кислородом и кислородом взятого количества хромовой кислоты.

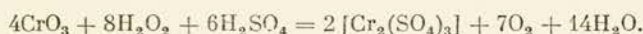


К этой таблице надо сделать следующее примечание: вступивший в реакцию кислород из хромовой кислоты определялся, с одной стороны, вычислением из разности между выделившимся кислородом и активным кислородом в данном количестве перекиси водорода, с другой стороны, непосредственно иодометрическим титрованием. Как только количество перекиси водорода превосходило количество, соответствующее отношению



в оставшейся жидкости можно было путем титрования перманганатом обнаружить избыток перекиси водорода.

Из этой таблицы видно, что при действии хромовой кислоты на перекись водорода в присутствии серной кислоты происходит взаимное восстановление обоих соединений, причем на каждую молекулу хромовой кислоты восстанавливаются две молекулы перекиси водорода. Реакция, следовательно, протекает согласно следующему уравнению:



Количественное взаимодействие хромовой кислоты и перекиси водорода можно продемонстрировать следующим простым опытом.

Определенное количество произвольного раствора перекиси водорода разлагается перманганатом калия и серной кислотой обычным способом; выделяющийся кислород собирается и измеряется. При смешивании такого же количества того же раствора перекиси водорода с избытком хромовой кислоты, один раз в отсутствии, а другой раз в присутствии серной кислоты, в первом случае получается ровно  $\frac{1}{2}$ , а во втором —  $\frac{7}{8}$  количества кислорода, выделившегося в присутствии перманганата. Из разности легко вычислить отношение хромовой кислоты и перекиси водорода, вступающих в реакцию. Так, например:

5 см<sup>3</sup> раствора перекиси водорода выделяют с перманганатом 36.8 см<sup>3</sup> O (не прив.)

5 » того же раствора выделяют с хромовой кислотой:

в отсутствии серной кислоты . . . . . 18.2 »

в присутствии серной кислоты . . . . . 31.4 »

Кислород из хромовой кислоты, вступивший в реакцию . . . 13.2 »

$$\frac{\text{Хромовая кислота}}{\text{Перекись водорода}} = \frac{13.2 \times 2}{18.2 \times 2} = \frac{1}{2.09}.$$

### ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

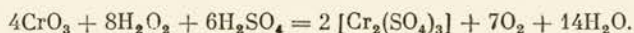
Данные о взаимодействии хромовой кислоты и перекиси водорода существенны для оценки гипотез, которые были предложены для объяснения действия окислителей на перекись водорода. Среди этих гипотез особенное значение имеют гипотезы Траубе и Бертело.

Согласно Траубе, при действии перманганата калия или окиси серебра на перекись водорода окисляется водород последней и выделяется кислород. В смысле взглядов Траубе, при действии хромовой кислоты на перекись водорода первая должна была бы восстановиться до окиси хрома, а из последней должен был бы выделиться весь кислород. Однако это не имеет места. Как было показано выше, в отсутствии кислоты хромовая кислота остается совершенно неизменной, в то время как из перекиси водорода выделяется половина содержащегося в ней кислорода, т. е. только активный кислород.

Поведение хромовой кислоты по отношению к перекиси водорода в присутствии кислот также несовместимо с гипотезой Траубе. Хотя при этом и происходит восстановление хромовой кислоты в окись хрома, но восстановленное количество меньше, чем должно было бы соответствовать окислению вступившей в реакцию перекиси водорода. Согласно указанной гипотезе, реакция должна была бы протекать по уравнению:



В действительности же она протекает согласно уравнению:



Таким образом, потребляется меньше хромовой кислоты и выделяется меньше кислорода, чем было бы необходимо для первого уравнения. Эти данные, повидимому, полностью опровергают гипотезу Траубе.

Однако и гипотеза Бертелло не соответствует поведению хромовой кислоты по отношению к перекиси водорода. Если объяснять восстановление хромовой кислоты в присутствии кислот промежуточным образованием неустойчивой трехокиси водорода, то нужно было бы допустить, что из восьми молекул перекиси водорода, вступающих в реакцию, шесть соединяются со свободным кислородом хромовой кислоты, образуя гипотетическую трехокись водорода, в то время как две остальные разлагаются каким-то другим путем, — мне это кажется мало вероятным.

Не подлежащее сомнению промежуточное образование высшего окисла хрома при действии хромовой кислоты на перекись водорода позволяет, с моей точки зрения, объяснить значительно проще разложение перекиси водорода окислами более или менее высокой степени окисления. А именно, можно допустить, что при этом образуется в качестве промежуточного продукта высший окисел не водорода, а вступающего в реакцию элемента. В некоторых случаях (U, V, Ti, Mo, W, Nb, Ta)<sup>5</sup> этот промежуточный продукт довольно устойчив, в других случаях (Cr) он неустойчив, но, благодаря характерному окрашиванию, его существование не вызывает сомнений; наконец, в некоторых случаях (Ag, Hg, Pt, Pb, Mn) образования промежуточного соединения не удастся обнаружить при помощи внешних признаков.

Образование высших окислов, повидимому, играет такую же роль при так называемом каталитическом распаде, как и при нормальном разложении перекиси водорода. Эти процессы можно представить себе следующим образом.

В обоих случаях первоначально образуется один и тот же промежуточный продукт путем присоединения перекиси водорода к вступающему в реакцию веществу. В отсутствии кислот этот промежуточный продукт распадается таким образом, что выделяется избыточный кислород, происходящий из перекиси водорода, и восстанавливается в первоначальное вещество. В присутствии кислот промежуточный продукт претерпевает более глубокое разложение, сопровождающееся выделением кислорода и образованием соответственной соли. Если данное соединение содержит более слабо связанный (подвижный) кислород ( $\text{MnO}_2$ ,  $\text{PbO}_2$ ,  $\text{MnO}_4\text{H}$ ,  $\text{CrO}_3$ ), то он выделяется одновременно с активным кислородом, образующимся из перекиси водорода.

Таким образом, между каталитическим распадом и разложением перекиси водорода при нормальной химической реакции, повидимому, нет принципиальной разницы.

Из взаимодействия хромовой кислоты и перекиси водорода в присутствии кислот было выведено отношение реагирующих молекул:

$$\frac{\text{Хромовая кислота}}{\text{Перекись водорода}} = \frac{1}{2}.$$

Представляло бы интерес выяснить, соответствует ли то же самое отношение действию хромовой кислоты на перекись водорода в отсутствии кислот, т. е., другими словами, имеет ли промежуточный продукт в обоих случаях один и тот же состав.

10 февраля 1902 г.

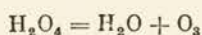
#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., **34**, 3851 (1901); настоящая книга, стр. 278.
2. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., **33**, 1507 (1900); настоящая книга, стр. 260.
3. Ваушанн. Zs. angew. Chem., 135—142 (1891).
4. Мархлевский. Zs. angew. Chem., 392—395 (1891).
5. Меликов и Писсаржевский. Изв. Акад. Наук [8], **9**, № 8.

## ЧЕТЫРЕХОКИСЬ ВОДОРОДА И ОЗОНОВАЯ КИСЛОТА

[*Hydrotetroxyd und Ozonsäure*] \*

При исследовании медленного окисления водорода *in statu nascendi*, выделяющегося из гидрида палладия<sup>1</sup>, я сделал некоторые наблюдения, которые, повидимому, лучше всего можно объяснить, если допустить образование четырехокси водорода. Последняя должна образовываться путем соединения двух ненасыщенных радикалов  $\text{H} \cdot \text{O} \cdot \text{O} \cdot$  и  $\cdot \text{O} \cdot \text{O} \cdot \text{H}$  и распадаться согласно уравнению:

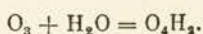


на воду и озон и поэтому обладать более энергичной окислительной способностью, чем перекись водорода.

В более поздней работе<sup>2</sup> я пытался установить экспериментально существование четырехокси водорода. При разложении четырехокси калия разбавленной серной кислотой, при хорошем охлаждении я получил очень неустойчивый раствор перекиси, который выделял при титровании перманганатом калия на 50% больше кислорода, чем соответствовало количеству потребленного перманганата. По всей вероятности, в растворе находилась гипотетическая четырехокись водорода, которая должна образовываться при действии кислоты на четырехокись калия, так же как перекись водорода образуется из двуокиси натрия:



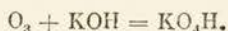
В последнем номере настоящего журнала Бейер и Виллигер<sup>3</sup> напечатали сообщение об «озоновой кислоте», которое находится в тесной связи с указанными выше исследованиями. При пропускании кислорода, содержащего озон, над твердой гидроокисью калия они получили оранжево-коричневое вещество, которое они называют калийной солью озоновой кислоты и считают тождественным с четырехокисью калия. Повидимому, то же самое соединение получается, если пропускать кислород, содержащий озон, через едкое кали при охлаждении. Свободная озоновая кислота, соответствующая озонвокислороду калию, повидимому является гидратом озона:



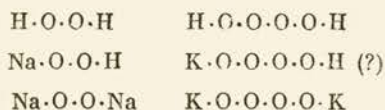
Легко видеть, что озоновая кислота Бейера и Виллигера представляет собою не что иное, как четырехокись водорода, существование которой я впервые предположил.

\* Ber. Dtsch. chem. Ges., 35, 3424 (1902).

Так же как и двуокись водорода, четырехокись водорода должна обладать кислыми свойствами и давать вполне определенные соли. Из последних до настоящего времени известны четырехокись калия и четырехокись рубидия. Однако представляется вероятным, судя по способу приготовления, что продукт, полученный Бейером и Виллигером, является не четырехокисью калия, а продуктом присоединения одной молекулы озона и одной молекулы едкого кали, т. е. кислой солью четырехокиси водорода:



Если это предположение подтвердится, то аналогия между солями воуокиси водорода и солями четырехокиси была бы полной:



Из сказанного выше следует, что обозначение «озоновая кислота» нужно рассматривать как однозначное с обозначением «четыреокись водорода».

9 октября 1902 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бах. О роли перекисей в процессах медленного окисления [Du rôle des peroxydes dans les phénomènes d'oxydation lente].— C. R. Acad. Sci., Paris, **124**, 95 (1897); Mon. Sci., 479 (1897); настоящая книга, стр. 242.
2. Бах. О высших перекисях водорода [Ueber höhere Wasserstoffsperoxyde].— Ber. Dtsch. chem. Ges., **33**, 1506 (1900); настоящая книга, стр. 259.
3. Bayer u. Williger. Ber. Dtsch. chem. Ges., **35**, 3038 (1902).

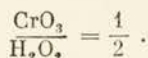
## О ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ХРОМОВОЙ КИСЛОТЫ С РЕАКТИВОМ КАРО

[*Ueber das Verhalten der Chromsäure gegen das Caro'sche Reagens*] \*

В связи с опубликованными мною ранее опытами<sup>1</sup>, относящимися к изучению взаимодействия хромовой кислоты и перекиси водорода, было также исследовано взаимодействие хромовой кислоты и реактива Каро.

Как известно, продукт реакции концентрированной серной кислоты на персульфат калия, разбавленный льдом, не оказывает никакого действия на раствор хромовой кислоты. В противоположность этому я нашел, что неразбавленный реактив очень энергично восстанавливает хромовую кислоту, сухую или в сернокислом растворе, с выделением кислорода и образованием сернокислого хрома. Это взаимодействие вполне аналогично взаимодействию реактива Каро с перманганатом калия. В разбавленном состоянии реакция с перманганатом протекает чрезвычайно медленно. При смешивании неразбавленного реактива с кристаллическим перманганатом калия или с марганцовым ангидридом в сернокислом растворе, наоборот, происходит почти моментально взаимное восстановление с выделением кислорода. Как я установил многочисленными опытами<sup>2</sup>, выделяющееся при этом количество кислорода ровно на  $\frac{1}{3}$  превосходит то, которое выделялось бы из данного количества марганцового ангидрида при реакции с перекисью водорода. Тот же избыток кислорода получился также и при действии безводной серной кислоты на сухой персульфат калия<sup>3</sup> при проведении всех операций в отсутствии влаги, т. е. в таких условиях, когда не мог иметь место гидролиз. Я пытался объяснить этот результат, предположив, что под действием высокой концентрации три молекулы свободной надсерной кислоты соединяются, образуя высшую надсерную кислоту, аналогичную четырехокиси калия и содержащую озоноподобную кислородную цепь.

Изучение взаимодействия хромовой кислоты с неразбавленным реактивом Каро позволило мне подвергнуть дальнейшей проверке правильность этого предположения. Действительно, если бы в реактиве существовала высшая надсерная кислота, то она должна была бы давать с хромовой кислотой такой же избыток кислорода, как и с марганцовой кислотой. Поставленные опыты показали, однако, к моему удивлению, что потребленное количество хромовой кислоты и выделившееся количество кислорода в точности соответствуют установленному для перекиси водорода отношению реагирующих молекул:



\* Ber. Dtsch. chem. Ges., 35, 3940 (1902).

Точные навески персульфата калия, содержащего определенное количество активного кислорода, смешивались в сосуде для разложения неоднократно упоминавшегося аппарата с концентрированной серной кислотой; после растворения соли из бюретки прибавлялся избыток раствора хромовой кислоты. Последний приготавливался путем растворения чистой хромовой кислоты в концентрированной серной кислоте; содержание активного кислорода определялось иодометрически обычным образом. По окончании выделения кислорода отсчитывался объем кислорода; зеленая жидкость переводилась в стакан; сосуд промывался 150 см<sup>3</sup> воды, после чего в жидкости и в промывной воде определялась иодометрически неиспользованная хромовая кислота. Эти измерения дали следующие результаты (в мг):

| Количество перекисного кислорода                  | Потребленный кислород из хромовой кислоты | Выделившийся кислород |
|---------------------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------|
| 22.86                                             | 17.0                                      | 39.32                 |
| 25.04                                             | 18.22                                     | 43.41                 |
| 24.62                                             | 17.63                                     | 42.38                 |
| 22.25                                             | 16.21                                     | 39.02                 |
| Среднее . . . 23.69                               | 17.26                                     | 41.03                 |
| Вычислено для H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 23.69 | 17.77                                     | 41.46                 |

Из этих опытов вытекает, что неразбавленный реактив Каро ведет себя по отношению к хромовой кислоте в точности так же, как перекись водорода. Предположение, что в реактиве имеется высшая надсерная кислота, таким образом, не подтверждается.

Для сравнения реактив Каро, приготовленный таким же образом, как указано выше, был протитрован марганцовым ангидридом в сернокислом растворе. Приводим результаты (в мг):

| Количество перекисного кислорода | Потребленный кислород из перманганата | Выделившийся кислород |
|----------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|
| 23.61                            | 13.91                                 | 37.02                 |
| 22.56                            | 13.42                                 | 35.60                 |
| 24.81                            | 14.90                                 | 39.42                 |
| 23.66                            | 14.09                                 | 37.34                 |

С перекисью водорода это количество марганцового ангидрида выделило бы 28.18 мг  
Избыток кислорода . . . . . 9.16 »

$$\frac{\text{Вычисленное количество кислорода}}{\text{Найденное количество кислорода}} = \frac{1}{1.32}$$

При титровании неразбавленного реактива Каро марганцовой кислотой получается, таким образом, такой же избыток кислорода, как и в предыдущих опытах.

Как же можно объяснить появление этого избытка кислорода?

Так как предположение о существовании высшей надсерной кислоты в реактиве Каро не оправдывается, то естественнее всего предположить, что реакция между марганцовой кислотой и перекисью протекает в концентрированной серной кислоте иначе, чем в водном растворе. В последнем случае, как известно, на каждый атом активного кислорода перманганата восстанавливается одна молекула перекиси. Если принять во внимание найденный выше избыток кислорода, то получается, что в серно-кислом растворе на каждый атом марганцовой кислоты в реакцию вступает не одна молекула перекиси водорода, а  $1\frac{2}{3}$ . Таким образом, в то время как при реакции в водном растворе имеет место отношение:

$$\frac{\text{Кислород из марганцовой кислоты}}{\text{Кислород из перекиси}} = \frac{1}{1},$$

для реакции в концентрированной серной кислоте надо принять отношение:

$$\frac{\text{Кислород из марганцовой кислоты}}{\text{Кислород из перекиси}} = \frac{3}{5}.$$

Что же касается химической природы реактива Каро, то из его поведения по отношению к марганцовой, хромовой и титановой кислоте вытекает, что он обладает различными свойствами в разбавленном и в неразбавленном состоянии. В то время как в неразбавленном состоянии он чрезвычайно энергично реагирует с указанными соединениями, он совершенно неактивен по отношению к ним, будучи разбавленным. Остается невыясненным, оказывает ли присутствие воды задерживающее действие на реакцию. Такого рода влияние в данном случае кажется мало вероятным.

5 ноября 1902 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., **35**, 872 (1902); настоящая книга, стр. 285.
2. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., **33**, 3111 (1900); настоящая книга, стр. 269.
3. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., **34**, 1520 (1901); настоящая книга, стр. 275.

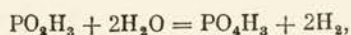


---

## РАСЩЕПЛЕНИЕ ВОДЫ ФОСФОРНОВАТИСТОКИСЛЫМИ СОЛЯМИ В ПРИСУТСТВИИ ПАЛЛАДИЯ В КАЧЕСТВЕ КАТАЛИЗАТОРА

[*Spaltung des Wassers durch Hypophosphite in Gegenwart von Palladium als Katalysator*] \*

В связи с некоторыми исследованиями о восстановительных ферментах мне пришлось заняться реакциями, при которых наступает расщепление воды с выделением водорода. Одна из этих реакций представляет особый интерес, так как она связана с образованием восстановителя, легко распадающегося с выделением водорода. Это — реакция между сернокислой медью и фосфорноватистой кислотой, открытая Вюрцом<sup>1</sup> 64 года тому назад. При нагревании до 60° концентрированного раствора сернокислой меди с концентрированным раствором фосфорноватистой кислоты Вюрц получил водородистую медь и фосфорную кислоту. Аналогичный результат получается при применении гипофосфита вместо свободной кислоты. Я нашел, что превращение происходит также и при обыкновенной температуре, если растереть фосфорноватисто-кислый натрий с сернокислой медью и оставить смесь на некоторое время. Что реакция протекает с расщеплением воды, видно из того, что она происходит и в отсутствие кислорода. Если не принимать во внимание металлов, то реакцию можно выразить уравнением:



т. е. имеет место расщепление воды окисляемым веществом в присутствии другого вещества, обладающего способностью временно связывать водород, вследствие чего могут возникнуть восстановительные процессы. Принимая во внимание присутствие многочисленных и разнообразных окисляемых веществ в растительных и животных организмах, вполне мыслимо, что аналогичная система лежит также и в основе жизненных восстановительных процессов.

Мы привыкли в настоящее время к мысли, что наиболее существенные биохимические процессы происходят при содействии катализаторов (ферментов), поэтому интересно отметить, что упомянутые выше реакции могут происходить также и каталитически. Давно известно, что восстановление растворимых солей палладия гипофосфитами происходит с выделением водорода, но Энгель<sup>2</sup> первый обратил внимание на ненормальное отношение между количеством палладия и количеством выделившегося водорода. Так, например, 0.5 г палладия вызывало превращение 500 г гипофосфита бария с выделением соответственного количества водорода. Однако реакция не была исследована им подробнее. Он считает, что фосфорноватистая

\* Ber. Dtsch. chem. Ges., 42, 4463 (1909).

кислота количественно превращается в фосфористую; фосфорная кислота в продуктах реакции не была найдена.

Я произвел некоторые опыты, относящиеся к расщеплению воды системой «гипофосфит — палладий» и получил результаты, представляющие значительный интерес для понимания катализа и его связи с действием ферментов. Эти результаты я здесь и привожу.

Сначала я попытался точно определить природу продуктов реакции.

К 10 см<sup>3</sup> раствора гипофосфита натрия, содержащего по иодометрическим определениям 0.7719 г гипофосфита натрия, было прибавлено 0.01 г палладиевой черни; выделяющийся водород собирался и измерялся. После прекращения выделения водорода жидкость фильтровалась количественно в мерную колбу на 100 см<sup>3</sup>, и в фильтрате определялась обычным способом иодометрически фосфористая кислота.

*Количество потребленного иода:*

|                                                                                                 |                       |             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-------------|
| До катализа . . . . .                                                                           | 349.6 см <sup>3</sup> | 0.1 н. иода |
| Вычислено для превращения PO <sub>2</sub> H <sub>3</sub> в PO <sub>3</sub> H <sub>3</sub> . . . | 174.8 »               | 0.1 » »     |
| После катализа . . . . .                                                                        | 166.4 »               | 0.1 » »     |

*Количество выделившегося водорода:*

|                                                                                             |                       |               |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|---------------|
| Вычислено для превращения PO <sub>2</sub> H <sub>3</sub> в PO <sub>3</sub> H <sub>3</sub> . | 186.4 см <sup>3</sup> | при 0° 760 мм |
| Получено 224.7 при 17° и 720 мм, т. е. . . .                                                | 195.8 »               | » 0° 760 »    |

Таким образом, было получено меньше фосфористой кислоты и больше водорода, чем соответствует стехиометрическому превращению применявшейся фосфорноватистой кислоты в фосфористую. В соответствии с этими аналитическими данными мне удалось, в противоположность результатам Энгеля, доказать с полной достоверностью посредством магниезальной смеси присутствие фосфорной кислоты в жидкости. Катализ, таким образом, не останавливается на фосфористой кислоте, хотя последняя и является главным продуктом реакции.

Скорость расщепления воды, в зависимости от концентрации катализатора, с одной стороны, и гипофосфита, с другой, определялась по выделению водорода в единицу времени. Методы количественного определения фосфорноватистой, фосфористой и фосфорной кислоты настолько сложны, что они практически неприменимы для изучения скорости реакции. Опыты производились следующим образом.

Применялся раствор гипофосфита натрия, содержащий по иодометрическому определению 0.19297 г гипофосфита натрия в 1 см<sup>3</sup>, и раствор хлористого палладия, приготовленный путем растворения чистого палладия обычным способом и содержащий 0.0004 г палладия на 1 см<sup>3</sup>. Реакция производилась в тонкостенном стеклянном цилиндре на 25 см<sup>3</sup>, соединенном посредством резиновой пробки и дважды согнутой стеклянной трубки с газовой бюреткой. Бюретка с уравнительной трубкой была наполнена ртутью. Объем жидкости составлял 10 см<sup>3</sup>. Опыты производились одновременно в трех приборах. После установления уровня бюреток на нуле из кранов вынимались пробки и в сосуды наливалось последовательно вычисленное количество воды, возрастающие количества хлористого палладия и по 4 см<sup>3</sup> раствора гипофосфита натрия (0.7719 г гипофосфита натрия); сосуды быстро закрывались и помещались в большую водяную баню при комнатной температуре, после чего пробки кранов вставлялись на место. Отсчеты производились через определенные промежутки времени после установления уровня, с учетом температуры и атмосферного давления.

Полученные таким образом данные представлены в виде кривых на рис. 1.

Из этих данных прежде всего следует, что скорость реакции при постоянном количестве гипофосфита возрастает значительно быстрее, чем количество палладия. Выделение 150 см<sup>3</sup> водорода (около полного пре-

вращения) происходило в различных опытах через следующие промежутки времени:

|                | A<br>1 | B<br>2 | C<br>3 | D<br>4 | E<br>5 | F<br>6 |
|----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Часы . . . . . | 160.0  | 20.1   | 11.0   | 5.5    | 4.2    | 3.0    |
| Вычислено . .  | 160.0  | 80.0   | 53.3   | 40.0   | 32.0   | 26.6   |

Оказывается далее, что в пределах отдельного опыта, т. е. при постоянном количестве палладия, скорость реакции падает скорее, чем концентрация гипофосфита натрия: кривые не прямолинейны, как это имеет место при незамедленных химических реакциях, а становятся понемногу менее крутыми и делаются, наконец, почти параллельными оси абсцисс. Это отклонение от закона действующих масс не может быть приписано уменьшению активности катализатора под влиянием продукта реакции, ибо при прибавлении гипофосфита натрия происходит дальнейшее выделение водорода. Если прибавить, с другой стороны, к исчерпанной реакционной жидкости раствор хлористого палладия, то последний быстро восстанавливается образовавшейся фосфористой кислотой, но после этого нет дальнейшего выделения водорода. Ход реакции, следовательно, нарушен каким-то образом, независимо от катализатора.

Зависимость скорости реакции от концентрации гипофосфита была также определена описанным выше способом. Опыты производились с 0.002 г палладия и возрастающими количествами гипофосфита и изображены кривыми рис. 2.

Из рис. 2 видно, что скорость реакции хотя и возрастает с концентрацией гипофосфита, но значительно медленнее, чем последняя. Расщепление воды системой «гипофосфит — палладий», таким образом, отклоняется от простых законов как в отношении концентрации палладия, так и в отношении концентрации гипофосфита. Однако наблюдающиеся отклонения имеют противоположные направления: скорость реакции возрастает скорее, чем концентрация палладия, и медленнее, чем концентрация гипофосфита. Соотношения здесь довольно сложны и могут быть выяснены только путем дальнейших опытов.

Среди других особенностей системы «гипофосфит — палладий» следует еще упомянуть ее отравление синильной кислотой. Если прибавить к гипофосфиту натрия небольшое количество цианистого калия до смешивания с хлористым палладием, то совершенно не наблюдается выделения водорода и, кроме того, не происходит восстановления соли палладия в металлический палладий; смесь остается прозрачной и бесцветной, ибо образующийся цианистый палладий не восстанавливается гипофосфитом натрия. Если прибавлять затем к бесцветной смеси по каплям раствор хлористого пал-

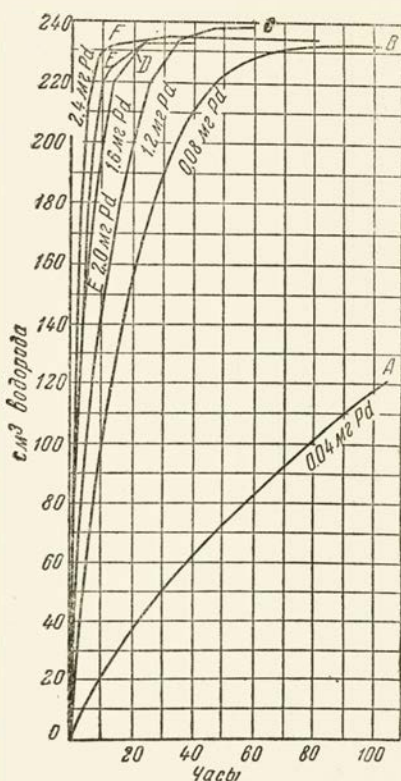


Рис. 1

ладия, то скоро наступает такой момент, после которого каждая новая капля немедленно восстанавливается. Тогда начинается выделение водорода, как в опытах без цианистого калия. Расщепление воды в этом случае начинается только тогда, когда присутствующий цианистый калий связывается палладием и становится безвредным. Таким образом, мы имеем здесь стехиометрическое соединение между ядом и катализатором. Если применять в указанном опыте палладиевую чернь вместо хлористого палладия, то отравление происходит более или менее медленно, в зависимости от количества прибавленного цианистого калия, но в начале опыта всегда имеет место выделение водорода.

Результаты этого исследования позволяют выявить замечательную аналогию между действием гидролитической системы «гипофосфит — палладий» и действием ферментов. Для действия фермента считается характерным то, что оно отклоняется от простых законов химической кинетики, в то время как неорганические катализаторы этим законам подчиняются.

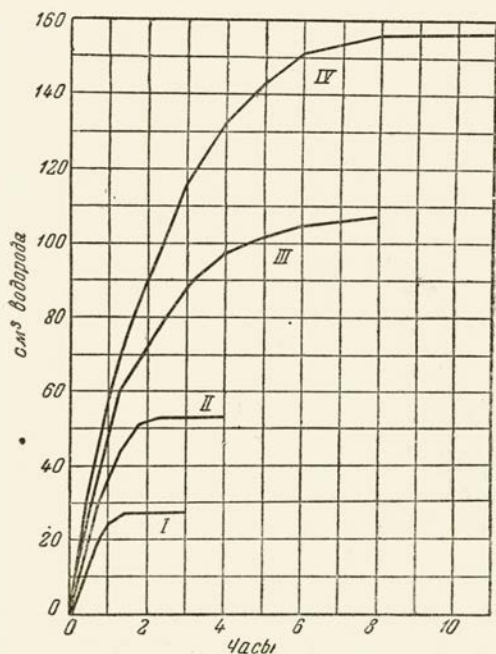


Рис. 2

I — 0.08148 г; II — 0.19297 г; III — 0.38594 г;  
IV — 0.57891 г гипофосфита в 10 см<sup>3</sup>.

нельзя считать характерными для действия ферментов. В этом отношении нет никакой принципиальной разницы между «неорганическими ферментами» (Бредиг) и «органическими катализаторами» (Оппенгеймер).

Что же касается механизма катализа реакции между гипофосфитом натрия и водой посредством палладия, то вряд ли можно сомневаться, что расщепление воды здесь происходит только потому, что палладий обладает способностью образовывать с выделяющимся водородом промежуточное неустойчивое соединение. Это соединение, несомненно, отлично от известного гидрида палладия Pd<sub>2</sub>H, последний очень медленно распадается. Помимо этого гидрида палладия существуют еще соединения палладия, содержащие большие количества водорода, ибо палладий способен

Так, например, Чигларж и Фюрт<sup>3</sup> использовали это различие для того, чтобы доказать существование пероксидазы в животном организме. В связи с тем, что гемоглобин и его продукты распада активированы перекисью водорода при различных окислительных реакциях, некоторые авторы поставили под вопрос существование животной пероксидазы. Чигларж и Фюрт сумели доказать, что ход активации перекиси водорода гемоглобином представляется графически прямой линией, в то время как кривые, полученные с препаратами пероксидазы растительного и животного происхождения показывают характерный для действия ферментов изгиб к оси абсцисс. Из хода расщепления воды системой «гипофосфит — палладий» вытекает, однако, что отклонения от простых законов могут наблюдаться и при чисто неорганическом катализе и что поэтому их никак

поглощать значительно бóльшие количества водорода, чем соответствует соединению  $\text{Pd}_2\text{H}$ .

Такого рода высшие гидриды палладия, которые можно рассматривать как пергидриды, играют, повидимому, существенную роль при расщеплении воды системой «гипофосфит — палладий». Вопрос этот будет более подробно изложен в одном из последующих сообщений. Здесь можно только предварительно указать на то, что, по всей вероятности, вода участвует в распаде пергидрида палладия таким образом, что промежуточно образуется чрезвычайно неустойчивая (до сих пор гипотетическая) закись водорода или пергидрид кислорода. Если допустить, что в растительном и животном организме расщепление воды происходит посредством системы «окисляемое вещество — вещество, поглощающее водород», то промежуточные пергидриды и пергидрид кислорода должны иметь для биохимических восстановительных процессов такое же значение, как перекиси и перекись водорода для биохимических окислительных процессов. На основании этих представлений, которые, конечно, можно рассматривать только как ориентирующую гипотезу, и была подвергнута мною исследованию область биохимических восстановительных процессов.

11 октября 1909 г.

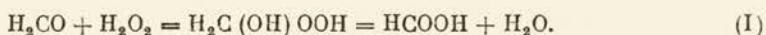
#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Würtz. C. R. Acad. Sci., Paris, 18, 702 (1845); Ann. Chim. Phys., [3], 11, 281 (1845).
2. Engel. C. R. Acad. Sci., Paris, 110, 786 (1890).
3. C z y h l a r z u. F ü r t h. Ueber tierische Peroxydase.— Hofm. Beitr., X, 358 (1907).

## ДЕЙСТВИЕ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА НА ФОРМАЛЬДЕГИД. К ТЕОРИИ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ \*

(Совместно с А. В. Генерозовым)

На основании свойств формальдегида и перекиси водорода следует ожидать, что эти два вещества образуют промежуточный продукт присоединения, который распадается на муравьиную кислоту и воду:



В действительности, хотя муравьиная кислота и является конечным продуктом, но реакция оказывается гораздо сложнее. Бланк и Финкенбейнер<sup>1</sup> показали, что формальдегид при действии перекиси водорода в щелочном растворе окисляется в муравьиную кислоту с *выделением водорода*, причем на каждые 2 молекулы формальдегида потребляется 1 молекула перекиси и выделяется 1 молекула водорода:



Такое, повидимому, парадоксальное направление реакции (выделение водорода из смеси реагирующих веществ) с трудом уживается с обычным представлением об окислительных свойствах перекиси, в теоретическом же отношении представляет значительный интерес, почему мы и считали желательным ближе выяснить эту реакцию.

Как известно, едкие щелочи сами по себе в определенных концентрациях, с одной стороны, окисляют формальдегид в муравьиную кислоту с выделением водорода, с другой стороны, вызывают превращения и конденсацию его; поэтому мы пытались сперва выяснить ход реакции между чистым формальдегидом и чистой перекисью водорода в отсутствии щелочи. Оказалось, что чистый формальдегид, приготовленный из триоксиметилена, и чистая перекись водорода (Мерка) в кварцевом сосуде реагируют, согласно уравнению (II), причем реакция протекает тем скорее, чем выше концентрация компонентов и чем выше температура реакции.

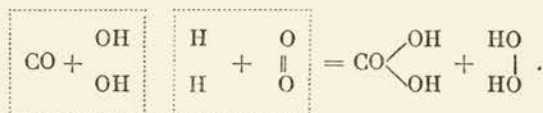
Прежде всего возникает вопрос о происхождении выделяющегося водорода. Так как отщепление водорода от метиленовой группы совершенно невероятно, то водород может выделяться или из перекиси, или из воды, принимающей участие в реакции. Первое предположение исключается, так как, по исследованиям Геймрод и Левене<sup>2</sup>, и другие окислители, не содержащие водорода, как хромовокислый калий, марганцовокислый калий и перекись свинца в щелочном растворе, реагируют точно так же

\* Сб. работ по чистой и прикладной химии НТО ВСНХ.— Тр. Хим. ин-та им. Л. Я. Карпова, I, 57 (1923).

с выделением водорода; таким образом, остается одно только допущение, что водород берет свое начало из воды.

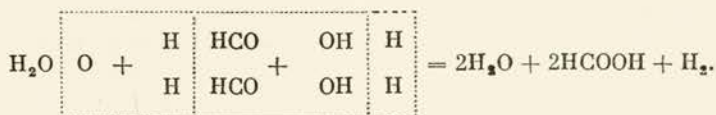
Для объяснения окислительных процессов, совершающихся за счет молекулы воды, существуют теперь две теории: старая, до самых последних лет общепризнанная, *теория расщепления воды Траубе* и новая *теория дегидрирования Виланда*<sup>3</sup>.

Исходя из допущения, что в отсутствии воды не может осуществляться ни один процесс окисления — пламя окиси углерода гаснет сейчас же в совершенно сухом воздухе, — Траубе высказал предположения, что благодаря одновременному действию окисляющегося вещества и окислителя молекула воды расщепляется, причем первое присоединяет гидроксильные группы, второй — водородные атомы. Например, для окисления окиси углерода он дал такое уравнение:



Хотя воззрение Траубе не является общей теорией окислительных процессов, — обобщению его препятствуют многочисленными опытами доказанное непосредственное присоединение кислородных молекул к ненасыщенным соединениям с образованием перекисей, — для окислительно-восстановительных процессов, протекающих за счет воды, она оказывается вполне удовлетворительной.

В духе теории расщепления воды, развитой Траубе, реакция между перекисью водорода и формальдегидом может быть выражена следующим уравнением:



Молекула формальдегида как таковая неспособна окисляться в муравьиную кислоту за счет воды с выделением водорода. Но она приобретает эту способность, если один из ее водородных атомов отнимается каким-либо окислителем. Свободная альдегидная группа  $\overset{|}{\text{HCO}}$  ведет себя, следовательно, по отношению к воде, как атом Na или K.

В таком виде течение реакции является довольно ясным и не допускает двух толкований. Менее понятны отношения, которыми обуславливается отсутствие восстановления перекиси водорода освобождающимся водородом. По всей видимости, здесь решающим является тот факт, что перекись водорода и формальдегид, как мы установили криоскопическим методом, соединяются, образуя некоторый комплекс. В этом комплексе активный кислород защищен от воздействия освобождающегося водорода. Другими словами, скорость, с которой водородные атомы соединяются в молекулы, в данном случае больше, чем скорость, с которой может восстанавливаться комплекс формальдегида и перекиси водорода.

Рассмотрим теперь, как может быть объяснена та же самая реакция с точки зрения теории дегидрирования Виланда.

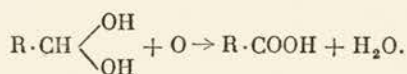
В противоположность Траубе, Виланд допускает, что окисление кислородом воды происходит не через расщепление молекулы воды и связывание гидроксильных ионов, но через присоединение целых молекул воды и последующее дегидрирование возникающего гидрата. Свой изыщ-

ный опыт окисления окиси углерода с помощью палладия в отсутствие кислорода он толкует в таком смысле, что из окиси углерода путем присоединения воды сперва образуется муравьиная кислота, которая затем дегидрируется палладием с образованием двуокиси углерода:

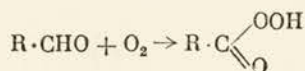


Виландом было произведено много других опытов с применением палладия в качестве акцептора водорода. Полученные им результаты могут быть объяснены как с помощью теории расщепления воды, так и с помощью теории дегидрирования, так что какой-либо решительный вывод является невозможным. Но имеются факты, которые хорошо укладываются в воззрение Траубе и совершенно не согласуются со взглядами Виланда. Одним из таких случаев является окисление формальдегида перекисью водорода.

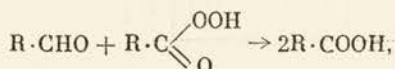
По мнению Виланда, окисление альдегидов в соответствующие кислоты является дегидрированием первоначально образующихся альдегид-гидратов:



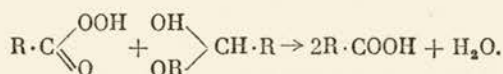
При окислении альдегидов свободным кислородом он допускает, в согласии с теорией Энглера и Баха, первичное образование перекисей (надкислот):



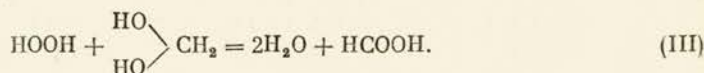
Дальнейшее окисление должно, по его предположению, происходить не путем прямой отдачи перекисного кислорода второй молекуле альдегида:



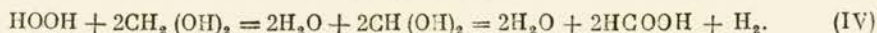
а путем дегидрирования альдегид-гидрата:



Соответственно последнему уравнению, реакция между перекисью водорода и формальдегидом должна протекать, по теории дегидрирования, следующим образом:



Но такое течение реакции находилось бы в противоречии с фактами, так как оно не отвечает молекулярным отношениям реакции, установленным опытом, и не объясняет образования водорода. Чтобы в одно и то же время остаться верным и опыту и теории дегидрирования, надо допустить, что образующийся сначала альдегид-гидрат частью дегидрируется перекисью водорода, частью самопроизвольно распадается на муравьиную кислоту и водород:





Интерпретируя уравнения (III) и (IV), мы получаем следующее: уравнение, составленное на основании теории расщепления воды Траубе, говорит, что *путем окисления одного изводородных атомов молекулы формальдегида становятся способными воспринимать гидроксильные ионы с образованием муравьиной кислоты, причем соответствующие водородные ионы выделяются в форме свободного водорода.* Уравнение, составленное на основании виландовой теории дегидрирования, говорит, что *благодаря частичному дегидрированию молекулы альдегид-гидрата становятся способными самопроизвольно распадаться на муравьиную кислоту и свободный водород.*

Нетрудно увидеть, какое из этих объяснений лучше отвечает фактам. Насколько мы знаем, в области окислительных процессов, происходящих за счет связанного кислорода воды, неизвестно ни одного факта, который нельзя было бы объяснить без всяких натяжек и исчерпывающим образом с помощью теории Траубе. Нельзя этого сказать относительно новой теории дегидрирования. Если привять во внимание еще и то, что теория Виланда вообще не дает более глубокого проникновения в сущность окислительных процессов, чем теория Траубе, то поневоле приходится признать, что для замены последней теории первой нет никакого основания.

Виланд, перенося свою теорию в область биологических окислительных процессов, представляет себе все реакции окисления и восстановления, совершающиеся в клетке, как процессы дегидрирования, и определенно признает тождество окислительных ферментов. Оксигеназы, по его мнению, не активируют молекулярный кислород с образованием перекисей, а ослабляют связь водорода в гидратах и сообщают ему способность к непосредственному соединению с молекулярным кислородом. Подобным же образом роль пероксидазы сводится будто бы не к перенесению перекисного кислорода на окисляемое вещество, а к подготовке водорода в гидрате к окислению перекисью водорода. Так как нельзя отрицать глубокой аналогии между системой «пероксидаза — перекись водорода» и системой «сернокислая закись железа — перекись водорода», то по смыслу теории дегидрирования следовало бы также и для соли железа допустить способность активировать водород. Этому шагу Виланд, однако, не делает и признает, что металлические соли и перекись водорода соединяются, образуя неустойчивые перекиси металлов, содержащие кислород с высоким потенциалом. Последние действуют, как истинные окислители.

Таким образом, Виланд в неорганическом окислительном катализе допускает существование двух родов катализаторов. Одни, как сернокислая закись железа, ускоряют перенос перекисного кислорода на способные к окислению субстраты. Другие, как палладий, ускоряют окислительные процессы за счет связанного кислорода воды, причем они функционируют в качестве водородных акцепторов и переносят водород воды на способные к восстановлению субстраты.

В биологическом катализе, который характеризуется именно своей резко выраженной специфичностью, Виланд, напротив, допускает для обоих процессов — перенесения перекисного кислорода и перенесения активного водорода — один единственный фермент. Позволим себе пояснить это положение на каком-нибудь примере.

Окисление бензальдегида в бензойную кислоту может совершаться двумя независимыми друг от друга путями. Альдегид легко поглощает одну молекулу кислорода, образуя перекись, которая с одной молекулой избыточного альдегида дает две молекулы бензойной кислоты. Другой путь окисления идет через расщепление воды, причем одна молекула альдегида присоединяет ОН'-ионы, другая молекула альдегида или какой-либо другой субстрат, способный восстанавливаться, связывает Н'-ионы. И тот и

другой процесс доступен каталитическому воздействию. Перенос перекисного кислорода производится металлическими солями, перенос водорода, как было установлено Бредигом и Зоммером в их классической работе, — металлами платиновой группы.

Живая клетка использует оба пути окисления и для этой цели производит два фермента. Один, подобно сернокислой закиси железа, ускоряет перенос перекисного кислорода. Это — пероксидаза. Другой, как палладий, ускоряет перенос лабильного водорода, который образуется при расщеплении воды на способные восстанавливаться субстраты. Таким является «энзим Шардингера», названный Бахом пергидридазой. Эти два каталитических процесса принципиально отличаются друг от друга, и на основании полученных до сих пор опытных данных в области ферментов уже а priori тождественность пероксидазы и пергидридазы является совершенно невероятной.

С теоретической точки зрения так же недопустимо отождествлять пероксидазу с пергидридазой, как и сернокислое железо с палладием.

Что касается приводимого Виландом экспериментального обоснования его предположения о тождестве окислительных и восстановительных ферментов, то следует отметить, что как его собственные весьма интересные опыты, так и другие опыты, приводимые для подтверждения его воззрения, были произведены не с изолированными ферментами, а с тканями или вытяжками из них. С такого рода материалами, которые содержат в себе все устойчивые при данных условиях ферменты клетки, можно получить как реакции окисления, так и реакции восстановления, а равно и гидролитические расщепления.

Из полученных результатов так же мало можно заключить о тождестве окислительных и восстановительных ферментов, как и о тождестве окислительных и гидролитических ферментов. Пока не доказано, что изолированная пероксидаза может редуцировать нитраты в нитриты и т. д. при посредстве альдегидов, как это делает пергидридаза, или что последняя может производить окислительные реакции при посредстве перекиси водорода, как это делает пероксидаза, приходится верить в химическую индивидуальность названных ферментов. Несмотря на самые разнообразные условия, до сих пор одному из нас (Бах) так и не удалось осуществить ни одной реакции восстановления с очищенной пероксидазой.

## ОПЫТЫ

### Окисление формальдегида перекисью водорода в отсутствие щелочи

Опыты производились с чистым формальдегидом, приготовленным обычным путем из триоксиметилена, и чистой перекисью водорода (Мерка). Аппарат, которым мы пользовались, состоял из колбы Вюрца (около 300 см<sup>3</sup>), снабженной делительной воронкой и термометром и соединенной стеклянной трубкой с большим эвдиометром для собирания и измерения выделяющегося газа; эвдиометр и все соединительные части наполнялись чистой водой. После полного эвакуирования колбы в нее впускались через делительную воронку отмеренные количества растворов формальдегида и перекиси водорода. При комнатной температуре и малых концентрациях компонент реакция протекает довольно медленно, при нагревании, в зависимости от условий, — бурно. По окончании реакции газ из колбы переводился в эвдиометр с помощью чистой воды; все жидкости соединялись

и измерялись, и в определенной части титрованием определялась муравьиная кислота.

В качестве примера приведем следующий опыт:

Взято: формальдегида 5,29 г (определялся нодометрически), перекиси водорода 2,4 г, воды 50 см<sup>3</sup>; температура реакции 70° С.  
Собрано водорода: 1520 см<sup>3</sup> при 18° и 750 мм.  
Вычислен вес водорода после приведения к 0° и 760 мм — 0,1237 г.  
Образовалось муравьиной кислоты — 5,727 г.  
Отношение Н<sub>2</sub> : НССОН — вычислено 1 : 2; найдено 1 : 2,007.

На образование муравьиной кислоты пошло около 70% взятого формальдегида, хотя в смеси еще оставалось значительное количество перекиси водорода. В то время как в щелочном растворе формальдегид и перекись водорода реагируют количественно по уравнению (II):



в отсутствии щелочи реакция останавливается уже раньше, чем израсходованы компоненты.

Подобные свойства Л. Леглер<sup>4</sup> обнаружил у полученной им перекиси гексаоксиметилена  $(\text{CH}_2\text{O})_6\text{O}_3 + 3\text{H}_2\text{O}$ , которая по количественному отношению — оксиметилен : активный кислород — в точности отвечает требованиям вышеприведенного уравнения, т. е. на две молекулы формальдегида содержит один атом активного кислорода. Следует еще отметить, что распад перекиси гексаоксиметилена Леглер по установленному им уравнению:



объясняет тем, что «вещество действует разлагающим образом на молекулу воды».

Отношение — водород : муравьиная кислота = 1 : 2 — сохраняется только в том случае, если перекись водорода и формальдегид реагируют в отношении 1 мол. : 2 мол. При избытке перекиси водорода муравьиной кислоты образуется больше, чем соответствует количеству выделенного водорода.

Взято: перекиси водорода 3,75 г, формальдегида 6,18 г.  
Получено: водорода 1715 см<sup>3</sup> при 15° и 754 мм = 0,1424 г; муравьиной кислоты 8,4944 г.  
Отношение Н<sub>2</sub> : 2СН<sub>2</sub>О — вычислено 1 : 2; найдено 1 : 2,59.

Из этого опыта вытекает, что при избытке перекиси водорода реакция с формальдегидом идет частью по уравнению (I), частью по уравнению (II).

Параллельные опыты в кварцевом сосуде и обыкновенной стеклянной колбе дают совершенно одинаковые результаты.

1922 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Blank u. Finkenbeiner. Ber. Dtsch. chem. Ges., **31**, 2979 (1898).
- Heimrod u. Levene. Biochem. Zs., **29**, 3 (1910).
- Wieland. Ber. Dtsch. chem. Ges., **45**, 484, 679, 2606 (1912); **46**, 3327 (1913); **47**, 2085 (1914); **54**, 2353 (1921).
- Legler. Ber. Dtsch. chem. Ges., **18**, 3347 (1888).

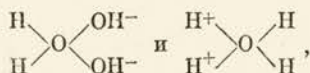
## ОБ АКТИВНОМ ВОДОРОДЕ

[Ueber aktiven Wasserstoff] \*

Дж. Дж. Томсон<sup>1</sup>, открывший трехатомный водород, указал на то, что для образования этой модификации водорода в каналовых лучах необходимо присутствие кислорода. С химической точки зрения эту зависимость можно объяснить тем, что реакция идет здесь путем промежуточного образования неустойчивого, перегруженного водородом соединения кислорода. Известно, что при окислении фосфора озон образуется не из свободных атомов кислорода, соединяющихся в трехатомную молекулу, а из промежуточной перекиси (пероксида) фосфора. По аналогии с этим можно предположить, что при гидрировании кислорода трехатомный водород образуется из промежуточного *пергидрида кислорода*. Из возможных промежуточных продуктов этого рода наиболее простым является гипотетическая *недокись водорода*, или оксипергидрид  $\text{OH}_4$ , аналог недокисей одновалентных металлов  $\text{OMe}_4$ . Оказывается, что именно такое соединение  $\text{OH}_4$  Дж. Дж. Томсон<sup>2</sup> нашел в каналовых лучах при действии разряда на смесь кислорода и водорода. Поэтому есть некоторое основание предполагать, что образование трехатомного водорода протекает по реакции



Вопрос о существовании недокисы водорода интересует меня по той причине, что, по моему мнению, в окислительно-восстановительных сопряженных реакциях, происходящих за счет воды, главную роль играют активные молекулы



которые находятся в подвижном равновесии как между собой, так и с остальной массой воды<sup>3</sup>. Первый род молекул действует окислительно, второй действует восстановительно. Окислительная сторона реакции ускоряется каталитически действием солей тяжелых металлов, восстановительная — действием металлов платиновой группы. Соответственными биологическими катализаторами являются ферменты — *пероксидаза и пергидридаза* (энзим Шардингера).

В надежде подойти ближе к выяснению этих взаимоотношений я поставил очень большое число опытов активирования водорода и пришел к со-

\* Сб. работ по чистой и прикладной химии НТО ВСНХ.— Тр. Хим. ин-та им. Л. Я. Карпова, 4, 1 (1925); Ber. Dtsch. chem. Ges., 58, 1388 (1925).

вершенно неожиданным результатам, которые будут кратко изложены в последующем.

Простейшим методом для получения активного водорода считается накаливание платины или палладия в струе водорода, вследствие чего последний приобретает способность производить при комнатной температуре такие реакции восстановления, которые обыкновенным водородом не вызываются. Для обнаружения активного водорода прибегают почти исключительно к гидрированию серы. Если активированный водород, пропущенный над измельченной серой, дает черное или темное пятно на бумажке, пропитанной раствором уксуснокислого свинца, то это считается доказательством присутствия трехатомного водорода. При этом количества получаемого сероводорода крайне ничтожны, — их хватает на качественную реакцию, но не на количественное определение.

Мне казалось, что для исследования активирования водорода в высшей степени чувствительная и легко поддающаяся количественному определению реакция восстановления нитрата в нитрит гораздо более пригодна, чем восстановление серы в сероводород. Если бы при пропускании 1 л активированного водорода через 5 см<sup>3</sup> раствора нитрата проявилось действие только 0.001 мг Н<sub>2</sub>, то это дало бы 0.006 мг N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, т. е. такое количество, которое легко и точно определяется в количественном отношении. А что трехатомный водород, который восстанавливает серу в сероводород, способен также восстанавливать нитрат в нитрит, — в этом как будто не было основания сомневаться.

Тем не менее ряд опытов, произведенных над активированием водорода посредством платины (сетки) и палладия (губчатого), дал крайне неудовлетворительные результаты. Восстановления нитрата в нитрит вообще не наблюдалось. Что касается восстановления серы в сернистый водород, то оно несколько раз, несомненно, имело место, но потом совершенно прекратилось, несмотря на то, что опыты все время велись в возможно тождественных условиях. Их этих опытов я вынес такое впечатление, как будто преходящее появление сероводорода было вызвано каким-то случайным загрязнением металлов, до того уже бывших в употреблении. Опыты были прекращены в июне прошлого года.

В декабрьском номере «Zeitschr. f. Elektrochemien» за 1924 г. Ф. Панет напечатал работу, в которой приводится интересное наблюдение. Панет сообщает, что способность платиновых металлов активировать водород теряется в процессе активирования. Он пишет:

«Насколько наш метод пригоден для получения Н<sub>2</sub> в больших количествах, мы еще не можем сказать, так как нам до сих пор не удалось длительным накаливанием одного и того же капилляра (из палладия) соответственно увеличить количество активного водорода. Свежеполученные с завода, а также «отдохнувшие» капилляры дают лучшие результаты, чем находившиеся уже более или менее продолжительное время в работе. Нам кажется, что дело идет здесь о каталитических влияниях, какие проявляются и при образовании Н<sub>2</sub> в канальных лучах».

Следовательно, то что я считал случайным загрязнением, является нормальной примесью платиновых металлов, *conditio sine qua non* активирования водорода. Примесь эта потребляется в процессе активирования водорода и появляется вновь после того, как металлы «отдохнули».

Мне показалось интересным исследовать это явление. При накаливании платиновой спирали из проволоки, не бывшей еще в употреблении, в фарфоровой трубке до 800—900° в струе водорода (см. стр. 309) и пропускании последнего над измельченной серой наблюдается, что выделение сероводорода, довольно значительное в начале опыта, быстро убывает и, смотря по обстоятельствам, полностью прекращается по прошествии 30—

60 минут. Дальнейшее нагревание в струе водорода, сколько бы оно ни длилось, не дает ни следа сероводорода. Оставление спирали в атмосфере водорода в течение нескольких дней при ежедневном нагревании ее в течение 1 часа до  $800^{\circ}$  не изменяет результата. Способность платиновой спирали активировать водород кажется полностью утерянной.

В предположении, что для активирования водорода необходимо содействие кислорода, растворенного или связанного в платине, я попытался достигнуть этого результата анодной поляризацией. И действительно, подвергнутая анодной поляризации в течение 20 минут в нормальной серной кислоте и затем тщательно отмытая спираль вновь дала при прокаливании в струе водорода значительное количество сероводорода. Но подвергнутая затем катодной поляризации, спираль дала такой же результат. Следовательно, потеря способности активировать водород не обуславливается израсходованием запаса кислорода, связанного в платине.

Дальнейшие опыты показали, что простого погружения в нормальную серную кислоту в течение 20 минут достаточно для «возрождения» спирали. Тут, естественно, возникло подозрение, что в этом случае сероводород получался от восстановления серной кислоты, адсорбированной спиралью из раствора, а не от гидрирования элементарной серы, над которой пропускался якобы активированный водород. Опыты полностью подтвердили правильность этого предположения: спираль, погруженная в нормальную серную кислоту и затем отмытая, дала при накаливании в струе водорода, *без пропускания над измельченной серой*, такое же количество сероводорода, как и при пропускании над серой.

Тем временем был поставлен опыт с платиновой спиралью, «утомленной» накаливанием в струе водорода и затем «отдыхавшей» в течение 18 дней на воздухе, с целью выяснить, может ли она дать сероводород без пропускания водорода над измельченной серой. К моему удивлению, опыт дал вполне положительный результат. Из этого следует, что платина адсорбирует не только серную кислоту из раствора, но и сернистые соединения ( $H_2S$ ,  $SO_2$  и т. д.) из воздуха и выделяет их в виде сероводорода при накаливании в струе водорода.

В дальнейшем удалось значительно сократить продолжительность «отдыха» спирали, «утомленной» накаливанием в струе водорода. Если такую спираль обработать в течение 10 часов током неочищенного лабораторного воздуха при комнатной температуре и затем накалить в струе водорода, то она вновь выделяет сероводород без пропускания водорода над измельченной серой. Напротив того, после обработки спирали тщательно очищенным воздухом не получается при тех же условиях ни следа сероводорода. Эти операции истощивания и возрождения можно сколько угодно раз повторить на одной и той же спирали.

Совершенно аналогичные результаты были получены при просасывании водорода через длинные платиновые капилляры при  $800^{\circ}$ . Губчатый палладий дал такие же результаты.

Ни со свежими, ни с возрожденными платиновыми спиральями не наблюдалось восстановления нитрата в нитрит водородом в условиях опыта. Так же мало могло быть установлено восстановление метиленовой сини в лейкоформу или трехокси вольфрама в двуокись.

Сделанные мною до сих пор наблюдения можно резюмировать следующим образом:

1. Не бывшие еще в употреблении платина и палладий содержат в адсорбированном состоянии сернистые соединения, которые выделяются ими в виде сероводорода при накаливании в струе водорода. Смотри по условиям опыта, запас адсорбированных сернистых соединений истощивается более или менее быстро.

2. Пропускание выходящего водорода над измельченной серой не изменяет количества сероводорода, выделяемого свежим металлом, и не вызывает образования сероводорода, после того как металл отдал свой запас сернистых соединений.

3. После обработки в течение короткого времени током неочищенного лабораторного воздуха истощенная платина приобретает вновь способность отдавать сероводород при прокаливании в струе водорода. В тех же условиях обработка очищенным воздухом никакого действия не оказывает.

4. Восстановление нитрата в нитрит, метиленовой сини в лейкоформу или трехокси вольфрама в двуокись водородом, пропущенным над накаленной платиной или палладием, не могло быть установлено в условиях моих опытов.

### ОПИСАНИЕ ОПЫТОВ

Всего было произведено более 100 опытов в разнообразных условиях, но с одинаковыми результатами, независимо от того, делались ли опыты в платиновой, кварцевой или фарфоровой трубке, применялся ли водород непосредственно из электролизера или предварительно очищенный химическими средствами или охлаждением посредством жидкого воздуха. Для

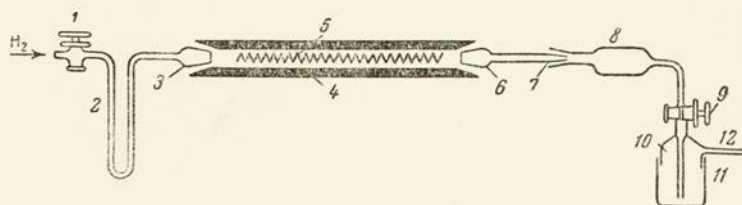


Рис. 1

1 — кран; 2 — трубка для погружения в жидкий воздух; 3 — шлиф; 4 — фарфоровая трубка; 5 — платиновая спираль; 6 — шлиф; 7 — шлиф; 8 — расширение для ввода толченой серы и стеклянной ваты; 9 — кран; 10 — шлиф; 11 — стаканчик, на дно которого кладется бумажка, пропитанная 10%-ным раствором уксусно-свинного раствора; 12 — отводная трубка

краткости я приведу здесь только заключительные опыты, поставленные для окончательной проверки наблюдений, сделанных в начальных фазах этого экспериментального исследования.

На рис. 1 изображена последняя форма употребленной мною аппаратуры.

Водород поступает через кран 1, освобождается от примесей охлаждением жидким воздухом в трубке 2, проходит через нагретый аппарат, выходит в стаканчик 11 перпендикулярно к реактивной бумажке, что делает возможным лучшее использование сероводорода, и выводится через трубку 12.

Водород приготавливался электролитически из раствора чистого едкого кали при помощи электродов из чистого никеля и сохранялся в стеклянном газометре над кипяченой дистиллированной водой, к которой прибавлялось 0.1% сулемы для предотвращения развития бактерий. Водород не содержал никаких соединений серы, ибо при пропускании через аппарат при комнатной температуре или при 800—900°, в отсутствие или присутствии спирали, предварительно прокаленной в струе водорода, он не дал ни следа сероводорода. Последний появлялся в течение опытов только при строго определенных условиях и поэтому не мог происходить от какой-либо постоянной примеси, содержащейся в водороде.

Так как в начале опытов я не располагал еще жидким воздухом, то водород очищался пропусканием через два промывных сосуда со щелочным

раствором перманганата, через фарфоровую трубку с платинированным асбестом, нагретую до  $600-700^{\circ}$ , через U-образную трубку с хлористым кальцием и натронной известью, через башню с твердым едким кали и через 4 трубки с фосфорным ангидридом. Эта очистка водорода вызывала — вероятно, вследствие более или менее полного удаления паров воды — замедление образования сероводорода, но не изменяла общего количества последнего. Очистка водорода посредством охлаждения жидким воздухом давала такой же эффект.

Для объективного сравнения результатов опытов реактивные бумажки с образовавшимся сернистым свинцом частью фотографировались.

После того как предшествующими опытами было установлено, что платина адсорбирует не только серную кислоту из раствора, но и сернистые соединения из воздуха и отдает их при накаливании в струе водорода в виде сероводорода, были произведены следующие опыты:

1. Расширение 8 аппарата было заполнено толченой серой между двумя пробками из стеклянной ваты, в фарфоровую трубку 4 была введена спираль из не бывшей еще в употреблении платиновой проволоки, толщиной 1 мм и длиной 1.2 м, и трубка была нагрета в электрической печи до  $800-900^{\circ}$  при пропускании около  $15 \text{ см}^3$  водорода в минуту. В то время как при пропускании влажного водорода образование сернистого свинца имело место вскоре после того, как температура трубки достигла требуемой высоты, с водородом, предварительно охлажденным посредством жидкого воздуха, реакция наступала на 10—15 минут позже. По прошествии 20 минут кран 9 был закрыт; стаканчик 11 был снят, реактивная бумажка в нем была заменена свежей, и операция была продолжена до полного прекращения образования сернистого свинца, на что потребовалось около 1 часа. Фотографии почерневших бумажек приведены на рис. 2, А. После этого пропускание водорода и нагревание были продолжены еще на 2 часа, но не было замечено ни малейшего образования сероводорода.

2. Предшествующий опыт был повторен со спиралью одинакового размера и из того же мотка платиновой проволоки, что и первая, но на этот раз расширение 8 было *тщательнейшим образом очищено от серы*. Но это несколько не изменило результата: получилось приблизительно столько же сернистого свинца, сколько и при пропускании «активированного» водорода над серой (рис. 2, В).

3. По окончании этого опыта спираль была оставлена в аппарате в течение 6 дней в атмосфере водорода, причем аппарат ежедневно нагревался в течение 1 часа до  $800-900^{\circ}$  при пропускании водорода. На 6-й день в расширение 8 аппарата была вновь введена сера между стеклянной ватой. Ни в одном случае не было получено ни следа сероводорода.

4. Платиновая спираль была вынута из аппарата и положена в трубку, через которую просасывался неочищенный лабораторный воздух в течение 10 часов при комнатной температуре. Аппарат в это время оставался наполненным водородом.

По истечении 10 часов спираль была опять введена в аппарат и накалена в струе водорода. При этом получалось приблизительно столько же сероводорода, как и с не бывшей еще в употреблении спиралью (рис. 2, С).

5. После полного прекращения выделения сероводорода электрический ток был выключен, и после охлаждения аппарата через него пропускался ток воздуха, тщательно очищенного прохождением через трубку в 30 см длины, заполненную ватой для удержания пыли, и через 10-шариковую трубку Лунге, наполненную щелочным перманганатом. После 10-часового пропускания воздух был вытеснен водородом и аппарат нагрет до  $800-900^{\circ}$  в токе этого газа в течение 2 часов. Не получалось ни следа сероводорода.



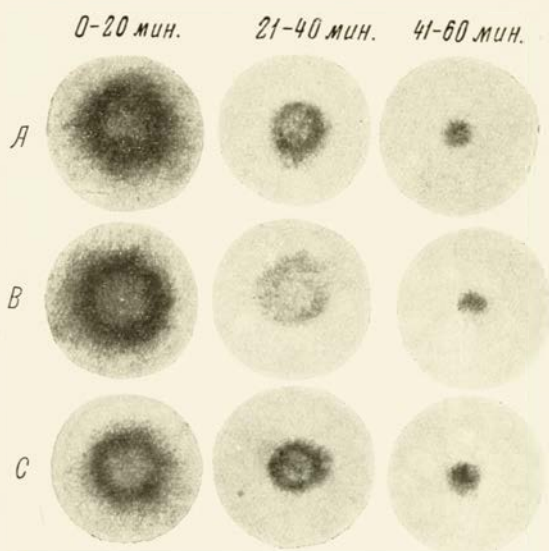


Рис. 2



6. Опыты 4 и 5 были повторены еще 2 раза один за другим с теми же результатами.

7. Два платиновых капилляра с просветом 0.1 мм и длиной 42 см были вставлены в полулю стеклянную пробку, снабженную трубкой в виде V так, что концы капилляров выходили в разветвлении последней (рис. 3).

Посредством шлифов капилляры приспособлены в частях 6 и 7 к аппарату. Через эти капилляры просасывался водород при 800°, для чего отводная трубка 12 была соединена с водоструйным насосом. Так же как и спирали, свежие капилляры дали значительные количества сероводорода при полном *отсутствии серы в сосуде* 8. По истечении 1 часа выделение сероводорода прекратилось. При пропускании неочищенного лабораторного воздуха капилляры «отдохнули» и при последующем нагревании в струе водорода вновь дали сероводород. При обработке очищенным воздухом и последующем нагревании в струе водорода не получилось ни следа сероводорода.

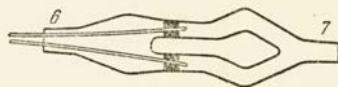


Рис. 3

8. Упомянутый в начале статьи совершенно недействительный губчатый палладий (8.5 г) был обработан в течение 10 часов неочищенным лабораторным воздухом и затем накален в аппарате до 800° в струе водорода. *Без пропускания над толченой серой* водород дал значительное количество сероводорода. Выделение последнего прекратилось полностью лишь после двухчасового нагревания. Контрольные опыты с очищенным воздухом дали отрицательные результаты.

9. Регенерированная платиновая спираль накалялась в аппарате, и выходящая струя водорода пропускалась через маленькую пробирку, содержащую 5 см<sup>3</sup> 5%-ного раствора азотнокислого натрия. Пробирка вставлялась в стаканчик 11 под отводной трубкой. По истечении 1 часа раствор исследовался на содержание нитрита посредством смеси сульфаниловой кислоты и  $\alpha$ -нафталана в уксуснокислом растворе. Получалось очень заметное окрашивание, которое соответствовало содержанию 0.0015 г N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, но контрольный опыт с чистой водой вместо раствора азотнокислого натрия дал такой же результат. Опыты эти были повторены несколько раз, но результаты получались те же. Повидимому, платина адсорбирует из неочищенного воздуха не только соединения серы, но и находящиеся в нем окислы азота. Поскольку последние ускользают от восстановления, они уносятся струей водорода.

10. Подобный же опыт был проведен с 5 см<sup>3</sup> 0.01%-ного раствора метиленовой сини вместо раствора азотнокислого натрия. После часового пропускания водорода над раскаленной платиновой спиралью, предварительно «возрожденной» в струе неочищенного воздуха, не было заметно никакого ослабления синего окрашивания раствора. В других опытах употреблялись бумажки, пропитанные тем же раствором метиленовой сини и положенные на дно стаканчика 11. Но и тут не произошло обесцвечивания.

11. Трехокись вольфрама растиралась в воде, и полученной взвесью пропитывалась бумажка, которая клалась на дно сосуда 11. После часового пропускания водорода над накаленной, предварительно «возрожденной» платиновой спиралью не было замечено ни малейшего окрашивания желтой бумажки в синий цвет.

18 мая 1925 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Thomson. Proc. Roy. Soc. (A), **89**, 1 (1913).
2. Thomson. Proc. Roy. Soc. (A), **101**, 290 (1922).
3. Бах. Biochem., Zs., **31**, 446 (1911); настоящая книга, стр. 490. См. также Бах. Химизм дыхательных процессов, ЖРФХО, **44**, 1—2 (1912); настоящая книга, стр. 50.

О ХИМИЧЕСКОЙ РОЛИ ВОДЫ  
В ОКИСЛИТЕЛЬНОМ ДЕЙСТВИИ ХИНОНА.  
К ТЕОРИИ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ

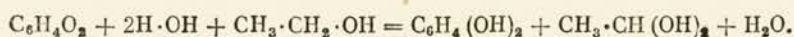
[*Ueber die chemische Beteiligung des Wassers an der oxydierenden Wirkung des Chinons.  
Zur Theorie der Oxydationsvorgänge*]\*

(Совместно с К. Николаевым)

Согласно теории окислительных процессов, развитой Виландом и опирающейся на представление о дегидрировании, окислительное действие хинона основано на том, что он непосредственно отнимает водород от окисляемого субстрата и переходит в гидрохинон:



Это толкование, совершенно исключаящее роль воды в окислительном процессе, позволяет предположить, что в подходящих органических растворителях реакция должна протекать и в отсутствие воды. Однако это не так. Если выставить спиртовой раствор хинона непосредственно на солнечный свет, то он окрашивается в красно-коричневый цвет, причем образуется ацетальдегид и хингидрон (Чиамициан и Зильбер). Если чрезвычайно тщательно высушить спирт и хинон, то реакция не наступает при освещении в течение нескольких недель. В присутствии воды количество превращающегося вещества возрастает с увеличением количества воды, однако не прямо пропорционально последнему (опыт 1). Для окисления пирогаллола хиноном в спиртовом (опыт 2), ацетоновом (опыт 3) и эфирном (опыт 4) растворах присутствие воды также является необходимым. То же самое имеет место и для окисления парафенилендиамина в эфирном растворе (опыт 5). Необходимость присутствия воды для окисления хиноном и увеличение количества реагирующего вещества с количеством прибавленной воды позволяют предположить, что вода химически участвует в реакции. Наиболее простое объяснение этих фактов дается известной теорией Траубе, основанной на представлении о расщеплении воды:



Мы считаем, однако, что приведенные факты позволяют уточнить механизм окислительного действия хинона. Гребе пытался свести окислительное действие хинона к существованию перекисной формы  $C_6H_4 \begin{matrix} O \\ | \\ O \end{matrix}$ . Виль-

\* Ber. Dtsch. chem. Ges., 64, 2769 (1931); ДАН СССР, 11 (1932).

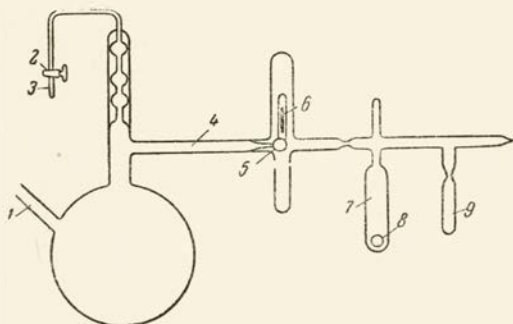
штеттером была изолирована соответственная перекисная форма ортохинона, но не парахинона.

Вследствие большего расстояния между атомами кислорода последняя значительно лабильнее первой и не существует в безводных растворах парахинона. Вода до известной степени стабилизирует перекисную форму парахинона, образуя с ней гидрат  $\text{HO} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{OOH}$ , т. е. гидроперекись параоксифенила.

Таким образом, парахинон окисляет не потому, что он в дикетоформе непосредственно отнимает у окисляемых субстратов водород и гидрируется, превращаясь в гидрохинон, а потому, что он присоединяет в перекисной форме воду и отдает свой активный кислород окисляемому субстрату, раскисляясь до гидрохинона.

### ОПИСАНИЕ ОПЫТОВ

1. **Хинон и спирт.** Чистый, несколько раз возогнанный хинон высушивался за 24 часа до употребления в открытой чашке в эксикаторе над серной кислотой, затем возможно скорее переносился в сухой тонкостенный стеклянный шарик, который запаивался. Спирт, обезвоженный обычным способом посредством гашеной извести, подвергался дальнейшей сушке в приборе, изображенном на рисунке ниже.



Через боковую трубку 1 в перегонную колбу, снабженную обратным холодильником, вводится 150 г 5%-ной амальгамы магния и затем 500 см<sup>3</sup> предварительно обезвоженного спирта, после чего боковая трубка закрывается резиновой пробкой и после эвакуирования колбы через кран 2 запаивается. После взбалтывания колба оставляется с открытым краном, оттянутый кончик 3 которого погружен в ртуть, на ночь, и на следующий день нагревается в течение 6 часов на водяной бане; после этого кран закрывается, шарик 5 разбивается железным грузом 6, запаянным в стеклянную трубку, и спирт перегоняется путем охлаждения градуированной колбы из толстого стекла в боковую часть прибора 5—9, предварительно высушенную в вакууме. После того как собрано 50 см<sup>3</sup> спирта колбочку 7 отпаивают, и шарик 8, содержащий 60 мг хинона, разбивают; после растворения в пробирку 9, на которой нанесена черта, переливают 5 см<sup>3</sup> раствора хинона и трубку отпаивают. Колбу затем открывают и в три трубки, содержащие возрастающие количества воды, наливают по 5 см<sup>3</sup> раствора хинона, после чего трубки запаивают. Одновременно запаивают 5 см<sup>3</sup> 0.01 N водного раствора хинона в аналогичную эвакуированную трубку и затем все трубки подвергают прямому действию солнечных лучей. Под действием

света водный раствор очень скоро окрашивается в темный красно-коричневый цвет и приобретает внешний вид гуминовых соединений, в то время как безводный спиртовой раствор сохраняет свое первоначальное зеленовато-желтое окрашивание, а остальные пробы лишь постепенно окрашиваются в красновато-коричневый цвет. Для того чтобы следить количественно за изменением, мы пользовались полученным в предшествующих опытах измененным до сходства с гуминовыми веществами водным раствором хинона, который становится прозрачным при прибавлении спирта. С этим раствором, интенсивность окрашивания которого мы считали равной 100, сравнивались колориметрически исследуемые пробы; результаты выражены в процентах полного превращения хинона. В качестве примера мы приводим следующие данные:

*Полное превращение хинона в водном растворе = 100*

| Время в часах                           | 0.5 | 1.5  | 3    | 5    | 24   | 44   | 70   |
|-----------------------------------------|-----|------|------|------|------|------|------|
| I. Безводный раствор . . . . .          | 0   | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| II. 0.25 см <sup>3</sup> воды . . . . . | 3.1 | 5.2  | 7.0  | 8.2  | 8.9  | 9.1  | 9.0  |
| III. 0.50 » » . . . . .                 | 4.6 | 9.0  | 9.8  | 10.2 | 10.6 | 10.5 | 10.6 |
| IV. 1.00 » » . . . . .                  | 7.1 | 12.1 | 13.7 | 14.1 | 15.1 | 15.4 | 15.8 |

Таким образом, после 24-часового освещения дальнейшее превращение хинона прекратилось. Следует еще отметить, что превращенный водный раствор хинона — здесь, повидимому, имеет место интрамолекулярное окисление хинона — приобретает способность окислять спирт в альдегиды даже в темноте, как это было нами установлено в специальных опытах.

2. **Хинон и пирогаллол в спирте.** Опыты были проведены описанным выше образом. Хинон и пирогаллол высушивались, взвешивались и запаивались отдельно в стеклянные ампулки. Трубки содержали по 10 см<sup>3</sup> раствора, центинормального по отношению к хинону и пирогаллолу, а трубки II, III, IV, кроме того, — возрастающие количества воды. Для сравнения и количественного определения превращенного вещества мы пользовались растворенным в спирте продуктом реакции, образующимся при окислении 10 см<sup>3</sup> водного раствора хинона и пирогаллола.

*Полное превращение в водном растворе = 100*

| Время в часах                          | 0.5  | 1    | 2    | 3    |
|----------------------------------------|------|------|------|------|
| I. Безводный раствор . . . . .         | 0    | 0    | 0    | 1.1  |
| II. 0.5 см <sup>3</sup> воды . . . . . | 9.1  | 17.4 | 26.2 | 20.8 |
| III. 1.0 » » . . . . .                 | 12.1 | 26.2 | 31.4 | 31.5 |
| IV. 2.0 » » . . . . .                  | 24.9 | 36.9 | 40.1 | 39.9 |

В то время как освещенные растворы хинона в безводном спирте оставались без изменения, при соответственных опытах без освещения с хиноном и пирогаллолом по истечении некоторого времени появлялось слабое окрашивание и в безводных растворах. В данном случае последнее окрашивание оценивалось в 1.1% полного превращения, в то время как в растворе, содержащем 2 см<sup>3</sup> воды, превращение составляло около 40%. Следует подчеркнуть, что эти данные, так же как и приведенные ниже, дают лишь представление о порядке величины имеющих место превращений и не претендуют на большую точность.

3. **Хинон и пирогаллол в ацетоне.** Ацетон высушивался над хлористым кальцием и затем многократно над прокаленным углекислым калием. Опыты ставились, как описано выше.

*Полное превращение в водном растворе = 100*

| Время в часах                          | 1    | 2     | 3    | 4    | 5    | 7    | 32   |
|----------------------------------------|------|-------|------|------|------|------|------|
| I. Безводный раствор . . . . .         | 0    | следы | 0.9  | 1.2  | 1.6  | 1.9  | 2.2  |
| II. 0.5 см <sup>3</sup> воды . . . . . | 9.1  | 10.5  | 11.6 | 13.1 | 14.8 | 15.8 | 22.3 |
| III. 1.0 » » . . . . .                 | 14.1 | 17.8  | 20.2 | 22.3 | 24.6 | 27.9 | 36.8 |
| IV. 2.0 » » . . . . .                  | 36.9 | 43.7  | 49.1 | 53.6 | —    | —    | —    |

4. Хинон и пирогаллол в эфире. Чистый эфир высушивался над хлористым кальцием, затем над натрием и, наконец, над калием. Описанная выше постановка опытов была изменена в том смысле, что эфирные растворы с определенным содержанием воды готовились путем смешивания сухих эфирных растворов с эфиром, насыщенным водой. На этих смесях готовились 0.005 N растворы гидрохинона и пирогаллола.

*Полное превращение в водном растворе = 100*

| Время в часах                                    | 1    | 2    | 3    | 4    | 7    | 8    |
|--------------------------------------------------|------|------|------|------|------|------|
| I. Безводный раствор . . . . .                   | 0    | 0    | 0    | 0    | 1.8  | 2.1  |
| II. На $\frac{1}{4}$ насыщенный водой . . . . .  | 5.2  | 8.3  | 10.2 | 11.3 | 11.8 | 12.0 |
| III. На $\frac{1}{2}$ насыщенный водой . . . . . | 7.1  | 11.1 | 13.3 | 13.4 | 13.9 | 13.8 |
| IV. Насыщенный водой . . . . .                   | 11.2 | 21.7 | 31.7 | 39.1 | 58.5 | 59.1 |

5. Хинон и парафенилендиамин в эфире. Качественно получаются такие же результаты, как в опытах с пирогаллолом. Количественное определение нельзя было провести, так как цвет водного раствора, служащего для сравнения, значительно отличается от цвета эфирных растворов, содержащих воду.

5 октября 1931 г.

---

## К ВОПРОСУ О МЕХАНИЗМЕ КАТАЛИТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЖЕЛЕЗА ПРИ АУТОКСИДАЦИЯХ

[Zur Frage nach dem Mechanismus der Eisenkatalyse  
bei Autoxydations-Prozessen] \*

Согласно точке зрения, высказанной впервые Маншо<sup>1</sup>, которой придерживается также и Варбург<sup>2</sup>, ускоряющее действие железа на аутооксидационные процессы происходит вследствие того, что Fe присоединяет молекулу кислорода с первичным образованием перекиси FeO<sub>2</sub> и передает активный кислород способному окисляться субстрату.

В связи с некоторыми опытами над влиянием солей металла на действие оксидазы, я пришел уже 22 года тому назад к выводу<sup>3</sup>, что соли металла не участвуют в первичном поглощении кислорода, а только активируют перекиси, образующиеся первично при аутооксидации субстратов. В качестве примера было приведено ускорение марганцем аутооксидации сиккативных масел и гидрохинона, которые сами по себе поглощают в отсутствии марганца кислород с образованием перекиси. Таким образом, действие солей металла аналогично действию пероксидазы.

Виланд и Франке<sup>4</sup> на основании детального исследования активирования кислорода железом считают невероятным первичное образование перекиси железа и допускают, что ион Fe<sup>++</sup> образует с субстратом комплексное соединение, которое подготавливает субстрат к дегидрированию присоединенным кислородом.

Следующие простые опыты дают новое доказательство неправильности предположения о первичном образовании FeO<sub>2</sub>.

Если широгаллол, гидрохинон и пирокатехин обработать чистым кислородом в присутствии Fe<sup>++</sup> (по 25 см<sup>3</sup> 0.1 мол. раствора и 0.025 мг Fe<sup>++</sup> в виде FeSO<sub>4</sub>), то происходит поглощение кислорода и, как было показано Виландом и Франке, образование гуминовых черных продуктов, а не пурпурогалина и хингидрона.

Если сравнить действие железа при аутооксидации свободных фенолов с его действием при аутооксидации соответственных эфиров, то получается следующее: триметилширогаллол, диэтилгидрохинон, диметил- и метилширокатехин не окисляются заметным образом даже после соприкосновения с кислородом в продолжение нескольких недель; только ионы Fe<sup>++</sup> переходят с образованием небольшого желтого осадка в Fe<sup>+++</sup>. Если на растворы действовать H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> вместо O<sub>2</sub>, то получаются те же продукты окисления, как и при аутооксидации свободных фенолов. В отсутствии Fe<sup>++</sup> эфиры не окисляются перекисью водорода. Аутооксидация диоксифенилаланина чрезвычайно ускоряется ионом Fe<sup>++</sup>; в то время как моно-

\* Ber. Dtsch. chem. Ges., 65, 1788 (1932).



оксифенилаланин (тирозин) совершенно не окисляется при тех же условиях; прибавление  $H_2O_2$  вызывает окисление с образованием черных продуктов.

Из этих опытов вытекает, что аутооксидация указанных фенолов ускоряется железом только тогда, когда их гидроксильный водород не замещен алкилами. Этерификации одной только фенольной группы пирокатехина уже достаточно для того, чтобы приостановить даже в присутствии железа аутооксидацию этого чрезвычайно легко окисляемого дифенола. Эти данные несовместимы с допущением первичного образования  $FeO_2$ . Действительно, если принять во внимание, что фенольные эфиры окисляются системой  $Fe^{II} + H_2O_2$  и что и в этом случае допускается промежуточное образование перекиси  $FeO_2$ , то непонятно, почему та же самая перекись, которая образуется из  $Fe^{II}$  и  $O_2$ , не окисляет эфиров.

Разрешение этой проблемы надо искать не в направлении аутооксидации железа, а в направлении аутооксидации субстратов. Как известно, при окислении дифенолов образуется первично перекись водорода: ее образование при аутооксидации гидрохинона, даже в отсутствии железа, было окончательно установлено Виландом и Франке. Поэтому окисление гидрохинона кислородом в присутствии  $Fe^{II}$  надо приписать действию системы « $Fe^{II} + H_2O_2$ ». Если условия неблагоприятны для первичного образования перекиси водорода, то катализ аутооксидационного процесса железом не имеет места. Поэтому можно допустить, что катализ железом заключается в ускорении действия образовавшейся первично перекиси водорода.

Это предположение соответствует действию указанных субстратов на сернокислый раствор титановой кислоты. Если ввести по 0.1 г пирагаллола, гидрохинона, пирокатехина или диоксифенилаланина в 10 см<sup>3</sup> раствора двуокиси титана в серной кислоте (раствор 0.5 г  $TiO_2$  в 50 см<sup>3</sup> концентрированной серной кислоты, разбавленный водой до 200 см<sup>3</sup> и отфильтрованный), то смесь приобретает более или менее интенсивное красно-оранжевое окрашивание. Диметилпирогаллол, диметилгидрохинон, монооксифенилаланин, диметил- и монометилпирокатехин остаются совершенно бесцветными в тех же условиях даже после продолжительного стояния. Вряд ли можно сомневаться, что окрашивание указывает в первом случае на присутствие перекиси.

В отношении детального механизма активации  $H_2O_2$  железом нет еще полной ясности. Виланд и Франке приходят к интересному выводу, что ион  $Fe^{II}$  предохраняется от окисления в ион  $Fe^{III}$  путем образования комплекса с субстратом и активирует для окисления субстрата присоединенную перекись водорода<sup>5</sup>. Промежуточное образование перекиси железа из  $Fe^{II}$  и  $H_2O_2$  они отрицают. Однако если принять во внимание тот факт, что окиси многих элементов образуют с  $H_2O_2$  более или менее устойчивые определенные соединения, то совершенно не исключено, что и  $Fe^{II}$  соединяется с  $H_2O_2$ , образуя очень лабильную активную перекись (например,  $RFeOOH$ ).

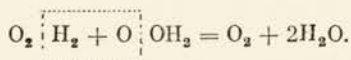
1 октября 1932 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

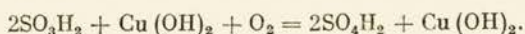
1. Manchot. Zs. anorg. Chem., 27, 420 (1901).
2. Warburg. Biochem., Zs., 152, 479 (1924).
3. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., 43, 364 (1910); настоящая книга, стр. 443.
4. Wieland u. Francke. Lieb. Ann., 464, 101 (1928).
5. L. c., стр. 222.

**К ВОПРОСУ О ЦЕННОМ ХАРАКТЕРЕ РЕАКЦИЙ РАЗЛОЖЕНИЯ  
ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПЕРОКСИДАЗЫ  
И КАТАЛАЗЫ \***

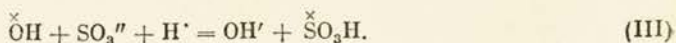
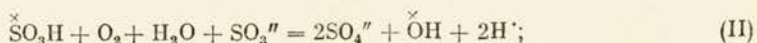
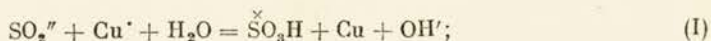
Свойство животных и растительных тканей ускорять окислительное действие перекиси водорода и вместе с тем разлагать ее с выделением молекулярного кислорода долгое время приписывалось «органическим материям», а затем всем ферментам вообще. В начале текущего столетия из растений были выделены два специфических фермента, из которых один, каталаза (О. Лев, 1901), разлагает перекись водорода подобно платине, с выделением молекулярного кислорода, другой, пероксидаза (А. Бах и Р. Шода, 1903), ускоряет подобно двувалентному железу окислительное действие  $H_2O_2$ . О механизме действия этих ферментов ничего определенного неизвестно. До сих пор предполагалось, что пероксидаза образует с  $H_2O_2$  промежуточное соединение, аналогичное перекисным соединениям металлических окислов, окислительный потенциал которого выше окислительного потенциала первоначальной перекиси. Относительно каталазы было высказано предположение (Виланд, 1923), что она, активируя водород одной молекулы  $H_2O_2$ , вызывает окисление его атомом кислорода другой молекулы:



В последнее время Габер и Вильштеттер<sup>1</sup> выступили с интересной попыткой объяснить действие как неорганических, так и органических окислительно-восстановительных катализаторов на основе цепных реакций, в которых свободные радикалы играют главную роль. Исходным пунктом они берут открытое Титовым каталитическое действие меди при окислении молекулярным кислородом сернистой кислоты в щелочном растворе. Реакция эта выражается следующим суммарным уравнением:



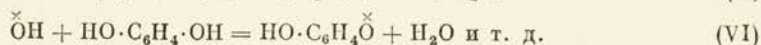
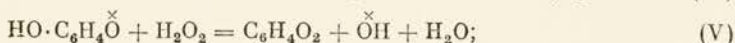
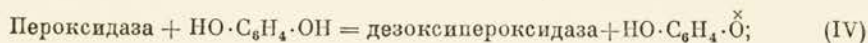
Это уравнение Габер и Вильштеттер расчлениют на следующие промежуточные ступени:



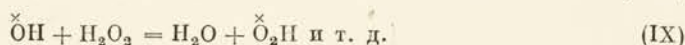
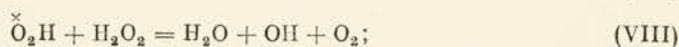
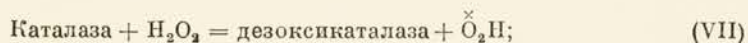
\* Журн. физ. хим., 4, 505 (1933).

Цепной характер реакции обуславливается тем, что радикал  $\overset{\times}{S}O_3H$ , который образуется вследствие отнятия атома водорода катализатором от  $SO_3H_2$ , реагирует с водой, молекулой кислорода и молекулой  $SO_3H_2$ , давая 2 молекулы  $SO_4H_2$  и радикал  $OH$ . Последний действует на  $SO_3H_2$ , возрождая первый радикал  $\overset{\times}{S}O_3H$ , и т. д.

Эту схему Габер и Вильштеттер применяют к объяснению ускорения окислительного действия перекиси водорода пероксидазой. При этом они предполагают, что никакого непосредственного взаимодействия между пероксидазой и  $H_2O_2$ , никакого активирования  $H_2O_2$  нет, а есть в первой фазе дегидрирование окисляемого субстрата пероксидазой с образованием радикала, который действует на  $H_2O_2$ . Например, для системы «пероксидаза — гидрохинон —  $H_2O_2$ » мы будем иметь:

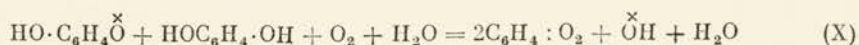


Для реакции, вызываемой каталазой, Габер и Вильштеттер дают следующую схему:

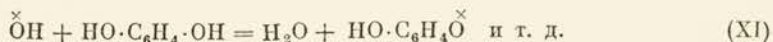


Не входя в обсуждение схемы Габера и Вильштеттера по существу, рассмотрим, насколько она применима к объяснению механизма действия пероксидазы и каталазы. Против применения ее к действию пероксидазы встречается прежде всего следующее возражение.

Предполагая, что пероксидаза не реагирует непосредственно с  $H_2O_2$ , а действует на субстрат, как «монодегидраза», образующийся радикал, в нашем примере  $HO \cdot C_6H_4 \overset{\times}{O}$ , должен был бы, согласно уравнениям (II) и (III) основной схемы, в отсутствие  $H_2O_2$  вызывать цепную реакцию окисления субстрата за счет молекулярного кислорода и воды:



и



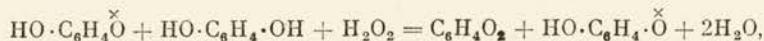
Другими словами, пероксидаза должна была бы обладать способностью окислять субстрат не только посредством  $H_2O_2$ , но и посредством молекулярного кислорода. Но этого нет. Бах и Шода<sup>2</sup> показали, что впервые извлеченная ими растительная пероксидаза, после повторной очистки растворением в воде и осаждением спиртом, несколько не ускоряет окисления молекулярным кислородом тех субстратов, окисление которых перекисью водорода она так энергично ускоряет: она — специфическая пероксидаза, а не оксигеназа. Факт этот подтвержден разными авторами и вошел в литературу. Тем не менее тут не исключена была возможность, что при несовершенстве первоначальных методов очистки фермента полученные препараты могли содержать примеси, препятствующие перенесению молекулярного кислорода пероксидазой на субстрат. Ввиду этого я решил повторить свои опыты с препаратами пероксидазы, очищенными путем адсорб-

ции на каолине и элюции по методу, предложенному Вильштеттером и Поллингером<sup>3</sup>, дающему препараты в 25—30 раз более активные, а следовательно и более свободные от посторонних примесей, чем мои первоначальные препараты. Активность приготовленной для нижеописанных опытов пероксидазы выражалась показателем 2430 (количество миллиграммов пурпурагалина, полученного при окислении пирогаллола перекисью водорода, на 1 мг пероксидазы).

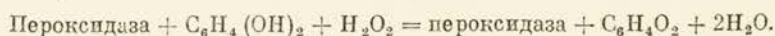
Для опыта брался раствор, содержащий 0.05 мг пероксидазы (показатель активности 121) в 10 см<sup>3</sup> воды, смешивался с 1 см<sup>3</sup> 0.1-молярного раствора свежеперегнанного гваякола и 4 см<sup>3</sup> воды, и смесь взбалтывалась с кислородом. Через 24 часа не произошло заметного поглощения кислорода, и смесь осталась бесцветной. Прибавление 1 см<sup>3</sup> 0.001 N H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> вызвало желто-бурое окрашивание смеси.

Тот же опыт был повторен в тех же условиях с гидрохиноном. Свежеприготовленный раствор чистого, несколько раз перекристаллизованного в кварцевой посуде из бидистиллята гидрохинона, смешанный с раствором пероксидазы, долгое время оставался бесцветным при взбалтывании с кислородом. Но если вместо свежего раствора взять раствор, постоявший несколько дней на воздухе и слабо окрасившийся в розоватый цвет, то уже по прошествии короткого времени наблюдается заметное потемнение смеси. Объясняется это тем, что, как показали Виланд и Франке<sup>4</sup>, чистейший гидрохинон, не содержащий железа, при стоянии на воздухе дает перекись водорода. Пероксидаза окисляет гидрохинон лишь постольку, поскольку имеет место самопроизвольное образование H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Но эта реакция протекает в сотни раз медленнее, чем окисление того же гидрохинона молекулярным кислородом при помощи *оксидазы* (системы: пероксидаза — легкоокисляемое вещество, связывающее O<sub>2</sub> с образованием перекиси).

Второе возражение против применения схемы Габера и Вильштеттера к пероксидазе заключается в следующем. Согласно уравнению (IX), радикал гидроксил разлагает молекулу H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> с образованием радикала H $\ddot{O}$ <sub>2</sub>, который по уравнению (VIII) разлагает H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на O<sub>2</sub>,  $\ddot{O}H$  и воду. Тот же радикал  $\ddot{O}H$  образуется и при окислении субстрата действием пероксидазы и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. А из этого следует, что и в этом случае должно иметь место разложение H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> с выделением молекулярного кислорода, как и в случае каталазы. Но, как показали впервые Бах и Шода, пероксидаза, в отличие от каталазы, не выделяет из H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ни следа молекулярного кислорода, — наблюдение, подтвержденное самим Вильштеттером на его чистейших препаратах пероксидазы. Чтобы обойти это затруднение, Габер и Вильштеттер заменяют уравнения (V) и (VI) одним уравнением:



которое соответствует предположению, что радикал субстрата, возникший в реакции (IV) в тройном столкновении с молекулой субстрата, сам претерпевает окончательное окисление в хинон и возрождает радикал субстрата. Но это предположение мало чем отличается от обычного представления, по которому пероксидаза, гидрохинон и перекись водорода образуют комплекс, который распадается с образованием хинона, воды и возрождением катализатора:



Шансов встречи молекул для тройного столкновения в первом случае не больше, чем в последнем, с тем отягчающим для схемы Габера и Вильштеттера

обстоятельством, что длительность существования их радикала должна превышать частоту встречи трех молекул.

Применение схемы Габера и Вильштеттера к объяснению разложения  $H_2O_2$  каталазой тоже наталкивается на серьезное затруднение. Если носителями цепной реакции разложения  $H_2O_2$  являются такие энергичные окислительные радикалы, как  $\dot{N}O_2$  и  $\dot{O}H$ , то всякое способное к окислению вещество, введенное в систему «каталаза —  $H_2O_2$ », должно было бы, по имеющимся экспериментальным данным (Бакстром, Тэйлор и др.), действовать как ингибитор, обрывающий цепную реакцию. Другими словами, система «каталаза —  $H_2O_2$ » должна была бы проявлять такие же окислительные свойства, как и система «пероксидаза —  $H_2O_2$ ».

Первые исследователи каталазы склонны были приписывать этому ферменту окислительные свойства. Но теперь считают, что это не соответствует действительности<sup>5</sup>. С своей стороны, я счел нужным проверить, какое влияние вышеупомянутые окисляемые субстраты — гваякол и гидрохинон — оказывают на разложение  $H_2O_2$  глубоководной каталазой и насколько они при этом подвергаются окислению. Опыты велись следующим образом.

Каталаза была извлечена из лошадиной печени и очищена по Эйлеру двукратной адсорбцией на каолине и элюцией фосфатным раствором  $pH=7$ . Для опыта брался 1 см<sup>3</sup> раствора каталазы, разлагавший в 3 мин. без остатка 22.3 мг  $H_2O_2$  в 15 см<sup>3</sup> (0.087 N  $H_2O_2$ ). Количественное разложение  $H_2O_2$  измерялось в обычно употребляемых для этой цели аппаратах по выделенному кислороду, так как присутствие окисляемого субстрата препятствовало определению посредством титрования перманганатом или посредством иодометрии. Опыты велись при температуре 20°.

I. Каталазы 1 см<sup>3</sup>, воды 9 см<sup>3</sup>, перекиси водорода 22.3 мг в 5 см<sup>3</sup>.

II. Каталазы 1 см<sup>3</sup>, 0.1 мол. раствора гваякола 1 см<sup>3</sup>, воды 8 см<sup>3</sup>, перекиси водорода 5 см<sup>3</sup>.

III. Каталазы 1 см<sup>3</sup>, 0.1 мол. раствора гваякола 3 см<sup>3</sup>, воды 6 см<sup>3</sup>, перекиси водорода 5 см<sup>3</sup>.

IV. Каталазы 1 см<sup>3</sup>, 0.1 мол. раствора гваякола 6 см<sup>3</sup>, воды 3 см<sup>3</sup>, перекиси водорода 5 см<sup>3</sup>.

Выделившийся кислород (0° и 760 мм) (в см<sup>3</sup>)

| Минуты | I    | II   | III  | IV   |
|--------|------|------|------|------|
| 1      | 11.8 | 12.0 | 12.1 | 11.8 |
| 2      | 14.8 | 14.7 | 15.0 | 14.8 |
| 3      | 15.2 | 15.3 | 15.2 | 15.4 |
| 4      | 15.3 | 15.3 | 15.2 | 15.4 |

Все пробы остались совершенно бесцветными. Опыты с гваяколом были повторены несколько раз и дали те же результаты. Контрольные опыты, в которых к каталазе было прибавлено 0.001 мг пероксидазы, дали интенсивное окрашивание реакционной смеси.

Эти опыты с полной ясностью показывают, что присутствие такого легкоокисляемого ингибитора, как гваякол, даже в значительной концентрации не оказывает влияния на скорость реакции системы «каталаза +  $H_2O_2$ », потому что в отличие от пероксидазы каталаза неспособна вызывать ускорение окислительного действия  $H_2O_2$ .

Проведенные в тождественных условиях опыты с гидрохиноном вместо гваякола дали следующие результаты:

Выделившийся кислород ( $0^\circ$  и 760 мм)(в см<sup>3</sup>)

| Минуты | I<br>(контроль) | II<br>(1 см <sup>3</sup> гидро-<br>хинона) | III<br>(3 см <sup>3</sup> гидро-<br>хинона) | IV<br>(6 см <sup>3</sup> гидро-<br>хинона) |
|--------|-----------------|--------------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------|
| 1      | 11.4            | 4.8                                        | —                                           | —                                          |
| 2      | 14.0            | 7.4                                        | 3.4                                         | 1.7                                        |
| 3      | 14.8            | 10.4                                       | —                                           | —                                          |
| 4      | 15.4            | 11.5                                       | 5.4                                         | 3.5                                        |
| 6      | 15.4            | 12.7                                       | 7.4                                         | 4.6                                        |
| 8      | —               | 13.9                                       | 8.6                                         | 5.8                                        |
| 10     | —               | 14.4                                       | 9.9                                         | 6.8                                        |
| 15     | —               | 15.3                                       | 12.1                                        | 8.8                                        |
| 20     | —               | 15.3                                       | —                                           | 10.1                                       |
| 25     | —               | —                                          | 14.4                                        | 11.4                                       |
| 30     | —               | —                                          | 15.2                                        | 12.4                                       |
| 35     | —               | —                                          | 15.3                                        | 13.5                                       |
| 60     | —               | —                                          | —                                           | 15.1                                       |

Из этой таблицы видно, что гидрохинон определенно задерживает действие каталазы и притом прямо пропорционально количеству ингибитора. Тем не менее приписать эту задержку обрыванию реакционной цепи вследствие перехватывания радикала  $\text{HO}_2^\times$  ингибитором нельзя по следующим соображениям.

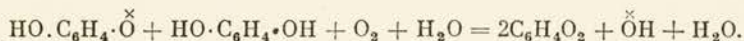
1. Перехватывая радикал  $\text{HO}_2^\times$ , каждая молекула гидрохинона окисляется необратимо в хинон, который с избытком гидрохинона дает хингидрон. Вследствие этого при сравнительно значительной концентрации гидрохинона реакционные жидкости должны были бы принять интенсивную красно-бурую окраску. А между тем в опыте II по окончании реакции жидкость осталась бесцветной, в опыте III она была слабозеленой, а в опыте IV несколько более окрашенной. Контрольные опыты с теми же концентрациями гидрохинона и  $\text{H}_2\text{O}_2$ , но без каталазы, показали, что в одинаковый промежуток времени контрольные пробы окрашиваются значительно интенсивнее, чем в основном опыте. Поэтому каталаза не только не ускоряет окисления гидрохинона перекисью водорода, но задерживает его вследствие быстрого разрушения  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

2. Едва ли подлежит сомнению, что водород гидрохинона легче окисляется, чем водород  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Достаточно вспомнить, что гидрохинон окисляется молекулярным кислородом с измеримой скоростью, тогда как на  $\text{H}_2\text{O}_2$  кислород никакого действия не оказывает. Поэтому при наличии значительного количества гидрохинона последний имеет все шансы перехватить образующиеся под действием каталазы радикалы  $\text{HO}_2^\times$  и уменьшить не только скорость выделения, но и общее количество свободного кислорода из  $\text{H}_2\text{O}_2$ . А между тем из вышеприведенной таблицы явствует, что присутствие гидрохинона, уменьшая скорость реакции каталазы, не оказывает никакого влияния на общее количество выделенного кислорода. С предположением промежуточного образования радикала  $\text{HO}_2^\times$  этот факт можно было бы примирить, лишь допуская, что гидрохинон, сталкиваясь с радикалом, сам не окисляется, а возрождает из него  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Но об этом и речи не может быть. На основании вышеизложенного приходится полагать, что уменьшение скорости реакции каталазы происходит здесь не потому,

что гидрохинон обрывает цепную реакцию, а по другим причинам. Курт Штерн<sup>6</sup>, разбирая типы задержки действия каталазы под влиянием разных факторов, указывает на возможность задержки вследствие того, что ингибитор адсорбируется на поверхности фермента и затрудняет доступ к нему перекиси водорода. В нашем случае тот факт, что гидрохинон значительно задерживает действие каталазы, сам не подвергаясь заметному окислению и не потребляя H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, находит свое наиболее правдоподобное объяснение в том, что в силу некоторого «сродства» гидрохинон адсорбируется коллоидальной каталазой и мешает доступу H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

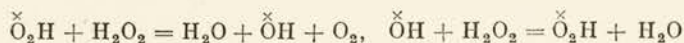
Резюмирую вышеизложенное.

1. Если пероксидаза, как предполагают Габер и Вильштеттер, не реагирует непосредственно с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, а только отнимает атом водорода от субстрата, превращая последний в радикал, то по смыслу их основной схемы этот радикал мог бы, совершенно независимо от присутствия H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, реагировать с молекулой воды и молекулой O<sub>2</sub> и, создавая радикал  $\dot{O}H$ , окисляться сам в окончательный продукт реакции:



Это значило бы, что пероксидаза способна окислять субстрат посредством молекулярного кислорода. Факты говорят другое.

2. Образование радикала  $\dot{O}H$  при действии пероксидазы на субстрат в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> должно было повести по реакциям Габера и Вильштеттера



к распаду 2H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> с выделением O<sub>2</sub>. Но этого нет.

3. Если бы при действии каталазы на H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> промежуточными носителями ценной реакции были радикалы  $\dot{O}_2N$  и  $\dot{O}H$ , то прибавление ингибитора должно было бы вызвать перерыв цепной реакции вследствие окисления ингибитора. Другими словами, система «каталаза — H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>» должна была бы обладать окислительными свойствами, как и система «пероксидаза — H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>». Но окислительными свойствами она не обладает.

Вывод. Схемы цепных реакций, предложенные Габером и Вильштеттером для объяснения механизма действия пероксидазы и каталазы на H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, не соответствуют фактам.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Haber u. Willstätter. Reaktionsmechanismus organischer u. enzymatischer Vorgänge.— Ber. Dtsch. chem. Ges., 64, 2844 (1931).
2. Бах соем. с Шода. О пероксидазе [Über Peroxydase].— Ber. Dtsch. chem. Ges., 36, 600 (1903); настоящая книга, стр. 349.
3. Willstätter u. Pollinger. Über Peroxydase. Lieb. Ann., 450, 269 (1922).
4. Wieland u. Franke. Lieb. Ann., 464, 101 (1922).
5. Oppenheimer Die Fermente u. ihre Wirkungen, 5-е изд. (1928).
6. Stern. Zs. physiol., Chem., 209, 173 (1932).

---

## ПОГЛОЩЕНИЕ ВОДОРОДА ПАЛЛАДИЕМ В ОТСУТСТВИИ И ПРИСУТСТВИИ ВОДЫ \*

(Совместно с М. И. Темкиным)

Вопрос о каталитическом участии воды в процессах гидрогенизации и дегидрогенизации посредством металлов имеет большое значение для выяснения механизма этих процессов.

Существующие в этой области взгляды весьма различны, а иногда и прямо противоречивы. Так, согласно некоторым авторам<sup>1</sup>, присутствие небольших количеств воды или окислов металлов наряду с металлом-катализатором необходимо для осуществления дегидрогенизации спиртов. Вильштеттер и Вальдшмидт-Лейтц<sup>2</sup> нашли, что гидрогенизация непредельных соединений при помощи палладия и других катализаторов не происходит в отсутствие кислорода, т. е. в отсутствие воды. Противоположный взгляд высказывался Боденштейном<sup>3</sup>, Кельбером<sup>4</sup> и другими авторами, отрицавшими роль воды и кислорода в гидрогенизационных процессах.

А. Бах и К. Николаев<sup>5</sup> показали, что, в полном противоречии с известной теорией Виланда, хинон в отсутствие воды не дегидрогенизует этилового спирта и что дегидрогенизация увеличивается с количеством прибавленной воды.

С этой точки зрения представлялось интересным выяснить, играет ли вообще вода какую-либо роль в процессе связывания водорода таким типичным дегидрогенизационным и гидрогенизационным агентом, как палладий. Поэтому нами были предприняты опыты по определению общего количества и скорости поглощения водорода палладием в присутствии и в отсутствие воды.

Для опытов была взята палладиевая чернь (Kahlbaum) в количестве 2 г. В промежутках между опытами она многократно прокаливалась в вакууме и охлаждалась в атмосфере водорода, и, таким образом, металл был полностью освобожден от кислорода и воды.

Многократное прокалывание изменило структуру палладия — палладиевая чернь превратилась в светлосерую палладиевую губку. Скорость поглощения водорода при этом, однако, не изменилась.

Водород получался электролизом раствора химически чистого едкого кали; для освобождения от кислорода водород пропускался через длинную нагретую трубку, наполненную палладиевым асбестом, и далее высушивался хлористым кальцием, фосфорным ангидридом и жидким воздухом.

Опыты производились следующим образом: палладиевая чернь, заключенная в кварцевой колбочке, прокаливалась до яркочерного каления

---

\* Журн. физ. хим., 5, 809 (1934).



при постоянной откачке с помощью ртутноконденсационных насосов (вакуум контролировался манометром Мак-Леода) и таким образом освобождалась от водорода, затем охлаждалась до комнатной температуры и соединялась с резервуаром, наполненным водородом. Ход поглощения наблюдался по изменению давления при помощи ртутного манометра. U-образная трубка, охлаждавшаяся жидким воздухом, предохраняла палладий от действия паров ртути. Трубка, снабженная краном, давала возможность ввести воду в шарик, расположенный на пути водорода, перед кварцевой колбочкой с палладием.

Весь прибор был сделан из стекла и не содержал каучуковых соединений.

Был проделан ряд опытов, причем палладиевая чернь от опыта к опыту все более освобождалась от кислорода и воды. Независимо от этого скорость поглощения водорода оставалась высокой и не менялась по мере хода обезвоживания. Общее количество поглощенного водорода и характер кинетики поглощения совпадает с данными Жукова<sup>6</sup>. Для примера приведем результаты двух опытов (см. табл. 1).

Общее количество поглощенного водорода в обоих опытах было равно 135 см<sup>3</sup> (приведено к 0° и 760 мм), т. е. 67.5 см<sup>3</sup>/г палладия.

Таблица 2

| Время<br>(в мин.) | Давление (в мм Hg)     |                      |
|-------------------|------------------------|----------------------|
|                   | Опыт 14,<br>t° = 19.5° | Опыт 16,<br>t° = 19° |
| 0                 | 446                    | 446                  |
| 0.25              | 266                    | 266                  |
| 0.5               | 245                    | 245                  |
| 1                 | 213                    | 212                  |
| 2                 | 168                    | 172                  |
| 3                 | 150                    | 155                  |
| 4                 | 144                    | 148                  |
| 5                 | 140                    | 144                  |
| 6                 | 138                    | 143                  |
| 10                | 136                    | 138                  |
| 30                | 135                    | 138                  |

в пределах ошибок опыта, с данными, найденными для сухого водорода. Примером могут служить два опыта, результаты которых представлены в табл. 2.

Из них опыт 14 был сделан с сухим водородом, а в опыте 16 в прибор было введено 0.4 см<sup>3</sup> воды.

После опытов с поглощением влажного водорода вода из палладия была удалена посредством прокаливания в вакууме и обработки водородом, после чего вновь была определена поглощающая способность палладия

Таблица 1

Ход поглощения водорода палладиевой чернью

| Время<br>(в мин.) | Давление (в мм Hg)  |                     |
|-------------------|---------------------|---------------------|
|                   | Опыт 5,<br>t° = 16° | Опыт 9,<br>t° = 20° |
| 0                 | 385                 | 390                 |
| 0.25              | 237                 | 235                 |
| 0.5               | 214                 | 214                 |
| 1                 | 181                 | 183                 |
| 2                 | 147                 | 148                 |
| 3                 | 135                 | 137                 |
| 4                 | 131                 | 132                 |
| 5                 | 129                 | 130                 |
| 6                 | 128                 | 129                 |
| 10                | 126                 | 126                 |
| 30                | 125                 | 126                 |

Интервал давлений, в котором провозводились опыты, соответствует среднему, почти горизонтальному участку изотермы, увеличение давления от 126 мм до 435 мм дало увеличение количества поглощенного водорода лишь на 3 см<sup>3</sup>.

После того как было установлено, что прокаливание в вакууме и обработка водородом не изменяют поглощающей способности палладия, были сделаны опыты поглощения влажного водорода. В прибор вводилась вода и водород проходил над водой (частью замерзшей вследствие энергичного испарения), прежде чем приходил в соприкосновение с палладием. Оказалось, что скорость поглощения и общее количество поглощенного газа совпадают,

по отношению к сухому водороду. Она совпала с найденной в предыдущих опытах.

В нескольких опытах освобождения водорода от примеси кислорода не производилось, причем на поверхности палладия происходило образование воды. Несмотря на это, скорость поглощения водорода осталась неизменной.

На основании описанных опытов можно заключить, что вода, а следовательно, и кислород не играют роли в процессе поглощения водорода палладием.

Надо полагать, что активация водорода в той или иной форме (например, диссоциация на атомы) на поверхности металла является первой стадией как поглощения водорода, так и гидрогенизационного процесса. Поэтому независимость поглощения водорода от наличия или отсутствия кислорода и воды может служить косвенным подтверждением взглядов, отрицающих роль воды и кислорода в процессах каталитической гидрогенизации.

Физико-химический институт  
им. Л. Я. Карпова  
Москва

#### ЛИТЕРАТУРА

1. ЖРФХО, **40**, 508 (1908).
2. Willstätter u. Waldschmidt-Leitz. Ber. Dtsch. chem. Ges., **54**, 113 (1921).
3. Bodenstein. Lieb. Ann., **440**, 119, 177 (1924).
4. Kelber. Ber. Dtsch. chem. Ges., **54**, 170 (1921); **57**, 136, 142 (1924).
5. Бах и Николаев. Ber. Dtsch. chem. Ges., **64**, 2769 (1931); настоящая книга, стр. 312.
6. Жуков. Изв. Ин-та физ.-хим. анал., **2**, 60 (1929).

---

## О ПЕРВЫХ УЛОВИМЫХ ПРОДУКТАХ КАТАЛИТИЧЕСКОГО РАСПАДА САХАРОВ В БЕСКИСЛОРОДНОЙ СРЕДЕ \*

(Совместно с Е. П. Алексеевой и В. П. Древингом)

В связи с исследованиями над связыванием атмосферного азота при обыкновенных условиях температуры и давления при помощи энзимов, извлеченных из азотных бактерий, было замечено, что в некоторых случаях пониженное образование аммиака сопровождается выделением свободного водорода. Дело представлялось в таком виде, как будто в соответствующих энзимных комплексах ослабел или выпал механизм, обеспечивающий соединение атмосферного азота с выделяющимся в реакции водородом. Так как в отсутствии глюкозы энзимные препараты в условиях опыта не образуют аммиака и не выделяют водорода, то было вполне очевидно, что последнее, т. е. выделение водорода, связано генетически с участием углевода в реакции. Ввиду значительного интереса, который представляет указанное явление как с теоретической, так и с практической стороны, я решил ближе исследовать его.

Поставленные мной ориентировочные опыты с заменой энзимного препарата платиновой чернью в качестве катализатора дали следующие результаты: в первом же опыте при взбалтывании с воздухом 0.01 моля глюкозы с 50 см<sup>3</sup> полунормального раствора NaOH с 0.35 г платиновой черни в колбе, соединенной с газовой бюреткой, при обыкновенной температуре в течение полутора часов произошло поглощение газа (13.2 см<sup>3</sup>), а затем газ стал выделяться, и по прошествии 20 часов его накопилось 42.2 см<sup>3</sup>. Анализ ваза показал, что он состоял только из водорода, кислорода и азота и не содержал ни следа углекислоты. Поглощение газа произошло исключительно за счет кислорода.

Ряд других опытов, давших аналогичные результаты, с полной очевидностью показал, что:

- 1) при взбалтывании глюкозы в щелочном растворе с воздухом в присутствии платиновой черни выделяется водород;
- 2) замена едкого натра фосфатным буфером (рН=9.12) замедляет выделение водорода, но не изменяет реакции;
- 3) скорость реакции зависит от количества и степени активности катализатора, но не от способа его приготовления (обработка раствора хлорной платины формальдегидом и щелочью, высаждение платины фосфорноватистокислым натрием или металлическим магнием).

В литературе имеется только одно указание на выделение водорода из глюкозы в присутствии неорганического катализатора. В связи со своей

---

\* Биохимия, 1, 75 (1936).

теорией дегидрирования Г. Виланд<sup>1</sup> поставил опыты над превращением глюкозы под действием палладиевой черни при 40° и обнаружил выделение углекислоты и водорода и образование глюконовой кислоты. С точки зрения методики обращает на себя внимание применение Виландом очень больших, совершенно необычных в каталитических исследованиях количеств палладия. В четырех опытах на 1 г глюкозы им были взяты 1.5, 2.2 и 9.8 г палладия. Об этих опытах еще будет речь в дальнейшем.

На основании полученных в предварительных опытах данных мы сочли целесообразным подвергнуть вопрос о выделении водорода из глюкозы под действием платиновой черни систематическому исследованию.

## МЕТОДИКА

### Приготовление платиновой черни

Исходная платина в виде жести, проволоки или сетки предварительно очищалась прокаливанием сперва в токе воздуха, а затем в токе чистого водорода при 700—800°. Очищенная платина растворялась в царской водке. Полученный раствор выпаривался досуха, вновь растворялся в воде, подкисленной хлористоводородной кислотой, опять выпаривался досуха, растворялся в воде и фильтровался. Из фильтрата платина была осаждена формальдегидом и едким кали. 33%-ный раствор формальдегида был приготовлен путем насыщения охлажденной воды газообразным формальдегидом, полученным из триоксиметилена нагреванием. Для опытов употреблялись чистые реактивы Кальбаума. В соответствии с пропорциями, указанными в работе Вильштеттера, смесь 62 см<sup>3</sup> раствора платинохлористоводородной кислоты, содержавшего 14.82 г платины и 137 см<sup>3</sup> раствора формальдегида, содержавшего 44.32 г СН<sub>2</sub>O, помещенная в охлаждающую смесь, постепенно обрабатывалась 176.5 см<sup>3</sup> КОН (135 г) и для завершения реакции нагревалась до 60° на водяной бане. Полученная платиновая чернь тщательно промывалась до исчезновения щелочной реакции и высушивалась. Из 14.82 г исходного материала было получено 13.53 г очень активной платиновой черни.

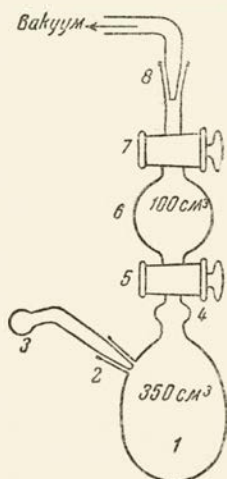


Рис. 1

### Опыты

Опыты проводились в аппарате, изображенном на рис. 1.

Перед опытом навеска платины всыпалась в колбочку 3, навеска сахара всыпалась в колбу 1, и при открытых кранах 5 и 7 аппарат присоединялся к лангмюировскому высоковакуумному насосу. После эвакуирования до  $10^{-3}$ — $10^{-4}$  мм Hg аппарат три раза заполнялся чистым, не содержащим кислорода водородом из электролизера и вновь эвакуировался до указанного разрежения. После этого аппарат разобщался с насосом, и через шлиф 8 при открытом кране 7 и закрытом кране 5 в воронку 6 вливалось посредством капиллярной воронки 100 см<sup>3</sup> 0.5 N NaOH; затем аппарат при закрытом кране 5 опять присоединялся к насосу, для того чтобы освободить раствор NaOH от кислорода. После этого кран 7 закрывался, платина поворотом колбочки 3 всыпалась в колбу, туда же через кран 5 при закрытом кране 7 вливался раствор

NaOH. После загрузки колба взбалтывалась рукой до растворения глюкозы и затем оставлялась в покое до конца опыта. Немедленно начиналось выделение газа, которое длилось 48—72 часа. Опыт велся при комнатной температуре (18°).

По окончании опыта делались измерения выделившегося газа и его анализ. Затем при закрытом кране 5 в воронку 6 вводилось 100 см<sup>3</sup> 0.5 N HCl (точный эквивалент прибавленной щелочи). После переведения кислоты в колбу 1 снова делались измерение и анализ газа для определения CO<sub>2</sub>.

### Исследование продуктов реакции

Дальнейшее исследование реакционной смеси производилось следующим образом: 1) количество непрореагировавшего сахара определялось по Бертрану; 2) общая кислотность раствора устанавливалась титрованием децинормальным раствором едкого натра; 3) летучие кислоты отгонялись под уменьшенным давлением (приемник помещался в охлаждающую смесь); 4) для полного удаления летучих кислот после полного отгона раствора к сухому остатку через капельную воронку прибавлялись 10—15 см<sup>3</sup> воды, раствор отгонялся досуха, и операция повторялась до тех пор, пока дистиллят не давал больше кислой реакции.

Количество летучих кислот определялось титрованием дистиллята 0.1 N NaOH. Качественно присутствие муравьиной кислоты устанавливалось реакцией восстановления концентрированного раствора хлорной ртути. Количественно она определялась окислением посредством 0.1 N KMnO<sub>4</sub>. Для этого 2 см<sup>3</sup> дистиллята и 0.2 г углекислого натрия в 10 см<sup>3</sup> воды помещались в фарфоровую чашку, раствор выпаривался досуха на водяной бане, после чего остаток выпаривался еще два раза с 10 см<sup>3</sup> воды досуха. Полученный осадок количественно смывался в колбу, содержащую 20 см<sup>3</sup> 0.1 N KMnO<sub>4</sub>, и нагревался в течение получаса на кипящей водяной бане. После охлаждения раствор подкислялся 10%-ной серной кислотой и к нему прибавлялось 10 см<sup>3</sup> 10%-ного раствора иодистого калия. Выделившийся иод определяется гипосульфитом; результат пересчитывается на муравьиную кислоту.

Для определения метилового спирта к 2 см<sup>3</sup> дистиллята прибавлялись 5 см<sup>3</sup> 0.5 N KMnO<sub>4</sub>, содержащего 20 г NaOH в 1 л, и нагревались полчаса на водяной бане. После этого раствор подкислялся 10%-ной H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и к смеси прибавлялись 5 см<sup>3</sup> 0.5 N щавелевой кислоты, избыток которой обратно оттитровывался 0.5 N KMnO<sub>4</sub>, раствор которого содержал 40 г фосфорной кислоты в 1 л. Из всего количества потребленного перманганата вычиталось количество, пошедшее на окисление муравьиной кислоты, разность пересчитывалась на метиловый спирт.

После отгонки летучих кислот оставался прозрачный светложелтый сироп, из которого выкристаллизовывалась поваренная соль. Из этого сиропа нелетучие кислоты выделялись путем превращения их в фенилгидразиды или в кальциевые соли.

Для получения фенилгидразидов сироп разбавлялся водой (в 20 раз) и к нему прибавлялся фенилгидразин из расчета: 1 часть фенилгидразина на 1 часть кислоты и 2 части фенилгидразина на 1 часть непрореагировавшего сахара и 50%-ная уксусная кислота в количестве, равном количеству фенилгидразина. Полученная смесь нагревалась на водяной бане, причем после получасового нагревания из раствора выпадал озон сахар. Реакционная смесь охлаждалась, отфильтровывалась от выделившегося озона и снова нагревалась на водяной бане в течение часа. На следующий день выделившийся фенилгидразид кислоты отфильтровывался, очищался кипячением водного раствора с животным углем и многократной перекри-

сталлизацией сначала из воды, а потом из 50%-ного спирта с примесью уксусноэтилового эфира.

Для выделения кальциевых солей отдельная порция упомянутого сиропа растворялась в воде и в течение 2—3 часов нагревалась на водяной бане с избытком свежеосажденного углекислого кальция, реакционная смесь фильтровалась и упаривалась таким образом, чтобы на 1 часть соли приходилось 3 части воды. Затравка значительно ускоряет кристаллизацию. Кальциевая соль получается перекристаллизацией из водного раствора. Из маточного раствора соль выделяется метиловым спиртом и очищается перекристаллизацией из небольшого количества воды.

Сорбит и маннит выделялись по Менье<sup>2</sup> конденсацией с бензальдегидом в растворе концентрированной соляной кислоты.

Дульцит и арабит выкристаллизовывались непосредственно из сиропа и очищались перекристаллизацией из спирта.

По вопросу, являющемуся предметом этой статьи, нами произведено около 90 опытов, давших в общем воспроизводимые результаты. Поэтому мы для экономии места приведем здесь по одному опыту из каждой серии.

### Опыты

*Опыт 1.* В первую очередь мы попытались произвести точный учет продуктов, образующихся при действии платины на щелочной раствор глюкозы.

Взято: глюкозы 12 г, 0.5 N NaOH 100 см<sup>3</sup>, платиновой черни 1 г. Температура 18°. Продолжительность опыта 24 часа.

Получено: выделившегося водорода 220 см<sup>3</sup> (0° и 760 мм Hg); углекислоты 0 см<sup>3</sup>; непрореагировавшей глюкозы 2.2 г (18.3%); летучих кислот в количестве, эквивалентном 5 см<sup>3</sup> 0.1 N NaOH (муравьиная кислота); глюкозы, превращенной в нелетучие кислоты, 4.8 г (40%); количество глюкозы, превращенной в сорбит, 3.03 г (25.2%). Сорбит выделен из указанного в методике сиропа в виде дибензала сорбита с точкой плавления 168°. Анализ дибензальсорбита дал следующие результаты:

|                      |                          |                           |
|----------------------|--------------------------|---------------------------|
| 1) 0.1500 г вещества | CO <sub>2</sub> 0.3713 г | H <sub>2</sub> O 0.0795 г |
| 2) 0.1650 » »        | CO <sub>2</sub> 0.4074 » | H <sub>2</sub> O 0.0834 » |

|            |           |           |          |         |
|------------|-----------|-----------|----------|---------|
| Найдено:   | 1) 67.50; | 2) 67.48; | 1) 6.05; | 2) 6.00 |
| Вычислено: | 67.00     |           | 6.19     |         |

Фракция нелетучих кислот была выделена из спирта в виде фенилгидрида глюконовой кислоты (3 г) с точкой плавления 200°.

#### Определение азота по Дюма

|                                                                |
|----------------------------------------------------------------|
| 1) 0.1929 г дали 16.5 мл N <sub>2</sub> при 18.5°, 737.9 мм Hg |
| 2) 0.1656 » » 13.78 » N <sub>2</sub> » 17.5°, 747.5 » Hg       |

|            |         |         |
|------------|---------|---------|
| Найдено:   | 1) 9.49 | 2) 9.48 |
| Вычислено: | 9.78    |         |

Если продукты такого же опыта выделять в виде солей кальция, то из 12 г глюкозы имеется возможность выделить 90—93% теоретического количества глюконата кальция и около 1 г арабоната кальция.

#### Анализ глюконата кальция

0.1192 г соли дали 0.0157 г CaO

Вычислено: 13.08% CaO; найдено: 13.28% CaO.

*Анализ арабоната кальция*

0.985 г соли дали 0.0152 г СаО

Вычислено: 15.14% СаО; найдено: 15.43% СаО

Из приведенных данных следует, что прореагировавшая глюкоза (10.8 г) дала: сорбита 3 г (вычислено на основании учета исчезнувшей глюкозы 3.03 г), 220 см<sup>3</sup> водорода (соответствующие 1.77 г глюкозы), глюконовой кислоты (титрованием нелетучих кислот) в количестве, соответствующем 4.8 г глюкозы (в виде фенилгидразида выделено 82% вычисленного количества). Таким образом, прореагировавшая глюкоза (10.8 г) распалась на эквивалентные количества глюконовой кислоты, с одной стороны, и сорбита и водорода, с другой стороны:

$$10.8 \text{ г} \cong 4.8 + (3.3 + 1.77).$$

Следовательно, не подлежит никакому сомнению, что в своей первоначальной фазе процесс прошел в бескислородной среде в направлении окислительно-восстановительной реакции дисмутации или реакции Каннищаро.

*Опыт 2. Влияние концентрации щелочи.* Те же условия, что и в опыте 1, с той разницей, что вместо 10 см<sup>3</sup> 0.5 N NaOH были взяты 100 см<sup>3</sup> 0.1 N NaOH, и смесь оставлена в течение 3 дней вместо 24 час.

Получено: водорода 36.8 см<sup>3</sup>; непрореагировавшей глюкозы 8.5 г; количество летучих кислот соответствовало 5 см<sup>3</sup> 0.1 N NaOH; количество нелетучих кислот соответствовало 100 см<sup>3</sup> 0.1 N NaOH; количество глюкозы, превращенной в нелетучие кислоты, — 1.9 г; количество глюкозы, превращенной в сорбит, — 1.6 г.

Уменьшение концентрации щелочи в 10 раз замедлило течение реакции, но не изменило ее характера.

*Опыт 3. Необходима ли едкая щелочь как таковая для реакции дисмутации или же она может быть заменена фосфатным буфером?*

Вместо 100 см<sup>3</sup> 0.5 N NaOH взято 100 см<sup>3</sup> 6%-ного раствора Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, соответствующего рН = 9.18. Продолжительность опыта 10 дней.

Получено: водорода 35 см<sup>3</sup>; непрореагировавшей глюкозы 10 г; количество летучих кислот соответствовало 1.0 см<sup>3</sup> 0.1 N NaOH; нелетучие кислоты, ввиду их незначительного количества, не могли быть выделены титрованием из забуференного раствора. Из последнего выделено было 1.09 г дибензальсорбита, эквивалентного 0.55 г сорбита (64% теоретического количества).

Этот опыт, так же как и опыт с боратным буфером, показывает, что присутствие едкой щелочи не является необходимым условием превращения глюкозы в направлении дисмутации.

*Опыт 4. Влияние количества платины.* Взято: 0.1 г платиновой черни вместо 1 г, остальные компоненты, как в стандартном опыте. Продолжительность опыта 6 дней.

Получено: водорода 0 см<sup>3</sup>; непрореагировавшей глюкозы 3.67 г; количество нелетучих кислот соответствовало 224 см<sup>3</sup> 0.1 N NaOH; количество глюкозы, превращенной в нелетучие кислоты, — 4.03 г; количество глюкозы восстановленной — 4.03 г.

Таким образом, и тут уменьшение количества платиновой черни замедлило реакцию, но не изменило ее направления. Вследствие замедления реакции выделившийся водород был весь использован для восстановления глюкозы. Глюконовая кислота и сорбит получились в эквивалентных количествах, причем осталась непокрытой только небольшая часть превращенной глюкозы [8.33 — (4.03 + 4.03) = 0.27 г].

*Опыт 5. Как ведут себя другие сахара?* Взято: 12 г галактозы вместо глюкозы. Продолжительность опыта 10 дней.

Получено: водорода 241.5 см<sup>3</sup>. Общий объем раствора после точной нейтрализации соляной кислотой 184 см<sup>3</sup>. Общая кислотность образовавшихся органических кислот соответствовала 380.08 см<sup>3</sup>, 0.1 N NaOH, количество выделенных летучих кислот соответствовало 1 см<sup>3</sup> 0.1 N NaOH. Количество непрореагировавшей галактозы не превышало 0.236 г. Галактозы на образование нелетучих кислот (галактоновой) пошло 6.79 г. Выделившиеся 241.5 см<sup>3</sup> водорода соответствовали 1.934 г галактозы. Таким образом, на образование дульцита должно было пойти 4.857 г галактозы.

Для выделения галактоновой кислоты из сиропа, оставшегося после отгонки воды и летучих кислот из реакционной смеси при 50° под уменьшенным давлением, содержащего по подсчету 2.12 г галактоновой кислоты, было взято 5.4 г, растворено в 18 см<sup>3</sup> воды и к раствору были прибавлены 2.2 г фенилгидразина и 2.3 г 50%-ной уксусной кислоты. Смесь кипятилась в течение часа на водяной бане. После охлаждения из раствора выкристаллизовывалось 2.1 г фенилгидразида галактоновой кислоты; из маточного раствора получено еще 0.52 г фенилгидразида. Полученный продукт очищался двукратной кристаллизацией из спирта с водой и кипячением с углем. Точка плавления 196°. Выход 82% теории.

Дульцит получен непосредственной кристаллизацией из остаточного сиропа. Из 10.8 г остаточного сиропа, по подсчету содержавшего 3 г дульцита, получено 2.2 г кристаллов. Последние были отжаты и перекристаллизованы из водного спирта. Температура плавления 186°.

*Опыт 6. Арабиноза.* Взято: арабинозы 10 г. Продолжительность опыта 10 дней.

Получено: водорода 240 см<sup>3</sup>; непрореагировавшей арабинозы 0.06 г; количество летучих кислот соответствовало 1 см<sup>3</sup> 0.1 N NaOH; количество нелетучих кислот соответствовало 341 см<sup>3</sup> 0.1 N NaOH; в нелетучие кислоты превращено 5.12 г арабинозы; 1.6 г арабинозы эквивалентны 240 см<sup>3</sup> выделившегося водорода. Таким образом, на образование арабита должно было пойти 3.52 г арабинозы.

Для выделения арабиновой кислоты 7.34 г сиропа, полученного после отгонки воды и летучих кислот и содержащего по подсчету 1.92 г арабиновой кислоты, были растворены в 50 см<sup>3</sup> воды и к раствору было прибавлено 2 г фенилгидразина и 2 г 50%-ной уксусной кислоты. Смесь нагревалась полтора часа на водяной бане. После охлаждения было выделено 2.05 г фенилгидразида арабиновой кислоты (68.5%); после перекристаллизации из спирта — белые листочки с температурой плавления 210—211°. Для арабиновой кислоты выделена также ее натриевая соль C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>O<sub>6</sub>Na · 5H<sub>2</sub>O; из воды — крупные призмы.

Анализ: 0.1607 г соли дали 0.0421 г Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.  
Вычислено: 8.27% Na; найдено: 8.40% Na.

После долгого стояния из оставшегося сиропа выкристаллизовался арабит. Кристаллы были отжаты на пористой тарелке и перекристаллизованы из спирта, температура плавления 100—101°. Из 10 г сиропа, содержащего 1.4 г арабита, было выделено 0.5 г кристаллов (35% теоретического количества).

*Опыт 7. Манноза.* Взято: маннозы 12 г. Продолжительность опыта 11 дней.

Получено: водорода 15 см<sup>3</sup>, углекислого газа 7.5 см<sup>3</sup>; непрореагировавшей маннозы 2.4 г; количество летучих кислот соответствовало 5 см<sup>3</sup> 0.1 N NaOH, нелетучих — 263 см<sup>3</sup> 0.1 N NaOH; в нелетучие кислоты пре-



вращено 4.73 г маннозы; 0.09 г маннозы эквивалентны выделившемуся водороду. Таким образом, на маннит должно пойти 4.65 г маннозы.

Манноновая кислота выделялась в форме фенилгидразидов по способу, описанному выше для арабинозы и галактозы, причем было выделено 50% вычисленного количества фенилгидразида с температурой плавления 220—223°.

Маннит выделялся по Менье<sup>2</sup> в форме трибензальманнита. Выделено 52% вычисленного количества с температурой плавления 204—205°.

*Опыт 8. Фруктоза.* Взято: фруктозы 12 г. Продолжительность опыта 13 дней; никакого выделения газа не было.

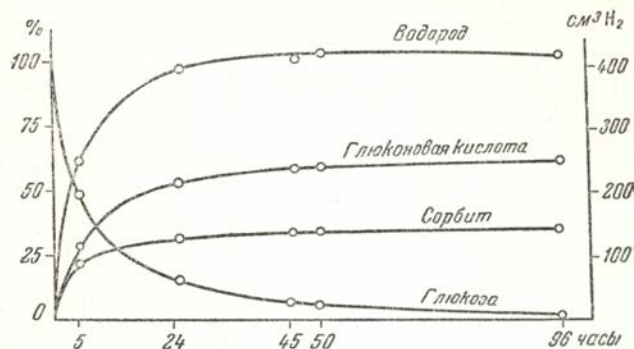


Рис. 2

Получено: непрореагировавшей фруктозы 1.84 г; количество летучих кислот соответствовало 21 см³ 0.1 N NaOH, нелетучих — 316 см³ 0.1 N NaOH. Муравьиной кислоты: 1) титрованием 0.1 N NaOH — 0.095 г, 2) окислением щелочным раствором перманганата калия — 0.092 г; метилового спирта окислением щелочным раствором перманганата калия — 0.06 г. Из нелетучих кислот выделена глюконовая кислота в форме фенилгидразида. Из 7.45 г сиропа, содержащего 4 г продуктов прореагировавшей фруктозы, выделено 1.37 г фенилгидразида. Образование фенилгидразида сопровождается выделением хлопьев смолы. Фенилгидразид очищался кипячением с животным углем и перекристаллизацией из 50%-ного спирта с примесью уксусноэтилового эфира; температура плавления 200°.

Для определения сорбита 5.44 г сиропа, содержащего 2.89 г прореагировавшей фруктозы, обрабатывалось по Менье для получения дибензальсорбита. Получено 1.084 г дибензальсорбита с температурой плавления 168°.

Ни арабионовой кислоты, ни арабита не найдено.

*Опыт 9.* Приводим еще один опыт (см. табл.), в котором превращение глюкозы в стандартных условиях было прослежено во времени.

| № п/п | Число часов после начала опыта | Количество непрореагировавшей глюкозы (в г) | Количество глюкозы, превратившейся в глюконовую кислоту (в г) | Количество глюкозы, превратившейся в сорбит (в г) | Объем выделившегося водорода (в мл) |
|-------|--------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-------------------------------------|
| 1     | 5                              | 5.82                                        | 3.48                                                          | 2.7                                               | 248                                 |
| 2     | 24                             | 1.84                                        | 6.36                                                          | 3.8                                               | 359                                 |
| 3     | 45.5                           | 0.822                                       | 7.01                                                          | 4.17                                              | 414                                 |
| 4     | 50.1                           | 0.718                                       | 7.13                                                          | 4.17                                              | 418                                 |
| 5     | 96                             | 0.260                                       | 7.43                                                          | 4.31                                              | 418                                 |

Пробы газа и жидкости брались посредством загнутой капиллярной трубки, которая через боковой шлиф была введена в колбу 1. На внешней стороне трубка была снабжена краном и небольшим приемником, который мог быть соединен с вакуум-аппаратом.

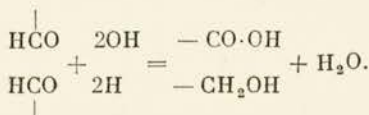
На рис. 2 даны кривые изменения концентрации глюкозы, глюконовой кислоты и сорбита и объема выделившегося водорода.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Приведенные выше экспериментальные данные с полной определенностью показывают, что исследованные нами сахара в щелочном растворе, даже весьма слабом, при полном отсутствии кислорода, при обыкновенной температуре и в присутствии платиновой черни как катализатора претерпевают окислительно-восстановительное превращение. При этом продуктами превращения прореагировавшего сахара, в количествах, близких к теоретическим, являются: кислота с тем же числом атомов углерода, восстановленный спирт и свободный водород. В большинстве случаев сумма восстановленного сахара и выделившегося водорода эквивалентна образовавшейся кислоте. С фруктозой были выделены метиловый спирт и муравьиная кислота, но арабиновая кислота и арабит не могли быть выделены. В опыте с альдозами никаких указаний на расщепление молекулы углевода в условиях опыта не было получено. Принимая во внимание, что в условиях опыта сахара подвергались очень мягкому воздействию и количественный учет продуктов реакции дал числа, близко соответствующие количеству прореагировавшего сахара, мы с полным основанием можем утверждать, что первым этапом распада альдоз является окислительно-восстановительная реакция в направлении дисмутации или каннищаровой реакции.

Возникает вопрос о механизме этой окислительно-восстановительной реакции. В настоящее время существуют две теории: гидролитическая теория Траубе-Баха и дегидрогенизационная теория Виланда.

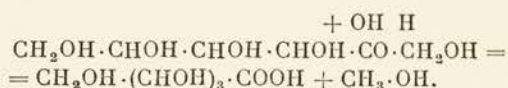
Исходя из положения, что окислительно-восстановительная реакция протекает на альдегидной группе НСО (фактический материал не допускает никакого другого предположения), теория Траубе-Баха принимает, что окислительная часть реакции происходит за счет гидроксильной воды одновременно с восстановительной, которая происходит за счет водорода воды.



Это толкование применимо ко всем без исключения окислительно-восстановительным реакциям, происходящим в водных растворах. В зависимости от скорости окислительной части реакции и восстанавливаемости субстрата освобождающийся водород потребляется целиком на восстановление или частично выделяется в свободном состоянии. Это явление хорошо иллюстрируется на примере формальдегида. В слабом щелочном растворе формальдегид дисмутирует с образованием эквивалентных количеств муравьиной кислоты и метилового спирта. Но с увеличением концентрации щелочи наряду с муравьиной кислотой и метиловым спиртом начинает выделяться водород, и выделяется его тем больше, чем концентриро-

ваннее щелочь, следовательно, чем скорее происходит окислительная часть реакции. Объясняется это тем, что, как правило, окислительные реакции идут быстрее, чем восстановительные, и что при большой концентрации выделяющегося в атомном состоянии водорода атомы легче соединяются между собой в молекулы, чем с формальдегидом в метиловый спирт.

В опыте с фруктозой появление метилового спирта и муравьиной кислоты показывает, что окислительно-восстановительная реакция разыгралась между кетогруппой и группой —СН<sub>2</sub>ОН, причем первая присоединила ОН, а последняя Н:

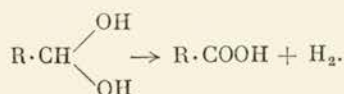


В соответствии с этим в продуктах реакции должна была оказаться арабоновая кислота. Но, судя по количеству метилового спирта и муравьиной кислоты, ее вообще было мало, и нам не удалось ее выделить, потому что под действием щелочи фруктоза превращалась главным образом в глюкозу и дала глюконовую кислоту и сорбит (опыт 8).

Что касается тех ничтожных количеств летучих кислот, найденных в продуктах реакции всех исследованных альдоз, то возможно, что их образование объясняется частичным превращением альдоз в кетозы.

Таким образом, как давно установленные факты, так и вновь сделанные наблюдения без всякой натяжки укладываются в рамки теории Траубе-Баха.

В своей теории дегидрирования Виланд исходит из предположения, что в процессах медленного окисления, происходящих в водных растворах, решающую роль играет не активирование молекулярного кислорода, а активирование водорода субстрата и перенос его катализатором. Так, при взбалтывании этилового спирта с палладиевой чернью образуется ацетальдегид, и в палладии накапливается водород. При взбалтывании раствора гидрохинона с палладиевой чернью образуется хинон, и из палладия можно выделить водород. Альдегиды в форме гидратов дегидрируются палладием с образованием кислот:



В упомянутых выше опытах Виланд пытался доказать, что при помощи палладия можно путем дегидрирования окислить глюкозу с выделением значительных количеств углекислоты и водорода в отсутствие кислорода. Следовательно, с точки зрения теории Виланда полученные нами результаты могут быть объяснены так, что платина активировала водород гидратной формы альдоз и, отняв его с превращением части альдоз в кислоты, частью перенесла его на другую часть альдозы с образованием спирта, частью выделила его в свободном состоянии.

Это толкование реакции было бы приемлемым, если бы экспериментальная основа теории Виланда была неоспоримой. Но этого нет. Безусловно доказательным Виланд считает свой опыт с гидрохиноном и палладием. Но Джиллеспи<sup>3</sup> показал, что палладиевая чернь, приготовленная по Виланду, действительно «дегидрировала» гидрохинон, но что она содержала значительные количества *кислорода*. Не освобожденная от кислорода, эта чернь весьма активно дегидрирует гидрохинон, в то время как

в отсутствии кислорода она никакого дегидрирующего действия не обнаруживает. Этот факт признан самим Виландом.

Палладиевую чернь того же приготовления, следовательно, содержащую кислород, Виланд применил для дегидрирования глюкозы. Для того чтобы получить окисленные глюкозы до углекислоты этой палладиевой чернью в бескислородной среде, он должен был употребить чернь в совершенно необычных для каталитических реакций количествах — от 2 до 10 г черни на 1 г глюкозы, оперируя при 40°. Если мы в наших опытах не получили ни следа углекислоты, а Виланд получил ее значительные количества, то это объясняется тем, что в его опытах произошло окисление глюкозы за счет кислорода черни.

Вторая экспериментальная основа теории Виланда — непосредственное дегидрирование спирта хиноном — тоже оказалась не соответствующей действительности. Бах и Николаев<sup>4</sup> показали, что при полном отсутствии воды хинон не действует окислительно на спирт, не оказывает никакого окислительного и дегидрирующего действия на пирогаллол в органических растворителях, хорошо высушенных, а окислительное действие его проявляется пропорционально количеству прибавленной воды. Эти факты легко объясняются теорией Траубе-Баха, но совершенно не укладываются в теорию Виланда.

Вообще постулат активирования водорода органического субстрата платиной или палладием как предпосылка окислительно-восстановительной реакции мало обоснован. Реакция Канниццаро на ароматических альдегидах в присутствии щелочей, окисление индиго в изатин и восстановление другой части его в лейкоформу в щелочном растворе и ряд других аналогичных реакций проходят в отсутствие дегидрирующих катализаторов. Толкование Виланда может казаться приемлемым в реакциях, протекающих в присутствии катализаторов. Вследствие некоторого сродства катализатора к водороду катализатор (палладий, платина) притягивает к себе водород субстрата, активирует его и присоединяет к себе, а потом может им гидрировать другие вещества. Но совершенно непонятно,

почему из двух молекул  $\text{H}_2\text{C} \begin{array}{l} \text{OH} \\ \text{OH} \end{array}$  в присутствии щелочи, которая не может

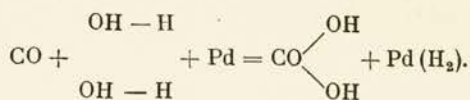
рассматриваться как дегидрогенизирующий или гидрогенизирующий катализатор, одна молекула приобретает свойства активировать водород другой и становится «акцептором» водорода, а другая «донатором» водорода. Нам кажется вполне очевидным, что в основе окислительно-восстановительных реакций лежит не активирование водорода субстрата, не миграция активированного водорода от одной молекулы субстрата к другой или от одной части молекулы к другой, а способность органических веществ определенной структуры одновременно окисляться за счет гидроксила воды и восстанавливаться за счет водорода воды. В свете полученных нами экспериментальных данных есть все основания предполагать, что углеводы принадлежат к этой категории химических веществ и что все процессы брожения основаны на воздействии элементов воды, приходящих из внешней среды, а не на миграции их от одной молекулы к другой или внутри одной и той же молекулы.

Чтобы вполне ясно выявить различие между теорией Траубе-Баха и Виланда, мы приведем еще следующий пример.

Виланд показал, что если взбалтывать окись углерода с водой и палладиевой чернью в отсутствии кислорода, то образуется углекислота, а в палладии накапливается водород:



Теория Траубе-Баха дает наиболее простое толкование этой реакции:



Ни палладий сам по себе, ни окись углерода сама по себе не разлагают воды, но, действуя одновременно, палладий притягивает водород, а окись углерода — гидроксилы.

Совсем иное толкование дает этой реакции Виланд. Он полагает, что сначала окись углерода гидратируется, образуя муравьиную кислоту, которая затем дегидрируется палладием, освобождая углекислоту:



Против этого толкования говорит прежде всего то, что окись углерода чрезвычайно трудно гидратируется: нужно пропускать окись углерода в кипящий 50%-ный раствор КОН, чтобы получить муравьинокислую соль. Виланд утверждает, что он констатировал образование муравьиной кислоты как промежуточного продукта в реакции с окисью углерода с палладием; но Траубе категорически отрицает образование муравьиной кислоты на основании своих собственных точных опытов.

Против расщепления воды окисью углерода и палладием Виланд возражает, считая эту реакцию мало вероятной. Однако Бах указал, что при предполагаемой гидратации окиси углерода молекула воды тоже расщепляется на OH и H и притом в гораздо более трудных условиях (на атоме

углерода  $\begin{array}{c} \text{H} \\ | \\ \text{C} = \text{O} \\ | \\ \text{HO} \end{array}$ ). Ведь всякая гидратация есть расщепление воды.

В попытках обосновать свою теорию дегидрирования Виланд скомбинировал целый ряд очень красивых опытов (например, окисление этилового спирта в бескислородной среде как живыми уксусными бактериями, так и извлеченными из них энзимами в присутствии метиленовой сини как акцептора водорода), но все без исключения найденные им новые факты гораздо проще объясняются теорией Траубе-Баха, чем его теорией дегидрирования, для подтверждения которой он вынужден прибегать к произвольным толкованиям.

С точки зрения биологических процессов окисления углеводов, полученные в наших исследованиях данные являются новым подтверждением первоначального предположения Траубе о роли воды в этих процессах. Но если в условиях наших опытов первыми уловимыми продуктами каталитического распада глюкозы в бескислородной среде оказались глюконовая кислота и сорбит, то это не значит, что в живой клетке, где условия катализа гораздо более сложны, где фосфорная кислота играет такую важную роль в образовании промежуточных продуктов, распад глюкозы не идет другими путями. Мы полагаем, что у микроорганизмов, из которых некоторые образуют большие количества глюконовой кислоты, распад глюкозы идет по найденному нами пути. Кроме того, наши опыты подвели химическую основу под образование водорода в живой клетке. Так как и с препаратами азотобактера и с платиновой чернью выделение водорода получилось и в присутствии кислорода, то, очевидно, окислительно-восстановительное превращение глюкозы за счет элементов воды может происходить и в кислородной среде. Поэтому глюкозооксидаза, извлеченная Мюллером из печени и дающая глюконовую кислоту в качестве единственного продукта окисления, в действительности не является непосредствен-

ным переносчиком кислорода на молекулу глюкозы, а ферментом, действующим аналогично платиновой черни.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

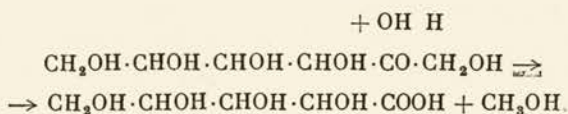
I. При действии платиновой черни на щелочные растворы глюкозы (0.1—0.5 N NaOH) при обыкновенной температуре в отсутствие кислорода выделяется водород и образуются глюконовая кислота и сорбит.

II. Точный учет продуктов реакции показал, что около половины прореагировавшего сахара превратилось в глюконовую кислоту (выделено в виде фенилгидразида и кальциевой соли), другая половина пришлось на сорбит (выделен в виде дибензала) и свободный водород.

III. Галактоза, манноза и арабиноза дали аналогичные результаты. Продукты реакции выделены и идентифицированы.

IV. Ввиду того что указанными продуктами реакции почти целиком покрываются количества прореагировавших сахаров, есть все основания считать, что первым этапом распада альдоз является окислительно-восстановительная реакция за счет элементов воды в направлении дисмутации, или каництаровой реакции.

V. В опытах с фруктозой было констатировано образование метилового спирта и муравьиной кислоты, что указывает на распад молекулы:



Арабиновой кислоты не удалось выделить, но выделены были сорбит и глюконовая кислота, вероятно вследствие превращения фруктозы в глюкозу под влиянием щелочи.

VI. Установленные в этом исследовании факты лучше объясняются гидролитической теорией Траубе-Баха, чем дегидрогенизационной теорией Виланда, экспериментальная химическая база которой не является бесспорной. В основе окислительно-восстановительных реакций лежит не активирование водорода с последующим отнятием его, не миграция водорода от одной молекулы к другой или от одной части молекулы к другой, а способность органических веществ определенной структуры окисляться за счет гидроксила воды. Углеводы принадлежат к этой категории органических соединений, и этим обуславливается их значение в жизни клетки.

6 апреля 1936 г.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Wieland. Ber. Dtsch. chem. Ges., **46**, 3327 (1913).
2. Meunier. Ann. Chim. Phys. (6), **22**, 412 (1891); (8), **25**, 286.
3. Gillespie a. Hall. J. Amer. Chem. Soc., 4207 (1926).
4. Бах и Николаев. ДАН СССР, **11** (1932); Ber. Dtsch. chem. Ges., **64**, 2769 (1931); настоящая книга, стр. 312.

*Часть III*

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ  
РАБОТЫ ПО БИОХИМИИ**

---





---

---

Раздел I

**ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ЖИВЫХ  
ОРГАНИЗМАХ**

**ИССЛЕДОВАНИЯ О РОЛИ ПЕРЕКИСЕЙ В ХИМИИ ЖИВОЙ КЛЕТКИ**

*(Untersuchungen über die Rolle der Peroxyde in der Chemie der lebenden Zelle)*

*Сообщение I*

**О ДЕЙСТВИИ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА НА ЖИВУЮ КЛЕТКУ**

*[Ueber das Verhalten der lebenden Zelle gegen Hydroperoxyd] \**

(Совместно с Р. Ш о д а)

Согласно перекисной теории, которую один из нас<sup>1</sup> предложил одновременно с Энглером<sup>2</sup> для объяснения явлений медленного окисления при действии молекулярного кислорода на окисляемые вещества, под действием энергии последних первоначально разрывается только одна из связей, соединяющих атомы кислорода. Таким образом, в качестве первичных продуктов окисления всегда образуются перекиси, типа перекиси водорода, которые более или менее устойчивы, в зависимости от условий, и в большинстве случаев превращаются в перекись водорода, реагируя с водой. С химической точки зрения, процессы сгорания, имеющие место в живых клетках, должны рассматриваться исключительно как процессы медленного окисления, и поэтому в живой клетке также должны образовываться перекиси в качестве нормальных продуктов окисления. Следовательно, образование перекисей принадлежит к числу постоянных факторов, играющих определенную роль в жизнедеятельности клетки, как, например, свет, теплота и т. д., и к которым живая клетка должна определенным образом приспособляться. Приспособление клетки к перекисям заключается в способности, с одной стороны, разлагать каталитически перекись водорода, а с другой стороны, активировать ее при помощи ферментов. Соответственными ферментами являются каталаза и пероксидаза.

Давно известно, что различные растительные и животные соки и экстракты способны катализировать перекись водорода. Шенбейн<sup>3</sup> и вслед за ним многочисленные авторы приписывают это свойство ферментам, существующим в организме. Только в последнее время О. Леву<sup>4</sup> удалось показать, что способность катализировать перекись водорода принадлежит определенному повсеместно распространенному ферменту, названному им каталазой. Каталаза присутствовала во всех без исключения исследованных Левом многочисленных объектах. Он правильно предполагает, что повсеместное присутствие этого фермента в организме не может быть случайным и должно иметь определенное физиологическое значение. Так как каталаза полностью и очень энергично разлагает перекись водорода вне клетки, то Лев заключил, что она действует как защитное

\* Ber. Dtsch. chem. Ges., 35, 1275 (1902).

средство, которое обуславливает разрушение малейших следов перекиси водорода, образующейся в процессах окисления. Действительно, согласно Леву, перекись водорода должна быть энергичным ядом для протоплазмы, разрушающим путем окисления неустойчивые группы атомов в живой протоплазме. Поэтому, по его мнению, и теория перекисной активации кислорода в живой клетке не может быть правильной.

Признавая полностью значение фактов, установленных Левом, мы не можем присоединиться к его выводам, главным образом потому, что чистая перекись водорода в не слишком концентрированных растворах не является ядом для протоплазмы. Как видно из следующих опытов, различные низшие растительные организмы могут не только сохранять жизнедеятельность, но даже бурно развиваться в присутствии сравнительно больших количеств перекиси водорода.

Наши опыты были поставлены с чистыми культурами *Penicillium glaucum*, *Rhizopus nigricans* и *Sterigmatocystis nigra*. Колбочки Эрленмейера, содержащие по 25 см<sup>3</sup> питательной среды Ролена, были простерилизованы обычным способом; после прибавления возрастающих количеств перекиси водорода они были засеяны соответствующими грибами из чистой культуры и поставлены в термостат при 22°. Количество перекиси (10%-ный раствор) соответствовало 1—25 мг активного кислорода в первой серии опытов и 5—50 мг — во второй. Для контроля в термостат были поставлены, с одной стороны, колбочки с посевом грибов без перекиси водорода, с другой стороны, колбочки с перекисью водорода и жидкостью Ролена без грибов.

При этом оказалось, что хотя перекись водорода и задерживала развитие грибов, но после определенного инкубационного периода, менявшегося в зависимости от природы грибов и количества перекиси водорода, из спор выходили нити мицеллия, которые сначала покрывались пузырьками газа, а затем обуславливали длительное выделение газов. Последнее увеличивалось с разрастанием мицеллия и прекращалось тогда, когда в питательной среде уже нельзя было обнаружить перекиси водорода при помощи двуокиси титана в сернистом растворе. Тем не менее грибки (*Sterigmatocystis* и *Rhizopus*) достигали полного развития с образованием спор в то время, когда среда содержала еще значительные количества перекиси водорода. Из трех исследованных грибов *Penicillium glaucum* оказался наиболее чувствительным к перекиси водорода. Питательные среды, содержавшие более 20 мг активного кислорода, оставались стерильными. *Rhizopus nigricans* переставал развиваться при содержании перекиси водорода больше чем 30 мг активного кислорода (0.25% перекиси водорода). *Sterigmatocystis nigra* давал, наоборот, во всех случаях прекрасные культуры. Одной из этих культур были засеяны далее питательные среды, содержавшие от 40 до 120 мг активного кислорода. Эта серия опытов показала, что полное развитие *Sterigmatocystis* может еще иметь место при содержании перекиси водорода более 1%.

Из различных количественных опытов мы приводим здесь только один. Так как вследствие разложения содержания перекиси в питательной среде непрерывно падает, были также поставлены опыты с постоянным содержанием перекиси. С этой целью был применен прибор, в основном аналогичный тому, которым Бах<sup>5</sup> пользовался для анализа жидкостей, содержащих перекиси. В бюретку с краном, деленную на 1/50 см<sup>3</sup>, был налит 10%-ный раствор перекиси водорода, и во избежание испарения бюретка была закрыта сверху резиновой трубкой и стеклянной палочкой. Газ, выделяющийся из эрленмейеровской колбочки, освобождался от следов углекислоты в калиаппарате и собирался в газовой бюретке. Потеря перекиси, вычисляемая из количества выделившегося кислорода, покрывалась пополнением из бюретки каждые сутки.

Этим путем было установлено, что *Sterigmatocystis nigra* очень хорошо может развиваться в питательной среде с постоянным содержанием перекиси, соответствующим 80 мг активного кислорода (0.68% перекиси водорода). В сутки разлагались следующие количества перекиси водорода:

I. 4.2 мг; II. 8.7 мг; III. 36.2 мг; IV. 49.4 мг; V. 62.4 мг; VI. 76.0 мг (опыт был прекращен на седьмой день).

Следует еще упомянуть, что в смеси перекиси водорода и жидкости Ролена, не содержащей грибов, не было заметного выделения кислорода. ■

Из этих опытов вытекает, что некоторые организмы могут существовать в питательных средах, содержащих до 1% перекиси водорода. Присутствие перекиси, таким образом, не является несовместимым с жизнью протоплазмы. Тот факт, что более концентрированные растворы перекиси убивают протоплазму, ни в коем случае не может служить аргументом в пользу предположения, что перекиси не могут существовать в живой клетке или

не могут выполнять в ней полезных функций. Выше определенного, сравнительно невысокого предела теплота также губительна для протоплазмы и, следовательно, ведет себя, как яд. Однако никто из этого не делает вывода, что теплота не играет никакой роли в балансе живой клетки.

Что перекись водорода не является ядом для протоплазмы, было далее подтверждено опытами *плазмоллиза*. Растворы азотнокислого калия, содержащие до 1% перекиси водорода, вызывают в растительных клетках вполне нормальный плазмоллиз. При содержании выше 1% перекиси водорода структура протоплазмы более или менее быстро уничтожается после предшествующего плазмоллиза. Поразительно, что даже в чистой 10%-ной перекиси водорода (без прибавления азотнокислого калия) происходит еще быстропроходящий плазмоллиз.

По нашему мнению, имеющийся в настоящее время фактический материал относительно роли перекисей в химии живых клеток позволяет высказать следующие гипотезы.

Перекиси, образующиеся первично в клетке, используются двумя путями: как окислители, в собственном смысле этого слова, для трудноокисляемых составных частей клетки и как переносчики химической энергии, превращающие ее в теплоту.

В живой клетке часто встречается фермент (пероксидаза), активирующий перекись водорода аналогично серноокислой закиси железа и вызывающий вместе с перекисью водорода синее окрашивание гваяковой настойки<sup>6</sup>. Этот фермент, может быть, и вызывает при помощи перекиси сгорание трудноокисляемых составных частей клетки, которые сами по себе являются лишь слабоокисляемыми.

Пероксидаза, а следовательно, и процессы сгорания, повидимому, должны быть локализованы в менее чувствительных частях клетки. В этом случае каталаза не может оказывать обычного действия на перекись водорода, так как она разрушается при объединенном действии пероксидазы и перекиси. Лев<sup>7</sup> указывает, что каталаза сильно разрушается уже под действием одной пероксидазы. В более чувствительных частях клетки, которые могли бы разрушаться под действием диффундирующей перекиси, выявляются функции каталазы.

При каталитическом разложении перекисей не только защищаются чувствительные части протоплазмы, но имеет место превращение в теплоту химической энергии, содержащейся в перекисях. Таким образом, использование перекисей в живой клетке регулируется комбинированным действием пероксидазы и каталазы.

Настоящая предварительная гипотеза послужит для ориентации в наших дальнейших опытах при исследовании этого вопроса.

17 марта 1902 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бах. С. R. Acad. Sci., Paris, 124, 954 (1897); настоящая книга, стр. 242.
2. Engler u. Wild. Ber. Dtsch. chem. Ges., 30, 1669 (1897).
3. Schönbein. J. prakt. Chem., 89 (1862).
4. Loew F. Catalase. U. S. Dept. Agric. Rep., No 68 (1901).
5. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., 33, 1506 (1900); настоящая книга, стр. 259.
6. Spitzer. Pflüg. Arch., 67, 615 (1897).
7. L. c., стр. 17.

## Сообщение II

## ОБ ОБРАЗОВАНИИ ПЕРЕКИСЕЙ В ЖИВОЙ КЛЕТКЕ

[Ueber Peroxydbildung in der lebenden Zelle] \*

(Совместно с Р. Ш о д а)

Согласно предложенной нами теории, кислород, необходимый для сжигания трудноокисляемых составных частей клетки, активируется путем промежуточного образования перекисей. Это образование может иметь место только при помощи легкоокисляемых соединений, так что можно а priori предположить, что живая клетка производит вещества, особенно подходящие для образования перекисей. Такими образователями перекиси, по видимому, являются так называемые окислительные ферменты, или оксидазы.

На перекисную функцию оксидаз Бах<sup>2</sup> указал уже пять лет тому назад. Касти и Левенгардт<sup>3</sup> недавно высказывались в том же смысле. Изучение «псевдокатализа» привело также Энглера и Велера<sup>4</sup> к выводу, что оксидазы являются соединениями, аналогичными перекисям.

Для более точной характеристики перекисей, образующихся при действии молекулярного кислорода на окислительные ферменты, мы поставили опыты, которые, однако, не дали до настоящего времени удовлетворительных результатов. Наблюдение, случайно сделанное нами в связи с этими опытами, привлекло наше внимание к другому пути исследования и привело в конце концов к выработке метода, который позволяет доказать образование перекисей в живых растениях с достаточной достоверностью.

Обработывая свежееотпрессованный сок *Lathraea squamaria*, содержащий большие количества оксидазы, током чистого воздуха при прибавлении по каплям 1%-ного раствора едкого бария, мы получили осадок барита; после промывания и разложения разбавленной серной кислотой этот осадок не давал известной реакции на перекись водорода с двуокисью титана в серноокислом растворе, однако вызывал немедленно очень интенсивное посинение бумажки с иодистым калием и крахмалом. Полученный раствор не давал реакции на азотистую кислоту с реактивом Грисса. Немедленное выделение иода из иодистого калия, следовательно, могло быть вызвано только присутствием замещенной перекиси водорода<sup>5</sup>. Аналогичный опыт был поставлен для сравнения с соком *Lathraea*, который потерял при хранении свойство вызывать синюю окраску гваяковой настойки (реакция на оксидазу). Результат был вполне отрицательным: подкисленный осадок барита не вызывал ни малейшего окрашивания бумажки с иодистым калием. Таким образом, образование перекиси было обусловлено присутствием оксидазы. Если этот вывод правилен, то и свежие, содержащие оксидазу растения, должны непосредственно выделять иод из иодистого калия. Действительно, когда мы прикоснулись к бумажке с крахмалом и иодистым калием свежим срезом *Lathraea*, мы немедленно получили на бумажке темносиний отпечаток среза. Объект исследования не содержал азотистой кислоты, и выделение иода можно объяснить только присутствием перекиси. После внимательного просмотра соответствующей литературы мы нашли краткие данные Вурстера<sup>6</sup>, оставшиеся совершенно незамеченными, согласно которым, растения, которые действуют как сильные окислители на бумажку, пропитанную тетраметилпарафенилендиаминном, реагируют и с иодокрахмальной бумажкой. Так как для окислительных процессов, протекающих в растительных соках, иодокрахмальная

\* Ber. Dtsch. chem. Ges., 35, 2466 (1902).

реакция значительно характернее и специфичнее, чем гваяковая реакция, мы считали желательным выяснить более точно условия получения первой из этих реакций.

Поставленные опыты дали много интересных результатов. В первую очередь обращает на себя внимание полный параллелизм между гваяковой и иодокрахмальной реакциями. Растения, окрашивающие немедленно гваяковую настойку, дают без исключения также и положительную иодокрахмальную реакцию. Чем сильнее одна из этих реакций, тем интенсивнее и другая. Только в случае чрезвычайно медленно действующих оксидаз, окрашивающих гваяковую настойку лишь очень постепенно, нельзя с полной достоверностью установить выделение иода. Как показало изучение многочисленных отпечатков срезов растений на иодокрахмальной и на гваяковой бумажке, в обоих случаях окислительное начало одно и то же и всегда локализовано в периферических слоях клетки.

Выделение иода происходит не непосредственно из иодистого калия, а из иодоводородной кислоты. Если кислотность растительного сока достаточна для разложения иодистого калия, как это имеет место в молодых картофельных клубнях или в свежей *Lathraea*, то иодокрахмальная бумажка окрашивается непосредственно, в противном случае необходимо подкислить бумажку разбавленной уксусной кислотой после соприкосновения со срезом. Нагревание объектов до 80° уничтожает как иодокрахмальную, так и гваяковую реакцию. Обе реакции часто ослабляются постепенно до полного исчезновения при увядании растений; иодокрахмальная реакция при этом исчезает первой и в большинстве случаев чрезвычайно быстро. То же самое имеет место и для отжатого сока. По истечении нескольких минут сок наиболее активных растений уже теряет способность выделять иод из иодистого калия. На гваяковую настойку отжатый сок также действует значительно слабее, чем само растение.

Тем более поразительна исключительная устойчивость так называемой пероксидазы. Сок *Lathraea*, сохранявшийся в течение 10 дней в открытом стакане без прибавления антисептиков и сам по себе уже не вызывающий синего окрашивания гваяковой настойки, давал при прибавлении следов перекиси водорода интенсивное синее окрашивание. После кипячения сока реакция исчезала. Таким образом, пероксидаза, очевидно, значительно устойчивее, чем оксидаза. Насколько нам известно, в настоящее время оксидаза всегда сопровождается пероксидазой. Живая клетка содержит, следовательно, одновременно и соединения, образующие перекиси, и соединения, активирующие их.

Из числа исследованных нами до сих пор растений следующие семейства дали более или менее резко выраженную положительную иодокрахмальную реакцию: Liliaceae, Colchicaceae, Commelinales, Araceae, Scitamineae, Gramineae, Cyperaceae, Piperaceae, Papaveraceae, Tillaceae, Berberidaceae, Umbelliferae, Araliaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Labiatae, Verbenaceae, Hydrophyllaceae, Convolvulaceae, Scrophulariaceae, Plantaginaceae, Myoporaceae, Dipsaceae, Compositae. Для демонстрационных опытов особенно пригодны легкодоступные *Sylphium* и *Philodendron*.

Описанные выше опыты с полной достоверностью доказывают, что в растительных соках существуют или образуются соединения перекисного типа, которые ведут себя по отношению к иодистому калию, как ацилированные перекиси водорода. Но доказывает ли это также образование перекисей в живой клетке? Пфеффер<sup>7</sup> высказал предположение, что наблюдающиеся в растительных соках окислительные процессы, основанные на активации кислорода, в действительности происходят после смерти организма и что в живой клетке никогда не имеется активного кислорода. Тот факт, что образование перекиси имеет место и во время жизни клетки, был доказан нами следующими опытами.

В качестве объекта мы выбрали молодые картофельные клубни, содержащие большое количество оксидазы, в качестве реактива — чистые растворы иодистого калия. Тонкие срезы, взятые из периферических слоев клеток свежих картофельных клубней, были промыты в физиологическом солевом растворе по Детмеру или в воде для удаления сока из разрушенных клеток, затем перенесены на предметное стекло и обработаны раствором иодистого калия под микроскопом. По истечении некоторого времени крахмальные зерна, находящиеся внутри клеток, приобрели характерную для крахмала в присутствии иода окраску. Клетки сохраняли при этом нормальный вид; как содержащие крахмал, так и не содержащие его клетки обнаруживали после прибавления гипертонического солевого раствора совершенно нормальный плазмолиз. Так как плазмолиз является одним из самых достоверных признаков жизни, то этим самым доказывается образование перекисей и в живой клетке.

В зависимости от состояния объекта (возраст, содержание оксидазы и воды, свежесть) для получения синего окрашивания крахмальных зерен нужны более или

менее концентрированные растворы иодистого калия, и окрашивание наступает более или менее быстро. Если применять слабощелочные растворы иодистого калия, то наблюдается одновременно синее окрашивание и плазмолиз. С объектами, которые очень медленно окрашивают гваяковую настойку, иодокрахмальная реакция часто дает отрицательный результат. Однако можно получить положительную реакцию почти со всеми объектами, содержащими оксидазу, если усилить действие последней прибавлением сернистого марганца. Бертран<sup>8</sup> нашел, что сернистый марганец очень значительно ускоряет специфическое действие оксидаз. Если обработать промытые срезы картофеля смесью равных частей 2.5%-ного раствора иодистого калия и 2.5%-ного раствора сернистого марганца, то крахмальные зерна приобретают уже по истечении 5—10 минут более или менее интенсивное синее окрашивание. В большинстве случаев при этом происходит одновременно и плазмолиз, и при исследовании препаратов под микроскопом легко найти клетки, в которых очень отчетливо наблюдаются оба явления (окрашивание и плазмолиз). После плазмолиза структура протоплазмы часто фиксируется выделенным избытком иода. Срезы, взятые в середине картофельных клубней, показывают при аналогичной обработке плазмолиз, но ни малейшего синего окрашивания крахмальных зерен. И здесь наблюдается параллелизм между гваяковой и иодокрахмальной реакциями, ибо, как и в других растениях, в картофельных клубнях окислительное или вызывающее окисление начало локализовано в периферических слоях клеток.

Что касается физиологического значения приведенных выше фактов, то мы надеемся изложить его в дальнейших сообщениях.

18 июня 1902 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., **35**, 1275 (1902); настоящая книга, стр. 341.
2. Бах. C. R. Acad. Sci., Paris, **124**, 951 (1897); настоящая книга, стр. 242.
3. Kastle a. Loewenhardt. Amer. Chem. J., **26**, 539 (1901).
4. Engler u. Woler. Zs. anorg. Chem., **29**, 1 (1902).
5. Baeyer u. Williger. Ber. Dtsch. chem. Ges., **33**, 858, 1569 (1900).
6. Wurster. Ber. Dtsch. chem. Ges., **21**, 1526 (1888).
7. Pfeffer. Ber. Dtsch. bot. Ges., **7**, 82 (1889).
8. Bertrand. C. R. Acad. Sci., Paris, **124**, 1335 (1897);

#### Сообщение III

#### ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТЫ КАК ВЕЩЕСТВА, ОБРАЗУЮЩИЕ ПЕРЕКИСИ

[*Oxydationsfermente als Peroxyderzeugende Körper*] \*

(Совместно с Р. Шода)

В предшествующем сообщении<sup>1</sup> мы высказали на основании некоторых опытов предположение, что способность соков различных растений выделять иод из иодистого калия нужно рассматривать как функцию оксидаз, содержащихся в соке. Это предположение оказалось правильным: нам удалось получить из грибов (*Russula foetens*, *Lacterius vellereus*) оксидазу, которая наряду с известными реакциями оксидаз (окрашивание в синий цвет гваяковой настойки, окисление пирогаллола с образованием пурпурогаллина и гидрохинона с образованием хингидрона) обладает также свойством выделять иод из подкисленного иодистого калия. При современном состоянии учения о самопроизвольном окислении вряд ли можно сомневаться в том, что активация кислорода, которая лежит в основе этих оки-

\* Ber. Dtsch. chem. Ges., **35**, 3943 (1902).

слительных процессов, может быть обусловлена только промежуточным образованием перекиси.

В пользу перекисных функций оксидаз можно привести далее следующие решающие данные.

Как известно, окислительная способность перекиси водорода значительно повышается под действием солей некоторых металлов, а также под действием фермента пероксидазы, повсеместно распространенного в растительных и животных организмах. Различные исследователи уже показали, что соли металлов также способны «активировать» оксидазы. Мы нашли, что пероксидаза, извлеченная из тыквы, которую мы опишем в следующем сообщении, повышает окислительную способность оксидазы из *Lactarii* совершенно таким же образом, как и окислительную способность перекиси водорода. Это существенное наблюдение дополняет аналогию между оксидазой и перекисью водорода и позволяет объяснить совсем просто одновременное существование оксидазы и пероксидазы в живых организмах.

Таким образом, предложенная нами в первом сообщении этой серии<sup>2</sup> предварительная гипотеза относительно функций пероксидазы, повидимому, удовлетворительно подтверждается.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

После того как мы доказали, что сок свежих грибов чрезвычайно активен по отношению к иодокрахмальной реакции, мы пытались выделить из него окисляющее начало. После многочисленных попыток мы выбрали в качестве сырья легкодоступный осенью *Lactarius vellereus*.

Около 35 кг свежих грибов *Lactarius* были измельчены в мясорубке, после чего масса была отжата сквозь прочное полотно. Полученные 10 л сока были смешаны с трехкратным объемом 95%-ного спирта; выпавший клейвидный осадок был отфильтрован, промыт спиртом и высушен в вакууме при 40°. Полученный таким образом исходный продукт (125 г) был тонко измельчен и хранился в хорошо закрывающейся склянке. Описанные ниже опыты производились с ним следующим образом: 3 г порошка были растерты с 60 см<sup>3</sup> воды и оставлены в течение получаса при 40°. Отфильтрованные растворы оксидазы исследовались в различных направлениях. Часть этого исходного материала очищалась путем многократного растворения и осаждения спиртом; более чистая оксидаза, полученная таким образом, применялась для контроля результатов, полученных с исходным продуктом. От основательной очистки сырого материала пришлось отказаться, так как содержание в нем оксидазы довольно мало, а при очистке неизбежны значительные потери.

Следует отметить, что оксидаза из грибов, повидимому, чрезвычайно устойчива. Исходный сок грибов *Lactarius* мог подвергаться гниению или брожению при помощи дрожжей, не теряя при этом своей окислительной способности. Для того чтобы разрушить оксидазу в соке, необходимо кипятить его в течение продолжительного времени. Легче добиться понижения ее активности «отравлением» минеральными кислотами, в частности плавиковой кислотой или сулемой. По отношению к иоду оксидаза почти не чувствительна. По отношению к нагреванию и другим факторам инактивации более чистый продукт чувствительнее исходного сока.

Описанный выше раствор-сырец оксидазы обладает известными свойствами оксидазы в резко выраженной форме. Одна капля раствора моментально окрашивает гваяковую настойку в темносиний цвет. Если прибавить 2 см<sup>3</sup> раствора оксидазы к раствору пирогаллола, то смесь немедленно окрашивается в коричневый цвет, а по истечении двух часов начинается выделение кристаллов пурпурогалина. Так же энергично и действие оксидазы на гидрохинон.

Обращает на себя внимание действие оксидазы на иодокрахмальный реактив. Если смешать с 2 см<sup>3</sup> оксидазы реактив, слабо подкисленный

разбавленной уксусной кислотой, то смесь приобретает вполне отчетливое фиолетовое окрашивание уже по истечении нескольких минут; это окрашивание становится понемногу интенсивнее и переходит в сине-черное. С кипяченым или отравленным раствором оксидазы реакция дает отрицательный результат. Чем чище раствор оксидазы, тем скорее наступает выделение иода. Это объясняется тем, что сырой продукт содержит восстанавливающие или ненасыщенные соединения, которые жадно присоединяют к себе иод и задерживают окрашивание крахмала. Если заранее окрасить в синий цвет иодокрахмальный реактив прибавлением небольшого количества иода и прибавить его в таком виде к сырому раствору оксидазы, то синее окрашивание моментально исчезает, и только по истечении некоторого времени реактив понемногу начинает вновь окрашиваться. Наличие восстанавливающих продуктов, повидимому, также является причиной сделанного нами ранее и подтвержденного еще раз наблюдения, что сок значительно активнее непосредственно после извлечения его из растения, чем после хранения, хотя бы в течение очень непродолжительного времени.

Многие растения, свежие срезы которых интенсивно окрашивают бумажку, пропитанную иодистым калием с крахмалом, дают при отжимании сок, не действующий на этот реактив. Если раздавить между пальцами кусочек *Lactarius* и дать выделяющемуся соку стекать на бумагу, пропитанную раствором индигосульфокислого натрия и высушенную, то каждая капля вызывает на синей бумаге образование желтоватого пятна (изатин). Сок, полученный после измельчения грибов в мясорубке, не оказывает, однако, никакого действия на индиговую бумажку. Таким образом, известные реакции оксидазы, повидимому, являются только слабым отражением окислительных процессов, которые протекают в живых растениях, хотя эти окислительные процессы бесспорно происходят благодаря присутствию оксидаз.

Наиболее интересным свойством оксидазы из *Lactarius*, несомненно, является ее способность активироваться пероксидазой, извлеченной из тыквы, таким же точно образом, как перекись водорода. Тот факт, что растворы перекиси водорода, которые сами по себе не вызывают синего окрашивания гваяковой настойки, вызывают это посинение при прибавлении раствора ферментов, известен еще со времен Шенбейна. Эта чрезвычайно чувствительная реакция часто применялась для обнаруживания ничтожных количеств перекиси водорода или фермента. Только в последнее время было установлено, что активация перекиси производится определенным ферментом — пероксидазой. Однако многочисленные исследователи, которые изучали эту реакцию, очевидно упустили из виду, что перекись водорода активируется пероксидазой не только при гваяковой реакции, но также при выделении иода из иодистого калия. При проведении иодокрахмальной реакции с очень разбавленными растворами перекиси водорода в присутствии 3—4 капель раствора пероксидазы или сока тыквы мы наблюдали моментальное посинение реактива. Параллельные опыты с кипячеными или отравленными растворами пероксидазы давали отрицательный результат. Раствор пероксидазы сам по себе (без прибавления перекиси водорода) не реагировал ни с гваяковой настойкой, ни с иодистым калием с крахмалом. При окислении пирогаллола очень разбавленными растворами перекиси водорода пероксидаза также энергично активирует перекись.

С точки зрения физиологии представляло большой интерес выяснить, можно ли, так же как и перекись водорода, активировать оксидазу пероксидазой. Опыт показал, что это действительно так и в случае гваяковой реакции и в случае выделения иода из иодистого калия.



Для того чтобы активация оксидазы при гваяковой реакции была более заметна, необходимо сильно разбавлять раствор оксидазы, так как в противном случае синее окрашивание очень быстро наступает и без прибавления пероксидазы. Исходный сок грибов *Lactarius* нужно для этого разбавить в 100 раз, раствор-сырец оксидазы — в 50 раз. В три пробирки *a*, *b* и *c* наливают равные количества гваяковой настойки и разбавленного раствора оксидазы; в пробирку *a* прибавляют, кроме того, 5 капель раствора пероксидазы, в пробирку *b* — 5 капель раствора пероксидазы, ин-активированного длительным кипячением или отравлением. В то время как в пробирке *a* появляется темносинее окрашивание уже по истечении нескольких минут, пробы *b* и *c* начинают окрашиваться только после много-часового стояния.

Аналогичным образом и с таким же результатом были также проведены опыты с иодокрахмальным реактивом. Однако в этом случае нужно применять более концентрированные растворы оксидазы, так как помимо того, что иод поглощается различными ненасыщенными соединениями, имеющимися в растворе оксидазы, иодокрахмальная реакция вообще менее чувствительна для обнаруживания перекисей, чем гваяковая реакция. Но и здесь можно подобрать условия опыта так, чтобы активирующее действие пероксидазы на оксидазу было совершенно очевидным.

Из приведенных опытов вытекает, что причина наблюдавшегося нами ранее полного параллелизма гваяковой и иодокрахмальной реакций в растительных соках заключается в том, что обе реакции обусловлены одним и тем же окислителем, который вообще ведет себя, как перекись.

5 ноября 1902 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Б а х. Ber. Dtsch. chem. Ges., **35**, 2466 (1902); настоящая книга, стр. 344.
2. Б а х. Ber. Dtsch. chem. Ges., **35**, 1275 (1902); настоящая книга, стр. 341.

#### Сообщение IV

#### О ПЕРОКСИДАЗЕ

[*Ueber Peroxydase*] \*

(Совместно с Р. Ш о д ь)

После того как мы установили факт образования перекиси в живой клетке<sup>1</sup>, мы пытались ближе изучить фермент, активирующий перекиси, — пероксидазу.

Существование в животных и растительных организмах продуктов, аналогичных ферментам, обладающих способностью активировать перекись водорода и перекиси, образующиеся при окислении воздухом органических соединений, таким же образом, как и соли закиси железа, было установлено Шенбейном<sup>2</sup> уже в 1856 г. Активация перекиси кровяными шариками, клейковиной и т. д. наблюдалась им при различных реакциях (посинение гваяковой настойки, выделение иода из иодистого калия, обесцвечивание растворов индиго)\*\*.

\* Ber. Dtsch. chem. Ges., **36**, 600 (1903).

\*\* В III сообщении настоящей серии [см. стр. 346; Ber. Dtsch. chem. Ges., **35**, 3945 (1902)] мы ошибочно указали, что активация перекиси водорода пероксидазой при иодокрахмальной реакции до сих пор не была отмечена. Шенбейн (l. c.) применял и эту реакцию.

Согласно взглядам Шенбейна, активирование перекиси водорода и каталитическое разложение последней нужно приписывать одной и той же причине, ибо, по его наблюдениям, оба эти явления всегда протекают вместе. Однако и тогда уже он нашел, что это правило не без исключений. По этому поводу он говорит<sup>3</sup>: «Как ни странно, дрожжи являются одним из немногих исключений из правила, согласно которому те вещества, которые разлагают перекись водорода, наподобие платины, вызывают также и посинение гваяковой настойки, содержащей перекись».

Взгляды Шенбейна сохранились до последних лет в физиологической химии. Шпицер<sup>4</sup>, пытавшийся определить количественно окислительную способность животных тканей при помощи вызванного ими каталитического разложения перекиси водорода, пришел к выводу, что способностью катализировать перекись водорода нужно приписывать тому же самому ферменту, который вызывает синее окрашивание гваяковой настойки в присутствии перекиси водорода. Однако Лепинуа<sup>5</sup> нашел, что интенсивность окрашивания в синий цвет различными объектами не пропорциональна выделению кислорода из перекиси водорода. Наконец, Лев<sup>6</sup> окончательно доказал, что способность разлагать каталитически перекись водорода принадлежит определенному ферменту — каталазе.

Этим одновременно определяется и индивидуальность фермента, активирующего перекиси. Название *пероксидаза* было предложено Линосье<sup>7</sup>, который приготавил из гноя путем осаждения спиртом пероксидазу, не содержащую оксидазы. Растительные пероксидазы приготавливались до настоящего времени путем нагревания смеси оксидаз и пероксидаз до температуры, при которой разрушаются оксидазы (около 70°). При этой температуре активность пероксидаз несколько понижается, но они не разрушаются. В качестве метода разделения оксидаз и пероксидаз Асо<sup>8</sup> рекомендует фракционированное осаждение спиртом, в котором пероксидазы в достаточной мере растворимы, или отравление оксидаз фтористым или кремнефтористым натрием, к которому пероксидазы мало чувствительны.

Ввиду того что многочисленные растения, не дающие реакции на оксидазы, обнаруживают энергичную реакцию на пероксидазу, мы пытались найти такой исходный растительный материал, который позволял бы непосредственно получать пероксидазу. Особенно подходящими оказались тыква и корни хрена.

Первоначально мы приготавливали пероксидазу из тыквы путем осаждения абсолютным спиртом сока, отмытого из измельченного исходного материала, растворения полученного осадка в воде и повторного осаждения спиртом. Однако ввиду того, что сок тыквы содержит много воды, необходимо было прибавлять громадное количество спирта для осаждения пероксидазы; поэтому выходы были чрезвычайно низки. Более удачен нижеследующий способ выделения пероксидазы из корней хрена.

2 кг хрена были тонко измельчены, оставлены на несколько часов для окончательного ферментативного распада глюкозидов, а затем обрабатывались в течение продолжительного времени (4—5 дней) 80%-ным спиртом, который экстрагирует эфирные масла. Красный спиртовой экстракт сливался, остаток промывался 80%-ным спиртом, отжимался и в заключение подвергался методической экстракции 40%-ным спиртом. Спиртовые вытяжки (около 8 л), дающие очень сильную реакцию на пероксидазу, упаривались в вакууме при 30° и фильтровались; затем к ним прибавлялся спирт до тех пор, пока прибавление его продолжало вызывать помутнение. Белый осадок растворялся в очень небольшом количестве воды, вновь осаждался абсолютным спиртом и высушивался в вакууме.

Таким образом получалась желтовато-белая масса, чрезвычайно рас-

творимая в воде и легко растворимая в 40%-ном спирте. Водный раствор энергично восстанавливает раствор Фелинга. Если диализировать водный раствор против чистой воды через пергамент, то получается диализат, содержащий пероксидазу и восстанавливающий раствор Фелинга значительно энергичнее, чем исходный продукт. Однако этот восстановитель не является носителем свойств пероксидазы, ибо многократное растворение в воде и осаждение абсолютным спиртом позволяет получить препараты пероксидазы, не восстанавливающие более раствор Фелинга.

Самые чистые препараты оксидазы из хрена содержали в среднем 6% золы. Многочисленные анализы показали, что эта зола не содержит железа, но зато содержит 0.8—1.4% алюминия и 0.2—0.6% марганца. Существует ли определенная причинная зависимость между содержанием марганца и пероксидазными свойствами продукта — до сих пор еще не было доказано с достоверностью.

При нагревании растворов пероксидазы с едким натром выделяется сначала аммиак, а затем основание, имеющее запах пиридина. Однако пероксидаза, по видимому, не является белковым соединением, так как ни исходный продукт, ни очищенные препараты не дают известных реакций на белок.

При нагревании растворов пероксидазы до кипения специфические свойства фермента исчезают. Однако, как это уже было показано Вудсом<sup>9</sup> на пероксидазе из табака, по истечении нескольких часов пероксидаза регенерирует. Вторичное нагревание окончательно разрушает пероксидазу. Вудс придерживается той точки зрения, что для оксидазы и пероксидазы существуют зимогены, которые значительно устойчивее по отношению к нагреванию и к другим агентам, чем активные ферменты. Аналогичного взгляда придерживается также Асо<sup>10</sup>. В спиртовом растворе пероксидаза разрушается при температуре кипения спирта.

Обращает на себя внимание поведение пероксидазы по отношению к перекиси водорода: энергично активируя небольшие количества перекиси водорода, она уничтожается более значительными количествами последней. Это наблюдение было уже сделано Шенбейном<sup>11</sup>. То же самое имеет место и для перекисей, образующихся при медленном окислении органических соединений.

Что же касается специфичности действия пероксидазы, то мы нашли, что она очень энергично активирует перекись водорода при многочисленных реакциях окисления, например окисление пирогаллола, галловой кислоты, анилина, диметиланилина, паратолуидина и т. д. Количественные опыты были поставлены следующим образом.

В четыре цилиндра были налиты равные количества соответственных реактивов (подкисленный раствор иодистого калия с крахмалом, раствор пирогаллола и т. д.). В первый цилиндр ничего не прибавлялось, во второй — определенное количество раствора пероксидазы, в третий — определенное количество раствора перекиси водорода и, наконец, в четвертый — равные количества растворов пероксидазы и перекиси водорода. В большинстве случаев в последнем цилиндре, содержащем одновременно реактив, перекись водорода и пероксидазу, наблюдалось более или менее сильное окисление уже через несколько секунд, в то время как в остальных цилиндрах реакция наступала чрезвычайно медленно, иногда совсем не наступала. В некоторых случаях ставились еще контрольные опыты с кипящим раствором пероксидазы.

Пероксидаза активирует не только перекись водорода, но также и все перекиси, образующиеся при окислении органических соединений кислородом воздуха (эфир, спирт, эфирные масла и т. д.). Этот факт был уже установлен Шенбейном.<sup>12</sup> Наши опыты и данные, приведенные Линоссье<sup>13</sup>,

подтверждают данные Шенбейна. Чрезвычайно замечательным кажется нам взгляд, высказанный Шенбейном<sup>14</sup>, что здесь имеет место активирование органических перекисей, а не образовавшейся вторично перекиси водорода.

Однако он не называет рассматриваемые им соединения органическими перекисями. Он называет их «антозонидами», образующимися путем расщепления неактивной молекулы кислорода органическим веществом на «озон»(—) и «антозон»(+). Более энергичный «озон» потребляется для «настоящего окисления» материи, в то время как более инертный «антозон» остается связанным с органическим веществом в состоянии «подвижной активности» и может активироваться различными активаторами кислорода, как органическими, так и неорганическими. Если отвлечься от поляризации кислорода, то эти взгляды представляют собой не что иное, как зародыш теперешней перекисной теории медленного окисления.

Можно рассматривать также как активирование органических перекисей и установленный нами факт<sup>15</sup>, что окислительная способность оксидаз повышается под действием пероксидаз различного происхождения. Не останавливаясь более подробно на многочисленных качественных опытах, мы приведем здесь только одну серию количественных опытов.

В этих опытах определялось поглощение кислорода и выделение углекислоты, которые имеют место при окислении пирогаллола в присутствии одной оксидазы, одной пероксидазы и, наконец, в присутствии обеих. В качестве сосуда мы употребляли снабженную кранами газовую промывалку известного нам объема. После наполнения воздухом, освобожденным от углекислоты, в сосуд вводился реактив через приводную трубку, доходящую до дна; сосуд соединялся с измерительной аппаратурой, которая также содержала воздух, освобожденный от углекислоты. Прибор, состоявший из градуированной газовой бюретки и уравнительной трубки, наполнялся ртутью. По истечении 24 часов объем поглощенного кислорода определялся при учете температуры и барометрического давления в начале и конце опыта, весь газ переводился в сосуд путем поднятия уравнительной трубки, и присутствующая углекислота определялась гравиметрически. Таким путем были получены следующие результаты.

|                                                                                                                                      | Поглощенный кислород | Выделявшаяся углекислота |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|--------------------------|
|                                                                                                                                      | (в см <sup>3</sup> ) |                          |
| 1) 1 г пирогаллола, 15 см <sup>3</sup> раствора оксидазы, 35 см <sup>3</sup> воды . . . . .                                          | 14.1                 | 5.4                      |
| 2) 1 г пирогаллола, 15 см <sup>3</sup> раствора пероксидазы, 35 см <sup>3</sup> воды . . . . .                                       | 0.6                  | 0.2                      |
| 3) 1 г пирогаллола, 15 см <sup>3</sup> раствора оксидазы, 15 см <sup>3</sup> раствора пероксидазы, 20 см <sup>3</sup> воды . . . . . | 19.1                 | 7.7                      |

В следующей статье приводятся данные об активировании оксигеназ (оксидазы, в значительной степени освобожденные от пероксидазы), которые с полной ясностью доказывают активирующее действие различных пероксидаз.

Все качественные и количественные опыты показали, что в отсутствие перекисей пероксидазы не обладают ни малейшей окислительной способностью, что уже наблюдалось Линосье<sup>16</sup> для пероксидазы из гноя. Противоречащие данные Лева<sup>17</sup>, повидимому, основаны на том, что он применял для своих опытов пирогаллол, содержащий перекиси. Аналогичным

образом объясняется тот факт, что свежеприготовленная гваяковая настойка не окрашивается одной пероксидазой, в то время как настойка, простоявшая несколько часов, дает с пероксидазой более или менее интенсивное синее окрашивание. Быстрое образование перекисного соединения в гваяковой настойке, которое можно обнаружить при помощи иодокрахмального реактива, было уже доказано Шенбейном<sup>18</sup>.

Как видно из последующего сообщения, в растениях имеются, помимо, по крайней мере две пероксидазы. К аналогичному выводу приходит и Асо<sup>19</sup>, изучивший более подробно поведение пероксидазы при различных цветных реакциях.

3 февраля 1903 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бах совм. с Шода. Ber. Dtsch. chem. Ges., **35**, 2466, 3943 (1902); настоящая книга, стр. 344, 346.
2. Schönbein. «Über chemische Berührungswirkungen» — Basler Verh. **1**, 467; Abhandl. Münchn. Akad. Wiss., **8**, 28 (1856); «Über die Gleichheit des Einflusses, welchen Blutkörperchen und Eisenoxydsalze auf die chemische Thätigkeit des gebundenen Sauerstoffs ausüben». — Basler Verh. **2**, 9; Abhandl. Münchn. Akad. Wiss., **8**, 406, (1856).
3. Schönbein. «Katalytische Wirksamkeit organischer Materien etc.», Abhandl. Münchn. Akad. Wiss., **2**, 100 (1863).
4. Spitzer. Pflüg. Arch., **67**, 615 (1897).
5. Lépinois. C. R. Soc. Biol., (1899).
6. Löw. «On Catalase». — U. S. Dept. Agric. Rep., No 68 (1901).
7. Linossier. C. R. Soc. Biol., **5**, 373 (1898).
8. Aso. Bull. Coll. Agric. Tokyo, **5**, 2, 229 (1902).
9. Woods. U. S. Dept. Agric. Rep., No 8, 17.
10. Aso. Bull. Coll. Agric. Tokyo, **5**, 2, 231 (1902).
11. Schönbein. Basler Verh., **1**, 474.
12. L. c.
13. Linossier. C. R. Soc. Biol., **5**, 373 (1898).
14. Schönbein. «Über das Verhalten der flüssigen Kohlenwasserstoffe und Fette sum wasserfreien Sauerstoff» — Basler Verh., **4**, 3, 478 (1866).
15. Бах совм. с Шода. Ber. Dtsch. chem. Ges., **35**, 3943 (1902); настоящая книга, стр. 346
16. Löw. C. R. Soc. Biol., **5**, 373 (1898).
17. Linossier. Ber. Dtsch. chem. Ges., **35**, 2487 (1902).
18. Schönbein. Pogg. Ann., **75**, 352 (1848).
19. Aso. Bull. Coll. Agric. Tokyo, **5**, 2, 218 (1902).

#### Сообщение V

#### РАЗЛОЖЕНИЕ ТАК НАЗЫВАЕМЫХ ОКСИДАЗ НА ОКСИГЕНАЗЫ И ПЕРОКСИДАЗЫ

[Zerlegung der sogenannten Oxydasen in Oxygenasen und Peroxydasen] \*

(Совместно с Р. Шода)

Бертран<sup>1</sup> предложил, как известно, для объяснения действия оксидазы теорию, согласно которой, оксидазы представляют собой способные распадаться гидролитически белковые соединения марганца, в которых закисный марганец играет роль переносчика кислорода. Молекула кислорода при этом расщепляется закисью марганца таким образом, что один атом кислорода потребляется на образование двуокиси марганца, в то

\* Ber. Dtsch. chem. Ges., **36**, 606 (1903).

время как другой атом переносится на окисляемое вещество. Образовавшаяся двуокись марганца затем разлагается кислым белковым радикалом, с выделением кислорода и возрождением первоначального соединения марганца.

Как будет показано в настоящем сообщении, приготовленная нами пероксидаза содержит марганец и, несмотря на это, не оказывает никакого окислительного действия в отсутствие перекиси. Это поведение несовместимо с представлением Бертрана о роли марганца при действии оксидазы, в связи с чем возникает следующий вопрос: представляют ли собой так называемые оксидазы вообще индивидуальные ферменты или они являются смесью пероксидаз и соединений, поглощающих кислород и образующих перекиси. §

Уже Бертран<sup>1</sup> показал, что лакказа может быть разложена путем фракционированного осаждения спиртом на две части; одна из них содержит меньше марганца и обладает слабыми окислительными свойствами, а другая — более сильный окислитель, содержащий больше марганца. Однако он не предполагал при этом, что уменьшение окислительной способности лакказы находится в связи с выделением пероксидазы. Через пять лет после этого Асо<sup>2</sup> предложил метод фракционированного осаждения спиртом для разделения пероксидазы и оксидазы. Однако он не пытался выяснить, является ли пероксидаза случайной примесью или нормальной составной частью оксидазы. Это побудило нас исследовать подробнее фракционированное осаждение оксидаз спиртом.

Если подвергнуть раствор оксидазы из *Lactarius* методическому фракционированному осаждению спиртом, соединяя соответственные фракции и вновь осаждая, то получаются в конце концов две фракции, из которых одна совершенно не обладает окислительными свойствами, а другая обладает ими лишь в слабой степени. Последняя фракция, которая почти не растворима в 40%-ном спирте, энергично активируется пероксидазами различного происхождения. Первая фракция растворима в спирте и сама активирует перекись водорода, так же как и инактивированную оксидазу, т. е. ведет себя, как настоящая пероксидаза. Слабоокисляющую фракцию, которая главным образом действует как переносчик кислорода, поглощая молекулярный кислород с образованием перекиси, мы будем обозначать в дальнейшем как оксигеназу, в то время как для фракции, не обладающей окислительной способностью, но активирующей перекиси, мы сохраним обозначение пероксидаза. Следует здесь отметить, что в то время, как из оксидазы, извлеченной из грибов *Lactarius*, сравнительно легко приготовить препараты пероксидазы, не содержащие оксигеназы (не окрашивающие в синий цвет гваяковую настойку), нам до сих пор еще не удалось получить оксигеназу, совершенно не содержащую пероксидазы. В соответствии с этим Бертран<sup>1</sup> указывает, что ему не удалось полностью очиститься лакказу от марганца. Тот факт, что пероксидаза прочно удерживается оксигеназой, не является удивительным, так как ферменты вообще очень легко увлекаются и очень прочно удерживаются различными осадками.

Частичное отделение оксигеназы от пероксидазы можно осуществить также и путем длительной экстракции смеси обеих 30—50%-ным спиртом или диализом против чистой воды. В последнем случае пероксидаза переходит в диализат.

При сравнительных опытах с оксигеназами и пероксидазами различного происхождения был обнаружен замечательный факт, что оксигеназы из грибов (*Russula* и *Lactarius*) значительно энергичнее активируются пероксидазами, выделенными из тех же грибов, чем пероксидазами из хрена или тыквы. С другой стороны, перекись водорода значительно сла-

бее активируется пероксидазой из *Russula* и *Lactarius*, чем пероксидазой из хрена или тыквы. Таким образом, повидимому, существуют по крайней мере две пероксидазы: одна из них энергично активирует оксигеназы и слабо активирует перекись водорода, другая обладает противоположными свойствами. Так как соответственные пероксидазы до сих пор еще не были идентифицированы как индивидуальные химические соединения, само собою разумеется, что полученные результаты нельзя считать строго сравнимыми. Мы пытались, однако, обойти это затруднение тем, что всегда применяли для опытов избыточное количество пероксидазы.

Опыты производились так, как было описано в предшествующем сообщении. Здесь мы даем только результаты количественных определений окисления, для которых применялось по 1 г пирогаллола, две различные пероксидазы и две оксигеназы, из которых одна почти не содержала пероксидазы и сама по себе оказывала чрезвычайно слабое окисляющее действие.

|                                                                                                         | Поглощенный кислород | Выделяющаяся углекислота |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|--------------------------|
|                                                                                                         | (в см <sup>3</sup> ) |                          |
| По 1 г пирогаллола и                                                                                    |                      |                          |
| 15 см <sup>3</sup> пероксидазы из хрена . . . . .                                                       | 0.5                  | 0.1                      |
| 15 см <sup>3</sup> пероксидазы из <i>Lactarius</i> . . . . .                                            | 0.2                  | 0.0                      |
| 0.05 г оксигеназы I из <i>Lactarius</i> . . . . .                                                       | 3.1                  | 1.1                      |
| 0.05 г оксигеназы I из <i>Lactarius</i> + 15 см <sup>3</sup> пероксидазы из хрена . . . . .             | 9.9                  | 5.9                      |
| 0.05 г оксигеназы I из <i>Lactarius</i> + 15 см <sup>3</sup> пероксидазы из <i>Lactarius</i> . . . . .  | 11.0                 | 6.8                      |
| 0.05 г оксигеназы II из <i>Lactarius</i> . . . . .                                                      | 1.2                  | 0.4                      |
| 0.05 г оксигеназы II из <i>Lactarius</i> + 15 см <sup>3</sup> пероксидазы из хрена . . . . .            | 12.4                 | 3.6                      |
| 0.05 г оксигеназы II из <i>Lactarius</i> + 15 см <sup>3</sup> пероксидазы из <i>Lactarius</i> . . . . . | 15.8                 | 5.1                      |

Из приведенных опытов вытекает, что оксигеназа из грибов *Lactarius* энергично активируется пероксидазой. При этом пероксидаза, отделенная от оксигеназы из *Lactarius*, значительно активнее, чем пероксидаза из хрена. Качественные опыты дали аналогичный результат.

Количество полученной нами до сих пор оксигеназы слишком мало для того, чтобы позволить более подробное исследование. Мы предполагаем поэтому переработать будущей осенью более значительное количество грибов *Russula* и *Lactarius* с целью выделения оксигеназы и разложить полученный сырой продукт путем методического фракционирования на его составные части — оксигеназу и пероксидазу.

То, что применявшиеся до сих пор оксигеназы представляют собой смеси оксигеназ и пероксидаз, позволяет совершенно просто объяснить тот факт, что многочисленные растения не обнаруживают реакции на оксигеназу, в то время как совершенно не существует растений, которые не давали бы реакции на пероксидазу. В качестве перекисей оксигеназы более или менее устойчивы, в зависимости от природы радикала, который связан с характерной для перекисей группой —O—O—. Мало устойчивые оксигеназы или такие, которые в присутствии воды легко образуют перекись водорода, потребляются для процесса дыхания немедленно после своего образования и поэтому не могут быть обнаружены. Что же касается пероксидаз, исключительная устойчивость которых была отмечена различными авторами, то

они сохраняются в различных частях растений и всегда могут быть обнаружены при помощи перекиси водорода.

3 февраля 1903 г.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Bertrand. C. R. Acad. Sci., Paris, **124**, 1356 (1897).
2. Aso. Bull. Coll. Agric. Tokyo, **5**, 2, 233 (1902).

### Сообщение VI

#### О КАТАЛАЗЕ <sup>1</sup>

[*Ueber Katalase*] \*

(Совместно с Р. Ш о д а)

Между пероксидазой и каталазой, встречающимися совместно почти во всех частях растительного и животного организма, существует кажущийся антагонизм: пероксидаза активирует перекись водорода, в то время как каталаза очень быстро и полностью разлагает ее с выделением инертного кислорода.

Лев<sup>2</sup>, первый установивший индивидуальность каталазы, считает, что, вследствие исключительной активности этого фермента, перекись водорода не имеет никакого физиологического значения. Эта точка зрения кажется нам, однако, не вполне обоснованной, так как Лев не изучал одновременного действия пероксидазы и каталазы на перекись водорода. Таким образом, еще не доказано, что каталаза препятствует использованию перекиси водорода для окисления при помощи пероксидазы. Далее нельзя оставить без внимания тот факт, что при самопроизвольном окислении легкоокисляемых веществ первоначально образуется не только перекись водорода, но и замещенные перекиси, которые активируются пероксидазой так же, как перекись водорода. Разлагает ли каталаза и эти перекиси с выделением молекулярного кислорода, — еще не выяснено. Нам казалось поэтому необходимым исследовать экспериментально взаимодействие каталазы с замещенными перекисями водорода, с одной стороны, и с перекисью водорода в присутствии пероксидазы — с другой. Сделанные нами опыты проливают, как нам кажется, некоторый свет на довольно запутанный вопрос об окислительных ферментах.

Каталаза, применявшаяся в этих опытах, была приготовлена из чистых культур *Sterigmatocystis nigra* следующим образом: пленка грибков растиралась со стеклом, и полученная масса затем размешивалась слегка подщелоченной водой. Отфильтрованная прозрачная жидкость осаждалась спиртом и очищалась затем обычным образом. Как было указано в сообщении I, этот грибок может существовать в присутствии более чем 1% перекиси водорода. В дальнейших опытах нам удалось получить путем методического посева хорошие культуры *Sterigmatocystis nigra* в жидкостях, содержащих более 2% перекиси водорода. В согласии со сделанным Левом<sup>3</sup> предположением, что количество перекиси водорода, проникаю-

\* Ber. Dtsch. chem. Ges., **36**, 1757 (1903).



щее за единицу времени в клетки грибов, полностью разлагается каталазой, оказалось, что *Sterigmatocystis nigra* содержит очень много каталазы. При равном весе сухого вещества этот грибок может разложить в четыре раза больше перекиси водорода, чем *Penicillium glaucum*.

Приготовленная нами каталаза была физиологически чистая, т. е. не содержала никаких других ферментов и не содержала восстанавливающих соединений, что имеет большое значение при исследовании окислительных процессов.

Для изучения действия каталазы на замещенные перекиси водорода мы выбрали, в качестве представителя последних, хорошо известную, наиболее близкую к перекиси водорода гидроперекись этила, которая была впервые приготовлена два года тому назад Бейером и Виллигером<sup>4</sup>.

100 г диэтилсульфата взбалтывались с 115 г 30%-ной перекиси водорода, 175 г едкого кали и 600 см<sup>3</sup> воды до исчезновения диэтилсульфата; подкисленный продукт реакции перегонялся на воздушной бане. После двукратной перегонки под уменьшенным давлением, в полученном продукте (2.65 г) оказалось 247% гидроперекиси этила по йодометрическому титрованию. С титановой кислотой в сернокислом растворе продукт реакции не давал ни малейшего желтого окрашивания и, следовательно, не содержал ни следа перекиси водорода. Наряду с большим количеством спирта он содержал следы уксусной кислоты.

30 см<sup>3</sup> 2.47%-ной гидроперекиси этила, точно нейтрализованной, смешивались с 0.01 г каталазы в аппарате, позволяющем собирать и измерять выделяющийся кислород. Из равного количества перекиси водорода с соответствующим содержанием активного кислорода это количество каталазы должно было бы выделить в течение нескольких минут около 120 см<sup>3</sup> кислорода. Однако из гидроперекиси этила не выделился ни один пузырек газа даже после продолжительного стояния при многократном взбалтывании. Опыт был повторен с различными препаратами каталазы, но всегда с одним и тем же результатом. Мы даже прибавляли к 30 см<sup>3</sup> раствора гидроперекиси этила 2 г воздушносухого порошка *Sterigmatocystis nigra*, т. е. количество, которое из избытка H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> могло бы выделять кислород литрами. Но и в этом случае не было ни малейшего выделения кислорода.

Из этих опытов вытекает, что каталаза не в состоянии разлагать гидроперекись этила с выделением кислорода. То, что мы получили для гидроперекиси этила, стоящей ближе всего к перекиси водорода по своим свойствам, можно непосредственно перенести и на другие замещенные перекиси, радикалы которых с точки зрения их химических функций менее схожи с водородным атомом, чем группа C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>. Действительно, оксигеназа, которую надо рассматривать как однозамещенную перекись водорода<sup>5</sup>, ни в малейшей степени не разлагается каталазой, как мы могли убедиться в количественных опытах.

Так как оксигеназа поглощает кислород сравнительно медленно и только в тех случаях, когда может передать его окисляемому веществу, то мы не имели в этом случае благоприятных условий для непосредственного наблюдения возможного выделения кислорода под действием каталазы. Поэтому мы поставили сравнительные опыты со смесями оксигеназы и пероксидазы в присутствии и в отсутствии каталазы и определяли в каждом случае поглощенный кислород. В качестве окисляемого вещества мы брали пирогаллол. Опыты проводились одновременно в двух аппаратах, как описано в IV сообщении этой серии<sup>6</sup>. В сосуде смешивались 1 г пирогаллола и 30 см<sup>3</sup> раствора, содержащего 0.01 г оксигеназы из *Lactarius* и 0.01 г пероксидазы из хрена.

В сосуд А прибавлялось еще 0.01 г каталазы, в то время как в сосуд В ничего не прибавлялось. В течение 48 часов поглотилось следующее количество кислорода (в см<sup>3</sup>): (см. стр. 358)

|                      | А<br>(с каталазой) | В<br>(без каталазы) |
|----------------------|--------------------|---------------------|
| Через 5 час. . . . . | 6.2                | 6.2                 |
| » 10 » . . . . .     | 9.4                | 9.3                 |
| » 24 часа . . . . .  | 14.8               | 14.8                |
| » 48 час. . . . .    | 18.6               | 18.7                |

Таким образом, присутствие каталазы не оказывает задерживающего влияния на окислительную способность оксигеназы.

Иначе могло бы обстоять дело со смесями пероксидазы и перекиси водорода, так как последняя чрезвычайно быстро разлагается каталазой с выделением неактивного кислорода. Однако мы нашли, что и в этом случае каталаза не оказывает никакого действия на окисление системой «пероксидаза — перекись водорода».

Опыты производились, как было описано в IV сообщении, колориметрическим путем с гваяковой настойкой, пирогаллолом и анилином. При этом оказалось, что между пробами, содержащими каталазу и не содержащими ее, не было никакой разницы в окрашивании. Следует отметить, что для этих опытов нужно применять возможно более чистую каталазу, так как присутствие восстановителей нарушает цветные реакции.

Тот факт, что окислительный процесс, производящийся смесями пероксидазы и оксигеназы или перекиси водорода, не нарушается каталазой, повидимому, можно лучше всего объяснить предварительным предположением, сделанным в сообщении I, согласно которому каталаза уничтожается при совместном действии пероксидазы и перекиси водорода. Точные опыты показали, однако, что это совершенно не так.

К 20 см<sup>3</sup> 0.05%-ного раствора каталазы прибавлялось 0.01 г оксигеназы и 0.01 г пероксидазы. После стояния в течение ночи к смеси прибавлялось 5 см<sup>3</sup> 3%-ного раствора перекиси водорода; выделяющийся кислород собирался и измерялся. В течение 3 минут выделилось 36.8 см<sup>3</sup> кислорода. Контрольный опыт с 20 см<sup>3</sup> того же раствора каталазы и 5 см<sup>3</sup> раствора Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> дал 37.2 см<sup>3</sup> кислорода.

К 20 см<sup>3</sup> раствора каталазы было прибавлено 0.01 г пероксидазы и 5 см<sup>3</sup> 3%-ного раствора перекиси водорода:

|                                              |                                |
|----------------------------------------------|--------------------------------|
| Выделено в течение 3 минут . . . . .         | 37.1 см <sup>3</sup> кислорода |
| Контрольный опыт (без пероксидазы) . . . . . | 37.4 „ „                       |

Из всех приведенных выше данных с полной ясностью вытекает, что пероксидаза и каталаза могут существовать и функционировать одновременно, не нарушая взаимно проявления своих специфических функций. На замещенные перекиси водорода, которые активируются пероксидазой, каталаза не оказывает совершенно никакого действия. Что же касается перекиси водорода, то, при одновременном действии пероксидазы и каталазы, разрушается с выделением кислорода только та часть перекиси, которая не может быть использована пероксидазой для окислительных процессов. С другой стороны, каталаза так же мало разрушается смесью пероксидазы и перекиси водорода, как и одной перекисью. Таким образом, упомянутое выше предварительное предположение, которое привело нас к пониманию истинного положения, оказывается неправильным.

В заключение мы приведем еще некоторые данные о предполагаемом тождестве каталазы с восстановительными ферментами или редуказами. Поцци-Эско<sup>7</sup>, который исследовал эти ферменты, утверждает, что способность разлагать перекись водорода с выделением кислорода принадлежит «редуказе», а не особому ферменту. Он повторил опыты Лева с каталазой из табака и нашел, что последняя способна не только разлагать перекись

водорода, но и восстанавливать серу в сероводород. Препараты редуказы должны обладать свойством разлагать перекись водорода в еще большей степени, чем каталаза Лева. Как известно, вещества, содержащие водород, немедленно используют активный кислород перекиси водорода для образования воды; поэтому нам а priori непонятно, каким образом редуказа, которая всегда выделяет, согласно Поцци-Эско, водород *in statu nascendi*, может разлагать перекись водорода с выделением кислорода. И действительно, прямые опыты показали, что наша более чистая каталаза совершенно не содержит редуказы.

0.02 г каталазы, 10 см<sup>3</sup> воды, 0.5 г серного цвета и 1 см<sup>3</sup> толуола были оставлены в закрытой колбе, внутри которой был подвешен кусочек фильтровальной бумаги, пропитанной уксуснокислым свинцом. По истечении 48 часов не было еще ни следа почернения бумаги. Профильтрованный раствор, отделенный от серы, довольно сильно разлагал перекись водорода. Таким образом, прибавление толуола не нарушало его активности.

Один из наиболее энергичных препаратов каталазы, который мы имели в руках, был приготовлен путем экстракции 40%-ным спиртом растертой свежей печени морской свинки. Он разлагал 5%-ный раствор перекиси водорода почти со взрывом. Однако и этот препарат не дал ни следа сероводорода при длительном действии на серу в присутствии толуола.

Таким образом, не подлежит сомнению, что существуют препараты каталазы, не содержащие восстановительных ферментов, и что каталаза, следовательно, не тождественна с редуказой.

15 мая 1903 г.

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бах совм. с Шода. Ber. Dtsch. chem. Ges., **35**, 1275, 2466, 3943 (1902); **36**, 600, 606 (1903); настоящая книга, стр. 341—353.
2. Löw. U. S. Dept. Agric. Rep., **68** (1901).
3. Löw. Ber. Dtsch. chem. Ges., **35**, 2487 (1902).
4. Bayer u. Williger Ber. Dtsch. chem. Ges., **34**, 738 (1901).
5. Бах совм. с Шода. Ber. Dtsch. chem. Ges., **35**, 2466 (1902); настоящая книга, стр. 344.
6. Бах совм. с Шода. Ber. Dtsch. chem. Ges., **36**, 600 (1903); настоящая книга, стр. 349.
7. Pozzi-Escot. Bull. Soc. Chim., (3), **27**, 280 (1902).

#### Сообщение VII

##### О ХИМИЧЕСКОЙ ПРИРОДЕ ОКСИДАЗ

[Einiges über die chemische Natur der Oxydasen] \*

(Совместно с Р. Шода)

Исходя из предположения, что так называемые оксидазы представляют собою легкоокисляемые вещества, связывающие молекулярный кислород с образованием перекисей, мы пытались<sup>1</sup> подойти ближе к характеристике промежуточных перекисей, образующихся при действии кислорода на оксидазы. При обработке сухим током воздуха свежего сока *Lathraea squamaria*, содержащего оксидазу, и одновременном прибавлении по каплям 1%-ного раствора барита мы получили осадок, который после промывания и разложения разбавленной серной кислотой, не дает реакции на перекись водорода с окисью титана в сернокислом растворе, однако медленно окрашивает в интенсивный синий цвет иодокрахмальный реактив. Так как сернокислый раствор не дал ни малейшей реакции на азотистую кислоту с реактивом Грисса, то напрашивается вывод, что выделение иода из иодистого калия обуславливалось замещенной перекисью водорода.

\* Ber. Dtsch. chem. Ges., **37**, 36 (1904).

Аналогичный опыт с соком *Lathraea*, ставшего неактивным после продолжительного хранения, дал вполне отрицательный результат в отношении выделения иода. Таким образом, наличие перекиси было, повидимому, связано с присутствием оксидазы в соке.

Этот результат побудил нас исследовать способность различных растений, содержащих оксидазу (окрашивающих в синий цвет гваяковую настойку), выделять иод из иодистого калия. Опыт проводился следующим образом: фильтровальная бумага, пропитанная гваяковой настойкой и иодистым калием с крахмалом, приводилась в соприкосновение со свежими срезами растений; полученные отпечатки исследовались. Во многих случаях мы могли констатировать, что между реакцией с гваяковой настойкой на оксидазу и выделением иода из иодистого калия существует строгий параллелизм в смысле относительной интенсивности обеих реакций и локализации окислителя в клетке.

Посредством иодокрахмальной реакции мы могли также доказать<sup>2</sup>, что образование перекисей, — поскольку на него указывает выделение иода из иодистого калия, — имеет место не только в выделенном растительном соке, но и в живой клетке. В обработанном раствором иодистого калия тонких срезах картофельных клубней, содержащих оксидазу, обнаружилось под микроскопом интенсивное синее окрашивание крахмальных зерен, содержащихся внутри клеток. То, что обработанные таким образом клетки еще живы, было доказано последующими опытами плазмолиза. И в этом случае наблюдался полный параллелизм между реакцией с гваяковой настойкой на оксидазу и выделением иода, ибо срезы, взятые из середины картофельных клубней, не давшие синего окрашивания с гваяковой настойкой, не обнаружили также и под микроскопом после обработки раствором иодистого калия ни малейшего синего окрашивания крахмальных зерен. Впоследствии мы доказали<sup>3</sup>, что разложение иодистого калия вызывается именно оксидазой, а не какой-нибудь другой составной частью клетки или растительного сока: из грибов (*Russula foetens*, *Lactarius vellereus*) была приготовлена оксидаза, которая наряду с обычными реакциями на оксидазы обладала способностью чрезвычайно энергично выделять иод из иодистого калия. Идентичность того начала, которое вызывает посинение гваяковой настойки, с тем, которое выделяет иод из иодистого калия, таким образом была доказана с полной достоверностью.

В последнее время Асо<sup>4</sup> пытался доказать, что вещество, выделяющее иод и производящее окисление, не тождественно с оксидазами. Он ссылается при этом на сделанное нами наблюдение<sup>5</sup>, что при хранении растительных соков и при увядании растений понемногу ослабляется как реакция с гваяковой настойкой, так и иодокрахмальная реакция, но что последняя при этом исчезает быстрее, чем первая. Асо делает отсюда вывод, что соответственные окислители имеют различную химическую природу. При этом он не принимает во внимание давно известный факт, что реакция на перекиси с гваяковой настойкой значительно чувствительнее, чем иодокрахмальная реакция<sup>6</sup>. Поэтому не удивительно, что последняя уже исчезает, в то время, когда первая еще только ослаблена. К этому надо прибавить, что в растительных соках при хранении могут возникнуть вследствие автолиза вещества, не действующие на гваяковую настойку и в то же время легко присоединяющие иод и, таким образом, снижающие чувствительность иодокрахмальных реакций. Аргумент, приведенный Асо, следовательно, не убедителен.

Для того чтобы обосновать экспериментально свои взгляды, Асо поставил опыты с соками из шести различных растений и получил при этом гваяковую реакцию, но не иодокрахмальную. Если принять во внимание упомянутые выше свойства этих реактивов, то в наблюдении Асо нет ничего неожиданного, тем более что исчезновение иодокрахмальной реакции

в соках различных растений (явнобрачных), которые в свежем состоянии дают резко выраженную реакцию, было уже указано нами во II сообщении настоящей серии.

Асо пытался также точнее определить химическую природу вещества, выделяющего иод. Путем экстракции почек *Sagittaria sagittifolia* горячей водой он получил жидкость, которая давала реакцию как с гваяковой настойкой, так и с иодистым калием и крахмалом. Так как последняя реакция не исчезала при нагревании, то Асо предположил, что выделение иода обуславливается присутствием нитрита; действительно, ему удалось обнаружить при помощи реактива Грисса присутствие азотистой кислоты. По его мнению, выделение иода обуславливается присутствием азотистой кислоты и в других растениях.

Мы повторили опыты Асо с почками *Sagittaria* и нашли, что его данные правильны в случае кратковременного нагревания, после которого водная вытяжка вызывает еще заметное разложение иодистого калия. Однако, если кипятить ее в течение 3—4 минут, то она полностью теряет способность разлагать иодистый калий. Полученная нами водная вытяжка была красновато-коричневой и поэтому совершенно не годилась для реакции Грисса. Жидкость можно было обесцветить путем прибавления основного уксуснокислого свинца, но после этого она более не давала ни иодокрахмальной реакции, ни реакции Грисса. Довольно активный в начале экстракт потерял по истечении 24 часов свою окислительную способность по отношению как к гваяковой настойке, так и к иодистому калию с крахмалом, что также говорит против наличия нитрита.

Асо исследовал также сок, полученный из клубней *Sagittaria sagittifolia*, и нашел, что он совершенно не содержит нитритов. Если бы он исследовал клубни по указанному нами способу, он мог бы убедиться, что, несмотря на отсутствие нитритов, они обладают способностью выделять иод из иодистого калия. Если свежий срез клубней *Sagittaria* соприкасается с бумагой, пропитанной иодистым калием с крахмалом, то через короткий промежуток времени в месте соприкосновения появляется фиолетовое кольцо, которое соответствует периферическим слоям клеток в клубне. На бумаге, пропитанной гваяковой настойкой, получается аналогичным образом темносинее кольцо, на пропитанной *m*-фенилендиамином — яркосинее кольцо. Все три отпечатка в точности совпадают, что еще раз доказывает локализацию окислительного начала в тех же периферических слоях клеток.

Таким образом, нет никаких оснований допускать, что разложение иодистого калия обуславливается присутствием какого-то вещества, отличного от оксидаз. Если приписывать выделение иода азотистой кислоте, как это делает Асо, то нельзя избежать того, чтобы свести к присутствию этой кислоты все окислительные процессы, вызванные оксидазами, ибо свойства азотистой кислоты по отношению к рассматриваемым окислительным процессам поразительно сходны в качественном и количественном отношении со свойствами оксидаз.

Давно известно, что обычные реактивы, применяемые для обнаруживания оксидаз (гваяковая настойка, пирогаллол и т. д.), окисляются азотистой кислотой так же, как и оксидазами. Однако представляло интерес выяснить количественными опытами, в какой мере эта кислота может служить переносчиком кислорода при окислении пирогаллола, как это имеет место для оксидазы.

Поставленные нами опыты производились одновременно в трех аппаратах, как описано в IV сообщении<sup>7</sup>. В сосуды наливались равные количества 10%-ного раствора пирогаллола, возрастающие количества раствора нитрита калия с известным содержанием азотистой кислоты и вычисленные количества разбавленной уксусной кислоты; объем смеси доводился водой до 30 см<sup>3</sup>.

Прибор *A* содержал 1 г пирогаллола, 2,5 мг азотистой кислоты, 30 см<sup>3</sup> воды  
 " *B* " " 1 " " 5,0 " " " 30 " "  
 " *C* " " 1 " " 7,5 " " " 30 " "

Опыты производились при одинаковых условиях, поглощенный кислород одновременно отсчитывался в газовых бюретках. Опыты дали следующие результаты:

*Поглощенный кислород (в см<sup>3</sup>)*

|                       | <i>A</i> | <i>B</i> | <i>C</i> | Температура (°C) |
|-----------------------|----------|----------|----------|------------------|
| Через 1 час . . . . . | 0.4      | 1.0      | 1.8      | 16.5             |
| » 2 часа . . . . .    | 1.0      | 2.2      | 3.4      | 16.5             |
| » 3 » . . . . .       | 1.6      | 3.2      | 5.2      | 16.5             |
| » 24 » . . . . .      | 4.4      | 6.2      | 7.6      | 16.7             |
| « 48 час. . . . .     | 8.6      | 9.8      | 11.6     | 16.3             |

(Объемы не привед.)

Для сравнения были проведены аналогичные опыты окисления с различными количествами возможно более чистого раствора оксидазы. Применявшиеся количества оксидазы находились, как и азотистая кислота, в отношении *A*:*B*:*C* = 1:2:3.

*Поглощенный кислород (в см<sup>3</sup>)*

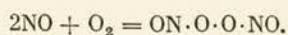
|                       | <i>A</i> | <i>B</i> | <i>C</i> | Температура (°C) |
|-----------------------|----------|----------|----------|------------------|
| Через 1 час . . . . . | 1.6      | 2.6      | 4.4      | 16               |
| » 2 часа . . . . .    | 2.6      | 3.8      | 5.6      | 16               |
| » 3 » . . . . .       | 3.4      | 5.0      | 7.2      | 16               |
| » 24 » . . . . .      | 5.8      | 8.4      | 10.4     | 16.5             |
| » 48 час . . . . .    | 7.1      | 9.8      | 14.4     | 16.5             |

(Объемы не привед.)

Из этих опытов вытекает, что при подходящем разбавлении\* азотистая кислота ведет себя при окислении пирогаллола в точности так же, как и оксидаза. Если принять во внимание только то количество кислорода, которое поглощается в течение 24 и 48 часов, то получается, что оно почти строго пропорционально квадратному корню из применявшегося количества азотистой кислоты; это соотношение характерно для действия ферментов. При окислении пирогаллола оксидазой эта пропорциональность выступает менее отчетливо. Если принять во внимание, что в обоих случаях получается тот же продукт окисления — пурпурогалин — и что наиболее существенные количественные опыты, иллюстрирующие действие оксидазы, были произведены с пирогаллолом, то а priori не исключено, что азотистая кислота или какое-то соединение, аналогичное нитрозилсерной кислоте, и является активным началом оксидазы. Само собой разумеется, что и в этом случае предложенная нами перекисная теория самопроизвольного окисления должна оставаться в силе. Действительно, едва ли можно сомневаться в том, что при действии молекулярного кислорода на окись азота, являющуюся переносчиком кислорода в азотистой кислоте,

\* В менее разбавленных растворах азотистой кислоты после быстрого поглощения кислорода наступает значительное выделение газа, весьма вероятно, вследствие недавно отмеченного Оппенгеймером [Ber. Dtsch. chem. Ges., 36,1744 (1903)] восстановления окиси азота в закись азота пирогаллолом.

образуется сначала не двуокись азота, а какая-то перекись, имеющая примерно следующий состав:



Если в наличии имеется способное окисляться вещество (акцептор), то образующаяся в качестве промежуточного соединения перекись немедленно восстановится в азотистый ангидрид и затем в окись азота. В противном случае происходит интрамолекулярное окисление, и перекись распадается на две молекулы двуокиси азота:



Поразительная аналогия между действием азотистой кислоты и оксидазы побудила нас тщательно исследовать наиболее чистые из наших препаратов оксидазы на присутствие азотистой кислоты.

0.03 г почти совершенно белого очень активного препарата оксидазы из *Lactarius* были растворены в 30 см<sup>3</sup> воды; в одной части прозрачного раствора оксидазы была разрушена нагреванием на кипящей водяной бане. Нагретый и нагретый растворы оксидазы были затем исследованы при помощи различных реактивов при одинаковых условиях. Полученные результаты сведены в нижеследующей таблице:

| Реактив                                                                | Ненагретый раствор оксидазы                                                | Нагретый раствор оксидазы         |
|------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| Гваяковая эмульсия                                                     | Немедленное появление интенсивного синего окрашивания                      | Бесцветный                        |
| Иодистый калий с крахмалом*                                            | Через 2 мин отчетливый фиолетовый цвет, понемногу переходящий в темносиний | Бесцветный<br>То же через 24 часа |
| Дифениламин в концентрированной серной кислоте                         | Бесцветный                                                                 | Бесцветный                        |
| <i>m</i> -фенилендиамин, растворенный в очень слабой уксусной кислоте  | Сначала фиолетовый, затем яркосиний                                        | Окрашен, как сам реактив          |
| <i>m</i> -фенилендиамин в присутствии серной кислоты по Гриссу         | Окрашен, как сам реактив                                                   | Окрашен, как сам реактив          |
| Нафтиламин-сульфаниловая кислота в разбавленном уксуснокислом растворе | Темный сине-фиолетовый                                                     | Слабый оранжево-желтый            |

\* Асо (1. с., 210) указывает, что очищенная оксидаза теряет способность выделять иод из иодистого калия. Возможно, что это правильно для малоустойчивых оксидаз явнотрачных, но не для устойчивых оксидаз из грибов.

Отрицательный результат, полученный с такой чувствительной реакцией на нитриты, как дифениламин и оба реактива Грисса, доказывает вполне определенно, что исследуемый нами препарат оксидазы совершенно не содержал азотистой кислоты. Таким образом, несмотря на поразительную аналогию в их действии, активное начало оксидазы и азотистая кислота не тождественны. Для действия оксидазы далее характерно образование красивого синего красителя из *m*-фенилендиамина в присутствии

разбавленной уксусной кислоты. То же вещество получается также и при действии перекиси водорода и пероксидазы на *m*-фенилендиамин, в то время как другие окислители окисляют его в коричневато-желтый краситель.\* Это наблюдение еще раз подтверждает установленную нами<sup>8</sup> равноценность систем «пероксидаза — оксигеназа» и «пероксидаза — перекись водорода».

Что же касается химической природы окислительных ферментов, то в этом отношении мы находимся еще в полном мраке. Наиболее активные приготовленные нами препараты оксигеназы и оксидазы дают чрезвычайно слабую реакцию на белок, которую нельзя считать бесспорной; они содержат значительные количества клеевидных веществ. Уже в IV сообщении<sup>9</sup> нами было упомянуто, что наиболее чистые препараты пероксидазы не дают реакции на белок. Таким образом, белковая природа окислительных ферментов еще весьма спорна.

Полученные нами до сих пор данные, таким образом, не согласуются с господствующими взглядами на природу окислительных ферментов, в особенности окислительных ферментов животного происхождения. Так, например, Б. Шпицер<sup>10</sup> считает, что окислительные ферменты являются нуклеопротеидами, и делает из этого весьма далеко идущие выводы о значении ядерного вещества клетки для окислительных процессов, происходящих в клетке. Интересные взгляды Шпизера покоятся, как нам кажется, на весьма неполной экспериментальной основе, ибо ни в коем случае нельзя считать доказанным, что окислительные ферменты по природе своей являются нуклеопротеидами. Состав ферментов зависит исключительно от природы материала и способа приготовления. Окислительные ферменты Шпизера были получены из растворов, которые содержали большие количества нуклеопротеидов, и потому в них проявляются свойства нуклеопротеидов; аналогично этому, препараты оксидазы, приготовленной из грибов, сохраняют клеевидные вещества, растворяются и высаживаются вместе с ними. Невольно возникает мысль об аналогии с радиоактивными веществами, которые так же связываются с инертными веществами, как сернокислый барий, хлористый свинец и т. д. Едва ли нужно подчеркнуть, что в случае ферментов можно так же мало приписать химический состав носителя самому активному началу, как и в случае радиоактивных веществ.

3 декабря 1903 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бах совм. с Шода. Ber. Dtsch. chem. Ges., **35**, 2466 (1902); настоящая книга, стр. 344.
2. L. c., 2469.
3. Бах совм. с Шода. Ber. Dtsch. chem. Ges., **35**, 3943 (1902); настоящая книга, стр. 346.
4. Aso. Beih. z. Bot. Cbl., **15**, 208 (1903); Bull. Coll. Agric. Tokyo, **5**, 481 (1903).
5. Бах совм. с Шода. Ber. Dtsch. chem. Ges., **35**, 2468 (1902); настоящая книга, стр. 344.
6. Schoene. Zs. analyt. Chem., 137 (1893).
7. Бах совм. с Шода. Ber. Dtsch. chem. Ges., **36**, 604 (1903); настоящая книга, стр. 349.
8. Бах совм. с Шода. Ber. Dtsch. chem. Ges., **36**, 606 (1903); настоящая книга, стр. 353.
9. Бах совм. с Шода. Ber. Dtsch. chem. Ges., **36**, 600 (1903); настоящая книга, стр. 349.
10. Spitzer. Pflüg. Arch., **67**, 615 (1897).

\* В отсутствии пероксидазы *m*-фенилендиамин в уксуснокислом растворе чрезвычайно медленно окисляется; в присутствии сернокислой закиси железа получается коричневато-желтый краситель.



## Сообщение VIII

## О ДЕЙСТВИИ ПЕРОКСИДАЗЫ

[Ueber die Wirkungsweise der Peroxydase] \*

(Совместно с Р. Ш о д а)

Метод, описанный нами в VI сообщении этой серии<sup>1</sup>, позволяет легко приготовить из корней хрена (*Cochlearia armoriana*) препараты пероксидазы, совершенно не содержащие других ферментов и не проявляющие никаких других специфических функций, кроме способности активировать перекиси. Эти препараты пероксидазы дали отрицательный результат при исследовании на оксигеназу, каталазу, амилазу, инвертазу, эмульсин и протеолитические ферменты.

**Оксигеназа.** 0.1 г пероксидазы, растворенная в 5 см<sup>3</sup> воды, смешивалась с раствором из 2 г свежеприготовленного пирогаллола в 25 см<sup>3</sup> воды. После пяти дней жидкость окрасилась в коричнево-желтый цвет, но осталась совершенно прозрачной и не дала ни следа пурпурогалина. В соединении с эквивалентным количеством перекиси водорода (см. ниже) 0.1 г пероксидазы выделяет в течение нескольких минут 0.180 г пурпурогалина из 2 г пирогаллола.

**Каталаза.** В аппарате, позволяющем собирать и измерять выделяющийся газ, к 0.1 г пероксидазы, растворенной в 10 см<sup>3</sup> воды, было прибавлено 10 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора перекиси водорода. В течение пяти дней в газовой бюретке с трудом накопился 1 см<sup>3</sup> газа. 0.005 г каталазы (из *Sterigmatocystis nigra*) выделяют в течение 2 минут из равного количества перекиси водорода около 30 см<sup>3</sup> кислорода. Насколько нам известно, до сих пор не удалось еще приготовить пероксидазу, совершенно не содержащую каталазы, так что результат приведенного выше опыта можно рассматривать как бесспорное доказательство того, что активация перекиси водорода и ее разложение с выделением кислорода — два совершенно независимые друг от друга процесса.

**Амилаза.** 100 г 2%-ного раствора крахмала смешивались с раствором 0.1 г пероксидазы в 10 см<sup>3</sup> воды; смесь оставлялась при 30°. После 24 часов не наблюдалось ни малейшего разжижения крахмального клейстера и раствор Фелинга не восстанавливался. Так как препараты амилазы всегда содержат значительные количества пероксидазы, мы пытались выяснить, способны ли последние оказывать активирующее действие на амилазу. 3 г амилазы (*diastase absolut*, Мерка) экстрагировались в течение 15 дней 5 раз порциями по 100 см<sup>3</sup> 40%-ного спирта; с остатком, в котором реакция на пероксидазу была очень слабая, делались опыты осахаривания порциями по 0.01 г в присутствии и в отсутствие 0.1 г пероксидазы. В течение 3 дней процесс осахаривания тщательно проверялся путем титрования раствором Фелинга. Результаты этих опытов показали, что пероксидаза не оказывает никакого влияния на переход в жидкое состояние и на осахаривание крахмала посредством амилазы.

Соединенные спиртовые экстракты осаждались абсолютным спиртом; полученный осадок промывался абсолютным спиртом и высушивался в вакууме при комнатной температуре. Он обнаруживал резко выраженные свойства пероксидазы, однако его гидролитическая способность была весьма незначительной. Исходя из предположения, что амилаза, может быть, лучше активируется выделенной из нее самой пероксидазой, чем пероксидазой из хрена, мы поставили сравнительные опыты с обеими фракциями амилазы. Оказалось, что соединенные фракции осахаривают не большее количество крахмала, чем в том случае, когда они действуют на него раздельно.

**Инвертаза.** Аналогичным образом было установлено, что наши препараты пероксидазы не инвертируют тростниковый сахар и не оказывают никакого влияния на его инверсию.

**Эмульсин.** При смешивании пероксидазы с амигдалином в водном растворе не обнаруживается ни запаха синильной кислоты, ни запаха бензальдегида и жидкость не восстанавливает раствор Фелинга.

**Протеолитические ферменты.** Белок, коагулированный в пробирках (по Метту), заливался раствором 0.1 г пероксидазы в 10 см<sup>3</sup> воды и был оставлен на несколько дней при 30° под толуолом; раствор не оказал никакого действия на белок.

Следует еще отметить, что при фракционированном осаждении крепким спиртом или крепким уксусом пероксидаза ведет себя, поскольку дело

\* Ber. Dtsch. chem. Ges., 37, 1342 (1904).

косаается ее специфической функции, как однородное вещество. Отдельные фракции имеют почти одинаковые свойства и не активируются взаимно.

Тот факт, что приготовленные нами препараты пероксидазы оказались физиологически чистыми и, в частности, не содержали оксигеназы и каталазы, побудил нас изучить более подробно поведение пероксидазы при активации перекиси водорода. Это казалось нам тем более интересным, что до сих пор по этому вопросу не имеется никаких экспериментальных данных.

Действие гидролитических ферментов неоднократно исследовалось, однако полученные результаты неполны, как и следовало ожидать. В процессе, обусловленном гидролитическим ферментом, например в инверсии тростникового сахара инвертазой, нужно принимать во внимание три главных фактора: вещество, которое гидролизуется, фермент и воду. Из этих факторов только два первых могут изменяться, в то время как третий, вода, остается всегда постоянным, и его количественное участие в процессе не может быть определено, ибо процесс протекает в водном растворе. Однако едва ли необходимо указывать, что вода играет при этом существенную роль и что все ферментативные гидролитические процессы следует рассматривать только как активацию воды соответственными ферментами. Так, например, тростниковый сахар инвертируется одной водой, хотя и чрезвычайно медленно, инвертаза же только неизмеримо ускоряет этот процесс. Если количественное участие воды в гидролитическом процессе остается неопределимым, то действие ферментов выявляется чрезвычайно односторонне.

Иначе обстоит дело при активации перекиси водорода пероксидазой. В этом случае все три главных фактора — окисляемое вещество, пероксидаза и перекись водорода — могут быть определены количественно. Таким образом, в этом случае можно ожидать более углубленного понимания действия катализаторов, чем в случае гидролитических ферментов.

Оставалось только найти подходящий субстрат для постановки опытов по окислению. Таким субстратом оказался неоднократно применявшийся пирогаллол. В чистом состоянии последний не реагирует заметным образом ни с одной пероксидазой, ни с одной перекисью водорода\*.

Продукт окисления — пурпурогалин — нерастворим в холодной воде, в то время как исходное вещество в ней легко растворимо, так что продукт реакции легко выделить в чистом состоянии. Второе преимущество пирогаллола заключается в том, что вследствие нерастворимости продукта реакции действие катализатора не нарушается установлением равновесия, как это имеет место для других ферментов.

Опыты были произведены следующим образом. Смешивались определенные количества пероксидазы, перекиси водорода и пирогаллола в водном растворе. По истечении 24 часов образовавшийся пурпурогалин собирался на взвешенных фильтрах, промывался 100 см<sup>3</sup> воды и высушивался до постоянного веса при 110°. Для того чтобы можно было производить ряд опытов с одним и тем же препаратом пероксидазы, мы приготовили 7 г пероксидазы, которая случайно обладала свойством активировать количество перекиси водорода, в точности равное количеству пероксидазы по весу (см. ниже). Мы, однако, подчеркиваем здесь, что это соотношение совершенно случайное, так как в других препаратах пероксидазы оно не наблюдалось. Для опытов мы растворяли по 1 г пероксидазы в

\* В 10 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора перекиси водорода был растворен 1 г пирогаллола и жидкость оставлена при комнатной температуре. По истечении 48 часов не образовалось ни следа пурпурогалина; жидкость была коричневато-желтой и совершенно прозрачной.

100 см<sup>3</sup> воды и употребляли точно отмеренное количество этого раствора. 1%-ный раствор перекиси водорода приготавливался из химически чистой 30%-ной перекиси водорода (Мерка) путем соответственного разбавления водой.

Были поставлены три серии опытов:

А) с различными количествами пероксидазы при постоянном количестве перекиси водорода и пирогаллола;

В) с различными количествами перекиси водорода при постоянном количестве пероксидазы и пирогаллола;

С) с различными количествами пирогаллола при постоянном количестве пероксидазы и перекиси водорода.

Все опыты были поставлены при одинаковых условиях при комнатной температуре (15—17°).

Объем жидкости во всех случаях был равен 35 см<sup>3</sup>.

Серия А

| № опыта    | Количество пероксидазы | Количество перекиси водорода | Количество пирогаллола | Образовавшийся пурпурогалин |
|------------|------------------------|------------------------------|------------------------|-----------------------------|
|            |                        |                              |                        |                             |
| I . . .    | 0.01                   | 0.10                         | 1                      | 0.021                       |
| II . . .   | 0.02                   | 0.10                         | 1                      | 0.042                       |
| III . . .  | 0.03                   | 0.10                         | 1                      | 0.066                       |
| IV . . .   | 0.04                   | 0.10                         | 1                      | 0.083                       |
| V . . .    | 0.05                   | 0.10                         | 1                      | 0.102                       |
| VI . . .   | 0.06                   | 0.10                         | 1                      | 0.123                       |
| VII . . .  | 0.07                   | 0.10                         | 1                      | 0.145                       |
| VIII . . . | 0.08                   | 0.10                         | 1                      | 0.166                       |
| IX . . .   | 0.09                   | 0.10                         | 1                      | 0.167                       |
| X . . .    | 0.10                   | 0.10                         | 1                      | 0.162                       |

Жидкость, окрашенная в коричнево-желтый и красно-коричневый цвет, отфильтрованная от осадка, давала в опытах I—VII при прибавлении пероксидазы новые количества пурпурогалина и содержала, таким образом, избыток перекиси водорода. Следует еще отметить, что главная часть реакции (соответствующая образованию около 90% пурпурогалина) заканчивалась в течение нескольких минут.

Из этих опытов с полной ясностью вытекает, что при возрастающих количествах пероксидазы и постоянном (избыточном) количестве перекиси водорода количество образующегося пурпурогалина в точности пропорционально количеству пероксидазы, как видно из следующих данных:

Количество пероксидазы: 1 : 2 : 3 : 4 : 5 : 6 : 7 : 8 : 9 : 10

Количество пурпурогалина: 1 : 2 : 3.14 : 3.95 : 4.85 : 5.85 : 6.90 : 7.90 : 7.95 : 7.70

В филтрате I—VI (серия В, стр. 368) можно было еще обнаружить при помощи перекиси водорода избыток пероксидазы.

При меняющемся количестве перекиси водорода и постоянном (избыточном) количестве пероксидазы превращение пропорционально количеству перекиси:

Количество перекиси: 1 : 2 : 3 : 4 : 5 : 6 : 7 : 8 : 9 : 10

Количество пурпурогалина: 1 : 2.04 : 2.42 : 3.80 : 4.63 : 5.40 : 6.42 : 8.19 : 8.19 : 7.91

## Серия В

| № опыта    | Количество пероксидазы | Количество перекиси водорода | Количество пирогаллола | Образовавшийся пурпурогалин |
|------------|------------------------|------------------------------|------------------------|-----------------------------|
|            | (в г)                  |                              |                        |                             |
| I . . .    | 0.10                   | 0.01                         | 1                      | 0.020                       |
| II . . .   | 0.10                   | 0.02                         | 1                      | 0.042                       |
| III . . .  | 0.10                   | 0.03                         | 1                      | 0.060                       |
| IV . . .   | 0.10                   | 0.04                         | 1                      | 0.083                       |
| V . . .    | 0.10                   | 0.05                         | 1                      | 0.099                       |
| VI . . .   | 0.10                   | 0.06                         | 1                      | 0.121                       |
| VII . . .  | 0.10                   | 0.07                         | 1                      | 0.142                       |
| VIII . . . | 0.10                   | 0.08                         | 1                      | 0.168                       |
| IX . . .   | 0.10                   | 0.09                         | 1                      | 0.168                       |
| X . . .    | 0.10                   | 0.10                         | 1                      | 0.165                       |

Некоторый избыток пероксидазы или перекиси водорода не оказывает никакого влияния на окисление системы «пероксидаза — перекись водорода». Из этого вытекает весьма существенный вывод, что пероксидаза и перекись водорода всегда принимают участие в реакции в постоянном отношении. Этот результат получает химическое толкование, если предположить, что пероксидаза образует с перекисью водорода определенное соединение, которое обладает более энергичными окислительными свойствами, чем перекись водорода. Такого рода соединения уже известны. Так, например, И. Броне<sup>2</sup> нашел, что молибденовая кислота, играющая роль катализатора в реакции между перекисью водорода и иодистоводородной кислотой, сначала образует вместе с перекисью водорода надмолибденовую кислоту, которая затем окисляет иодистоводородную кислоту значительно скорее, чем перекись водорода\*. Приведенные выше опыты показывают, что пероксидаза потребляется в процессе окисления так же, как и перекись водорода. Если бы она регенерировалась из промежуточного продукта, то избыток перекиси водорода оказывал бы определенное действие на величину превращения, что, однако, не имеет места.

В опытах I—VIII (таблицы А и В) на 0.01 г пероксидазы и 0.01 г перекиси водорода получалось в среднем 0.0205 г пурпурогалина. В опытах IX и X эта пропорциональность внезапно исчезала и, несмотря на то, что количество пероксидазы и перекиси водорода возрастало, количество образовавшегося пурпурогалина оставалось постоянным и равным приблизительно 0.165 г. Напрашивалось предположение, что применявшееся количество пирогаллола (1 г) было недостаточно для полного использования окислителя. Мы произвели поэтому дополнительные опыты, в которых количество пирогаллола равнялось 1.5 г, и получили следующие результаты:

| № опыта    | Количество пероксидазы | Количество перекиси водорода | Количество пирогаллола | Образовавшийся пурпурогалин |
|------------|------------------------|------------------------------|------------------------|-----------------------------|
|            | (в г)                  |                              |                        |                             |
| VIII . . . | до 0.08                | 0.08                         | 1.5                    | 0.164                       |
| IX . . .   | » 0.09                 | 0.09                         | 1.5                    | 0.186                       |
| X . . .    | » 0.10                 | 0.10                         | 1.5                    | 0.207                       |

\* Тот взгляд, что пероксидаза и перекись водорода дают вместе перекисное соединение, был уже высказан Кастлом и Левенгардтом [Amer. Chem. J., 26, 593 (1901)].

Как видно, количество образовавшегося пурпурогалина всегда пропорционально количеству пероксидазы — перекиси водорода при условии, если пирогаллол имеется в достаточном количестве.

Мы пытались далее выяснить влияние концентрации пирогаллола на окисление системой «пероксидаза — перекись водорода». С этой целью мы поставили опыты с возрастающими количествами пирогаллола при постоянном количестве пероксидазы и перекиси водорода:

## Серия С

| № опыта   | Количество пероксидазы | Количество перекиси водорода | Количество пирогаллола | Образовавшийся пурпурогалин |
|-----------|------------------------|------------------------------|------------------------|-----------------------------|
|           |                        |                              |                        |                             |
| I . . .   | 0.10                   | 0.10                         | 1.5                    | 0.205                       |
| II . . .  | 0.10                   | 0.10                         | 2.0                    | 0.203                       |
| III . . . | 0.10                   | 0.10                         | 3.0                    | 0.208                       |
| IV . . .  | 0.10                   | 0.10                         | 4.0                    | 0.202                       |

Из этих опытов вытекает, что концентрация пирогаллола не оказывает никакого влияния на величину превращения.

Как было упомянуто выше, пероксидаза потребляется в процессе окисления. Разрушение пероксидазы обуславливается не продуктами окисления пирогаллола; это вытекает из того, что при избытке пероксидазы можно получить дополнительные количества пурпурогалина по окончании окисления, если прибавить перекись водорода. Таким образом, она сохраняет и здесь свою специфическую функцию. Так как пероксидаза разрушается, как мы уже видели ранее<sup>3</sup>, перекисью водорода, мы пытались изучить количественно это взаимодействие.

Смесь из 0.10 г пероксидазы, 0.10 г перекиси водорода и 20 см<sup>3</sup> воды, распределенная в пяти эрленмейеровских колбах, исследовалась через 1—5 дней. При этом оказалось, что при прибавлении по 1.5 г пирогаллола в 15 см<sup>3</sup> воды только первая смесь, простоявшая один день, окрасилась в коричневый цвет; другие остались бесцветными. Таким образом, пероксидаза была почти полностью уничтожена эквивалентным количеством перекиси водорода в течение 24 часов. Для того чтобы определить остаток неразложившейся перекиси в смеси, мы прибавляли к последней по 0.10 г пероксидазы и взвешивали образовавшийся пурпурогалин. При этом получены следующие результаты:

|                                       |         |         |         |         |         |
|---------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Смеси . . . . .                       | I       | II      | III     | IV      | V       |
| Продолжительность опыта . . . . .     | 1 день  | 2 дня   | 3 дня   | 4 дня   | 5 дней  |
| Образовавшийся пурпурогалин . . . . . | 0.174 г | 0.168 г | 0.170 г | 0.168 г | 0.166 г |

Из этих данных можно вычислить, что смеси содержали еще около 0.085 г, т. е. 85% исходного количества перекиси водорода (2.05 вес. части пурпурогалина = 1 вес. части перекиси водорода). Так как при действии перекиси водорода на пероксидазу не выделяется сколько-нибудь заметного количества кислорода, то недостающее количество перекиси водорода, повидимому, было использовано на окисление субстрата пероксидазы. Однако пока еще не удастся выяснить, каким образом происходит инактивация пероксидазы перекисью водорода. При этом не возникает кислого соединения, как это видно из следующих данных:

10 см<sup>3</sup> раствора, содержащие 0.10 г пероксидазы, титровались 0.01 N раствором едкого натра в присутствии фенолфталеина в качестве индикатора. Потреблено: 3.1 см<sup>3</sup> 0.01 N NaOH.

10 см<sup>3</sup> того же раствора были оставлены на 48 часов после прибавления 10 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора перекиси водорода и затем протитрованы. Потреблено: 3.15 см<sup>3</sup> 0.01 N NaOH.

В описанных выше опытах мы принимали во внимание только размер превращения, а не скорость окислительного процесса. Для того чтобы прийти к дальнейшим выводам о действии пероксидазы, мы предполагаем определять скорость катализа перекиси водорода пероксидазой другим путем. Однако уже и сейчас установлено, что при активации перекиси водорода пероксидаза ведет себя, как определенное химическое соединение, и реагирует с перекисью в постоянном отношении. Следует ли из этого, что пероксидазу надо вычеркнуть из классов ферментов? Нам кажется, что к этому не имеется серьезных оснований. Этот вопрос будет обсужден в следующем сообщении.

23 марта 1904 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бах совм. с Шода. Ber. Dtsch. chem. Ges., **36**, 600 (1903); настоящая книга, стр. 349.
2. Brode. Диссертация (1901); Leipzig, 1901; Zs. physik. Chem., **37**, 3 (1901).
3. Бах совм. с Шода. Ber. Dtsch. chem. Ges., **35**, 600 (1903); настоящая книга, стр. 349.

#### Сообщение IX

##### СКОРОСТЬ РЕАКЦИИ В ПРИСУТСТВИИ ПЕРОКСИДАЗЫ

[*Geschwindigkeit der Peroxydasereaktion*] \*

(Совместно с Р. Шода)

Характерным для действия ферментов считается многократно наблюдавшийся факт, что скорость ферментативных реакций не следует закону действующих масс; хотя время, необходимое для реакции, и падает с увеличивающимся количеством ферментов, но оно не обратно пропорционально последнему. Для некоторых ферментов было даже выведено особое правило, так называемое правило Шютца, согласно которому скорость реакции пропорциональна квадратному корню из количества фермента. Однако существуют и такие ферменты (инвертаза, лабфермент), которые не отклоняются от законов действующих масс. Таким образом, законы действия ферментов в настоящее время еще нельзя установить, хотя с различных сторон и делаются попытки в этом направлении<sup>1</sup>.

После того как мы установили в VIII сообщении настоящей серии<sup>2</sup>, что пероксидаза и перекись водорода всегда реагируют в постоянном отношении при окислении пирогаллола, мы пытались измерить скорость реакции пероксидазы при активировании перекиси водорода, для того чтобы глубже уяснить себе механизм ее действия. Из всех окислительных процессов, которые производятся системой «пероксидаза — перекись водорода», для определения скорости реакции пригодно только окисление иодистоводородной кислоты, так как в этом случае легко следить за ходом реакции при помощи титрования гипосульфитом. Однако как ни просто выполнение этого определения, пришлось провести многочисленные предварительные опыты, прежде чем удалось установить те условия, при кото-

\* Ber. Dtsch. chem. Ges., **37**, 2434 (1904).

рых получаются приемлемые результаты. Главное затруднение заключается в чрезвычайно большой скорости реакции с пероксидазой. Конечно, можно было бы уменьшить скорость, снижая концентрацию пероксидазы. Однако при этом количество реагирующего вещества было настолько мало, что измерения больше теряли в точности, чем приобретали благодаря удлинению времени реакции. Следующая методика оказалась наиболее целесообразной.

450 см<sup>3</sup> раствора, содержащего 0.005 экв. иодистого калия и от 0.000125 до 0.0015 экв. пероксидазы\*, были распределены по 45 см<sup>3</sup> при помощи пипетки в 10 широкогорлых колб, емкостью в 125 см<sup>3</sup>, которые были поставлены в большую водяную баню при комнатной температуре.

Вода, употреблявшаяся для приготовления раствора, была выдержана в течение 24 часов в той же водяной бане для выравнивания температуры. Температура комнаты (16°) колебалась в течение опыта не более чем на 1°, температура бани оставалась практически постоянной. С другой стороны, был приготовлен раствор, 5 см<sup>3</sup> которого содержали точно 0.0005 экв.

уксусной кислоты и 0.0005 экв. перекиси водорода  $\frac{(H_2O_2)}{2}$ . Колба с этим раствором была также поставлена в водяную баню. Для этих опытов применялась химически чистая перекись водорода Мерка.

В определенные моменты к содержимому одной из колбочек прибавлялось по 5 см<sup>3</sup> раствора, содержащего перекись водорода и уксусную кислоту, после чего жидкость хорошо перемешивалась стеклянной палочкой. За несколько секунд до истечения предполагаемой продолжительности реакции колбочка доставалась из водяной бани и ставилась под кран бюретки, содержащей 0.01 N раствор гипосульфита, и к смеси прибавлялся раствор крахмала; в соответственный момент жидкость титровалась возможно скорее до первого изменения окрашивания. Продолжительность реакции считалась от момента введения смеси перекиси водорода и уксусной кислоты до начала титрования. На последнее требовалось 20—30 секунд. Раствор гипосульфита точно устанавливался по чистому бихромату калия; для лучшего сохранения к нему прибавлялось небольшое количество углекислого натрия<sup>3</sup>. Во время опыта титр раствора гипосульфита оставался неизменным. Результаты перечислялись на точный 0.01 N раствор.

Таким образом, были проведены 8 серий опытов, в которых концентрация иодистого калия, уксусной кислоты и перекиси водорода оставалась постоянной (по 0.0005 экв. KJ, CH<sub>3</sub>COOH и  $\frac{H_2O_2}{2}$  в 50 см<sup>3</sup>), в то время как концентрация пероксидазы возрастала от 0 до 15 : 100 000 экв. Все опыты были произведены в один и тот же день и при одинаковых условиях. Полученные результаты сведены в таблицах (стр. 372—373).

Если нанести минуты на оси абсцисс, а миллилитры раствора тиосульфата — на оси ординат, то получаются следующие кривые (рис. 4):

$$A : B : C : D : E : F : G = 1 : 2 : 4 : 6 : 8 : 10 : 12.$$

Из приведенных выше таблиц видно прежде всего, что при окислении иодистоводородной кислоты пероксидаза потребляется в процессе активации перекиси водорода, подобно тому, как и при окислении пирогаллола, ибо реакция быстро приходит к состоянию, в котором она протекает точно так же, как и без пероксидазы. Скорость разрушения пероксидазы возрастает с концентрацией пероксидазы, но быстрее, чем последняя. Количе-

\* Для этих опытов мы применяли тот же препарат пероксидазы, который мы использовали ранее (стр. 366) для опытов окисления пирогаллола; этот препарат активировал количество перекиси водорода, в точности равное его весу.

ство превращенного вещества здесь уже не пропорционально количеству пероксидазы, как это имело место при окислении пирогаллола. Если отнести количество прореагировавшего вещества, за вычетом величин, получающихся в отсутствии пероксидазы, к количеству гипосульфита, использованного в опыте *A*, то получаются следующие данные:

Вычислено:  $A : B : C : D : E : F : G = 6.8 : 13.6 : 27.2 : 40.8 : 54.4 : 68.0 : 81.6$   
                   1 2 4 6 8 10 12

Получено: 6.8 : 10.6 : 13.8 : 14.8 : 15.8 : 16.9 : 18.0

*Без пероксидазы*

| Время (в мин.) | Потребленный раствор гипосульфита (в см <sup>3</sup> ) |
|----------------|--------------------------------------------------------|
| 1              | —                                                      |
| 2              | 0.25                                                   |
| 3              | —                                                      |
| 4              | 0.45                                                   |
| 5              | —                                                      |
| 6              | 0.60                                                   |
| 8              | 0.80                                                   |
| 10             | 0.90                                                   |
| 12             | 1.10                                                   |
| 20             | 1.60                                                   |

*B (0.000025 экв. пероксидазы)*

| Время (в мин.) | Потребленный раствор гипосульфита (в см <sup>3</sup> ) |
|----------------|--------------------------------------------------------|
| 1              | 2.4                                                    |
| 2              | 4.7                                                    |
| 3              | 6.6                                                    |
| 4              | 8.4                                                    |
| 5              | 9.5                                                    |
| 6              | 10.2                                                   |
| 8              | 11.7                                                   |
| 10             | 11.8                                                   |
| 12             | 12.0                                                   |
| 20             | 12.3                                                   |

*D (0.000075 экв. пероксидазы)*

| Время (в мин.) | Потребленный раствор гипосульфита (в см <sup>3</sup> ) |
|----------------|--------------------------------------------------------|
| 1              | 7.3                                                    |
| 2              | 13.3                                                   |
| 3              | 15.5                                                   |
| 4              | 16.0                                                   |
| 5              | 16.2                                                   |
| 6              | 16.2                                                   |
| 8              | 16.3                                                   |
| 10             | 16.3                                                   |
| 12             | 16.3                                                   |
| 20             | 16.4                                                   |

*A (0.0000125 экв. пероксидазы)*

| Время (в мин.) | Потребленный раствор гипосульфита (в см <sup>3</sup> ) |
|----------------|--------------------------------------------------------|
| 1              | 1.3                                                    |
| 2              | 2.4                                                    |
| 3              | 3.6                                                    |
| 4              | 4.4                                                    |
| 5              | 5.3                                                    |
| 6              | 6.1                                                    |
| 8              | 7.1                                                    |
| 10             | 7.9                                                    |
| 12             | 8.1                                                    |
| 20             | 8.4                                                    |

*C (0.00005 экв. пероксидазы)*

| Время (в мин.) | Потребленный раствор гипосульфита (в см <sup>3</sup> ) |
|----------------|--------------------------------------------------------|
| 1              | 4.9                                                    |
| 2              | 8.9                                                    |
| 3              | 12.1                                                   |
| 4              | 14.0                                                   |
| 5              | 14.4                                                   |
| 6              | 14.7                                                   |
| 8              | 15.0                                                   |
| 10             | 15.1                                                   |
| 12             | 15.1                                                   |
| 20             | 15.4                                                   |

*E (0.0001 экв. пероксидазы)*

| Время (в мин.) | Потребленный раствор гипосульфита (в см <sup>3</sup> ) |
|----------------|--------------------------------------------------------|
| 1              | 10.1                                                   |
| 2              | 15.7                                                   |
| 3              | 16.9                                                   |
| 4              | 17.0                                                   |
| 5              | 17.1                                                   |
| 6              | 17.1                                                   |
| 8              | 17.2                                                   |
| 10             | 17.2                                                   |
| 12             | 17.2                                                   |
| 20             | 17.4                                                   |



F (0.000125 экв. пероксидазы)

G (0.00015 экв. пероксидазы)

| Время (в мин.) | Потребленный раствор гипосульфита (в см <sup>3</sup> ) | Время (в мин.) | Потребленный раствор гипосульфита (в см <sup>3</sup> ) |
|----------------|--------------------------------------------------------|----------------|--------------------------------------------------------|
| 1              | 12.2                                                   | 1              | 15.0                                                   |
| 2              | 17.1                                                   | 2              | 18.6                                                   |
| 3              | 18.2                                                   | 3              | 18.9                                                   |
| 4              | 18.3                                                   | 4              | 19.1                                                   |
| 5              | 18.2                                                   | 5              | 19.1                                                   |
| 6              | 18.3                                                   | 6              | 19.1                                                   |
| 8              | 18.3                                                   | 8              | 19.2                                                   |
| 10             | 18.4                                                   | 10             | 19.2                                                   |
| 12             | 18.4                                                   | 12             | 19.3                                                   |
| 20             | 16.5                                                   | 20             | 19.4                                                   |

Из таблиц вытекает далее совершенно неожиданный результат, что при катализе реакции между иодистоводородной кислотой и перекисью

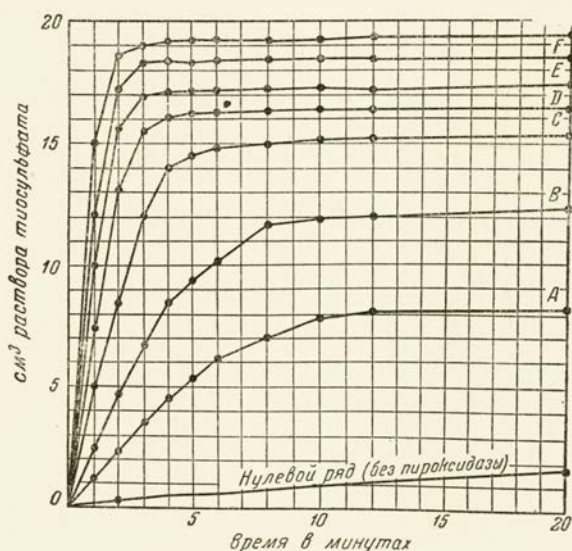


Рис. 1

водорода пероксидаза активирует последнюю значительно энергичнее, чем при окислении пирогаллола. В то время как в последнем случае пероксидаза активировала количество перекиси водорода, в точности равное ее весу, в первом случае активировались следующие количества перекиси:

Весовых частей: A B C D E F G  
5.44 4.36 2.56 1.97 1.58 1.37 1.20

Причина этой разницы, повидимому, довольно сложная и может быть выяснена только посредством дальнейших опытов.

Если мы желаем оценить скорость реакции пероксидазы, то нужно принимать во внимание тот факт, что активность пероксидазы падает тем скорее, чем больше концентрация пероксидазы. Поэтому результаты, полученные при различных концентрациях, сравнимы между собой только в том случае, если выбрать такие стадии реакций, в которых пероксидаза

сохранила еще почти полностью свою активность. Если нанести концентрацию пероксидазы на ось абсцисс, а потребленное количество тиосульфата — на ось ординат, то получается картина разложения пероксидазы, приведенная на рис. 2.

К концу 1-й минуты пероксидаза сохраняет еще во всех случаях свою полную активность. Количество превращенного вещества в точности пропорционально количеству пероксидазы в пределах ошибок опыта:

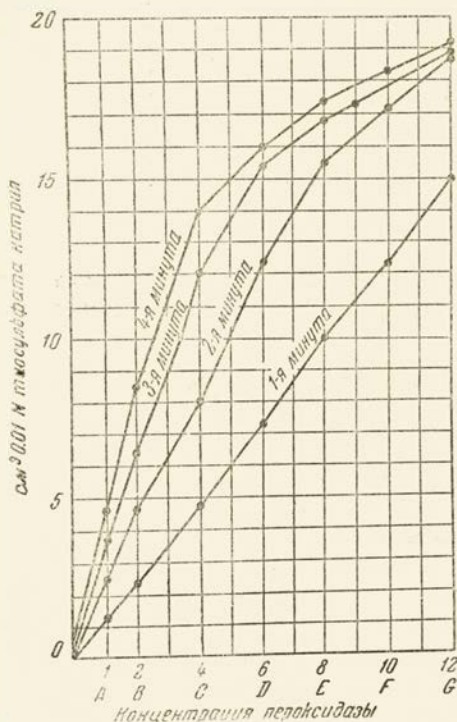


Рис. 2

Для *B*, *C* и *D* время, соответствующее потреблению 8 см<sup>3</sup> тиосульфата, относится, как:

$$B : C : D = 3.75 : 1.85 : 1.20$$

$$2 \quad 4 \quad 6$$

$$Pt = 7.50, \quad 7.40, \quad 7.20.$$

Из этих опытов можно заключить с полной уверенностью, что скорость реакции в присутствии пероксидазы следует закону действующих масс, поскольку реакция не нарушается образующимися продуктами реакции. Каким образом происходит это нарушение — еще не выяснено более детально.

Мы считаем, что на вопрос о том, можно ли рассматривать пероксидазы как фермент, следует ответить утвердительно. Между пероксидазой и другими ферментами существует разница только в одном отношении. В то время как другие ферменты более или менее полно регенерируются в процессе реакции, которую они катализируют, и поэтому в состоянии превращать очень большие количества субстрата по сравнению с их собственным количеством, пероксидаза полностью и быстро потребляется в процессе активирования перекиси водорода. Однако способность к регенерированию

пропорционально количеству пероксидазы в пределах ошибок опыта: функция от концентрации выражается прямой. К концу 2-й минуты пропорциональность наблюдается только при концентрациях *A—E*, к концу 3-й минуты только при *A—C*, к концу 4-й минуты только при *A—B*.

Таким образом, если выбрать стадии реакции, при которых пероксидаза действует еще без изменения, и сравнить, например, для концентраций *D*, *E*, *F*, *G* моменты, соответствующие потреблению 13 см<sup>3</sup> раствора тиосульфата, то получаются следующие значения:

$$D : E : F : G = 1.9 : 1.5 : 1.15 : 0.9.$$

$$6 \quad 8 \quad 10 \quad 12$$

Произведение количества пероксидазы на продолжительность реакции (*Pt*) является постоянной величиной:

$$Pt = 11.4, \quad 12.0, \quad 11.5, \quad 10.8.$$

Для *B*, *C* и *D* время, соответствующее потреблению 8 см<sup>3</sup> тиосульфата, относится, как:

ни в какой мере не является критерием ферментативной природы реакции, ибо действие ферментов всегда более или менее ограничено.

Пероксидазу с другими «органическими катализаторами» (Оппенгеймер) объединяет происхождение, способ приготовления, разрушение при нагревании и специфичность. Если она следует при ненарушенной реакции закону действующих масс, то это имеет место также и для лабфермента (Фульд), инвертазы (О'Суливан и Томпсон, Анри) и, согласно Сентеру<sup>4</sup>, для каталазы. Вайс<sup>5</sup>, подвергший недавно подробному исследованию протеолитические ферменты прорастающих злаков, получил для действия пептазы солода кривые, чрезвычайно похожие на наши.

Имеется, как нам кажется, гораздо больше оснований причислить пероксидазу к ферментам, чем отрицать за ней природу фермента. Если придерживаться последней точки зрения, как это, повидимому, делает Оппенгеймер<sup>6</sup>, то запутанный вопрос об окислительных агентах, оказывающих каталитическое действие в живой клетке, ни в какой степени не делается яснее и не приближается к своему разрешению.

8 июня 1904 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Henri V. Lois générales de l'action des diastases. (1903). Paris.
2. Вах совм. с Шода. Ber. Dtsch. chem. Ges., **37**, 1342 (1904); настоящая книга, стр. 365.
3. Ostwald - Luther. Physico-chemische Messungen. 451 (1902). Leipzig.
4. Senter. Zs. physik. Chem., **44**, 257 (1903).
5. Weiss. C. R. trav. lab. Carlsberg, **5**, 3, 196 (1903).
6. Oppenheimer. Die Fermente, 351, 367 (1903). Leipzig.

---

## РАСПАД УГЛЕВОДОВ В ЖИВОТНОМ ОРГАНИЗМЕ

[*Dégradation des hydrates de carbone dans l'organisme animal*] \*

(Совместно с Ф. Бателли)

Стоклаза и Черни недавно применили к животным тканям методы, которые были использованы школой Бухнера при изучении зимазы. Они нашли, что в органах животных существует, так же как и в растениях, фермент, превращающий глюкозу в спирт и углекислоту. В другой работе Стоклаза, Иелинек и Черни констатировали, что наряду со спиртом образуется молочная кислота, и вывели из этого заключение, что в этих тканях существуют два фермента: один, вызывающий спиртовое брожение, а другой — молочнокислое.

Со своей стороны, мы предприняли ряд исследований с целью изучить те превращения, которые должна претерпеть глюкоза в организме, для того чтобы освободить энергию, которую она содержит в потенциальном состоянии. В настоящем сообщении мы изложим основные моменты нашей теории распада глюкозы.

Гоппе-Зейлер, Готье и др. высказали уже предположение, что сложные соединения, находящиеся в организме, претерпевают до окисления распад, аналогичный тому, который происходит при брожении; однако выводы этих авторов и их взгляды на окислительные реакции значительно отличаются от нашей точки зрения. Мы считаем, что распад углеводов происходит путем двух серий чередующихся химических реакций. Эти две серии реакций определяются каталитическим действием двух различных категорий ферментов: гидролизующих, или расщепляющих, ферментов и окисляющих ферментов.

При расщеплениях в качестве продукта реакции всегда образуется углекислота, при окислениях — вода; углекислота никогда не получается прямым окислением. При окислении кислород всегда соединяется с водородом и никогда не соединяется с углеродом. Ферменты, вызывающие гидролиз, дают, таким образом, возможность получать легкоокисляемые вещества и освобождать организм от углерода без значительной потери энергии. Наибольшая часть энергии получается при прямом окислении водорода кислородом воздуха.

Эта теория, которую мы применяем здесь главным образом к распаду углеводов, по всей вероятности, имеет более общее значение, и мы полагаем, что ее можно считать правильной также и для жиров и белков.

Ограничиваясь рассмотрением распада глюкозы, мы допускаем существование следующего ряда реакций.

Глюкоза сначала расщепляется на молочную кислоту, затем на спирт и углекислоту. Спирт в момент образования очень легко окисляется кис-

\* C. R. Acad. Sci., Paris, 136, 1351 (1903).

лородом крови при содействии окислительных ферментов. Продуктом окисления спирта является уксусная кислота, которая, в свою очередь, расщепляется на метан и углекислоту. Метан окисляется, в момент образования, в муравьиную кислоту, а последняя расщепляется на углекислоту и водород. Наконец, водород *in statu nascendi* соединяется с кислородом и образует воду. Как известно, все эти соединения находятся в организме в большем и меньшем количестве, и все эти реакции могут быть, вообще говоря, выполнены при помощи организованных ферментов.

В подтверждение нашей теории мы, в первую очередь, приведем следующие термохимические соображения.

При сгорании 1 г-моля глюкозы выделяются 673 ккал. Если мы применим термохимические данные к распаду глюкозы в том виде, как мы его только что изложили, то увидим, что образование молочной кислоты и спирта происходит с выделением теплоты (+21.6°), а образование метана и водорода — с поглощением теплоты (-22°). Другими словами, в последовательных расщеплениях с выделением углекислоты не имеет места в целом ни поглощение, ни выделение энергии. Наоборот, в ряде последовательных окислений, при которых водород сгорает, образуя воду, мы имеем выделение 673 ккал, т. е. тот же самый тепловой эффект, как и при полном сгорании глюкозы. Действительно, при окислении спирта в уксусную кислоту выделяются 232.6 ккал, при окислении метана в муравьиную кислоту 303 ккал и, наконец, при окислении водорода, происходящего из муравьиной кислоты, 137.6 ккал, всего 673.2 ккал.

Готье и вслед за ним Стоклаза применяют к животному организму представление Пастера об анаэробном дыхании, в смысле выделения энергии в процессах, аналогичных брожению, без участия свободного кислорода. Термохимические данные, которые мы только что привели, показывают, что при реакциях расщепления глюкозы выделение теплоты очень незначительно. Представление об анаэробном дыхании как о значительном источнике энергии для высших животных недопустимо.

Наша теория опирается еще и на тот факт, что при действии самых энергичных окислителей органические соединения никогда не выделяют весь свой углерод в виде углекислоты. С другой стороны, известно, что окислительные ферменты обычно действуют на окисляемые вещества, отнимая у них два атома водорода, заменяя их чаще всего одним атомом кислорода. Таким образом, это действие вполне аналогично действию при окислении спирта, метана и водорода в нашей схеме распада глюкозы.

2 июня 1903 г.

## ДЕЙСТВИЕ ПЕРОКСИДАЗЫ НА РЕАКЦИЮ МЕЖДУ ПЕРЕКИСЬЮ ВОДОРОДА И ИОДИСТОВОДОРОДНОЙ КИСЛОТОЙ

[*Wirkungsweise der Peroxydase bei der Reaktion zwischen Hydroperoxyd und Jodwasserstoffsäure*] \*

В сообщении, напечатанном мною ранее в сотрудничестве с Р. Шода<sup>1</sup>, было показано, что при окислении пирогаллола перекись водорода и пероксидаза всегда реагируют в постоянных отношениях. Если действовать равными количествами перекиси водорода на пирогаллол в присутствии возрастающих количеств пероксидазы и взвешивать образующийся пурпурогалин, то оказывается, что выше определенной границы дальнейшее прибавление пероксидазы не оказывает никакого влияния на количество реагирующего вещества. Аналогичная граница наблюдается также и для перекиси водорода, если применять постоянные количества пероксидазы и возрастающие количества перекиси водорода. Количество прореагировавшего вещества прямо пропорционально количеству перекиси водорода при избытке пероксидазы и количеству пероксидазы при избытке перекиси водорода. Из сравнения этих предельных количеств можно вывести способность исследуемого препарата пероксидазы к активированию т. е. отношение  $\frac{\text{перекись водорода}}{\text{пероксидаза}}$ . Так, например, мы нашли, что препарат, использованный для этих опытов и приготовленный в большом количестве (около 7 г), активировал количество перекиси водорода, почти в точности равное его собственному весу, т. е. имел активирующую способность, равную единице.

Метод, основанный на окислении пирогаллола, характеризует размер превращения, вызванного пероксидазой, но не скорость самой реакции, ибо при выбранных нами отношениях концентраций, — а только при этих отношениях и можно было получать количество пурпурогалина, поддающееся точному взвешиванию, — окисление пирогаллола происходит с неизмеримо большой скоростью. Поэтому мы пытались<sup>2</sup> определять скорость реакции пероксидазы другим путем, а именно: путем титрования иода, освобождающегося при реакции между перекисью водорода и иодистоводородной кислотой. Полученные при этом результаты сводятся в основном к следующему:

1. Скорость реакции пероксидазы следует закону действующих масс, поскольку на реакцию не влияют образующиеся продукты реакции.
2. В процессе активирования пероксидаза очень быстро и необратимо теряет свою способность активировать.

\* Ber. Dtsch. chem. Ges., 37, 3785 (1904).

3. Увеличение количества выделяющегося иода, вызванное пероксидазой, не прямо пропорционально количеству пероксидазы, как это имеет место при окислении пирогаллола, а растет медленнее, чем последнее.

4. Активирующая способность пероксидазы  $\frac{\text{перекись водорода}}{\text{пероксидаза}}$  значительно больше при окислении иодистоводородной кислоты перекисью водорода, чем при окислении пирогаллола; при этом она падает при возрастании концентрации пероксидазы.

Большой интерес, связанный с вопросом о природе действия пероксидазы, которая является наиболее существенным из окислительных ферментов, заставил меня попытаться выяснить экспериментальным путем причину этой разницы в поведении пероксидазы при указанных окислительных реакциях. В дальнейшем приведены полученные мною результаты.

К сожалению, у меня больше не оставалось препарата пероксидазы, использованного для указанных выше опытов, и мне пришлось приготовить свежий препарат из хрена. Я кратко опишу здесь разработанный мною метод приготовления.

**Приготовление пероксидазы.** 500 г по возможности неповрежденного хрена были тонко измельчены и автолизировались в течение ночи. Полученная масса обрабатывалась в течение 10 дней одним литром 80%-ного спирта; красная жидкость, выделяющая сильный запах горчичного масла, два-три раза сливалась за это время и заменялась свежим спиртом. Эта длительная обработка спиртом вызывает, может быть при участии эфирных составных частей растения, разложение всех ферментов, за исключением пероксидазы. После обработки крепким спиртом масса отжималась, промывалась спиртом, вновь отжималась, экстрагировалась 500 см<sup>3</sup> 40%-ного спирта в течение 8—10 дней и затем отжималась. Прозрачная отфильтрованная жидкость осаждалась четырехкратным объемом смеси из трех частей 98%-ного спирта и одной части эфира. Образующийся осадок (около 1—2 г) отфильтровывался, промывался крепким спиртом и затем эфиром, растворялся в 100 см<sup>3</sup> воды, фильтровался и вновь осаждался смесью спирта с эфиром. После промывания эфиром и высушивания в эксикаторе над серной кислотой получалось около 0.8 г белого крахмалистого вещества, которое растекалось на влажном воздухе и легко растворялось в воде и в 40%-ном спирте.

Определение активирующей способности пероксидазы происходит следующим образом.

Точная навеска в 0.3 г хранящегося в эксикаторе препарата растворяется в 30 см<sup>3</sup> воды, 5 см<sup>3</sup> этого раствора смешиваются с избытком перекиси водорода (30 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора перекиси водорода) и 1.5 г пирогаллола; образующийся пурпуругалин переводится через 12 часов на взвешенный фильтр, промывается 200 см<sup>3</sup> воды, высушивается до постоянного веса при 110° и взвешивается. С другой стороны, на пирогаллол действуют 10 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора перекиси водорода в избытке пероксидазы (25 см<sup>3</sup> указанного выше раствора), — объем жидкости в обоих случаях равен 50 см<sup>3</sup>, — и дальше производят взвешивание, как указано выше.

Если  $a$  обозначает количество пероксидазы, применявшееся при избытке перекиси водорода, и  $m$  — количество образующегося при этом пурпуругалина,  $b$  — количество перекиси водорода, применявшееся при избытке пероксидазы, и  $n$  — образующееся при этом количество пурпуругалина, то  $\frac{bm}{n}$  представляет собой количество перекиси водорода, которое реагирует с количеством пероксидазы, равном  $a$ , и  $\frac{bm}{an}$  — активирующую способность исследуемого препарата пероксидазы.

Применяя препарат пероксидазы, приготовленный описанным способом, активирующая способность которого равна 0,87, я подверг систематическому исследованию действие пероксидазы на реакцию между перекисью водорода и иодистоводородной кислотой.

### ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ИОДИСТОВОДОРОДНОЙ КИСЛОТЫ НА ДЕЙСТВИЕ ПЕРОКСИДАЗЫ

Реакция между перекисью водорода и иодистоводородной кислотой происходит с измеримой скоростью; количество реагирующего в единицу времени вещества, как известно, пропорционально концентрации реагирующих веществ. Так как эта реакция очень ускоряется под действием пероксидазы, то представляло интерес выяснить, зависит ли это ускорение от концентрации иодистоводородной кислоты. На основании сделанных ранее опытов можно было непосредственно исходить из того, что в присутствии избытка пероксидазы ускорение пропорционально концентрации перекиси водорода.

Предварительные опыты показали, что концентрация иодистоводородной кислоты имеет определенное влияние на ускорение выделения иода, вызванное пероксидазой, поэтому я решил поставить систематические опыты для выяснения этого вопроса. Мне пришлось отказаться от определения скорости реакции обычным способом, так как при более высоких концентрациях реакция протекает неизмеримо быстро, в то время как при низких концентрациях превращение слишком мало. Конечное состояние действия пероксидазы достигается в несколько минут даже при самых низких концентрациях, так что измерения не дают результатов, которые можно было бы использовать. Поэтому я ограничился определением конечных состояний, которые соответствовали полному израсходованию применявшейся пероксидазы. За вычетом величин, полученных в контрольных опытах без прибавления пероксидазы, интенсивность выделения иода, увеличивающаяся под действием пероксидазы, при различных концентрациях пероксидазы и иодистоводородной кислоты могла быть довольно точно определена.

Опыты производились следующим образом.

Путем смешивания эквивалентных количеств раствора уксусной кислоты и раствора иодистого калия приготовлялся раствор иодистоводородной кислоты, который содержал в 1 см<sup>3</sup> точно 0,00005 экв. HI. Оба раствора сохранялись отдельно и смешивались непосредственно перед наполнением реакционных колб. С другой стороны, был приготовлен раствор перекиси водорода, который содержал в 5 см<sup>3</sup> точно 0,0005 экв. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, и раствор пероксидазы, содержащий в 1 см<sup>3</sup> 0,0001 экв. Последний раствор разбавлялся при низких концентрациях в 10 раз, при высоких — в 5 раз. Все растворы, колбы с дистиллированной водой и хорошо промытые широкогорлые реакционные колбы емкостью в 125 см<sup>3</sup> ставились в большую водяную баню при комнатной температуре (22°). Объем реакционной смеси был равен 50 см<sup>3</sup>, причем концентрация иодистоводородной кислоты возрастала от 0,000125 до 0,001 экв., концентрация пероксидазы от 0,0000125 до 0,00025 экв., в то время как концентрация перекиси водорода была всегда равна 0,0005 экв.

Серии опытов были расположены по возрастающим концентрациям пероксидазы таким образом, чтобы в каждой серии реакционные колбочки содержали постоянное количество пероксидазы и возрастающие количества иодистоводородной кислоты.

В колбочки, находящиеся в водяной бане, последовательно прибавлялось вычисленное количество воды, раствор иодистоводородной кислоты,



раствор пероксидазы и затем 5 см<sup>3</sup> раствора перекиси водорода. Начало реакции считалось от момента введения перекиси водорода. По истечении ровно 10 минут выделившийся иод титровался в каждой колбе точно установленным раствором гипосульфита. Контрольная серия без прибавления пероксидазы была поставлена при одинаковых условиях для всех концентраций иодистоводородной кислоты; полученные при этом числа были вычтены из полного превращения. В табл. 1 приведены данные, характеризующие интенсивность выделения иода (в миллилитрах 0.01 *N* раствора гипосульфита). В этой таблице, как и во всех последующих, концентрации пероксидазы и иодистоводородной кислоты выражены в стотысячных долях эквивалента.

Из этой таблицы вытекает прежде всего, что интенсивность выделения иода возрастает как с концентрацией пероксидазы, так и с концентрацией иодистоводородной кислоты; однако она возрастает не безгранично, а достигает определенного максимума для каждой концентрации пероксидазы и иодистоводородной кислоты и остается затем постоянной. Так, например, для концентрации пероксидазы *A* максимум достигается при концентрации иодистоводородной кислоты *IV*, для концентрации пероксидазы *B* — при концентрации иодистоводородной кислоты *V* и т. д. Для concentra-

Таблица 1

Интенсивность выделения иода (в см<sup>3</sup> 0.01 *N* гипосульфита)

| Концентрация пероксидазы \ Концентрация $HJ$ | Концентрация $HJ$ |         |            |         |        |          |
|----------------------------------------------|-------------------|---------|------------|---------|--------|----------|
|                                              | I (12.5)          | II (25) | III (37.5) | IV (50) | V (75) | VI (100) |
| <i>A</i> (1.25) . . . . .                    | 3.1               | 4.4     | 5.0        | 5.4     | 5.3    | 5.4      |
| <i>B</i> (2.5) . . . . .                     | 5.1               | 7.1     | 7.9        | 8.5     | 8.6    | 8.5      |
| <i>C</i> (5.0) . . . . .                     | 7.0               | 9.5     | 11.3       | 13.2    | 13.6   | 13.6     |
| <i>D</i> (10.0) . . . . .                    | 9.3               | 12.9    | 15.7       | 17.9    | 21.4   | 25.1     |
| <i>E</i> (15.0) . . . . .                    | 10.9              | 15.9    | 18.5       | 21.6    | 26.0   | 29.3     |
| <i>F</i> (20.0) . . . . .                    | 10.7              | 17.6    | 21.4       | 25.5    | 29.1   | 33.6     |
| <i>G</i> (25.0) . . . . .                    | 10.8              | 17.8    | 24.0       | 28.4    | 32.6   | 37.1     |
| Контрольная серия . . .                      | 0.7               | 1.4     | 2.0        | 2.7     | 4.1    | 5.4      |

ций пероксидазы *D* — *G* максимум не достигается при исследованных концентрациях иодистоводородной кислоты и, несомненно, лежит при более высоких концентрациях.

Если рассматривать интенсивность выделения иода, которое получается при постоянных концентрациях иодистоводородной кислоты и возрастающих концентрациях пероксидазы, то и здесь при *EI* наблюдается максимум, соответствующий концентрации иодистоводородной кислоты *I*, и при *FII* — максимум, соответствующий концентрации иодистоводородной кислоты *II*. Если максимум достигнут при определенном количестве пероксидазы и иодистоводородной кислоты, то дальнейшее прибавление пероксидазы или иодистоводородной кислоты не оказывает никакого влияния на интенсивность выделения иода. Таким образом, пероксидаза, перекись водорода и иодистоводородная кислота участвуют в реакции в постоянных отношениях.

В приведенной выше таблице встречаются далее в различных рядах величины, довольно близкие друг к другу. Если сравнивать концентрации пероксидазы и иодистоводородной кислоты, которые соответствуют равной интенсивности выделения иода, то оказывается, что произведение

этих концентраций является постоянной величиной. Такого рода постоянство произведений концентраций пероксидазы и иодистоводородной кислоты наблюдается, например, при *BII* и *CI*, при *CII* и *DI*, при *CIII* и *EI*, при *DV* и *EIV* и т. д.

Из этих данных можно сделать интересные выводы относительно зависимости между активирующей способностью пероксидазы и концентрацией пероксидазы и иодистоводородной кислоты.

Пусть  $a$  и  $a_1$  — концентрации пероксидазы,  $b$  и  $b_1$  — концентрации иодистоводородной кислоты, соответствующие равной интенсивности выделения иода  $x$ . Активирующая способность пероксидазы равна в первом случае  $\frac{x}{a}$ , во втором случае  $\frac{x}{a_1}$ .

Если  $ab = a_1b_1$ , то

$$\frac{x}{a} : \frac{x}{a_1} = \frac{a}{a_1} \quad \text{и} \quad \frac{x}{a} : \frac{x}{a_1} = \frac{b}{b_1},$$

т. е. активирующая способность, соответствующая равной интенсивности выделения иода, обратно пропорциональна концентрации пероксидазы и прямо пропорциональна концентрации иодистоводородной кислоты. Так, например, при *BII* активирующая способность равна 2.8 и концентрация пероксидазы 2.5, в то время как для *CI* вдвое большей концентрации пероксидазы, равной 5, соответствует активирующая способность 1.4 и т. д.

Если, наконец, мы сравним концентрации иодистоводородной кислоты, соответствующие различной интенсивности выделения иода, то оказывается, что возрастание интенсивности этого процесса почти строго пропорционально квадратному корню из концентрации иодистоводородной кислоты, как видно из следующих данных\*:

|                          | I    | II   | III  | IV   | V    | VI   |
|--------------------------|------|------|------|------|------|------|
|                          | 1    | 2    | 3    | 4    | 6    | 8    |
| Серия <i>D</i> . . . . . | 9.2  | 12.9 | 15.7 | 17.9 | 21.4 | 25.1 |
| Вычислено . . . . .      | 9.2  | 13.0 | 15.9 | 18.6 | 22.4 | 25.9 |
| Серия <i>E</i> . . . . . | 10.9 | 15.9 | 18.5 | 21.6 | 26.1 | 29.3 |
| Вычислено . . . . .      | 10.9 | 15.3 | 18.8 | 21.8 | 26.5 | 30.7 |

Указанные выше закономерности выводятся без какой-либо натяжки из экспериментальных данных, приведенных в табл. 1; при некоторой склонности к обобщениям можно было бы легко найти в этом основание для «закона действия пероксидазы». Такого рода «законы» и были установлены в большом количестве для различных ферментов\*\*.

Однако в большинстве случаев они страдают тем недостатком, что применимы только для данного исследуемого препарата фермента. С другими препаратами часто наблюдаются совершенно другие закономерности. Этот печальный опыт я сделал, когда попробовал повторить описанные выше опыты с другим препаратом пероксидазы из хрена, повидимому, более чистым.

\* Эта закономерность относится только к тем опытам, при которых постоянство увеличения еще не достигнуто.

\*\* Так, например, Медведев [Pflüg. Arch., 65, 249 (1897)] нашел для оксидазы из печени закон, согласно которому «количество салициловой кислоты, образующейся в единице объема, пропорционально квадрату концентрации окислительного фермента и обратно пропорционально квадратному корню из концентрации салицилового альдегида». Он не остановился перед тем, чтобы выразить этот закон в математических формулах. Согласно Словцову (Zs. physiol. Chem., 31, 227), скорость реакции растительной оксидазы пропорциональна квадратному корню из количества фермента. Оппенгеймер [Die Fermente (Leipzig, 1903), 354] высказывается следующим образом о выводах Словцова: «из его данных можно сделать этот вывод при некоторой фантазии».

Этот препарат был приготовлен из экстракта, который долго сохранялся в открытом сосуде. Жидкость, сильно помутневшая в результате обильного развития бактерий, была профильтрована и осаждена смесью спирта с эфиром. Определение активирующей способности этого препарата по методу окисления пирогаллола дало 0.92. Опыты были проведены в тех же точно условиях, как и описанные выше. В табл. 2 приводятся полученные при этом результаты.

Таблица 2

Интенсивность выделения иода (в  $см^3$  0.01 *N* гипосульфита)

| Концентрация пероксидазы \ Концентрация $HJ$ | I<br>(12.5) | II<br>(25) | III<br>(37.5) | IV<br>(50) | V<br>(75) | VI<br>(100) |
|----------------------------------------------|-------------|------------|---------------|------------|-----------|-------------|
| A (1.25) . . . . .                           | 1.2         | 2.4        | 3.3           | 4.2        | 4.2       | 4.1         |
| B (2.5) . . . . .                            | 2.2         | 4.2        | 6.1           | 8.1        | 8.3       | 8.2         |
| C (5.0) . . . . .                            | 3.6         | 6.0        | 9.4           | 12.1       | 15.2      | 15.8        |
| D (10.0) . . . . .                           | 4.4         | 8.3        | 12.2          | 14.6       | 20.7      | 25.9        |
| E (15.0) . . . . .                           | 5.0         | 9.6        | 13.8          | 18.5       | 27.4      | 36.6        |
| F (20.0) . . . . .                           | 5.0         | 10.1       | 15.1          | 20.1       | 30.2      | 41.0        |
| G (25.0) . . . . .                           | 5.1         | 10.2       | 15.6          | 20.4       | 30.0      | 40.8        |
| Контрольная серия . . . . .                  | 0.7         | 1.6        | 2.2           | 2.9        | 4.1       | 5.6         |

Если сравнить эти результаты с полученными ранее (см. табл. 1), то между ними наблюдается существенная разница. И в этом случае влияние концентрации пероксидазы и иодистоводородной кислоты на интенсивность выделения иода ограничено; однако эти границы значительно сужены. В то время как для первого препарата максимум для определенной концентрации пероксидазы достигался только при концентрациях иодистоводородной кислоты I и II (табл. 1), со вторым препаратом этот максимум наблюдался при всех концентрациях иодистоводородной кислоты (серии F и G, табл. 2). Что касается других закономерностей, которые наблюдались ранее, то в этом случае они не повторились. В тех случаях, где выделение иода протекает с одинаковой интенсивностью (например, при CIII и EII, при CIV и DIII и т. д.), произведение концентрации пероксидазы и иодистоводородной кислоты не постоянно. Возрастание интенсивности этого процесса уже не пропорционально квадратному корню из концентрации иодистоводородной кислоты. Вместо этой закономерности наблюдается с полной ясностью другая закономерность: после достижения максимума по отношению к пероксидазе возрастание интенсивности в точности прямо пропорционально концентрации иодистоводородной кислоты (серии F и G, табл. 2). Что эта разница между действием обоих препаратов пероксидазы не обусловлена каким-нибудь изменением условий опыта, вытекает из того, что в обоих случаях контрольные серии дают точно совпадающие результаты. К тому же и характер отклонений между результатами обеих серий также указывает на то, что дело идет здесь об изменении свойств пероксидазы, а не условий опыта. В то время как при низких концентрациях иодистоводородной кислоты (I—IV) первый препарат пероксидазы дает значительно большие числа, чем второй, они почти выравниваются при средних концентрациях (столбец V, табл. 1 и 2), а при более высоких концентрациях иодистоводородной кислоты второй препарат даже превосходит первый (столбец VI, табл. 1 и 2). Для наглядности мы приводим здесь из таблиц две серии, соответствующие одинаковым концентрациям пероксидазы и иодистоводородной кислоты:

|                        | I    | II   | III  | IV   | V    | VI   |
|------------------------|------|------|------|------|------|------|
| Табл. 1, серия E . . . | 10.9 | 15.9 | 18.5 | 21.6 | 26.0 | 29.3 |
| Табл. 2, серия E . . . | 5.0  | 9.6  | 13.8 | 18.5 | 27.4 | 36.6 |

Эти результаты проще всего объясняются, если допустить, что первый препарат пероксидазы содержал, наряду с самой пероксидазой, какой-то другой катализатор, который при низких концентрациях иодистоводородной кислоты ускорял выделение иода, а при более высоких — задерживал его. Однако ввиду того, что активирующая способность применявшейся пероксидазы, определенная по методу окисления пирогаллола, была в обоих случаях одинакова, нужно далее сделать вывод, что исследуемый катализатор не оказывает никакого действия на окисление пирогаллола посредством перекиси водорода. Другими словами, активирующая способность, которую пероксидаза проявляет при окислении пирогаллола, не обязательно равна той, которая проявляется при окислении иодистоводородной кислоты. Правильность этого вывода была окончательно установлена опытами с препаратами пероксидазы различного происхождения.

Мне удалось приготовить физиологически чистые препараты пероксидазы, которые будут подробно описаны в следующем сообщении, из корней *Iris germanica* и из тонких стеблей *Asparagus officinalis*, не содержащих хлорофилла. Для того чтобы сравнить действие этих препаратов пероксидазы с действием пероксидазы из хрена, были приготовлены растворы 0.223 г пероксидазы из хрена, 0.416 г пероксидазы из ириса и 0.32 г пероксидазы из спаржи в 100 см<sup>3</sup> воды; к каждому раствору прибавлялось 30 см<sup>3</sup> пирогаллола и избыток перекиси водорода. Образующийся пурпурогалин взвешивался.

|                                 | Количество образовавшегося пурпурогалина |
|---------------------------------|------------------------------------------|
| Пероксидаза из хрена . . . . .  | 0.071 г                                  |
| Пероксидаза из ириса . . . . .  | 0.093 »                                  |
| Пероксидаза из спаржи . . . . . | 0.078 »                                  |

Остатки растворов были использованы для активирования окисления иодистоводородной кислоты, причем для каждого опыта употреблялось 5 см<sup>3</sup> соответственных растворов. В табл. 3 приведены полученные результаты.

Таблица 3

Интенсивность выделения иода (в см<sup>3</sup> 0.01 N гипосульфита)

| Испытуемый препарат            | Концентрация НJ |            |               |            |           |             |              |
|--------------------------------|-----------------|------------|---------------|------------|-----------|-------------|--------------|
|                                | I<br>(12.5)     | II<br>(25) | III<br>(37.5) | IV<br>(50) | V<br>(75) | VI<br>(100) | VII<br>(150) |
| Пероксидаза из хрена . . . . . | 5.2             | 10.3       | 15.6          | 20.0       | 29.9      | 40.2        | —            |
| » из ириса . . . . .           | 0.1             | 0.8        | 2.2           | 3.7        | 6.9       | 10.6        | —            |
| » из спаржи . . . . .          | 0.0             | 0.0        | 0.4           | 0.7        | 1.1       | 1.4         | 2.2          |
| Контрольная серия . . . . .    | 0.7             | 1.5        | 2.1           | 2.9        | 4.3       | 5.9         | 8.5          |

Пероксидаза из спаржи, которая при окислении пирогаллола давала несколько больше пурпурогалина, чем пероксидаза из хрена (0.078 против 0.071 г), активировала в 30—40 раз меньше перекиси водорода при окислении иодистоводородной кислоты. Пероксидаза из ириса ведет себя аналогичным образом. Эти результаты можно объяснить двумя способами:

1) либо препараты пероксидазы из хрена содержат посторонние вещества, способствующие катализу реакции между перекисью водорода и иоди-

стоводородной кислотой, в то время как они не оказывают никакого влияния на окисление пирогаллола;

2) либо приготовленные указанным способом препараты содержат две различные пероксидазы, оказывающие специфическое действие, из которых одна активирует перекись водорода только при окислении пирогаллола, а другая — только при окислении иодистоводородной кислоты.

На основании накопившихся у меня экспериментальных данных я склонен присоединиться к первому допущению и пытался дать в этом смысле ответ на вопрос, который вызвал постановку настоящего исследования.

### ВЛИЯНИЕ СВОБОДНОГО ИОДА НА ДЕЙСТВИЕ ПЕРОКСИДАЗЫ

Все сделанные до сих пор опыты, относящиеся к поведению пероксидазы при окислении иодистоводородной кислоты перекисью водорода, показали, что действие пероксидазы нарушается образующимися продуктами реакции. Так, например, скорость реакции пропорциональна количеству катализатора только в первой стадии реакции. Соответственно этому и в конечном состоянии количество прореагировавшего вещества не прямо пропорционально количеству пероксидазы. Это задерживающее действие казалось разумным приписать, в первую очередь, свободному иоду, появляющемуся в качестве продукта реакции. Опыты, однако, показали, что это правильно только отчасти.

В этих опытах к раствору пероксидазы прибавлялись различные количества раствора иода, содержание иода в которых было точно известно; через определенные промежутки времени обработанная таким образом пероксидаза применялась для активации перекиси водорода описанным ранее способом. Само собой разумеется, что из полученных чисел вычиталось количество иода, прибавленное заранее, а также результаты, полученные в контрольных опытах. Отношения концентраций соответствовали опыту *DV*, табл. 2. В табл. 4 сведены полученные таким образом результаты:

Таблица 4

*Интенсивность выделения иода (в см<sup>3</sup> 0.01 N гипосульфита)*

|                           |                                   | Продолжительность действия иода (в мин.)                  |          |      |      |      |      |     |
|---------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------|----------|------|------|------|------|-----|
|                           |                                   | I. 100 пероксидазы, 7 иода в 200 см <sup>3</sup> воды     |          |      |      |      |      |     |
| Минуты . . . . .          | 2                                 | 4                                                         | 6        | 10   | 23   | 35   | 47   | 200 |
| Гипосульфит . .           | 22.5                              | 21.2                                                      | 19.9 (?) | 20.8 | 17.8 | 15.9 | 13.8 | 4.8 |
|                           |                                   | II. 100 пероксидазы, 17.5 иода в 200 см <sup>3</sup> воды |          |      |      |      |      |     |
| Минуты . . . . .          | 5                                 | 15                                                        | 30       | 80   | 90   |      |      |     |
| Гипосульфит . .           | 22.9                              | 19.7                                                      | 17.9     | 13.5 | 13.2 |      |      |     |
|                           |                                   | III. 100 пероксидазы, 35 иода в 200 см <sup>3</sup> воды  |          |      |      |      |      |     |
| Минуты . . . . .          | 5                                 | 15                                                        | 30       | 40   | 75   |      |      |     |
| Гипосульфит . .           | 24.3                              | 21.8                                                      | 19.0     | 17.1 | 13.8 |      |      |     |
|                           |                                   | Контрольные опыты:                                        |          |      |      |      |      |     |
| Без иода . . . . .        | 20.7 см <sup>3</sup> гипосульфита |                                                           |          |      |      |      |      |     |
| Без пероксидазы . . . . . | 4.2 » »                           |                                                           |          |      |      |      |      |     |

Из этих опытов видно, что свободный иод оказывает задерживающее влияние на действие пероксидазы только после длительного воздействия. При кратковременном воздействии иод, наоборот, даже определенно ускоряет ее действие; последний эффект возрастает вместе с концентрацией иода, хотя и не прямо пропорционально последней. Таким образом, при условиях опытов, которых я придерживался, нарушение реакции пероксидазы не может быть приписано свободному иоду.

### ВЛИЯНИЕ ИЗБЫТКА ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА НА ДЕЙСТВИЕ ПЕРОКСИДАЗЫ

Далее я пытался выяснить, оказывает ли перекись водорода, применявшаяся во всех опытах в избытке, задерживающее действие на реакцию в присутствии пероксидазы вследствие постепенного разложения катализатора. С этой целью я смешал раствор, содержащий 0.005 экв. перекиси водорода в 50 см<sup>3</sup> воды, с раствором 0.001 экв. пероксидазы в 50 см<sup>3</sup>; через определенные промежутки времени 10 см<sup>3</sup> этой смеси прибавлялись к вычисленному количеству иодистоводородной кислоты, и через 10 минут титровался освободившийся иод. Отношения концентраций те же и в опыте DV.

0.001 пероксидазы, 0.005 перекиси водорода в 100 см<sup>3</sup> воды

|                  |      |      |      |      |      |      |      |
|------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| Минуты . . . . . | 1    | 3    | 6    | 20   | 135  | 650  | 1200 |
| Гипосульфит . .  | 20.4 | 19.9 | 19.7 | 19.4 | 17.6 | 12.8 | 0    |

#### Контрольные опыты:

|                                                                            |                      |
|----------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| Растворы перекиси водорода и пероксидазы<br>сохранялись отдельно . . . . . | 20.6 см <sup>3</sup> |
| Опыт без пероксидазы . . . . .                                             | 4.3 »                |

Как видно, избыток перекиси водорода задерживает реакцию в присутствии пероксидазы. Однако это не объясняет наблюдающиеся нарушения, ибо активирующая способность пероксидазы заметно падает только после длительного действия перекиси водорода.

### ОДНОВРЕМЕННОЕ ВЛИЯНИЕ СВОБОДНОГО ИОДА И ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА НА ДЕЙСТВИЕ ПЕРОКСИДАЗЫ

При окислении иодистоводородной кислоты перекисью водорода пероксидаза находится в жидкости, содержащей одновременно свободный иод и избыток перекиси водорода; поэтому необходимо было еще выяснить одновременное влияние обоих веществ на действие пероксидазы.

Перекись водорода, раствор иода и раствор пероксидазы смешивались в определенных пропорциях; через определенные промежутки времени смесь исследовалась указанным выше способом. Отношения концентраций, как в DV.

I. 50 пероксидазы, 33 иода, 500 перекиси водорода в 100  $cm^3$  воды

|                  |      |     |     |     |    |    |    |     |
|------------------|------|-----|-----|-----|----|----|----|-----|
| Минуты . . . . . | 1    | 2   | 3   | 5   | 10 | 15 | 30 | 350 |
| Гипосульфит . .  | 11.2 | 5.6 | 4.7 | 1.5 | 0  | 0  | 0  | 0   |

II. 100 пероксидазы, 100 иода, 500 перекиси водорода в 100  $cm^3$  воды

|                  |     |     |   |     |    |    |     |     |
|------------------|-----|-----|---|-----|----|----|-----|-----|
| Минуты . . . . . | 1   | 2   | 3 | 5   | 10 | 15 | 30  | 750 |
| Гипосульфит . .  | 8.2 | 1.9 | 0 | 0.2 | 0  | 0  | 0.1 | 0   |

## Контрольные опыты:

|                                                                                     |             |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| Растворы перекиси водорода и пероксидазы<br>сохранялись отдельно без иода . . . . . | 20.2 $cm^3$ |
| Опыт без пероксидазы . . . . .                                                      | 4.2 »       |

Таким образом, если при раздельном действии свободного иода и перекиси водорода пероксидаза лишь медленно разрушается, при одновременном действии обоих веществ она претерпевает быстрое разрушение. Смешанная с эквивалентным количеством свободного иода и 5 экв. перекиси водорода, пероксидаза безвозвратно теряет в течение 3—4 минут способность активировать перекись водорода. Разрушение пероксидазы, повидимому, происходит под действием какого-то кислородного соединения иода.

Этот результат позволяет вполне удовлетворительно объяснить тот факт, что в более поздней стадии катализа, при окислении иодистоводородной кислоты, действие пероксидазы обнаруживает значительные отклонения от закона действующих масс.

## ВЛИЯНИЕ КИСЛОТНОСТИ РАСТВОРА НА ДЕЙСТВИЕ ПЕРОКСИДАЗЫ

При рассмотрении данных, приведенных в табл. 2, обращает на себя внимание тот факт, что после достижения точки, выше которой дальнейшее прибавление пероксидазы не вызывает дальнейшего выделения иода, жидкость содержит еще избыток иодистоводородной кислоты и перекиси водорода. Так, например, после того как в  $F1$  (табл. 2) наибольшее количество иода было выделено при концентрации  $I$  при  $5\text{ cm}^3 0.01 N$  гипосульфита, в реакционной жидкости оставалось еще  $0.000075$  экв. иодистоводородной кислоты и  $0.00045$  экв. перекиси водорода. При удвоении концентрации иодистоводородной кислоты получается удвоенное количество иода ( $FII$ ), при увеличении в три раза получается трехкратное количество иода ( $FIII$ ) и т. д. Таким образом, во всех случаях под действием пероксидазы окисляется только часть иодистоводородной кислоты, а именно  $\frac{2}{5}$  \*. Для полного использования пероксидазы необходим, таким образом, избыток иодистоводородной кислоты. В связи с этим возникает вопрос, участвует ли избыточная иодистоводородная кислота непосредственно в реакции или она действует косвенно, придавая реакционной жидкости необходимую кислотность (концентрация водородных ионов). В последнем случае, при низких концентрациях иодистоводородной кислоты, прибавление посторонней кислоты должно было бы повысить действие пероксидазы, так же как и прибавление иодистоводородной кислоты. К сожалению

\* Понятно, что после разрушения пероксидазы реакция между перекисью водорода и иодистоводородной кислотой продолжается сама по себе, как в отсутствии катализатора.

нию, в этой стадии моих исследований приготовленный мною запас пероксидазы был почти полностью исчерпан, так что опыты не могли быть поставлены достаточно детально. Однако сделанное выше предположение было совершенно однозначно подтверждено полученными результатами:

Отношение концентраций, как при *DI*, табл. 2

10 пероксидазы, 125 НЛ, 50 Н<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, возрастающие количества уксусной кислоты

|                                                                 |      |      |     |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|------|-----|------|
| Уксусная кислота . . . . .                                      | 1.87 | 3.75 | 7.5 | 15.0 |
| Гипосульфит . . . . .                                           | 5.70 | 6.20 | 7.0 | 8.4  |
| Контрольный опыт без уксусной кислоты . . . . .                 | 4.60 | 4.60 | 4.6 | 4.6  |
| Контрольный опыт без пероксидазы . . . . .                      | 0.70 | 0.70 | 0.8 | 0.7  |
| Интенсивность выделения пода под действием уксусной кислоты . . | 0.40 | 0.90 | 1.6 | 3.1  |

Прибавление уксусной кислоты повышает, таким образом, действие пероксидазы; в этом случае повышение пропорционально концентрации прибавленной кислоты. Дальнейшие опыты в этом направлении желательны. Однако и сейчас уже достаточно ясно, что пероксидаза, перекись водорода и иодистоводородная кислота реагируют в определенных отношениях, причем часть иодистоводородной кислоты участвует непосредственно в реакции, в то время как другая часть, которая может быть заменена посторонней кислотой, используется для создания необходимых условий реакции для пероксидазы (водородные ионы?).

### ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ДЕЙСТВИЕ ПЕРОКСИДАЗЫ

В связи с описанными выше опытами было также исследовано влияние температуры на действие пероксидазы.

Опыты были поставлены при концентрациях, соответствующих опытам *AI* и *DI* (табл. 2), и проведены при трех различных температурах; само собою разумеется, что контрольные опыты были проведены при тех же условиях в отсутствие пероксидазы.

I. 1.25 пероксидазы, 25 НЛ, 50  $\frac{\text{H}_2\text{O}_2}{2}$

|                                            |     |     |     |
|--------------------------------------------|-----|-----|-----|
| Температура °С . . . . .                   | 18  | 22  | 38  |
| Гипосульфит . . . . .                      | 3.9 | 3.8 | 3.0 |
| Контрольный опыт без пероксидазы . . . . . | 1.2 | 1.4 | 2.0 |
| Интенсивность выделения пода . . . . .     | 2.7 | 2.4 | 1.0 |

II. 10 пероксидазы, 12.5 НЛ, 50  $\frac{\text{H}_2\text{O}_2}{2}$

|                                            |     |     |     |
|--------------------------------------------|-----|-----|-----|
| Температура °С . . . . .                   | 16  | 24  | 32  |
| Гипосульфит . . . . .                      | 5.4 | 4.8 | 4.2 |
| Контрольный опыт без пероксидазы . . . . . | 0.7 | 0.9 | 1.2 |
| Интенсивность выделения пода . . . . .     | 4.7 | 3.9 | 3.0 |



Как видно, интенсивность выделения иода, возрастающая под воздействием пероксидазы, уменьшается с повышением температуры; по-видимому, при повышении температуры пероксидаза скорее разрушается образующимися продуктами реакции, чем при более низкой температуре.

## ВЫВОДЫ

I. При окислении иодистоводородной кислоты перекисью водорода пероксидаза вызывает увеличение интенсивности этого процесса, которое возрастает вместе с концентрацией пероксидазы и с концентрацией иодистоводородной кислоты до определенного максимума и остается затем постоянным. Для каждой концентрации пероксидазы максимум достигается при определенной концентрации иодистоводородной кислоты, для каждой концентрации иодистоводородной кислоты — при определенной концентрации пероксидазы, так что можно допустить, что пероксидаза, иодистоводородная кислота и перекись водорода реагируют между собой в определенных отношениях.

Аналогичная зависимость между ферментом и субстратом наблюдалась также и для гидролитических ферментов, и здесь также можно допустить, что фермент, субстрат и вода реагируют между собой в определенных отношениях с образованием промежуточных соединений.

II. При исследовании влияния концентрации пероксидазы и иодистоводородной кислоты на интенсивность окисления последней были установлены следующие закономерности с определенным препаратом пероксидазы из корней хрена:

1) При равных величинах интенсивности произведение концентраций пероксидазы и иодистоводородной кислоты представляет собой постоянную величину, откуда получается, что активизирующая способность пероксидазы  $\left(\frac{\text{перекись водорода}}{\text{пероксидаза}}\right)$  обратно пропорциональна ее концентрации и прямо пропорциональна концентрации иодистоводородной кислоты.

2) Интенсивность превращения иодистоводородной кислоты в точности пропорциональна квадратному корню из концентрации последней.

При повторении опытов с другим, по-видимому, более чистым препаратом пероксидазы из хрена эти закономерности, однако, не повторились. Вместо них с неменьшей ясностью выявилась следующая закономерность:

3) По достижении максимума пероксидазы интенсивность превращения в точности пропорциональна концентрации иодистоводородной кислоты.

Таким образом, установленные для действия пероксидазы закономерности зависят от способа приготовления фермента.

III. Из результатов, которые были получены с указанными препаратами пероксидазы, можно было сделать вывод, что первый препарат содержал два катализатора, из которых один активировал перекись водорода при окислении иодистоводородной кислоты, но не при окислении пирогаллола. Этот вывод был далее подтвержден тем, что из *Iris Germanica* и *Asparagus officinalis* были приготовлены препараты пероксидазы, которые при прочих равных условиях активировали больше перекиси водорода при окислении пирогаллола и значительно меньше при окислении иодистоводородной кислоты, чем пероксидаза из хрена.

IV. Пероксидаза сравнительно медленно разрушается под действием свободного иода. Так же точно она ведет себя по отношению к перекиси водорода. Однако при одновременном действии иода и перекиси водорода пероксидаза очень быстро и необратимо разрушается.

V. Для полного использования пероксидазы необходима определенная кислотность (концентрация водородных ионов) в реакционной жидкости. Эта кислотность может быть достигнута либо избытком иодистоводородной кислоты, либо посторонней кислотой (уксусная кислота).

VI. Интенсивность окисления иодистоводородной кислоты, активируемая пероксидазой, во всех случаях падает с повышением температуры (16—38°).

#### ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установление «законов действия ферментов» совершенно лишено перспектив до тех пор, пока ферменты получаются не в виде химически чистых индивидуумов, а в виде неизвестных и меняющихся смесей веществ, из которых каждое индивидуально может оказывать определенное влияние на реакцию в присутствии фермента.

1 октября 1904 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бах совм. с Шода. Ber. Dtsch. chem. Ges., **37**, 1342 (1904); настоящая книга, стр. 365.
2. Бах совм. с Шода. Ber. Dtsch. chem. Ges., **37**, 2434 (1904); настоящая книга, стр. 370.

## К ВОПРОСУ О КАТАЛАЗЕ

[Zur Kenntnis der Katalase] \*

Одновременное существование пероксидазы и каталазы в животном и растительном организме придает особый интерес вопросу о взаимном влиянии этих ферментов при проявлении их специфического действия на перекись водорода. Первые опыты, которые я поставил два года тому назад совместно с Р. Шода<sup>1</sup> по этому вопросу, дали следующие результаты:

1. При разложении перекиси водорода с выделением инертного кислорода действие каталазы ни в малейшей степени не нарушается присутствием пероксидазы, если только не имеется субстрата, который был бы способен окисляться под действием системы «пероксидаза — перекись водорода».

2. В последнем случае пероксидаза проявляет свое полное действие, которое несколько не нарушается присутствием каталазы.

В то время, когда мы производили эти опыты, еще не было известно метода точного измерения действия пероксидазы, так что нам пришлось ограничиться цветными реакциями; при этом, естественно, не могли достаточно учитываться количественные соотношения между пероксидазой, каталазой и перекисью водорода. Выработанный мною позже<sup>2</sup> метод определения способности к активированию пероксидазы путем окисления пирогаллола позволяет в настоящее время количественно исследовать взаимное влияние пероксидазы и каталазы при их действии на перекись водорода. Я поставил поэтому в последнее время в этом направлении новые опыты, результаты которых я здесь кратко изложу. Из теоретических соображений можно было ожидать, что при подходящих условиях опыта будет иметь место распределение перекиси водорода между пероксидазой и каталазой, соответственно их концентрации. Заранее укажу, что новые опыты только подтвердили правильность прежних наблюдений. Они дали, однако, одновременно некоторые достойные внимания результаты, относящиеся к действию и свойствам каталазы.

Пероксидаза, применявшаяся в этих опытах, была приготовлена из корней хрена описанным ранее методом<sup>3</sup> с той разницей, что при осаждении фермента из водноспиртового раствора к абсолютному спирту не прибавлялся эфир. Оказалось, что при длительном соприкосании с эфиром пероксидаза теряет в большей или меньшей степени свою активность, вероятно, вследствие известного свойства эфира очень легко образовывать активные перекиси<sup>4</sup>, которые частично разрушают фермент.

Каталаза приготовлялась из животных тканей ввиду их большей доступности. Подходящим материалом оказались жировые ткани, содержащие довольно много каталазы, как это уже наблюдалось Либрманом<sup>5</sup>.

\* Ber. Dtsch. chem. Ges., 38, 1878 (1905).

Существенным преимуществом этого материала является то, что из него легко приготовить препараты каталазы, совершенно не дающие пероксидазы.

500 г свежего говяжьего жира (почки) тщательно освобождались от кровянистой ткани (содержащей пероксидазу) и растирались в большой ступке с 100 г стеклянного порошка и 50 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора двууглекислого натрия. Полученная густая масса затем долгое время размешивалась с 250 см<sup>3</sup> теплой воды. Мутный белый экстракт отфильтровывался и осаждался абсолютным спиртом. Полученный осадок быстро отфильтровывался, промывался абсолютным спиртом и освобождался от последнего хранением в эксикаторе над хлористым кальцием. Таким путем получалась роговидная белая масса (2.3 г), из которой только 1/10 растворялась в воде. Водный раствор давал явные реакции на белок и довольно энергично разлагал перекись водорода. 1 см<sup>3</sup> раствора, содержащего 0.025 г растворимого вещества в 100 см<sup>3</sup>, выделял в течение 1 минуты из 10 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора перекиси водорода весь содержащийся в ней перекисный кислород.

Для предполагаемых опытов по распределению перекиси водорода между пероксидазой и каталазой было совершенно необходимо иметь точное представление о поведении данного препарата каталазы по отношению к перекиси. В первую очередь нужно было рассмотреть зависимость действия каталазы от концентрации фермента и субстрата. Опыты производились таким же образом, как и при исследовании действия пероксидазы<sup>6</sup>.

В 10 широкогорлых колбочек, поставленных в большую водяную баню при комнатной температуре, наливались из склянок, стоящих в той же водяной бане, равные количества раствора каталазы, возрастающие количества перекиси водорода и соответственное количество воды, для того чтобы во всех склянках объем был одинаковым. Момент введения перекиси водорода считался моментом начала реакции. Реакционная жидкость хорошо перемешивалась кратким взбалтыванием и затем оставлялась спокойно в термостате. По истечении ровно 60 минут реакция прекращалась прибавлением разбавленной серной кислоты и оставшаяся в реакционной смеси неразложившейся перекись водорода титровалась обратно 0.01*N* раствором перманганата калия. Отдельные контрольные опыты показали, что раствор каталазы чрезвычайно слабо и только по истечении очень длительного воздействия восстанавливает перманганат калия, даже при более высокой концентрации.

Для опытов применялся раствор каталазы, содержащий 0.05 мг растворимого вещества в 1 см<sup>3</sup> и 1%-ный раствор химически чистой перекиси водорода. Объем жидкости во всех случаях составлял 50 см<sup>3</sup>. Пять серий опытов были поставлены с возрастающими количествами каталазы (1—5 см<sup>3</sup> указанного выше раствора) и с возрастающими количествами перекиси водорода (10—100 мг). Серии опытов расположены по возрастающим концентрациям каталазы, так что в каждой серии реакционные сосуды содержат равные количества каталазы и возрастающие количества перекиси водорода. В продолжение опыта термометр, вставленный в водяную баню, показывал постоянную температуру 10°C.

В следующей таблице приведены результаты этих опытов.

*Разложившаяся перекись водорода (в мг)*

| Концентрация каталазы<br>Концентрация H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (в мг) | A<br>(1 см <sup>3</sup> ) | B<br>(2 см <sup>3</sup> ) | C<br>(3 см <sup>3</sup> ) | D<br>(4 см <sup>3</sup> ) | E<br>(5 см <sup>3</sup> ) |
|----------------------------------------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| I 10                                                                       | 7.09                      | 9.41                      | 10.00                     | 10.00                     | 10.00                     |
| II 20                                                                      | 12.79                     | 17.67                     | 19.18                     | 20.00                     | 20.00                     |
| III 30                                                                     | 16.28                     | 25.00                     | 29.41                     | 30.00                     | 30.00                     |
| IV 40                                                                      | 18.95                     | 31.28                     | 37.09                     | 39.18                     | 40.00                     |
| V 50                                                                       | 20.03                     | 36.86                     | 44.88                     | 48.39                     | 50.00                     |
| VI 60                                                                      | 21.62                     | 40.45                     | 52.09                     | 57.32                     | 60.00                     |
| VII 70                                                                     | 23.02                     | 42.90                     | 57.67                     | 66.04                     | 69.63                     |
| VIII 80                                                                    | 22.94                     | 44.88                     | 62.67                     | 72.90                     | 78.74                     |
| IX 90                                                                      | 22.90                     | 46.28                     | 67.32                     | 79.06                     | 86.16                     |
| X 100                                                                      | 22.98                     | 46.16                     | 71.11                     | 84.65                     | 93.83                     |

Из этой таблицы вытекает с полной ясностью, что степень превращения, вызванного каталазой в единицу времени, зависит как от концентрации перекиси водорода, так и от концентрации фермента. Он возрастает с возрастанием обеих концентраций, хотя и медленнее, чем последние, до определенного максимума и затем остается постоянным. Для полного использования каталазы необходима, таким образом, определенная концентрация перекиси водорода, для полного использования перекиси — определенная концентрация каталазы. Тот факт, что по достижении максимума концентрация каталазы глубина превращения в точности пропорциональна количеству перекиси водорода, понятен, так как в этом случае разлагается вся перекись водорода (DI—DIV, EI—EVII). Однако обратное также правильно, т. е. по достижении максимума для перекиси водорода глубина превращения прямо пропорциональна концентрации каталазы.

Эта последняя пропорциональность еще яснее выявляется в следующей серии опытов, в которой применялась большая концентрация перекиси водорода (150 мг  $H_2O_2$  в 50 см<sup>3</sup>), чем соответствует максимуму:

|                                                      | A     | B     | C     | D     | E      |
|------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|--------|
| Концентрация каталазы (в см <sup>3</sup> ) . . . . . | 1     | 2     | 3     | 4     | 5      |
| Разложенная перекись водорода (в мг) . .             | 23.02 | 46.51 | 70.00 | 92.20 | 118.02 |

Действие каталазы подчиняется, таким образом, тому же самому закону, который наблюдался мною для пероксидазы<sup>7</sup> и который, повидимому, имеет место также и для других ферментов, а именно: при избытке фермента превращение пропорционально количеству субстрата, при избытке субстрата — количеству фермента. Для пероксидазы, которая действует на сложный субстрат (перекись водорода — окисляемое вещество), это правило осложняется тем, что превращение пропорционально отдельным составным частям субстрата (так, например, пропорционально количеству перекиси водорода при избытке пероксидазы и иодистоводородной кислоты или количеству иодистоводородной кислоты при избытке пероксидазы и перекиси водорода). Легче всего объяснить это тем, что фермент и субстрат участвуют в реакции в постоянном отношении, образуя промежуточные соединения\*.

Для проведения исследования о распределении перекиси водорода между субстратом и ферментами было далее необходимо определить скорость реакции, вызываемой приготовленным мною препаратом каталазы, так как только при точном знании этой скорости можно применять сравнимые количества пероксидазы и каталазы. Обычный метод, применявшийся также и Сентером<sup>8</sup> в его основном исследовании о скорости реакции каталазы, неприменим в условиях моих опытов. Оказалось, что при отборе проб жидкости пипеткой из реакционной склянки внутри пипетки происходит такое энергичное выделение кислорода, что точное измерение объема жидкости практически невозможно. Поэтому мне пришлось вернуться к методу, который уже оправдал себя при определении скорости реакции пероксидазы<sup>6</sup>.

Опыты были произведены указанным выше способом с 10 склянками при 12°. Было поставлено три серии опытов с постоянной концентрацией перекиси водорода (100 мг  $H_2O_2$  на 50 см<sup>3</sup>) и возрастающей концентрацией каталазы (3, 6 и 12 см<sup>3</sup> указанного выше раствора). Главной целью этих опытов было определение концентрации каталазы, необходимой для разложения 100 мг  $H_2O_2$  в 50 см<sup>3</sup> в течение 10 минут (зависимость продолжительности реакции от концентрации при окислении пирогаллала для определения способности активировать пероксидазу). Полученные результаты приведены в следующей таблице:

\* Касти и Левенгардт (Amer. Chem. J., 29, 585 (1903) впервые высказали взгляд, что каталаза и перекись водорода соединяются, образуя промежуточное соединение перекисного типа.

А. 100 мг  $H_2O_2$ , 3 см<sup>3</sup> раствора каталазы в 50 см<sup>3</sup>

|                                     |       |       |       |       |       |
|-------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Минуты . . . . .                    | 2     | 4     | 6     | 8     | 10    |
| Разложено $H_2O_2$ (в мг) . . . . . | 20.92 | 29.99 | 34.52 | 38.04 | 42.61 |
| Минуты . . . . .                    | 15    | 20    | 25    | 40    | 50    |
| Разложено $H_2O_2$ (в мг) . . . . . | 48.33 | 54.73 | 62.38 | 64.28 | 65.23 |

Б. 100 мг  $H_2O_2$ , 6 см<sup>3</sup> раствора каталазы в 50 см<sup>3</sup>

|                                     |       |       |       |       |       |
|-------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Минуты . . . . .                    | 2     | 4     | 6     | 8     | 10    |
| Разложено $H_2O_2$ (в мг) . . . . . | 31.90 | 43.33 | 51.66 | 58.40 | 63.59 |
| Минуты . . . . .                    | 15    | 20    | 25    | 40    | 50    |
| Разложено $H_2O_2$ (в мг) . . . . . | 77.14 | 84.76 | 92.38 | 96.19 | 97.11 |

С. 100 мг  $H_2O_2$ , 12 см<sup>3</sup> раствора каталазы в 50 см<sup>3</sup>

|                                     |       |       |       |       |       |
|-------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Минуты . . . . .                    | 2     | 4     | 6     | 8     | 10    |
| Разложено $H_2O_2$ (в мг) . . . . . | 61.19 | 77.57 | 89.99 | 95.00 | 98.09 |
| Минуты . . . . .                    | 15    | 20    | 25    | 40    | 50    |
| Разложено $H_2O_2$ (в мг) . . . . . | 99.04 | 99.06 | 99.02 | —     | —     |

Если сравнить время, необходимое для разложения около  $\frac{2}{3}$  применявшейся перекиси водорода (62.38 мг) во всех трех сериях, то получаются следующие значения:

$$\frac{A : B : C}{1 : 2 : 4} = 30 : 9.5 : 2.4.$$

В условиях опыта, которых я придерживался, скорость реакции каталазы растет, таким образом, быстрее, чем ее концентрация. При удвоении концентрации скорость возрастает в три раза. При увеличении ее в четыре раза скорость возрастает в 12 раз по сравнению с первоначальной. Эти результаты до известной степени подтверждают наблюдения, которые были сделаны Сентером<sup>9</sup> с каталазой из крови. Он нашел, в частности, что скорость разложения перекиси водорода каталазой только в очень разбавленных растворах перекиси водорода (около  $\frac{1}{300}$  мол.) следует в первом приближении закону действующих масс. При более высоких концентрациях перекиси водорода скорость возрастает быстрее, чем количество фермента. Сентер пытается объяснить отклонение от простых законов действием перекиси водорода на каталазу. Принимая во внимание чрезвычайно большую чувствительность каталазы по отношению к химическим и физическим воздействиям, гораздо правильнее приписать эти отклонения неизвестным примесям, которые неизбежны при выделении каталазы.

После того как активность приготовленного препарата каталазы по отношению к перекиси водорода была определена приведенными выше опытами, было поставлено количественное определение распределения перекиси водорода между пероксидазой и каталазой. Из всех реакций окисления, которые производятся системой «пероксидаза — перекись водорода», только две — окисление пирогаллола и окисление иодистоводородной кислоты — допускают количественные определения. Однако ввиду того что каталаза очень быстро разлагается свободным иодом, для предполагаемого исследования распределения можно использовать только окисление пирогаллола. Опыты были поставлены следующим образом.

В шесть эрленмейеровских колбочек прибавлялись последовательно раствор пирогаллола (10 см<sup>3</sup> 15%-ного раствора), раствор пероксидазы (по 1 экв.), раствор

каталазы (0.5 экв.), вода (до 40 см<sup>3</sup>) и затем перекись водорода (10 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора). После 24-часового стояния полученные осадки пурпуругалина переносились на взвешенные фильтры, тщательно промывались 200 см<sup>3</sup> воды, сушились при 110° до постоянного веса и взвешивались.

Уже при проведении реакции было замечено, что, несмотря на присутствие сравнительно больших количеств каталазы в реакционной смеси, не было выделения кислорода, и во всех колбах, повидимому, образовывались одинаковые количества пурпуругалина. Взвешивание высушенных осадков действительно дало следующие результаты:

|                                          |       |       |       |       |       |       |
|------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Прибавленная каталаза (в экв.) . . . . . | 0     | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     |
| Пурпуругалин (в г) . . . . .             | 0.201 | 0.203 | 0.200 | 0.205 | 0.201 | 0.203 |

Присутствие 1—5 экв. каталазы не оказало, таким образом, никакого влияния на окисление пирогаллола системой «пероксидаза — перекись водорода». Полное отсутствие предполагаемого распределения перекиси водорода между пероксидазой и каталазой позволяет предположить, что последний фермент теряет свою активность под действием пирогаллола.

Нижеследующие данные вполне это подтверждают:

- а) 1 экв. каталазы, 0.1 г перекиси водорода в 50 см<sup>3</sup>.  
 б) 1 " " , 1.5 г пирогаллола, 0.1 г перекиси водорода в 50 см<sup>3</sup>.

*Выделившийся кислород*

После 10 минут: а) 31.8 см<sup>3</sup> (0° и 760 мм); б) 0.0 см<sup>3</sup>.  
 После 180 минут: а) 31.8 см<sup>3</sup> (0° и 760 мм); б) 0.6 см<sup>3</sup>.

После 24-часового стояния к реакционной смеси (б) прибавлялся 1 экв. пероксидазы, и полученный пурпуругалин взвешивался обычным способом. Получено 0.191 г вместо 0.202 г (среднее из шести приведенных выше опытов).

Применяющиеся в настоящее время количественные методы, таким образом, не позволяют проследить за распределением перекиси водорода между пероксидазой и каталазой. Я надеюсь подойти ближе к разрешению этого вопроса другим путем, однако не исключена возможность, что такого рода распределение вообще не имеет места. Как уже было указано выше<sup>1</sup>, каталаза не оказывает никакого действия на замещенную перекись водорода (гидроперекись этила). С другой стороны, на основании сделанных до сих пор опытов, можно допустить с достаточной достоверностью, что пероксидаза и перекись водорода соединяются, образуя замещенную перекись водорода. Если скорость, с которой это промежуточное соединение образуется и передает окисляемому субстрату активный кислород, больше, чем скорость, с которой оно вновь распадается на пероксидазу и перекись водорода, то перекись водорода в смеси окисляемого субстрата, каталазы, пероксидазы и перекиси водорода может быть частично или полностью, в зависимости от количества присутствующей пероксидазы, защищена от влияния каталазы.

29 апреля 1905 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бах совм. с Шода. Ber. Dtsch. chem. Ges., **36**, 1757 (1903); настоящая книга, стр. 356.
2. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., **37**, 3785 (1904); настоящая книга, стр. 378.
3. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., **37**, 3787 (1904); настоящая книга, стр. 379.
4. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., **38**, 774 (1905).
5. Liebermann. Ber. Dtsch. chem. Ges., **38**, 1524 (1905).
6. Бах совм. с Шода. Ber. Dtsch. chem. Ges., **37**, 2434 (1904).
7. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., **37**, 3785 (1904); настоящая книга, стр. 378.
8. Senter. Zs. physik. Chem., **44**, 257 (1903).
9. Senter. Zs. physik. Chem., **44**, 286 (1903).

## ВЛИЯНИЕ ПЕРОКСИДАЗЫ НА СПИРТОВОЕ БРОЖЕНИЕ \*

[*Einfluss der Peroxydase auf die alkoholische Gärung*] \*\*

Окислительное действие системы «пероксидаза — перекись водорода» распространяется на сравнительно большое число соединений, но не производит глубокого окисления молекул. Оно ограничивается главным образом окислением подвижного водорода фенолов\*\*\* и ароматических аминов, а также иодистоводородной кислоты. Из числа веществ, играющих существенную роль в физиологическом отношении, сахар, например, совершенно не окисляется, по крайней мере в тех условиях, которые я исследовал.

Так как не исключено, что в организме сахар сжигается не как таковой, а только после предварительного расщепления, я пытался подвергнуть его одновременному действию расщепляющего фермента и системы «пероксидаза — перекись водорода», рассчитывая на то, что при этом произойдет окисление углевода или какого-нибудь из его продуктов расщепления. Особенно подходящим для такого рода опытов мне казался фермент спиртового брожения, находящийся в дрожжах, так как он вызывает глубокий распад молекулы сахара.

Для опытов, описанных ниже, применялись бюхнеровские «ацетоновые дрожжи», т. е. отпрессованные дрожжи, обработанные ацетоном. При достаточно длительной обработке дрожжей этим растворителем, как известно, убиваются все дрожжевые клетки, в то время как содержащийся в них фермент остается почти незатронутым.

Ацетоновые дрожжи были приобретены мною на дрожжевой фабрике Шрейдер в Мюнхене, под названием «Zumin rug» в виде лепешек и порошка. Применявшаяся пероксидаза приготовлялась описанным выше способом из корней хрена. Опыты ставились следующим образом.

В две склянки по 400 см<sup>3</sup>, содержащие по 100 см<sup>3</sup> 15%-ного раствора сахара, по 1 г пероксидазы в 15 см<sup>3</sup> воды и по 5 г зимазы, помещались тонкостенные запаянные ампулы, содержащие по 10 см<sup>3</sup> 10%-ного раствора перекиси водорода.

В одной из склянок прибавленная пероксидаза была разрушена предварительным двукратным кипячением раствора. Эти склянки были соединены с тремя промывалками, содержащими отмеренное количество титрованной баритовой воды; реакционные колбы и промывалки были поставлены в термостаты при 30°. Последняя промывалка каждой серии соединялась посредством толстостенной резиновой трубки и трехходового крана с газовой бюреткой, наполненной ртутью.

После тщательного испытания на герметичность приборы были оставлены в термостате до тех пор, пока не образовалось заметное помутнение в первой промывалке.

\* Установленное в этой работе явление сильного торможения спиртового брожения системой «пероксидаза—перекись водорода» получило в современной биохимической литературе наименование «реакция Баха». П р и м. р е д.

\*\* Ver. Dtsch. chem. Ges., 39, 1664 (1906).

\*\*\* Пирогаллол при этом частично окисляется в углекислоту.



После этого ампулы, содержащие перекись водорода, были разбиты. Немедленно произошло бурное выделение газа; выделяющийся кислород освобождался промывалками от углекислоты, собирався в бюретки и измерялся. По истечении 72 часов через прибор просасывался ток воздуха, не содержащего углекислоты, и соединенные жидкости промывалок — в последней промывалке баритовая вода оставалась совершенно прозрачной — быстро фильтровались через сухие фильтры; в фильтрах затем титровалась оставшаяся гидроокись бария щавелевой кислотой, 1 см<sup>3</sup> которой соответствовал 2 см<sup>3</sup> углекислоты, и вычислялось количество образующейся углекислоты. В бродильной жидкости кислотность определялась посредством децинормального едкого натра.

Следующий опыт был поставлен с перекисью водорода и зимазой в отсутствии пероксидазы и с одной зимазой — при прочих равных условиях. В следующей таблице сведены полученные результаты.

|                                                            | I<br>Активная<br>пероксидаза,<br>перекись<br>водорода<br>и зимаза | II<br>Кипяченая<br>пероксидаза,<br>перекись<br>водорода<br>и зимаза | III<br>Перекись<br>водорода<br>и зимаза | IV<br>Зимаза |
|------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------|
| Выделившийся кислород (см <sup>3</sup> )                   | 304.0                                                             | 300.0                                                               | 310.0                                   | —            |
| Образовавшаяся углекислота<br>(см <sup>3</sup> ) . . . . . | 184.5                                                             | 482.2                                                               | 492.5                                   | 486.3        |
| Полная кислотность (см <sup>3</sup> ) . . .                | 162.5                                                             | 168.3                                                               | 166.7                                   | 164.6        |

Из этой таблицы видно: 1) что вся перекись водорода разлагается с выделением кислорода каталазой, находящейся в дрожжах (вычислено 321 см<sup>3</sup>, получено 304, 300, 310 см<sup>3</sup> кислорода). Если принять во внимание кислород, оставшийся растворенным в баритовой воде и в реакционной жидкости, то разложение перекиси водорода можно считать количественным; 2) что присутствие активной пероксидазы сильно задерживает спиртовое брожение, в то время как инактивированная пероксидаза и перекись водорода в отсутствии пероксидазы не оказывают никакого влияния на брожение; 3) что присутствие пероксидазы и перекиси водорода совершенно не влияет на кислотность перебродившей жидкости.

Для того чтобы ближе выяснить влияние пероксидазы на бесклеточное спиртовое брожение, я поставил ряд сравнительных опытов с активной и кипяченой пероксидазой, следя за ходом реакции путем измерения углекислоты, непосредственно собирающейся в бюретке. Многочисленные контрольные опыты показали, что углекислота является единственным газообразным продуктом брожения. Эти сравнительные опыты показали, что задерживающее действие пероксидазы на спиртовое брожение различно для различных препаратов пероксидазы и зимазы, но что оно во всех случаях имеет место. В таблице на стр. 398 приведены в качестве примера результаты, полученные с двумя различными препаратами зимазы и одним и тем же препаратом пероксидазы.

По истечении приблизительно 60 часов выделение углекислоты полностью прекращается, при условии, что в зимазе не содержится клеток, способных развиваться. В последнем случае на 4-й и 5-й день наступает энергичное брожение, при котором выделяется около 100 см<sup>3</sup> углекислоты в час и которое продолжается два дня.

В приведенных выше опытах в сброженной жидкости определялась также и каталаза путем измерения объема кислорода, который выделялся из 15 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора перекиси водорода при прибавлении 5 см<sup>3</sup> данной жидкости. При этом было сделано интересное наблюдение, что способность зимазы выделять кислород из перекиси водорода задерживается

Количество выделившейся углекислоты (в см<sup>3</sup>)

(привед. к 0° и 760 мм)

|                    | Активная пероксидаза |           | Кипяченая пероксидаза |           |
|--------------------|----------------------|-----------|-----------------------|-----------|
|                    | Зимаза I             | Зимаза II | Зимаза I              | Зимаза II |
| 1-й день . . . . . | 158.2                | 147.4     | 267.8                 | 251.4     |
| 2-й день . . . . . | 35.6                 | 19.3      | 190.0                 | 149.6     |
| 3-й день . . . . . | 0.8                  | 0.6       | 51.2                  | 20.6      |
|                    | 194.6                | 167.3     | 509.0                 | 421.6     |

в присутствии активной пероксидазы почти в такой же мере, как ее способность отщеплять углекислоту от сахара:

|                              | Зимаза I              |                       | Зимаза II             |                       |
|------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|                              | Активная пероксидаза  | Кипяченая пероксидаза | Активная пероксидаза  | Кипяченая пероксидаза |
| Выделившаяся углекислота . . | 194.6 : 509.0 = 0.382 |                       | 167.3 : 421.6 = 0.397 |                       |
| Выделившийся кислород . . .  | 8.4 : 22.4 = 0.379    |                       | 8.2 : 20.2 = 0.405    |                       |

В других опытах с теми же препаратами пероксидазы и зимазы были получены аналогичные отношения. Эта замечательная пропорциональность позволила предположить, что между соответственными ферментами дрожжей имеется какая-то причинная связь. Дальнейшие опыты показали, однако, что эта связь случайная. С третьим препаратом зимазы и более чистой, значительно более энергичной пероксидазой были получены следующие данные:

|                                               | Зимаза III           |                       |
|-----------------------------------------------|----------------------|-----------------------|
|                                               | Активная пероксидаза | Кипяченая пероксидаза |
| Выделившаяся углекислота (в см <sup>3</sup> ) |                      |                       |
| в 1-й день . . . . .                          | 0.0                  | 265.6                 |
| во 2-й день . . . . .                         | 6.2                  | 79.0                  |
| в 3-й день . . . . .                          | 13.4                 | 2.0                   |
|                                               | 19.6 : 346.6 = 0.056 |                       |
| Выделившийся кислород . . . . .               | 22.5 : 31.0 = 0.726  |                       |

В этом случае каталаза была значительно меньше затронута пероксидазой, чем фермент дрожжей, расщепляющий сахар.

Тот факт, что активная пероксидаза оказывает задерживающее действие на бесклеточное спиртовое брожение, представляет интерес в том отношении, что дрожжи принадлежат к числу немногочисленных орга-

низмов, не содержащих пероксидазы\*. Таким образом расщепление сахара на спирт и углекислоту, повидимому, несовместимо с присутствием пероксидазы.

Что касается отсутствия какого бы то ни было окисления при одновременном действии зимазы и системы «пероксидаза — перекись водорода» на сахар, то я склонен на основании накопившегося опыта считать, что его надо приписать не присутствию каталазы в зимазе, а малой окисляемости соответственных веществ при помощи системы «пероксидаза — перекись водорода». Действительно, как ни велико содержание каталазы в зимазе, оно не препятствует получению известных реакций окрашивания, которые вызываются пероксидазой в присутствии перекиси водорода. 1 г зимазы в состоянии разложить 3.5 кг 1%-ного раствора перекиси водорода в течение 10 минут, с выделением около 11 л кислорода. Если растереть 1 г зимазы с пероксидазой и 20 см<sup>3</sup> воды и прибавить перекись водорода и вслед за тем раствор гваякола, то не наблюдается никакого окрашивания. Однако если прибавить еще каплю перекиси водорода или если заранее, т. е. до перекиси водорода, прибавить раствор гваякола, то смесь приобретает темнокрасное окрашивание. Последнее исчезает через некоторое время и вновь появляется при прибавлении перекиси водорода. При применении каталазы, не содержащей восстанавливающих веществ, окрашивание вообще не исчезает. Пирогаллол, гваяковая настойка, ароматические амины ведут себя при одновременном действии системы «пероксидаза — перекись водорода» и зимазы, как гваякол. Таким образом, специфические функции пероксидазы не нарушаются присутствием очень значительных количеств каталазы. Что в некоторых случаях имеет место и обратное положение, будет показано в более позднем сообщении.

20 апреля 1906 г.

\* Уже Шенбейн [Abhandl. Münch. Akad. Wiss., 2, 100 (1836)] наблюдал, что дрожжи, очень энергично разлагающие H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> с выделением кислорода, не активируют ее.

---

## РАЗЛОЖЕНИЕ КАТАЛАЗЫ ДРОЖЖЕЙ ПРИ БЕСКЛЕТОЧНОМ СПИРТОВОМ БРОЖЕНИИ

[*Über das Schicksal der Hefekatalase bei der zellfreien  
alkoholischen Gärung*] \*

В связи с опытами о влиянии пероксидазы на спиртовое брожение (см. предшествующее сообщение) я сделал наблюдение, что содержание каталазы в зимазе довольно быстро падает в процессе расщепления сахара. Это наблюдение заставило меня поставить некоторые опыты с целью выяснения судьбы каталазы дрожжей при бесклеточном спиртовом брожении.

В отношении разрушения каталазы при брожении сахара под действием зимазы следует рассматривать два различных явления: 1) собственно спиртовое брожение, при котором продукты распада сахара (спирт, кислоты) могут нарушать действие каталазы, и 2) так называемый автолиз дрожжевого вещества, т. е. посмертное действие ферментов дрожжей на содержащиеся в них расщепляемые вещества. Так как каталаза принадлежит к числу белковых соединений, то она должна в большей или меньшей степени разрушаться при автолизе под действием протеолитических ферментов дрожжей. Для того чтобы судить о судьбе каталазы при брожении, было необходимо поставить параллельно опыты с брожением и автолизом.

Две склянки, содержащие: *A* — 125 см<sup>3</sup> 12%-ного раствора сахара и 5 г зимазы III (см. предшествующее сообщение) и *B* — 125 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и 5 г зимазы, ставились в термостат при 30°. Для определения каталазы отбирались пробы по 5 см<sup>3</sup> хорошо перемешанного содержимого склянок и взвешивались в 45 см<sup>3</sup> воды; 5 см<sup>3</sup> взвеси (соответствующие 0.02 г зимазы) смешивались в определенных, всегда одинаковых условиях с 15 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора перекиси водорода; ровно через 10 минут измерялся выделившийся объем кислорода и приводился к 0° и 760 мм.

В тех же условиях были произведены еще два опыта, но вместо 5 г зимазы было взято 0.5 г; 5 см<sup>3</sup> взвеси непосредственно использованы для определения каталазы. Применялся более старый препарат зимазы (зимаза 0) и зимаза II (см. предшествующее сообщение).

Полученные результаты приведены в табл. 1 и 2.

Из этих опытов вытекает: 1) что содержание каталазы в зимазе медленно, но правильно убывает при автолизе; 2) что в присутствии сахара, т. е. при спиртовом брожении, происходящее при автолизе разрушение каталазы очень ускоряется; 3) что разрушение каталазы в обоих случаях возрастает с разбавлением зимазы.

---

\* Ber. Dtsch. chem. Ges., 39, 1669 (1906).

Таблица 1  
Количество выделившегося кислорода (в см<sup>3</sup>)

|                    | А<br>Зимаза<br>в растворе<br>сахара<br>(брожение) | Б<br>Зимаза<br>в воде<br>(автолиз) |
|--------------------|---------------------------------------------------|------------------------------------|
| Начало опыта . . . | 43.3                                              | 44.2                               |
| Через 5 час. . . . | 42.1                                              | 42.5                               |
| » 12 » . . . .     | 41.7                                              | 39.8                               |
| » 23 » . . . .     | 36.0                                              | 33.5                               |
| » 35 » . . . .     | 29.3                                              | 32.9                               |
| » 48 » . . . .     | 13.1                                              | 31.7                               |
| » 60 » . . . .     | 2.2                                               | 30.5                               |

Таблица 2  
Количество выделившегося кислорода (в см<sup>3</sup>)

|                    | Зимаза 0 |         | Зимаза II |         |
|--------------------|----------|---------|-----------|---------|
|                    | Брожение | Автолиз | Брожение  | Автолиз |
| Начало опыта . . . | 32.2     | 31.8    | 47.2      | 48.4    |
| Через 6 час. . . . | 29.5     | 29.2    | 44.1      | 44.5    |
| » 12 » . . . .     | 13.8     | 20.8    | 40.3      | 41.0    |
| » 24 » . . . .     | 2.8      | 12.2    | 14.9      | 32.1    |
| » 36 » . . . .     | 1.2      | 8.3     | 2.4       | 26.3    |

Определенную зависимость между содержанием каталазы и способностью зимазы вызывать брожение не удалось установить с достоверностью.

20 апреля 1906 г.

## ВЛИЯНИЕ ПЕРОКСИДАЗЫ НА АКТИВНОСТЬ КАТАЛАЗЫ

[*Einfluss der Peroxydase auf die Tatigkeit der Katalase*] \*

При зимазном брожении в присутствии активной пероксидазы ката­лаза исчезает значительно быстрее, чем при брожении в присутствии кипяченой пероксидазы<sup>1</sup>; это позволяет предположить, что пероксидаза оказывает задерживающее действие на активность каталазы. Это пред­положение находилось в известном противоречии с сделанным ранее Шода и мною<sup>2</sup> наблюдением, что пероксидаза не оказывает влияния на разло­жение перекиси водорода каталазой. Но в предыдущих опытах влияние пероксидазы определялось просто после смешивания обоих ферментов при комнатной температуре. Поэтому не была исключена возможность, что при длительном соприкосновении и при более высокой температуре, как это имеет место при исследованиях с зимазой, обстоятельства скла­дываются иначе. Недавно опубликованное Бателли и сотр.<sup>3</sup> наблюдение придало вопросу о взаимном влиянии пероксидазы и каталазы новый ин­терес. Эти исследователи нашли в животном организме соединение, кото­рое снижает активность каталазы на  $\frac{1}{3}$  после 15-минутного воздействия при 37°. Они назвали сначала это соединение «антикаталазой», а затем, после того как они нашли, что оно содержит железо в закисном состоянии, «феррозином». Оказалось, что феррозин активизирует перекиси, хотя он и не является ферментом. Дальнейшие опыты показали, что сернокислая

Таблица 1

*Количество выделившегося кислорода (в см<sup>3</sup>)*

|                      | Зимаза +<br>активная<br>пероксидаза | Зимаза +<br>кипяченая<br>пероксидаза |
|----------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Начало опыта . . . . | 41.5                                | 40.5                                 |
| Через 3 час. . . . . | 40.6                                | 40.5                                 |
| » 6 » . . . . .      | 39.5                                | 41.0                                 |
| » 9 » . . . . .      | 39.6                                | 40.4                                 |
| » 21 » . . . . .     | 39.3                                | 40.7                                 |
| » 27 » . . . . .     | 36.1                                | 37.8                                 |
| » 33 » . . . . .     | 33.8                                | 33.8                                 |
| » 46 » . . . . .     | 33.6                                | 34.2                                 |
| » 58 » . . . . .     | 33.2                                | 34.0                                 |

\* Ber. Dtsch. chem. Ges., 39, 1670 (1906).

закись железа так же тормозит действие каталазы, как и феррозин. Если вещества, которые активируют перекись водорода, задерживают действие каталазы, то и пероксидаза должна действовать в том же направлении. Это заставило нас проверить наши старые наблюдения.

Сначала были поставлены опыты с каталазой из дрожжей: к 0.5 г зимазы в 100 см<sup>3</sup> воды было прибавлено: *A* — 0.2 г активной пероксидазы в 25 см<sup>3</sup> воды и *B* — такое же количество кипяченой пероксидазы; смесь оставлялась в термостате при 30°; содержание каталазы определялось по методу, указанному в предыдущем сообщении.

Из полученных данных видно (табл. 1), что активность каталазы из дрожжей не снижается при длительном контакте с активной пероксидазой при 30°. Для того чтобы сравнить в дальнейшем каталазу из животного организма с пероксидазой из растений, я поставил опыт с довольно активным препаратом каталазы, полученным из бычьей печени (табл. 2):

Таблица 2

Количество выделившегося кислорода (в см<sup>3</sup>)

|                    | Каталаза +<br>активная<br>пероксидаза | Каталаза +<br>кипяченая<br>пероксидаза |
|--------------------|---------------------------------------|----------------------------------------|
| Начало опыта . . . | 36.3                                  | 21.3                                   |
| Через 4 час. . . . | 36.5                                  | 22.0                                   |
| » 12 » . . . .     | 34.1                                  | 21.7                                   |
| » 23 » . . . .     | 35.7                                  | 22.1                                   |
| » 34 » . . . .     | 27.1                                  | 21.9                                   |
| » 48 » . . . .     | 21.7                                  | 21.4                                   |
| » 60 » . . . .     | 21.8                                  | 21.2                                   |
| » 72 » . . . .     | 21.0                                  | 20.8                                   |

В этом случае наблюдалось даже большое повышение действия каталазы в присутствии активной пероксидазы. Однако по истечении 48 часов нельзя было заметить разницы между пробами каталазы, к которым была прибавлена активная и кипяченая пероксидаза.

Приведенные выше опыты подтверждают, таким образом, сделанное ранее наблюдение, что специфическое действие каталазы на перекись водорода не тормозится присутствием пероксидазы. Разрушение каталазы дрожжей при зимазном брожении сахара значительно ускоряется присутствием активной пероксидазы. О причинах этого ускорения можно только строить предположения.

20 апреля 1906 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бах совм. с Шода. Ber. Dtsch. chem. Ges., **39**, 1639 (1906); настоящая книга, стр. 400—401.
2. Бах совм. с Шода. Ber. Dtsch. chem. Ges., **36**, 1756 (1903); настоящая книга, стр. 356.
3. Battelli u. a. C. R. Soc. Biol., **58**, 235; **59**, 521, 580.

---

## ПЕРОКСИДАЗЫ КАК СПЕЦИФИЧЕСКИ ДЕЙСТВУЮЩИЕ ФЕРМЕНТЫ (I)

[*Peroxydasen als spezifisch wirkende Enzyme*] \*

Бертран<sup>1</sup> нашел в некоторых растениях окислительный фермент, названный им тирозиназой, который отличается от обычной оксидазы (лакказы) тем, что он не окисляет ни фенолы, ни ароматические амины, но превращает тирозин в черный продукт окисления. С другой стороны, обычная оксидаза на тирозин не действует, так что здесь имеет место специфическое действие ферментов.

Исходя из тех соображений, что все реакции окисления, которые производятся обычной оксидазой, могут быть осуществлены также и пероксидазой вместе с перекисью водорода, мне казалось интересным выяснить поведение тирозина по отношению к последней окислительной системе. Поставленные мною опыты с пероксидазой из хрена и перекисью водорода показали, что ни при каких обстоятельствах тирозиназа не превращается этой окислительной системой в характерный черный продукт. Так как оксидазы представляют собою не что иное, как смесь пероксидаз и оксигеназ<sup>2</sup>, т. е. ферментов, активирующих перекиси и образующих перекиси, то отсутствие окисления тирозина может иметь два объяснения: либо пероксидаза, содержащаяся в тирозиназе, отлична от обычной пероксидазы, либо перекись, образованная оксигеназой, действует на тирозин в другом направлении, чем перекись водорода. Другими словами, специфическое действие тирозиназы надо приписать либо специфической природе ее пероксидазы, либо специфической природе ее оксигеназы.

Для того чтобы ближе подойти к разрешению этого вопроса, я пытался выделить пероксидазу, содержащуюся в тирозиназе. Составная часть оксидазы, образующая перекись, — оксигеназа, — как известно, в большинстве случаев довольно неустойчива, в то время как пероксидаза сохраняется почти неограниченно долго. Поэтому я поставил себе целью обработкой подходящего материала, содержащего тирозиназу, непосредственно получить пероксидазу, не содержащую оксигеназы. †

Тонкоизмельченные молодые картофельные клубни были отжаты и полученный сок (300 см<sup>3</sup>) оставлен на 24 часа после прибавления небольшого количества крепкого спирта (30 см<sup>3</sup>). Прибавление спирта вызывает коагуляцию клейевидных веществ, которые чрезвычайно затрудняют фильтрование, если их не удалить. К отфильтрованной прозрачной коричневой жидкости прибавлялся четырехкратный объем абсолютного спирта; полученный осадок отфильтровывался на бюchnerовской воронке, промывался абсолютным спиртом и высушивался в вакууме над хлористым кальцием. Полученная таким образом черно-серая масса очень мало растворима в воде. Раствор получался совершенно прозрачным и бесцветным. Испытания раствора на

\* Ber. Dtsch. chem. Ges., 3 9, 2126 (1906).



окислительные ферменты показали, что он содержит, наряду с большим количеством обыкновенной пероксидазы и небольшим количеством обыкновенной оксигеназы, также и элементы тирозиназы Бертрана, однако уже не в первоначальных отношениях. В то время как свежий сок из картофельных клубней сравнительно быстро окислял тирозин, полученный раствор почернел после прибавления тирозина только через 36—48 часов.

Предполагая, что ослабление действия тирозиназы надо приписать частичному разложению ее оксигеназы, я пытался заменить последнюю перекисью водорода. К моему удовлетворению, опыты дали резко положительный результат. Растворы ферментов, которые окисляли тирозин только после длительного действия (36—48 часов), окрашивались в черно-коричневый цвет\* через короткое время (1 час) после прибавления перекиси водорода.

Совершенно аналогичные результаты были получены со смесью обыкновенной оксидазы и тирозиназы, приготовленной из *Lactarius vellereus*; и в этом случае окисление тирозина очень ускорялось перекисью водорода. Таким образом, в то время как перекись водорода с обыкновенной пероксидазой не оказывает никакого действия на тирозин, она энергично окисляет его, если она активируется пероксидазой, содержащейся в тирозиназе. Из этого вытекает, что специфическое действие тирозиназы основано на специфической природе ее пероксидазы. То же самое имеет место и для обыкновенной оксидазы и обыкновенной пероксидазы. Поскольку позволяет заключить наш опыт, для специфического действия окислительных ферментов является, таким образом, решающей специфическая природа соответственных пероксидаз.

### ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Слабым местом попыток приписать окислительным ферментам основную роль в процессах дыхания до сих пор было то обстоятельство, что наиболее известные и наиболее распространенные представители этого класса ферментов вызывают окислительные процессы, имеющие очень отдаленное отношение к процессам дыхания. Как известно, при дыхании происходит полное сгорание резервных и питательных веществ и превращение содержащейся в них потенциальной энергии в работу и теплоту. Для выполнения этой функции окислительные ферменты должны бы в первую очередь действовать именно на эти вещества. Однако это не так: окислительными ферментами окисляются не углеводы, жиры и т. д., а лишь некоторые сравнительно легко окисляемые соединения, содержащие подвижный водород. Следует ли из этого, что окислительные ферменты не имеют никакого отношения к собственным процессам дыхания? Принимая во внимание установленный факт, что окислительные ферменты, как и другие ферменты, имеют специфическое действие, я считаю, что такое заключение было бы преждевременным.

Если рассмотреть внимательнее химические действия известных окислительных ферментов, то обращает на себя внимание тот факт, что они одновременно вызывают процессы окисления и конденсации. Так, например, обычная пероксидаза в присутствии перекиси водорода и обычная оксидаза превращают пирогаллол в пурпурогаллин, гидрохином в хингидрон, гваякол<sup>3</sup> в соединение  $[C_6H_3(O \cdot CH_3) \cdot O]_4$  при частичном окис-

\* Пероксидаза, содержащаяся в тирозиназе, значительно чувствительнее к химическим воздействиям и к температуре, чем обыкновенная пероксидаза. Поэтому для проведения окислительных опытов с тирозином нужно применять очень разбавленные растворы перекиси водорода, ибо в противном случае пероксидаза быстро разрушается.

лении. Окисление ароматических аминов в различные красители, а также и окисление тирозина тирозиназой надо также рассматривать как одновременное окисление и конденсацию. Вряд ли мы ошибемся, если будем рассматривать известные окислительные ферменты как катализаторы, функция которых состоит в ускорении окислительных синтезов в живой клетке. Эти окислительные синтезы выражаются в образовании многочисленных красящих и ароматических веществ, смол и других не исследованных еще более детально соединений\*.

Наряду с этими окислительными ферментами, оказывающими специфическое действие, в животных и растительных организмах имеются собственно дыхательные ферменты, ускоряющие сгорание резервных веществ. Хотя эти ферменты до сих пор и не были изолированы, однако их существование, повидимому, можно считать не вызывающим сомнения на основании опубликованного недавно Палладиным<sup>4</sup> очень интересного экспериментального исследования. Здесь не место останавливаться подробнее на этой обширной работе, я позволю себе только привести из нее пример, хорошо иллюстрирующий постановку вопроса.

Этиолированные листья *Vicia Faba* обрабатывались последовательно током воздуха, пока не прекратилось выделение углекислоты, и затем перекисью водорода: образовавшаяся в обоих случаях углекислота определялась раздельно.

Получено на 100 г листьев: в токе воздуха 800 мг, с перекисью водорода — 1694 мг углекислоты.

Тот факт, что при действии перекиси водорода образовалось такое большое количество углекислоты, ясно доказывает, что и здесь оказывала действие специфическая пероксидаза, которая окисляла резервные вещества при помощи оксигеназы, а по использовании последней — при помощи прибавленной перекиси водорода. Что здесь действительно имеет место ферментативное окисление резервных веществ, вытекает далее из того, что этиолированные листья *Vicia Faba*, культивированные на сахарном растворе, при одинаковых условиях дали в токе воздуха 2743 мг, с перекисью водорода — 4932 мг углекислоты на 100 г листьев. Чем больше было количество резервных материалов в листьях, тем больше выделялось углекислоты при обработке объектов воздухом и перекисью водорода.

Рассматривая все данные, относящиеся к области биохимических окислительных процессов, мы приходим к выводу, что они лучше всего и проще всего объясняются на основе теории дыхания, основанной, с одной стороны, на современном учении о медленном окислении, с другой стороны, на современном учении о действии ферментов.

6 июня 1906 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Bertrand. Bull. Soc. chim., **16**, 793, 1218 (1896).
2. Бах совм. с Шода. Ber. Dtsch. chem. Ges., **36**, 606 (1903); настоящая книга, стр. 353.
3. Bertrand. Ann. Inst. Pasteur, **18**, 118 (1904).
4. Палладин. Действие дыхательных ферментов растений при различных условиях [Die Arbeit der Athmungsenzyme der Pflanzen unter verschiedenen Verhältnissen]. — Zs. physiol. Chem., **47**, 407, (1906).

\* Что тирозиназа принимает участие в образовании черного пигмента в животном организме, было уже отмечено Фюртом и Шнейдером [Beitr. z. Chem. u. Pathol., **1**, 229 (1901)] и Жессаром [Ann. Inst. Pasteur, **15**, 543 (1901)].

---

## ПЕРОКСИДАЗЫ КАК СПЕЦИФИЧЕСКИ ДЕЙСТВУЮЩИЕ ФЕРМЕНТЫ (II)

[*Peroxydasen als spezifisch wirkende Enzyme*] \*

(Ответ Р. Шода)

Сообщение<sup>1</sup>, напечатанное мною под этим заглавием, вызвало со стороны Р. Шода<sup>2</sup> некоторые замечания, на которые я считаю нужным ответить.

Приоритет Р. Шода обоснован в том отношении, что в докладе, который он сделал в прошлом году, действительно кратко упоминается наблюдение, что тирозин не окисляется обычной пероксидазой с перекисью водорода. Р. Шода прав и в том отношении, что он мне прислал отчет о своем докладе. К сожалению, я не обратил на него должного внимания, так как считал, что это один из хорошо известных мне докладов, которые Р. Шода делал при различных обстоятельствах о нашей совместной работе. Что в этом докладе содержится новое наблюдение, — я совершенно упустил из вида. В противном случае я бы, конечно, процитировал его, как я это делал в других случаях. Я тем более сожалею об этом упущении, что оно дало Р. Шода повод к персональным нападкам на меня.

В то время как Р. Шода, таким образом, принадлежит приоритет упомянутого наблюдения, его утверждение, будто бы я извлек из его доклада «идею специфического действия пероксидазы», а также соображения о составе тирозиназы, — совершенно ложно. Как видно из нижеследующего, ход рассуждений в моей работе вытекает исключительно из статей, напечатанных под моим именем и под именем Р. Шода в настоящем журнале.

1. Существование различных пероксидаз, оказывающих специфическое действие, было впервые замечено не Шода, а Асо<sup>3</sup>. Соответственное наблюдение Асо было упомянуто в нашем IV сообщении<sup>4</sup>, относящемся к пероксидазе. Кроме того, в IX сообщении<sup>5</sup> мы приводим специфическое действие пероксидазы как доказательство ее ферментативной природы. Р. Шода, следовательно, никоим образом не является автором открытия специфического действия пероксидаз.

2. Так же мало можно рассматривать Р. Шода как автора идеи, что тирозиназа состоит из пероксидазы и оксигеназы. Что оксидазы, а среди них естественно и тирозиназу, надо рассматривать как смеси веществ, активирующих перекиси, и веществ, образующих перекиси, было указано в нашем V сообщении.<sup>6</sup> Эта точка зрения была положена Бахом и Шода<sup>7</sup> в основу\*\* общей классификации окислительных ферментов.

\* Ver. Dtsch. chem. Ges., 39, 3329 (1906).

\*\* За разделение оксидаз на: 1) лакказы, 1) тирозиназы, 3) другие окислительные ферменты, а пероксидаз на: 1) супероксидазу, 2) специфически действующие пероксидазы, 3) пероксидазы, соответствующие тирозиназе, приведенное Р. Шода

З. Р. Шо́да не пытался изолировать из тирозиназы соответствующую пероксидазу. Но и в этом отношении он нашел бы, как и я, ценные указания в нашем совместном наблюдении<sup>8</sup>, что при обработке материалов, содержащих оксидазу, оксигеназа большей частью разрушается, в то время как пероксидаза остается практически без изменения.

Таким образом, в моей работе новым является не ход рассуждений, которые Р. Шо́да пытается приписать себе, а установленный экспериментально факт, что из тирозиназы можно приготовить пероксидазу, активирующую перекись водорода при окислении тирозина, чего не делает обычная пероксидаза.

В заключение я хочу сказать еще несколько слов по следующему вопросу. Р. Шо́да говорит в своей заметке о «перекисной теории Шо́да и Баха». Как это известно всем компетентным лицам, знакомым с этим вопросом, эта теория была высказана Энглером и мною одновременно и независимо друг от друга<sup>9</sup> и развита мною в полном объеме, совсеми ее биохимическими выводами, еще в 1897 г.<sup>10</sup> Областью биохимических окислительных процессов Р. Шо́да занялся только в 1902 г., по моему предложению и в качестве моего сотрудника. Его имя не имеет поэтому никакого отношения к перекисной теории.

От дальнейшей полемики с Р. Шо́да я отказываюсь.

1 октября 1906 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бах *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **39**, 2126 (1906); настоящая книга, стр. 404.
2. Chodat. *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **39**, 2507 (1906).
3. Aso. *Bull. Coll. Agric. Tokyo*, **5**, 2, 218 (1902).
4. Бах совм. с Шо́да. *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **36**, 605 (1903); настоящая книга, стр. 349.
5. Бах совм. с Шо́да. *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **37**, 2440 (1904); настоящая книга, стр. 370.
6. Бах совм. с Шо́да. *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **36**, 606 (1903).
7. Бах совм. с Шо́да. Современное состояние учения об окислительных ферментах растений [*Ueber den gegenwärtigen Stand der Lehre von den pflanzlichen Oxydationsfermenten*].— *Biochem. Cbl.*, **I**, 417 (1903); настоящая книга, стр. 17.
8. Бах совм. с Шо́да. *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **35**, 2468 (1902).
9. Engler u. Weissberg. *Kritische Studien über die Vorgänge der Autoxydation*, 29 (1904). Braunschweig.
10. Бах. *Mon. Sci.*, **11**, 479 (1897); *Cdlander. Ueber langsame Verbrennung*.— *Samml. chem. u. chem.-techn. Votr.*, **3**, 385 (1899).

---

в его заметке,— он один ответственен. Из этой классификации вытекает, что, согласно Шо́да, обыкновенная пероксидаза (которую следует называть супероксидазой) и пероксидаза, соответствующая тирозиназе, не принадлежат к числу специфически действующих пероксидаз. Таким образом, его «идея специфического действия пероксидаз» представляется чрезвычайно мало ясной.

---

## О ДЕЙСТВИИ ПОДА НА ПЕРОКСИДАЗУ

[*Über das Verhalten der Peroxydase gegen Jod*] \*

Пероксидаза, получаемая из хрена и других растительных материалов, активирует перекись водорода только по отношению к окислению иодистоводородной кислоты, ароматических аминов и фенолов. Эти три класса соединений имеют общим только присутствие подвижного водорода в молекуле, а в остальном они резко различны друг от друга. Согласно учению о специфичности ферментных действий, в этих окислительных процессах должны принимать участие по крайней мере три различные пероксидазы. Однако при исследовании многочисленных материалов, содержащих пероксидазу, я до сих пор ни в одном случае не наблюдал отсутствия какого-либо из указанных активационных процессов. Растительные объекты, которые активируют перекись водорода при окислении иодистоводородной кислоты, всегда активируют ее и по отношению к ароматическим аминам и фенолам.

Это наблюдение можно было бы объяснить тем, что гипотетические ферменты находятся в растениях одновременно, и при обработке соответственных материалов для выделения пероксидазы вместе осаждаются спиртом. Исходя из этих соображений, я пытался в последнее время произвести разделение специфических пероксидаз путем фракционированного осаждения спиртом и ацетоном. Опыты дали, однако, вполне отрицательный результат. Отдельные фракции вели себя при активировании перекиси водорода, как первоначальная пероксидаза. Отрицательные результаты этих опытов нельзя было, однако, еще рассматривать как доказательство идентичности пероксидаз, так как не была исключена возможность, что эти гипотетические пероксидазы ведут себя совершенно одинаково по отношению к спирту и ацетону.

К разделению предполагаемых составных частей пероксидазы можно было подойти еще и другим путем, а именно, химическим воздействием. Можно допустить, что специфические пероксидазы обладают неодинаковой чувствительностью по отношению к химическим воздействиям. В связи с более ранними опытами в первую очередь было исследовано действие пода на пероксидазу. И в этом случае предполагаемая цель не была достигнута. В связи с этим исследованием были, однако, сделаны некоторые интересные наблюдения, касающиеся поведения пероксидазы по отношению к иоду, которые я и сообщаю ниже.

Уже было отмечено в одном из предшествующих сообщений<sup>1</sup>, что пероксидаза, или, вернее, ее способность активировать перекись водорода при окислении иодистоводородной кислоты, сравнительно мало чувствительна по отношению к свободному иоду. Представляло, однако, интерес выяс-

---

\* Ber. Dtsch. chem. Ges., 40, 230 (1907).

нить влияние иода на активацию перекиси водорода пероксидазой при окислении фенолов, поскольку и этот окислительный процесс можно количественно изучать благодаря образованию пурпурогалина из пирогаллола. Задержка активации под влиянием иода в этом случае была бы верным доказательством того, что пероксидаза с ее известными свойствами является смесью различных специфических ферментов.

Опыты были поставлены сначала с водно-спиртным экстрактом из корней хрена, приготовленным описанным ранее способом<sup>2</sup>. Содержание осаждаемой спиртом пероксидазы в этом экстракте было определено следующим образом: к 100 см<sup>3</sup> экстракта прибавлялся 1 л абсолютного спирта; образующийся осадок количественно переводился на взвешенный фильтр, промывался абсолютным спиртом и высушивался при 30° в вакууме над хлористым кальцием. Получено: 0.520 г пероксидазы. Последняя растворялась количественно в 100 см<sup>3</sup> воды и 20 см<sup>3</sup> этого раствора (соответствующие равному объему исходного экстракта), смешивались с 1 г пирогаллола в 50 см<sup>3</sup> воды и 30 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора перекиси водорода: образующийся пурпурогалин переводился через 24 часа на взвешенный фильтр, промывался 200 см<sup>3</sup> воды и высушивался при 105° до постоянного веса. Получено: 0.230 г пурпурогалина. 20 см<sup>3</sup> исходного экстракта, обработанные тем же способом пирогаллолом и перекисью водорода, дали 0.227 г пурпурогалина. Из этого определения вытекает, что при применении достаточного количества спирта пероксидаза высаждается количественно, т. е. без потери активирующей способности.

Определение активирующей способности пероксидазы описанным ранее способом<sup>3</sup> показало, что 20 см<sup>3</sup> экстракта (= 0.104 г твердой пероксидазы) активируют 0.11 г перекиси водорода.

Исследование влияния иода на активирующую способность пероксидазы было поставлено следующим образом: 160 см<sup>3</sup> экстракта смешивались с 40 см<sup>3</sup> раствора иода; через определенные промежутки времени к порциям по 25 см<sup>3</sup> этой смеси прибавлялся пирогаллол (1 г в 45 см<sup>3</sup> воды) и перекись водорода (30 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора); образующийся пурпурогалин взвешивался. Для приготовления раствора иода навеска химически чистого иода растворялась в свежеперегнанном спирте. Были поставлены три серии опытов, с возрастающими количествами иода и одинаковыми количествами пероксидазы, причем для каждой серии ставились контрольные опыты с соответственным количеством иода в отсутствии пероксидазы и с 20 см<sup>3</sup> экстракта без прибавления иода. Предварительными опытами было установлено, что перекись водорода активируется при окислении пирогаллола свободным иодом так же, как пероксидазой, — в этом случае из пирогаллола образуется пурпурогалин, содержащий иод\*.

Результаты этих трех серий опытов сведены в таблице на стр. 411.

Применять большие количества иода нельзя было, так как его действие перекрыло бы действие пероксидазы. Из приведенных выше данных следует, что:

1. При применении 0.0075 г иода на 20 см<sup>3</sup> экстракта активирующая способность пероксидазы остается без изменения в течение первых часов, а затем начинает медленно возрастать. Избыток пурпурогалина составлял после 200 часов действия иода 0.069 г, т. е. 30.1% количества пурпурогалина, которое получалось в начале опыта.

\* Пурпурогалин характеризовался окрашиванием в синий цвет в присутствии щелочей, растворимостью в концентрированной серной кислоте с оранжево-красной окраской и образованием нафталина при перегонке с цинковой пылью. Остаток после перегонки содержал иод в виде подпорошкообразного осадка. Последний экстрагировался горячей водой; к отфильтрованной жидкости, подкисленной уксусной кислотой после охлаждения, прибавлялась перекись водорода в присутствии крахмального клейстера. Смесью немедленно окрашивалась в синий цвет.

I. 160 см<sup>3</sup> экстракта 0.050 г иода, 40 см<sup>3</sup> спирта, 25 см<sup>3</sup> смеси  
для каждого опыта

|                                       |                                                                                 |         |         |         |         |          |          |         |
|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|---------|---------|---------|---------|----------|----------|---------|
| Продолжительность действия иода . . . | Начало                                                                          | 2 часа  | 4 часа  | 30 час. | 76 час. | 120 час. | 200 час. |         |
| Пурпурогалин . . .                    | 0.229 г                                                                         | 0.228 г | 0.227 г | 0.252 г | 0.263 г | 0.287 г  | 0.298 г  |         |
| Контрольные опыты                     | 0.0075 г иода в отсутствии пероксидазы<br>20 см <sup>3</sup> экстракта без иода |         |         |         |         |          | 0.039 г  | 0.228 г |

II. 160 см<sup>3</sup> экстракта, 0.300 г иода, 40 см<sup>3</sup> спирта

|                                       |                                                                                 |         |         |         |          |          |         |
|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|---------|---------|---------|----------|----------|---------|
| Продолжительность действия иода . . . | Начало                                                                          | 3 часа  | 24 часа | 48 час. | 130 час. | 300 час. |         |
| Пурпурогалин . . .                    | 0.391 г                                                                         | 0.392 г | 0.398 г | 0.400 г | 0.408 г  | 0.424 г  |         |
| Контрольные опыты                     | 0.0375 г иода в отсутствии пероксидазы<br>20 см <sup>3</sup> экстракта без иода |         |         |         |          | 0.110 г  | 0.226 г |

III. 160 см<sup>3</sup> экстракта, 0.600 г иода, 40 см<sup>3</sup> спирта

|                                       |                                                                                |         |         |         |          |          |         |
|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|---------|---------|---------|----------|----------|---------|
| Продолжительность действия иода . . . | Начало                                                                         | 2 часа. | 18 час. | 40 час. | 120 час. | 200 час. |         |
| Пурпурогалин . . .                    | 0.429 г                                                                        | 0.426 г | 0.424 г | 0.420 г | 0.405 г  | 0.389 г  |         |
| Контрольные опыты                     | 0.075 г иода в отсутствии пероксидазы<br>20 см <sup>3</sup> экстракта без иода |         |         |         |          | 0.135 г  | 0.228 г |

2. При применении 0.0375 г иода на 20 см<sup>3</sup> экстракта имеет место с самого начала значительное увеличение выхода пурпурогалина. Количество образующегося пурпурогалина в этом случае больше, чем сумма полученных количеств в контрольных опытах с одним иодом и с одной пероксидазой. Разность составляет 0.053 г, т. е. 15.6%. При дальнейшем действии иода количество пурпурогалина продолжает медленно возрастать и достигает по истечении 300 часов 0.0424 г. Разность по окончании опыта равна 0.090 г, т. е. 26.5%.

3. При применении 0.075 г иода на 20 см<sup>3</sup> экстракта с самого начала получается то максимальное количество пурпурогалина, которое в предыдущем опыте достигалось лишь после 30-часового действия иода. Разность по сравнению с контрольными опытами: 0.066 г, т. е. 18.7%. При дальнейшем действии иода наблюдается медленное убывание активирующей способности пероксидазы.

Эти наблюдения проще всего объясняются, как мне кажется, если предположить, что применявшийся экстракт пероксидазы содержал наряду с готовой пероксидазой и зимоген последней. Под действием иода зимоген тем скорее превращался в активную пероксидазу, чем больше было количество присутствующего иода. Предположение, что для оксидазы и пероксидазы существуют определенные зимогены, было высказано Вудсом<sup>4</sup> на основании некоторых наблюдений о влиянии нагревания на сок растений табака.

В связи с результатами, полученными для экстрактов пероксидазы, представляло интерес выяснить влияние иода на осажденную пероксидазу.

Раствор, содержащий в 200 см<sup>3</sup> воды 1 г осажденной пероксидазы, приготовленной из молодых корней хрена, отфильтровывался. Определение активирующей способности (перекись водорода: пероксидаза) по методу окисления пирогаллола дало необычайно высокую величину (1.8). К 140 см<sup>3</sup> отфильтрованного раствора (=0.7 г пероксидазы) прибавлялось 0.53 г иода, 36 см<sup>3</sup> спирта (т. е. 0.075 г иода на 0.1 г пероксидазы); через определенные промежутки времени 25 см<sup>3</sup> этой смеси применялись описанным выше способом для активации перекиси водорода при окислении пирогаллола. Опыты дали следующие результаты:

| Продолжительность действия иода . . . | Начало                                 | 48 час. | 96 час. | 168 час. | 240 час. | 350 час. |
|---------------------------------------|----------------------------------------|---------|---------|----------|----------|----------|
| Пурпурогалин . . .                    | 0.376 г                                | 0.373 г | 0.377 г | 0.370 г  | 0.372 г  | 0.376 г  |
| Контрольные опыты . . . . .           | 0.0075 г иода в отсутствии пероксидазы |         |         |          |          | 0.040 г  |
|                                       | 0.1000 г пероксидазы без иода          |         |         |          |          | 0.379 г  |

В противоположность результатам, полученным с экстрактом пероксидазы, при действии 0.007 г иода на 0.1 г осажденной пероксидазы не наблюдается увеличения активирующей способности пероксидазы. Второй опыт был поставлен приблизительно в тех же условиях концентрации и активации, как опыт II (см. выше).

К 140 см<sup>3</sup> раствора, содержащего 0.66 г пероксидазы в 200 см<sup>3</sup> воды, прибавлялось 0.263 г иода в 35 см<sup>3</sup> спирта; смесь исследовалась описанным выше способом.

| Продолжительность действия иода . . . . . | Начало                                 | 48 час. | 96 час. | 140 час. | 216 час. |
|-------------------------------------------|----------------------------------------|---------|---------|----------|----------|
| Пурпурогалин . . . . .                    | 0.331 г                                | 0.337 г | 0.313 г | 0.293 г  | 0.285 г  |
| Контрольные опыты . . . . .               | 0.0375 г иода в отсутствии пероксидазы |         |         |          | 0.112 г  |
|                                           | 0.066 г пероксидазы без иода           |         |         |          | 0.225 г  |

Прибавление иода не вызвало здесь никакого увеличения активирующей способности пероксидазы, ибо сейчас же после смешивания реактивов образовывалось почти такое же количество пурпурогалина, как и при контрольных опытах, в которых иод и пероксидаза применялись отдельно. При дальнейшем действии иода активирующая способность пероксидазы медленно убывала.

Из приведенных выше опытов я делаю вывод, что применявшаяся мною твердая пероксидаза не содержала зимогена, в противоположность упомянутому выше экстракту пероксидазы.

Что же касается самого действия иода на пероксидазу, то обращает на себя внимание малая чувствительность пероксидазы по отношению к иоду, хотя в других случаях иод обычно действует довольно энергично. Пероксидаза быстро разлагается<sup>5</sup> только в случае одновременного действия перекиси водорода и иода, при эквивалентном количестве (по отношению к активированной перекиси) всех трех реагентов. Для полного разложения пероксидазы в данном случае нужно было бы применить 1.8 г перекиси водорода и около 13 г иода на 1 г пероксидазы.

С точки зрения физиологии, действие иода на экстракт пероксидазы (содержащий зимоген) представляет интерес, поскольку в щитовидной железе млекопитающих имеется соединение иода, играющее существенную роль в окислительных процессах, протекающих в организме, и оказывающее определенно ускоряющее действие на обмен веществ. Действует ли активное начало щитовидной железы на экстракты пероксидазы, содержащие зимоген, аналогично свободному иоду, будет выяснено дальнейшими опытами.

Я предполагаю испытать и другие химические вещества на их способность превращать зимоген пероксидазы в активный фермент.

29 декабря 1906 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., **37**, 3785 (1904); настоящая книга стр. 385.
2. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., **37**, 3787 (1904); настоящая книга, стр. 379.
3. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., **37**, 1342 (1904); настоящая книга стр. 379.
4. Woods. «Observations on the mosaic disease of tobacco». — U. S. Dept. Agric. Bull., No 18, стр. 17.
5. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., **37**, 2434. (1904) настоящая книга, стр. 370.



---

## О ДЕЙСТВИИ ГИДРОКСИЛАМИНА, ГИДРАЗИНА И СИНИЛЬНОЙ КИСЛОТЫ НА ПЕРОКСИДАЗУ

[*Ueber das Verhalten der Peroxydase gegen Hydroxylamin,  
Hydrazin und Blausäure*] \*

После того как было показано, что пероксидаза мало чувствительна по отношению к иоду<sup>1</sup>, было исследовано действие на нее некоторых других химических соединений, известных как яды для протоплазмы и ферментов. Ниже приведены результаты этих исследований.

### ПЕРОКСИДАЗА И СОЛЯНОКИСЛЫЙ ГИДРОКСИЛАМИН

Для того чтобы проследить количественно за действием гидроксиламина на пероксидазу, я применил неоднократно использованный мной в предыдущих работах метод, основанный на окислении пирогаллола в пурпурогаллин посредством системы «пероксидаза — перекись водорода».

Вследствие своей щелочности гидроксиламин не мог применяться в свободном состоянии, а только в виде соли. Опыты были поставлены с свежеприготовленным активным экстрактом пероксидазы из корней хрена и чистым солянокислым гидроксиламином. Определение активирующей способности экстракта по описанному выше методу окисления пирогаллола<sup>2</sup> показало, что 15 см<sup>3</sup> экстракта активируют 0.179 г перекиси водорода с образованием 0.359 г пурпурогаллина. К порциям по 75 см<sup>3</sup> этого экстракта, находящимся в хорошо закрывающихся склянках, прибавлялись возрастающие количества солянокислого гидроксиламина в 25 см<sup>3</sup> воды. Через определенные промежутки времени 20 см<sup>3</sup> смеси смешивались с 1 г пирогаллола в 50 см<sup>3</sup> воды и 30 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора перекиси водорода и оставлялись на 24 часа; образующийся пурпурогаллин взвешивался описанным ранее способом. Предварительные опыты показали, что пероксидаза сравнительно мало чувствительна и по отношению к гидроксиламину. Соответственно этому на каждые 75 см<sup>3</sup> экстракта применялось от 0.1 до 5.0 г солянокислого гидроксиламина. В нижеследующей таблице (стр. 414) сведены результаты этой серии опытов. Приведенные количества солянокислого гидроксиламина, выраженные в граммах, отнесены к безводной соли.

Прибавление возрастающих количеств солянокислого гидроксиламина вызвало, таким образом, возрастающее ослабление активности пероксидазы, причем реакция между пероксидазой и солянокислым гидроксиламином протекала с очень большой скоростью. Действительно, по истечении

\* Ber. Dtsch. chem. Ges., 40, 3185 (1907)

## Образовавшийся пурпурогалин (в г)

| № опыта                                    | I     | II    | III   | IV    | V     | VI    | VII   | VIII  |
|--------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Солянокислый гидроксиламин                 | 0.1   | 0.5   | 1.0   | 1.5   | 2.0   | 3.0   | 4.0   | 5.0   |
| Непосредственно после смешивания . . . . . | 0.255 | 0.217 | 0.174 | 0.142 | 0.107 | 0.047 | 0.013 | 0.017 |
| Через 24 часа . . . . .                    | 0.256 | 0.216 | 0.177 | 0.145 | 0.103 | 0.014 | 0.016 | 0.012 |
| » 48 час. . . . .                          | 0.250 | 0.219 | 0.175 | 0.141 | 0.099 | 0.012 | 0.015 | 0.014 |

В отсутствии солянокислого гидроксиламина: 0.359.

1—2-дневного действия солянокислого гидроксиламина ослабление активности пероксидазы было не больше, чем непосредственно после смешивания реактивов. Весьма поразительно, что при применении 4 и 5 г солянокислого гидроксиламина на 75 см<sup>3</sup> экстракта (опыты VII и VIII) действие пероксидазы, по видимому, еще не было прекращено. Раствор пирогаллола окрашивался и в этих случаях в темнокоричневый цвет и давал небольшие осадки.

Однако, когда я провел качественно со всеми смесями пероксидазы остальные реакции на пероксидазу, то я заметил с большим удивлением, что эти реакции получались только для смеси I—VI; для смеси VII и VIII они совершенно не получались, за исключением реакции с гидрохиноном и пирогаллолом. Пробы были поставлены с фенолом, резорцином, гидрохиноном, пирокатехином, гваяколом, гваяковой смолой, орто- и мета-фенилендиамином и иодистоводородной кислотой.

Что появлению цветных реакций в опытах VII и VIII препятствовало не присутствие слишком больших количеств гидроксиламина, было доказано тем, что при прибавлении активного раствора пероксидазы оставшиеся бесцветными реакционные смеси приобретали характерное для каждого случая окрашивание. По всей видимости, в этом случае было достигнуто разделение<sup>3</sup> специфических составных частей, содержащихся, согласно моему предположению, в обыкновенной пероксидазе, благодаря тому что все специфические ферменты, за исключением тех, которые активируют перекись водорода при окислении гидрохинона и пирогаллола, разрушаются солянокислым гидроксиламином. Более детальное исследование показало, однако, что здесь имеет место не разделение специфических пероксидаз, а своеобразная реакция между указанными фенолами и солянокислым гидроксиламином, в присутствии перекиси водорода. Действительно, при смешивании гидрохинона и пирогаллола с солянокислым гидроксиламином в присутствии перекиси водорода наблюдались в точности те же самые явления, как и в опытах VII и VIII.

В соответствии с этим полученные в последнем случае почти черные осадки совершенно не содержали пурпурогалина, в то время как осадок, полученный в опыте VI, совершенно ясно давал реакции на пурпурогалин. Если оставить гидрохинон и пирогаллол с солянокислым гидроксиламином в водном растворе на воздухе, то эти смеси окрашиваются не более, чем растворы соответственных фенолов. По видимому, гидрохинон и пирогаллол реагируют с солянокислым гидроксиламином, образуя соединения, которые окисляются перекисью водорода гораздо энергичнее, чем сами фенолы. При тех же условиях другие фенолы не реагируют с солянокислым гидроксиламином и перекисью водорода.

Из приведенных выше опытов, таким образом, вытекает, что при применении более чем 3 г солянокислого гидроксиламина на 75 см<sup>3</sup> экстракта

пероксидазы активность фермента совершенно исчезает. Количество гидроксиламина, необходимое для полного разрушения пероксидазы, было точнее определено следующим образом.

В 10 пробирок, содержащих по  $1 \text{ см}^3$  экстракта пероксидазы, прибавлялось последовательно  $0.040$ — $0.050$  г солянокислого гидроксиламина в  $5 \text{ см}^3$  воды,  $1 \text{ см}^3$  насыщенного раствора гваякола и  $0.5 \text{ см}^3$  1%-ного раствора перекиси водорода. Коричневое окрашивание реактива было еще отчетливо заметно при  $0.048$  г хлоргидрата гидроксиламина, но уже не получалось при  $0.049$  г. Среднее из этих чисел —  $0.0485$  г — соответствует тому количеству соли, которое необходимо для полного уничтожения пероксидазы, содержащейся в  $1 \text{ см}^3$  экстракта.

Тот факт, что активность пероксидазы уничтожается только сравнительно большими количествами солянокислого гидроксиламина, позволяет предположить, что здесь имеет место не «отравление», а стехиометрическая реакция между пероксидазой и гидроксиламином. Уже неоднократно указывалось<sup>4</sup>, что пероксидаза и перекись водорода всегда реагируют между собой в постоянных отношениях, и что количество перекиси водорода, которое может быть активировано данным количеством пероксидазы, можно довольно точно определить. Так как в данном случае известно как количество гидроксиламина, необходимое для полного прекращения действия пероксидазы, так и количество активированной перекиси водорода, то из отношения «солянокислый гидроксиламин:перекись водорода» можно сделать заключение об отношении «солянокислый гидроксиламин:пероксидаза».

Расчет показывает, что на 1 молекулу перекиси водорода приходится почти точно 2 молекулы гидроксиламина:  $15 \text{ см}^3$  экстракта пероксидазы активировали  $0.179 \text{ г} = 0.00526$  молекулы перекиси водорода. Для уничтожения пероксидазы в  $15 \text{ см}^3$  экстракта потребовалось  $0.0485 \times 15 = 0.7215 = 0.01046$  молекулы гидроксиламина. Получается отношение: гидроксиламин:перекись водорода =  $1.984 : 1$ .

Принимая, что перекись водорода и пероксидаза реагируют между собой в отношении молекула на молекулу, пероксидаза, теряя свою активность, по видимому, реагирует с 2 молекулами гидроксиламина. Если в смеси имеется менее 2 молекул солянокислого гидроксиламина, то часть пероксидазы сохраняет свою активность.

Здесь можно указать уже заранее, что вполне аналогичное отношение было найдено для действия цианистого калия на пероксидазу; однако для сульфата гидразина было найдено значительно отличающееся отношение.

### ПЕРОКСИДАЗА И СУЛЬФАТ ГИДРАЗИНА

Опыты были поставлены аналогично описанным выше. Применялся экстракт из корней хрена,  $15 \text{ см}^3$  которого активировали  $0.151$  г перекиси водорода с образованием  $0.312$  г пурпурагаллина. Приведенные в таблице (на стр. 416) количества сульфата гидразина относятся к чистой безводной соли.

В основном опыты с сульфатом гидразина протекали, таким образом, аналогично опытам с гидроксиламином, но в этом случае наблюдалось более медленное взаимодействие между сульфатом гидразина и пероксидазой, и количество соли, необходимое для прекращения действия пероксидазы, было значительно меньше. Смесь IV давала еще в начале опыта все реакции на пероксидазу, смесь V не давала больше никаких реакций, за исключением реакции с гидрохиноном и пирогаллолом. Осадки V, VI и VII не содержали пурпурагаллина. Фенолы ведут себя по отношению

## Образовавшийся пурпурогалин (в г)

| № опыта                                    | I     | II    | III   | IV    | V     | VI    | VII   |
|--------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Сульфат гидразина                          | 0.10  | 0.25  | 0.50  | 0.75  | 1.0   | 1.5   | 2.0   |
| Непосредственно после смешивания . . . . . | 0.313 | 0.277 | 0.177 | 0.040 | 0.017 | 0.016 | 0.017 |
| Через 24 часа . . . . .                    | 0.311 | 0.279 | 0.175 | 0.032 | 0.016 | 0.019 | 0.015 |
| » 48 час. . . . .                          | 0.309 | 0.270 | 0.160 | 0.014 | 0.019 | 0.014 | 0.014 |

к сульфату гидразина и перекиси водорода так же, как и по отношению к солянокислому гидроксилламину, только гидрохинон и пирогаллол быстро реагируют с ними, окрашиваясь в коричневый цвет и образуя незначительные черные осадки.

Произведенное описанным выше способом более точное определение количества сульфата гидразина, необходимого для полного прекращения действия пероксидазы, показало, что пероксидаза, содержащаяся в 1 см<sup>3</sup> экстракта, разрушается 0.0103 г = 0.000079 грамм-молекулы сульфата гидразина. Так как 1 см<sup>3</sup> экстракта активировует 0.01066 г = 0.00031 грамм-молекулы перекиси водорода, то получается отношение:

$$\text{Сульфат гидразина:перекись водорода} = 0.254 : 1.$$

С другим экстрактом пероксидазы, сохранившимся 18 месяцев, 15 см<sup>3</sup> которого активировали 0.128 г перекиси водорода, получилось отношение:

$$\text{Сульфат гидразина:перекись водорода} = 0.251 : 1.$$

Таким образом, в то время как для полного прекращения действия пероксидазы необходимо 2 молекулы солянокислого гидроксилламина, — по отношению к активированной перекиси водорода — пероксидаза разрушается уже  $\frac{1}{4}$  молекулы сульфата гидразина. Причина этой разницы мне неясна. Возможно, что здесь играет некоторую роль природа кислоты, связанной с основанием. Раствор пероксидазы, к которому прибавлен солянокислый гидроксилламин и сульфат гидразина, имеет сильно кислую реакцию, поскольку указанные соли сильно диссоциированы гидролитически уже в водном растворе.

## ПЕРОКСИДАЗА И ЦИАНИСТЫЙ КАЛИЙ

Для этих опытов применялся тот же самый экстракт, как и в опытах с сульфатом гидразина (см. верхн. табл. стр. 417). Условия опыта, как указано выше.

Из этих опытов вытекает, что немедленно после смешивания реактивов падение активности пероксидазы тем больше, чем больше концентрация цианистого калия, вплоть до полного исчезновения активности. Дальнейшее действие цианистого калия протекает, однако, в двух различных направлениях. В то время как при низких концентрациях (0.05—0.10 г цианистого калия в 100 см<sup>3</sup> смеси серии I и II) активность пероксидазы медленно продолжает падать, при высоких концентрациях (IV—VIII) происходит более или менее быстрое и полное «выздоровление фермента» Оптимум для выздоровления, повидимому, находится при концентрации VI. При более высоких концентрациях восстановление протекает значительно медленнее. В серии III (0.2 г цианистого калия) наблюдается равно-

## Образовавшийся пурпурогалин (в г)

| № опыта                                    | I     | II    | III   | IV    | V     | VI    | VII   | VIII  |
|--------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Цианистый калий                            | 0.05  | 0.10  | 0.20  | 0.40  | 0.60  | 1.0   | 2.0   | 3.0   |
| Непосредственно после смешивания . . . . . | 0.251 | 0.232 | 0.210 | 0.166 | 0.149 | 0.110 | 0.039 | 0.0   |
| Через 24 часа . . . . .                    | 0.189 | 0.215 | 0.214 | 0.262 | 0.311 | 0.312 | 0.170 | 0.049 |
| » 48 час. . . . .                          | 0.169 | 0.198 | 0.209 | 0.270 | 0.312 | 0.316 | 0.198 | 0.057 |
| » 72 » . . . . .                           | 0.155 | 0.188 | 0.212 | 0.282 | 0.310 | 0.312 | 0.216 | 0.066 |
| » 98 » . . . . .                           | 0.157 | 0.199 | 0.210 | 0.293 | 0.314 | 0.313 | 0.236 | 0.075 |

В отсутствии цианистого калия: 0.312.

весие между ослаблением и возрождением фермента, ибо в этом случае активность пероксидазы остается без изменения в продолжение всего опыта в пределах точности определения. Следует еще отметить, что при смешивании пирогаллола, цианистого калия и перекиси водорода смесь медленно окрашивается в темнокоричневый цвет, но не дает ни следа пурпурогалина.

Ввиду того что в описанных явлениях могла играть роль щелочность цианистого калия, опыты были повторены с теми же растворами пероксидазы и цианистого калия, но с той разницей, что перед смешиванием реактивов синильная кислота выделялась из цианистого калия стехиометрическим количеством уксусной кислоты.

## Образовавшийся пурпурогалин (в г)

| № опыта                                    | II    | III   | IV    | V     | VI    | VII   |
|--------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Цианистый калий — уксусная кислота         | 0.10  | 0.20  | 0.40  | 0.60  | 1.0   | 2.0   |
| Непосредственно после смешивания . . . . . | 0.175 | 0.166 | 0.150 | 0.132 | 0.104 | 0.040 |
| Через 24 часа . . . . .                    | 0.206 | 0.188 | 0.169 | 0.149 | 0.120 | 0.066 |
| » 48 час. . . . .                          | 0.222 | 0.206 | 0.178 | 0.168 | 0.148 | 0.087 |
| » 96 » . . . . .                           | 0.249 | 0.238 | 0.227 | 0.214 | 0.206 | 0.104 |

В отсутствии синильной кислоты: 0.312.

При действии возрастающих количеств свободной синильной кислоты на пероксидазу происходит, таким образом, равномерное ослабление с одновременным возрождением ослабленного фермента. Если сравнить цифры, приведенные в предыдущей таблице, с данными, полученными при действии цианистого калия на пероксидазу, то мы приходим к выводу, что при реакции между пероксидазой и синильной кислотой щелочный металл оказывает защитное действие на фермент, задерживая при низких концентрациях его ослабление, а при высоких концентрациях — ускоряя его возрождение. Для выяснения причин этого явления надо исследовать действие щелочей на пероксидазу.

Пользуясь более точным определением количества цианистого калия, необходимого для полного прекращения действия применявшейся пероксидазы, было вычислено отношение:

Цианистый калий: перекись водорода = 1.957 : 1.

Основные результаты настоящего исследования можно резюмировать следующим образом:

I. Количества солянокислого гидроксилamina, сульфата гидразина и цианистого калия, необходимые для полного прекращения действия пероксидазы, настолько велики, что здесь несомненно имеет место не «отравление», а стехиометрическая реакция между пероксидазой и указанными соединениями.

II. Если сравнить эти количества с количеством перекиси водорода, которое может быть активировано данной пероксидазой, то оказывается, что количество пероксидазы, необходимое для активирования 1 молекулы перекиси водорода, полностью уничтожается 2 молекулами солянокислого гидроксилamina и цианистого калия и  $\frac{1}{4}$  молекулы сульфата гидразина. Для более точного суждения об этих отношениях необходимо поставить дальнейшие опыты с целью выяснения действия кислот и щелочей на пероксидазу.

19 июня 1907 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., **40**, 230 (1907); настоящая книга, стр. 409.
2. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., **37**, 3787 (1904); настоящая книга, стр. 379.
3. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., **40**, 230 (1907); настоящая книга, стр. 409.
4. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., **37**, 1346, 3785 (1904), **38**, 1878 (1905); настоящая книга, стр. 367, 368, 378, 391.

---

## К ВОПРОСУ О ПЕРОКСИДАЗЕ, СОДЕРЖАЩЕЙСЯ В ТИРОЗИНАЗЕ

[Zur Kenntnis der in Tyrosinase tätigen Peroxydase] \*

Несколько времени тому назад я сообщил результаты опытов<sup>1</sup>, поставленных с целью выделения из тирозиназы предполагаемой в ней специфической пероксидазы. Путем обработки молодых картофельных клубней с целью выделения тирозиназы был получен препарат, который сам по себе медленно окисляет тирозин, но вызывал в присутствии перекиси водорода уже через несколько часов характерное образование меланина. Из этих опытов был сделан вывод, что тирозиназа состоит, как и обычные оксидазы, из оксигеназы, т. е. вещества, образующего при поглощении кислорода перекиси, которое можно заменить перекисью водорода, и пероксидазы, которая активизирует перекиси или прибавленную перекись водорода.

Шода<sup>2</sup> повторил мои опыты, но не мог их подтвердить. Он даже нашел, что перекись водорода не ускоряет, а задерживает действие тирозиназы. Этот факт объясняется просто тем, что Шода применял для своих опытов слишком концентрированные растворы перекиси водорода. В упомянутом выше сообщении<sup>3</sup> мною определенно указано, что тирозиназа, или содержащаяся в ней активная пероксидаза, очень чувствительна к перекиси водорода и что поэтому опыты можно производить только с очень разбавленными растворами перекиси водорода.

Интенсивное ускорение действия тирозиназы путем прибавления перекиси водорода было недавно с полной ясностью доказано обширной работой Фюрта и Иерузалема<sup>4</sup> о ферментативном образовании меланина. Эти авторы установили границу, выше которой тирозиназа теряет свою активность под действием перекиси водорода, и провели все свои опыты с тирозиназой в присутствии перекиси водорода, изучая исключительно действие пероксидазы, содержащейся в этом ферменте.

На основании этих данных можно считать довольно вероятным существование пероксидазы в тирозиназе. Однако нет еще прямого доказательства правильности этого предположения. Поэтому я пытался выяснить путем новых опытов условия, в которых можно осуществить разделение тирозиназы на ее составные части.

В качестве исходного материала я пользовался грибами *Russula delica*, имевшимися у меня в количестве 2.5 кг. Грибы перерабатывались тремя отдельными порциями: 1) молодые, совершенно целые грибы, 2) более или менее поврежденные грибы, 3) грибы, уже начавшие гнить. После измельчения в мясорубке грибы были отжаты; полученный слизистый сок, насыщенный толуолом, сохранялся в хорошо закрывающихся склянках,

\* Ber. Dtsch. chem. Ges., 41, 216 (1908).

наполненных до горла. Для того чтобы исследовать количественно действие тирозиназы, я исходил из сделанного мною уже ранее наблюдения, что черный продукт окисления, образующийся при действии растительной тирозиназы на тирозин, легко обесцвечивается разбавленным раствором перманганата в присутствии серной кислоты. Оказалось, что эта реакция может быть положена в основу точного и простого метода определения относительных количеств меланина. Достаточно титровать черную реакционную смесь 0.002 *N* раствором перманганата в присутствии серной кислоты до обесцвечивания, для того чтобы получить хорошо воспроизводимые результаты. При помощи этого метода была исследована в первую очередь способность свежеежатых соков грибов окислять тирозин.

К 10 см<sup>3</sup> сока, разбавленного в 10 раз дистиллированной водой, прибавлялись 10 см<sup>3</sup> раствора тирозина (содержащего 0.05% тирозина и 0.04% углекислого натрия) и 30 см<sup>3</sup> воды; по истечении 24 часов пробы подкислялись 1 см<sup>3</sup> 10%-ной серной кислоты и титровались до обесцвечивания 0.002 *N* раствором перманганата. За вычетом того количества перманганата, которое потреблялось на обесцвечивание исходного раствора фермента, окрашенного в коричневатый цвет, были получены следующие результаты.

|                                                                | Сок I                     | Сок II           | Сок III         |
|----------------------------------------------------------------|---------------------------|------------------|-----------------|
| Внешний вид смеси через 24 часа . . . . .                      | Черный<br>(черный осадок) | Черно-фиолетовый | Темнокоричневый |
| Количество потребленного перманганата (в см <sup>3</sup> ) . . | 37.8                      | 13.6             | 8.3             |

Для того чтобы выяснить далее действие перекиси водорода на соки, я повторил опыт, прибавляя по 1 см<sup>3</sup> 0.05%-ного раствора перекиси водорода к каждой смеси. Несмотря на то, что соки содержали каталазу, прибавление перекиси водорода вызвало в пробах II и III заметное ускорение образования меланина. По истечении 24 часов эти смеси также были совершенно черными. После разложения оставшейся неиспользованной перекиси водорода путем прибавления 1 см<sup>3</sup> раствора каталазы (это количество достаточно для разложения 10 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора перекиси водорода в течение 1 минуты) реакционные смеси подкислялись и титровались.

Количество потребленного перманганата (в см<sup>3</sup>)

|       |        |         |
|-------|--------|---------|
| Сок I | Сок II | Сок III |
| 37.3  | 26.7   | 23.2    |

Таким образом, прибавление перекиси водорода не влияет на сок I, удваивает действие сока II и почти утраивает действие сока III. Следовательно, перекись водорода тем энергичнее ускоряет деятельность тирозиназы, чем слабее исходный раствор фермента. Проще всего объяснить это предположением, что ослабление тирозиназы определяется частичным разложением ее оксигеназы, которая может быть заменена перекисью водорода.

По истечении нескольких дней сок III совершенно загнил и разложился. Сок II, имевшийся в количестве всего 100 см<sup>3</sup>, был оставлен, а сок I (470 см<sup>3</sup>) перерабатывался дальше. Слизистая коричневая жидкость имела кислую реакцию и не фильтровалась. Для того чтобы нейтрализовать кислоту и одновременно коагулировать слизь, я взболтал жидкость с 10 г углекислого магния и отфильтровал ее. Из прозрачной светлокоричневой



жидкости выпал по истечении некоторого времени на стенках склянки небольшой кристаллический осадок. Жидкость была возможно полнее удалена, а осадок счищен и обработан 30 см<sup>3</sup> воды. Он показался очень мало растворимым в воде. 10 см<sup>3</sup> слитой воды были смешаны с равным объемом раствора тирозина. По истечении 24 часов смесь была еще совершенно бесцветной. Однако, когда я прибавил к ней 0.5 см<sup>3</sup> 0.05%-ного раствора перекиси водорода, произошло довольно быстрое окисление тирозина. По истечении 10 часов смесь была черного цвета. Опыт был повторен с остатком водной вытяжки и дал тот же результат. В присутствии перекиси водорода реакционная смесь окрасилась в черный цвет через сравнительно короткий промежуток времени, в то время как в отсутствие перекиси водорода она начала окрашиваться лишь на 3-й день. Повидимому, при обработке сока грибов углекислым магнием образуется труднорастворимое соединение, содержащее значительно больше пероксидазы, чем оксигеназы из исходной тирозиназы. Соответственно этому, в коагуляте, содержащем отфильтрованный углекислый магний, должно быть больше пероксидазы, чем оксигеназы. Это предположение оказалось правильным.

Прозрачный сок еще раз взбалтывался с 10 г углекислого магния; смесь фильтровалась с помощью водоструйного насоса, для того чтобы возможно лучше отделить коагулят от оставшегося в нем сока. Воздушно-сухой осадок растирался с 100 см<sup>3</sup> воды и прозрачная почти бесцветная вытяжка исследовалась на присутствие пероксидазы.

*А.* 20 см<sup>3</sup> экстракта, 10 см<sup>3</sup> раствора тирозина, 29 см<sup>3</sup> воды, 1 см<sup>3</sup> раствор перекиси водорода.

*В.* 20 см<sup>3</sup> экстракта, 10 см<sup>3</sup> раствора тирозина, 30 см<sup>3</sup> воды без перекиси водорода.

По истечении 30 минут в пробе *А* появилось заметное коричневое окрашивание, которое быстро усиливалось. Через 10 часов реакционная смесь была совершенно черной. После прибавления 1 см<sup>3</sup> раствора каталазы смесь подкислялась и титровалась 0.002 *N* раствором перманганата. Потреблено: 18.4 см<sup>3</sup> раствора перманганата. Проба *В* начала медленно окрашиваться на 3-й день и была черной на 7-й день. На титрование пошло 20.4 см<sup>3</sup> раствора перманганата.

Из сказанного выше вытекает, что взбалтывание сока из грибов с углекислым магнием позволяет разделить содержащиеся в тирозиназе пероксидазу и оксигеназу, благодаря тому, что углекислый магний связывает значительно больше пероксидазы, чем оксигеназы.

Частичное разделение составных частей тирозиназы может быть далее достигнуто при помощи метилового спирта.

100 см<sup>3</sup> сока из грибов смешивались с 500 см<sup>3</sup> крепкого метилового спирта; образовавшийся осадок быстро фильтровался, промывался метиловым спиртом и освобождался от избытка спирта сушкой в вакууме над хлористым кальцием. Сухой осадок растирался с 100 см<sup>3</sup> воды; в раствор переходило незначительное количество вещества и отфильтрованная жидкость смешивалась описанным выше способом с раствором тирозина, в присутствии и в отсутствие перекиси водорода. В то время как в пробе, содержащей перекись водорода, характерное черное окрашивание появилось через 12 часов, проба, не содержащая перекиси водорода, оставалась без изменения в течение почти двух дней. Потребление перманганата для обесцвечивания первой пробы через 12 часов: 17.6 см<sup>3</sup>.

Помимо этих методов, позволяющих более или менее полно разделить составные части тирозиназы, следует упомянуть здесь еще о наступающем самопроизвольно при некоторых обстоятельствах, но еще не исследованном ближе разложении оксигеназы, содержащейся в тирозиназе. Сок III (см. выше) исследовался, по истечении 6-недельного хранения в присутст-

вии толуола, на активность тирозиназы. При этом оказалось, что сок почти полностью потерял свою способность окислять сам по себе тирозин. Жидкость, смешанная с раствором тирозина, начинала медленно окрашиваться только по истечении 24 часов, в то время как проба, к которой была прибавлена перекись водорода, стала через 24 часа совершенно черной; для ее обесцвечивания потребовалось 23 см<sup>3</sup> раствора перманганата. Расход перманганата через 24 часа при обесцвечивании только что приготовленного сока составлял: в присутствии перекиси водорода 27.6 см<sup>3</sup>, в отсутствии перекиси водорода — 13.6 см<sup>3</sup>. Таким образом, пероксидаза, содержащаяся в тирозиназе, почти не изменилась при хранении, в то время как соответствующая оксигеназа почти полностью исчезла. Результаты всех приведенных опытов можно резюмировать следующим образом.

При подходящем разбавлении перекись водорода не оказывает никакого влияния на действие свежей нормальной тирозиназы. При определенных изменениях тирозиназы, которые могут быть вызваны искусственно или происходят самопроизвольно, ее действие на окисление тирозина чрезвычайно ускоряется прибавлением разбавленной перекиси водорода. В нормальной тирозиназе образующиеся из оксигеназы перекиси имеются, повидимому, в достаточном количестве для полного использования соответственной пероксидазы. При изменениях тирозиназы оксигеназа, которую а priori можно рассматривать как очень неустойчивое вещество, разрушается в первую очередь и может быть заменена соответствующим количеством перекиси водорода для окисления тирозина. Это объяснение находится в полном соответствии со всеми полученными за последнее время данными, относящимися к области окислительных ферментов.

9 января 1908 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., **39**, 2126 (1906); настоящая книга, стр. 404.
2. Chodat. Arch. Sci. phys. nat., **34**, 173 (1907).
3. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., **39**, 2128 (1906); настоящая книга, стр. 405.
4. Fürth u. Jerusalem. Beitr. Chem. Physiol. u. Pathol., **10**, 46, 131 (1907).

## О МЕХАНИЗМЕ ДЕЙСТВИЯ ТИРОЗИНАЗЫ

[*Ueber die Wirkungsweise der Tyrosinase*] \*

В связи с подробным исследованием меланиновых пигментов и ферментативного образования меланина, Фюрт и Иерузалем<sup>1</sup> пытались выяснить также и механизм действия тирозиназы. Для того чтобы следить количественно за действием фермента, авторы применяли два метода:

1) Метод седиментации, при котором количество образовавшегося меланина оценивалось по объему выпавшего осадка пигмента, и 2) спектрофотометрический метод, при котором относительные количества пигмента определялись путем измерения коэффициента экстинкции соответственных реакционных жидкостей. Первый метод позволяет лишь определить, с довольно грубым приближением, конечное состояние ферментативной реакции; при помощи второго метода можно, наоборот, исследовать с достаточной точностью только начальные фазы реакции, при которых жидкость остается однородной. Применяя эти методы, Фюрт и Иерузалем получили для тирозиназы из грибов довольно противоречивые, трудно объяснимые результаты, из которых они сделали вывод, что условия действия тирозиназы значительно более сложны, чем условия действия других ферментов.

Как было указано в предшествующем сообщении, можно очень легко следить количественно за действием тирозиназы путем титрования разбавленным раствором перманганата калия в присутствии серной кислоты.

Так как я имел в своем распоряжении очень хороший материал, содержащий тирозиназу, то я попытался применить указанный метод для выяснения условий действия тирозиназы.

В первую очередь была исследована зависимость образования меланина от концентрации тирозиназы.

300 см<sup>3</sup> прозрачного, отфильтрованного сока (см. предшествующее сообщение), полученного из свежих молодых грибов *Russula delica*, смешивались с 1.5 л 96%-ного спирта; образующийся осадок фильтровался на водоструйном насосе, промывался спиртом и высушивался в вакууме над хлористым кальцием. Сухой осадок растирался с 30 см<sup>3</sup> воды, при этом лишь незначительная часть препарата переходила в раствор. Отфильтрованный, почти совершенно бесцветный раствор применялся для описанных ниже опытов.

В 8 стаканчиков наливалось по 10 см<sup>3</sup> раствора тирозина (содержащего 0.05% тирозина и 0.04% углекислого натрия) и возрастающие количества фермента; объем доводился водой до 50 см<sup>3</sup>. Стаканчики содержали соответственно 0.5, 1, 1.5, 2.5, 10, 15 и 20 см<sup>3</sup> раствора фермента. Смеси остав-

\* Ber. Dtsch. chem. Ges., 41, 221 (1908).

лялись на 24 часа при комнатной температуре, затем подкислялись 1 см<sup>3</sup> 10%-ной серной кислоты и титровались 0.002 N раствором перманганата до обесцвечивания. Одновременно с первой серией была приготовлена вторая серия, совершенно в тех же условиях, но в этом случае титрование

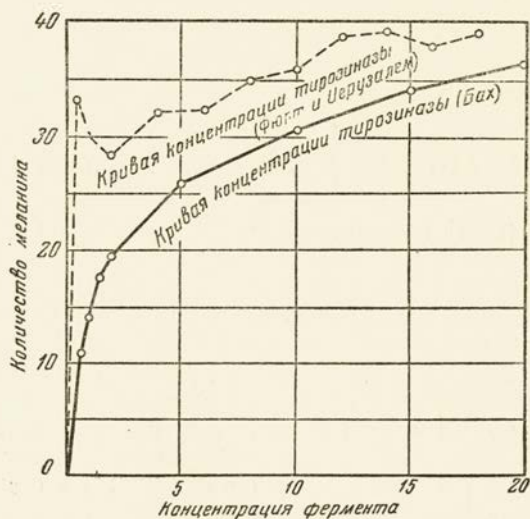


Рис. 1

производилось через 48 часов. Полученные результаты приведены в следующей таблице:

Количество потребленного перманганата (в см<sup>3</sup>)

| № опыта                   | I    | II   |      | IV   | V    | VI   | VII  | VIII |
|---------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Концентрация фермента . . | 0.5  | 1.0  | 1.5  | 2.0  | 5.0  | 10.0 | 15.0 | 20.0 |
| Через 24 часа . . . . .   | 10.8 | 14.2 | 17.3 | 19.8 | 25.8 | 30.4 | 33.6 | 35.8 |
| » 48 час. . . . .         | 13.2 | 16.0 | 17.8 | 20.4 | 25.6 | 31.2 | 34.4 | 35.4 |

Из этих опытов вытекает: 1) что количество продукта реакции возрастает с количеством фермента, однако медленнее, чем последнее, и 2) что реакция тем скорее заканчивается, чем больше концентрация фермента. В этом отношении действие тирозиназы совершенно такое же, как исследованное мною ранее<sup>2</sup> действие пероксидазы из хрена. Если нанести концентрации фермента на ось абсцисс, а количество перманганата — на ось ординат, то получается приведенная на рис. 1 кривая. Для сравнения приведена также и кривая концентрации тирозиназы (после 24-часового действия), полученная Фюртом и Иерусалемом.

Для того чтобы подробнее исследовать механизм действия тирозиназы, выяснялась затем зависимость скорости реакции тирозиназы: 1) от концентрации фермента, 2) от концентрации субстрата.

В три широкогорлые эрленмейеровские колбы на 750 см<sup>3</sup>, содержащие по 100 см<sup>3</sup> раствора тирозина, добавлялись возрастающие количества фермента и вода (до 500 см<sup>3</sup>). Колба I содержала 10 см<sup>3</sup> раствора фермента,

колба II — 20 см<sup>3</sup> и колба III — 30 см<sup>3</sup>. Смеси оставались при комнатной температуре; через определенные промежутки времени от каждой смеси отбиралась проба в 50 см<sup>3</sup>, подкислялась приведенным выше способом и титровалась. Полученные результаты приведены в следующей таблице:

Количество потребленного перманганата (в см<sup>3</sup>)

| № опыта               | I    | II   | III  |
|-----------------------|------|------|------|
| Через 1 час . . . . . | 0.0  | 1.4  | 2.8  |
| » 2 часа . . . . .    | 0.0  | 3.9  | 5.7  |
| » 3 » . . . . .       | 1.6  | 5.8  | 8.8  |
| » 4 » . . . . .       | 2.7  | 7.8  | 11.1 |
| » 6 час. . . . .      | 5.5  | 11.1 | 16.1 |
| » 9 » . . . . .       | 9.4  | 16.3 | 20.8 |
| » 14 » . . . . .      | 15.9 | 19.0 | 22.3 |
| » 24 » . . . . .      | 16.0 | 19.9 | 22.8 |

Для наглядности эти данные представлены в виде кривых на рис. 2. Если сравнить количества перманганата, потребленные через равные промежутки времени, то не наблюдается определенной пропорциональности между действием и количеством фермента.

В начальных стадиях реакции действие возрастает скорее, чем концентрация фермента, по истечении 6 часов оно в точности прямо пропорционально последней, при более продолжительной реакции действие возрастает медленнее, чем концентрация фермента. Однако если сравнивать не равные продолжительности реакции, а равные превращения, то в этом случае с полной ясностью выявляется обратная пропорциональность между количеством фермента и продолжительностью реакции: произведение количества фермента на продолжительность реакции представляет в данном случае постоянную величину.

Так, например, при концентрации фермента III количество потребленного перманганата составляет 5.7 см<sup>3</sup> через 2 часа, при концентрации фермента II оно составляет 5.8 см<sup>3</sup> через 3 часа и при концентрации фермента I — 5.4 см<sup>3</sup> через 6 часов:

$$III \cdot 2 = II \cdot 3 = I \cdot 6.$$

Та же самая закономерность имеет место при III · 3 и I · 9, при III · 4 и II · 6, при III · 6 и II · 9. Однако она не наблюдается в начальных и конечных стадиях реакции. Так, например, при II · 1 и I · 3, при III · 1 и I · 4, при II · 9 и I · 14 равным превращениям соответствуют неодинаковые произведения количества фермента на продолжительность реакции. Это объясняется тем, что при низких концентрациях ферментов реакция наступает медленнее, чем при больших концентрациях, но, с другой стороны, при последних фермент скорее прекращает свое действие, чем при первых (см. приведенные кривые скоростей). Соответственно этому можно сравнивать между собою только средние стадии реакции, в которых дей-

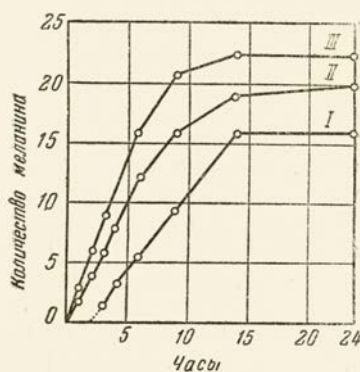


Рис. 2

ствие фермента полное и нормальное. В этих стадиях закон действующих масс несомненно имеет место.

Представляло еще интерес выяснить зависимость скорости реакции тирозиназы от концентрации субстрата. Три колбы (I, II и III), содержащие по 30 см<sup>3</sup> раствора фермента и возрастающие количества раствора тирозина, были доведены водой до 500 см<sup>3</sup>. Колба I содержала 25 см<sup>3</sup>, колба II — 50 см<sup>3</sup> и колба III — 75 см<sup>3</sup> раствора тирозина. Титрование происходило, как указано выше.

*Количество потребленного перманганата (в см<sup>3</sup>)*

| № опыта               | I   | II   | III  |
|-----------------------|-----|------|------|
| Через 1 час . . . . . | 1.0 | 1.9  | 3.0  |
| » 2 часа . . . . .    | 2.1 | 4.2  | 6.0  |
| » 3 » . . . . .       | 3.1 | 6.3  | 9.2  |
| » 4 » . . . . .       | 4.1 | 8.4  | 11.7 |
| » 5 час. . . . .      | 4.8 | 9.4  | 13.9 |
| » 6 » . . . . .       | 5.8 | 10.8 | 14.4 |
| » 8 » . . . . .       | 7.0 | 12.4 | 14.7 |
| » 12 » . . . . .      | 8.5 | 12.5 | 15.1 |
| » 24 » . . . . .      | 8.4 | 12.6 | 16.2 |

Из приведенных данных видно, что при равных количествах тирозиназы и возрастающих количествах тирозина продолжительность в точности обратно пропорциональна концентрации субстрата. Эта закономерность имеет место для начальных и средних стадий реакции, но не для конечных, ибо и в этом случае активность фермента тем скорее исчерпывается, чем больше концентрация субстрата.

Результаты этого исследования можно резюмировать следующим образом: действие тирозиназы безусловно следует закону действующих масс. Отклонения, наблюдающиеся в конечных стадиях реакции, обусловлены тем, что активность фермента исчерпывается в течение реакции, и исчерпывается тем быстрее, чем больше концентрация фермента и субстрата, т. е. чем скорее протекает реакция.

9 января 1908 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Fürth u. Jerusalem. Beitr. Chem. Physiol. u. Pathol., 10, 4—6, 131 (1907).
2. Бах. Ver. Dtsch. chem. Ges., 37, 3786 (1904); настоящая книга, стр. 378.

---

## О ДЕЙСТВИИ СВЕТА НА ПЕРОКСИДАЗУ

[*Ueber das Verhalten der Peroxydase gegen Licht*] \*

В связи с проведенными ранее опытами, касающимися зависимости пероксидазы от различных физических и химических воздействий, было также исследовано действие света на этот фермент.

200 см<sup>3</sup> экстракта пероксидазы, содержащиеся в большой эрленмейеровской колбе, были подвергнуты прямому действию солнечного света. Через определенные промежутки времени отбирались пробы по 20 см<sup>3</sup> и смешивались с раствором 1 г пирогаллола в 50 см<sup>3</sup> воды и 30 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора перекиси водорода; образующийся осадок пурпурогалина переводился через 24 часа на взвешенный фильтр, промывался в 200 см<sup>3</sup> воды, высушивался до постоянного веса при 105° и взвешивался. Таким путем были получены следующие результаты:

|                                                 |       |       |       |       |       |       |
|-------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Продолжительность освещения (в часах) . . . . . | 0     | 4     | 8     | 15    | 40    | 76    |
| Пурпурогалин (в г) . . . . .                    | 0.198 | 0.197 | 0.201 | 0.187 | 0.165 | 0.166 |

С другим экстрактом были получены следующие результаты:

|                                                 |       |       |       |       |       |
|-------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Продолжительность освещения (в часах) . . . . . | 0     | 4     | 22    | 50    | 76    |
| Пурпурогалин (в г) . . . . .                    | 0.227 | 0.222 | 0.202 | 0.190 | 0.183 |

При одновременном действии кислорода и света происходит, таким образом, медленное убывание активности пероксидазы. В этом отношении пероксидаза не отличается от других ферментов, хотя она в общем и является одним из самых устойчивых ферментов.

9 января 1908 г.

---

\* Ber. Dtsch. chem. Ges., 41, 225 (1908).

## О СОДЕРЖАНИИ АЗОТА В ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТАХ

[*Ueber den Stickstoffgehalt der Oxydationsfermente*] \*

В связи с исследованием японского лака Чирх и Стивенс<sup>1</sup> сделали некоторые наблюдения о содержании азота в оксидазе (лакказе), которая, как известно, содержится в этом растительном соке. Они нашли, в частности, что оксидаза всегда содержит азот, но что его нельзя обнаружить ни по методу Лассэнъя, ни по методу Келлера. Бертран<sup>2</sup> определил содержание азота в лакказе путем нагревания фермента с натронной известью и титрования дистиллята с серной кислотой. Он считает, что при перегонке выделяется аммиак, и производит соответственно вычисление количества азота. Согласно Чирху и Стивенсу, это предположение неправильно, ибо при нагревании оксидазы с твердой щелочью образуется не аммиак, а исключительно пиррол. Пиррол был обнаружен ими обычным образом. Авторы, однако, не объясняют, откуда происходит щелочность дистиллята. Как известно, пиррол имеет кислую, а не щелочную реакцию, и поэтому щелочность дистиллята не может объясняться присутствием в ней этого азотистого соединения.

Присутствие пиррола в продуктах перегонки оксидазы представляло интерес, однако, само по себе, и поэтому мне казалось желательным выяснить, дает ли также и пероксидаза, которая является устойчивой составной частью оксидазы, реакцию на пиррол.

Препарат пероксидазы из хрена был очищен повторным растворением в воде и осаждением спиртом; 0.008 г полученного фермента, который обладал чрезвычайно высокой активизирующей способностью 2.1, смешивались с растертым в порошок едким кали и нагревались в пробирке. Выделяющиеся пары содержали аммиак, который можно было обнаружить по его запаху и по посинению красной лакмусовой бумажки, и пиррол, окрашивающий в яркокрасный цвет смоченную в соляной кислоте основную стружку. Из этого опыта вытекает, что наиболее существенная часть оксидазы — пероксидаза — бесспорно дает реакцию на пиррол. Выделяет ли также оксигеназа при нагревании со щелочью пиррол, осталось невыясненным, ибо я не имею в настоящее время в своем распоряжении препарата оксигеназы. Что же касается присутствия азота в окислительных ферментах, то оно очень легко обнаруживается по методу Лассэнъя как для пероксидазы, так и для оксидаз, полученных из различных грибов, если только применять для реакции достаточное количество металлического калия (но не натрия!) Почему Чирх и Стивенс получили отрицательный результат с лакказой, — мне непонятно.

9 января 1908 г.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Tschirch u. Stevens. Arch. Pharm., 243, 7, 504 (1905).
2. Bertrand. Ann. Chim. Phys., 12, 115 (1897).

\* Ber. Dtsch. chem. Ges., 41, 226 (1908).



## К ВОПРОСУ ОБ ОЧИСТКЕ ПЕРОКСИДАЗЫ

[Zur Reinigung der Peroxydase] \*

(Совместно с С. И. Черняком)

Физиологически чистые препараты пероксидазы, которые можно приготовить по методу Баха и Шода<sup>1</sup>, всегда содержат большие количества сахаристых и смолистых веществ и активируют сравнительно незначительные количества перекиси водорода. Определение активирующей способности различных препаратов по методу, выработанному Бахом<sup>2</sup>, показывает, что 1 часть пероксидазы активирует при окислении пирогаллола 0.5—1.5 части перекиси водорода. Все попытки очистить препараты от примесей, путем повторного растворения в воде и осаждения спиртом, и повысить благодаря этому их активирующую способность не дали до сих пор удовлетворительных результатов. Так, например, Штеклин<sup>3</sup> получил путем фракционированного осаждения спиртом большого количества исходной пероксидазы препарат, который активировал только 2 весовые части перекиси водорода. Бах<sup>4</sup> упоминает препарат, который имел «исключительно высокую активирующую способность 2.1». Как было уже указано Штеклином<sup>5</sup>, причина этой неудачи заключается в том, что при очистке пероксидазы обычным методом скоро достигается такое состояние, при котором фермент и загрязнения выпадают вместе в постоянном отношении.

Ввиду того что не было надежды значительно очистить пероксидазу осаждением спиртом, мы пытались подойти к разрешению этого вопроса другим путем. Многочисленные предварительные опыты, поставленные в различных направлениях, показали, что растворы пероксидазы лучше всего можно очистить путем осаждения примесей основным уксуснокислым свинцом, удаления свинца посредством уксуснокислого натрия и последующего диализа.

Для целесообразного выполнения этого метода необходимо довольно значительное количество неочищенной пероксидазы, и мы поэтому начали с поисков материала, содержащего пероксидазу, обработка которого была бы менее неудобна, чем обработка применявшегося до сих пор хрена. В качестве такого материала мы нашли легко доступную белую репу. Путем отжатия тонкоизмельченного материала получается сок, активирующая способность которого превосходит лучшие экстракты пероксидазы из хрена. Осаждение отфильтрованного сока спиртом дает пероксидазу-сырец, из которой можно удалить около 37% примесей повторным растворением в воде и осаждением спиртом. Железо и марганец удаляются при этом полностью, кальций, магний и восстанавливающие сахара — только частично.

Опыт производился следующим образом.

\* Ber. Dtsch. chem. Ges. 41, 2345 (1908).

30 кг белой репы измельчались в мясорубке; из отжатой массы было получено 20 л сока, к которому прибавлялось 2 л 96%-ного спирта для коагуляции слизистых веществ. После фильтрования сок осаждался 130 л крепкого спирта\*, образовавшийся осадок отфильтровывался, промывался спиртом и освобождался от последнего в вакууме. Полученная пероксидаза-сырец (52 г) растиралась с 600 см<sup>3</sup> воды, причем только незначительная часть ее переходила в раствор. Нерастворенная часть отфильтровывалась и промывалась небольшим количеством воды; к 600 см<sup>3</sup> фильтрата, содержащего только около 7 г сухого вещества, прибавлялось 40 г уксуснокислого свинца в порошке. По истечении 24 часов образовавшийся осадок отфильтровывался, промывался небольшим количеством воды; к фильтрату (600 см<sup>3</sup>) прибавлялся уксуснокислый натрий в порошке до прекращения появления мути. Потреблено: 21 г сухого уксуснокислого натрия. После удаления осадка путем фильтрования щелочный фильтрат (600 см<sup>3</sup>) диализировался против дистиллированной воды. Предварительные опыты показали, что для диализа нельзя применять ни пергаментную бумагу, ни гильзы фирмы Шлейхер, так как пероксидаза довольно быстро диализирует через такого рода мембраны. Лучшие результаты получены с настоящим пергаментом, хотя и он пропускает значительные количества пероксидазы. Для приготовления диализатора на широкое горло склянки, дно которой было вырезано, натягивался большой кусок пергамента; полученный таким образом пергаментный мешок наполовину наполнялся раствором пероксидазы и погружался на одну треть в дистиллированную воду.

В начале диализа при смешивании 2 см<sup>3</sup> раствора пероксидазы с 1 г пирогаллола в 70 см<sup>3</sup> воды и 30 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора перекиси водорода получалось 0.310 г пурпурогалина. После 6-дневного диализа (вода в наружном сосуде менялась ежедневно 5—6 раз) объем жидкости в диализаторе составлял 735 см<sup>3</sup>. Из 2.6 см<sup>3</sup> этой жидкости (т. е. 2 см<sup>3</sup> исходного раствора пероксидазы) получалось с 1 г пирогаллола и 30 см<sup>3</sup> раствора перекиси водорода — 1.59 г пурпурогалина. При выпаривании досуха 20 см<sup>3</sup> раствора пероксидазы в платиновой чашке получился остаток, составлявший после высушивания до постоянного веса при 115°—0.041 г. Сухой остаток был осторожно сожжен в той же самой чашке. Получено: 0.0015 г = 3.6% золы. Таким образом, при диализе активирующая способность пероксидазы уменьшилась приблизительно вдвое, но содержание сухого вещества упало с 7 до 1.23 г. 700 см<sup>3</sup> диализированного раствора пероксидазы подвергались дальнейшему диализу в течение 6 дней. На 13-й день диализ был прерван, так как я опасался, что количество остающейся в диализаторе пероксидазы будет недостаточным для проведения опыта. Диализированный раствор пероксидазы, объем которого не изменился заметно за время второй стадии диализа, представлял собою опалесцирующую, легко фильтрующуюся жидкость, которая не становилась прозрачной при повторном фильтровании. Осадок, полученный при прибавлении 4.5 л 99%-ного спирта к 670 см<sup>3</sup> диализата, переводился через 24 часа на уплотненный фильтр, промывался абсолютным спиртом и высушивался в вакууме.

Пероксидаза, очищенная описанным выше способом, получилась в виде легкого серовато-белого порошка, вес которого составлял всего 0.780 г. Препарат содержал 7.87% воды, 81.66% органического вещества и 1.47%

\* Эта операция была любезно выполнена для нас Ницбергом и Полоновским на фабрике Химических продуктов, за что мы выражаем им и здесь нашу искреннюю благодарность.

зола. Определение азота при сжигании дало 3.44% азота, в расчете на беззольное вещество. При определении активирующей способности по Баху были получены следующие данные:

0.0073 г пероксидазы + избыток перекиси водорода дали 0.263 г пурпурогалина.  
0.0050 г перекиси водорода + избыток пероксидазы дали 0.079 г пурпурогалина.

$$\text{Активирующая способность: } \frac{0.263 \cdot 0.05}{0.079 \cdot 0.0073} = 22.7.$$

Описанная Штеклином<sup>6</sup> очищенная пероксидаза содержала 11.41% воды, 65.88% органического вещества и 22.71% зола, при содержании азота 3.43%, и активирующей способности 2. При равном содержании азота и в 15 раз меньшем содержании зола наша пероксидаза активировала, следовательно, в 11 раз больше перекиси водорода, чем пероксидаза Штеклина. Активирующая способность пероксидазы, таким образом, повидимому, не зависит непосредственно ни от содержания азота в ней, ни от ее зольности. По всей видимости, при дальнейшей разработке описанного способа очистки удастся приготовить совершенно беззольную пероксидазу.

Наша пероксидаза дает определенно положительную биуретовую и ксантопротеиновую реакцию, но не дает реакции Миллона. При нагревании в пробирке из нее выделяется пиррол и резко щелочное основание. Пиррол образуется также при озолении пероксидазы в платиновом тигле. В настоящее время мы не можем еще точно определить, какая зависимость существует между пероксидазой и белками. Принимая во внимание малое содержание азота и отсутствие реакции Миллона, можно в крайнем случае допустить, что пероксидаза принадлежит к числу «белковых веществ в широком смысле этого слова» (Чапек).

Очищенная пероксидаза активирует перекись водорода как при окислении фенолов и ароматических аминов, так и при окислении иодистоводородной кислоты. В этом отношении нет заметной разницы между исходной неочищенной пероксидазой и самыми чистыми препаратами. На основании этого наблюдения, а также всех сделанных ранее Бахом<sup>7</sup> опытов надо считать, что пероксидаза представляет собою индивидуальный фермент, функцией которого является активирование перекиси водорода при окислении веществ, содержащих подвижный водород. Химическая природа этих веществ не является решающей для процесса активации. При окислении тирозина перекись водорода, однако, не активируется обыкновенной пероксидазой<sup>8</sup>, а только пероксидазой, которую можно выделить из тирозиназы<sup>9</sup>. Причина этой особенности должна быть выяснена в дальнейших исследованиях.

Следует отметить малую чувствительность хорошо очищенной пероксидазы к нагреванию. При нагревании наблюдается следующая закономерность: чем больше концентрация, тем дольше можно нагревать пероксидазу, не нарушая ее действия. В качестве примера можно привести следующий опыт.

Шесть тонкостенных пробирок, содержащих по 1 см<sup>3</sup> чистой пероксидазы (=0.0017 г перекиси водорода), были поставлены в кипящую воду. Оказалось, что полное разрушение пероксидазы наступает только после 18-минутного нагревания в кипящей воде. Исходный раствор пероксидазы был затем разбавлен в 20 раз дистиллированной водой. При нагревании шести пробирок, содержащих по 1 см<sup>3</sup> этого разбавленного раствора, в кипящей воде пероксидаза разрушилась уже через 3 минуты.

Для проведения дальнейших опытов с целью изучения свойств более чистой пероксидазы полученное нами количество фермента было недостаточным.

20 июня 1908 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бах совм. с Шода. *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **36**, 602 (1903); настоящая книга, стр. 349.
2. Бах. *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **37**, 3787 (1904); настоящая книга, стр. 378.
3. Stöcklin. *Contribution à l'étude de la peroxydase*, 37 (1907), Genève.
4. Бах. *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **41**, 226 (1904); настоящая книга, стр. 419.
5. *L. c.*, стр. 22.
6. *L. c.*, стр. 24.
7. Бах. *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **40**, 230, 3186 (1907); настоящая книга, стр. 427.
8. Chodat. *J. Suisse Chim. Pharm.*, **46**, 48 (1905); Бах. *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **39**, 2126, 3329 (1906); настоящая книга, стр. 404.
9. Бах. *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **41**, 216 (1908).

## К ВОПРОСУ О ТИРОЗИНАЗЕ

[Zur Kenntnis der Tyrosinase] \*

Тот факт, что перекись водорода активируется пероксидазой при окислении трех различных классов соединений (фенолы, ароматические амины и иодистоводородная кислота), позволяет предположить, что в пероксидазе имеются три различных фермента, обладающие специфическим действием. Однако несмотря на все усилия, до сих пор не удалось разделить эти предполагаемые ферменты или хотя бы приостановить одну из функций пероксидазы, не уничтожая одновременно и обе другие<sup>1</sup>. При современном состоянии наших знаний можно, таким образом, не без основания считать, что процесс активации определяется не химической природой вещества, окисляющегося перекисью водорода, а присутствием в нем подвижного водорода. Другими словами, пероксидаза ведет себя как неспецифический фермент. Принимая во внимание полную равноценность системы «пероксидаза — перекись водорода» и обыкновенной оксидазы, последняя также не должна обладать специфичностью. Этот вывод находится, однако, в противоречии с тем фактом, что тирозин не окисляется обычной оксидазой, а только определенной оксидазой, открытой Буркло и Бертраном<sup>2</sup> и названной «тирозиной». В соответствии с этим и система «пероксидаза — перекись водорода» не оказывает никакого действия на тирозин<sup>3</sup>. В данном случае, повидимому, имеет место специфическое действие фермента, связанное с химическим строением субстрата. Для выяснения этого противоречия мною были поставлены систематические опыты, результаты которых я вкратце привожу ниже.

Изучая видимую специфичность тироминазы, нужно прежде всего принять во внимание высказанную Гоннерманом<sup>4</sup> гипотезу, что тироминаза является не окислительным, а гидролитическим ферментом: тирозин расщепляется тироминазой гидролитически таким образом, что в нем появляются легкоокисляемые, самопроизвольно окисляющиеся на воздухе продукты расщепления. Если бы это предположение подтвердилось, то поставленная проблема о специфичности тироминазы получила бы ясное и простое объяснение. Поэтому я подверг гипотезу Гоннермана проверке в различных направлениях. Сначала я пытался разделить во времени оба указанных процесса, т. е. гидролиз тиромина и окисление образующегося продукта расщепления. С этой целью был поставлен следующий опыт.

В 400 см<sup>3</sup> прокипяченной и охлажденной в токе водорода воды было растворено 0.2 г тироминазы из *Russula delica*, очищенной путем осаждения спиртом. Кроме того, был приготовлен таким же образом раствор тиромина, насыщенный при нагревании и не содержащий кислорода.

\* Ber. Dtsch. chem. Ges., 42, 594 (1909).

По 200 см<sup>3</sup> каждого из этих растворов смешивались в колбе, наполненной водородом (смесь А). Первоначальные растворы и смесь были поставлены в термостат при 25° без доступа воздуха. По истечении 24 часов 200 см<sup>3</sup> смеси А были перелиты в стакан и одновременно приготовлена одинаковая смесь (смесь В) из первоначальных растворов фермента и тирозина, хранившихся отдельно в термостате. Обе смеси были затем подвергнуты действию кислорода воздуха в одинаковых условиях. За ходом окисления тирозина я следил в обоих случаях посредством описанного мною ранее<sup>5</sup> метода титрования перманганатом, отбирая через равные промежутки времени по 20 см<sup>3</sup> из каждой смеси и титруя до обесцвечивания 0.002 N раствором перманганата, после подкисления серной кислотой.

*Количество потребленного перманганата (в см<sup>3</sup>)*

|                           |     |     |     |      |      |
|---------------------------|-----|-----|-----|------|------|
| Время (в часах) . . . . . | 1   | 2   | 3   | 4    | 5    |
| Смесь А . . . . .         | 3.7 | 5.1 | 6.9 | 10.2 | 16.4 |
| Смесь В . . . . .         | 3.8 | 5.3 | 6.8 | 10.3 | 16.3 |

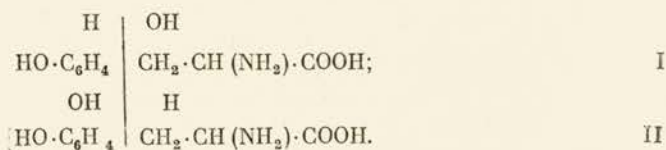
Из этого опыта вытекает, что предварительная обработка тирозина тирозиназой в отсутствие кислорода не оказывает никакого влияния на скорость последующего окисления смеси. Этот результат находится в явном противоречии с допущением, что окислению тирозина предшествует гидролиз.

Что при действии тирозиназы на тирозин в отсутствие воздуха не образуется никаких легкоокисляемых продуктов, было установлено ниже-следующим опытом.

Тотчас же после отбора 200 см<sup>3</sup> для описанного выше опыта, остаток смеси А нагревался в течение некоторого времени с целью разрушения тирозиназы, а затем подвергался действию кислорода воздуха. Смесь оставалась бесцветной в течение многих недель; прибавление пероксидазы и перекиси водорода не вносило никаких изменений. Предположение Гоннермана, следовательно, не подтвердилось и в этом направлении.

Предварительная обработка тирозина трипсином (48 часов в термостате при 37° в присутствии толуола) и пептолитическим ферментом из бюхнеровской зимазы также дала отрицательный результат.

Предположение о гидролитическом расщеплении тирозина тирозиназой было в заключение проверено еще в одном направлении. Наиболее простое расщепление тирозина должно было бы происходить по формуле I или II:

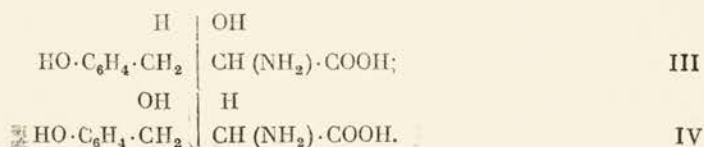


В первом случае в качестве продуктов расщепления должны были бы образоваться фенол и серин, во втором случае — гидрохинон и аланин. Как известно, фенол, серин и аланин являются продуктами гидролиза протеиновых веществ, и поэтому вполне допустимо, что расщепление происходит именно таким образом. Если окислению тирозина действительно предшествует расщепление такого рода, то тирозиназа должна была бы вызывать образование такого же продукта окисления из этих продуктов расщепления, как и из тирозина.

Эквивалентные количества фенола и *d,l*-серина, с одной стороны, и гидрохинона и аланина — с другой (по 0.0001 молекулы в 20 см<sup>3</sup> воды), смешивались с тирозиназой и оставлялись на воздухе. Одновременно ставились контрольные опыты с теми же фенолами в отсутствии аминокислот. Оказалось, что *d,l*-серин задерживает окисление фенола: реакция наступала на 2 часа позже, чем в контрольном опыте. По истечении 48 часов между обеими пробами не было никакой разницы: обе были окрашены в тот же коричнево-красный цвет. Даже по истечении 10 дней в смеси фенола и серина не появилось характерного черного окрашивания. Что касается окисления смеси гидрохинона и аланина, то оно протекало точно так же, как окисление гидрохинона в отсутствии аланина.

К указанным смесям прибавлялась также оксидаза, не содержащая тирозиназы (*Lactarius vellereus*), и пероксидаза (из хрена) с перекисью водорода. Окисление протекало точно так же, как окисление соответственных фенолов. Прибавление тирозина к этим смесям не оказывало никакого влияния.

Можно себе далее представить, что гидролитический распад тирозина происходит в β-положении, согласно формуле III или IV, и сопровождается образованием паракрезола и оксиаминоуксусной кислоты или параоксибензилового спирта и гликокола:



Насколько мне известно, оксиаминоуксусная кислота не была найдена среди продуктов гидролиза протеиновых веществ и не могла быть приготовлена синтетически, вероятно потому, что она легко распадается на аммиак и глиоксиловую кислоту. При действии тирозиназы на смесь паракрезола и *d,l*-серина (следующий гомолог оксиаминоуксусной кислоты) жидкость приобрела интенсивное красно-фиолетовое окрашивание. Характерный для продукта окисления тирозина черный цвет не появился даже через несколько дней. После прибавления пероксидазы и перекиси водорода в смеси паракрезола и *d,l*-серина появилась молочная муть, которая впоследствии превратилась в белый осадок. При действии тирозиназы на смесь параоксибензилового спирта (приготовленного из параоксибензамида путем восстановления натриевой амальгамой) и гликокола через 3 дня образовался красно-коричневый осадок. При тех же условиях эта смесь дала в присутствии пероксидазы и перекиси водорода желто-коричневый осадок.

Из приведенных выше опытов вытекает, что причиной специфичности тирозиназы не является способность расщеплять тирозин перед окислением.

Жессаром<sup>6</sup> была предложена другая гипотеза для объяснения действия тирозиназы. Он расчленяет его на два процесса: окисление тирозина в красное вещество и последующую конденсацию этого вещества в известный черный продукт. Окисление может происходить под действием как окислительных ферментов, так и других химических окислителей (реактив Миллона), в то время как для превращения красного вещества в черный продукт конденсации необходимо присутствие минеральных солей, содержащихся в тирозиназе.

Для проверки этой гипотезы был поставлен следующий опыт. Активный препарат тирозиназы, очищенный путем многократного осаждения спиртом, был растворен в воде и нагрет до кипения; после охлаждения

раствор, к которому был прибавлен тирозин, был разделен порциями по  $20 \text{ см}^3$  на три стаканчика: в первый было прибавлено  $5 \text{ см}^3$  воды, во второй —  $2 \text{ см}^3$  1%-ного раствора перекиси водорода и  $3 \text{ см}^3$  воды, в третий —  $2 \text{ см}^3$  раствора перекиси водорода,  $2 \text{ см}^3$  раствора пероксидазы и  $1 \text{ см}^3$  воды. Все три пробы оставались бесцветными в течение нескольких недель.

Аналогичный опыт был поставлен с оксидазой вместо пероксидазы и перекиси водорода. Оксидаза была приготовлена из грибов (*Lactarius vellereus*) и нагрета до  $75^\circ$  для разрушения тирозиназы. И в этом случае не было никакого окисления тирозина. Эти опыты были неоднократно повторены и всегда давали тот же результат.

Нет поэтому никакого сомнения, что причиной специфичности тирозиназы не является содержание в ней неорганических соединений.

Гипотезу Нессара можно, однако, расширить в смысле современного учения о коферментах. Можно было, в частности, предположить, что тирозиназа состоит из обыкновенной оксидазы, т. е. пероксидазы и оксигеназы, и какого-то кофермента, благодаря которому окислительный процесс идет в определенном направлении.

Я исследовал более 100 различных растительных соков и экстрактов и около 40 фракций тирозиназы различного происхождения на их способность вызывать окисление тирозина пероксидазой и перекисью водорода. Эти исследования дали следующие результаты.

I. Окисление тирозина под действием пероксидазы, перекиси водорода и растительного сока или препарата фермента происходит только в том случае, если сок или препарат фермента сами по себе активны по отношению к тирозину, т. е. содержат тирозиназу.

В многочисленных опытах, поставленных в этом направлении, не наблюдалось ни одного исключения из этого правила. Во многих случаях в соках и экстрактах действие тирозиназы перекрывалось присутствием восстанавливающих или других, не исследованных подробнее веществ. Это в особенности имело место в тех случаях, когда соки и экстракты были подвергнуты действию гнилостных бактерий. Однако путем осаждения спиртом эти задерживающие вещества могут быть в значительной степени удалены, после чего совершенно четко выявляется действие тирозиназы. Многие соки и экстракты содержат вещества, подобные фенолам, которые окрашиваются в красно-коричневый цвет под действием пероксидазы и перекиси водорода. При прибавлении тирозина можно даже наблюдать ускорение образования красителя. Этот окислительный процесс не имеет, однако, ничего общего с действием тирозиназы, ибо, во-первых, такое же ускорение может быть вызвано уксусной или молочной кислотой, и, во-вторых, окисление никогда не доходит до образования характерного черного продукта.

II. Очищенная, вполне нейтральная пероксидаза всегда задерживает окисление тирозина очищенной тирозиназой как в присутствии, так и в отсутствии перекиси водорода.

В качестве примера можно привести следующие данные из экспериментального материала.

В три стакана *A*, *B* и *C* наливалось по  $150 \text{ см}^3$  насыщенного при нагревании раствора тирозина и  $20 \text{ см}^3$  раствора тирозиназы (0.01 г очищенной тирозиназы в  $100 \text{ см}^3$  воды). Стакан *A* содержал еще  $30 \text{ см}^3$  воды; стакан *B* —  $2 \text{ см}^3$  1% ного раствора перекиси водорода,  $2 \text{ см}^3$  раствора пероксидазы (количество, эквивалентное прибавленной перекиси водорода) и  $23 \text{ см}^3$  воды; стаканы *C* содержат  $2 \text{ см}^3$  раствора пероксидазы и  $28 \text{ см}^3$  воды. Через равные промежутки времени из смесей отбиралось по  $20 \text{ см}^3$  жидкости; к пробам прибавлялись для разложения имеющейся перекиси водорода равные количества раствора каталазы; после подкисления серной кислотой жидкость титровалась 0.02 *N* раствором перманганата до обесцвечивания.



Количество потребленного перманганата (в см<sup>3</sup>)

|                           |     |     |      |      |      |      |      |      |
|---------------------------|-----|-----|------|------|------|------|------|------|
| Время (в часах) . . . . . | 2   | 4   | 8    | 12   | 20   | 32   | 42   | 72   |
| Раствор А . . . . .       | 4.2 | 7.8 | 12.3 | 14.7 | 18.3 | 18.2 | 18.2 | 18.4 |
| Раствор В . . . . .       | 1.1 | 2.3 | 4.1  | 6.3  | 10.1 | 14.2 | 16.1 | 18.1 |
| Раствор С . . . . .       | 0.0 | 0.0 | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 1.9  | 5.2  | 10.4 |

Замечательно, что задерживающее влияние пероксидазы на действие тирозиназы уменьшается в присутствии перекиси водорода. Уже Штауб<sup>7</sup> заметил при некоторых опытах, что действие тирозиназы тормозится прибавлением пероксидазы.

III. Если растительный сок или препарат тирозиназы содержит восстанавливающие или другие задерживающие вещества, то при прибавлении пероксидазы и перекиси водорода наступает временное ускорение окисления, но затем задерживающее влияние пероксидазы вновь проявляется.

Пример. Путем осаждения сернистым аммонием старого сока из *Russula delica*, очень мутного вследствие действия бактерий, был приготовлен препарат, который наряду с тирозиназой содержал вещества, задерживающие окисление тирозина. Раствор 0.05 г этого препарата в 100 см<sup>3</sup> воды применялся для следующих опытов.

В три стакана А, В и С было налито по 150 см<sup>3</sup> насыщенного при нагревании раствора тирозина и по 20 см<sup>3</sup> раствора фермента. Стакан В содержал еще 2 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора перекиси водорода, стакан С—2 см<sup>3</sup> раствора перекиси водорода и 2 см<sup>3</sup> раствора пероксидазы (эквивалент); содержание всех трех стаканов было доведено до 200 см<sup>3</sup> водой. Оказалось, что по истечении двух часов жидкость в стакане А оставалась совершенно бесцветной, в то время как в стакане В она была окрашена в розово-красный и в стакане С в темнокрасный цвет. По истечении 4 часов не было никакой разницы между окрашиванием всех трех жидкостей. По истечении 8 часов, наоборот, жидкость в стакане А была темнее, чем В, а в стакане В—темнее, чем в С. Титрование перманганатом дало следующие результаты.

Количество потребленного перманганата (в см<sup>3</sup>)

|                           |     |     |     |     |      |      |
|---------------------------|-----|-----|-----|-----|------|------|
| Время (в часах) . . . . . | 2   | 3   | 4   | 8   | 20   | 32   |
| Раствор А . . . . .       | 0.0 | 0.2 | 1.9 | 8.2 | 13.7 | 13.6 |
| Раствор В . . . . .       | 0.3 | 1.0 | 1.8 | 6.7 | 10.1 | 13.8 |
| Раствор С . . . . .       | 1.1 | 1.5 | 2.1 | 5.7 | 8.5  | 13.2 |

Из этих данных видно с полной ясностью, что ускорение окислительного процесса в течение первых часов обуславливается не действием пероксидазы и перекиси водорода на тирозин, а разрушением ими задерживающих веществ.

В одном случае совершенно неожиданно наблюдалось ускорение действия тирозиназы самой пероксидазой (без прибавления перекиси водорода). Более подробное исследование показало, что применявшийся раствор пероксидазы имел кислую реакцию. При повторении опыта со свежеприготовленным, совершенно нейтральным раствором пероксидазы имела место, как и ранее, задержка действия тирозиназы. С другой стороны, следы молочной или уксусной кислоты вызвали такое же ускорение окислительного процесса, как и кислая пероксидаза. Применявшаяся фракция тирозиназы содержала ненормально большое количество золы (32.4%).

Рассматривая результаты настоящего исследования, мы приходим к выводу, что действие тирозиназы совершенно отлично от действия обычной оксидазы или системы «пероксидаза — перекись водорода». По всей видимости, тирозиназа принадлежит к особому классу окислительных ферментов, окислительное действие которых распространяется на вещества с менее лабильным водородом.

2 февраля 1909 г.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бах Вег. Dtsch. chem. Ges., **40**, 230, 3185 (1907); **41**, 2345 (1908); настоящая книга стр. 409, 413, 429.
2. Bourguelot et Bertrand. Bull. Soc. mycol. de France, **XVIII**, 27 (1896).
3. Chodat J. Suisse Chim. Pharm., **46**, 48 (1906).
4. Gonnermann. Pflüg. Arch., 82 (1900).
5. Бах Вег. Dtsch. chem. Ges., **41**, 217 (1908); настоящая книга, стр. 419.
6. Gessard. C. R. Acad. Sci., Paris, **130**, 1327 (1900).
7. Staub. Nouvelles recherches sur la tyrosinase, 40 (1908). Genève.

## МЕТОД БЫСТРОГО ПРИГОТОВЛЕНИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ ИЗ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ

[Eine methode zur schnellen Verarbeitung von Pflanzenextracten auf  
Oxydationsfermente] \*

Обработка свежеприготовленных растительных соков и экстрактов очень затрудняется, как известно, присутствием слизистых веществ, которые приходится удалять путем повторного осаждения спиртом, высушивания и растворения в воде. Оказалось, что предварительная обработка экстрактов 5—10%-ным раствором сернокислого магния изменяет состояние этих коллоидов настолько, что они полностью осаждаются сравнительно незначительными количествами спирта; это позволяет очень легко производить быструю переработку экстрактов путем непосредственного фракционирования осаждения спиртом. В качестве примера можно привести следующий опыт.

К 400 см<sup>3</sup> мутного, плохо фильтрующегося сока грибов (*Russula delica*) было прибавлено 20 г кристаллизованного сернокислого магния; после растворения соли жидкость была смешана с 200 см<sup>3</sup> 98%-ного спирта и поставлена на 15 минут в охлаждающую смесь. Образовался черный хлопьевидный осадок, который легко можно было отфильтровать при помощи водоструйного насоса; после промывания спиртом осадок был высушен в вакууме при 30°. К совершенно прозрачному фильтрату было прибавлено 200 см<sup>3</sup> спирта и т. д. Таким образом были получены следующие фракции:

I. Содержание спирта в жидкости 32%. Черный, клейкий осадок в большей части пристающий к фильтру, — около 1 г.

II. Содержание спирта 48%. Темнокоричневая густая жидкость, которая быстро затвердела, образуя плотную массу с кристаллами сернокислого магния — 7.6 г.

III. Содержание спирта 56%. Кристаллы сернокислого магния с примесью светлокоричневой массы — 5.4 г.

IV. Содержание спирта 70%. Светлее, чем предшествующая фракция, — 2.8 г.

V. Содержание спирта 75%. Очень легкая, желтовато-белая кристаллическая масса — 1.4 г.

VI. Содержание спирта 78%. Желтовато-белая масса — 0.55 г.

Переработанный сок из грибов содержал много оксидазы, а также фенолазу и тирозиназу, т. е. он быстро окислял иодистоводородную кислоту, ароматические амины, фенолы (1-, 2- и 3-валентные) и тирозин. Исследование отдельных фракций показало, что фракции I и VI практически не содержали оксидазы; фракция II содержала незначительное количество

\* Ber. Dtsch. chem. Ges., 43, 362 (1910).

оксидаз, фракция III — несколько больше; главная часть оксидаз оказалась в IV и V фракциях. Последняя содержала исключительно много тирозиназы, но не оказывала никакого действия на иодистоводородную кислоту и ароматические амины. Это фракционирование отнимало не более 3—4 часов и требовало 3—4 объема спирта, т. е. не больше, чем потребляется при обычном методе для первого осаждения экстракта. Полученные фракции легко очистить от сернокислого магния путем диализа в проточной воде. Этот метод был применен мною с хорошими результатами к фракционированному осаждению пероксидазы из сока белой репы. Из животного экстракта (легкие) были также приготовлены в течение 3 часов шесть фракций в сухом виде, но они не исследованы подробнее на содержание фермента. Как будет показано в следующем сообщении, этот метод позволил мне готовить оксидазу, совершенно не содержащую ни марганца, ни железа.

17 января 1910 г.

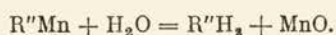
## К ТЕОРИИ ДЕЙСТВИЯ ОКСИДАЗ

### Сообщение I

#### ОКСИДАЗЫ, НЕ СОДЕРЖАЩИЕ НИ МАРГАНЦА, НИ ЖЕЛЕЗА

[Zur Theorie der Oxydasewirkung. I. Mangan- und Eisenfreie Oxydasen] \*

Согласно предложенной Бертраном<sup>1</sup> теории, оксидазы являются органическими соединениями марганца, от которых легко отщепляется гидролитически закись марганца по уравнению:



Под действием оксидазы инертная молекула кислорода расщепляется закисью марганца с выделением атомного кислорода и образованием двуокиси марганца. Последняя передает свой лабильный кислород окисляемым веществам и восстанавливается в первоначальное соединение марганца. Закись марганца является, таким образом, активным началом оксидаз (лакказ), производя одновременно активацию и перенос кислорода.

За последние годы стали, однако, известны данные, плохо согласующиеся с этой теорией. В своем первом сообщении Бертран<sup>2</sup> высказал предположение, что действие оксидазы не может проявиться, если марганец заменен другими металлами. Однако Словцов<sup>3</sup>, Сарту<sup>4</sup> и Исаев<sup>5</sup> приготовили оксидазы, совершенно не содержащие марганца и не содержащие железа, действие которых тождественно с действием оксидаз Бертрана, содержащих марганец. Согласно Исаеву, активность оксидаз, не содержащих марганца, не повышается при прибавлении солей марганца. Розенфельд<sup>6</sup>, Штеклин<sup>7</sup>, Бах и Черняк<sup>8</sup> установили далее, что пероксидазы, тесная связь которых с оксидазами несомненна, не содержат ни марганца, ни железа. В связи со всеми этими данными возникает вопрос, участвуют ли вообще указанные металлы в самом действии оксидазы. Экспериментальное решение этого вопроса встретило большие трудности, которые мне удалось обойти только путем применения описанного в предшествующем сообщении метода: мне удалось приготовить из грибов очень активные препараты оксидазы, совершенно не содержащие ни марганца, ни железа.

В качестве исходного материала я выбрал грибы (*Lactarius vellereus*) вследствие большой устойчивости содержащихся в них оксидаз. Осенью 1908 г. я извлек оксидазу из 12 кг грибов, очищая препараты путем повторного растворения в воде и осаждения спиртом. Исследование нерастворимых остатков, которые получались при последовательных операциях, показало, что первый остаток содержал некоторое количество марганца и большое количество железа; во втором и третьем имелись лишь следы марганца, пятый остаток совершенно не содержал марганца, но содер-

\* Ber. Dtsch. chem. Ges., 43, 364 (1910)

жал еще большое количество железа. Часть растворимого препарата, соответствующая последнему остатку, была сожжена и исследована на марганец и железо. Оказалось, что она также не содержала марганца, но содержала железо. Очистка продолжалась, но по мере ее продолжения уменьшалась осаждаемость препаратов спиртом. При смешивании водных растворов более чистых препаратов со спиртом образовывались тонкие эмульсии, из которых оксидазы осаждались только после продолжительного стояния (2—4 недели) в виде мягкой хлопьевидной массы. Таким путем было получено 0.987 г (сухое вещество) очень активной оксидазы, которая содержала 0.0791 г, т. е. 8.01% золы. Последняя совершенно не содержала марганца, но содержала железо.

Опыты я продолжил в ноябре прошлого года с имевшимся у меня в запасе соком грибов (смесь *Lactarius vellereus* и *Russula delica*), пользуясь разработанным методом фракционирования, описанным в предшествующем сообщении. Около 8 г соединенных фракций, наиболее богатых оксидазой, полученных при содержании спирта 65—75% и не содержащих ни марганца, ни железа, было разделено на 3 части путем трехкратного фракционирования (50, 70 и 75% спирта). Последняя фракция (75% спирта) опять содержала больше всего оксидаз. Она быстро окисляла тирозин, пирогаллол, фенол и паракрезол, медленнее — гидрохинон. На иодисто-водородную кислоту и ароматические амины она не оказывала никакого действия. Нагревание до 80° совершенно приостанавливало реакции, происходящие под действием оксидазы. При озолении 1.68 г сухого вещества этой фракции было получено 0.631 г (= 36.99%) белоснежной золы. Последняя была растворена в воде в присутствии соляной кислоты и исследована на железо. Реакция с железистосинеродистым калием была вполне отрицательной. С роданистым калием было получено чрезвычайно слабое, неопределимое окрашивание, которое почти нельзя было отличить колориметрически от контрольной жидкости (реактивы в воде). Зола второй фракции (70% спирта) давала еще очень слабую, но вполне отчетливую реакцию на железо.

Из этих опытов вытекает, что присутствие соединений марганца и железа совершенно не является решающим для действия оксидазы. Этот результат, который доказывает неправильность взгляда Бертрана, вполне соответствует предложенной мною<sup>9</sup> 13 лет тому назад и сейчас многими принятой перекисной теории оксидаз. Уже тогда я подчеркивал, что окисление индиго кислородом воздуха в присутствии бензальдегида представляет собою модель действия оксидазы. Это, однако, вовсе не означает, что металлические соединения, имеющиеся в растительных и животных организмах, не оказывают никакого влияния на действие оксидазы. Как будет показано в следующем сообщении, они ускоряют дальнейшее превращение первичных продуктов окисления, что может косвенно ускорить действие оксидазы.

17 января 1910 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Bertrand. C. R. Acad. Sci., Paris, **124**, 1355 (1897).
2. Bertrand. C. R. Acad. Sci., Paris, **124**, 1032 (1897).
3. Словцов. Zs. physiol. Chem., **31**, 227 (1900).
4. Sarthou. J. Pharm. Chim., **11**, 482 (1900).
5. Исаев. Z. physiol. Chem., **45**, 331 (1905).
6. Розенфельд. «Оксидаза из корня редьки» (1906). СПб. (Диссертация).
7. Stöcklin. «Contribution à l'étude de la peroxydase» (1907) Genève (Диссертация).
8. Бах совм. с Черняком. Ber. Dtsch. chem. Ges., **41**, 2345 (1908); настоящая книга, стр. 429.
9. Бах. C. R. Acad. Sci., Paris, **124**, 951 (1897); Mon. Sci., **14**, 497 (1897); настоящая книга, стр. 242.

## Сообщение II

ВЛИЯНИЕ МЕТАЛЛИЧЕСКИХ СОЛЕЙ НА ДАЛЬНЕЙШЕЕ  
ПРЕВРАЩЕНИЕ ПРОДУКТОВ ДЕЙСТВИЯ ОКСИДАЗЫ

[*Einfluss der Metallsalze auf die weitere Umwandlung der Produkte der Oxydasewirkung*] \*

Мы обязаны Бертрану<sup>1</sup> первыми наблюдениями о влиянии металлических солей на действие оксидазы. Он нашел, что действие оксидазы из люцерны, содержащей мало марганца, значительно повышается при прибавлении солей марганца. Так как он считал, что марганец является единственным действующим началом оксидаз, то он естественно толковал сделанное им наблюдение в смысле своей теории. Значительнее, яснее и существеннее наблюдения Жессара<sup>2</sup> над влиянием металлических солей на действие тирозиназы. Как известно, при действии тирозиназы на тирозин образуются красные продукты, которые постепенно превращаются в черные меланиноподобные вещества. Жессар наблюдал, что при некоторых препаратах тирозиназы дальнейшее превращение красных продуктов протекает очень медленно; однако в этих случаях процесс образования меланина может быть настолько ускорен прибавлением металлических солей (щелочноземельных), что образование красных продуктов может даже пройти незаметно. Эти наблюдения Жессара были подтверждены и расширены мною.

В связи с некоторыми опытами по регенерированию при помощи амальгамы алюминия препаратов тирозиназы, потерявших активность при длительном хранении, я заметил, что растворы тирозиназы, обработанные этим восстановителем, чрезвычайно ускоряют действие активных препаратов, но сами не действуют на тирозин. Более подробное исследование показало, что в данном случае ускорение действия тирозиназы зависит от присутствия коллоидальной гидроокиси алюминия. Другие соединения алюминия также оказались очень активными. Ускоряющее действие алюминиевых солей значительно превосходит действие других металлов и в особенности заметно в случае более чистых препаратов тирозиназы. Для того чтобы выяснить ускоряется ли в данном случае действие самой тирозиназы или только дальнейшее превращение уже образовавшихся продуктов окисления, я провел следующие опыты.

0.05 г богатой тирозиназой V фракции (см. предшествующее сообщение), растворенные в 50 см<sup>3</sup> воды, смешивались с 50 см<sup>3</sup> насыщенного при нагревании раствора тирозина. Уже по истечении 20 минут смесь окрасилась в темнокрасный цвет. Она была затем нагрета осторожно до 80° для разрушения тирозиназы\*\*, часть была сохранена для контроля, а к остальному количеству прибавлено несколько капель 1%-ного раствора сернокислого алюминия. В то время как контрольная проба оставалась без изменения в течение продолжительного времени, проба, содержащая сернокислый алюминий, окрасилась в фиолетовый цвет уже через 2 минуты; по истечении 10 минут она стала совершенно черной, по истечении 1 часа из нее выпало характерное для действия тирозиназы черное вещество. Следует еще отметить, что сернокислый алюминий не оказывает ни малейшего воздействия на тирозин ни сам по себе, ни в присутствии перекиси водорода и пероксидазы. Соли других металлов (Ca, Mg, Mn, Zn) также ускоряют превращение красного вещества, но в меньшей степени, чем соли алюминия.

\* Ber. Dtsch. chem. Ges., 43, 366 (1910).

\*\* При быстром нагревании до кипения окрашивание исчезает.

Из этих опытов ясно видно, что соли металлов только ускоряют дальнейшее превращение уже образовавшихся продуктов окисления, но не принимают участия в первичном окислительном процессе, т. е. в поглощении и активировании кислорода.

Ввиду того что препарат оксидазы, применявшийся в описанном выше опыте, содержал не только тирозиназу, но и фенолазы, было исследовано влияние на него алюминиевых солей при окислении фенолов. Оказалось, что дальнейшее превращение желтых продуктов, образующихся при действии оксидазы на пирогаллол, чрезвычайно ускоряется алюминиевыми солями (образование пурпурогалина). Дальнейшие опыты показали, что безразлично, образовались ли первичные желтые продукты окисления при самопроизвольном окислении пирогаллола под действием оксидазы или под действием перекиси водорода. С другой стороны, соли алюминия не оказывают заметного влияния на поглощение кислорода пирогаллолом ни сами по себе, ни в присутствии кипяченой оксидазы, по крайней мере в первых стадиях окисления. Соли других металлов также ускоряют превращение желтых продуктов окисления, но в меньшей мере, чем соли алюминия. При превращении первичных продуктов окисления гидрохинона соли марганца значительно активнее, чем соли алюминия.

Таким образом, хотя металлические соли и не принимают участия в самом действии оксидазы, они могут, однако, при определенных обстоятельствах косвенно ускорять его. Это косвенное ускорение имеет место в тех случаях, когда первичные продукты окисления оказывают задерживающее действие на окислительный процесс, вследствие тенденции к образованию равновесных состояний. Вызывая дальнейшее превращение первичных продуктов окисления (в большинстве случаев путем выделения труднорастворимых соединений), металлические соли уменьшают торможение реакции и поэтому косвенно ускоряют поглощение кислорода. Ускоряющее действие марганцовых солей на окисление сиккативных масел, гидрохинона и других веществ, которые сами по себе поглощают кислород с измеримой скоростью, сводится к такого рода противодействию торможению реакции. Что касается механизма этого торможения, то наиболее вероятно, что металлические соли обеспечивают, как и пероксидазы, перенос лабильного кислорода образовавшихся первично перекисных комплексов на еще не окисленный субстрат.

Наши сведения о действии оксидаз можно в основном резюмировать следующим образом.

Субстраты, на которые распространяется действие оксидазы, обладают уже сами по себе способностью поглощать при комнатной температуре кислород и образовывать определенные продукты окисления. Этот окислительный процесс может чрезвычайно ускоряться каталитически некоторыми легко окисляемыми веществами (эфир, альдегиды, терпены и т. д.), а также той частью оксидаз, которая поглощает кислород (оксигеназа). Ввиду того что ускорение окислительных процессов упомянутыми легкоокисляемыми веществами сводится, как было доказано, к активации кислорода путем промежуточного образования перекиси, то надо допустить образование перекиси и в случае оксигеназ. Превращение образующихся первично продуктов окисления в конечные продукты реакции (пурпурогалин, хингидрон, красители и т. д.) ускоряется далее другими катализаторами. Это, с одной стороны, соли определенных металлов, с другой — пероксидазы. Эти катализаторы ускоряют перенос перекисного кислорода на еще не окисленный субстрат. Каталитические системы: «легкоокисляемые вещества (или перекиси) — металлическая соль» и «оксигеназа — пероксидаза» бесспорно построены по одному и тому же химическому принципу, ибо, комбинируя соответственные элементы этих систем, можно приготовить



смешанные активные системы: «способные окисляться вещества (или перекиси) — пероксидазы» и «оксигеназы — металлическая соль».

Действие оксидазы, надо, таким образом, рассматривать как двух-фазный процесс, обусловленный двумя различными видами катализаторов: молекулярный кислород активируется оксигеназами с образованием перекиси, пероксидазы переносят на субстрат подвижный кислород перекиси.

Это толкование, однако, правильно в настоящее время только для фенолаз, в которых оксигеназы можно заменить легкоокисляемыми веществами или перекисями, а пероксидазу — металлическими солями. В случае тирозиназы влияние металлических солей еще отчетливее, чем в случае фенолазы, однако в этом случае нельзя заменить металлические соли обыкновенной пероксидазой. Мне также не удалось до настоящего времени произвести первичное окисление тирозина в красное вещество посредством различных перекисей или легкоокисляющихся веществ в присутствии свободного кислорода. Аналогичные соотношения мы имеем в случае алкоголь-оксидазы и пуринооксидазы. Для этих оксидаз, повидимому, правильно очень интересное объяснение, данное Энглером и Герцогом<sup>3</sup>. Они допускают, что в этих случаях образуются активные перекиси, которые отдают перекисный кислород окисляемому субстрату, не нуждаясь для этого в другом активаторе (пероксидазе).

Что природа радикалов, связанных с перекисной группой —O—O—, является решающей для хода окислительных процессов, было установлено интересными работами Бейера и Вилигера о замещенной перекиси водорода.

Действие тирозиназы следует, таким образом, рассматривать как процесс, обусловленный каталитической системой «специфическая оксигеназа — соль металла».

17 января 1910 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

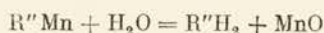
1. Bertrand. C. R. Acad. Sci., Paris, 124, 1032 (1897).
2. Gessard. C. R. Acad. Sci., Paris, 130, 1327 (1900).
3. Engler u. Herzog. Zs. physiol. Chem., 59, 327 (1909).

## О ДЕЙСТВИИ КИСЛОТ НА ФЕНОЛАЗУ

[*Über das Verhalten der Phenolase gegen Säuren*] \*

(Совместно с Б. Збарским)

Бертран рассматривает, как известно, фенолазу (лакказу) как марганцовую соль органической кислоты, легко подвергающуюся гидролитическому расщеплению. Под действием воды эта соль распадается согласно уравнению:



на свободную кислоту и закись марганца, являющуюся переносчиком кислорода и единственным активным началом фенолазы. Из этого представления вытекает, что кислоты, в особенности неорганические, должны задерживать действие фенолазы, поскольку они образуют с марганцем устойчивые соли, мало или совсем не подверженные гидролитическому распаду. Бертрану<sup>2</sup> удалось подтвердить это предположение. Он приготовил из сока японского лакового дерева оксидазу, действие которой на гваякол приостанавливалось под влиянием чрезвычайно малых количеств кислоты. В растворе, содержащем на 10 см<sup>3</sup> 0.0005 г лакказы окисление совершенно прекращалось, когда кислотность достигала 0.001 *N* серной кислоты (т. е. 0.49 мг H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Для 0.00025 г лакказы кислотность 0.0005 *N* серной кислоты прекращала всякое окисление. Из результатов, которые Бертран рассматривает как новое доказательство правильности своих представлений, он делает далеко идущие выводы о природе электроотрицательной части RH<sub>2</sub> фенолазы: последнюю он рассматривает как кислоту, крепость которой порядка аминсазобензосульфоновой кислоты.

В связи с изучением окислительных ферментов один из нас (Бах) сделал наблюдение, что фенолаза, полученная из некоторых грибов, вообще очень устойчива и выдерживает большие количества минеральных кислот без уменьшения активности. В сравнении с применявшимися количествами фермента эти критические количества кислоты настолько велики, что не может быть и речи «о нейтрализации закиси марганца» в смысле представлений Бертрана. Поскольку этот вопрос имеет большое значение для теории действия оксидаз, нам представлялось желательным изучить более детально действие кислот на фенолазу.

\* Biochem. Zs., 34, 473 (1911).

## МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты были проведены с фенолазой, приготовленной из грибов (*Lactarius vellereus*).

Сок (2 л), полученный из 5 кг тонкоизмельченных и отпрессованных грибов, смешивался с 2 л крепкого спирта и 20 кг сернокислого магния и фильтровался после непродолжительного отстаивания. К прозрачному фильтрату прибавлялся трехкратный объем 98%-ного спирта; образующийся осадок отфильтровывался, промывался спиртом и высушивался в вакууме над хлористым кальцием. Сухой препарат растворялся в 200 см<sup>3</sup> воды; после отфильтровывания нерастворимых частей фильтрат выливался в 1 л абсолютного спирта. Образующийся осадок вновь обрабатывался указанным способом. Мы получили, таким образом, легкорастворимый, очень активный препарат фенолазы, 0.0002 г которого давали уже по истечении нескольких минут с 0.2 г пирогаллола в 10 см<sup>3</sup> воды интенсивное желтое окрашивание жидкости. Контрольная проба, поставленная в тех же условиях с кипяченой фенолазой, оставалась бесцветной в течение многих дней. Препарат содержал 5.64% воды, 70.78% органического вещества и 25.58% золы. Исследование последней на марганец дало отрицательный результат при сплавлении с селитрой и содой и слабоположительный результат при обработке азотной кислотой и перекисью свинца. Для нейтрализации 0.1179 г золы потребовалось 5 см<sup>3</sup> 0.01 N серной кислоты.

За действием фенолазы удобнее всего следить путем весового определения пурпурогалина, образующегося при действии фермента на пирогаллол. Помимо его сложности, этот метод представляет еще то неудобство, что он дает удовлетворительные результаты только при довольно значительных количествах пурпурогалина (не менее 0.05 г). Для того чтобы избежать этих недочетов, мы разработали объемный метод, позволяющий определять количественно минимальные количества пурпурогалина.

Смесь, содержащая пурпурогалин, фильтруется через трубку с асбестом — мы применяли для этого обычные хлоркальциевые трубки с шариком, — осадок пурпурогалина промывается водой до тех пор, пока промывная вода не перестает восстанавливать перманганат, и затем растворяется в концентрированной серной кислоте; получающийся темнокрасный раствор разбавляется 6—8-кратным объемом воды и титруется 0.01 N раствором перманганата до обесцвечивания. Метод дает хорошо воспроизводимые результаты. В трех опытах, произведенных в разное время с одинаковым количеством фенолазы и при прочих равных условиях, для обесцвечивания сернокислого раствора пурпурогалина потребовалось 4.8; 4.9 и 4.8 см<sup>3</sup> 0.01 N раствора перманганата.

При действии фенолазы на пирогаллол образуются, помимо нерастворимого пурпурогалина, коричнево-красные растворимые в воде продукты окисления; с малоактивными фенолазами образуются вообще только последние (см. ниже). В серийных опытах с возрастающими количествами серной кислоты мы определяли образование этих продуктов колориметрически, принимая за единицу окрашивание фильтрата, получающееся в контрольном опыте (без прибавления кислоты).

## ФЕНОЛАЗА И СЕРНАЯ КИСЛОТА

При действии фенолазы на фенолы в кислом растворе наблюдаются два различных момента: задержка окисления фенола в кислой среде и разрушение фермента кислотой. Что окисление фенола на воздухе уско-

ряется в присутствии щелочей и замедляется кислотами, — давно известно. Бертран не различал эти два эффекта и приписывал разрушению фенолазы кислотами то, что хотя бы частично должно быть приписано задержке основной реакции кислотами. Для более детального изучения мы поставили опыты, с одной стороны, с фенолазой и пирогаллолом в кислом растворе, с другой стороны, определяли действие кислоты на фенолазу. В последнем случае после нейтрализации кислоты с ферментом были проведены опыты в нейтральном растворе в обычных условиях.

### Влияние серной кислоты на окисление пирогаллола фенолазой

Опыты проводились с 0.02 г фенолазы, 0.2 г пирогаллола и возрастающими количествами серной кислоты в 30 см<sup>3</sup> при комнатной температуре. По истечении 48 часов смеси исследовались приведенным выше способом. Одновременно ставились контрольные опыты с активной фенолазой без кислоты, с кипяченой фенолазой в присутствии кислоты и с пирогаллолом и серной кислотой без прибавления фенолазы. В нижеследующей таблице сведены главные результаты этих опытов. Количество раствора перманганата, потребленное для обесцвечивания сернокислого раствора пурпурогалина, выражено в миллиграммах кислорода.

| Прибавлен-<br>ная серная<br>кислота<br>(в мг) | Пурпу-<br>рогалин<br>(в мг O <sub>2</sub> ) | Интенсив-<br>ность<br>окрашивания | Прибавлен-<br>ная серная<br>кислота | Пурпу-<br>рогалин<br>(в мг O <sub>2</sub> ) | Интенсив-<br>ность<br>окрашивания |
|-----------------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------|
| 0.00                                          | 1.804                                       | 1.00                              | 56.35                               | 0                                           | 1.30                              |
| 0.98                                          | 2.625                                       | 1.50                              | 75.11                               | 0                                           | 0.75                              |
| 1.96                                          | 1.401                                       | 1.75                              | 93.90                               | 0                                           | 0.54                              |
| 2.94                                          | 1.212                                       | 2.00                              | 112.70                              | 0                                           | 0.32                              |
| 3.92                                          | 0.956                                       | 2.15                              | 116.37                              | 0                                           | 0.21                              |
| 4.90                                          | 0.848                                       | 2.30                              | 122.50                              | 0                                           | 0.09                              |
| 5.94                                          | 0.619                                       | 2.50                              | 128.62                              | 0                                           | 0.03                              |
| 6.86                                          | 0.480                                       | 2.60                              | 134.75                              | 0                                           | 0.00                              |
| 9.80                                          | 0.310                                       | 2.71                              |                                     |                                             |                                   |
| 12.74                                         | 0.298                                       | 2.70                              |                                     |                                             |                                   |
| 22.54                                         | 0.117                                       | 3.11                              |                                     |                                             |                                   |
| 28.17                                         | 0.094                                       | 3.30                              |                                     |                                             |                                   |
| 37.55                                         | 0.033                                       | 3.22                              |                                     |                                             |                                   |

Из этой таблицы прежде всего видно, что незначительные количества серной кислоты не только не задерживают действия фенолазы, но даже ускоряют его. В присутствии 0.98 мг серной кислоты, 20 мг фенолазы дали в полтора раза больше пурпурогалина, чем в контрольном опыте без прибавления кислоты. С возрастанием количества кислоты образование пурпурогалина правильно убывает и совершенно прекращается, когда смесь содержит на 20 мг фенолазы приблизительно двукратное количество по весу серной кислоты в 30 см<sup>3</sup>. Весьма замечательно, что с уменьшением количества образующегося пурпурогалина интенсивность окрашивания жидкости, т. е. образование растворимых окрашенных продуктов окисления, непрерывно возрастает, причем максимум интенсивности окрашивания почти точно совпадает с минимумом образования пурпурогалина, как это видно из кривых рисунка. Другими словами, реагирующая смесь содержит тем больше продуктов окисления, чем меньше образуется пурпурогалина. Из этого вытекает, что хотя серная кислота и задерживает образование пурпурогалина при данных концентрациях, она не препят-

ствует образованию растворимых окрашенных продуктов окисления, которые в отсутствие кислоты конденсируются дальше, образуя пурпурогалин. После достижения максимума интенсивности окрашивания образование продуктов окисления убывает с дальнейшим возрастанием количества кислоты и прекращается только при содержании 134.75 мг серной кислоты. Для полного прекращения действия 20 мг фенолазы в 30 см<sup>3</sup>, таким образом, потребовалось семикратное по весу количество серной кислоты.

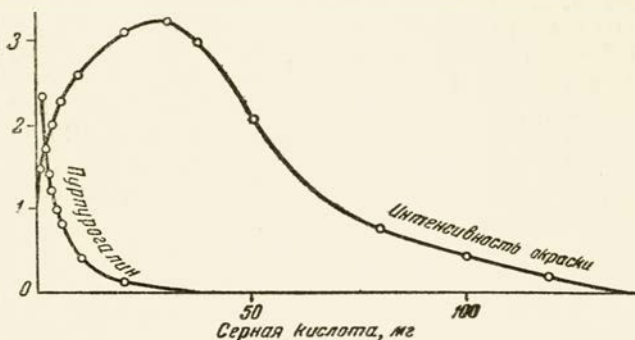


Рис. 1

Неудовлетворительность взглядов Бертрана еще резче выявляется, если определять смертельные дозы серной кислоты для возрастающих концентраций фенолазы. Как было указано выше, Бертран установил для лакказы строгую прямую пропорциональность между количеством фермента и смертельными дозами серной кислоты. Как видно из нижеследующих цифр, для нашей фенолазы эти отношения совершенно иные.

| 0.2 г пирогаллола, возрастающие количества фенолазы и серной кислоты в 30 см <sup>3</sup> |      |      |      |      |       |       |       |       |  |  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|--|--|
| Фенолаза (в мг) . . . . .                                                                 | 0.5  | 1.0  | 5.0  | 10.0 | 15.0  | 20.0  | 25.0  | 30.0  |  |  |
| Смертельные дозы H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (в мг) . . . . .                          | 16.7 | 28.0 | 61.2 | 85.7 | 112.0 | 134.2 | 145.0 | 152.0 |  |  |

Таким образом, смертельные дозы серной кислоты возрастают значительно медленнее, чем концентрация фенолазы: для 0.5 мг фенолазы она составляет 33-кратное, для 30 мг только 5-кратное от количества фермента. Если принять во внимание, что превращение, обусловленное фенолазой, возрастает также медленнее, чем концентрация фермента, то оказывается, что смертельные дозы серной кислоты пропорциональны не абсолютным количествам фенолазы, а только активности фермента при данных концентрациях.

### Действие серной кислоты на фенолазу

Для определения истинного влияния серной кислоты на фенолазу необходимо было через определенные промежутки времени нейтрализовать раствор фермента, предварительно обработанный кислотой, и затем окислять им пирогаллол при обычных условиях. Опыт проводился следующим образом.

0.2 г фенолазы, растворенной в 320 см<sup>3</sup> воды, смешивались с 120 см<sup>3</sup> 0.1 N серной кислоты и оставлялись при комнатной температуре. Через определенные промежутки времени из смеси отбирались пробы по 20 см<sup>3</sup> (соответственно 0.02 г фенолазы), нейтрализовались 0.1 N раствором едкого натра в присутствии фенолфталеина до слабозеленоватого окрашивания и

обесцвечивались затем прибавлением одной капли разбавленной лимонной кислоты. Раствор фермента затем смешивался с 0.2 г пирогаллола в 30 см<sup>3</sup>; по истечении 48 часов в смеси определялся пурпурогалин и окрашенные продукты окисления.

|                                     |      |      |      |      |      |      |      |      |
|-------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Время (в часах) . . . . .           | 0    | 1    | 2    | 4    | 8    | 24   | 48   | 120  |
| Пурпурогалин . . . . .              | 1.80 | 0.99 | 0.86 | 0.53 | 0.66 | 0.0  | 0.0  | 0.0  |
| Интенсивность окрашивания . . . . . | 1.00 | 0.73 | 0.81 | 0.87 | 0.95 | 2.32 | 1.90 | 1.00 |

Таким образом, действие серной кислоты на фенолазу при указанных условиях вызывает сравнительно медленное убывание ее активности. По истечении 8-часового действия кислоты образование пурпурогалина упало на  $\frac{2}{3}$ . По истечении 24 часов фенолаза потеряла способность образовывать пурпурогалин, но ее способность окислять пирогаллол в растворимые коричневые продукты сохранилась еще после 120 часов действия серной кислоты. Контрольные опыты показали, что сернокислый натрий, образующийся при нейтрализации серной кислоты, не оказывает заметного действия на окисление пирогаллола.

### Действие других кислот на фенолазу

По описанному выше способу мы провели ряд серийных опытов с соляной, молочной, щавелевой и лимонной кислотами. Не входя в подробности этих опытов, которые будут описаны в другом месте, мы приводим здесь из обширного экспериментального материала только следующую таблицу, в которой для 0.02 г фенолазы в 30 см<sup>3</sup> даны смертельные дозы кислот, в граммах и грамм-эквивалентах.

*Смертельные дозы кислот для 0.02 г фенолазы в 30 см<sup>3</sup>*

|                             | Серная кислота | Соляная кислота | Молочная кислота | Щавелевая кислота | Лимонная кислота |
|-----------------------------|----------------|-----------------|------------------|-------------------|------------------|
| Граммы . . . . .            | 0.134          | 0.109           | 7.020            | 0.189             | 3.90             |
| Грамм-эквиваленты . . . . . | 0.0026         | 0.003           | 0.078            | 0.004             | 0.060            |

Обращает на себя внимание чрезвычайно слабое действие молочной кислоты и сильное действие щавелевой кислоты, которая приближается к соляной кислоте. Интенсивная задержка действия лакказы щавелевой кислотой наблюдалась уже Бертраном.

### ДЕЙСТВИЕ ФЕНОЛАЗЫ НА РАЗЛИЧНЫЕ ФЕНОЛЫ В КИСЛОМ РАСТВОРЕ

Как указано выше, Бертран проводил свои опыты с гваяколом, в то время как мы предпочитали применять пирогаллол из соображений удобства аналитических определений. Нам казалось желательным провести сравнительные опыты действия фенолазы на различные фенолы в кислом растворе. Опыты, поставленные с эквивалентными количествами гидрохинона, пирогаллола и гваякола с равными количествами фенолазы, показали, что доза серной кислоты, смертельная для 0.02 г фенолазы, зависит от природы субстрата.

Смертельные дозы серной кислоты  
для 0.02 г фенолазы в 30 см<sup>3</sup>

| Гидрохинон | Пирогаллол | Гваякол |
|------------|------------|---------|
| 0.098 г    | 0.134 г    | 0.245 г |

Мы исследовали активность нашей фенолазы по отношению к указанным фенолам и нашли, что она окисляет с наибольшей скоростью гваякол, затем пирогаллол и медленнее всего гидрохинон. Выше было уже указано, что при изменяющихся концентрациях фенолазы и постоянном количестве субстрата смертельные дозы кислоты пропорциональны, при прочих равных условиях, активности фермента при данных концентрациях. Это утверждение нужно дополнить теперь тем, что при постоянной концентрации фенолазы и изменяющемся количестве субстрата смертельные дозы кислоты пропорциональны активности фермента по отношению к различным субстратам.

Полное значение этих явлений нам еще неясно. Однако очевидно, что здесь не имеет место простое связывание марганца или какого-либо другого металла кислотой.

### ВЫВОДЫ

I. Присутствие малых количеств кислоты несомненно усиливает окисление пирогаллола под действием фенолазы.

II. С возрастающим количеством прибавленной кислоты уменьшается образование пурпурогалина, но возрастает интенсивность окрашивания смеси, причем максимум интенсивности окрашивания соответствует минимуму образования пурпурогалина. Из этого вытекает, что до определенного предела (около 2 весовых частей серной кислоты на 1 весовую часть фенолазы) кислоты задерживают образование пурпурогалина, а не первичных продуктов окисления.

III. После прекращения образования пурпурогалина с возрастанием количества кислоты начинает убывать интенсивность окрашивания смеси и в конце концов окрашивание полностью исчезает. В сравнении с изменяющимися количествами фермента смертельные дозы кислоты настолько велики, что не может быть и речи о простом связывании марганца или какого-либо другого металла кислотой.

IV. При возрастающих концентрациях фенолазы и постоянном количестве субстрата смертельные дозы кислоты пропорциональны не абсолютным количествам фермента, а активности фенолазы при данных отношениях концентрации.

V. При постоянной концентрации фенолазы и возрастающих количествах субстрата смертельные дозы кислоты пропорциональны активности фенолазы по отношению к отдельным субстратам.

VI. При исследовании действия кислот на фенолазу мы имеем дело с очень сложными явлениями, окончательное выяснение которых в настоящее время еще невозможно. Объяснение, данное Бертраном, не соответствует фактическим данным.

21 июня 1911 г.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Bertrand. C. R. Acad. Sci., Paris, 124, 124, 1335 (1897).
2. Bertrand. C. R. Acad. Sci., Paris, 115, 340 (1893); Ann. Inst. Pasteur, 21, 673 (1907).

## К ВОПРОСУ О СПЕЦИФИЧНОСТИ ДЕЙСТВИЯ ФЕНОЛАЗЫ

[Zur Kenntnis der Spezifitätserscheinungen bei der Phenolasewirkung] \*

(Совместно с В. Марианович)

В связи с исследованием о действии кислот на фенолазу из грибов Бах и Збарский<sup>1</sup> установили, что количество кислоты, необходимое для полного прекращения действия определенного количества фермента, зависит как от концентрации фермента, так и от природы окисляемого субстрата.

Так, например, смертельная доза серной кислоты для 0.5 мг фенолазы при окислении 0.2 г пирогаллола в 30 см<sup>3</sup> оказалась равной 16.7 мг H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. При прочих равных условиях для прекращения действия 10 мг фенолазы потребовалось не 334 мг, а только 85.7 мг серной кислоты. При окислении эквивалентных количеств гидрохинона, пирогаллола и гваякола смертельная доза серной кислоты для 20 мг фенолазы оказалась равной 98 мг в первом случае, 134 мг во втором и 245 мг в третьем.

Активность фенолазы возрастает, как известно, медленнее, чем концентрация фермента. С другой стороны, активность фермента при окислении исследуемых фенолов оказалась наибольшей для гваякола, меньшей для пирогаллола и наименьшей для гидрохинона. Из этого вытекает, что смертельные дозы кислоты пропорциональны не абсолютным количествам фермента, а активности фенолазы при данных условиях опыта (концентрация фермента и природа субстрата).

Из этих результатов Бах и Збарский сделали вывод, что действие кислот на фенолазу осложняется обстоятельствами, которые нельзя, в противоположность взглядам Бертрана<sup>2</sup>, свести к «нейтрализации» слабосвязанного марганца или какого-либо другого металла.

Для объяснения установленных Бахом и Збарским фактов можно сделать два предположения:

1. Наблюдающиеся различия обусловлены свойствами субстрата, на способность которого окисляться кислоты влияют различным образом.
2. Фермент, известный под названием «фенолаза», содержит несколько специфических ферментов, на которые равные количества кислоты оказывают различное действие.

Для того чтобы подойти ближе к разрешению этого вопроса экспериментальным путем, мы поставили опыты для исследования влияния некоторых солей на фенолазу при окислении различных субстратов. Условия опыта здесь благоприятнее, так как влияние солей на фенолазу менее энергично, чем влияние кислот. Кроме того, мы пытались непосредственно разделить предполагаемые специфические ферменты или хотя бы доказать их существование.

\* Biochem. Zs., 42, 417 (1912).



## ДЕЙСТВИЕ НЕКОТОРЫХ СОЛЕЙ НА ФЕНОЛАЗУ

Опыты были поставлены с целью определить влияние различных солей на действие фенолазы при окислении одинаковых субстратов и одной и той же соли при окислении различных субстратов. Опыты были поставлены со следующими субстратами и солями:

С у б с т р а т ы: гваякол, гидрохинон, орсин, пирогаллол,  $\alpha$ -нафтол + парафенилендиамин (реактив Реман-Шпицера).

С о л и: хлористый кальций, уксуснокислый кальций, сернокислый цинк, уксуснокислый цинк, сернокислый марганец, уксуснокислый марганец, сернокислый алюминий. Соли железа не исследовались, так как они непосредственно дают с некоторыми субстратами окрашивание, которое не позволяет производить колориметрические определения.

Фенолаза приготавливалась из грибов (*Lactarius vellereus*) по несколько измененному методу. Так как для нас было существенно получить возможно более однородную фенолазу, не содержащую тирозиназы, то растертая масса грибов смешивалась с равным объемом подогретой до 70° чистой воды в большой чашке; смесь нагревалась затем еще в течение 3 минут при этой температуре при непрерывном размешивании. Тирозиназа при этом полностью разрушалась, но полученный экстракт содержал больше фенолазы, чем какой-либо другой из всех приготовленных за все время работы с фенолазой. Одна капля экстракта в 5 см<sup>3</sup> 2%-ного раствора гваякола вызывала моментально темнокрасное окрашивание и вскоре вслед за тем образование красно-коричневого осадка. С реактивом Реман-Шпицера моментально образовывался индофенол. С пирогаллолом наблюдалось уже через 3 минуты обильное образование пурпурогалина. Исключительная активность экстракта, вероятно, объясняется тем, что при кратком нагревании растертой массы грибов образуется значительно больше активной фенолазы из ее зимогена, чем разрушается вследствие нагревания.

К экстракту, отжатому через полотно, прибавлялось 2% сернокислого магния и после растворения соли равный объем крепкого спирта; образующийся осадок отфильтровывался, а прозрачный фильтрат осаждался 3-кратным объемом 98%-ного спирта. Осадок отфильтровывался при помощи водоструйного насоса, промывался крепким спиртом и высушивался в вакууме над хлористым кальцием. Сухая серовато-белая масса растворялась в небольшом количестве воды. После отфильтровывания для удаления твердых частиц жидкость вновь обрабатывалась, как было описано выше. Этим путем был получен легкий, почти белый, полностью растворимый в воде порошок, сохранивший все окислительные свойства первоначального экстракта.

Для того чтобы судить о влиянии различных солей на действие фенолазы при окислении различных субстратов, было необходимо выработать единый, применимый во всех случаях количественный метод исследования. После некоторых предварительных опытов оказалось, что наиболее целесообразен следующий метод.

В ряд эрленмейеровских колб, закрытых резиновыми пробками с отверстиями для приводящей и отводящей трубок, наливалось по 50 см<sup>3</sup> раствора, содержащего фермент, субстрат и соль в определенных количествах; через раствор пропускался при обыкновенной температуре постоянной ток чистого воздуха. Количество фенолазы составляло во всех случаях 5 мг, количество субстрата—0.002 г-мол, количество соли колебалось от 0.0002 до 0.001 г-экв\*. Для того чтобы колориметрические определения

\* К реактиву Реман-Шпицера прибавлялось эквивалентное количество карбоната натрия для разложения применявшегося сернокислого парафенилендиамина.

не осложнялись образованием осадка, концентрация фермента и субстрата выбиралась таким образом, чтобы в течение опыта в реагирующей смеси образовывались только растворимые продукты окисления. Ход окисления определялся колориметрически по интенсивности окрашивания реагирующей смеси; за нормальное окрашивание принималось то, которое получалось при действии 5 мг фенолазы на 0.002 г-моль субстрата в 50 см<sup>3</sup> без прибавления соли. Для определения интенсивности окрашивания пробы, отобранные из реагирующей смеси, наливались в колориметрические трубки; в более окрашенные жидкости добавлялась из бюретки вода до равенства окрашивания с наименее окрашенной пробой, которая, естественно, играла роль контрольной. Из прибавленного количества воды вычислялась относительная интенсивность окрашивания. Результаты перечислялись по отношению к нормальному окрашиванию (= 1). В зависимости от скорости окислительного процесса продолжительность опыта колебалась от 1 до 6 часов. При повторении определения в различные моменты всегда получались хорошо сравнимые результаты. Для контроля в каждой серии ставились опыты с неактивной (кипяченой) фенолазой с прибавлением соли (0.001 г-экв.), с одинаковым количеством соли без фенолазы и с субстратом без фермента и без соли. Следует еще прибавить, что для всех опытов применялись химически чистые препараты Кальбаума.

Полученный нами цифровой материал будет подробно опубликован в другом месте. Здесь же для уяснения метода исследования мы приводим только результаты двух серий опытов и даем сводку основных результатов.

### Действие сернокислого цинка и сернокислого марганца на фенолазу

5 мг фенолазы, 0.002 г-моль субстрата, 0.0002—0.001 г-экв. соли в 50 см<sup>3</sup>.

#### Интенсивность окрашивания

| Субстрат                             | Нормальное окрашивание | Соль (в г-экв.) |        |       | Контрольные опыты |      |      |
|--------------------------------------|------------------------|-----------------|--------|-------|-------------------|------|------|
|                                      |                        | 0.0002          | 0.0006 | 0.001 | a                 | b    | c    |
| А. Сернокислый цинк                  |                        |                 |        |       |                   |      |      |
| Гваякол . . . . .                    | 1.00                   | 1.24            | 1.42   | 1.40  | 0                 | 0    | 0    |
| Гидрохинон . . . . .                 | 1.00                   | 0.82            | 0.75   | 0.73  | 0                 | 0    | 0    |
| Пирогаллол . . . . .                 | 1.00                   | 0.54            | 0.54   | 0.54  | 0.25              | 0.21 | 0.15 |
| Орсин . . . . .                      | 1.00                   | 0.73            | 0.66   | 0.66  | 0                 | 0    | 0    |
| α-Нафтол-парафенилендиамин . . . . . | 1.00                   | 1.32            | 1.54   | 2.00  | Коричневатое      |      |      |
| В. Сернокислый марганец              |                        |                 |        |       |                   |      |      |
| Гваякол . . . . .                    | 1.00                   | 0.92            | 0.78   | 0.71  | 0                 | 0    | 0    |
| Гидрохинон . . . . .                 | 1.00                   | 1.20            | 1.40   | 1.80  | 1.52              | 1.48 | 0    |
| Пирогаллол . . . . .                 | 1.00                   | 0.78            | 0.78   | 0.78  | 0.35              | 0.35 | 0.35 |
| Орсин . . . . .                      | 1.00                   | 4.40            | 6.00   | 6.60  | 2.14              | 0.08 | 0    |
| α-Нафтол-парафенилендиамин . . . . . | 1.00                   | 1.16            | 1.26   | 1.80  | 0.83              | 0.71 | 0.58 |

#### Контрольные опыты

a — неактивная фенолаза + 0.001 г-экв. соли;

b — 0.001 г-экв. соли;

c — субстрат без соли и без фермента.

В следующей таблице дано максимальное действие солей на фенолазу при окислении субстратов, приведенное к нормальному окрашиванию и выраженное в процентах; + обозначает увеличение, а — уменьшение окрашивания по сравнению с нормальным. При вычислении результатов были вычтены данные, полученные в контрольных опытах.

*Увеличение и уменьшение интенсивности окрашивания под влиянием солей*

| Субстрат                                  | Хлористый кальций | Уксуснокислый кальций | Сернокислый цинк | Уксуснокислый цинк | Сернокислый марганец | Уксуснокислый марганец | Сернокислый алюминий |
|-------------------------------------------|-------------------|-----------------------|------------------|--------------------|----------------------|------------------------|----------------------|
| Гваякол . . . . .                         | — 74              | — 42                  | + 42             | +142               | — 22                 | — 5                    | —57                  |
| Гидрохинон . . . . .                      | + 32              | + 52                  | — 27             | +136               | — 32                 | +120                   | —32                  |
| Пирогаллол . . . . .                      | — 20              | — 43                  | — 71             | +136               | — 57                 | — 66                   | +*                   |
| Орси . . . . .                            | +234              | +540                  | — 34             | — 44               | +346                 | +660                   | — ∞                  |
| α-Нафтол-парафенилен-<br>диамин . . . . . | + 12              | + ∞                   | +100             | + ∞                | — 3                  | + ∞                    | +80                  |

Из этих данных ясно видно, что природа окисляемого субстрата является решающей для действия солей металлов на фенолазу. При прочих совершенно равных условиях хлористый кальций, например, задерживает окисление гваякола (—74%) и ускоряет окисление орсина (+234%). Сернокислый цинк, наоборот, ускоряет окисление гваякола (+42%) и задерживает окисление орсина (—34%). Сернокислый алюминий ускоряет окисление пирогаллола и реактива Реман-Шпицера, но задерживает окисление гваякола и гидрохинона, совершенно прекращает окисление орсина и т. д.

При попытке объяснить эти результаты нужно прежде всего принимать во внимание изменение состояния реагирующей смеси вследствие прибавления соли. Бертран<sup>3</sup> доказал, что активность солей марганца при окислении гидрохинона кислородом воздуха увеличивается параллельно с их способностью расщепляться гидролитически. Так, например, уксуснокислый марганец оказался, при прочих равных условиях, приблизительно в 9 раз активнее, чем сернокислый марганец. Вольф<sup>4</sup>, изучавший влияние различных солей на окисление некоторых фенолов кислородом воздуха, нашел, что двунариевая соль фосфорной кислоты и трехнатриевая соль лимонной кислоты ускоряют окисление гидрохинона, так же как уксуснокислый марганец. Однако активность этих солей не пропорциональна их способности расщепляться гидролитически. Фосфат натрия оказывал наименьшее влияние, несмотря на то, что он значительно легче гидролизуется, чем обе другие соли. Лимоннокислый натрий и уксуснокислый марганец обладают одинаковой способностью гидролизываться, однако уксуснокислый марганец ускоряет окисление гидрохинона значительно интенсивнее, чем лимоннокислый натрий. Вольф поэтому высказывает предположе-

\* Под влиянием сернокислого алюминия продукты окисления пирогаллола приобретают интенсивный оранжево-красный цвет, который нельзя сравнить колориметрически с желто-коричневым нормальным окрашиванием. На неокисленный пирогаллол сернокислый алюминий не оказывает никакого влияния. См Б а х. А. Вег. Dtsch. chem. Ges., 43, 366 (1910).

ние, что влияние солей на окисление фенолов кислородом воздуха нельзя приписывать исключительно гидролитическому распаду и что здесь играют роль и другие факторы.

Если рассматривать влияние солей на действие фенолазы с точки зрения их способности расщепляться гидролитически, то оказывается, что между гидролизом и влиянием солей нет прямой зависимости. Хотя в общем уксуснокислые соли и действуют энергичнее, чем хлориды или сульфаты, но гидролитическая расщепляемость соли еще не является решающей для влияния на действие фенолазы. При окислении пирогаллола, например, уксуснокислый кальций задерживает реакцию ( $-43\%$ ) больше, чем хлористый кальций ( $-20\%$ ); уксуснокислый марганец больше ( $-66\%$ ), чем сернокислый марганец ( $-57\%$ ), однако уксуснокислый цинк чрезвычайно ускоряет окисление пирогаллола ( $+136\%$ ), в то время как сернокислый цинк его задерживает ( $-71\%$ ). При окислении орсина соли кальция и марганца оказывают ускоряющее действие, причем ацетаты приблизительно в 2 раза активнее, чем хлориды и сульфаты; наоборот, сернокислый цинк несколько слабее задерживает окисление ( $-34\%$ ), чем уксуснокислый цинк ( $-44\%$ ). Легко гидролизующий сернокислый алюминий ускоряет реакцию только в случае окисления пирогаллола и реактива Реман-Шпицера, во всех других случаях — замедляет ее. Таким образом, выводы, сделанные относительно влияния солей на окисление фенолов воздухом, правильны и для влияния солей на действие фенолазы.

В своих опытах над искусственными оксидазами, т. е. над влиянием различных солей на самопроизвольное окисление фенолов, Вольф<sup>5</sup> сделал очень интересное наблюдение, что коллоидальное железистосинеродистое железо ускоряет в присутствии лимоннокислого натрия окисление пирокатехина, но не гидрохинона. При тех же самых условиях соединения марганца оказывают обратное действие, — они ускоряют окисление гидрохинона и не влияют на окисление пирокатехина. Вольф правильно подчеркивает значение этого наблюдения для понимания специфичности при каталитическом окислении фенолов.

Полученные нами результаты (см. приведенную выше таблицу) очень ясно выявляют такого рода специфичность влияния различных солей на действие фенолазы. Контрольные опыты показали, что явления специфичности проявляются уже при самопроизвольном окислении субстратов в отсутствие фенолазы.

Все эти данные определенно говорят против предположения, что различное влияние одной и той же соли при окислении различных субстратов должно быть приписано существованию специфических фенолаз, на которые соли и кислоты оказывают различное действие. Гораздо более вероятно, что именно субстраты обуславливают различное действие солей и вообще химических реактивов в том смысле, что скорость их самопроизвольного окисления, т. е. основная реакция, изменяется в ту или другую сторону под действием посторонних примесей. Фенолаза может здесь играть роль, только увеличивая в известной степени первоначальную скорость, поскольку на нее непосредственно не влияет соль. Наблюдающаяся специфичность следует таким образом, рассматривать, как свойство субстрата, а не фенолазы.

Что же касается причины специфического влияния солей на исследуемые субстраты, то для ее объяснения имеются некоторые данные. Вейнланд и Биндер<sup>6</sup> недавно показали, что пирокатехин образует с уксуснокислым железом в присутствии едкого кали комплексное соединение  $\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_2)_3 \cdot \text{K}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

Аналогичные соединения можно приготовить с солями алюминия, меди, никеля, кобальта и марганца. Пирогаллол, галловая кислота, салицило-

вая кислота и протокатехиновая кислота также дают с солями железа такого рода комплексы. Если допустить, что фенолы соединяются с солями и в отсутствии едкого кали, то можно себе представить, что в зависимости от природы фенолов и солей свойства образующихся комплексов, в том числе и их способность окисляться, претерпевают более или менее серьезные изменения. Действие фенолазы должно в таком случае определяться свойствами этих комплексов, а не свойствами исходных фенолов. Во всяком случае, независимо от того, правильно ли это объяснение или нет, из приведенных выше данных с достаточной ясностью вытекает, что нет никаких оснований допускать существование различных фенолаз, обладающих специфическими свойствами.

### ПОПЫТКИ ИЗОЛИРОВАТЬ СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ФЕНОЛАЗЫ ИЛИ ДОКАЗАТЬ ИХ СУЩЕСТВОВАНИЕ

Для того чтобы проверить еще другим путем правильность этих выводов, мы пытались непосредственно выделить специфические составные части фенолазы или хотя бы доказать их существование. В литературе имеется много данных о существовании фенолаз, обладающих специфическими действиями. Буркло<sup>7</sup> сделал наблюдение, что картофельный сок, обладающий всеми реакциями на фенолазу, не оказывает никакого влияния на гваякол. Согласно Исаеву<sup>8</sup>, фенолаза из солода окисляет гидрохинон и пирогаллол, но не гваякол. Асо<sup>9</sup> допускает поэтому существование специфической «гваяколазы». Лейман и Сано<sup>10</sup> делают такое же предположение. Вольф<sup>11</sup> нашел, что орсин энергично окисляется экстрактами из *Russula*, в то время как фенолаза японского лакового дерева (лакказа) не оказывает на него никакого окислительного действия. Поэтому он допускает, что грибы *Russula* содержат энергичную специфическую «орсиназу». Розель<sup>12</sup>, Каствл<sup>13</sup> и Вернон<sup>14</sup> приписывают окисление реактива Реман-Шпицера действию специфической «индофенолазы». Поставленные нами опыты поэтому казались нам не лишними интереса.

Как уже было упомянуто, Бах и Збарский установили, что для полного прекращения действия фенолазы при окислении гидрохинона нужно значительно меньше кислоты, чем при окислении пирогаллола и гваякола. Если допустить, что каждому субстрату соответствует специфический фермент и что кислоты влияют не одинаково на эти специфические ферменты, то должно быть возможно исключить действием кислот наиболее чувствительные ферменты и изолировать наименее чувствительные. Опыты были проведены следующим образом.

Мы приготовили обычным способом препарат фенолазы и определили количество кислоты, необходимое для прекращения действия фермента при окислении трех указанных выше субстратов. Затем мы растворили этот препарат (около 2 г) в воде и прибавили несколько больше соляной кислоты, чем было необходимо для полного отравления предполагаемой «гидрохиноназы». Само собою разумеется, что все необходимые условия опыта — концентрация, температура, продолжительность — строго соблюдались. К кислому раствору фермента был прибавлен четырехкратный объем крепкого спирта, образующийся осадок был отфильтрован, промыт 80%-ным спиртом до удаления соляной кислоты, затем еще раз промыт абсолютным спиртом и высушен над хлористым кальцием. Исследование обработанного таким образом препарата показало, что он окисляет не только пирогаллол и гваякол, но также и гидрохинон, и приблизительно в такой же мере, как первоначально. Опыт был повторен с серной кислотой и дал те же самые результаты.

Таким образом, нам не удалось разделить предполагаемые специфические фенолазы посредством сильных кислот или хотя бы полностью приостановить какую-нибудь из их функций. После этого мы пытались достигнуть желаемой цели путем фракционированного осаждения спиртом в присутствии серноокислого магния по методу Баха<sup>15</sup>. Не останавливаясь подробно на этих опытах, мы укажем лишь, что в некоторых случаях удается ослабить ту или иную окислительную функцию фенолазы, но не полностью приостановить ее. Так, например, мы имели в руках препараты, которые довольно слабо окисляли гваякол, но после прибавления ничтожных количеств кислоты или кислой соли оказывали такое же энергичное действие, как первоначальный препарат. Активность фракций, которые слабо окисляли гидрохинон, легко восстанавливалась при прибавлении уксуснокислого кальция или уксуснокислого марганца. У нас создалось при этих опытах впечатление, что фракционирование сводится не к разделению специфических фенолаз, а к выделению различных составных частей, которые так или иначе влияют на действие фенолазы. И в этом случае мы не нашли никаких определенных подтверждений предположения о существовании специфических фенолаз.

При этих условиях нам казалось желательным выяснить причины явлений специфичности, наблюдавшихся различными авторами при исследовании действия фенолазы.

В первую очередь мы проверили и подтвердили наблюдение Буркло. Свежий картофельный сок энергично окисляет гидрохинон и пирогаллол, но не оказывает никакого действия на гваякол. Однако как только мы прибавили небольшое количество перекиси водорода к оставшейся бесцветной смеси картофельного сока и раствора гваякола, немедленно получилось интенсивное красно-коричневое окрашивание и образовался тетрагваякохинон. Этот результат казался совершенно несовместимым с существующими взглядами на действие фенолазы. Тот факт, что картофельный сок сам по себе не окисляет гваякол, а окисляет его только после прибавления перекиси водорода, можно объяснить тем, что сок содержит пероксидазу, но не содержит оксигеназы. С другой стороны, быстрое окисление гидрохинона и пирогаллола указывает на присутствие оксигеназы в достаточном количестве. Оксигеназа, соответствующая фенолазе, не специфична, ибо она может быть заменена при окислении всех субстратов, в том числе и при окислении гваякола, перекисями или другими, легко окисляющимися веществами, образующими перекиси. Это противоречие, таким образом, нельзя свести к отсутствию специфичной по отношению к гваяколу оксигеназы.

При более подробном исследовании все эти противоречия довольно хорошо разъясняются. Картофельный сок содержит наряду с фенолазой редуцирующий фермент (пергидридазу) и восстанавливающие вещества. Наряду с окислительными процессами в соке происходят восстановительные процессы. В зависимости от большей или меньшей способности продуктов окисления восстанавливаться, окислительный процесс кажется задержанным или полностью перекрывается. Оказывается, что продукты окисления гваякола значительно легче восстанавливаются, чем продукты окисления гидрохинона и пирогаллола, как это видно из нижеследующих опытов.

Эквивалентные количества трех фенолов были смешаны с одинаковыми количествами фенолазы; после окисления к ним были прибавлены одинаковые количества картофельного сока. Через короткий промежуток времени проба, содержащая гваякол, совершенно обесцветилась, в то время как обе другие остались без изменения. Тот же результат получается, если заменить картофельный сок свежим экстрактом из печени. Если прибавить картофельный сок или экстракт из печени одновременно с фенола-

зой, то окисление гваякола начинается значительно позже, чем окисление гидрохинона или пирогаллола.

Таким образом, если картофельный сок не оказывает действия на гваякол, то это не потому, что ему нехватает «гваяколазы», или специфической для гваякола оксигеназы, а потому, что в соке окислительный процесс маскируется восстановительным процессом, вследствие легкого восстановления продуктов окисления гваякола. Прибавление перекиси водорода или избытка фенолазы сдвигает равновесие в сторону, благоприятную для окислительного процесса, и тогда можно наблюдать окисление гваякола.

Причина явлений специфичности, которые привели Вольфа к допущению существования орсиназы, совершенно иная. Вольф сам уже заметил, что окисление орсина требует щелочности среды, приблизительно соответствующей щелочности двуназиевой соли фосфорной кислоты. Это является, таким образом, необходимым условием для самопроизвольного окисления орсина, и поэтому также *conditio sine qua non* действия фенолазы на орсин. Если препарат фенолазы не вызывает окисления орсина, то следует в первую очередь предположить отсутствие этого необходимого условия основной реакции и только затем уже допустить наличие специфичности, если при необходимой щелочности реагирующей смеси фенолаза остается неактивной. Опыт говорит в пользу первого предположения.

Согласно Вольфу, лакказы из японского лакового дерева не оказывают никакого действия на орсин, в то время как фенолаза из *Russula delica* быстро окисляет его. К сожалению, мы не располагали препаратом лакказы, но мы нашли, что система «пероксидаза (из хрена) — перекись водорода», равноценная лакказе также не действует на орсин. Поэтому мы поставили сравнительные опыты окисления посредством этой системы в присутствии и в отсутствии фосфорнокислого натрия. Оказалось, что незначительные количества фосфата, которые сами по себе не вызывали заметного ускорения самопроизвольного окисления орсина, вызывали энергичное окисление этого субстрата в соединении с системой «пероксидаза — перекись водорода», также неактивной самой по себе.

Таким образом, и в этом случае нет никаких оснований приписывать окисление орсина специфичной орсиназе.

Почему надо приписывать окисление  $\alpha$ -нафтола и парафенилендиамина действию какой-то «индофенолазы», отличной от обычной фенолазы, — нам неясно. А priori мало вероятно, что фенолаза, которая окисляет в отдельности оба вещества, не оказывает на них никакого действия, когда они соединены. В соответствии с этим мы нашли, что все исследованные нами препараты фенолазы давали реакцию на индофенол, если только условия опыта были правильно подобраны. Дальнейшее доказательство идентичности индофенолазы и обычной фенолазы заключается в том, что система «пероксидаза — перекись водорода» вызывает чрезвычайно интенсивное образование индофенола. До сих пор неизвестно ни одного случая, когда эта система вела бы себя по отношению к какому-либо субстрату иначе, чем фенолаза. Таким образом, можно говорить об индофенольной реакции фенолазы, но никак не об индофенолазе.

В появившейся недавно обширной работе Бателли и сотр.<sup>16</sup> пытаются выявить не отмеченные до сих пор явления специфичности в действии фенолазы. Исходя из старых данных Бертрана<sup>17</sup>, согласно которым лакказа окисляет только поливалентные фенолы и амины, они называют фенолазу «полифенолоксидазой» и определяют ее как фермент, который ускоряет окисление «полифенолов и соответственных аминоксоединений». Уже Буркло<sup>18</sup> доказал, что известный под названием фенолазы фермент окисляет монофенолы и моноамины так же, как полифенолы и полиамины. Бателли и сотр. возражают, однако, что применявшиеся Буркло препараты фер

мента были приготовлены из грибов и могли содержать тирозиназу. Поэтому нельзя считать доказанным, что изученные им процессы окисления вызывались исключительно полифенолоксидазой.

Мы задали себе труд, хотя его можно было считать почти излишним, проверить наблюдения Буркло с чрезвычайно чистыми препаратами фенолазы и пероксидазы. Полученный нами результат вполне ясен и однозначен: фенолаза, не содержащая тирозиназы, и равноценная ей система «пероксидаза — перекись водорода» окисляют монофенолы и моноамины так же, как полифенолы и полиамины. Обозначение «полифенолоксидаза», которая предполагает существование «монофенолоксидазы», таким образом, лишено основания.

## ВЫВОДЫ

I. Влияние солей (хлористый кальций, уксуснокислый кальций, сернокислый цинк, уксуснокислый цинк, сернокислый марганец, уксуснокислый марганец, сернокислый алюминий) на действие фенолазы при окислении различных субстратов (гваякол, гидрохинон, пирогаллол, орсин,  $\alpha$ -нафтол-парафенилендиамин) зависит от природы субстрата. Так например, хлористый кальций задерживает окисление гваякола и пирогаллола и ускоряет окисление других субстратов. Сернокислый цинк ускоряет окисление гваякола и реактива Реман-Шпицера и задерживает окисление во всех других случаях.

II. Между гидролитическим расщеплением солей и их способностью влиять на действие фенолазы нет прямой зависимости. Гидролитическая расщепляемость солей является только одним из факторов, влияющих на действие фенолазы.

III. Соли влияют специфически на самопроизвольное окисление субстратов (в отсутствии фенолазы).

IV. Нет никаких оснований предполагать, что явления специфичности, проявляющиеся при действии фенолазы, обуславливаются существованием специфических фенолаз. Наблюдающуюся специфичность надо рассматривать как свойства субстратов, а не свойства фермента.

V. Явления специфичности, вероятно, обуславливаются тем, что субстраты образуют с солями комплексные соединения, свойства которых, в том числе и их способность окисляться, отличны от свойств первоначальных субстратов.

VI. Опыты, поставленные с целью изолирования предполагаемых специфических ферментов, содержащихся в фенолазе, не дали результатов. При обработке фенолазы кислотами в тех условиях, которые необходимы для полного превращения ее действия на гидрохинон, и последующем осаждении кислого раствора фермента спиртом был получен препарат, который вновь окислял гидрохинон. Фракционированное осаждение спиртом в присутствии сернокислого магния также дало отрицательный результат.

VII. Проверка некоторых данных, касающихся существования специфически действующих фенолаз, дала следующие результаты:

1) отсутствие окисления гваякола свежим картофельным соком объясняется не отсутствием специфически действующей «гваяколазы», а легкой восстанавливаемостью продуктов окисления гваякола. Наряду с процессом окисления в картофельном соке протекают восстановительные процессы, которые перекрывают окисление гваякола, но не перекрывают окисления гидрохинона и пирогаллола. При прибавлении перекиси водорода или избытка фенолазы равновесие смещается в сторону окислительных процессов, и окисление гваякола немедленно выявляется;



2) отсутствие окисления орсина некоторыми препаратами фенолазы, а также системой «пероксидаза — перекись водорода» объясняется не отсутствием орсиназы, а отсутствием соли, обеспечивающей щелочную реакцию среды (*conditio sine qua non* самопроизвольного окисления орсина);

3) индофенолаза тождественна с обычной фенолазой и с системой «пероксидаза — перекись водорода»;

4) нет никаких оснований предполагать существование полифенолоксидазы, которая окисляла бы только полифенолы и полиамины.

29 мая 1912 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бах совм. со Збарским. *Biochem., Zs.*, **34**, 473 (1911); настоящая книга, стр. 446.
2. Bertrand. *C. R. Acad. Sci., Paris*, **115**, 340 (1893); *Ann. Inst. Pasteur*, **21**, 673 (1907).
3. Bertrand. *C. R. Acad. Sci., Paris*, **124**, 1355 (1897); *Bull. Soc. Chim.*, **17**, 152 (1897).
4. Wolff. *Contribution à la conaissance des phén. oxydases art. et nat.* (1910).
5. *L. c.*, стр. 51.
6. Weinland u. Binder. *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **45**, 148 (1912).
7. Bourquelot. *Soc. Biol.*, 896 (1896).
8. Исаев. *Zs. physiol. Chem.*, **45**, 331 (1904).
9. Aso. *Beih. z. Bot. Zbl.*, **15**, 308 (1903).
10. Lehman u. Sano. *Arch. Hyg.*, **67**, 99 (1908).
11. *L. c.*, стр. 77.
12. Rossell. *Über. Nachw. u. Verbreit. intracell. Ferm.* (1901). Strassburg.
13. Kastle. *Bull. Hyg. Lab. Washington*, 1906, No 26 (1906).
14. Vernon. *J. Physiol.*, **42**, 402 (1911).
15. Бах. *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **43**, 362 (1910); настоящая книга, стр. 439.
16. Battelli u. a. *Ergebn. Physiol.*, **12**, 96—268 (1912).
17. Bertrand. *C. R. Acad. Sci., Paris*, **120**, 266 (1895).
18. Bourquelot. *C. R. Acad. Sci., Paris*, **123**, 375 (1897).

---

## ОБРАЗОВАНИЕ АЗОТИСТОЙ КИСЛОТЫ В РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТАХ ПУТЕМ ОКИСЛЕНИЯ

[*Oxydative Bildung von Salpetrigsäure in Pflanzenextrakten*] \*

В связи с некоторыми опытами, поставленными с целью выяснения вопроса об устойчивости растительной пергидридазы в растворах, я подтвердил сделанное Мазе<sup>1</sup> интересное наблюдение, что в растительных экстрактах в присутствии воздуха самопроизвольно образуется азотистая кислота.

Шенбейн уже наблюдал, что в картофельном соке образуются при длительном хранении нитриты и объяснил это восстановлением нитратов, содержащихся в соке. Мазе установил, что в стерильных растительных экстрактах, нагретых в течение 5 минут при 105°, получается при доступе воздуха уже через несколько дней отчетливая реакция на азотистую кислоту. В отсутствие воздуха реакция не наблюдается. Мазе считает, что азотистая кислота непрерывно образуется в живой клетке, и приписывает ей существенную роль в процессе дыхания, высказывая предположение, что «дыхательное сгорание представляет собою окисление белковых веществ протоплазмы, происходящее под действием азотистой функции, вероятно связанной с самой молекулой белка».

Для того чтобы выяснить условия образования азотистой кислоты в картофельном экстракте путем окисления, я поставил следующие опыты.

Порции по 100 см<sup>3</sup> картофельного сока, приготовленного описанным выше способом, путем обработки растертой массы 2%-ным раствором фтористого натрия, были поставлены в следующие условия: I — оставлены при комнатной температуре (14—18°) в большой склянке, закрытой пробкой с трубкой с натронной известью; II — нагреты до кипения и затем оставлены, как в I опыте; III — помещены в маленькие склянки с притертыми пробками, сохранявшиеся в отсутствие воздуха под водой при комнатной температуре. Через определенные промежутки времени содержание нитрита в пробках определялось описанным ранее способом. Результаты сведены в нижеследующей таблице (см. стр. 463).

Другие опыты дали совершенно одинаковые результаты. Из этих данных вытекает, что:

1. Первоначальный экстракт совершенно не содержит нитритов, что совпадает с данными Молиша<sup>2</sup>, согласно которым свежие растения не содержат нитритов.

2. Образование азотистой кислоты обуславливается не восстановлением случайно находящихся в экстракте нитратов, ибо для восстановления

---

\* Biochem. Zs., 52, 418 (1913).

| Время<br>(в днях) | $\text{N}_2\text{O}_5$ в 100 $\text{cm}^3$ (в мг) |         |          | Время<br>(в днях) | $\text{N}_2\text{O}_5$ в 100 $\text{cm}^3$ (в мг) |         |          |
|-------------------|---------------------------------------------------|---------|----------|-------------------|---------------------------------------------------|---------|----------|
|                   | Опыт I                                            | Опыт II | Опыт III |                   | Опыт I                                            | Опыт II | Опыт III |
| 0                 | 0                                                 | 0       | 0        | 10                | 4.42                                              | 0.13    | 0        |
| 1                 | 0                                                 | 0       | 0        | 15                | 3.72                                              | 0.34    | 0        |
| 2                 | 0.08                                              | 0       | 0        | 20                | 2.41                                              | 0.48    | 0        |
| 4                 | 0.50                                              | 0       | 0        | 25                | 1.52                                              | 0.60    | 0        |
| 6                 | 1.85                                              | Следы   | 0        | 30                | 0.62                                              | 0.71    | 0        |
| 8                 | 3.51                                              | 0.10    | 0        |                   |                                                   |         |          |

присутствие кислорода ни в коем случае не является решающим; образование азотистой кислоты, таким образом, основано на окислительном процессе.

3. Окислительное образование азотистой кислоты происходит в нагретых до кипения экстрактах значительно медленнее, чем в нормальных.

4. Образовавшаяся азотистая кислота постепенно разлагается, как это уже наблюдалось Мазе.

Что образование кислоты основано на окислении аминосоединений, содержащихся в экстракте, почти очевидно. Однако сомнительно, что здесь имел место простой окислительный процесс, как это, по видимому, допускает Мазе. С одной стороны, картофельный экстракт содержит большие количества оксидаз (фенолазы и тирозиназы), которые окисляют именно аминосоединения. Присутствие оксидаз легко обнаруживается по быстрому почернению некипяченого экстракта в присутствии воздуха, в то время как кипяченый экстракт в тех же условиях дает очень слабое окрашивание, а активный сок, сохраняющийся в отсутствие воздуха, совершенно не окрашивается. С другой стороны, образование азотистой кислоты в кипяченом соке, в котором оксидазы более или менее разрушены, происходит значительно медленнее, чем в нормальном. Поэтому весьма вероятно, что мы здесь имеем дело с окислительным процессом, который сам по себе протекает чрезвычайно медленно и значительно ускоряется под действием оксидаз. В образовании азотистой кислоты в нормальном соке, по видимому, играют роль факторы, которые исключаются либо при кипячении экстракта, либо при осаждении оксидаз.

Мазе объясняет неоднократно упоминавшуюся способность растительных объектов выделять йод из подкисленного иодистого калия, предположив наличие азотистой кислоты в каждой живой клетке. Аналогичное объяснение было высказано уже 10 лет тому назад Асо<sup>3</sup>, в противоположность утверждению Баха и Шода<sup>4</sup>, что оксидаза, вызывающая посинение гваяковской настойки (фенслаза), — тождественна с действующим началом, обуславливающим выделение йода в растениях. Тождественность эта вытекает из следующих данных:

1. Между гваяковой и иодокрахмальной реакцией в свежих растительных объектах наблюдается полный параллелизм в отношении локализации окислительного начала и интенсивности окислительных процессов.

2. Из грибов, содержащих оксидазу, можно приготовить термолабильный препарат, обладающий, наряду с обычными реакциями оксидазы, способностью выделять йод из подкисленного иодистого калия.

Против этих выводов Асо возражал, что сок, приготовленный им из *Sagittaria sagittifolia*, который давал как гваяковую, так и иодокрахмальную реакцию, после кипячения не вызывал уже посинения гваяковой настойки, но выделял йод из иодистого калия. Сок содержал нитриты, в то время как сам исходный материал (лук), согласно Асо, нитритов не содер-

жал. Это дало Асо повод предположить, что выделение иода свежими растениями также обуславливается нитритами.

Предположение Асо—Мазе не выдерживает критики уже по одному тому, что не удастся обнаружить азотистой кислоты ни в свежих растениях, ни в свежеприготовленных растительных соках, в то время как эти объекты довольно быстро вызывают выделение иода из иодистого калия. Против этого предположения можно далее выдвинуть тот факт, что пероксидаза чрезвычайно ускоряет окисление иодистоводородной кислоты перекисями. Ввиду того что система «пероксидаза — перекись» тождественна с фенолазой во всех своих действиях, надо приписать также и выделение иода из подкисленного иодистого калия действию фенолазы. Предположение о роли нитритов было окончательно опровергнуто Шода и Бахом<sup>5</sup>, приготовившими из грибов (*Lactarius vellereus*) фенолазу, которая не давала реакцию на нитриты, но энергично окисляла иодистый калий.

Я недавно повторил этот опыт с теми же результатами. Поэтому не может быть сомнения, что способность выделять иод из иодистоводородной кислоты присуща обычной фенолазе. Во всяком случае, можно было бы согласовать взгляды Асо—Мазе с фактами, если бы сделать дополнительное предположение, что при действии кислорода на фенолазу или перекиси на пероксидазу (оба фермента всегда содержат азот) появляется «азотистая функция», которая окисляет иодистый калий. Однако это дополнительное предположение, которое уже рассматривалось Шода и Бахом (*l. c.*), пока ничем не обосновано.

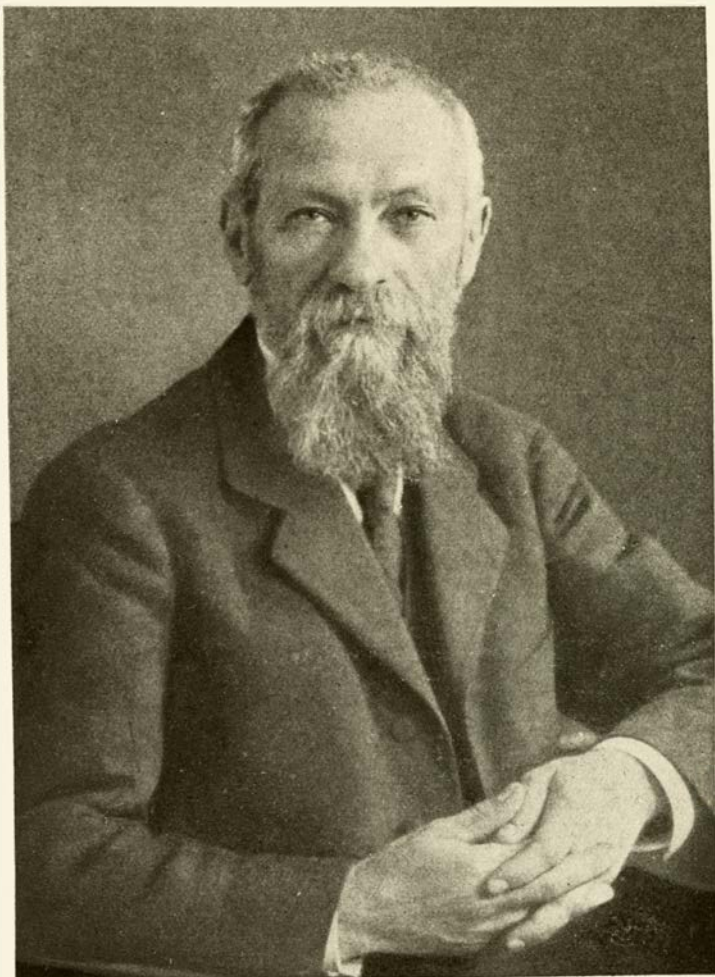
На вопрос о том, вызывается ли выделение иода из подкисленного иодистого калия фенолазой как таковой или специфической «иодидазой» (Рациборский), я считаю возможным ответить в смысле отсутствия специфичности у этих ферментов. С одной стороны, несмотря на все попытки, до сих пор не удалось никакими физическими или химическими методами разделить на специфические части фенолазу и соответствующую ей пероксидазу или окончательно приостановить какую-либо одну из функций этих ферментов. С другой стороны, явления специфичности, из которых можно было бы сделать вывод о существовании специфических фенолаз (гваяколаза, орсиаза), могут быть сведены к чрезвычайно простым условиям опыта<sup>6</sup>.

Предположение, что фенолаза или соответствующая ей пероксидаза являются смесью специфических ферментов, лишено какого бы то ни было экспериментального основания. При современном состоянии наших сведений мы должны, таким образом, допустить, что фенолаза, как таковая (или система «пероксидаза — перекись») вообще способна действовать только на водород определенной лабильности. Связан ли этот лабильный водород с атомом азота, как в аминах, с атомом кислорода, как в фенолах, или с атомом иода, как в иодистоводородной кислоте, не составляет для наличия окислительного процесса никакой разницы.

5 июня 1913 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Mazé. C. R. Acad. Sci., Paris, **153**, 357 (1911)
2. Molisch. Monatsh. f. Chem., **8**, 237.
3. Aso. Beitr. z. Bot. Zbl., **15**, 208 (1903).
4. Бах совм. с Шода. Ber. Dtsch. Chem. Ges., **35**, 2466 (1902); настоящая книга, стр. 344.
5. Бах совм. с Шода. Ber. Dtsch. chem. Ges., **37**, 36 (1904); настоящая книга, стр. 359.
6. Бах совм. с Марианович. Biochem. Zs., **42**, 417 (1912); настоящая книга, стр. 452.



А. Н. БАХ  
(1916 г.)



---

## О ХИМИЗМЕ ДЕЙСТВИЯ ТИРОЗИНАЗЫ

[*Ueber das Wesen der sogenannten Tyrosinasewirkung*] \*

Как известно, тирозиназа занимает среди ферментов особое место, играя роль строго специфической оксидазы по отношению к тирозину; в то же время она окисляет некоторые фенолы, как фенолаза, которая, с своей стороны, не оказывает никакого действия на тирозин. Для объяснения этой частичной специфичности были предложены различные гипотезы, но ни одна из них не соответствует фактам. В связи с опытами<sup>1</sup> над коферментом пергидридазы и гидролитическим окислением  $\alpha$ -аминокислот с образованием альдегидов непосредственно предшествующих гомологов этих кислот при одновременном восстановлении подходящих акцепторов водорода (реакция Штрекера), я подверг это загадочное действие тирозиназы детально исследованию.

Ввиду того что при действии тирозиназы на тирозин отщепляются, как и в реакции Штрекера, углекислота и аммиак, естественно было предположить, что при действии тирозиназы распад тирозина происходит отчасти гидролитически и отчасти под действием свободного кислорода<sup>2</sup>. Правильность этого предположения удалось полностью подтвердить: тирозиназа не является однородной специфической оксидазой, а представляет собою смесь обычной фенолазы и аминоксидазы, под действием которых тирозин готовится к окислению фенолазой или пероксидазой — перекись водорода.

В настоящей статье я привожу сводку результатов, полученных мною в исследованиях, которые продолжались несколько лет. Я не буду вдаваться в историю вопроса о тирозиназе и отсылаю к изложению у Оппенгеймера<sup>3</sup> и к статье Бателли и сотр.<sup>4</sup>.

### ДЕЙСТВИЕ ТИРОЗИНАЗЫ ОХВАТЫВАЕТ ДВА РАЗЛИЧНЫХ ПРОЦЕССА, КОТОРЫЕ МОЖНО РАЗДЕЛИТЬ ВО ВРЕМЕНИ: ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ И ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЙ ПРОЦЕССЫ

Все авторы, занимавшиеся вопросом о тирозиназе, приходят к выводу, что тирозиназа не оказывает заметного действия на тирозин в отсутствии кислорода. Но что при действии тирозиназы наряду с окислительным процессом происходит вполне определенный восстановительный процесс, насколько мне известно, до сих пор еще никем не высказывалось. Этот восстановительный процесс можно выявить следующим образом.

---

\* Biochem. Zs., 60, 221 (1914).

При действии тирозиназы на тирозин в присутствии воздуха образуются, как известно, окрашенные в красный цвет продукты окисления, которые принимают красно-коричневое, затем фиолетовое окрашивание и в заключение выпадают в виде черного осадка, нерастворимого в щелочах, кислотах и органических растворителях. Если действовать тирозиназой на тирозин на воздухе до получения интенсивного красного окрашивания и затем заменить в приборе воздух азотом или углекислотой, то через некоторое время наступает полное обесцвечивание реагирующей смеси. Если взболтать ее на воздухе, то она медленно вновь окрашивается в красный цвет. Если проводить опыт при 35—40°, то можно в короткий срок наблюдать чередующиеся окисление и восстановление. Восстановление красного продукта окисления не вызывается здесь бактериями, как это видно из того, что опыт можно провести с таким же успехом в 2%-ном растворе фтористого натрия, т. е. при вполне антисептических условиях.

Тот же восстановительный процесс имеет место при действии тирозиназы на паракрезол в присутствии  $\alpha$ -аминокислот. Шода<sup>5</sup> и Абдергальден и Гугенгей<sup>6</sup> сделали интересное для понимания механизма образования красителей в растениях наблюдение, что смесь паракрезола и аминокислот окисляется тирозиназой с образованием различных красителей. Так, например, смесь паракрезола и гликола постепенно окрашивается под действием тирозиназы в интенсивный красный цвет; затем жидкость самопроизвольно обесцвечивается и принимает в заключение синий или синекрасный цвет. Это обесцвечивание образующегося сначала красного продукта окисления можно объяснить перекрыванием окислительного процесса восстановительным. Действительно, если взболтать обесцвеченную смесь на воздухе, то она вновь окрашивается в красный цвет. Эту операцию можно повторять много раз с тем же результатом, если только гликокол имеется в достаточном количестве.

Так как при окислении фенолазой пирогаллола, гидрохинона и т. д. не происходит восстановления образующихся окрашенных продуктов окисления, то наличие восстановительного процесса при действии тирозиназы можно рассматривать как доказательство того, что при действии тирозиназы на тирозин наступает гидролитический окислительно-восстановительный процесс.

#### ФЕНОЛАЗА ЯВЛЯЕТСЯ НОРМАЛЬНОЙ СОСТАВНОЙ ЧАСТЬЮ ТИРОЗИНАЗЫ

Легко приготовить препараты фенолазы, не оказывающие никакого действия на тирозин. Препаратов тирозиназы, совершенно не содержащих фенолазы, приготовить мне не удалось, несмотря на все усилия. Моя коллекция ферментов содержит семнадцать различных препаратов тирозиназы, приготовленных в различное время и различными методами из грибов (*Russula delica* и *Lactarius vellereus*) и картофельной кожуры. Все эти препараты окисляют не только тирозин, но также в большей или меньшей степени пирогаллол, пирокатехин и гидрохинон.

Согласно Бертрану<sup>7</sup>, можно приготовить из *Russula delica* препараты, совершенно не содержащие фенолазы, если экстрагировать грибы водой, насыщенной хлороформом, и затем прибавлять к экстрактам  $1\frac{1}{2}$  объема спирта. Образующийся осадок вновь экстрагируется водой, насыщенной хлороформом, и осаждается спиртом. Приготовленный таким образом препарат энергично окисляет тирозин, но не окисляет пирогаллола и гидрохинона.

Эти данные мне не удалось подтвердить. Если подвергать сок из *Rus-*



*sula* фракционированному осаждению спиртом в присутствии сернокислого магния<sup>8</sup> (см. стр. 439), причем легко получить любое число фракций в короткий промежуток времени, то все фракции, как низшие, так и высшие, содержат тирозиназу и фенолазу. Я подверг низшие фракции (от  $1/2$  до  $1\frac{1}{2}$  объема спирта) повторному фракционированию, но мне не удалось достигнуть разделения тирозиназы и фенолазы. Следует отметить, что высшие фракции чрезвычайно слабо действуют на гваяковую эмульсию и гваякол или совершенно на них не действуют, в то время как первоначальный сок *Russula* энергично их окисляет. Но здесь имеет место не прекращение действия фенолазы, а только неблагоприятное для окисления этих субстратов изменение содержания солей в препаратах. Как велико влияние содержания солей в реагирующей смеси на действие фенолазы, видно из следующего опыта.

Приготовляют два 2%-ных раствора гваякола: 1) в чистой дистиллированной воде и 2) в водопроводной воде. Если прибавить к обоим растворам равные количества фенолазы, то наблюдается, что окисление гваякола наступает во второй пробе значительно позже, чем в первой, или даже совершенно не наступает. Если прибавить к оставшейся бесцветной пробе немного уксусной или лимонной кислоты, то наступает нормальное окисление субстрата. Вполне аналогично ведет себя фенолаза при окислении гваяковой эмульсии, но содержание соли в водопроводной воде не оказывает заметного влияния на окисление пирогаллола и гидрохинона фенолазой. Бах и Збарский<sup>9</sup> и Бах и Марианович<sup>10</sup> установили в многочисленных опытах, что влияние кислот и солей на действие фенолазы зависит от природы субстратов. Следует еще отметить, что в многочисленных препаратах тирозиназы, которые не оказывают видимого действия на гваякол, окисление начинается при прибавлении следов уксусной кислоты.

Если приготовить тирозиназу из грибов, оксигеназа которых довольно устойчива, то препарат содержит в большей или меньшей степени неизменную «цельную» фенолазу (пероксидаза + оксигеназа). Если, наоборот, применять для приготовления тирозиназы растения, оксигеназа которых легко изменяется, как это наблюдается для большинства явнотрачных, то большая часть оксигеназы разлагается, и препарат тирозиназы содержит избыток пероксидазы, в чем легко убедиться при помощи известных реакций пероксидазы.

Бертран и Муттермилх<sup>11</sup> приготовили из пшеничных отрубей тирозиназу, не содержащую фенолазы. Я повторил эти опыты и получил следующие результаты.

Свежие экстракты из пшеничных отрубей дают реакции на тирозиназу и фенолазу. Если подвергнуть экстракт фракционированному осаждению спиртом в присутствии сернокислого магния, то верхние фракции (от 2 до 3 объемов спирта) дают на фенолазу слабую реакцию или не дают ее вовсе, хотя они и окисляют тирозин, но довольно медленно. Все препараты содержат большие количества пероксидазы. Содержание в них пероксидазы настолько велико, что можно рекомендовать пшеничные отруби как легко доступный материал для приготовления этого фермента. Как известно, частично или полностью разрушенная оксигеназа может быть заменена для появления действия фенолазы перекисью водорода. Поэтому весьма интересен тот факт, что действие на тирозин тирозиназы из отрубей значительно ускоряется перекисью водорода. В присутствии оксигеназы и перекиси водорода пероксидаза принимает участие в окислении продуктов распада тирозина в том отношении, что последние легко поглощают кислород и, следовательно, образуют перекиси, дальнейшее превращение которых ускоряется ферментом (см. дальше).

Шода и Швейцер<sup>12</sup> указывают, что тирозиназа, приготовленная из

картофельной кожуры по методу Шода и Штауба, не содержит фенолазы. Препарат, приготовленный в точности по описанному ими методу, оказался слабой тирозиназой; однако он окислял также пирогаллол и содержал избыток пероксидазы. В соответствии с этим, окисление тирозина и в этом случае ускорялось перекисью водорода, как я доказал это уже несколько лет тому назад<sup>13</sup>.

На основании всех этих фактов я считаю возможным утверждать, что фенолаза и пероксидаза являются нормальной составной частью тирозиназы и обуславливают окисление продуктов распада тирозина посредством свободного кислорода.

#### **ВО ВРЕМЯ ПЕРВОЙ СТАДИИ ДЕЙСТВИЯ ТИРОЗИНАЗЫ ИЗ ТИРОЗИНА ОБРАЗУЮТСЯ ПРОДУКТЫ, КОТОРЫЕ ЛЕГКО ОКИСЛЯЮТСЯ ФЕНОЛАЗОЙ ИЛИ ПЕРОКСИДАЗОЙ С ПЕРЕКИСЬЮ**

Как было упомянуто выше, красный продукт, образующийся первоначально при действии тирозиназы на тирозин в присутствии воздуха, обесцвечивается при замене воздуха азотом. Если с целью разрушения фермента нагреть бесцветную реакционную смесь до кипения и после охлаждения прибавить пероксидазу (из хрена) и перекись водорода, то смесь немедленно приобретает коричнево-черно-фиолетовое окрашивание, характерное для более поздних стадий действия тирозиназы. Этот опыт можно с таким же результатом провести в течение нескольких минут следующим образом.

Раствор тирозина, насыщенный при нагревании и охлажденный до 40°, взбалтывается на воздухе с активной тирозиназой. Он окрашивается при этом в течение 5—10 мин., в интенсивно-красный цвет. Красный раствор обесцвечивается затем кипячением, охлаждается и смешивается с пероксидазой и перекисью водорода. В зависимости от отношения концентраций, полученное окрашивание колеблется от светлорозового до черно-фиолетового. Избыток перекиси водорода обесцвечивает продукт реакции, так же как перманганат калия в кислом растворе.

Если применять фенолазу, не содержащую тирозиназы, вместо пероксидазы с перекисью водорода, то наблюдаются те же самые изменения окрашивания, но реакция протекает значительно медленнее, как это всегда имеет место и для фенолазы, которая не содержит готовой перекиси.

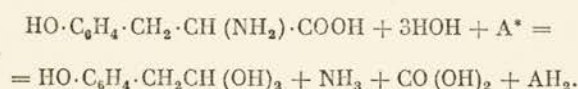
При предварительной обработке тирозиназой в указанных условиях только незначительная часть имеющегося тирозина становится доступной окислению фенолазой или пероксидазой с перекисью водорода. В обоих случаях реакция скоро приостанавливается и дает едва заметные количества меланина. Если прибавить затем в реагирующую смесь свежую тирозиназу, то происходит дальнейшее превращение и окисление незатронутого тирозина с образованием значительного осадка меланина. То же самое явление можно также показать наглядно, если обработать предварительно тирозин указанным выше способом тирозиназой и провести с обесцвеченной реагирующей смесью сравнительные опыты окисления посредством свежей тирозиназы, фенолазы и пероксидазы с перекисью водорода.

Обесцвеченная реагирующая смесь не вполне индифферентна к свободному кислороду, ибо при длительном стоянии на воздухе она приобретает окрашивание, аналогичное тем, которые получаются при действии фенолазы или пероксидазы с перекисью водорода, и дает в заключение незначительные количества меланина. Таким образом, мы имеем здесь дело с реакцией, которая сама по себе протекает медленно и ускоряется под действием фенолазы. Так как тирозин не изменяется заметно при стоянии

на воздухе ни сам по себе, ни в присутствии фенолазы, то напрашивается вывод, что во время первой стадии действия тирозиназы он распадается на более простые, способные окисляться под действием фенолазы продукты.

Относительно природы этих продуктов можно сделать следующие замечания.

Шода и Швейцер<sup>14</sup> сделали недавно существенное наблюдение, что гликокол окисляется тирозиназой из кожуры картофеля с образованием формальдегида, углекислоты и аммиака. В связи с опытами, которые я провожу в настоящее время по вопросу о ферментативном ускорении образования альдегидов из аминокислот, я повторил и подтвердил опыты Шода и Швейцера. Правильность этих наблюдений была также подтверждена Киблом, Франкландом Армстронгом и Джонсом<sup>15</sup>. Этим доказывается, что в основе действия тирозиназы лежит гидролитический распад аминокислот согласно реакции Штрекера. В соответствии с этим при действии тирозиназы на тирозин должен в первую очередь образовываться параоксифенилацетальдегид наряду с углекислотой и аммиаком:



Если это предположение правильно, то при действии фенолазы или пероксидазы с перекисью водорода на параоксифенилацетальдегид должны образовываться те же продукты окисления, которые образуются при действии тирозиназы на тирозин. Вследствие малой доступности параоксифенилацетальдегида мне до сих пор не удалось определить действия на него этих окислителей. Опыты с предшествующим гомологом, параоксифенилформальдегидом (параоксисбензальдегидом), дали интересные результаты.

Сначала я пробовал окислить пероксидазой с перекисью водорода параоксисбензальдегид (Кальбаум) в 1%-ном растворе, но не наблюдал при этом ни малейшего окисления. Так как в реакции Штрекера отщепляется аммиак, то я пытался далее провести окисление в присутствии ничтожных количеств аммиака. Уже через несколько минут реагирующая смесь окрасилась в розово-красный цвет, затем в темнокрасный и, наконец, в красно-коричневый с фиолетовым оттенком. Эти окрашивания наблюдаются при действии тирозиназы на тирозин. В отсутствие перекиси водорода окисление не происходит, в отсутствие пероксидазы оно протекает с неизмеримо малой скоростью.

Опыт здесь, повидимому, полностью соответствует теоретическим предположениям. Надо упомянуть, что в контрольных опытах с фенолазой в присутствии аммиака не было достигнуто такого же окисления параоксисбензальдегида. Причина этой аномалии еще не определена мною. По всей видимости, прибавление аммиака отравляет оксигеназу, содержащуюся в фенолазе, ибо при прибавлении перекиси водорода наблюдаются те же изменения окрашивания, как и при применении пероксидазы. Что фенолаза значительно более чувствительна к аммиаку, чем пероксидаза, было доказано Збарским<sup>16</sup>.

Как бы то ни было, несомненно, что при действии тирозиназы на тирозин образуются продукты, которые легко окисляются фенолазой или пероксидазой с перекисью водорода, в то время как эти же окислители не оказывают никакого действия на исходный тирозин.

\* А — акцептор водорода.

### ПОДГОТОВКА ТИРОЗИНА К ОКИСЛЕНИЮ ФЕНОЛАЗОЙ ПРОИЗВОДИТСЯ ФЕРМЕНТОМ

Что касается того агента, посредством которого тирозин распадается на продукты, легко поддающиеся действию фенолазы, то я не могу еще сказать о нем ничего точного: он термолабилен, ибо раствор тирозиназы, нагретый до  $70^{\circ}$ , не оказывает ни малейшего действия на тирозин ни сам по себе, ни после прибавления фенолазы или пероксидазы с перекисью водорода. Поэтому, согласно обычным представлениям, мы должны рассматривать его как фермент.

Как я уже доказал<sup>17</sup> несколько лет тому назад количественными опытами, для действия фермента необходимо присутствие свободного кислорода. Оказалось, в частности, что предварительная обработка тирозина тирозиназой в атмосфере водорода при  $25^{\circ}$  в течение 24 часов не оказывает заметного влияния на скорость последующего окисления тирозина в присутствии воздуха. В отсутствие кислорода, таким образом, не происходит заметного распада тирозина. Если оставшаяся бесцветная реагирующая смесь кипятится с целью разрушения тирозиназы и после охлаждения смешивается с фенолазой или пероксидазой с перекисью водорода, то окисления совершенно не происходит.

Недавно опубликованные мною опыты<sup>18</sup> по образованию альдегидов из аминокислот дают некоторые указания на значение кислорода для действия фермента. При реакции Штрекера акцептор водорода (аллоксан, бензохинон) постепенно восстанавливается освобождающимся при расщеплении воды водородом. Начало реакции не зависит от присутствия или отсутствия кислорода. Только после полного восстановления акцептора водорода начинается действие кислорода, который окисляет восстановленный акцептор с возрождением первоначального соединения (гидрохинон в хинон) и роль которого для дальнейшего хода реакции является решающей. Что кислород необходим уже в начале действия тирозиназы, объясняется тем, что этот фермент не содержит готового акцептора водорода; в атмосфере водорода не происходит ни малейшего превращения тирозина под действием тирозиназы, в то время как при равных условиях расщепление аланина бензохиноном легко доказать. Наиболее соответствует фактам то предположение, что под влиянием кислорода образуется акцептор водорода, который попеременно восстанавливается водородом воды и окисляется свободным кислородом (вероятно, при содействии фенолазы) и обуславливает гидролитическое окисление тирозина.

Принимая во внимание, что гидролитический фермент, содержащийся в тирозиназе, действует, кроме тирозина, на гликокол и другие аминокислоты, я предлагаю называть его «аминоацидазой».

### ВЫВОДЫ

Из приведенных выше данных вытекает, что:

I. При действии тирозиназы на тирозин происходит энергичный восстановительный процесс.

II. Тирозиназа всегда содержит фенолазу или пероксидазу.

III. При действии тирозиназы на тирозин образуются продукты, которые легко окисляются фенолазой.

IV. Наконец, из того, что в предварительной подготовке тирозина для окисления фенолазой участвует фермент, вытекает, что фермент, называвшийся до сих пор тирозиназой, не является однородной специфической оксидазой, а состоит из фермента (аминоацидазы), под действием которого

тирозин распадается гидролитически на более легко окисляемые продукты, и из обычной фенолазы, которая окисляет дальше эти продукты распада.

Наличие восстановительного процесса при действии тирозиназы подтверждается теорией Палладина<sup>19</sup> о дыхательных ферментах, согласно которой хромогены, содержащиеся в живых организмах, попеременно окисляются кислородом воздуха при содействии оксидаз (с образованием пигментов) и восстанавливаются водородом в исходные вещества. Значение этих представлений для понимания гидролитических окислительно-восстановительных процессов, происходящих в живых организмах, было уже указано мною<sup>20</sup>.

Тот факт, что тирозиназа является смесью аминоксидазы и фенолазы, подтверждает далее высказанное несколько лет тому назад Матюзом<sup>21</sup> предположение, что ферменты, которые до сих пор называли оксидазами, охватывают два класса ферментов: один из них обуславливает активацию кислорода, а другой, значительно более важный, вызывает расщепление субстратов на различные молекулы, обладающие восстановительными свойствами. Ферменты второго рода рассматриваются Матюзом скорее как восстановительные ферменты, и он приписывает им определенную специфичность, в то время как сами оксидазы никакой специфичностью не обладают.

Предвзято бы большой интерес исследовать подробнее с точки зрения взглядов Матюзы так называемые специфические оксидазы (алкоголь-оксидаза, урикооксидаза и ксантинооксидаза).

2 февраля 1914 г.

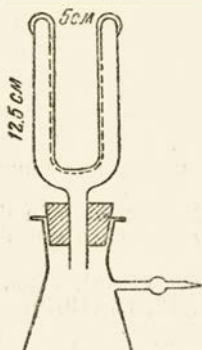
#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бах. *Biochem. Zs.*, **38**, 154 (1912); **52**, 412; **58**, 205 (1913); настоящая книга, стр. 501.
2. Бах. Окислительные процессы в живых тканях. [Oxydationsprozesse in der lebenden Substanz].—Oppenheimer Handb. d. Biochemie, der Menschen und der Tiere, Ergänzungsband 133 (1913). Jena.
3. Oppenheimer. «Die Fermente und ihre Wirkungen», 4-е изд. (1913). Jena.
4. Battelli u. a. «Die Oxydationsfermente».—*Ergebn. Physiol.*, **12**, 96 (1912).
5. Chodat. *Arch. Sci. phys. nat.*, **32**, 225 (1912).
6. Abderhalden u. Guggenheim. *Zs. physiol. Chem.*, **54**, 331 (1908).
7. Bertrand. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **23**, 460 (1886).
8. Бах. *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **43**, 362 (1910); настоящая книга, стр. 439.
9. Бах совм. со Збарским. *Biochem. Zs.*, **34**, 473 (1911); настоящая книга, стр. 446.
10. Бах совм. с Марианович. *Biochem. Zs.*, **42**, 417 (1912); настоящая книга, стр. 452.
11. Bertrand et Muttermilch. *Bull. Soc. Chim.*, **I**, 837, 1048 (1907).
12. Chodat et Schweizer. *Arch. Sci. phys. nat.*, **34**, 140 (1913).
13. Бах. *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **39**, 2126 (1906); настоящая книга стр. 407.
14. Chodat et Schweizer. *Arch. Sci. phys. nat.* **34**, 140 (1913).
15. Keeble, Frankland, Armstrong a. Jones. *Proc. Roy. Soc.*, **87**, 193 (1913).
16. Збарский. «De l'influence des acides et des alcalis sur la phenolase et la peroxydase» (1911). Genève. Диссертация.
17. Бах. *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **42**, 594 (1909); настоящая книга, стр. 433.
18. Палладин. *Biochem. Zs.*, **58**, 205 (1913); настоящая книга, стр. 507.
19. Палладин. *Biochem. Zs.*, **18**, 151 (1900).
20. Бах. *Oppenheimer Handb. d. Biochemie, Ergänzungsband*, 180.
21. Mathews. *J. Biol. Chem.*, **6**, 1 (1872).

## ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ РЕАКЦИИ ПЕРОКСИДАЗЫ

[*Empfindlichkeit der Peroxydasereaktion*] \*

В связи с некоторыми опытами (см. следующую статью), которые я провожу в настоящее время, мне пришлось возможно лучше очистить от посторонних примесей, в частности от минеральных солей, препарат пероксидазы, приготовленный обычным методом из хрена. Так как диализ не давал удовлетворительных результатов<sup>1</sup>, я попытался применить ультрафильтр для интенсивной очистки пероксидазы. Полученный препарат оказался чрезвычайно активным, и поэтому я считал желательным определить на нем предел чувствительности реакции пероксидазы, поскольку до сих пор по этому вопросу не имеется никаких данных.



Препарат был приготовлен следующим образом.

2 кг хрена, измельченного в мясорубке, были растерты с 1 л воды и оставлены на 48 часов, после чего масса была отжата и к полученному соку (1200 см<sup>3</sup>) был прибавлен равный объем 98%-ного спирта. Через 24 часа жидкость была профильтрована, и прозрачный фильтрат, содержащий главную часть пероксидазы, осажден трехкратным объемом спирта. Отфильтрованный осадок был высушен после промывания спиртом в вакууме над хлористым кальцием. Сухой осадок (2.15 г) был растворен в 200 см<sup>3</sup> воды; прозрачный отфильтрованный раствор подвергнулся ультрафильтрации.

Для этой операции применялся очень простой прибор, изображенный на приведенном рисунке.

В качестве ультрафильтра применялся полотняный мешочек, пропитанный коллодием и плотно входящий в изображенную на рисунке воронку, во внутренней части которой были сделаны отверстия. В предварительных опытах была установлена толщина слоя коллодия, который не пропускает коллоидального фермента. Ультрафильтр герметически присоединялся к верхней части воронки парафином.

В этом приборе раствор пероксидазы отфильтровывался и затем многократно промывался стерилизованной водой, к которой был прибавлен толуол, до тех пор пока объем ультрафильтрата не составил 1 л. При давлении в 100 мм ультрафильтр пропускал не более 50 см<sup>3</sup> в 24 часа, так что вся операция потребовала около 3 недель. Так как в последних ультрафильтрациях было довольно значительное количество пероксидазы, промывание было прекращено; остающееся на ультрафильтре небольшое количество

\* Ber. Dtsch. chem. Ges., 47, 2122 (1914).

вещества было растворено в 100 см<sup>3</sup> воды и профильтровано через бумажный фильтр для отделения нерастворимых частей.

Таким образом, был получен совершенно прозрачный раствор, в котором наблюдалась едва заметная опалесценция в толстом слое. Так как по результатам предварительных опытов нельзя было ожидать хороших результатов при выделении пероксидазы путем осаждения спиртом, содержание сухого вещества в растворе определялось следующим образом. Осадок, полученный из 20 см<sup>3</sup> раствора выпариванием досуха, высушивался до постоянного веса при 100° и взвешивался. Из 20 см<sup>3</sup> раствора пероксидазы было получено 0.0254 г = 0.127% сухого вещества.

Пероксидаза, очищенная ультрафильтрованием, была значительно активнее, чем препарат, приготовленный Бахом и Черняком<sup>1</sup> путем трудоемкой очистки 50 г сырой пероксидазы комбинированным методом осаждения основным уксуснокислым свинцом и последующего диализа. Приготовленная первоначально Бахом и Шоода<sup>2</sup> пероксидаза давала при окислении пирогаллола только 2 мг пурпурогалина на 1 мг фермента, приготовленная Бахом и Черняком — 36 мг, ультрафильтрованная — 98 мг (см. следующее сообщение).

Для определения предела чувствительности реакции пероксидазы наиболее удобно использовать окисление гваякола, ибо этот субстрат не окисляется заметно перекисью водорода, без участия катализатора. При применявшихся концентрациях реактив остается совершенно бесцветным даже после хранения в течение нескольких дней, в отличие от пирогаллола и гидрохинона. Опыты были проведены следующим образом.

1 см<sup>3</sup> (= 0.00127 г сухого вещества) очищенного ультрафильтрованием раствора был разбавлен до 1 л. Последующими разбавлениями были приготовлены растворы, содержащие 0.0001—0.000001 мг пероксидазы на 1 см<sup>3</sup>. Эти растворы (в количестве 1 см<sup>3</sup>) смешивались с 8 см<sup>3</sup> 0.1%-ного раствора гваякола и 1 см<sup>3</sup> 0.1%-ного раствора перекиси водорода. При разбавлении одной части пероксидазы в 500 миллионов частей жидкости реактив давал уже по истечении 5 минут довольно интенсивное красно-коричневое окрашивание. При разбавлении 1 : 1000 миллионов через 20 минут наступает отчетливое, постепенно увеличивающееся коричнево-красное окрашивание. Если оставить пероксидазу на 24 часа, то можно очень легко обнаружить одну часть пероксидазы в 2 биллионах частей воды. Поскольку я не могу претендовать на то, что приготовленный мною препарат был химически чистым, — он безусловно содержал еще посторонние коллоиды, — предел чувствительности пероксидазы лежит еще значительно ниже.

Таким образом, пероксидазу можно считать одним из самых чувствительных катализаторов.

10 июня 1914 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бах совм. с Черняком. *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **41**, 2345 (1908); настоящая книга, стр. 429.
2. Бах совм. с Шоода. *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **36**, 600 (1903); настоящая книга, стр. 349.

## ВЫХОД ПУРПУРОГАЛИНА ПРИ ОКИСЛЕНИИ ПИРОГАЛЛОЛА ПОСРЕДСТВОМ ПЕРОКСИДАЗЫ И ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА

[*Purpurogallinausbeuten bei der Oxydation des Pyrogallols mit Peroxydase  
und Hydroperoxyd*] \*

Ниренштейн и Спирс<sup>1</sup> занялись недавно приготовлением пурпурогалина из пирогаллола всеми известными до сих пор методами, в том числе и посредством пероксидазы и перекиси водорода, и нашли, что выход колеблется между 10 и 16%. Бах и Шода<sup>2</sup> исследовали количественно действие пероксидазы при окислении пирогаллола посредством перекиси водорода, определяя образующийся пурпурогалин, и установили, что при постоянном и избыточном количестве перекиси водорода выход пурпурогалина пропорционален количеству пероксидазы, а при постоянном избытке пероксидазы — количеству перекиси водорода. Эта пропорциональность наблюдается только до определенного предела, после которого дальнейшее прибавление пероксидазы или, соответственно, перекиси водорода не вызывает увеличения количества пурпурогалина. Этот предел соответствует, следовательно, полному использованию субстрата и указывает на максимальный выход пурпурогалина. Выходы, полученные Бахом и Шода в шести опытах, колеблются между 16.2 и 16.8% и приближаются к максимальным выходам Ниренштейна и Спирса. Штеклин<sup>3</sup> указывает на выход в 0.50 г пурпурогалина, т. е. 50%, при окислении 1 г пирогаллола посредством 0.1 г пероксидазы и 20 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора перекиси водорода. Он считает, что Бах и Шода получили значительно меньшие выходы потому, что они применяли слишком большие концентрации перекиси водорода и работали с менее чистой пероксидазой. Учитывая эти данные, мне казалось небезинтересным проверить активность очищенной путем ультрафильтрации пероксидазы (см. предшествующую статью) при окислении пирогаллола перекисью водорода.

Опыты проводились с 1 г пирогаллола, 15 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора перекиси водорода и возрастающими количествами пероксидазы одновременно: а) в 50 см<sup>3</sup> и б) в 200 см<sup>3</sup>. Образующийся пурпурогалин переводился через 24 часа на взвешенный фильтр, промывался в 100 см<sup>3</sup> воды, высушивался до постоянного веса при 105° и взвешивался. Для того чтобы условия растворимости были одинаковыми, к пробам серии а) прибавлялось за 1 час до фильтрования 150 см<sup>3</sup> воды. Полученные результаты приведены в следующей таблице (в мг):

|              | 1  |    | 2   |     | 3   |     | 4   |     | 5   |     | 6   |     |
|--------------|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Пероксидаза  | a  | b  | a   | b   | a   | b   | a   | b   | a   | b   | a   | b   |
| Пурпурогалин | 94 | 98 | 201 | 206 | 261 | 258 | 252 | 260 | 249 | 262 | 267 | 258 |

\* Ber. Dtsch. chem. Ges., 47, 2125 (1914).



В дополнение был еще поставлен опыт с большим избытком пероксидазы и с большим избытком перекиси водорода, а именно, 6 мг пероксидазы и 0.3 г перекиси водорода: а) в 50 см<sup>3</sup>, б) в 200 см<sup>3</sup>.

П о л у ч е н о: а) 261, б) 264 мг пурпуругалина.

Из этих опытов вытекает, что степень чистоты пероксидазы не является решающей для выхода пурпуругалина. Моя пероксидаза была около 20 раз активнее пероксидазы Штеклина, и все же мне не удалось достигнуть выходов выше половины выходов Штеклина. Концентрация перекиси водорода не имеет заметного влияния на выход пурпуругалина, так же как и на активность пероксидазы: при прочих равных условиях в 50 см<sup>3</sup> получались практически такие же выходы, как в 200 см<sup>3</sup>. В последнем случае пурпуругалин выпадает в виде объемистого осадка, содержащего много воды, и доводится при сушке до постоянного веса значительно медленнее, чем в первом.

В заключение я упомяну здесь еще об одной очень чувствительной реакции на пурпуругалин. Если растворить пурпуругалин в спирте или ацетоне, разбавить трехкратным объемом воды и прибавить к нему пероксидазу и перекись водорода, то смесь приобретает красивое фиолетовое окрашивание, которое постепенно исчезает и заменяется коричневым. Эта реакция позволяет определять одну часть пурпуругалина в 500 000 частей жидкости. Та же реакция получается и с фенолазой, что еще раз подтверждает неоднократно отмеченную равноценность фенолазы и системы «пероксидаза — перекись водорода».

Такое же изменение окрашивания можно наблюдать при обработке водной суспензии пурпуругалина фенолазой или пероксидазой и перекисью. Из этого вытекает, что пурпуругалин, образующийся при окислении пирагаллола, избегает дальнейшего окисления, только поскольку он выделяется в нерастворимом состоянии. Поэтому для выхода пурпуругалина решающей является, в первую очередь, скорость его выделения.

10 июня 1914 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Nierenstein u. Spiers. Ber. Dtsch. chem. Ges., 46, 3151 (1913).
2. Бах совм. с Шода. Ber. Dtsch. chem. Ges., 37, 1342 (1904); настоящая книга, стр. 365.
3. Stöcklin. Contribution à l'étude de la peroxydase (1907). Genève. Диссертация.

## СУЩЕСТВУЕТ ЛИ ПЕРОКСИДАЗА В ДРОЖЖАХ?

[*Kommt Peroxydase in Hefen vor?*] \*

Присутствие двух ферментов, пероксидазы и каталазы, характерно для мельчайших частей живого вещества. Пероксидаза ускоряет окислительное действие перекиси водорода и органических перекисей, каталаза совершенно прекращает это окислительное действие, разлагая перекись водорода на молекулярный инертный кислород и воду. О физиологическом значении этих ферментов можно еще спорить, но их биологическая повсеместная распространенность не оспаривается и неоспорима. Однако существует одно исключение. Шенбейн<sup>1</sup>, которому мы обязаны рядом чрезвычайно интересных наблюдений в этой области, уже отметил, что дрожжи представляют собой исключение из правила, согласно которому вещества, которые разлагают  $H_2O_2$  наподобие платины, вызывают также и посинение гваяковой настойки, содержащей  $H_2O_2$ . В настоящее время мы говорим, что дрожжи содержат каталазу, но не содержат пероксидазы. В течение моих исследований над окислительными ферментами я неоднократно имел случай проверять и подтвердить правильность наблюдения Шенбейна. Мне удалось<sup>2</sup> также привести доказательство и *a contrario*, установив, что незначительные количества пероксидазы, прибавленные заранее к дрожжам, легко могут быть обнаружены посредством обычных реактивов. Если растереть 1 г зимазы (ацетоновые дрожжи) с 20 см<sup>3</sup> воды и прибавить раствор гваякола и перекиси водорода, то смесь остается бесцветной. Если же прибавить к препарату дрожжей последовательно раствор гваякола, 1 каплю активного раствора пероксидазы и перекись водорода, то смесь немедленно окрашивается в красно-коричневый цвет. Окрашивание исчезает более или менее быстро, но вновь появляется при прибавлении перекиси водорода. С пирогаллолом и гидрохиноном получается аналогичный результат. Таким образом, если дрожжи не дают реакции на пероксидазу, то это потому, что в них нет этого фермента, а не потому, что реакция пероксидазы перекрывается задерживающими веществами.

В появившейся недавно работе Харден и Зильва<sup>3</sup> авторы пытаются доказать, что «активная пероксидаза» существует во всех дрожжах. В английских свежих дрожжах ее можно обнаружить непосредственно; в сухих дрожжах, а также в зимазе она обнаруживается только после отмытия задерживающих веществ, которые образуются при высушивании или при осаждении ацетоном дрожжей. Эти авторы проводят определение пероксидазы следующим образом:

10 см<sup>3</sup> взвешенных дрожжей (=0.1 г сухих дрожжей) смешиваются с 1 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора парафенилендиамина и 1 см<sup>3</sup> раствора перекиси

\* *Fermentforschung*, 1, 197 (1915); *Arch. Sci. phys. nat.*, 39, 497 (1915).

водорода (10-кратное разбавление 3%-ного раствора  $H_2O_2$ , нейтрализованного на лакмус). Одновременно ставится контрольный опыт с дрожжами и парафенилендиамином без перекиси водорода. Смесь окрашивается в первом случае через несколько минут в фиолетовый цвет, в то время как во втором случае она остается без изменения; авторы делают из этого вывод, что дрожжи содержат активную пероксидазу.

В этих опытах обращает на себя внимание прежде всего то, что авторы ни разу не поставили решающего для наличия ферментативного действия контрольного опыта с препаратом фермента, инактивированным посредством нагревания. Отрицательный результат такого контрольного опыта не всегда доказывает, что мы имеем дело с ферментом, но положительный результат является почти бесспорным доказательством того, что в данном случае нет ферментативного действия. Вызывает далее некоторое сомнение, что авторы для обнаруживания пероксидазы применяли в качестве субстрата исключительно парафенилендиамин, а не такой чувствительный и надежный реактив, как гваякол. По этим причинам я счел желательным ознакомиться подробнее с реакцией, найденной Харденом и Зильва.

Сначала я повторил их опыты и нашел, как и следовало ожидать, что их наблюдения совершенно правильны. Однако контрольные опыты с инактивированными препаратами дрожжей дали колеблющиеся результаты. Во многих случаях наблюдалось заметное задерживание образования фиолетового красителя в контрольных пробах. Однако окрашивание всегда появлялось и сравнивалось через некоторое время с окрашиванием основной пробы, хотя реактив сам по себе и не принимает никакого фиолетового окрашивания (см. ниже). В других случаях не было заметной разницы между основными и контрольными пробами. В некоторых случаях пробы с кипяченными дрожжами давали даже более интенсивное окрашивание, чем пробы с активными дрожжами. Однако ни в одном случае не удалось получить с исследуемыми дрожжами реакции на пероксидазу посредством гваякола, пирогаллола или гидрохинона. Контрольные опыты с прибавленным заранее ничтожным количеством пероксидазы дали все без исключения положительный результат. Эти данные позволяют предположить, что наблюдавшееся Харденом и Зильва появление фиолетового окрашивания в парафенилендиамине под действием перекиси водорода в присутствии препарата дрожжей не имеет ничего общего с действием пероксидазы. Для того чтобы получить более подробные данные об этой реакции, я подверг окислению парафенилендиамина перекисью водорода более детальному исследованию.

Если смешать  $1\text{ см}^3$  0.2 *N* чистого раствора парафенилендиамина (=1.08%; Харден и Зильва применяли 1%-ный раствор) с  $10\text{ см}^3$  воды и  $1\text{ см}^3$  0.3%-ного чистого раствора перекиси водорода (Мерк), то смесь постепенно окрашивается от желтого до красно-коричневого цвета. Однако даже по истечении многих дней оставленная в закрытом сосуде смесь не обнаруживает ни малейшего фиолетового окрашивания. Харден и Зильва, повидимому, просто допускают, что именно пероксидаза вызывает фиолетовое окрашивание реактива. Однако это не так. Когда я прибавил к указанной смеси парафенилендиамина и перекиси водорода 1 каплю чрезвычайно активной пероксидазы, очищенной длительным промыванием на ультрафильтре<sup>4</sup>, то смесь приобрела более темный цвет, и из нее выпал красноватый порошок. Но даже по истечении 48 часов нельзя было заметить ни малейшего фиолетового окрашивания. Этот поразительный результат заставил меня проверить по отношению к парафенилендиамину и перекиси водорода другие растворы пероксидазы, приготовленные обычным способом без ультрафильтрации. Оказалось, что все растворы дали немедленно интенсивное фиолетовое окрашивание. Дальнейшие опыты пока-

зали, что для появления фиолетового окрашивания необходимо присутствие кислот или кислых солей. Если прибавить к смеси реактива и ультрафильтрованного, не содержащего кислот раствора пероксидазы кислоты или одноосновного фосфорнокислого калия, то она немедленно окрашивается в темнофиолетовый цвет. Харден и Зильва указывают, что кислоты сильно задерживают открытую ими реакцию. Однако это правильно только постольку, поскольку избыток прибавленной кислоты препятствует появлению фиолетового окрашивания. Как вытекает из нижеследующих опытов, интенсивность фиолетового окрашивания увеличивается с возрастанием количества кислоты до некоторого максимума, который почти точно соответствует отношению парафенилендиамина: кислота = 1 моль : 0.5 моля. Выше этого предела фиолетовое окрашивание совершенно не появляется. Опыты производились следующим образом.

В 10 колориметрических трубок было налито по 1 см<sup>3</sup> 0.2 N раствора парафенилендиамина, 1 см<sup>3</sup> 0.3%-ного раствора перекиси водорода, возрастающее количество соляной кислоты и воды до 10 см<sup>3</sup>; появляющиеся окрашивания сравнивались между собой. В первой серии опытов применялось от 0.2 до 2 см<sup>3</sup> 0.01 N соляной кислоты. Интенсивность окрашивания оказалась прямо пропорциональной количеству кислоты, но максимальное окрашивание еще не было достигнуто. Эта серия опытов была затем повторена с 0.2 до 2 см<sup>3</sup> 0.1 N раствора соляной кислоты:

|                                          |     |     |     |     |     |     |     |      |     |     |
|------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|
| 0.1 N HCl (в см <sup>3</sup> ) . . . . . | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1.0 | 1.2 | 1.4 | 1.6  | 1.8 | 2.0 |
| Трубки . . . . .                         | I   | II  | III | IV  | V   | VI  | VII | VIII | IX  | X   |

В смесях I — V появилось по истечении нескольких минут постепенно возрастающее фиолетовое окрашивание, пропорциональное количеству прибавленной кислоты; остальные смеси окрасились в коричневато-желтый цвет, причем интенсивность окрашивания убывала с возрастанием количества кислоты. По истечении 30 минут интенсивность фиолетового окрашивания в трубках I — V определялась прибавлением чистой воды из бюретки в трубки II, III, IV и V до тех пор, пока интенсивность окрашивания не стала одинаковой во всех пяти трубках. Из прибавленного количества воды, необходимого для уравнивания всех окрашиваний, легко вычислить их относительную интенсивность.

Относительная интенсивность окрашивания

|            | I    | II   | III  | IV   | V    |
|------------|------|------|------|------|------|
| Вычислено: | 1.00 | 2.00 | 3.00 | 4.00 | 5.00 |
| Получено:  | 0.97 | 2.05 | 2.89 | 3.93 | 4.78 |

В соответствии с результатами этих опытов чистый солянокислый парафенилендиамин не дает с чистой перекисью водорода ни малейшего фиолетового окрашивания. Однако если прибавить к смеси возрастающее количество углекислого кальция, то наблюдается, что интенсивность фиолетового окрашивания убывает с возрастанием количества углекислого кальция и обратно пропорциональна ему. Кислые соли и соли слабых кислот, как одноосновный фосфорнокислый калий и лимоннокислый калий, оказывают на окисление парафенилендиамина перекисью водорода такое же влияние, как и кислоты.

Эти данные позволяют почти полностью объяснить наблюдения Хардена и Зильва, не прибегая к допущению действия пероксидазы. Дрожжи вызывают в смеси чистого парафенилендиамина и чистой перекиси водорода в водном растворе фиолетовое окрашивание, потому что они имеют кислую реакцию, а не потому, что они содержат пероксидазу, ибо с обычными реактивами на пероксидазу реакция не получается. Если прибавить к дрож-

жам углекислый кальций, а затем парафенилендиамин с нафтолом, то фиолетовое окрашивание не появляется. Если подкислить смесь, то она окрашивается нормальным образом в фиолетовый цвет. Наблюдавшаяся Харденом и Зильва задержка реакции щелочами обусловливается снижением кислотности дрожжей. Кислоты оказывают, однако, задерживающее действие только тогда, когда их количество превосходит отношение парафенилендиамин : кислота = 1 : 0.5. В препаратах дрожжей, которые вызывают очень медленное появление фиолетового окрашивания смеси, можно значительно ускорить реакцию осторожным прибавлением кислоты.

Колеблющиеся результаты, которые получаются при сравнительных опытах с активными и инактивированными препаратами дрожжей, также объясняются непостоянством кислотности препаратов. При нагревании суспензий дрожжей до кипения всегда имеет место изменение кислотности; выделяется углекислота, а часть кислот, находящихся в свободном состоянии или в виде кислых солей, связывается белками. Это вызывает задержку в появлении фиолетового окрашивания, зависящую от первоначальной кислотности дрожжей и от степени ее изменения.

При некоторых обстоятельствах можно наблюдать и ускорение образования красителя в кислой смеси парафенилендиамина и перекиси водорода под действием дрожжей, но это связано только с адсорбционными явлениями, а не с действием пероксидазы. Дрожжи содержат коллоидные вещества, которые легко адсорбируют продукт окисления парафенилендиамина и этим самым ускоряют окислительную реакцию. Вполне аналогичное ускорение вызывается также тонкоизмельченным шелком, который адсорбирует продукт окисления парафенилендиамина в кислом растворе с интенсивным фиолетовым окрашиванием, в то время как тонкоизмельченная хлопчатобумажная ткань совершенно не влияет на ход реакции.

Я пытался подойти к разрешению вопроса о присутствии пероксидазы в дрожжах еще и другим путем. Как известно, пероксидаза принадлежит к числу тех ферментов, которые легко выделить из живого организма. Достаточно взболтать с водой любую тонкоизмельченную растительную ткань для того, чтобы тотчас же получить экстракт, содержащий пероксидазу и дающий при фильтровании прозрачную жидкость. Таким образом, если в дрожжах содержится пероксидаза, то она должна легко экстрагироваться водой одновременно с инвертазой и мальтазой из дрожжевых клеток, разрушенных при высушивании или при осаждении ацетоном. Вследствие присутствия больших количеств задерживающих веществ, образующихся при автолизе дрожжей, непосредственное доказательство присутствия пероксидазы в таких экстрактах невозможно. Ультрафильтрация является, однако, чрезвычайно подходящим способом для интенсивной очистки пероксидазы и других ферментов. Путем длительного промывания водой растворов пероксидазы в сконструированном мною<sup>4</sup> довольно простом ультраfiltре мне удалось получить препараты, которые давали при окислении пирогаллола перекисью водорода на 1 мг фермента 98 мг пурпурогалина, в то время как пероксидаза из того же исходного продукта (хрен), очищенная посредством многократного осаждения спиртом и растворения в воде, не давала более 4—5 мг пурпурогалина на 1 мг фермента. Естественно было применить ультрафильтрацию для очистки пероксидазы, которая могла содержаться в дрожжах.

40 г сухих дрожжей (фабрики Шредер, Мюнхен) обрабатывались в течение 5 дней 1 л воды в присутствии большого количества толуола; полученный экстракт был отфильтрован и подвергнут ультрафильтрации. Коллоидный остаток на ультраfiltре был промыт в 400 см<sup>3</sup> воды, содержащей толуол, растворен в 50 см<sup>3</sup> воды и отфильтрован от нераство-

римых частей на бумажном фильтре. Исследование растворов показало, что они содержат большие количества инвертазы и мальтазы, но ни малейшего следа пероксидазы. Контрольные опыты с прибавленными заранее ничтожными количествами пероксидазы показали, что раствор совершенно не содержит задерживающих веществ. Аналогичный опыт, поставленный с зимином, дал такие же результаты.

На основании всех этих фактов я считаю возможным утверждать, что дрожжи не содержат пероксидазы, которую можно было бы обнаружить обычными реактивами; этим они резко отличаются от других живых организмов. Причину этого различия можно усматривать только в приспособлении дрожжей к анаэробным условиям существования. Единственным известным до сих пор каталитическим действием, которое оказывает пероксидаза, является ускорение окислительного действия перекиси водорода и органических перекисей. Эти перекиси образуются при действии свободного молекулярного кислорода на ненасыщенные, легкоокисляемые вещества. Другими словами, действие пероксидазы находится в тесной связи с кислородным дыханием клетки. Если жизнь клетки происходит в отсутствии кислорода, то она не нуждается в пероксидазе и поэтому не производит ее. Поэтому отсутствие пероксидазы в строго анаэробных дрожжах легко понятно. Однако не исключена возможность, что те сорта дрожжей, которые частично используют свободный кислород, содержат большее или меньшее количество пероксидазы. Для выяснения этого вопроса существует только один путь: сравнительные опыты с чистыми культурами дрожжей верхнего и нижнего брожения. Этими чистыми культурами засеивались обычным способом и всегда в тех же условиях питательные среды, причем с дрожжами верхнего брожения проводились параллельные опыты с пропусканием стерильного воздуха. По окончании брожения смеси исследовались следующим образом.

**Реакция с парафенилендиамин ом.** 10 см<sup>3</sup> хорошо взболтанной смеси смешивались с 1 см<sup>3</sup> 0.2*N* раствора парафенилендиамина и 1 см<sup>3</sup> 0.3%-ного раствора перекиси водорода.

**Реакция на пероксидазу.** 10 см<sup>3</sup> сброженной смеси, 1 см<sup>3</sup> 1%-ного гваякола, 1 см<sup>3</sup> 0.3%-ной перекиси водорода.

**Проба на задерживающие вещества.** К пробам оставшегося бесцветным гваякола прибавлялось по 1 капле раствора пероксидазы, отмечалось время, необходимое для появления определенного красно-коричневого окрашивания.

**Реакция на пергидридазу** (восстановительный фермент). К 15 см<sup>3</sup> перебродившей смеси прибавлялось 0.5 г нитрата натрия и 0.2 г фтористого натрия (для исключения живых клеток); смесь оставалась на 1 час в термостате при 50°, после чего переводилась количественно в мерную колбу на 30 см<sup>3</sup>; после прибавления 1 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора основного уксуснокислого свинца и доведения водой до черты жидкость фильтровалась через сухой фильтр. В фильтрате (15 см<sup>3</sup>) содержание нитрита определялось колориметрически посредством  $\alpha$ -нафтиламина и сульфаниловой кислоты в уксуснокислом растворе.

После этого все смеси были отфильтрованы, осадки промыты в 200 см<sup>3</sup> воды и высушены в течение 24 часов при 35°. С высушенными осадками были поставлены реакции с парафенилендиамином и гваяколом.

В заключение осадки были еще раз промыты в 600 см<sup>3</sup> воды для удаления образовавшихся задерживающих веществ и испытаны упомянутыми реактивами. Результаты этих опытов сведены в нижеследующей таблице (стр. 481).

Из этих опытов вытекает, что пероксидаза не встречается ни в чистых культурах дрожжей верхнего брожения, ни в чистых культурах нижнего

| Обозначение дрожжей | Исходная бродильная смесь |         |                            |                                               | Высушенный остаток |         | Промытые остатки  |         |
|---------------------|---------------------------|---------|----------------------------|-----------------------------------------------|--------------------|---------|-------------------|---------|
|                     | парафенилендиамин         | гваякол | торможение реакции (в мин) | пергидридаза мг $N_2O_2$ в 15 см <sup>3</sup> | парафенилендиамин  | гваякол | парафенилендиамин | гваякол |
| I                   | +                         | —       | 6                          | 0.003                                         | +                  | —       | +                 | —       |
| II                  | +                         | —       | Бесцветна                  | 0.007                                         | —                  | —       | +                 | —       |
| III                 | +                         | —       | 2                          | 0.006                                         | —                  | —       | +                 | —       |
| A                   | +                         | —       | 3                          | 0.009                                         | —                  | —       | +                 | —       |
| B                   | +                         | —       | 2                          | 0.016                                         | —                  | —       | +                 | —       |
| V                   | +                         | —       | 2                          | 0.042                                         | +                  | —       | +                 | —       |
| A'                  | +                         | —       | 0                          | 0.058                                         | —                  | —       | +                 | —       |
| B'                  | +                         | —       | 0                          | 0.093                                         | —                  | —       | +                 | —       |
| B''                 | +                         | —       | 0                          | 0.080                                         | —                  | —       | +                 | —       |

## Обозначение дрожжей

Дрожжи нижнего брожения: I—*Saccharomyces monacensis* Hansen;  
 II—*Saccharomyces Carlsbergensis* Hansen;  
 III—*Saccharomyces ellipsoides*. Дикие дрожжи.

Дрожжи верхнего брожения: A—раса II. Берлинские дрожжи;  
 B—датские дрожжи. Дикие дрожжи;  
 B—*Saccharomyces validus* Hansen.  
 A', B', B''—дрожжи верхнего брожения, выращенные в токе воздуха.

брожения. Пропускание воздуха через дрожжи верхнего брожения ничего не меняет в результатах. Нельзя установить никакой связи между задерживанием реакции пероксидазы и содержанием пергидридазы (восстановление нитратов) в культурах. Ток воздуха, повидимому, снижает содержание задерживающих веществ.

Само собой разумеется, что я далек от того, чтобы считать эти результаты окончательными. Наоборот, я склонен предполагать, что путем систематического выращивания чистых дрожжей в токе воздуха удастся приготовить сорта дрожжей, содержащие пероксидазу. Однако такого рода опыты не входят в область моих исследований. В настоящее время можно считать установленным, что нормальные дрожжи не дают реакции на пероксидазу.

## ВЫВОДЫ

I. Установленный Харденом и Зильва факт, что в смеси парафенилендиамина и перекиси водорода дрожжи вызывают фиолетовое окрашивание, не имеет ничего общего с действием пероксидазы. Действительно, контрольные опыты с кипячеными дрожжами дают колеблющиеся результаты, несовместимые с предположением о ферментативном действии. С другой стороны, во всех исследованных дрожжах не было получено ни в одном случае реакции на пероксидазу с обычными реактивами (гваякол, пирогаллол, гидрохинон). Контрольные опыты с прибавлением заранее небольшого количества пероксидазы к пробам всегда давали положительный результат.

II. Образование фиолетового красителя при окислении парафенилендиамина перекисью водорода имеет место только в присутствии кислоты.

Количество красителя растет с увеличением количества кислоты до определенного максимума, соответствующего отношению парафенилендиамина : кислота = 1 моль : 0.5 моля. Выше этого предела фиолетовое окрашивание не появляется. Кислые соли (одноосновные фосфаты, лимоннокислые соли) оказывают такое же действие, как кислоты.

III. Наблюдавшаяся Харденом и Зильва реакция вызывается не пероксидазой, содержащейся в дрожжах, а исключительно кислотой. В кислой смеси парафенилендиамина и перекиси водорода образование фиолетового красителя так же ускоряется тонкоизмельченным шелком, как и дрожжами.

IV. Экстракты дрожжей (Hefanol и Zymin) и зимаза были очищены длительным промыванием водой на ультрафильтре от веществ, задерживающих действие пероксидазы. Коллоидальные остатки содержали большие количества инвертазы и мальтазы, но ни следа пероксидазы.

V. Чистые дрожжи нижнего брожения, выращенные в нормальных условиях, и чистые дрожжи верхнего брожения, выращенные в нормальных условиях, а затем в токе воздуха, не давали ни в свежем виде, ни после высушивания и промывания ни малейшей реакции на пероксидазу.

15 апреля 1915 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

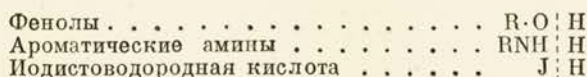
1. Schönbein. Abhandl. Münch. Akad. Wiss., **2**, 100 (1863).
2. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., **37**, 1668 (1906); настоящая книга, стр. 396.
3. Harden a. Zilva. Biochem. J., **8**, 217 (1914).
4. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., **47**, 2122 (1914); настоящая книга, стр. 472.



## О РЕАКЦИЯХ ПЕРОКСИДАЗЫ, ОЧИЩЕННОЙ ПУТЕМ УЛЬТРАФИЛЬТРОВАНИЯ

[*Sur les réactions de la peroxydase purifiée  
par ultrafiltration*] \*

Как известно, окислительная система пероксидаза — перекись водорода действует так же, как и фенолаза (лакказа), на три различных класса химических соединений: фенолы, ароматические амины и подистоводородную кислоту. Так как ферменты считаются специфичными, т. е. способными действовать только на определенные субстраты или в крайнем случае на группу субстратов, можно было бы предположить, что фермент, называемый пероксидазой, действительно является смесью по меньшей мере трех специфических ферментов. Исходя из этих соображений, я поставил<sup>1</sup> серию опытов с целью изолировать специфические ферменты пероксидазы или по крайней мере выявить их индивидуальное существование. Однако все опыты дали до настоящего времени отрицательный результат. Ни физическими методами (фракционированное нагревание, фракционированное осаждение спиртом), ни химическими (действие кислот, щелочей, иода, синильной кислоты, гидроксилamina, гидразина) мне не удалось прекратить окончательно какую-нибудь из функций пероксидазы, не затрагивая одновременно обе другие. Таким образом, мы вынуждены допустить, что пероксидаза не является специфическим ферментом в обычном смысле этого слова. Однако при более близком рассмотрении мы видим, что эти три группы соединений имеют то общее, что все они содержат в молекуле подвижный водород:



Можно, следовательно, сказать, что пероксидаза специфична в том смысле, что она действует только на подвижный водород, независимо от природы химических соединений, в состав которых он входит.

В одной из своих предыдущих работ<sup>2</sup> я показал, что пероксидазу можно отделить при помощи очень простого ультрафильтра почти от всех сопровождающих ее растворимых кристаллоидов. Мне казалось интересным выяснить, действует ли пероксидаза, очищенная ультрафильтрованием, на фенолы и ароматические амины таким же образом, как неочищенная пероксидаза, т. е. выяснить, влияет ли удаление кристаллоидов на свойство пероксидазы ускорять окисление подвижного водорода этих соединений перекисью водорода.

\* Arch. Sci. phys. nat., 42, 56 (1916).

Для этих опытов я пользовался экстрактом, приготовленным путем мацерирования в течение 3 дней при комнатной температуре 3 кг измельченного в мясорубке хрена с 3 л воды. Для того чтобы избежать тех изменений коллоидов, которые вызываются осаждением экстрактов спиртом, я решил подвергнуть экстракт непосредственно ультрафильтрации, сохраняя часть необработанного экстракта для дальнейших опытов; экстракты пероксидазы сохраняются годами, если они хорошо насыщены толуолом. Фильтрация 3 л экстракта через ультрафильтр продолжалась около 4 месяцев. Коллоидальный осадок, полученный на ультрафильтре, был промыт 1 л воды, насыщенной толуолом, и в заключение вновь растворен в 300 см<sup>3</sup> воды и отфильтрован на обычном фильтре для удаления коагулировавших коллоидов. Таким образом, 1 см<sup>3</sup> этого экстракта ультрафильтрованной пероксидазы соответствовал 10 см<sup>3</sup> исходного экстракта. Ультрафильтрованный экстракт содержал 1.72 мг сухого вещества на 1 см<sup>3</sup>. С пирогаллолом и перекисью водорода в избытке он дает 89 мг пурпурогалина на 1 мг сухого фермента. Экстракт совершенно нейтрален на лакмус и фенолфталеин. Для определения истинной концентрации водородных ионов я применил метод Бредига, основанный на гидролизе диазоуксусного эфира, с образованием свободного азота и гликолевого эфира; скорость реакции прямо пропорциональна количеству ионов водорода в жидкости. Ряд опытов доказал, что концентрация водородных ионов в экстракте, очищенном ультрафильтрацией, не превосходит заметным образом их концентрации в применявшейся воде. Первоначальный экстракт был определенно кислым на лакмус.

10 см<sup>3</sup> ультрафильтрованного экстракта были доведены до первоначального разбавления прибавлением 90 см<sup>3</sup> воды; с разбавленными таким образом и с исходными, очищенными экстрактами были поставлены сравнительные опыты окисления перекисью водорода следующих субстратов: фенол, гваякол, гидрохинон, пирогаллол, орсин, анилин, диметиланилин, диэтиланилин, бензидин и парафенилендиамин. Само собой разумеется, что все опыты были произведены по возможности в идентичных условиях. Все результаты приведены в таблице (стр. 485).

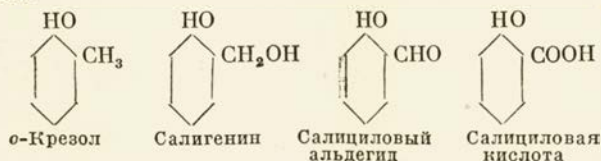
Как видно, для первых четырех фенолов нет существенной разницы между исходным экстрактом и ультрафильтрованным. Что касается пятого фенола — орсина, то ультрафильтрованный экстракт дает нормальное окисление, а исходный экстракт совершенно не вызывает окисления. Наоборот, с ароматическими аминами исходный экстракт дает положительные результаты, а ультрафильтрованный экстракт — отрицательные. Это различие несомненно связано с различным содержанием водородных ионов в экстрактах и с ролью, которую последние играют в окислении различных субстратов. Я уже указывал, что исходный экстракт был определенно кислым на лакмус, в то время как концентрация водородных ионов в ультрафильтрованном экстракте не превосходила их концентрации в применявшейся воде. Среди исследованных субстратов фенол, гваякол, гидрохинон и пирогаллол хорошо окисляются в щелочных и нейтральных растворах и выдерживают еще значительную кислотность среды. Поэтому с этими фенолами оба экстракта дали одинаковые результаты. Орсин окисляется в щелочной и нейтральной среде, но остается без изменения в кислой среде, и поэтому исходный экстракт дал отрицательный результат. Ароматические амины, наоборот, окисляются только в кислой среде, и, следовательно, ультрафильтрованный экстракт, будучи совершенно нейтральным, не мог вызвать нормального окисления этих субстратов. Однако после подкисления уксусной кислотой он дал те же результаты, как и исходный экстракт.

Из всех этих опытов вытекает, что реакция среды играет существенную

| Субстраты         | Исходный экстракт                                                     | Ультрафильтрованный экстракт                                          |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| Фенол             | Жидкость красно-коричневая, темнокоричневая; грязноватый осадок       | Жидкость красно-коричневая, темнокоричневая; грязнокоричневый осадок  |
| Гваякол           | Жидкость коричневая, красно-коричневая; красно-черный осадок          | Жидкость коричневая, красно-коричневая; осадок красно-черный          |
| Гидрохинон        | Жидкость фиолетово-розовая, красная, коричневая; черно-зеленый осадок | Жидкость фиолетово-розовая, красная, коричневая; черно-зеленый осадок |
| Пирогаллол        | Жидкость желто-коричневая, темнокоричневая; красно-оранжевый осадок   | Жидкость желто-коричневая, темнокоричневая; красно-оранжевый осадок   |
| Орсиин            | Бесцветная жидкость                                                   | Жидкость фиолетово-розовая, красно-коричневая; коричневый осадок      |
| Анилин            | Фиолетовая жидкость                                                   | Желто-коричневый осадок                                               |
| Диметиланилин     | Жидкость желтая, коричневая, зеленая, фиолетовая; фиолетовый осадок   | Почти бесцветный                                                      |
| Диэтиланилин      | Та же последовательность окрашивания                                  | Бесцветный                                                            |
| Бензидин          | Жидкость яркосиняя; синий осадок                                      | Коричнево-фиолетовый                                                  |
| Парафенилендиамин | Яркофиолетовый, коричневый                                            | Бордо                                                                 |

роль в окислительных процессах, обусловленных пероксидазой, и что можно допустить серьезные ошибки, если с этим недостаточно считаться.

Имея очищенную, очень активную пероксидазу, я попытался выяснить некоторые другие вопросы, касающиеся действия этого фермента, и, в частности, влияние введения определенных радикалов в ароматическую группу фенолов на их окисляемость системой пероксидаза — перекись водорода. Опыты окисления были поставлены со следующими четырьмя производными *o*-крезола:



При окислении *o*-крезола и салигенина смесью пероксидазы и перекиси водорода жидкость окрашивается в желтый цвет, затем вскоре переходит к темнокоричневому и красно-коричневому и, наконец, выделяет смолистую красно-коричневую массу, нерастворимую в воде, мало растворимую в эфире и хорошо растворимую в спирте. В тех же самых условиях салициловый альдегид не окисляется системой пероксидаза — перекись во-

дорода. Однако если слегка подщелочить жидкость двухосновным фосфорнокислым калием, то окисление происходит так же, как и в случае орто-крезола и салигенина. Получается темнокоричневая жидкость, выделяющаяся после нейтрализации разбавленной кислотой красно-коричневый осадок, нерастворимый в воде и растворимый в спирте. Что касается салициловой кислоты, то она не окисляется системой пероксидаза — перекись водорода ни в кислом, ни в нейтральном, ни в щелочном растворе. Таким образом, мы видим, что пока в замещающем радикале имеется водород, связанный с углеродом, окисление происходит. Если с углеродом связано два или три атома водорода, то окисление происходит в нейтральной среде. Если остается только один атом водорода (салициловый альдегид), а два других замещены одним атомом кислорода, то необходимо прибавление ионов  $\text{OH}'$  или эквивалентных ионов, для того чтобы произвести окисление. Если замещающим радикалом является карбоксил, то окисление не наступает уже ни при какой реакции среды. Аналогичные результаты были получены с *n*-замещенными соединениями.

Введение нитрогрупп в фенолы в *o*- и *n*-положении также препятствует окислению системой пероксидаза — перекись водорода.

В настоящее время еще нельзя достаточно разобраться в теоретическом значении этих фактов. Я замечу только, что наблюдал при окислении *o*-крезола и салигенина образование муравьиной кислоты, которую можно характеризовать ее серебряной солью; это доказывает, что окисление вызывает отрыв боковой цепи. Я не обнаружил заметных количеств углекислоты. К сожалению, изучение этих реакций затрудняется тем, что необходимы большие количества пероксидазы для того, чтобы получать продукты окисления, достаточные для химического исследования; когда же требуется четыре месяца для приготовления нескольких дециграммов очищенного фермента, то поневоле приходится обращаться с ним экономно. Тем не менее, я пожертвовал тремя дециграммами своего самого чистого и самого активного фермента для того, чтобы решить вопрос о том, окисляется ли этиловый спирт системой пероксидаза — перекись водорода. Опыты были проведены в присутствии углекислого кальция для нейтрализации кислот, которые могут образоваться при окислении. В результате я не получил ни уксусного альдегида, ни уксусной кислоты, ни какой-либо другой органической кислоты. Однако количество окислителя, участвовавшего в реакции, было достаточно для окисления нескольких грамм пирогаллола в пурпурогалин. Я считаю возможным утверждать, что этиловый спирт не окисляется системой пероксидаза — перекись водорода. В живых организмах возможно, что спирт окисляется специфической оксидазой (алкогольоксидазой). Я в этом сильно сомневаюсь. По аналогии с другими, так называемыми специфическими оксидазами, например тирозиноксидазой, которая оказалась смесью двух неспецифических ферментов, я склонен думать, что алкогольоксидаза также является смесью двух агентов, из которых один вызывает в спирте превращение, делающее его способным окисляться вторым агентом. К этому вопросу я предполагаю еще вернуться впоследствии.

Июль 1916 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., **40**, 230, 3185 (1907); настоящая книга, стр. 409, 413.
2. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., **47**, 2122 (1914); настоящая книга, стр. 472.

---

**БЫСТРЫЙ МЕТОД ОБНАРУЖИВАНИЯ  
И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕЗНАЧИТЕЛЬНЫХ  
КОЛИЧЕСТВ ЭСТЕРАЗЫ**

[*Schneller Nachweis und quantitative Bestimmung  
geringer Esterasemengen*] \*

Для определения эстеразы эмульсия, содержащая фермент, ставится после прибавления сложного эфира на несколько часов в термостат. Если в этой смеси кислотность оказывается более высокой, чем в поставленной одновременно контрольной пробе с нагретой эмульсией, то считается, что в смеси имеется фермент, расщепляющий сложный эфир. Вследствие малой чувствительности реакции для проведения ее требуются большие количества фермента, кроме того, она протекает довольно медленно, что приводит к ряду неудобств (автолиз применяющихся эмульсий, опасность заражения бактериями).

В связи с выяснением природы действия тирозиназы<sup>1</sup> мне пришла мысль использовать для определения эстеразы принцип, лежащий в основе действия тирозиназы. Как мне удалось доказать, тирозиназа является смесью аминоксидазы и обычной фенолазы. Последняя не окисляет тирозина как такового, а только после его расщепления аминоксидазой, согласно реакции Штрекера, на параоксифенилацетальдегид, аммиак и углекислоту. Так как фенолаза и пероксидаза с перекисью водорода не действуют на фенольные эфиры, то казалось возможным обнаружить малейшее расщепление фенольных эфиров посредством этой окислительной системы. Опыты полностью подтвердили это предположение. Оказалось, что углекислый гваякол прекрасно подходит не только для обнаруживания, но и для количественного определения минимальных количеств ферментов, расщепляющих эфиры.

Качественное определение происходит следующим образом.

1 г исследуемого на эстеразу вещества растирается с кварцевым песком и 5 каплями глицерина и взвешивается в 500 см<sup>3</sup> теплой воды; смесь фильтруется через полотно. 10 см<sup>3</sup> мутного фильтрата смешиваются в пробирке с 0.1 г углекислого гваякола и несколькими каплями толуола и ставятся в термостат при 40°. Одновременно ставится в тех же условиях контрольная проба с нагретой до кипения эмульсией. По истечении от 5 до 30 минут обе пробы быстро нагреваются до кипения, для того чтобы разрушить каталазу и пергидридазу; после охлаждения к ним прибавляют по 1 капле раствора пероксидазы и 1 капле 3%-ного раствора перекиси водорода. В зависимости от содержания эстеразы в исследуемом веществе в пробе с активной эмульсией образуется более или менее интенсивное

---

\* Fermentforschung, 1, 151 (1915).

красно-коричневое окрашивание, в то время как контрольная проба остается совершенно бесцветной. Чувствительность реакции настолько велика, что в веществах, содержащих много эстеразы, проба может быть произведена с 2—5 мг вещества в несколько минут.

Для того чтобы следить количественно за расщеплением углекислого гваякола, поступают следующим образом.

100 см<sup>3</sup> приготовленной описанным способом эмульсии взбалтываются с 1 г растертого в порошок углекислого гваякола и 1 см<sup>3</sup> толуола и сохраняются в термостате. Следует отметить, что когда вещество содержит эстеразу, прибавление толуола излишне, ибо выделяющийся уже через несколько минут гваякол имеет сильное антисептическое действие. Одновременно ставится контрольная проба с кипяченой эмульсией. Через определенные промежутки времени из проб отбираются 1—5 см<sup>3</sup> и выливаются в 35 см<sup>3</sup> кипящей воды, находящейся в мерной колбе на 50 см<sup>3</sup>. Смесь держится еще несколько секунд при кипении, затем быстро охлаждается, доводится водой до черты и, если это необходимо, фильтруется через сухой фильтр. 20 см<sup>3</sup> фильтрата смешиваются в колориметрической трубке с 1 каплей раствора пероксидазы и 2 каплями 3%-ного раствора перекиси водорода. Получающееся окрашивание сравнивается со шкалой, приготовленной из чистого раствора гваякола и равных количеств пероксидазы и перекиси водорода. Для приготовления шкалы в ряд колориметрических трубок наливается по 20 см<sup>3</sup> растворов, содержащих возрастающие количества гваякола (0.1—10 мг), по 1 капле раствора пероксидазы и по 2 капли раствора перекиси водорода. Метод легко выполняется и дает сравнимые результаты. Его чувствительность превосходит чувствительность обычных методов в сотни раз. В качестве примера можно привести результаты одного опыта, поставленного с эмульсией, приготовленной из свежей телячьей печени.

*Отщепленный гваякол*

(мг в 100 см<sup>3</sup> эмульсии)

| Время (в часах)       | 1/4  | 1/2   | 1     | 2     | 4      | 6      | 24     | 48     | 72     |
|-----------------------|------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Активная эмульсия . . | 7.75 | 15.08 | 30.19 | 59.12 | 117.89 | 177.68 | 202.74 | 244.36 | 256.41 |
| Неактивная эмульсия . | 0    | 0     | 0     | 0     | 0      | Следы  | 0.25   | 0.91   | 1.98   |

Для того чтобы получить данные о распространении эстеразы в животном организме, мы пожертвовали кроликом. Его органы были исследованы на содержание эстеразы описанным выше методом. Результаты приведены в нижеследующей таблице.

*Отщепленный гваякол*

(мг в 100 см<sup>3</sup> эмульсии (=0.2 г растертой массы))

| Время (в часах) | Мышцы | Сердце | Мозг | Легкие | Почки | Печень |
|-----------------|-------|--------|------|--------|-------|--------|
| 1               | 2.91  | 3.12   | 5.62 | 22.87  | 29.91 | 42.10  |
| 10              | 3.85  | 3.72   | 6.48 | 48.05  | 63.62 | 93.15  |
| 20              | 4.98  | 4.78   | 7.51 | 56.25  | 78.75 | 117.23 |

Таким образом, из всех органов печень содержит больше всего эстеразы. Для приготовления раствора пероксидазы можно рекомендовать в качестве легко доступного материала пшеничные отруби. 500 г отрубей остаются на несколько дней мацерироваться в 1 л воды в присутствии большого количества толуола и затем отжимаются. К полученному экстракту прибавляется равный объем спирта; жидкость фильтруется через 24 часа. Прозрачный фильтрат осаждается трехкратным объемом спирта, осадок фильтруется, промывается спиртом и высушивается в вакууме над хлористым кальцием. Сухой остаток растворяется в 200 см<sup>3</sup> воды, отфильтровывается для отделения нерастворимых частей и сохраняется под толуолом. В то время как твердая пероксидаза теряет свою активность уже в течение нескольких недель, она неограниченно долго сохраняется в растворе. Приготовленный описанным выше способом раствор чрезвычайно активен.

В заключение следует еще упомянуть, что свежий сок из грибов (*Lactarius vellereus*), содержащий большое количество оксидазы, непосредственно окисляет углекислый гваякол, в то время как фенолаза, приготовленная осаждением сока спиртом, не оказывает никакого действия на эфиры. Это объясняется тем, что свежий сок содержит эстеразу, которая при выделении фенолазы частично разрушается и частично остается в нерастворимом осадке. Как и при действии тирозиназы, в соке грибов одновременное действие двух неспецифических ферментов (эстеразы и фенолазы) создает впечатление действия специфической оксидазы, действующей только на эфир гваякола. Не исключена возможность, что аналогичные условия имеются и в других случаях, когда оксидазы кажутся специфичными.

6 января 1915 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бах. Biochem. Zs., 60, 221 (1914); настоящая книга, стр. 465.

Раздел 2

ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ  
ПРОЦЕССЫ В ЖИВЫХ ОРГАНИЗМАХ

К ВОПРОСУ О ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТАХ

[Zur Kenntniss der Reduktionsfermente]

Сообщение I

О ФЕРМЕНТЕ ШАРДИНГЕРА (ПЕРГИДРИДАЗА)

[Ueber das Schardinger-Enzym (Perhydridase)] \*

Способность органического вещества животного и растительного происхождения превращать нитраты в нитриты была замечена Шенбейном<sup>1</sup> уже в 1861 г. и связана с каталитическими свойствами этих веществ по отношению к перекиси водорода. Он обратил внимание на то, что кровяные шарики, оказывающие каталитическое действие на перекись водорода, также восстанавливают нитраты в нитриты и что каталитическое действие в обоих случаях одинаково приостанавливается синильной кислотой.

Многочисленные авторы занимались с тех пор восстановительными свойствами клеток, но до настоящего времени в этой области господствует еще полная неясность и неопределенность. В то время как некоторые авторы (Рей-Палад, Поши-Эско, Аблус и его сотрудники) считают, что существуют восстановительные ферменты, другие авторы (Гейфтер и его сотрудники, Кастл и Эльвон) приписывают наблюдающееся восстановление не ферментативным процессам. Состояние вопроса в достаточной степени характеризуется тем, что в своей замечательной книге Опенгеймер<sup>2</sup> посвящает восстановительным ферментам всего несколько строчек, в которых он ставит под вопрос их существование. Здесь не место входить в критическое обсуждение весьма обширного материала. Я отмечу только одно основное наблюдение, сделанное Шардингером<sup>3</sup>, которое является, как мне кажется, ключом к пониманию ферментативных восстановительных процессов, протекающих в растительных и животных организмах.

Шардингер установил, что свежее коровье молоко, которое само по себе при 70° не оказывает никакого действия на метиленовую синь, индигосульфат натрия и т. д., энергично восстанавливает эти красители в соответственные лейкоформы в присутствии формальдегида или ацетальдегида. С кипяченым молоком эта реакция совершенно не имеет места. В тщательно произведенной работе Тромсдорф<sup>4</sup> доказал, что реакция Шардингера обуславливается заранее существующим в молоке ферментом, а не каким-нибудь продуктом бактериальной деятельности, так как асептическое молоко также даст эту реакцию. С другой стороны, в некоторых случаях молоко, зараженное бактериями, восстанавливает метиленовую синь даже в отсутствии альдегидов. Из этого вытекает, что фермент Шардингера не тождественен с так называемой «редуказой», ибо он оказывает восстановительное действие только в присутствии альдегидов. Тромсдорф отмечает, что установление этих фактов не дает еще ничего для понимания реакции Шардингера. Этот вывод, однако, правилен только в том случае, если рассматривать реакцию изолированно. Если же рассматривать, с одной стороны, весь материал, накопленный в области окислительных ферментов, с другой — некоторые чисто химические восстановительные процессы, то выявляются чрезвычайно интересные аналогии. В своих исследованиях об окислительных ферментах я натолкнулся на некоторые наблюдения, которые привлекли мое внимание к области восстановительных процессов и дали повод к настоящей работе.

\* Biochem. Zs., 31, 443 (1911).



Восстановление нитратов в нитриты, красителей в лейкоформы и т. д. растительными и животными тканями предполагает участие активного водорода, т. е. водорода *in statu nascendi*. Так как последний может происходить только из воды, то я пытался<sup>5</sup> привлечь для объяснения этих восстановительных процессов реакции, в которых происходит расщепление воды с выделением водорода. Вполне ясной и однозначной оказалась реакция, происходящая между гипофосфитами и водой в присутствии палладия. Если прибавить к водному раствору гипофосфита некоторое количество палладиевой черни, то фосфорноватистая кислота превращается в фосфористую с выделением водорода. Количественное исследование показало, что реакция протекает в основном согласно уравнению  $\text{PO}_2\text{H}_3 + 2\text{HON} = \text{PO}_3\text{H}_3 + \text{H}_2\text{O}$ . Если прибавить к смеси вещество, способное восстанавливаться, например метиленовую синь, то одновременно с окислением фосфорноватистой кислоты происходит восстановление этого вещества.

Легко видеть, что между этой реакцией и реакцией Шардингера существует большая аналогия. Эта аналогия становится еще яснее, если принять во внимание, что Бредигу и Зоммеру<sup>6</sup> удалось заменить в реакции Шардингера молочный фермент коллоидными металлами платиновой группы (придий, платина, палладий). Можно с полным основанием допустить, что в основе действия систем: «палладий — метиленовая синь — гипофосфит — вода», «палладий — метиленовая синь — альдегид — вода», «молочный фермент — метиленовая синь — альдегид — вода» лежит одна и та же реакция, а именно: расщепление воды окисляемым веществом под действием катализатора, образующего с водородом воды неустойчивое, энергично восстанавливающее соединение.

После того как я счел выясненной сущность реакции Шардингера, я пытался точнее определить соотношение фермента Шардингера к существующей, по видимому, в тканях, редуказе\*. Как известно, печень и другие органы содержат некоторое вещество, восстанавливающее метиленовую синь и другие красители соответственные лейкоформы и разлагающиеся при кипячении. С другой стороны, печень содержит одну или несколько альдегидаз, которые превращают за счет элементов воды альдегиды в соответственные спирты и кислоты. Естественно было предположить, что между редуказой, альдегидазой и ферментом Шардингера существует какая-то зависимость. Для того чтобы выяснить этот вопрос, я пытался изучить влияние альдегидов на восстановление метиленовой сини тканью печени.

Свежая телячья печень очень энергично восстанавливает метиленовую синь. Если сделать взвесь 2 г растертой печени в 10 см<sup>3</sup> воды, прибавить 1 см<sup>3</sup> раствора метиленовой сини по Шардингеру\*\* и нагреть смесь на водяной бане при 70°, то очень быстро происходит обесцвечивание метиленовой сини. Если растертая печень нагрета до кипения, то восстановления не происходит. Если поставить сравнительные опыты в присутствии и в отсутствии альдегида, то наблюдается, что в зависимости от прибавленного количества альдегида (формальдегид, ацетальдегид) он совершенно не оказывает влияния на восстановление метиленовой сини или даже задерживает его. Однако мне удалось приготовить из печени препараты, которые, так же как фермент Шардингера, чрезвычайно ускоряли восстановление метиленовой сини ацетальдегидом.

Если хорошо размешать растертую печень с пятикратным количеством по весу 2%-ного раствора фтористого натрия и отжать через полотно, то получается эмульсия; после пятикратного разбавления водой эта эмульсия почти не действует или действует чрезвычайно медленно на метиленовую синь при 70°, но восстанавливает ее в несколько минут в присутствии ацетальдегида (1 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора на 20 см<sup>3</sup> разбавленной муты). С эмульсией, нагретой до кипения, восстановление совершенно не происходит. Отфильтрованная эмульсия не оказывает никакого действия, остаток же сохраняет

\* Я предлагаю заменить этимологически неправильное обозначение «редуктаза» названием «редуказаз». Употребление слова «редуктаза» вместо «редуказаз» так же мало допустимо, как «оксидатаза» вместо «оксидаза».

\*\* 5 см<sup>3</sup> насыщенного спиртового раствора метиленовой сини + 95 см<sup>3</sup> воды.

активность. Мне, однако, удалось перевести фермент в раствор и совершенно отделить его от ткани печени. Растертая печень (телячья) размешивается с пятикратным количеством по весу 1%-ного раствора бикарбоната натрия и оставляется на несколько часов на леднике. Жидкость затем сливается и тщательно нейтрализуется разбавленной уксусной кислотой. После фильтрования получается совершенно прозрачная рубиново-красная жидкость, которая содержит фермент в растворе. При прибавлении к жидкости трехкратного объема крепкого спирта фермент выпадает. После удаления спирта фермент можно экстрагировать 0,5%-ным раствором бикарбоната натрия из осадка. Совершенно прозрачный, бесцветный фильтрат, который сам по себе не оказывает никакого действия на метиленовую синь, дает после нейтрализации разбавленной уксусной кислотой ясно выраженную реакцию Шардингера. После нагревания до кипения фильтрат не активен. Оптимум температуры находится, как и для фермента Шардингера, при 70°. Как и фермент Шардингера, он очень чувствителен к избытку альдегида. Ацетальдегид дает лучшие результаты, чем формальдегид, вероятно, вследствие большей ядовитости последнего. Фермент довольно неустойчив как в растворе, так и в твердом состоянии. Его можно извлечь из печени и других органов (легкие, селезенка, почки, тимус) в асептических условиях посредством раствора, содержащего 1% бикарбоната натрия и 2% фтористого натрия.

Из вышесказанного следует с полной очевидностью, что редуказа печени и других органов не является индивидуальным ферментом, а состоит из двух частей—одной, которая, повидимому, идентична с ферментом Шардингера, и другой, которую можно заменить альдегидами.

Мы имеем тут полную аналогию со случаем обыкновенной оксидазы (фенолазы) и соответствующей пероксидазы. Как известно, оксидаза сама по себе производит те же самые окислительные реакции, как пероксидаза в присутствии перекиси водорода. Перекись водорода не влияет на действие нормальной оксидазы или, в зависимости от концентрации, даже задерживает окисление. В измененной оксидазе неустойчивая составная часть может быть заменена перекисью водорода. Устойчивая часть оксидазы — пероксидаза — существует в некоторых объектах, например в корнях хрена, независимо от неустойчивой. То же самое наблюдается и для восстановительного фермента животных органов, если вместо оксидазы рассматривать редуказу, вместо перекиси водорода — альдегид и вместо пероксидазы — фермент Шардингера. В то время как оксидаза является системой «пероксидаза — образующие перекиси соединения (оксигеназа)», редуказу можно рассматривать только как систему «фермент — соединения, расщепляющее воду». Аналогия между оксидазой и редуказой настолько поразительна и глубока, что невольно напрашивается мысль о сходстве химических процессов, лежащих в основе действия этих ферментов. Для того чтобы ориентироваться в дальнейшем исследовании этой области, я позволю себе высказать вкратце следующие взгляды по этому вопросу.

Теория электролитической диссоциации предполагает, что вода в незначительной части диссоциирована на  $H^+$  и  $OH^-$ .

Вследствие четырехвалентности кислорода вода должна содержать и ненасыщенные молекулы  $H_2O<$ , ненасыщенность воды нужно считать причиной электролитической диссоциации, — поэтому мыслимо и вполне совместимо с современными взглядами физической химии (Джонс, Армстронг), что ионы  $H^+$  и ионы  $OH^-$  образуют с ненасыщенными молекулами воды неустойчивые соединения. Из водородных ионов должен получаться при этом комплекс  $H_2O<(H_2)$ , из гидроксильных ионов  $H_2O<(OH)_2$ . Первый из них представляет не что иное, как гипотетическую недоокись водорода или пергидрид кислорода  $H_4O$ , металлозамещенное соединение которого  $Me_4O$  хорошо известно; второе — представляет собой гидрат перекиси водорода.

Рассмотрим несколько подробнее в связи с этим предположением какую-нибудь реакцию, основанную на расщеплении воды, например исследованную Бредигом и Зоммером<sup>6</sup> реакцию между метиленовой синью, формальдегидом и водой в присутствии коллоидальной платины. Ни сами

по себе, ни вместе метиленовая синь и формальдегид не в состоянии разлагать воду с измеримой скоростью при  $70^{\circ}$  и восстанавливаться или соответственно окисляться за ее счет. Однако реакция немедленно начинается, если прибавить к смеси обоих соединений в водном растворе коллоидальную платину. На чем основано ускоряющее действие платины? Энглер и Велер<sup>7</sup> доказали, что ускорение некоторых окислительных процессов мелкодисперсной платиной основано на образовании перекиси платины, и считают, что образующаяся первичная перекись соединяется с водой и образует очень активный гидрат перекиси платины. При действии платины на перекись водорода образуется то же самое соединение, которое при наличии окисляемых субстратов окисляет их, а в отсутствии субстрата распадается с выделением кислорода (катализ разложения перекиси водорода платиной). Ускорение окисления формальдегида в смеси метиленовая синь — формальдегид — вода можно, следовательно, очень просто объяснить, если допустить, что неустойчивый комплекс  $\text{H}_2\text{O} < (\text{OH})_2$  соединяется с платиной, образуя гидрат перекиси платины, что должно вызвать дальнейшую диссоциацию воды.

При катализе восстановления метиленовой сини платина, вероятно, играет такую же роль, как при катализе окисления формальдегида, образуя с комплексом  $\text{H}_2\text{O} = \text{H}_2$ , т.е. с водородными ионами и водой, активный гидрат платиноводородного соединения.

Аналогичное соединение палладия уже известно. Приготовленный Паалем и Герумом<sup>8</sup> чрезвычайно активный жидкий гидрозоль водородистого палладия является не чем иным, как оксипергидридом палладия.

Известное свойство платины, палладия и т. д. соединяться как с водородом, так и с кислородом позволяет ожидать, что эти металлы одновременно ускоряют и восстановительный, и окислительный процесс в реакции Шардингера: они действуют как амбокатализаторы. Однако катализаторы, действующие в живых организмах, обладают специфичностью. Окислительные процессы, основанные на промежуточном образовании неустойчивых кислородных соединений — перекисей, ускоряются пероксидазой, восстановительные процессы, основанные на расщеплении воды и промежуточном образовании неустойчивых водородных соединений (пергидриды), ускоряются ферментом Шардингера. Аналогия между этими ферментами основана на подобии химических соединений, с которыми они вступают в реакцию: в случае пероксидазы мы имеем дело с перекисью водорода  $\text{H}_2\text{O} < \text{O}$  и ее производными, в случае фермента Шардингера — с пергидридом кислорода  $\text{H}_2\text{O} < \text{H}_2$  и его производными.

Это представление (которое, само собой разумеется, можно рассматривать только как предварительную гипотезу) позволяет планомерно изучать область биологических восстановительных процессов и доступно широкой экспериментальной проверке.

В заключение еще несколько слов о номенклатуре восстановительных ферментов. Фермент молока, который катализирует восстановление красителей в присутствии альдегидов, называется Шмидтом «альдегид-каталазой», Иенсенем — «альдегид-редуктазой», Зелигманом — «косвенной редуктазой», Тромсдорфом<sup>9</sup> — «ферментом Шардингера». В связи с изложенными выше фактами и аналогиями я предлагаю называть этот фермент «пергидридазой». Общее обозначение («редуктаза») следует, как указано выше, заменить обозначением «редуказа».

Опыты с пергидридазой продолжаются.

24 февраля 1911 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Schönbein. J. prakt. Chem., 84, 193 (1861); Zs. Biol., 3, 410.
2. Oppenheimer. «Die Fermente und ihre Wirkungen», Leipzig (1909).

3. Schardinger. Zs. Unters. Nahr. u. Genussm., 5, 22 (1902); Chem. Ztg., 28, 704 (1904).
4. Trommsdorff. Cbl. Bakteriол., 49, 291 (1909).
5. Bax. Ber. Dtsch. chem. Ges., 42, 4463 (1909); настоящая книга, стр. 295.
6. Bredig u. Sommer. Zs. physik. Chem., 70, 34 (1909).
7. Engler u. Wöhler. Zs. anorg. Chem., 29, 1 (1902).
8. Paal u. Gerum. Ber. Dtsch. chem. Ges., 41, 805 (1908).
9. Trommsdorff. Cbl. Bakteriол., 49, 300 (1909).

## Сообщение II

### ВОССТАНОВЛЕНИЕ НИТРАТОВ СИСТЕМОЙ «ПЕРГИДРИДАЗА — АЛЬДЕГИД — ВОДА»

[Reduktion der Nitrate durch das System «Perhydridase — Aldehyd — Wasser»] \*

В первом сообщении<sup>1</sup> было показано, что восстановление метиленовой сини экстрактом из органов должно быть приписано действию фермента, который, повидимому, тождественен с пергидридазой из молока (фермент Шардингера) и вещества, которое может быть заменено альдегидами. Естественно было предположить, что давно известное восстановление нитратов в нитриты, происходящее в растертых органах и экстрактах из них, обуславливается аналогичной системой. Это предположение полностью подтвердилось: пергидридаза из молока, сама по себе не оказывающая никакого действия на нитраты, довольно энергично восстанавливает их в присутствии альдегидов; с другой стороны, из печени можно приготовить препараты, которые, так же как и пергидридаза молока, очень энергично ускоряют восстановление нитратов альдегидами.

В настоящей статье вкратце описываются опыты, которые привели к установлению этих данных.

#### Метод исследования и предварительные опыты

Для количественного исследования восстановления нитратов системой пергидридаза — альдегид — вода был выработан следующий метод.

Отмеренный объем коровьего молока, подогретого до определенной температуры, смешивался с отмеренными количествами также предварительно полоретых растворов нитрата и альдегида — объем смеси составлял во всех опытах 100 см<sup>3</sup> — и ставился в термостат в закрытых сосудах. Через определенные промежутки времени отбирались пробы в 1—2 см<sup>3</sup>, в зависимости от интенсивности восстановительного процесса, смешивались с 1 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора основного уксуснокислого свинца в колбах на 50 см<sup>3</sup> и доводились водой до черты; после взбалтывания смесь фильтровалась через сухой фильтр. Таким путем получался прозрачный, совершенно бесцветный фильтрат, в котором можно было определять содержание нитрита с такой же точностью, как в воде, по методу Илосвей-Лунге, посредством  $\alpha$ -нафтиламина и сульфаниловой кислоты в разбавленном уксуснокислом растворе. Для определения берут 10—20 см<sup>3</sup> фильтрата и смешивают с определенным объемом реактива Илосвей-Лунге в узком цилиндре с притертой пробкой. С другой стороны, в таком же цилиндре смешивают 1—2 см<sup>3</sup> раствора нитрита (из чистого нитрита серебра) с реактивом и доводят водой до 15 см<sup>3</sup>. В цилиндр, в котором раствор более интенсивно окрашен, прибавляют из бюретки чистую воду до тех пор, пока обе пробы не приобретают одинакового окрашивания. Из отношения объемов легко вычислить содержание нитрита в исследуемой пробе. Для удобства результат перечисляется на общее количество смеси. Надежность метода можно иллюстрировать следующим примером.

К 50 см<sup>3</sup> кипяченого \*\* коровьего молока было прибавлено 5.175 мг N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> в виде раствора нитрита натрия (приготовленного из чистого нитрита серебра путем осаждения хлористым натрием), 5 см<sup>3</sup> 10%-ного раствора ацетальдегида и воды до 100 см<sup>3</sup>; после взбалтывания смесь была поставлена в термостат при 50°.

\* Biochem. Zs., 33, 282 (1911).

\*\* В смеси свежего, некипяченого коровьего молока, нитрита натрия и ацетальдегида содержание нитрита медленно убывает (см. ниже).

| Часы . . .   | Полученный $N_2O_3$ |       |       |       |       |
|--------------|---------------------|-------|-------|-------|-------|
|              | 0                   | 1     | 2     | 4     | 24    |
| мг . . . . . | 5.169               | 5.147 | 5.152 | 5.158 | 5.172 |

Ошибка опыта составляет здесь, таким образом, не более 0.4% содержания нитрита. Предварительные опыты, поставленные по этому методу, дали следующие результаты:

1. При данных условиях опыта нитраты не восстанавливаются ацетальдегидом с измеримой скоростью.

2. Кипяченое коровье молоко не оказывает никакого влияния на процесс восстановления.

3. Свежее коровье молоко ускоряет восстановление нитрата ацетальдегидом в такой степени, что при подходящих условиях опыта образования нитритов можно обнаружить уже через 1—2 минуты.

4. В отсутствие альдегидов свежее коровье молоко не влияет на нитраты.

Для иллюстрации можно привести следующие опыты.

К 100 см<sup>3</sup> свежего коровьего молока было прибавлено 5 г нитрата натрия и 0.5 г ацетальдегида в 50 см<sup>3</sup> воды; после взбалтывания смесь была поставлена в термостат при 50°. Одновременно был поставлен контрольный опыт при тех же точно условиях, но без прибавления альдегидов.

мг  $N_2O_3$  в реакционной смеси

| Часы . . . . .            | 0.5   | 1     | 2     | 3      | 5      | 7      | 9      | 12     | 24      |
|---------------------------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
| В присутствии альдегида . | 2.923 | 4.901 | 7.510 | 12.075 | 12.441 | 12.390 | —      | 12.407 | —       |
| Без альдегида             | 0     | 0     | 0     | 0      | 2.015  | 7.765  | 12.792 | 68.310 | 115.497 |

В то время как в первом случае ход восстановительного процесса характерен для действия фермента, во втором случае задержка в начале реакции и следующее за ней быстрое нарастание скорости явно указывают на бактериальное действие. Это было окончательно установлено опытом, в котором для исключения действия бактерий в качестве антисептического средства применялся фтористый натрий.

А. 75 см<sup>3</sup> свежего коровьего молока, 5 г нитрата натрия, 2 г фтористого натрия, 0.5 г ацетальдегида.

Б. 75 см<sup>3</sup> свежего коровьего молока, 5 г нитрата натрия, 2 г фтористого натрия, 0 ацетальдегида.

Объем смеси 100 см<sup>3</sup>; температура 50°.

По истечении 2 минут в А можно было обнаружить нитрит; по истечении 24 часов содержание нитрита составляло 6.735 мг  $N_2O_3$ ; в Б не образовалось ни следа нитрита.

После этих предварительных опытов я занялся более подробным изучением восстановления нитратов системой пергидридаза — альдегид — вода.

### Влияние концентрации альдегида

Для опытов применялись свежее коровье молоко, чистый нитрат натрия и свежеперегнанный ацетальдегид (паральдегид). Концентрации: 75 см<sup>3</sup> молока, 5 г нитрата натрия, возрастающие количества альдегида (от 0.25 до 1.0 г) в 100 см<sup>3</sup>. Условия опыта, как указано выше. Все опыты были произведены одновременно и с теми же самыми веществами при 50°. Полученные результаты сведены в таблице, приведенной на стр. 496.

Из этой таблицы видно, что процесс восстановления начинается тем позже, чем больше концентрация альдегида. В ходе реакции превращение возрастает с концентрацией альдегида, но значительно медленнее последней. После достижения конечного состояния количество превращенного вещества очень отдаленно пропорционально количеству применявшегося альдегида. Восстановительный процесс останавливается уже по истечении

мг  $N_2O_3$  в 100 см<sup>3</sup>

| Время<br>(в часах) | Концентрация альдегида (в г) |       |       |       |       |
|--------------------|------------------------------|-------|-------|-------|-------|
|                    | 0.125                        | 0.250 | 0.500 | 0.750 | 1.000 |
| 1                  | 2.519                        | 2.508 | 2.327 | 2.245 | 2.001 |
| 2                  | 2.708                        | 2.956 | 3.205 | 3.426 | 3.608 |
| 3                  | 2.690                        | 3.105 | 3.801 | 4.312 | 4.851 |
| 6                  | 2.678                        | 3.242 | 4.085 | 4.861 | 6.280 |
| 9                  | 2.699                        | 3.480 | 4.310 | 5.340 | 7.342 |
| 12                 | 2.710                        | 3.527 | 4.410 | 5.676 | 7.706 |
| 24                 | 2.673                        | 3.695 | 4.451 | 5.713 | 7.700 |
| 48                 | —                            | 3.450 | 4.435 | 5.678 | 7.395 |

немногих часов. В некоторых случаях удается заметить определенное снижение содержания нитрата.

Следует еще отметить, что под влиянием ацетальдегида смесь по-немногу окрашивается в серо-коричневый до оранжево-коричневого цвет. Это окрашивание прямо пропорционально концентрации альдегида. С формальдегидом не наблюдается никакого окрашивания. Причина этого явления будет выяснена в дальнейших опытах.

#### Влияние концентрации нитрата

Опыты производились с 75 см<sup>3</sup> молока, 0.5 г ацетальдегида и возрастающими количествами нитрата (1—4 г) в 100 см<sup>3</sup>. Температура 50°.

мг  $N_2O_3$  в 100 см<sup>3</sup>

| Время<br>(в часах) | Концентрация нитрата (в г) |       |       |       |
|--------------------|----------------------------|-------|-------|-------|
|                    | 1.0                        | 2.0   | 3.0   | 4.0   |
| 1                  | 1.287                      | 1.707 | 2.328 | 3.629 |
| 2                  | 2.328                      | 2.699 | 3.625 | 3.860 |
| 5                  | 3.543                      | 4.289 | 4.753 | 5.094 |
| 8                  | 3.750                      | 4.741 | 4.834 | 5.121 |
| 12                 | 3.682                      | 4.601 | 4.689 | 5.089 |
| 24                 | 3.018                      | 4.078 | 4.213 | 4.939 |

И в этом случае количество прореагировавшего вещества возрастает с концентрацией нитрата, но еще значительно медленнее, чем это имело место при возрастающих концентрациях альдегида. Оптимум концентрации нитрата, повидимому, находится между 4 и 5%.

#### Влияние концентрации фермента

5 г нитрата натрия, 0.5 г ацетальдегида, возрастающее количество молока (от 15 до 60 см<sup>3</sup>) в 100 см<sup>3</sup>. Температура 50°.

Из опытов (см. верхн. табл., стр. 497) следует, что при постоянной концентрации нитрата и альдегида размер превращения в ранних стадиях реакции прямо пропорционален концентрации фермента, но в более поздних стадиях имеют место небольшие отклонения от этой закономерности.

мг  $N_2O_3$  в 100 см<sup>3</sup>

| Время<br>(в часах) | Концентрация молока (в см <sup>3</sup> ) |       |       |       |
|--------------------|------------------------------------------|-------|-------|-------|
|                    | 15                                       | 30    | 45    | 60    |
| 1                  | 0.750                                    | 1.509 | 2.203 | 2.995 |
| 2                  | 1.149                                    | 2.271 | 3.509 | 4.406 |
| 3                  | 1.226                                    | 2.702 | 4.658 | 5.097 |
| 6                  | 1.314                                    | 3.069 | 5.021 | 6.187 |
| 9                  | 1.256                                    | 3.028 | 5.297 | 6.269 |
| 24                 | 1.201                                    | 3.060 | 5.260 | 6.273 |

## Влияние температуры

Кроме приведенных серий опытов, произведенных при 50°, для выяснения влияния температуры на действие системы пергидридаза — альдегид были поставлены опыты при 30, 40, 60 и 70°.

75 см<sup>3</sup> свежего молока, 5 г нитрата натрия, 0.5 г ацетальдегида.

мг  $N_2O_3$  в 100 см<sup>3</sup>

| Время<br>(в часах) | Температура |       |       |       |
|--------------------|-------------|-------|-------|-------|
|                    | 30°         | 40°   | 60°   | 70°   |
| 0.5                | 0.506       | 0.624 | 4.434 | 4.085 |
| 1                  | 1.242       | 1.403 | 5.971 | 3.227 |
| 2                  | 1.826       | 2.772 | 8.871 | 2.762 |
| 3                  | 2.137       | 3.528 | 8.171 | 1.552 |
| 6                  | 2.589       | 3.881 | 5.971 | 1.491 |
| 8                  | 2.700       | 4.001 | 5.942 | 1.507 |
| 24                 | 4.085       | 4.412 | 5.353 | 1.520 |
| 48                 | 4.131       | —     | 5.360 | —     |

Эти данные с полной ясностью показывают, что при действии молока на нитраты в присутствии ацетальдегида протекают одновременно два процесса: восстановление нитратов в нитриты и частичное исчезновение уже образовавшегося нитрита. Для обоих процессов скорость реакции увеличивается с повышением температуры до 60°. При 70° заметно падает как восстановление нитратов, так и разложение нитритов. Оптимум находится между 60 и 70°. Причины разложения нитритов мне еще не удалось выяснить (см. ниже).

### Действие системы пергидридаза — альдегид в щелочном растворе

Если сопоставить все приведенные выше данные, то обращает на себя внимание, что восстановительная способность исследуемой системы чрезвычайно мала. В принятых условиях опыта наивысшая концентрация субстратов — 5% нитрата и 1% ацетальдегида — оказалась наиболее благоприятной. Но и в самом благоприятном случае количество прореагировавшего вещества составляет не более 0.3% исходного количества субстрата. Незначительность превращения можно было в первую очередь объяснить тем, что образующаяся из ацетальдегида уксусная кислота раз-

лагает образующийся нитрит, причем выделяющаяся из него азотистая кислота более или менее быстро разрушается. Если это предположение правильно, то в щелочном растворе должно получаться большее количество нитрита, чем в нейтральном. Это объяснение казалось мне тем более правдоподобным, что благоприятное влияние щелочности на восстановление нитратов экстрактами из органов уже наблюдалось ранее<sup>2</sup>. Опыты показали, однако, против всякого ожидания, что прибавление 1%-ного раствора двууглекислого натрия не оказало заметного влияния на ход восстановления нитрата исследуемой системой.

60 см<sup>3</sup> свежего молока, 5 г нитрата натрия с прибавлением или без прибавления 0.5 г ацетальдегида и 1 г двууглекислого натрия в 100 см<sup>3</sup>. Температура 50°.

мг N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> в 100 см<sup>3</sup>

| Время<br>(в часах) | Прибавки                  |          |            |
|--------------------|---------------------------|----------|------------|
|                    | альдегид +<br>+бикарбонат | альдегид | бикарбонат |
| 1                  | 2.967                     | 2.958    | 0.0        |
| 2                  | 4.415                     | 4.389    | 0.0        |
| 3                  | 5.433                     | 5.350    | 0.0        |
| 7                  | 6.269                     | 6.295    | 0.937      |
| 24                 | 6.309                     | 6.285    | 107.36     |

Тот факт, что прибавление двууглекислого натрия не оказывает никакого влияния на восстановление нитрата, ясно показывает, что образующаяся уксусная кислота не обуславливает никакого разложения нитрита.

#### Действие системы пергидридаза — альдегид на нитрит натрия

Другим объяснением незначительной восстановительной способности системы пергидридаза — альдегид является предположение, что образующийся сначала нитрит восстанавливается системой дальше или претерпевает какое-то другое превращение. Для проверки этого предположения был поставлен следующий опыт.

50 см<sup>3</sup> свежего или кипяченого молока, 5.175 мг N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> в виде нитрита натрия с прибавлением или без прибавления 0.5 г ацетальдегида в 100 см<sup>3</sup>. Температура 50°.

мг N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> в 100 см<sup>3</sup>

| Время<br>(в часах) | Состав смеси                 |                                 |               |
|--------------------|------------------------------|---------------------------------|---------------|
|                    | свежее молоко +<br>+альдегид | кипяченое молоко +<br>+альдегид | свежее молоко |
| 0                  | 5.159                        | 5.169                           | 5.181         |
| 1                  | 5.007                        | 5.147                           | 5.163         |
| 2                  | 4.776                        | 5.152                           | 5.172         |
| 4                  | 4.567                        | 5.158                           | —             |
| 7                  | 4.435                        | —                               | 5.178         |
| 24                 | 4.345                        | 5.172                           | 5.186         |

Таким образом, в то время как в пробах с кипяченым молоком в присутствии ацетальдегида и со свежим молоком в отсутствии альдегида не наблюдается уменьшения содержания нитрита, в пробе со свежим



молоком в присутствии альдегида имеет место определенное исчезновение прибавленного нитрита, безусловно лежащее вне пределов ошибок опыта. Уменьшение содержания нитрита, однако, настолько незначительно (около 15%), что картина процесса восстановления этим существенно не изменяется. Поэтому нужно допустить, что или пергидридаза вообще имеется в молоке в очень малых количествах, или она сравнительно быстро разлагается какими-либо продуктами реакции. Более глубокое понимание природы происходящих здесь процессов вряд ли возможно при работе с такими сложными системами, как молоко. Поэтому я занялся разработкой метода приготовления пергидридазы.

### Опыты с формальдегидом

Для сравнения были также поставлены опыты с формальдегидом вместо ацетальдегида при прочих равных условиях.

75 см<sup>3</sup> молока, 5 г нитрата натрия, возрастающее количество формальдегида (от 0.25 до 1 г) в 100 см<sup>3</sup>. Температура 50°.

мг N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> в 100 см<sup>3</sup>

| Время<br>(в часах) | Концентрация альдегида (в г) |       |       |       |
|--------------------|------------------------------|-------|-------|-------|
|                    | 0.25                         | 0.50  | 0.75  | 1.00  |
| 1                  | 0.110                        | 0.101 | 0.104 | 0.114 |
| 3                  | 0.194                        | 0.147 | 0.121 | 0.117 |
| 6                  | 0.176                        | 0.227 | —     | —     |
| 24                 | 0.161                        | 0.228 | 0.169 | 0.139 |

Из этих опытов видно, что с ацетальдегидом получаются значительно лучшие результаты, чем с формальдегидом. Вероятно, большая ядовитость последнего играет существенную роль.

### Пергидридаза в телячьей печени

200 г растертой телячьей печени обрабатывались в течение 24 часов 400 см<sup>3</sup> раствора, содержащего 2% фтористого натрия и 1% двууглекислого натрия, после чего смесь была профильтрована через полотно. С мутным фильтратом были поставлены следующие опыты: 5 г нитрата натрия с прибавлением или без прибавления 0.5 г ацетальдегида, возрастающее количество экстракта из печени (25 и 50 см<sup>3</sup>) в 100 см<sup>3</sup>. Температура 50°.

мг N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> в 100 см<sup>3</sup>

| Время<br>(в часах) | 25 см <sup>3</sup> экстракта |               | 50 см <sup>3</sup> экстракта |               |
|--------------------|------------------------------|---------------|------------------------------|---------------|
|                    | с альдегидом                 | без альдегида | с альдегидом                 | без альдегида |
| 1                  | 0.777                        | 0.128         | 1.101                        | 0.507         |
| 2                  | 1.404                        | 0.305         | 2.437                        | 1.163         |
| 3                  | 2.159                        | 0.353         | 4.565                        | 1.271         |
| 6                  | 3.632                        | —             | 5.851                        | 1.451         |
| 9                  | 4.575                        | 0.371         | —                            | —             |
| 24                 | 4.566                        | 0.339         | 5.971                        | 1.432         |

Таким образом, в данных условиях опыта в присутствии ацетальдегида наблюдается увеличение превращения, но это увеличение падает с концентрацией экстракта из печени: при равных количествах альдегида увеличение составляет 13 при 25 см<sup>3</sup> экстракта и 4 при 50 см<sup>3</sup>. Из хода процесса восстановления можно заключить, что пергидридаза молока тождественна с пергидридазой печени.

Экстракты из печени, нагретые до кипения, не оказывают никакого влияния на восстановление нитрата ацетальдегидом.

## ВЫВОДЫ

I. Свежее коровье молоко ускоряет восстановление нитратов альдегидами в такой мере, что при соответствующих условиях опыта образование нитрита можно обнаружить уже по истечении 1—2 минут. Кипяченое молоко в присутствии альдегида, а также свежее молоко без альдегида не оказывают сами по себе никакого влияния на восстановление нитратов.

II. Скорость восстановления, а также размер превращения возрастают с концентрацией альдегида, но значительно медленнее последней.

III. То же самое имеет место и для концентрации нитратов.

IV. При постоянной концентрации альдегида и нитрата превращение прямо пропорционально концентрации фермента в ранних стадиях восстановительного процесса; в более поздних стадиях наблюдаются незначительные отклонения от этой закономерности.

V. Наряду с восстановлением нитратов имеет место и разрушение образовавшихся нитритов. Скорость процессов возрастает при повышении температуры. Оптимум находится между 60 и 70°.

VI. Образующаяся из ацетальдегида уксусная кислота не оказывает никакого влияния на разложение нитритов, ибо при щелочной реакции не замечается никакого увеличения количества прореагировавшего вещества.

VII. В смеси свежего молока, ацетальдегида и нитрита натрия происходит при 50° медленное уменьшение содержания нитрита. Однако это уменьшение настолько незначительно, что ход восстановления нитратов системой пергидридаза — альдегид не нарушается им существенно.

VIII. Формальдегид дает значительно менее благоприятные результаты, чем ацетальдегид.

IX. Из телячьей печени можно приготовить при помощи 2%-ного раствора фтористого натрия и 1%-ного раствора двууглекислого натрия экстракт, который ускоряет, так же как и пергидридаза молока, восстановление нитратов ацетальдегидом.

Значение всех этих данных для теории восстановительных ферментов будет подробно изложено в одном из последующих сообщений в связи с результатами других опытов.

8 мая 1914 г.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бах. *Biochem. Zs.*, **31**, 443 (1911); настоящая книга, стр. 490.
2. Heft er. *Arch. exp. Pathol. u. Pharm.*, **28** (1908).

## Сообщение III

## О КОФЕРМЕНТЕ ПЕРГИДРИДАЗЫ В ЖИВОТНЫХ ТКАНЯХ

[Vorkommen eines Kofermentes der Perhydridase in tierischen Geweben] \*

В сообщении I этой серии<sup>1</sup> было упомянуто, что при фильтровании эмульсий из растертой печени, обладающих энергичной восстановительной способностью, получают совершенно неактивные фильтраты, в то время как осадок сохраняет восстановительные свойства эмульсии. Количественные опыты показали, что восстановительная способность этих остатков значительно меньше, чем восстановительная способность исходных эмульсий. Так как восстановительным агентом тканей является сложная система «пергидридаза + вещество, расщепляющее воду + вода», то естественно было допустить, что наблюдающееся снижение восстановительной способности должно быть приписано удалению вещества, расщепляющего воду и действующего как кофермент. Если это предположение правильно, то фильтраты, неактивные сами по себе, должны представлять в соединении с пергидридазой из молока, так же неактивной самой по себе, восстанавливающую систему. В действительности это так и есть: отфильтрованные экстракты различных тканей содержат вещество, неразрушающееся при кипячении, которое восстанавливает в присутствии свежего, некипяченого молока красителя в лейкоформы и нитраты в нитриты. В присутствии кипяченого молока эти реакции не протекают.

Для того чтобы уточнить условия, в которых происходят реакции, я применил метод восстановления нитратов, описанный мною в сообщении II<sup>2</sup>, который легко проводится количественно.

Опыты были поставлены следующим образом.

200 г печени (телячьей) были измельчены в мясорубке, полученная масса размешана с 400 см<sup>3</sup> воды и отфильтрована после кипячения. 50 см<sup>3</sup> фильтрата смешивались с 50 см<sup>3</sup> свежего коровьего молока и 5 г нитрата натрия, с прибавлением или без прибавления 2 г фтористого натрия и 1 г двууглекислого натрия и нагревались до 60°; образующийся нитрит определялся описанным способом. Двууглекислый натрий прибавлялся для выяснения влияния кислотности или щелочности смеси на ход восстановления нитратов, а фтористый натрий должен был препятствовать развитию бактерий в этой чрезвычайно для них благоприятной среде. Полученные результаты приведены в нижеследующей таблице.

мг N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> в 100 см<sup>3</sup>

| Время<br>(в часах) | Прибавки |                    |       |                          |
|--------------------|----------|--------------------|-------|--------------------------|
|                    | —        | NaHCO <sub>3</sub> | NaF   | NaHCO <sub>3</sub> + NaF |
| 0.5                | 8.452    | 8.192              | 8.093 | 8.107                    |
| 1                  | 9.132    | 8.625              | 8.132 | 8.006                    |
| 2                  | 9.409    | 8.601              | 7.762 | 7.510                    |
| 3                  | 10.088   | 9.240              | 7.401 | 6.521                    |
| 6                  | 10.350   | 9.180              | 6.469 | 5.083                    |
| 24                 | 48.762   | 236.905            | 6.445 | 4.906                    |

Из этих данных видно, что в первых стадиях восстановительного процесса нет существенной разницы между активностью пергидридазы в различных условиях. Однако дальнейшее восстановление нитрата протекало различно в зависимости от прибавок. В отсутствие фтористого натрия (столбцы 2 и 3) наблюдается непрерывное возрастание количества нитрита,

\* Biochem. Zs., 38, 154 (1912).

и конечное состояние явно указывает на действие бактерий. Тот факт, что в присутствии  $\text{NaHCO}_3$  количество нитрита составляло 236.905 мг  $\text{N}_2\text{O}_3$ , а в отсутствии  $\text{NaHCO}_3$  только 48.762 мг, объясняется благоприятным влиянием щелочности и неблагоприятным влиянием кислотности на развитие бактерий. В присутствии фтористого натрия (столбцы 4 и 5) количество нитрита достигает через полчаса максимального значения и затем правильно убывает. Замечательно, что щелочность смеси не препятствует убыванию количества нитрита и даже способствует ему. Это в особенности ясно выявляется в следующем опыте.

50 см<sup>3</sup> молока, 50 см<sup>3</sup> экстракта из мышц (теленка), приготовленного описанным выше способом, 2 г фтористого натрия с прибавлением или без прибавления 1 г бикарбоната натрия. Температура 50°.

мг  $\text{N}_2\text{O}_3$  в 100 см<sup>3</sup>

| Время (в часах)                    | 0.5    | 1      | 2      | 3      | 6      | 24     |
|------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Без $\text{NaHCO}_3$ . . . . .     | 13.525 | 12.922 | 12.957 | 12.930 | 12.128 | 11.088 |
| В присутствии $\text{NaHCO}_3$ . . | 13.041 | 9.891  | 9.681  | 8.632  | 8.086  | 6.150  |

Убывание количества нитрита составляло, таким образом, в первом случае 17.7%, во втором 53%. По всей вероятности, щелочность раствора способствует дальнейшему восстановлению образующихся нитритов. Этот вопрос будет выяснен в дальнейших опытах.

Ткани, применявшиеся для этих опытов, обрабатывались для получения экстракта через несколько часов после смерти животных. Возникает вопрос, существует ли найденный кофермент в живых тканях или он образуется при их посмертном автолизе. Для разрешения этого вопроса ткани убитого кролика были исследованы на присутствие кофермента пергидридазы немедленно после его смерти. Результат был явно положительным. Для того чтобы располагать данными о количественном распределении кофермента, ткани различных органов теленка, полученные еще теплыми с бойни, были обработаны и исследованы описанным выше способом. Все опыты были проведены одновременно и при одинаковых условиях. В нижеследующей таблице приведены полученные результаты.

50 см<sup>3</sup> молока, 50 см<sup>3</sup> экстракта, 5 г нитрата натрия, 2 г фтористого натрия. Температура 50°.

мг  $\text{N}_2\text{O}_3$  в 100 см<sup>3</sup>

| Время (в часах) | Легкие | Мозг  | Селезенка | Почки  | Печень |
|-----------------|--------|-------|-----------|--------|--------|
| 0.5             | 7.198  | 8.625 | 11.088    | 12.937 | 16.180 |
| 1               | 6.881  | 8.257 | 10.211    | 12.950 | 16.219 |
| 2               | 6.734  | 7.762 | 9.026     | 12.621 | 12.939 |
| 6               | 5.093  | 7.510 | 8.923     | 9.023  | 11.089 |
| 24              | 3.987  | 7.102 | 7.601     | 7.915  | 9.703  |

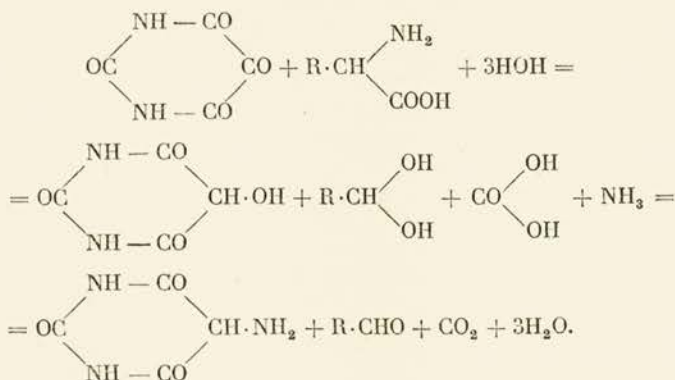
Таким образом, печень, повидимому, содержит наибольшее количество кофермента, а легкие — наименьшее. Однако не следует забывать, что во всех опытах одновременно с образованием нитритов происходит их разложение и что именно в экстракте из легких наблюдается наибольшее убы-

вание количества нитрита (55%). Полученные числа выражают, таким образом, только равнодействующую двух процессов, протекающих одновременно в противоположных направлениях. Абсолютные значения можно будет получить только тогда, когда удастся проследить за каждым из этих процессов в отдельности.

Как было указано вначале, кофермент пергидридазы не разрушается при кипячении. Он не осаждается спиртом, легко диализируется и не разрушается при обработке током воздуха. Относительно его химической природы нельзя еще сказать ничего определенного. По имеющимся в настоящее время данным можно считать установленным, что пергидридаза дает возможность использовать для восстановительных процессов только альдегиды, и среди них лучше всего низшие гомологи жирного ряда. На альдогексозы она не оказывает никакого действия. Из числа альдегидокислот может быть использована только глиоксиловая кислота. Так как последняя чрезвычайно распространена в животном организме в виде диуреида (аллантина), я поставил опыт восстановления нитрата этим соединением (50 см<sup>3</sup> молока, 5 г нитрата натрия, 2 г фтористого натрия, 1 г аллантина в 100 мл при 50°). Опыт дал, однако, совершенно отрицательный результат; в этих условиях аллантина, следовательно, не расщепляется на глиоксиловую кислоту и мочевины.

В связи с вопросом о природе кофермента пергидридазы следует отметить, что животный организм обладает постоянным и богатым источником альдегидов в виде α-аминокислот, являющихся нормальными продуктами распада протеинов.

Уже 50 лет тому назад Штрекер<sup>3</sup> сделал наблюдение, что α-аминокислоты окисляются уже при комнатной температуре аллоксаном с отщеплением аммиака и углекислоты, образуя альдегиды предшествующих гомологов углеводородного ряда; аллоксан при этом сам восстанавливается в урамил:



Образующийся урамил конденсируется затем с неизменным аллоксаном в мурексид.

Траубе<sup>4</sup> недавно доказал, что такое же окисление α-аминокислот может быть вызвано и другими кетосоединениями. Поэтому вряд ли можно сомневаться, что аналогичные реакции протекают также в животном организме и приводят к образованию альдегидов, которые играют роль кофермента пергидридазы, окисляясь далее за счет воды с образованием соответственных кислот.

Как это ни странно, реакция Штрекера, имеющая такое большое значение для понимания биологических процессов распада, совершенно не привлекла внимания биохимиков. Штрекер высказывается следующим образом о полученных им результатах:

«Мне кажется в высшей степени замечательным, что такие устойчивые соединения, как аланин и лейцин, так легко окисляются аллоксаном».

Лишь недавно Гертлей и Вутон<sup>5</sup> отметили, что реакция Штрекера представляет интерес для биологии с разных точек зрения. Пересматривая все данные, полученные за последние годы при исследовании биологических процессов распада, мы видим, что эта реакция указывает на путь, по которому идет нормальный распад аминокислот в организме. По всей вероятности, на реакциях такого рода основано действие дезамидирующих ферментов и карбоксилаз<sup>6</sup>. Поэтому представляло бы большой интерес исследовать влияние катализаторов на реакцию Штрекера.

27 ноября 1911 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бах. Biochem. Zs., **31**, 443 (1911); настоящая книга, стр. 490.
2. Бах. Biochem. Zs., **33**, 282 (1911); настоящая книга, стр. 494.
3. Strecker. Lieb. Ann., **123**, 363 (1862).
4. Traube. Ber. Dtsch. chem. Ges., **44**, 3145 (1911).
5. Hurlley a. Wootton. J. Chem. Soc., **288**, 99 (1911).
6. Neuberg. Ber. Dtsch. chem. Ges., **44**, 2477; Biochem. Zs., **31**, 170; **32**, 323 (1911).

#### Сообщение IV

#### РАСТИТЕЛЬНАЯ ПЕРГИДРИДАЗА

[Pflanzliche Perhydridase] \*

После того как мной было установлено<sup>1</sup>, что восстановление красителей и нитратов в животном организме происходит под действием системы «пергидридаза — расщепляющее воду вещество (альдегид) — вода», я поставил себе целью изучить более подробно восстановительную систему растительных тканей. Теоретические соображения, а также некоторые экспериментальные данные, которые до сих пор не были истолкованы удовлетворительно, позволяли предположить, что и в этом случае имеется аналогичная система.

Аблус и Алуа<sup>2</sup> нашли, что картофельный сок, который сам по себе не оказывает никакого действия на салициловый альдегид, окисляет последний в салициловую кислоту в присутствии нитратов или хлоратов. Они приписывают это действие «окислительно-восстановительной диастазе» и считают, что окисление салицилового альдегида происходит за счет соединения, находящегося в соке и содержащего большое количество кислорода. То, что для этого окисления необходимо еще присутствие нитратов или хлоратов, они объясняют, предположив, что оксидаза (лакказа), также имеющаяся в картофельном соке, задерживает реакцию, стабилизируя упомянутое кислородное соединение. Нитраты и хлораты должны в данном случае заменять стабилизированное соединение.

В более поздней работе Аблус<sup>3</sup> установил, что окисление салицилового альдегида происходит также в отсутствии нитратов или хлоратов, если приостановить действие оксидазы путем исключения кислорода; в этих условиях окислительно-восстановительный фермент приобретает способность действовать на гипотетическое кислородное соединение.

Результаты этих наблюдений показывают, что картофельный сок содержит пергидридазу, которая ускоряет расщепление воды альдегидами и вызывает восстановительные процессы. Опыт показал, что это в действительности так и есть. Оказалось, что восстановление нитратов в картофельном соке под действием системы пергидридаза — альдегид — вода

\* Biochem. Zs., **52**, 412 (1913).

происходит настолько быстро, что эта реакция очень удобна для демонстрационных опытов.

К 1 г свежерастертого очищенного картофеля прибавляют в пробирке 10 см<sup>3</sup> 4%-ного раствора нитрата натрия, предварительно подогретого до 60°, и 3 капли 10%-ного раствора ацетальдегида; смесь нагревается в течение 2 минут при 60°. Реактив Илосвей — Лунге дает четкую реакцию на нитриты. В поставленной одновременно контрольной пробе без альдегида нет ни следа нитрита.

Растительная пергидридаза растворима в воде. Можно приготовить совершенно прозрачные, очень активные растворы следующим образом.

100 г измельченного очищенного картофеля растирают с 250 см<sup>3</sup> 2%-ного раствора фтористого натрия \* и фильтруют смесь при помощи водоструйного насоса. Бесцветный вначале фильтрат довольно быстро окрашивается под действием оксида экстракта на хромогены, находящиеся в нем. Все описанные ниже опыты были поставлены с такими же подверженными действию бактерий растворами.

Сначала была количественно исследована активность пергидридазы при восстановлении нитратов в нитриты. Опыты были проведены по методу, описанному в сообщении II настоящей серии. В качестве примера можно привести следующие данные, взятые из многочисленных, хорошо совпадающих серий опытов.

80 см<sup>3</sup> активного или инактивированного кипячением экстракта, 4 г нитрата натрия с прибавлением или без прибавления 1 г ацетальдегида в 100 см<sup>3</sup>. Температура 50°.

мг N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> в 100 см<sup>3</sup>

| Время<br>(в часах) | I<br>Активный<br>экстракт +<br>+ альдегид | II<br>Инактивирован-<br>ный экстракт +<br>+ альдегид | III<br>Активный<br>экстракт без<br>альдегида |
|--------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| 0                  | 0                                         | 0                                                    | 0                                            |
| 1                  | 7.51                                      | 0                                                    | 0.31                                         |
| 2                  | 12.25                                     | 0                                                    | 0.36                                         |
| 3                  | 12.07                                     | 0                                                    | 0.39                                         |
| 5                  | 12.18                                     | Следы                                                | 0.43                                         |
| 24                 | 12.06                                     | »                                                    | 0.41                                         |
| 48                 | 12.12                                     | »                                                    | 0.49                                         |

Из этих опытов следует, что необходимый для выявления действия пергидридазы кофермент, который может быть заменен альдегидами, имеется в ничтожном количестве в отфильтрованных картофельных экстрактах. При хранении экстрактов в асептических условиях в отсутствии воздуха количество кофермента непрерывно возрастает, как это было установлено в опытах, поставленных, чтобы выяснить, насколько сохраняется пергидридаза.

В этих опытах свежеприготовленный экстракт был налит в склянки, хорошо закрывающиеся притертыми пробками; склянки были погружены для полного исключения воздуха в водяную баню при комнатной температуре. По истечении определенных промежутков времени вынималась одна из склянок и определялась восстановительная способность экстракта в присутствии и в отсутствии ацетальдегида по истечении часового действия на нитрат натрия.

Таким образом, количество нитрита, которое может быть образовано под действием пергидридазы и без альдегида, возрастает при хранении экстракта. Это можно объяснить только тем, что при автолизе составных частей экстракта образуются вещества, которые могут играть роль кофермента пергидридазы. Эти опыты показывают также, что растительная пергидридаза довольно устойчива при хранении в антисептических условиях и в отсутствии воздуха. При доступе воздуха она очень скоро разрушается, причем в экстракте путем окисления самопроизвольно появляется азотистая кислота (см. следующее сообщение).

\* Фтористый натрий (Кальбаум) имел слабощелочную реакцию.

мг  $N_2O_3$  в  $100\text{ см}^3$ 

| Продолжительность хранения<br>(в днях) | В присутствии<br>альдегида | В отсутствии<br>альдегида |
|----------------------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 0                                      | 7.01                       | 0.23                      |
| 1                                      | 7.05                       | 0.31                      |
| 4                                      | 6.92                       | 0.45                      |
| 10                                     | 6.98                       | 2.41                      |
| 15                                     | 6.71                       | 4.62                      |
| 20                                     | 6.80                       | 5.90                      |
| 25                                     | 6.51                       | 6.70                      |
| 30                                     | 6.60                       | 6.90                      |

Все попытки получить из растворов активную пергидридазу в твердом состоянии до сих пор не привели к благоприятным результатам. В отношении активности и скорости реакции растительная пергидридаза очень близка к животной. Она отличается от нее, однако, в том отношении, что в соединении с животным коферментом она не вызывает ни малейшего восстановления. Как было указано в сообщении III, кипящая вода извлекает из животных тканей некоторые вещества, которые сами по себе не вызывают никаких восстановлений, но представляют собой, в соединении с пергидридазой, также не активной самой по себе, энергичные восстановительные системы. Дальнейшие опыты показали, что этот кофермент содержится в больших количествах в продажном пептоне (Мерк) и в кипяченых экстрактах зимазы. Растительная пергидридаза не оказывает никакого действия на эти препараты, так же как и на кипяченые экстракты из животных тканей.

Для выяснения причин этого различия я поставил многочисленные опыты, которые еще не привели к желаемому результату и которые я здесь вкратце изложу.

Согласно современному состоянию наших знаний, животная пергидридаза способна использовать для создания восстановительной системы только низшие альдегиды; поэтому естественно было предположить, что кофермент состоит из соединений, которые легко превращаются в альдегиды под действием примесей, сопровождающих животную пергидридазу, или ферментов. Тот факт, что растительная пергидридаза не действует на кофермент, можно объяснить отсутствием соответственных примесей или ферментов. Среди соединений, из которых сравнительно легко могут образовываться альдегиды, в первую очередь нужно иметь в виду  $\alpha$ -аминокислоты. Последние окисляются за счет воды при участии аллоксана (Штрекер) или других кетосоединений (Траубе), образуя предшествующие в гомологическом ряду альдегиды, с отщеплением углекислоты и аммиака. Таким образом, если использование кофермента животной пергидридазы основано на упомянутом превращении аминокислот, то и изолированные аминокислоты могут играть роль кофермента. В этом направлении были поставлены опыты со свежим коровьим молоком и глицином, тирозином, аланином, серином, лейцином и аспарагиновой кислотой в виде натриевых солей или свободных кислот. В качестве субстратов, способных восстанавливаться, применялись метиленовая синь и нитрат натрия. Все опыты дали определенно отрицательный результат. Что мы здесь не имеем дела с разрушением пергидридазы под влиянием прибавок, было доказано тем, что во всех пробах при прибавлении ацетальдегида происходят нормальные восстановительные процессы.



Я поставил далее аналогичные опыты с пировиноградной и щавелевоуксусной кислотами, так как согласно Нейбергу кетокислоты переходят под влиянием открытой им карбоксилазы в предшествующие альдегиды с отщеплением углекислоты. Эти опыты также дали вполне отрицательный результат. Таким образом, природа кофермента еще не выяснена и поэтому вопрос о причине различия между действием животной и растительной пергидридазы еще не разрешен.

Так же как и животная пергидридаза, растительная пергидридаза вызывает восстановление только при содействии низших альдегидов или соединений, образующих альдегиды. Кастл и Эльвов<sup>4</sup> нашли целый ряд «ускорителей» (толуол, спирты, альдегиды, ацетон и т. д.) для восстановления нитратов неотфильтрованными картофельными экстрактами (эмульсии). За исключением альдегидов мне не удалось подтвердить эти данные при работе с приготовленными мной совершенно прозрачными растворами пергидридазы. Не только свеженегранные спирт, ацетон или толуол, но даже метилал, чрезвычайно близкий к формальдегиду, совершенно не могли быть использованы для восстановлений. Ацетал, наоборот, чрезвычайно легко используется как животной, так и растительной пергидридазой. Амигдалин играет роль кофермента пергидридазы картофеля, но не пергидридазы молока. Эта разница объясняется тем, что картофельные экстракты содержат смесь ферментов, известную под названием «эмульсин», под действием которой амигдалин расщепляется на глюкозу, бензальдегид и синильную кислоту, в то время как в коровьем молоке эмульсин не имеется. Однако если к смеси молока, нитрата и амигдалина прибавить некоторое количество этой смеси ферментов, то происходит быстрое восстановление нитратов под действием отщепленного бензальдегида.

Растительная пергидридаза, которая быстро восстанавливает нитраты в присутствии альдегидов, не оказывает в тех же условиях никакого действия на метиленовую синь, чем она существенно отличается от животной пергидридазы. Причина этого различия до сих пор еще не выяснена.

5 июня 1913 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бах. *Biochem. Zs.*, **31**, 443; **33**, 282 (1911); **38**, 154 (1912); настоящая книга, стр. 490, 494, 501.
2. Abelous et Aloy. *C. R. Acad. Sci., Paris*, **138**, 382 (1904).
3. Abelous. *C. R. Acad. Sci., Paris*, **138**, 1619 (1904).
4. Kastle a. Elvove. *Amer. Chem. J.*, **31**, 606 (1904).

#### Сообщение V

### НОВЫЕ ДАННЫЕ О КОФЕРМЕНТЕ ПЕРГИДРИДАЗЫ. ОБРАЗОВАНИЕ АЛЬДЕГИДОВ ИЗ АМИНОКИСЛОТ

[*Weiteres über das Koferment der Perhydridase. Bildung von Aldehyden aus Aminosäuren*] \*

В то время как изолированные аминокислоты не вызывают в соединении с пергидридазой<sup>1</sup> никакого восстановления нитратов, белок, полностью расщепленный до аминокислот, оказался активным коферментом пергидридазы. Это побудило меня исследовать среди других соединений вещество, приготовленное по методу Абдергальдена и известное под названием «эрептон».

Сначала я пытался выделить активную часть эрептона путем обработки органическими растворителями (метиловый спирт, этиловый спирт, аце-

\* *Biochem. Zs.*, **58**, 205 (1913).

тон, эфир или их смеси), но не получил при этом благоприятных результатов. При попытке определить, насколько эта активная часть перегоняется с парами воды, я произвел некоторые наблюдения, из которых удалось сделать очень существенные выводы относительно реакций, лежащих в основе действия кофермента. Оказалось, в частности, что водные растворы эрептона всегда выделяют небольшие количества альдегида при перегонке. Дистилляты восстанавливают щелочные растворы серебра на холоду с образованием зеркала, дают фиолетовое окрашивание с фуксином и бисульфитом и восстанавливают нитраты в нитриты под действием пергидридазы. Наряду с альдегидами перегоняется также аммиак и — вначале перегонки — сернистое соединение. Для более точной характеристики альдегидов были, само собой разумеется, необходимы опыты с большими количествами эрептона, но скорость выделения альдегида можно было с большой точностью определять количественно в моих опытах по восстановлению нитратов в присутствии пергидридазы.

В первую очередь возник вопрос о том, существуют ли альдегиды уже в расщепленном белке или они образуются только при перегонке раствора эрептона. Против предсуществования альдегидов говорит уже тот факт, что свежие растворы эрептона не восстанавливают щелочных растворов серебра и не дают реакций с фуксином и бисульфитом. Однако доказать с полной несомненностью количественными опытами непрерывное образование альдегидов не удалось, ибо оказалось, что при перегонке растворов эрептона альдегиды переходят только в первые порции дистиллята, а дальнейшие фракции не содержат альдегида. При повторении перегонки после замены отогнанной воды и стояния в течение 24 часов из раствора вновь отгонялись альдегиды. При перегонке в токе воздуха альдегиды содержатся в одинаковом количестве во всех фракциях дистиллята. Для наглядности я привожу здесь последний опыт, который был поставлен для окончательной проверки всех полученных в этой работе результатов, при соблюдении всех мер предосторожности.

Раствор 10 г эрептона в 250 см<sup>3</sup> воды перегонялся из большой колбы; дистиллат собирался фракциями по 15 см<sup>3</sup>. 10 см<sup>3</sup> каждой фракции смешивались с 5 см<sup>3</sup> свежего коровьего молока и 5 см<sup>3</sup> 15%-ного раствора нитрата натрия; после 10-минутного пребывания в термостате при 60° образовавшееся количество нитрита определялось по описанному ранее методу<sup>2</sup>. После того как было отобрано шесть фракций, отогнанная вода заменялась свежей, и на следующий день перегонка повторялась таким же образом.

Эта операция была повторена с одним и тем же раствором эрептона пять раз. По окончании пятой перегонки отогнанная вода была заменена свежей, и жидкость немедленно отогнана в токе воздуха. Все результаты приведены в нижеследующей таблице. Само собою разумеется, что в тех же условиях были поставлены все обычные контрольные опыты со свежим молоком и раствором нитрата, и с кипяченым молоком, раствором нитрата и дистиллятом. Все контрольные опыты дали отрицательные результаты.

*Восстановление нитратов, произведенное 15 см<sup>3</sup> дистиллята (в мг N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)*

|                                                  | Фракции |       |       |       |       |       |
|--------------------------------------------------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                                                  | I       | II    | III   | IV    | V     | VI    |
| 1-я перегонка . . . . .                          | 0.062   | 0.030 | Следы | 0     | 0     | 0     |
| 2-я » . . . . .                                  | 0.066   | 0.021 | »     | Следы | 0     | 0     |
| 3-я » . . . . .                                  | 0.059   | 0.036 | 0.009 | »     | 0     | 0     |
| 4-я » . . . . .                                  | 0.053   | 0.026 | Следы | 0     | 0     | 0     |
| 5-я » . . . . .                                  | 0.058   | 0.028 | 0.001 | Следы | 0     | 0     |
| Дальнейшая перегонка<br>в токе воздуха . . . . . | 0.046   | 0.059 | 0.056 | 0.063 | 0.059 | 0.050 |

Этот опыт позволил установить следующие положения:

1. При перегонке раствора эрептона альдегиды переходят только в первые порции дистиллята. После отгонки около  $\frac{1}{6}$  объема жидкости дистиллят практически не содержит альдегида.

2. Если после прекращения отгонки альдегида оставить раствор эрептона на 24 часа и затем вновь отгонять его, то первые фракции снова содержат альдегиды в том же количестве, как и при предыдущей перегонке.

3. Прекращение выделения альдегида несомненно связано с недостатком кислорода, ибо при продолжении перегонки в токе воздуха альдегиды вновь появляются в дистилляте. В последовательных фракциях дистиллята содержится приблизительно одинаковое количество альдегида, почти равное тому количеству, которое содержится в первой фракции при всех перегонках.

Я позволю себе обсудить несколько подробнее значение этих результатов.

Из пунктов 1 и 2 вытекает, что альдегиды не существуют заранее в эрептоне в качестве примесей, а образуются только при нагревании раствора. В противном случае раствор эрептона, не содержащий более альдегидов после перегонки, не мог бы выделять новые количества альдегида при перегонке после 24-часового стояния. Если принять еще во внимание, что свежие растворы эрептона не оказывают действия ни на щелочный раствор серебра, ни на фуксин с бисульфитом, то можно с полной достоверностью утверждать, что эрептон не содержит альдегидов в заметном количестве.

Значение пункта 3, касающегося роли кислорода при образовании альдегидов, может быть объяснено только в связи с вопросом о материалах, из которых образуются альдегиды.

Ввиду того что среди продуктов распада белка не известно ни одного однородного вещества, которое отщепляло бы альдегиды при перегонке в водном растворе, напрашивается вывод, что альдегиды образуются только при взаимодействии продуктов распада при высокой температуре. Среди реакций, протекающих с образованием альдегидов, в первую очередь надо иметь в виду открытое Штрекером<sup>3</sup> окисление  $\alpha$ -аминокислот аллоксаном. Аминокислоты окисляются за счет гидроксила воды с отщеплением аммиака и углекислоты и превращаются в предшествующие в гомологическом ряду альдегиды, а аллоксан восстанавливается освобождающимся водородом, образуя урамил. Последний затем конденсируется с избытком аллоксана и отщепленным аммиаком в мурекид. Аллоксан сам по себе является продуктом распада белка (хотя и не образующимся нормально). С другой стороны, согласно Траубе<sup>4</sup>, и другие кетосоединения дают ту же самую реакцию. Поэтому можно с большой вероятностью допустить, что при распаде белка на аминокислоты создаются те условия, которые необходимы для дальнейшего распада аминокислот по открытому Штрекером пути. Таким образом, если эрептон обладает способностью отщеплять альдегиды при перегонке, то это происходит потому, что он содержит еще наряду с  $\alpha$ -аминокислотами такие вещества, которые поглощают освобождающийся при расщеплении воды водород. Мы имеем здесь дело с сопряженной окислительно-восстановительной реакцией, при которой аминокислоты окисляются за счет воды, а способные к восстановлению вещества восстанавливаются\*. При обыкновенной температуре эта реакция протекает с неизмеримо малой скоростью, на что достаточно ясно указывает отсутствие реакции на альдегиды в холодных растворах эреп-

\* Более подробно по этому вопросу см. мою статью «Oxydationsprozesse in der lebenden Substanz». O p p e n h e i m e r. Handb. d. Biochemie, Ergänzung.-Bd. (1913). Jena.

тона. При более высокой температуре реакция Штрекера происходит довольно медленно, но все же с измеримой скоростью. Только тогда, когда эрептон играет роль кофермента пергидридазы при восстановлении нитратов, наблюдаются значительное образование и немедленное израсходование альдегидов.

Если допустить правильность этого толкования, то значение кислорода для образования альдегидов в растворах эрептона довольно легко объясняется. Окисление аминокислот за счет воды может происходить только в том случае, если присутствуют акцепторы для освобождающегося водорода; последние при этом, понятно, восстанавливаются. Так, например, из аллоксана образуется урамил, из хинона — гидрохинон и т. д. Если акцепторы водорода имеются в ограниченном количестве, как это, повидимому, имеет место в эрептоне, то после их полного восстановления реакция должна остановиться. Если вводить затем кислород, то восстановленные акцепторы водорода окисляются с возрождением первоначальных соединений, и вновь происходит расщепление воды и образование альдегидов.

Для того чтобы доказать правильность этого объяснения на примере реакции, происходящей между определенными соединениями, я поставил опыт с  $\alpha$ -аланином и бензохиноном, причем последний имелся в незначительном количестве по сравнению с первым.

0.05 г-мол.  $\alpha$ -аланина (Кальбаум), растворенные в воде с 0.001 г-мол. бензохинона, были подвергнуты перегонке таким же образом, как было описано выше для раствора эрептона. Определение содержания альдегида в различных фракциях дало следующие результаты (см. табл.).

*Восстановление нитратов, произведенное 15 см<sup>3</sup> дистиллята (в мг N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)*

|                                                  | Ф р а к ц и и |       |       |       |       |       |
|--------------------------------------------------|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                                                  | I             | II    | III   | IV    | V     | VI    |
| 1-я перегонка . . . . .                          | 0.361         | 0.220 | 0.057 | 0.023 | 0.010 | Следы |
| 2-я » . . . . .                                  | 0.341         | 0.233 | 0.037 | 0.018 | 0.011 | »     |
| 3-я » . . . . .                                  | 0.375         | 0.212 | 0.042 | 0.009 | 0.009 | »     |
| 4-я » . . . . .                                  | 0.370         | 0.228 | 0.023 | 0.015 | Следы | »     |
| Дальнейшая перегонка<br>в токе воздуха . . . . . | 0.287         | 0.330 | 0.381 | 0.360 | 0.340 | 0.321 |

Если сравнить эти результаты с теми, которые были получены в опыте с эрептоном, то обращает внимание полная аналогия между ходом образования альдегида в обоих опытах. И в том и в другом случае альдегид переходит только в первых фракциях. В жидкостях, не содержащих альдегида по окончании каждой перегонки, через 24 часа появляется вновь такое же количество альдегида, как при первоначальной перегонке. При пропускании тока воздуха во время перегонки содержание альдегида немедленно возрастает до первоначального значения и остается затем постоянным в течение продолжительного времени.

Для окисления аминокислот по реакции Штрекера, так же как и других окислительно-восстановительных реакций, основанных на расщеплении воды (по удачной номенклатуре Оппенгеймера<sup>5</sup> — «гидролитические окислительно-восстановительные реакции»), присутствие свободного кислорода не является решающим. Кислород играет роль только тогда, когда вследствие полного восстановления акцептора водорода реакция останавливается. Окисляя восстановленный акцептор водорода (гидрохинон) с возрождением первоначального соединения (хинон), он играет

роль деполяризатора, препятствующего установлению равновесия и обеспечивающего нормальный ход реакции. Полная аналогия между ходом реакции в растворах аланина с хиноном и в растворе эрептона позволяет считать, что в последнем случае образование альдегида так же происходит путем расщепления воды, присутствие кислорода способствует этой реакции только косвенно, ибо нам неизвестно среди продуктов распада белка такое вещество, которое поглощало бы свободный кислород с образованием альдегида. Ускоряют ли окислительные и восстановительные ферменты образование альдегидов из аминокислот — будет выяснено в дальнейших опытах.

Приведенные выше данные разрешают вопрос о природе кофермента пергидридазы. До сих пор считалось, что восстановительные процессы, происходящие в животных и растительных объектах, обуславливаются присутствием фермента (пергидридазой) и кофермента (который может быть заменен альдегидами), действующих с расщеплением воды. Этот кофермент был найден мной сначала в кипяченых экстрактах из органов, затем в продажном пептоне и, наконец, в эрептоне. Но так как образование альдегидов в последнем случае теперь доказано, то сейчас уже можно просто истинным коферментом пергидридазы считать альдегиды, и именно такие альдегиды, в которых альдегидная группа связана со сравнительно простыми радикалами, ибо сложные альдегиды, которые не восстанавливают непосредственно щелочного раствора серебра и не дают окрашивания с фуксином и бисульфитом, например альдогексозы и т. д., не могут быть использованы пергидридазой. Таким образом, пергидридаза является истинной альдегидазой и может быть использована не только как очень надежный, но и как очень чувствительный реактив на альдегиды. Непосредственные измерения показали, что 0.05 мг ацетальдегида в 5 см<sup>3</sup> (т. е. 1/100 000) дают с 2 см<sup>3</sup> свежего молока и 3 см<sup>3</sup> 1%-ного нитрата натрия количество нитрита, которое можно еще довольно точно определить количественно при помощи реактива Илосвей — Лунге.

### ВЫВОДЫ

I. Расщепленный до аминокислот белок, известный под названием эрептона, оказавшийся активным коферментом пергидридазы, отщепляет альдегиды при перегонке водного раствора.

II. Количественное исследование хода образования альдегида показывает, что альдегиды переходят только в первых фракциях дестиллята. После отгонки приблизительно  $\frac{1}{6}$  раствора дестилляты больше не содержат альдегида. При повторении перегонки через 24 часа из раствора вновь отгоняются альдегиды, переходящие в первые фракции в таком же количестве, как и в предыдущих перегонках.

III. Если после прекращения выделения альдегидов перегонка продолжается в токе воздуха, то в дестилляте вновь появляются альдегиды. При этом последовательные фракции содержат приблизительно одинаковые количества альдегида, близкие к количеству, получающемуся в первых фракциях.

IV. Из пунктов II и III вытекает, что альдегиды не предсуществуют в эрептоне, а образуются только при перегонке. Этот вывод подтверждается тем, что свежий раствор эрептона не восстанавливает щелочного раствора серебра и не окрашивает раствора фуксина с бисульфитом, в то время как первые фракции дестиллята дают обе эти реакции.

V. Образование альдегидов из эрептона основано на реакции Штрекера. Количественный ход образования альдегида при перегонке раствора,

который содержит в 200 см<sup>3</sup> воды 0.05 г-мол. аланина и 0.001 г-мол. бензохинона, вполне подобен тому, который наблюдается при перегонке растворов эрптона. Окисление  $\alpha$ -аминокислот происходит путем расщепления воды и свободный кислород нужен только для регенерирования восстановленных акцепторов водорода.

VI. Истинным коферментом пергидридазы являются альдегиды, в которых альдегидная группа связана с простыми радикалами. Сложные альдегиды (например, альдогексозы), которые не реагируют непосредственно со щелочным раствором серебра или с раствором бисульфита с фуксином, не могут быть использованы пергидридазой. Таким образом, пергидридаза представляет собой истинную альдегидазу.

12 ноября 1913 г.

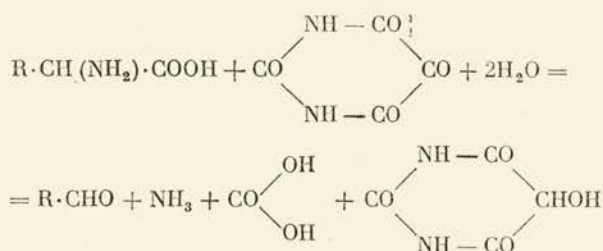
#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бах. *Biochem. Zs.*, **52**, 412 (1913); настоящая книга, стр. 504.
2. Бах. *Biochem. Zs.*, **33**, 282 (1911).
3. *Strecker. Lieb. Ann.*, **123**, 363 (1862).
4. *Traube. Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **44**, 3145 (1911).
5. *Oppenheimer. «Die Fermente und ihre Wirkungen»*, 759, Leipzig (1913).

## О НОВОЙ РЕАКЦИИ МОЧИ

[*Sur une nouvelle réaction de l'urine*] \*

В более ранних работах<sup>1</sup> я показал, что восстановление нитратов и красителей в тканях животного организма обусловливается одновременным действием фермента и кофермента, не оказывающих в отдельности никакого действия. В свежем молоке этот фермент существует без кофермента и вызывает совместно с коферментом, извлеченным из тканей или с альдегидами, такие же восстановительные реакции, как и в тканях. Кофермент может быть извлечен из тканей кипящей водой. Он находится также и в продажных пептонах и в белках, расщепленных до аминокислот. Последние исполняют роль кофермента только постольку, поскольку из них образуются альдегиды по реакции, аналогичной открытой в 1862 г. Штрепером<sup>2</sup> (действие аллоксана на аминокислоты):



Продолжая эти исследования, я установил, что нормальная моча содержит значительные количества того же самого кофермента, т. е. что она не восстанавливает сама по себе нитраты в нитриты, но производит эту реакцию в присутствии фермента, содержащегося в свежем молоке. Так как образующиеся нитриты легко определять количественно, эта реакция могла бы быть полезной для физиологических и патологических исследований. Поскольку нормальная моча не содержит альдегидов, эта реакция указывает на присутствие в ней продуктов распада белка.

Для выполнения этих определений я предлагаю два метода: один — приблизительный, а другой — очень точный, но несколько более сложный.

По первому методу 3 см<sup>3</sup> свежей мочи и 2 см<sup>3</sup> свежего молока взаимодействуют с 0.2 г азотнокислого натрия (не содержащего нитрита) в течение 20 минут при 60°. Одновременно производится контрольный опыт с теми же количествами молока, но без нитрата. По истечении этого времени к каждой пробе прибавляются 5 см<sup>3</sup> реактива Илосвей (смесь сульфаниловой кислоты и α-нафтиламина в разбавленной уксусной кислоте).

\* C. R. Acad. Sci., Paris, 162, 353 (1916).

Проба, содержащая нитрит, окрашивается в более или менее интенсивный красный цвет, в то время как контрольная проба дает только окрашивание смеси молока с мочой. К контрольной пробе прибавляется по каплям титрованный раствор азотистокислого натрия до одинакового окрашивания обеих проб. Из прибавленного количества нитрита можно вычислить количество нитрата, образовавшегося вследствие восстановления нитрата.

Для того чтобы выполнить точное определение, берут 15 см<sup>3</sup> свежей мочи, 10 см<sup>3</sup> свежего молока и 1 г азотнокислого натрия. Одновременно ставится контрольная проба с кипяченым молоком. По окончании реакции к обеим пробам прибавляется по 0.5 г уксуснокислого свинца, растертого в тонкий порошок; после взбалтывания смесь фильтруется через сухой фильтр, и в 20 см<sup>3</sup> фильтрата определяется колориметрически нитрит, как в воде.

Я выполнил значительное количество определений с нормальной мочой и констатировал, что 1 см<sup>3</sup> мочи может восстановить совместно с ферментом молока количество нитрата, соответствующее от 0.00001 до 0.00005 г N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

С кипяченым молоком и нитратом или со свежим молоком в отсутствии нитрата реакция не происходит.

Следует еще прибавить, что асептическая кровяная сыворотка не восстанавливает нитраты в присутствии молока. Однако сыворотка, подвергнутая действию бактерий даже в виде чистых культур (дифтерийный токсин), дает интенсивную реакцию.

6 марта 1916 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бах. Arch. Sci. phys. nat., 32 (1917); 37 (1914); Biochem. Zs., 31, 4413; 33, 282; 38, 154; 52, 412; 58, 205 (1911—1914); настоящая книга, стр. 504, 507.
2. Strecker. Lieb. Ann., 123, 363.



## НЕСПЕЦИФИЧНОСТЬ ЖИВОТНЫХ И РАСТИТЕЛЬНЫХ ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ

[*Non-spécificité du ferment réducteur animal et végétal*] \*

В связи с изучением фермента молока, восстанавливающего нитраты в присутствии альдегидов<sup>1</sup>, возник вопрос о том, влияет ли природа радикала, связанного с альдегидной группой, на ход реакции. Опыты, затронувшие 14 различных альдегидов, были выполнены следующим образом.

В каждом случае 10 см<sup>3</sup> свежего сырого молока выдерживались при 60° в течение 2 часов с 10 см<sup>3</sup> 10%-ного раствора нитрата натрия в присутствии 0.001 г-мол. растворенного или взвешенного альдегида. По истечении этого времени 1 см<sup>3</sup> смеси обрабатывался в мерной колбе на 50 см<sup>3</sup> 5 см<sup>3</sup> насыщенного раствора уксуснокислой закиси свинца, после чего жидкость была доведена до черты; смесь была хорошо взболтана и отфильтрована через сухой фильтр. В 10 см<sup>3</sup> фильтрата нитрит определялся колориметрически по методу Илосвей—Лунге. Для сравнения я повторил ту же серию опытов, заменяя молоко 5 г растертого картофеля, разведенными в 10 см<sup>3</sup> воды. В одной из предшествующих работ<sup>2</sup> я показал, что окислительно-восстановительный фермент, открытый Аблусом в картофельных клубнях, вполне аналогичен по своему действию восстановительному ферменту молока: так же как и последний, он восстанавливает нитраты при содействии альдегидов. В нижеследующей таблице полученные

| Альдегиды              | Азотистый ангидрид N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> |                           | Альдегиды           | Азотистый ангидрид N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> |                           |
|------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------|---------------------|--------------------------------------------------|---------------------------|
|                        | животный фермент (мг)                            | растительный фермент (мг) |                     | животный фермент (мг)                            | растительный фермент (мг) |
| Муравьиный . . . . .   | 0.023                                            | 0.201                     | Бензойный . . . . . | 0.987                                            | 0.29                      |
| Уксусный . . . . .     | 0.473                                            | 0.257                     | Параоксибензойный   | 0.927                                            | 0.221                     |
| Хлорал . . . . .       | 0.0                                              | 0.046                     | Ортооксибензойный   | 0.911                                            | 0.274                     |
| Валерьяновый . . . . . | 0.161                                            | 0.232                     | Метанитробензойный  | 0.0                                              | 0.281                     |
| Фурфурол . . . . .     | 0.301                                            | 0.246                     | Метахлоробензойный  | 0.002                                            | 0.249                     |
| Цитронелал . . . . .   | 0.006                                            | 0.401                     | Анисовый . . . . .  | 0.512                                            | 0.231                     |
| Цитрал . . . . .       | 0.376                                            | 0.163                     | Пиперонал . . . . . | 0.911                                            | 0.237                     |

\* C. R. Acad. Sci., Paris, 164, 248 (1917).

данные выражены в миллиграммах азотистого ангидрида  $\text{N}_2\text{O}_3$  на 10  $\text{cm}^3$  молока или 5 г картофельной массы. В этой таблице не приняты во внимание количества нитрита меньше 0.001 мг. Количество нитрита, образующееся в отсутствии альдегида, значительно меньше указанного числа.

Из таблицы видно, что как фермент молока, так и фермент картофеля могут использовать для восстановления нитратов самые разнообразные альдегиды. Восстановительный фермент, таким образом, не является специфическим в обычном смысле этого слова. Обыкновенно допускают, что между ферментом и субстратом существует структурная зависимость, которая символически сравнивается с зависимостью между ключом и замком. Так же как ключ открывает только тот замок, для которого он сделан, так и фермент действует только на тот субстрат, к которому подходит его структура. Однако если не считать, что картофель содержит по одному специфическому ферменту для каждого из исследуемых альдегидов, что никак не подтверждается экспериментальными данными, то приходится признать, что восстановительный фермент специфичен для альдегидного радикала, независимо от природы связанной с ним группы. Другими словами, специфичность восстановительного фермента имеет функциональный, а не структурный характер; она относится к определенной химической функции, а не к геометрическому строению субстрата в пространстве.

Тот факт, что некоторые альдегиды лучше используются ферментом растительного происхождения, чем животного (хлорал, цитронелал, метанитробензойный и метахлоробензойный альдегиды), следует приписывать каким-то различиям в свойствах среды в самом общем смысле этого слова. В молоке фермент находится в присутствии совершенно других веществ, чем в картофельных клубнях. Это означает, что в обоих случаях фермент должен действовать в различной среде. Вполне естественно, что одна из этих сред может быть более благоприятной, чем другая, для окисления того или иного альдегида.

29 января 1917 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бах. C. R. Acad. Sci., Paris, **162**, 353 (1916); настоящая книга, стр. 513.
2. Бах. Biochem. Zs., **52**, 412 (1913); настоящая книга, стр. 504.

---

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОДУКТОВ РАСПАДА БЕЛКОВЫХ ВЕЩЕСТВ В КРОВЯНОЙ СЫВОРОТКЕ

[*Dosage des produits de dégradation des matières protéiques  
dans le sérum sanguin*] \*

(Совместно с Б. Збарским)

В опубликованных ранее работах один из нас (А. Бах) показал, что восстановление нитратов и красителей животными тканями определяется комбинированным действием фермента и кофермента и что последний можно заменить альдегидами. Было также установлено, что кофермент состоит из продуктов распада белков, образующихся при разложении и окислении аминокислот, превращающихся в альдегиды. Свежее молоко содержит этот фермент без кофермента, что позволило использовать его для определения продуктов распада белков. В присутствии последних свежее молоко, само по себе не оказывающее восстанавливающего действия, восстанавливает нитраты в нитриты, которые могут быть определены количественно обычными методами.

Таким образом, было показано, что моча всегда содержит продукты распада белков, в то время как нормальная лошадиная сыворотка их не содержит.

Продолжая эти исследования, мы пытались выяснить, могут ли изменения физиологического состояния, которые претерпевают животные при иммунизации, вызвать появление продуктов распада белков в сыворотке. Мы взяли под наблюдение семь лошадей, из которых две иммунизировались против дифтерита, три против дизентерии и две против скарлатины. В собранной подходящим образом сыворотке продукты распада белков определялись следующим образом.

Пробирка, содержащая 1 см<sup>3</sup> сыворотки, 0.2 г нитрата натрия и 2 см<sup>3</sup> свежего молока, помещалась в термостат при 60° на 30 минут. Жидкость затем осаждалась 3 см<sup>3</sup> 5%-ного раствора уксуснокислой закиси свинца и фильтровалась; в прозрачном и бесцветном фильтрате образовавшийся нитрит определялся по методу Илосвей—Лунге—посредством смеси сульфаниловой кислоты и  $\alpha$ -нафтиламина в уксуснокислом растворе. Контрольные опыты: 1) тот же опыт, но с предварительным кипячением свежего молока; 2) тот же опыт со свежим молоком, но с 1 см<sup>3</sup> воды вместо сыворотки. Если молоко действительно свежее и получено от здоровой коровы, в контрольных опытах не получается нитрита. В противном случае полученные в контрольном опыте величины вычитаются из цифр основного опыта.

В следующей таблице приведены полученные данные.

---

\* C. R. Acad. Sci., Paris, 171, 1175 (1920).

Нитрит, образовавшийся под действием 1 см<sup>3</sup> сыворотки(0.001 мг N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)

|           | Дифтерит    |       | Дизентерия |       |       | Скарлатина |       |
|-----------|-------------|-------|------------|-------|-------|------------|-------|
|           | л о ш а д и |       |            |       |       |            |       |
|           | № 1         | № 2   | № 3        | № 4   | № 5   | № 6        | № 7   |
| 9.IV (1)  | —           | —     | —          | 0     | 0     | 0.016      | 0     |
| 10.IV     | 0.080       | 0.048 | 0.008      | 0.196 | 0.086 | 0.016      | 0.076 |
| 11.IV (2) | 0.076       | 0.048 | 0.008      | 0.032 | 0.068 | 0.105      | 0.076 |
| 12.IV     | 0.117       | 0.072 | 0.052      | 0.032 | 0.068 | 0.061      | 0.078 |
| 13.IV     | 0.112       | 0.070 | 0.040      | 0     | 0.068 | 0.022      | 0.080 |
| 16.IV (3) | 0           | 0     | 0.040      | 0     | 0.068 | 0.004      | 0.004 |
| 22.V      | 0           | 0     | 0.009      | 0     | 0.068 | 0.004      | 0.004 |
| 27.IV     | 0           | 0     | 0.002      | 0     | 0.068 | 0          | 0.003 |

Примечание. (1) Инъекция токсивов лошадям № 4, 5 и 7; (2) инъекция токсивов лошадям № 1, 2 и 3; (3) лошади № 4 и 5 были обескровлены.

Из этой таблицы видно, что вследствие инъекции токсина у иммунизируемых лошадей появляются в сыворотке продукты распада белков, которые более или менее быстро исчезают. Эти продукты распада могут происходить от организма лошади или от введенных токсивов. Количественное исследование последних показало, что в сыворотке остается лишь некоторая часть продуктов распада, введенных в организм животных вместе с токсином. Так, например, лошадь № 4 получила 11/IV инъекцию в 140 г токсина. Если считать, что объем крови лошади составляет 25 л, то 1 см<sup>3</sup> сыворотки должен был бы содержать 0.0044 г первоначального токсина. Разбавленный в такой же пропорции водой токсин дал с 2 см<sup>3</sup> свежего молока и 0.2 г нитрата натрия 0.00024 мг N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> на 1 см<sup>3</sup>. На следующий день после инъекции мы нашли в сыворотке этой лошади количество продуктов распада, соответствующее 0.000196 мг N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> на 1 см<sup>3</sup>. На третий день это количество упало до 0.000032 мг N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. С другой стороны, так как токсин был получен на 1%-ном растворе пептона, приведенные выше данные позволяют нам судить о чувствительности метода. 0.0044 г пептона (более или менее измененного под действием бактерий) соответствуют 0.000240 мг N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Мы можем определить, как видно из приведенной выше таблицы, количество нитрита, а следовательно, и количество продуктов распада в 100 раз меньше.

Таким образом, мы установили, что восстановительный фермент молока может быть использован для определения минимальных количеств продуктов распада белков. При помощи этого метода мы намерены поставить исследования с целью выяснить вопрос о существовании специфических защитных ферментов в том смысле, как это предполагает Абдергальден.

15 ноября 1920 г.

---

## О МНИМОМ ТОЖДЕСТВЕ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ И ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ \*

(Совместно с К. А. Николаевым)

Виланд<sup>1</sup> тринадцать лет тому назад выступил с новой теорией, согласно которой всякий процесс окисления, происходящий в присутствии воды, рассматривается как отнятие водорода, как *дегидрирование*. Например, окись углерода СО окисляется в уголекислоту не непосредственно, а сначала образует гидрат СО<sub>2</sub>Н<sub>2</sub>, т. е. муравьиную кислоту, из которой отнятием двух атомов водорода получается уголекислота:



Дегидрированию, по мнению Виланда, предшествует активирование водорода в молекуле, причем это активирующее действие приписывается катализаторам. А раз водород активирован, то акцептором его может быть, безразлично, молекулярный кислород, или метиленовая синь, или палладиевая чернь.

В своем стремлении положить теорию дегидрирования в основу учения о биологических окислительных процессах Виланд пришел к мысли, что всесторонне исследованное *активирование* кислорода в них никакой роли не играет. Заявляя себя последователем теории Энглера—Баха, поскольку самопроизвольное окисление ненасыщенных веществ протекает в отсутствие воды, он утверждает, что в водных растворах, а следовательно, и в живых клетках окисление идет не путем активирования молекулярного кислорода через промежуточное образование перекисей, а путем *активирования водорода* и последующего дегидрирования. Правда, активированный водород дает с молекулярным кислородом перекись водорода:  $\text{H}_2 + \text{O}_2 = \text{H}_2\text{O}_2$ . Но это вторичная, побочная реакция, не имеющая прямого отношения к активированию кислорода. Следовательно, по мысли Виланда, не активный кислород окисляет водород, а активный водород восстанавливает молекулярный кислород<sup>2</sup>.

Как известно, между явлениями самопроизвольного окисления, т. е. между активированием молекулярного кислорода через промежуточное образование перекисей, и действием оксидаз установлена тесная связь. Химическое вещество, которое само по себе неспособно соединяться с молекулярным кислородом, быстро окисляется им в присутствии другого вещества, способного к самопроизвольному окислению. Например, раствор индиго сам по себе не окисляется на воздухе, но если прибавить к нему немного терпентинного масла, то наступает быстрое окисление, и индиго превращается в изатин. Так как установлено, что терпены легко окисляются с об-

---

\* Журн. эксп. биол. и мед., № 2, 152 (1925).

разованием перекисей, то предполагают, что индиго, устойчивое по отношению к молекулярному кислороду, окисляется активным кислородом перекисей.

Далее, окислительное действие системы «легкоокисляемое вещество — кислород → перекись» значительно ускоряется каталитически солями тяжелых металлов, подобно тому как действие перекиси водорода ускоряется сернистой закисью железа. Причина этого лежит в том, что соли образуют с соответственными перекисями промежуточные соединения, обладающие более высоким окислительным потенциалом, чем исходные перекиси. В параллель к этому установлено, что обыкновенная оксидаза (фенолоксидаза) состоит из двух отделимых друг от друга, составных частей. Одна из них, названная *пероксидазой*, ускоряет окислительное действие перекисей наподобие солей тяжелых металлов; другая, названная *оксигеназой*, соединяется с молекулярным кислородом наподобие ненасыщенных соединений, образуя перекиси. Сама по себе пероксидаза в присутствии кислорода никакого окислительного действия не оказывает, оксигеназа же действует слабоокислительно, а вместе они образуют активную окислительную систему, построенную по тому же типу, что и упомянутая выше система «соль тяжелого металла — легкоокисляемое вещество —  $O_2$ », «пероксидаза — оксигеназа —  $O_2$ ». Правильность этого вывода подтверждается тем, что из этих систем можно составить две активные *смешанные* системы: «пероксидаза — легкоокисляемое вещество —  $O_2$ », «соль тяжелого металла — оксигеназа —  $O_2$ ».

Если предположить, что в биологических окислительных процессах активирование кислорода не играет никакой роли, то необходимо допустить, что действие пероксидазы и оксигеназы не имеет никакого отношения к явлениям самопроизвольного окисления и их ускорению под влиянием катализаторов. Виланд не останавливается перед этим решительным шагом и приписывает оксигеназе и пероксидазе свойство *активировать водород*. По его мнению, оксигеназа активирует не молекулярный кислород, а водород субстрата и делает его способным к непосредственному соединению с молекулярным кислородом; то же действие оказывает и пероксидаза, с той только разницей, что активированный ею водород она направляет не на молекулярный кислород, а на слабосвязанный кислород перекиси. Этой гипотезой Виланд подводит действие этих ферментов, которые до сих пор рассматривались как окислительные, под свою теорию дегидрирования.

В подтверждение своего взгляда Виланд приводит опыты, которые сами по себе очень интересны. Ему удалось окислить этиловый спирт в уксусную кислоту в *бескислородной среде* уксусными бактериями, применяя вместо кислорода метиленовую синь как акцептор водорода. Тот же результат он получил, употребляя вместо живых уксусных бактерий культуры, умерщвленные ацетоном. До сих пор считалось, что окисление спирта в уксусную кислоту бактериями вызывается действием специальной *алкогольоксидазы*, переносящей свободный кислород на спирт. И так как в опыте Виланда образование уксусной кислоты сопровождалось восстановлением метиленовой сини в лейкоформу, то он полагает, что ему удалось принудить оксидазу функционировать, как редуказу.

С другой стороны, Виланд показал, что восстановительный фермент молока (фермент Шардингера, пергидридаза), который ускоряет восстановление метиленовой сини альдегидами, причем последние окисляются в соответственные кислоты, может ускорять окисление этих альдегидов *кислородом воздуха*. Получается представление, что поставленная в надлежащие условия редуказа может функционировать, как настоящая оксидаза<sup>3</sup>.

Против выводов Виланда Бах<sup>4</sup> возразил, что опыты были произведены не с изолированными ферментами, а со всем составом тела бактерий или с цельным молоком. С такого рода материалами, которые содержат разнообразную смесь ферментов и других веществ, нельзя получить результаты, допускающие одно только толкование. Доказательными опыты Виланда были бы лишь тогда, если бы удалось посредством *изолированной* алкогольоксидазы окислить спирт в уксусную кислоту как действием метиленовой сини, так и действием кислорода, если бы удалось посредством *изолированной* пергидридазы окислить альдегиды в соответственные кислоты как действием метиленовой сини, так и действием кислорода. К сожалению, все попытки выделить алкогольоксидазу из уксусных бактерий потерпели до сих пор неудачу. Но зато Збарскому и Михлину<sup>5</sup> удалось выделить пергидридазу из молока и в значительной мере очистить ее. Здесь представлялась возможность проверить, действительно ли изолированный фермент обладает сам по себе способностью использовать как метиленовую синь, так и кислород, т.е. функционировать то как редуказа, то как оксидаза.

Мы повторили опыты Виланда с салициловым альдегидом, но вместо молока употребили фермент, изолированный по способу Збарского и Михлина.

1 л свежего пахтанья (жидкость, остающаяся после приготовления масла из сливок) осаждался 3 л свеженеперегнанного ацетона, и образовавшийся осадок отфильтровывался под уменьшенным давлением, после чего он еще раз растирался с ацетоном и фильтровался. Полученный порошок раскладывался тонким слоем на фильтровальной бумаге для испарения ацетона, а затем в течение нескольких дней обезжиривался настаиванием на петролейном эфире. Полученный препарат плохо растворялся в воде (не больше 25%). Выход получился — около 42 г воздушносухого порошка. Прежде всего был поставлен опыт с водной эмульсией полученного препарата. 12 г сухого порошка были растерты с 50 см<sup>3</sup> воды в тонкую и стойкую эмульсию. Для определения активности последней смесь из 1 см<sup>3</sup> эмульсии, 2 см<sup>3</sup> воды, 1 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора уксусного альдегида и 1 см<sup>3</sup> 1%-ного нитрата натрия ставилась на полчаса в термостат при 65°. После этого смесь осаждалась 1 см<sup>3</sup> насыщенного раствора основного уксуснокислого свинца, фильтровалась и 3 см<sup>3</sup> прозрачного фильтрата были исследованы на содержание нитрита по способу Илосвей—Лунге. 1 см<sup>3</sup> жидкости дал 0.057 мг N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, приблизительно в 27 раз больше, чем свежее молоко.

Для опытов служили цилиндрические сосуды вместимостью в 200 см<sup>3</sup> с впаянными приводящей и отводящей трубками. Трубки были снабжены кранами. Порядок опыта был следующий. Два сосуда наполнялись дистиллированной водой; последняя вытеснялась из одного сосуда чистым водородом, а из другого чистым воздухом. В каждый сосуд было налито: 0.35г салицилового альдегида, 3.3 см<sup>3</sup> фосфатного буфера (pH=7.6), 10 см<sup>3</sup> эмульсии фермента и воды до 20 см<sup>3</sup>. Оба сосуда затем были поставлены в термостат при 60° на 6—8 часов. Для определения количества образовавшейся салициловой кислоты смесь по окончании опыта разводилась вдвое водой, затем подкислялась 1 см<sup>3</sup> 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> для осаждения белков; после фильтрования прозрачный *фильтрат извлекался пять раз эфиром*. Соединенные эфирные вытяжки, содержащие, помимо салициловой кислоты, также салигенин и неизменный салициловый альдегид, были высушены над сернокислым натрием и затем пять раз взбалтывались с углекислым натрием, взвешенным в небольшом количестве воды. Собранные вместе водные вытяжки, содержавшие салициловую кислоту в виде салицилата натрия, взбалтывались несколько раз для удаления следов салицилового альдегида и салигенина с эфиром до тех пор, пока вытяжки не давали более реакции с железными квасцами. После нейтрализации жидкость

переводилась в мерную колбу, разбавлялась водой до черты и содержание салициловой кислоты определялось колориметрически при помощи 1%-ного раствора железных квасцов. Виланд определял салициловую кислоту или весовым способом или титрованием; мы находим, что более простое колориметрическое определение также дает хорошие результаты. Точно таким же образом были проделаны контрольные опыты с эмульсией фермента, инактивированного нагреванием в атмосфере водорода и воздуха. При этом получились следующие результаты:

*Образовавшаяся салициловая кислота*

| Водород          |                          | Воздух           |                          |
|------------------|--------------------------|------------------|--------------------------|
| активный фермент | инактивированный фермент | активный фермент | инактивированный фермент |
| 0.01018 г        | 0                        | 0.01845 г        | 0                        |

Как видно из этих цифр, выход салициловой кислоты при применении эмульсии из осажденного фермента значительно больше в атмосфере воздуха, чем в атмосфере водорода, что совпадает с результатами Виланда. К совершенно иным результатам мы пришли, когда вместо осадка, который еще содержал большинство составных частей молока, мы взяли экстракт из этого осадка. В своей работе Збарский и Михлин указывают на то, что вода извлекает незначительные количества фермента из препарата, полученного осаждением ацетоном; наоборот, посредством извлечения осадка 0.005 N соляной кислотой с последующей нейтрализацией углекислым натрием удается получить чрезвычайно активный фермент. С приготовленными таким способом растворами энзима мы произвели следующие опыты.

1. К 10 см<sup>3</sup> раствора фермента, который по активности соответствовал 400 см<sup>3</sup> молока, было прибавлено 0.25 г салицилового альдегида и 5 см<sup>3</sup> фосфатного буфера до pH-7.55; полученная смесь была поставлена в термостат на 12 часов при 60° в атмосфере воздуха. Одновременно был поставлен точно такой же опыт в атмосфере водорода и контрольные опыты с инактивированным ферментом.

*Образовавшаяся салициловая кислота*

| Водород          |                          | Воздух           |                          |
|------------------|--------------------------|------------------|--------------------------|
| активный фермент | инактивированный фермент | активный фермент | инактивированный фермент |
| 0.01832 г        | 0                        | 0.00934 г        | 0                        |

2. 13 см<sup>3</sup> раствора фермента, соответствующего 130 см<sup>3</sup> молока, 0.25 г салицилового альдегида, 6 см<sup>3</sup> фосфатной смеси (pH-6.8), находились в течение 8 часов в термостате при 60° в атмосфере водорода и воздуха.

*Образовавшаяся салициловая кислота*

| Водород          |                          | Воздух           |                          |
|------------------|--------------------------|------------------|--------------------------|
| активный фермент | инактивированный фермент | активный фермент | инактивированный фермент |
| 0.00556 г        | 0                        | 0.00384 г        | 0                        |



3. Подобным же образом была обработана в продолжение 9 часов смесь из 10 см<sup>3</sup> раствора фермента (соответствующих 300 см<sup>3</sup> молока), 0,25 г салицилового альдегида, 5 см<sup>3</sup> воды и 5 см<sup>3</sup> фосфатной смеси (рН-6.8).

Образовавшаяся салициловая кислота

| Водород          |                          | Воздух           |                          |
|------------------|--------------------------|------------------|--------------------------|
| активный фермент | инактивированный фермент | активный фермент | инактивированный фермент |
| 0.01664 г        | 0                        | 0.00726 г        | 0                        |

Из этих опытов ясно, что фермент, полученный путем осаждения ацетоном и очищенный от примесей обезжириванием и извлечением слабой кислотой, дает меньший выход салициловой кислоты в атмосфере воздуха, чем в атмосфере водорода. Таким образом, очищенный фермент сохраняет свою способность производить одновременно окисление и восстановление двух молекул альдегида за счет воды, но не способен окислять салициловый альдегид посредством молекулярного кислорода. Другими словами, фермент может функционировать как редуказа или оксидо-редуказа, но не как оксидаза.

Чем же объяснить разницу в действии очищенного и неочищенного фермента? Наиболее простым и правдоподобным представлялось предположение, уже высказанное Бахом<sup>4</sup>, что пероксидаза, содержащаяся в свежем молоке, участвует в окислении салицилового альдегида молекулярным кислородом, ускоряя перенесение активного кислорода с образующейся вначале перекиси альдегида. Исходя из таких соображений, мы поставили разнообразные опыты с целью выяснить отношение салицилового альдегида к кислороду и пероксидазе.

Для опытов мы пользовались раствором очищенной растительной пероксидазы, активность которой была определена по методу, основанному на окислении гваякола. 1 см<sup>3</sup> этого раствора соответствовал 41.5 мг окисленного гваякола. Опыты были поставлены точно так же, как и вышеописанные с пергидридазой. Мы не будем входить в детали их, так как все они дали отрицательный результат.

Заметим только, что мы не наблюдали образования салициловой кислоты даже и в том случае, когда вместо кислорода мы употребляли перекись водорода в качестве акцептора водорода. Приведенное выше предположение Баха, таким образом, отпадает: находящаяся в молоке пероксидаза не может служить причиной повышенного окисления салицилового альдегида в присутствии кислорода. Но одновременно эти опыты обнаруживают и несостоятельность предположения Виланда относительно того, что пероксидаза есть не что иное, как дегидраза, использующая в качестве акцептора водорода перекись водорода. Пероксидаза так же мало в состоянии активировать водород салицилового альдегида и делать его способным к непосредственному соединению с молекулярным кислородом или с кислородом перекиси, как и переносить активный кислород перекиси на салициловый альдегид.

Таким образом, мы приходим к убеждению, что в установленном Виландом окислении салицилового альдегида кислородом воздуха не принимают участия ни фермент Шардингера (пергидридаза), ни пероксидаза молока. Так как, с другой стороны, нет никаких оснований предполагать, что в молоке существует еще не известная, переносящая молекулярный ки-

слород оксидаза, то приходится допустить, что реакция, о которой идет речь, *не ферментативного характера*. Нам кажется, что сущность вопроса лучше всего выясняется на следующем, очень показательном примере.

Если смесь из свежего молока, небольшого количества метиленовой сини и уксусного альдегида или, еще лучше, гипоксантина<sup>6</sup>, нагреть в эвакуированном сосуде до 60°, то наблюдается быстрое обесцвечивание красящего вещества: оно восстанавливается в лейкоформу и таким образом перестает функционировать как акцептор водорода, вследствие чего реакция останавливается. Если ввести в сосуд небольшое количество кислорода, то смесь опять быстро принимает синюю окраску и затем через небольшой промежуток времени снова обесцвечивается. В присутствии толуола и избытка гипоксантина эта реакция может быть неоднократно повторена. Возвращение голубого окрашивания смеси указывает на дегидрирование лейкоформы молекулярным кислородом, благодаря чему реакция опять наступает. Так как всюду, где лейкоформа соприкасается с молекулярным кислородом, дегидрирование происходит с неизмеримо большой скоростью, то ясно, что фермент молока не имеет никакого отношения к возвращению синего окрашивания под влиянием кислорода. Последний в данном случае функционирует как вторичный акцептор водорода, так как первичный акцептор — метиленовая синь — чрезвычайно легко окисляется после гидрирования. Благодаря видимому изменению окрашивания ход реакции в этом случае легко проследить. Если первичный акцептор водорода не окрашен, то участие его в реакции осталось бы незамеченным и получилось бы впечатление прямого дегидрирующего действия молекулярного кислорода на альдегид в смысле гипотезы Виланда.

Мы считаем весьма вероятным, что свежее молоко содержит такого рода первичные акцепторы водорода (быть может, липоидного характера), действие которых аналогично действию метиленовой сини в нашем примере. Благодаря очистке фермента удаляются различные сопровождающие его примеси и таким образом исключается вторичное действие кислорода

## РЕЗЮМЕ

Предположение Виланда, что энзим Шардингера (пергидридаза) может использовать в качестве акцепторов водорода как метиленовую синь, так и молекулярный кислород и, таким образом, одинаково функционировать как редуказа и оксидаза, было проверено опытами над окислением салицилового альдегида посредством молочного энзима, изолированного по способу Збарского и Михлина. Водная эмульсия осадка, полученного при охлаждении пахтанья ацетоном, дала в атмосфере воздуха *больше* салициловой кислоты, чем в атмосфере водорода (0.01845 г против 0.01018 г), что подтверждает наблюдение, сделанное Виландом при употреблении свежего молока. Напротив, раствор энзима, полученный посредством извлечения осадка 0.02 N соляной кислотой и последующей нейтрализацией, дал в атмосфере воздуха *меньше* салициловой кислоты, чем в атмосфере водорода (в среднем от 3 опытов 0.0068 г против 0.0135 г). Контрольными опытами с растительной пероксидазой установлено, что замеченное Виландом увеличение салициловой кислоты в атмосфере воздуха не может быть приписано пероксидазе, содержащейся в молоке. Разницу между действием изолированного энзима и цельного молока в присутствии кислорода можно объяснить, предположив, что молоко содержит некоторые вещества (возможно, липоидного характера), которые функционируют как акцепторы водорода и подобно восстановленной метиленовой сини легко окисляются молекулярным кислородом. Это создает

видимость *непосредственного* использования кислорода энзимом, т. е. симулирует «оксидазное действие» его.

27 ноября 1925 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Wieland. *Ergebn. Physiol.*, XX, 477 (1922); *Handb. d. Biochemie*, 2-е изд., II, 252 (1922).
2. Wieland. *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, 47, 2109 (1914).
3. Wieland. *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, 46, 3327 (1913).
4. Бах. *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, 46, 3864 (1913); настоящая книга, стр. 112.
5. Збарский и Михлин. *Biochem. Zs.*, 155, 485 (1925.)
6. Morgan, Stewart a. Hopkins. *Proc. Roy. Soc.*, 101, 94 (1922).

---

**ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ПРЕВРАЩЕНИЕ  
КСАНТИНА И ГИПОКСАНТИНА В МОЧЕВУЮ КИСЛОТУ  
БЕЗ УЧАСТИЯ ПОСТОРОННИХ АКЦЕНТОРОВ  
ВОДОРОДА**

[*Enzymatische Umwandlung des Xanthins u. Hypoxanthins in Harnsäure ohne  
Mitwirkung fremder Wasserstoffakzeptoren*] \*

(Совместно с Д. Михлиным)

Бахом<sup>1</sup> было установлено, что способность животных тканей восстанавливать красители в лейкоформы и нитраты в нитриты основана на совместном действии фермента и кофермента, которые не оказывают, каждый в отдельности, никакого восстановительного действия. Этот фермент идентичен с открытым Шардингером<sup>2</sup> в сыром молоке ферментом, который восстанавливает метиленовую синь и нитраты в присутствии альдегидов. Кофермент, который можно извлечь из тканей органов кипящей водой и который является смесью продуктов распада белка, заменяет альдегиды в реакции Шардингера и, со своей стороны, может быть заменен альдегидами при действии фермента из животных органов.

Морган, Стюарт и Хопкинс<sup>3</sup> подтверждают данные Баха и добавляют к ним существенное наблюдение, что восстановление метиленовой сини под влиянием фермента Шардингера происходит и тогда, когда вместо альдегидов применяются гипоксантин и ксантин, которые окисляются при этом «анаэробно», превращаясь в мочевую кислоту. Они нашли далее, что при окислении оснований в качестве акценторов водорода может служить не только метиленовая синь, но и свободный кислород, т. е. что фермент Шардингера также играет роль непосредственной оксидазы. При этом оказалось, что потребление кислорода (определенное в микрореспирометре Баркрофта) соответствует тому количеству, которое необходимо для окисления оснований; Диксон и Турлов<sup>4</sup>, продолжавшие исследования в этой области, рассматривают фермент Шардингера как ксантин-оксидазу.

Виланд<sup>5</sup> установил, что находящийся в молоке фермент дает больше салициловой кислоты при действии на салициловый альдегид в присутствии кислорода, чем в отсутствии кислорода; он приводит это наблюдение в подтверждение своих взглядов о природе окислительных явлений. Бах и Николаев<sup>6</sup> показали недавно, что фермент молока, изолированный и очищенный по методу Збарского и Михлина<sup>7</sup>, дает противоположный результат, т. е. дает больше салициловой кислоты в отсутствии кисло-

---

\* Журн. эксп. биол. и мед., № 18, 385 (1927).

рода, чем в присутствии. Изолированный фермент Шардингера сохраняет таким образом, свою способность вызывать реакцию Канинциаро между двумя молекулами альдегида за счет воды, но теряет способность переносить молекулярный кислород на альдегиды. В связи с этими результатами представляло интерес выяснить, в состоянии ли также фермент молока превращать пуриновые основания в мочевую кислоту без содействия посторонних акцепторов водорода, т. е. вызывать в основаниях изменения, аналогичные дисмутации альдегидов. Вследствие некоторой аналогии между группами  $\text{HCO}-$  и  $\text{HCN}-$ , которые переходят при окислении в  $\text{OC}\cdot\text{OH}$  и  $\text{OC}\cdot\text{NH}$ , возможность такого рода превращения не была исключена. Как видно из дальнейшего, это предположение оправдалось.

### О П И С А Н И Е О П Ы Т О В

Применявшийся нами растворимый в воде без остатка препарат фермента был приготовлен по методу Збарского и Михлина путем осаждения пахтанья ацетоном, обезжиривания, экстракции и осаждения раствором 0.005 *N* соляной кислоты, адсорбции на каолине и элюции. Его активность, определенная по восстановлению нитрата в нитрит в присутствии ацетальдегида, была приблизительно в 260 раз больше активности свежего молока (перечисленной на сухое вещество). Сам по себе препарат фермента не оказывает ни малейшего восстановительного действия ни на метиленовую синь, ни на нитрат натрия, т. е. он не содержит никаких акцепторов гидроксила.

15 мг ксантина, растворенные в 10 см<sup>3</sup> 0.1 *N* раствора едкого натра, были нейтрализованы 0.1 *N* раствором одноосновного фосфорнокислого калия до pH 7.8; часть ксантина выпала в виде пуринового основания. К раствору было прибавлено 10 мг препарата фермента в 5 см<sup>3</sup> воды, после чего объем был доведен водой до 30 см<sup>3</sup>. Смесь была разделена на две порции по 15 см<sup>3</sup>. Одна из них насыщалась током чистого воздуха, а другая была оставлена в атмосфере чистого азота в термостате при 60°. По истечении 6 часов обе порции были разбавлены до 90 см<sup>3</sup>, осаждены 5 см<sup>3</sup> раствора вольфрамата натрия и 5 см<sup>3</sup> <sup>2</sup>/<sub>3</sub>*N* серной кислоты по Фолину<sup>8</sup> и отфильтрованы. Образовавшаяся мочевая кислота осаждалась в фильтрате молочнокислым серебром и определялась колориметрически.

Количество образовавшейся мочевой кислоты в токе воздуха равнялось 1.5 мг, в атмосфере азота — 1.52 мг. Препарат фермента, инактивированный нагреванием до кипения, не дал ни следа мочевой кислоты.

Многочисленные другие опыты были проведены с ксантином и гипоксантином аналогичным образом. Присутствие кислорода не оказывало, по видимому, никакого влияния на превращение пуриновых оснований в мочевую кислоту. Однако не была исключена возможность, что применявшийся азот содержал следы кислорода, которого могло бы хватить для окисления ничтожных количеств пуриновых оснований. Поэтому мы поставили опыты в большем масштабе, с чрезвычайно тщательным исключением кислорода.

1. Раствор 0.160 г гипоксантина в 15 см<sup>3</sup> 0.1 *N*. NaOH был доведен до pH 7.8 раствором одноосновного фосфорнокислого калия; после прибавления 0.5 г фермента объем был доведен до 50 см<sup>3</sup> водой. Раствор был налит в две колбочки с приводящими и отводящими трубками и кранами. Колба, предназначенная для опытов в атмосфере азота, была сначала наполнена чистой прокипяченной водой; после вытеснения воды чистым азотом и вве-

дения испытуемой жидкости, к которой было прибавлено небольшое количество тимола, колба несколько раз эвакуировалась для удаления последних следов кислорода и, наконец, была наполнена азотом. Азот из бомбы пропусклся через нагретую до  $600^{\circ}$  фарфоровую трубку, наполненную свежевосстановленными медными стружками, затем через две промывалки с концентрированным щелочным раствором пирогаллола и сохранялся в стеклянном сосуде над фосфором в палочках. Газометр заполнялся чистой прокипяченной водой. После выхода из газометра очищенный азот пропусклся еще через одну промывалку, заполненную щелочным пирогаллолом при тщательном исключении кислорода. Светложелтое окрашивание реактива сохранялось без изменения в продолжение всего опыта, так что можно считать, что применявшийся азот совершенно не содержал кислорода.

Колбочка, наполненная указанным образом испытуемой жидкостью в атмосфере азота, оставлялась в термостате на 24 часа при  $30^{\circ}$  с закрытыми кранами. Вторая колбочка просто наполнялась исследуемой жидкостью после прибавления тимола; через нее пропусклся ток воздуха в термостате одновременно с первой. По истечении 24 часов содержимое каждой колбочки (прозрачная жидкость над белым осадком) переводилось количественно в мерную колбу после растворения осадка в  $0.1 N$  NaOH. Мочевая кислота затем определялась по Фолину.

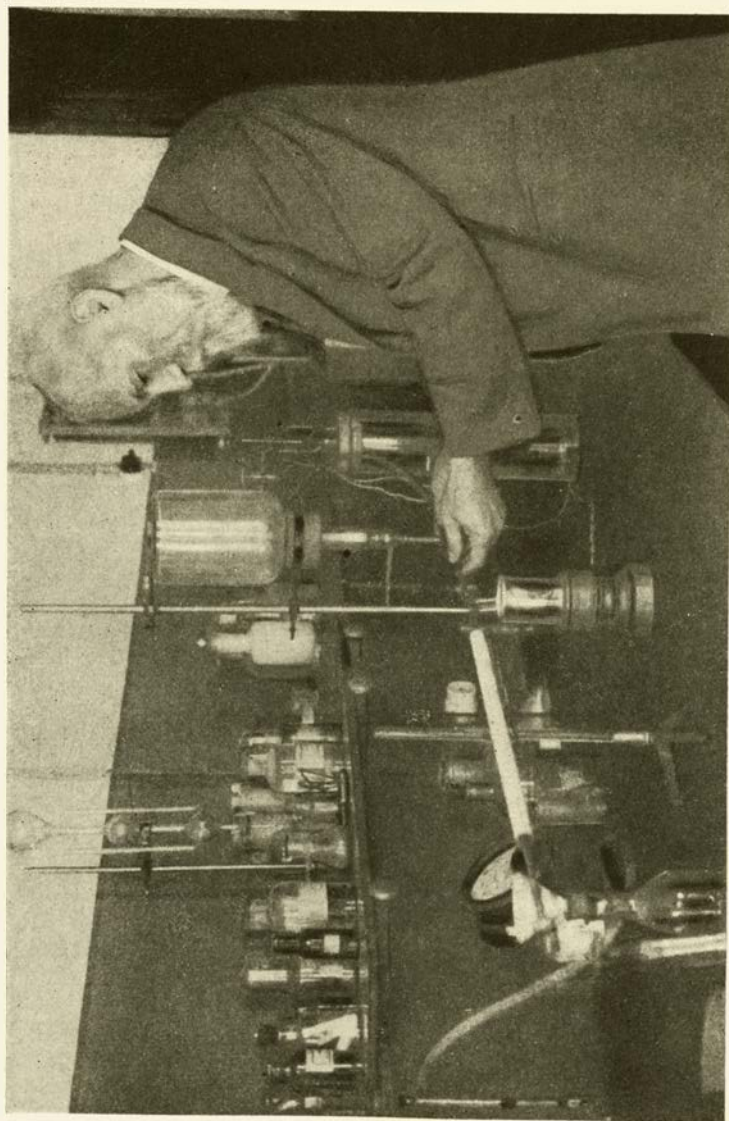
Количество образовавшейся мочевой кислоты в токе воздуха равнялась  $0.010$  г, в азоте —  $0.011$  г.

2. Раствор  $0.200$  г гипоксантина в  $20$  см<sup>3</sup>  $0.1 N$  NaOH нейтрализовался раствором одноосновного фосфорнокислого калия до pH 7.8; после прибавления  $0.5$  г препарата фермента и тимола смесь была доведена водой до  $60$  см<sup>3</sup> и налита в две колбы, как было указано выше. Продолжительность опыта 6 часов, температура  $60^{\circ}$ .

Количество образовавшейся мочевой кислоты в токе воздуха равнялось  $0.024$  г, в токе азота —  $0.026$  г.

На основании этих результатов можно сделать вывод, что фермент Шардингера в состоянии окислять ксантин и гипоксантин с образованием мочевой кислоты, без содействия других акцепторов водорода, кроме самих пуриновых оснований; это окисление, происходящее за счет воды, предполагает одновременное образование продуктов восстановления применявшихся оснований. Мы поэтому немедленно приступили к их обнаруживанию. Вследствие хорошо известной лабильности<sup>9</sup> этих продуктов все наши попытки до сих пор не увенчались успехом. Эти опыты будут продолжены с большими количествами. Однако уже сейчас ясно, что наблюдавшееся и измеренное Хопкинсом и его учениками поглощение кислорода при действии фермента молока на ксантин и гипоксантин не находится в прямой зависимости от окисления оснований. Для превращения пуриновых оснований и альдегидов под влиянием молочного фермента свободный кислород совершенно бесполезен и даже вреден.

Семнадцать лет назад Бах<sup>10</sup> впервые высказал предположение, что салицилаза, открытая Шмидебергом<sup>11</sup> в печени и считавшаяся оксидазой, в действительности таковой не является, а представляет собой фермент, ускоряющий канницаровскую реакцию с салициловым альдегидом. Он указал на то, что в продуктах реакции должен быть найден, наряду с салициловой кислотой, соответственный продукт восстановления — салигенин. Следуя этому указанию, Бателли и сотр.<sup>12</sup> действительно установили образование салигенина при действии ткани печени на салициловый альдегид, что было подтверждено Виландом<sup>5</sup>. После того как выяснилось, что салицилаза ткани идентична с ферментом Шардингера, этому ферменту стали вновь приписывать свойства оксидазы. Приведенные выше



A. H. B A X  
(1927 a.)





опыты совершенно лишают эту точку зрения экспериментального обоснования.

В заключение приведем еще некоторые данные о природе и номенклатуре окислительно-восстановительных ферментов.

Фермент Шардингера не оказывает никакого влияния на молекулярный водород и переносит на подходящие субстраты только активный водород, образующийся при расщеплении воды. Мы имеем здесь ярко выраженную аналогию с пероксидазой, которая также не оказывает никакого действия на молекулярный кислород и переносит только активный перекисный кислород. Принимая во внимание эту аналогию, Бах<sup>1</sup> назвал фермент Шардингера пергидридазой. Это название не получило широкого приращения, вероятно потому, что неизвестны изолированные пергидриды. В последнем издании своего курса Оппенгеймер<sup>13</sup> заменил, в связи с теорией дегидрирования Виланда, обозначение «пергидридаза» «дегидразой» и назвал фермент Шардингера «альдегидразой». Независимо от того, что всеобщая применимость теории Виланда оспаривается с различных сторон (Бах, Варбург, Маншо, Траубе, Вильштеттер), название «альдегидраза» само по себе не вполне удачно, так как оно характеризует функцию фермента односторонне: фермент Шардингера является не только альдегид-дегидразой, но и альдегид-гидразой. В теоретическом отношении небезинтересно отметить, что именно с точки зрения теории Виланда в ее крайнем смысле сущность явления, которое мы здесь рассматриваем, гораздо лучше описывается обозначением «пергидридаза», чем «дегидраза».

Согласно Виланду, фермент Шардингера вызывает частичное освобождение, — активирование водорода в молекуле субстрата. Само собою разумеется, это не означает, что фермент создает активный водород там, где его раньше не было, — это было бы несовместимо с классическим определением катализа. Фермент может только ускорить достижение равновесного состояния между веществом, содержащим подвижный, активный водород, и другим веществом, которое может функционировать как акцептор водорода. Вещество, которое содержит подвижный активный водород, т. е. большее количество водорода, чем оно может крепко связать, есть не что иное, как пергидрид, подобно тому как вещество, содержащее слабосвязанный активный кислород, называется перекисью. Согласно современным взглядам, в химической реакции участвуют не все присутствующие молекулы, а только активные, возбужденные молекулы, в данном случае только возбужденные пергидридные молекулы. Фермент реагирует только с этими пергидридами. Он нарушает равновесие между активными и неактивными молекулами, отнимая активный водород и перенося его на подходящий субстрат, и обуславливает этим распространение реакции. Фермент ведет себя в данном случае, как истинная пергидридаза. Против этого названия Оппенгеймер выдвинул возражение, что пергидридаза сама является пергидридом. Это правильно, но только в той мере, в какой фермент превращается в пергидрид, поглощая пергидридный водород, аналогично тому как пероксидаза превращается в перекись, поглощая перекисный кислород. Сама по себе пергидридаза так же мало является пергидридом, как пероксидаза перекисью. И в этом отношении между обоими ферментами имеется полная аналогия.

Приведенные соображения остаются в силе совершенно независимо от того, кладут ли в основу ферментативного переноса водорода первичное расщепление воды, согласно разделяемой нами теории Траубе, или же присоединение воды с последующим дегидрированием гидратированного субстрата, по Виланду. Собственно всякое присоединение воды уже является *eo ipso* расщеплением воды, ибо молекула воды присоединяется не как таковая, а — в соответствии со средством элементов данного вещества или

системы веществ—в виде водородного атома и гидроксильной группы. Первичное расщепление воды является, таким образом, во всех случаях первой стадией окислительно-восстановительного процесса. Что касается дальнейших стадий, то при современном состоянии наших знаний окончательное решение этого вопроса еще невозможно. В случае бескислородного окисления окиси углерода с образованием углекислоты в присутствии палладия Виланд предполагает первоначальное присоединение воды (т. е. первичное расщепление воды атомом углерода) с образованием муравьиной кислоты и затем отделение обоих присоединенных атомов водорода палладием. Мы считаем более вероятным, что атомы водорода активных молекул воды поглощаются палладием, в то время как гидроксилы непосредственно соединяются с окисью углерода. В первом приближении наиболее простой путь всегда кажется правильным.

3 июня 1927 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бах. *Biochem. Zs.*, **31**, 443 (1911), **38**, 154 (1912), настоящая книга, стр. 446 и 551.
2. Schardinger. *Zs. Unters. Nahr.-u. Genussm.*, **5**, 22 (1902).
3. Morgan, Stewart a. Hopkins. *Proc. Roy. Soc.*, **94**, 109 (1922).
4. Dixon a. Thurlon. *Biochem. J.*, **18**, 971 (1924).
5. Wieland. *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **46**, 3327 (1913).
6. Бах совм. с Николаевым. *Biochem. Zs.*, **169**, 105 (1926).
7. Збарский и Михлин. *Biochem. Zs.*, **155**, 486 (1925); **174**, 116 (1926).
8. Folin. *J. Biol. Chem.*, **38**, 459 (1919).
9. Tafel. *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **34**, 1165 (1901).
10. Бах. *Biochem. Zbl.*, **9**, 9 (1909) (Sammelreferat).
11. Schmiedberger. *Arch. exp. Pathol. u. Pharm.*, **14**, 288 (1881).
12. Battelli. u. a. *Biochem. Zs.*, **29**, 130 (1910).
13. Oppenheimer. «Die Fermente und ihre Wirkungen» (1926). Leipzig.

## О ТАК НАЗЫВАЕМОЙ СУКЦИНО-ДЕГИДРАЗЕ

[*Ueber die sogenannten Succinodehydrase*] \*

(Совместно с Д. Михлиным)

В предыдущих сообщениях<sup>1-2</sup> было показано, что изолированный фермент Шардингера (пергидридаза, альдегидраза, ксантинооксидаза), который обуславливает окислительно-восстановительные реакции с альдегидами, гипоксантином и ксантином за счет молекулы воды, не в состоянии переносить молекулярный кислород на указанные субстраты, т. е. играть роль непосредственной оксидазы. С другой стороны, Виланду<sup>3</sup> не удалось окислить фенолы посредством изолированной фенолоксидазы при замене кислорода другими акцепторами водорода (метиленовая синь, динитробензол и т. д.). Ферментативный окислительно-восстановительный процесс за счет молекулы воды и ферментативное окисление за счет молекулы кислорода представляют собою, следовательно, два совершенно независимых процесса, обусловленных различными ферментами. В противоречии с этим выводом, в литературе приводятся данные о существовании сукцино-дегидразы, которая вызывает дегидрирование янтарной кислоты как посредством метиленовой сини, так и посредством молекулярного кислорода. Предметом настоящего сообщения и является выяснение этого противоречия.

Тунберг<sup>4</sup> сделал еще в 1909 г. наблюдение, что янтарная кислота повышает поглощение кислорода тонкоизмельченной мышечной тканью. В 1910 г. Бателли и сотр.<sup>5</sup> исследовали подробнее это явление и пришли к выводу, что здесь играет роль окислительный фермент, который они позже назвали сукцинооксидоном. В 1918 г. Тунберг<sup>6</sup> указал, что в соответствии с теорией дегидрирования Виланда, окисление янтарной кислоты происходит и в том случае, если вместо кислорода в качестве акцептора водорода применяется метиленовая синь. Что касается окисления янтарной кислоты, то из этого был сделан вывод, что вымытая мышечная ткань, которая сама по себе восстанавливает чрезвычайно медленно или совсем не восстанавливает метиленовую синь, обесцвечивает ее при прибавлении нейтрализованной янтарной кислоты. При дальнейшем изучении этого вопроса Тунберг<sup>7</sup> пришел двумя годами позже к выводу, что «существует фермент, специально установленный на янтарную кислоту, который ее дегидрогенизирует и в отсутствие кислорода переносит водород на метиленовую синь, превращая ее в лейкоформу». Данные Тунберга вызвали некоторый интерес, так как их рассматривали как доказательство правильности теории дегидрирования Виланда.

\* Ber. Dtsch. chem. Ges., 60, 82 (1927).

Однако более подробное исследование и проверка экспериментальных основ взглядов Тунберга показывают, что существование сукцино-дегидразы в смысле теории Виланда ни в коем случае нельзя считать доказанным.

### КОЛИЧЕСТВО ПРОДУКТОВ РЕАКЦИИ

Если бы дегидрирование янтарной кислоты в присутствии метиленовой сини и кислорода производилось одним и тем же ферментом, то следовало бы ожидать, что количество прореагировавшего вещества должно быть в обоих случаях, если не в точности эквивалентно, то во всяком случае одного порядка. Однако это не так. Мы проводили одновременно опыты с метиленовой синью и с кислородом на одном и том же материале и нашли, что в одинаковые промежутки времени поглощается приблизительно в 300 раз больше кислорода, чем соответствует количеству восстановленной метиленовой сини (опыты 1—5, стр. 534—535).

### ВЛИЯНИЕ СИНИЛЬНОЙ КИСЛОТЫ

Бателли и сотр.<sup>5</sup> сделали наблюдение, что поглощение кислорода мышечными тканями в присутствии янтарной кислоты задерживается синильной кислотой. Тунберг<sup>6</sup> подтвердил это наблюдение и нашел, с своей стороны, что этот яд не оказывает влияния на обесцвечивание метиленовой сини мускульными тканями и янтарной кислотой. Исходя из предположения, что в обоих случаях он имеет дело с одним и тем же ферментом, он объясняет полученные им результаты тем, что синильная кислота задерживает действие кислорода, но не метиленовой сини. При современном состоянии наших знаний вряд ли необходимо подчеркивать, что синильная кислота отравляет не кислород, а катализатор (оксидазу или систему с железом по Варбургу).

### ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ Н-ИОНОВ

Восстановление красителей, нитратов и т. д. в животных тканях происходит, как было впервые установлено Бахом<sup>8</sup>, под влиянием совместного действия фермента, идентичного с ферментом Шардингера, и кофермента, растворимого в воде и устойчивого при кипячении. Кофермент, который рассматривается сейчас как «дыхательный материал», существует в тканях частично в растворенном, частично в адсорбированном состоянии. Свежеизмельченная мускульная ткань восстанавливает метиленовую синь довольно энергично. Если промыть ее несколько раз водой, то она теряет способность восстанавливать краситель. Это, однако, еще не означает, что кофермент полностью удален, а только, что его распределение между адсорбентом и средой изменилось в пользу адсорбента. Изменением среды можно вызвать дальнейшую десорбцию кофермента. Это именно и происходит, когда мускульная ткань приходит в соприкосновение с нейтрализованным раствором янтарной кислоты вместо воды. Когда мы поставили сравнительные опыты с метиленовой синью на одном и том же материале, с одной стороны — с раствором янтарной кислоты, нейтрализованной до  $\text{pH}=7.6$ , с другой стороны — с фосфатным буфером одного и того же  $\text{pH}$ , мы нашли, что в обеих сериях опытов восстановление метиленовой сини происходило практически одновременно (опыты 6—8, стр. 535). Контрольные опыты с водой вместо ян-

тарной кислоты и фосфатных буферов дали отрицательный результат. Буферная смесь с борнокислыми солями (рН 7.8) дала такое же восстановление, как в указанном выше случае (опыт 9, стр. 535). Если незначительная щелочность прибавленного раствора уже достаточна для появления реакции с метиленовой синью, то нет никаких причин допускать дегидрирование янтарной кислоты до тех пор, пока не доказано, что она при этом действительно распадается. Вследствие чрезвычайно малого размера этого превращения исследование распада янтарной кислоты в опыте с метиленовой синью сопряжено с почти непреодолимыми трудностями, и до сих пор неизвестно ни одного опыта, поставленного в этом направлении. Приведенные в литературе данные, согласно которым Тунберг произвел в опыте с метиленовой синью дегидрирование янтарной кислоты с образованием фумаровой кислоты<sup>9</sup>, основаны на недоразумении. Следует еще отметить, что в то время как фосфатные смеси с рН-7.6 вызывают восстановление метиленовой сини и промытой мускульной ткани в такой же мере, как янтарнокислые соли, они не оказывают никакого влияния на поглощение кислорода в тех же условиях (опыт 10, стр. 536).

### ВЛИЯНИЕ НЕЙТРАЛЬНЫХ СОЛЕЙ

При дальнейшем изучении этого вопроса Тунберг<sup>7</sup> нашел, что простое прибавление хлористого натрия или хлористого калия к смеси промытой мускульной ткани и метиленовой сини вызывает восстановление красителя. Это восстановление он правильно приписывает сохранившейся в самой промытой ткани способности обесцвечивать метиленовую синь (остаточное восстановление). Это явление проще всего объяснить, предположив, что прибавление соли вызывает такое изменение условий растворения и осмотических свойств среды, что происходит дальнейшая десорбция кофермента. Тунберг сам уже пришел к такому объяснению, ибо он пишет: «возможно, что остаточное восстановление основано на том, что некоторые истинные активаторы чрезвычайно трудно вымываются из мышечной массы». Однако он не использовал дальше это направление и вместо того пытался выработать метод исключения ошибок, происходящих вследствие остаточного восстановления. Этот метод заключается в том, что к основным и контрольным пробам прибавляются равные количества смеси двухосновного и одноосновного фосфорнокислого калия в отношении 3 : 1. При проверке метода получены следующие результаты.

Указанная фосфатная смесь дает раствор с рН=7.3. В присутствии вымытой мышечной ткани этот раствор обесцвечивает метиленовую синь при прочих равных условиях с той же скоростью, как нейтрализованый раствор янтарной кислоты. Если часть раствора фосфата заменить соответственным количеством раствора сукцината, то смесь дает такую же скорость реакции, как и каждый из исходных растворов сам по себе (опыт 11, стр. 536). Совершенно аналогичные результаты были получены с уксусной и лимонной кислотами, которые, по Тунбергу, также должны дегидрироваться метиленовой синью (опыт 12, стр. 536). Вряд ли можно сомневаться в том, что предполагаемое дегидрирование органических кислот перекрывается здесь остаточным восстановлением. Во всяком случае, следует упомянуть что, как это было уже установлено Тунбергом, соли щавелевой и масляной, а также и некоторых других органических кислот оказывают чрезвычайно незначительное влияние на остаточное восстановление или даже совсем на него не влияют.

Нейтральные соли не вызывают повышения поглощения кислорода вымытой мышечной тканью (опыт 13, стр. 536).

## ВЫВОДЫ

I. Под влиянием янтарной кислоты вымытая мышечная ткань поглощает приблизительно в 300 раз больше кислорода, чем соответствует восстановленной метиленовой сини.

II. Синильная кислота не влияет на восстановление метиленовой сини, но задерживает поглощение кислорода.

III. Неорганические буферные растворы (фосфорнокислые и борно-кислые смеси) в области  $pH=7.4$  и нейтральные растворы солей ускоряют восстановление метиленовой сини и не влияют на поглощение кислорода.

IV. Восстановление метиленовой сини, вызванное неорганическими буферными растворами (остаточное восстановление), выражается такого же порядка величинами, как восстановление, вызванное нейтральной янтарной кислотой.

Из пунктов I—III вытекает, что восстановление метиленовой сини и поглощение кислорода являются двумя принципиально отличными друг от друга процессами. На основании пункта IV предполагаемое дегидрирование янтарной кислоты в опыте с метиленовой синью кажется чрезвычайно сомнительным.

## ОПИСАНИЕ ОПЫТОВ

## Количество реагирующего вещества

Для опытов, описанных ниже, мы пользовались мышечной тканью голубей, ибо, согласно Бателли и сотр., эти ткани содержат больше всего сукцино-оксидазы.

Опыт 1. Свежевырезанная мышечная ткань оставляется на 5 часов, затем измельчается в мясорубке и промывается 3 раза трехкратным объемом воды в течение 15 мин. Промытый материал переносится на полотно и тщательно отсасывается на бюхнеровской воронке.

а) Опыт с кислородом. 60 см<sup>3</sup> раствора янтарной кислоты, доведенного до  $pH=7.6$  раствором едкого кали, переводят в колбу на 150 см<sup>3</sup> и ставят в термостат при 38° с приспособлением для взбалтывания. После введения 20 г мышечной ткани колба эвакуируется, наполняется кислородом и соединяется с газовой бюреткой, наполненной кислородом. После выравнивания температуры пускается в ход болтушка; поглощение кислорода отсчитывается через каждые 5 минут. Одновременно с основным опытом ставится контрольный опыт с 60 см<sup>3</sup> воды вместо раствора янтарной кислоты.

В следующих цифрах приведены данные относительно количества кислорода, поглощенного в присутствии янтарной кислоты. В контрольном опыте не наблюдалось поглощения кислорода.

|                                           |       |       |       |       |       |       |
|-------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Время (в минутах) . . . . .               | 5     | 10    | 15    | 20    | 25    | 30    |
| Поглощенный кислород (в см <sup>3</sup> ) | 16.80 | 26.88 | 31.92 | 34.36 | 35.08 | 36.12 |

б) Опыт с метиленовой синью. С тем же самым материалом были поставлены опыты с метиленовой синью в вакууме согласно указаниям Тунберга. В четыре вакуумные трубки, по Тунбергу, помещалось по 1 г промытой мышечной ткани, по 3 см<sup>3</sup> нейтрализованной 1%-ной янтарной кислоты и возрастающие количества метиленовой сини в 3 см<sup>3</sup> воды. Одновременно ставился контрольный опыт без прибавления янтарной кислоты.

Отмечалось время, необходимое для полного обесцвечивания смеси:

|                                                 |     |     |     |     |
|-------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| Количество прибавленной метиленовой сини (в мг) | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 |
| Продолжительность обесцвечивания (в минутах)    | 12  | 20  | 34  | 48  |
| Контрольный опыт, не обесцвечено через 180 мин. |     |     |     |     |

Если вычислить количество водорода, перенесенного на:

а) кислород и б) метиленовую синь в 20 минут 1 г мышечной ткани, то получается:

а) 0.303 мг; б) 0.001 мг;  $a : b = 303$ .

Опыты многократно проверялись с различными препаратами из мышц. Полученные в опытах 2—5 результаты приведены в следующей таблице:

| Опыт | Поглощенный кислород (в мг) | Обесцвеченная метиленовая синь (в мг) | Продолжительность обесцвечивания (в минутах) | $a : b$ |
|------|-----------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------------|---------|
| 2    | 2.39                        | 0.2                                   | 23                                           | 299     |
| 3    | 2.47                        | 0.2                                   | 19                                           | 308     |
| 4    | 2.25                        | 0.2                                   | 17                                           | 281     |
| 5    | 2.27                        | 0.2                                   | 22                                           | 281     |

В равные промежутки времени на кислород переносится приблизительно в 300 раз больше водорода, чем на метиленовую синь, в пересчете на 1 г мышечной ткани.

#### Влияние концентрации $H^+$ -ионов

Опыт 6. 3 вакуумные трубки, по Тунбергу, содержали по 1 г отмытой мышечной ткани (голубь), по 1 см<sup>3</sup> раствора метиленовой сини (1 : 5000) и следующие прибавки: трубка *a* — 4 см<sup>3</sup> нейтрализованного 1%-ного раствора янтарной кислоты, трубка *b* — 4 см<sup>3</sup> фосфорной смеси с pH=7.6, трубка *c* — 4 см<sup>3</sup> воды. Смеси ставились в термостат при 40°, и отмечалось время, необходимое для обесцвечивания.

Время, необходимое для обесцвечивания: *a* — 18 минут, *b* — 16 минут и *c* — не обесцвечено через 3 часа.

Опыт 7. Измельченная мышечная ткань (теленка), промытая 2 раза трехкратным объемом воды через 15 минут. Опыт ставился, как указано выше.

Время, необходимое для обесцвечивания: *a* — 12 минут, *b* — 15 минут, *c* — не обесцвечено.

Тот же измельченный материал после 24-часового хранения при комнатной температуре.

Время, необходимое для обесцвечивания: *a* — 70 минут, *b* — 65 минут, *c* — не обесцвечено.

Опыт 8. 5 г мышечной ткани размешивают с 5 см<sup>3</sup> раствора метиленовой сини: после адсорбции ткани отжимаются. В 3 вакуумные трубки, по Тунбергу, помещают по 5 г окрашенной таким образом мышечной ткани. Кроме того, трубка *a* получает 25 см<sup>3</sup> фосфатной смеси с pH=7.6, трубка *b* — 25 см<sup>3</sup> нейтрализованного раствора янтарной кислоты, трубка *c* — 25 см<sup>3</sup> воды.

Время, необходимое для обесцвечивания: *a* — 28 минут, *b* — 30 минут, *c* — не обесцвечено в течение 3 часов.

Опыт 9. Подготовка материалов и постановка опытов, как указано выше. Прибавки: *a* — 25 см<sup>3</sup> боратной смеси по Кларку (pH=7.8), *b* — 25 см<sup>3</sup> нейтрализованного раствора янтарной кислоты, *c* — 25 см<sup>3</sup> воды.

Время, необходимое для обесцвечивания: *a* — 33 минуты, *b* — 28 минут, *c* — не обесцвечено через 3 часа.

Опыты 6—9, таким образом, доказывают, что при равном рН метиленовая синь в присутствии мышечной ткани обесцвечивается практически с той же самой скоростью при действии фосфатных и боратных буферных смесей, как и с раствором янтарнокислых солей.

Опыт 10. Опыт с кислородом с 20 г мышечной ткани (Траубе) и *a*) 60 см<sup>3</sup> нейтрализованного раствора янтарной кислоты, *b*) 60 см<sup>3</sup> фосфатной смеси с рН=6.7. Постановка опыта, как в 1-а.

|                                                     |                                                       |                        |    |    |    |    |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------------|----|----|----|----|
| Время (в минутах) . . . . .                         | 10                                                    | 15                     | 20 | 25 | 30 | 35 |
| Поглощенный кислород (в см <sup>3</sup> ) . . . . . | $\left\{ \begin{array}{l} a \\ b \end{array} \right.$ | 20                     | 32 | 43 | 48 | 49 |
|                                                     |                                                       | без заметной адсорбции |    |    |    |    |

### Влияние солей

Опыт 11. Были приготовлены следующие смеси.

|                                                                                             |  | Продолжительность обесцвечивания. |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|--|-----------------------------------|
| <i>a</i> ) 1 г мышечной ткани (голубь) + 5 см <sup>3</sup> фосфатной смеси рН=7.4           |  | 17 мин.                           |
| <i>b</i> ) 1 г мышечной ткани + 5 см <sup>3</sup> сукцината                                 |  | 15 »                              |
| <i>c</i> ) 1 г мышечной ткани + 2.5 см <sup>3</sup> фосфата + 2.5 см <sup>3</sup> сукцината |  | 18 »                              |
| <i>d</i> ) 1 г мышечной ткани + 1 см <sup>3</sup> фосфата + 4 см <sup>3</sup> воды          |  | 23 »                              |
| <i>e</i> ) 1 г мышечной ткани + 5 см <sup>3</sup> воды                                      |  | Не обесцвечено через 3 часа       |

Опыт 12. Измельченные мышцы лягушки, промытые 2 раза 20-кратным объемом воды.

|                                                                                                    | Продолжительность обесцвечивания. |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| <i>a</i> ) 1 г мышцы + 5 см <sup>3</sup> фосфатной смеси рН 7.4                                    | 80 мин.                           |
| <i>b</i> ) 1 г мышцы + 1 см <sup>3</sup> фосфатной смеси + 4 см <sup>3</sup> уксуснокислого натрия | 85 »                              |
| <i>c</i> ) 1 г мышцы + 1 см <sup>3</sup> фосфатной смеси + 4 см <sup>3</sup> лимоннокислого калия  | 90 »                              |
| <i>d</i> ) 1 г мышцы + 1 см <sup>3</sup> фосфатной смеси + 4 см <sup>3</sup> маслянокислого натрия | Не обесцвечено                    |
| <i>e</i> ) 1 г мышцы + 5 см <sup>3</sup> воды                                                      | Не обесцвечено                    |

Опыт 13. Промытые мышцы (голубь).

|                                                                                        |                                                       |                |    |    |    |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|----------------|----|----|----|-----------|
| <i>a</i> ) 25 г мышцы + 75 см <sup>3</sup> нейтрализованного раствора янтарной кислоты |                                                       |                |    |    |    |           |
| <i>b</i> ) 25 г мышцы + 75 см <sup>3</sup> раствора хлористого калия (0.1 N)           |                                                       |                |    |    |    |           |
| Время (в минутах) . . . . .                                                            | 5                                                     | 10             | 15 | 20 | 25 | 30 35     |
| Поглощенный кислород (в см <sup>3</sup> ) . . . . .                                    | $\left\{ \begin{array}{l} a \\ b \end{array} \right.$ | 18             | 32 | 48 | 60 | 66 [68 70 |
|                                                                                        |                                                       | Нет поглощения |    |    |    |           |

25 января 1927 г.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Бах и Николаев. *Biochem. Zs.*, **169**, 405 (1926); настоящая книга, стр. 519.
2. Бах и Михлин. *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **60**, 62 (1927); настоящая книга, стр. 526.
3. Wieland. *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **59**, 1184 (1926).
4. Thunberg. *Skand. Arch. Physiol.*, **22**, 406 (1909).
5. Battelli u. a. *Biochem. Zs.*, **30**, 172 (1911).
6. Thunberg. *Skand. Arch. Physiol.*, **35**, 163 (1918).
7. Thunberg. *Skand. Arch. Physiol.*, **40**, 1 (1920).
8. Бах. *Biochem. Zs.*, **31**, 443; **33**, 282 (1911); **38**, 154 (1912); **58**, 205 (1913); настоящая книга, стр. 490, 494, 501, 507.
9. См. Orpenheimer *Handb. d. Biochemie*, 5-е изд., **2**, 264 (1923).



---

### Раздел 3

## КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ФЕРМЕНТОВ

### О ФЕРМЕНТНЫХ ПОКАЗАТЕЛЯХ КРОВИ \*

#### Сообщение I

#### КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАТАЛАЗЫ, ПЕРОКСИДАЗЫ, ПРОТЕАЗЫ И ЭСТЕРАЗЫ В КАПЛЕ КРОВИ \*\*

(Совместно с С. Р. Зубковой)

В последнее десятилетие в связи с быстрым развитием энзимологии все более и более выявляется та огромной важности роль, какую ферменты играют в жизни организма. Более полувека тому назад Шенбейн высказал мысль, что без содействия окислительных ферментов организм задохнулся бы в океане кислорода, как он задыхается в бескислородной среде. Тогда эта мысль казалось парадоксальной, но теперь едва ли кто станет оспаривать то положение, что между состоянием организма и работой его ферментов существует теснейшая связь, что всякое изменение в состоянии организма или вызывается, или сопровождается изменением в работе его ферментов, а это дает возможность переходить от одного ряда явлений к другому — от изменения состояния организма к изменению деятельности ферментов — и обратно. Вполне очевидно, что точное знание этих взаимоотношений дало бы нам ответ на важнейшие вопросы физиологии и патологии, над разрешением которых бьется мысль исследователей. Для того чтобы установить эти взаимоотношения, необходимо иметь возможность производить частые и многочисленные определения ферментов организма, и наиболее удобным объектом в этом отношении является кровь. К сожалению, в смысле систематического количественного изучения работы ферментов крови до сих пор почти ничего не сделано. Причина этого лежит в неудовлетворительности современных методов определения ферментов крови. Методы эти требуют много времени и довольно значительных количеств крови, получить которые можно только из вены.

Все эти соображения побудили нас приступить к выработке таких методов определения ферментов крови, которые дали бы возможность избежать неудобств, присущих старым методам, и установить числовое выражение работы ферментов крови, установить то, что мы называем *ферментными показателями крови*.

Ниже мы даем описание методов, которые выработаны нами для определения четырех ферментов — каталазы, протеазы, пероксидазы и липазы — в капле крови. Определение всех четырех ферментов вместе с контрольными опытами требует всего 0.006 см<sup>3</sup> крови и легко выполнимо в

---

\* Работа эта выполнена в Химическом институте им. Л. Я. Карпова в течение 1919—1920 гг. и дополнена в Биохимическом институте НКЗ в 1921 г.

\*\* Сб. работ по чистой и прикл. химии.— Тр. Хим. ин-та им. Л. Я. Карпова, 1, 65 (1923).

сравнительно короткое время. При некотором навыке легко можно за 3 часа произвести определение этих ферментов в 4—6 пробах крови. Само собою разумеется, что дело идет здесь не об определении абсолютных количеств ферментов, а об установлении некоторых относительных величин, которые получаются в строго определенных условиях и являются прямым или косвенным числовым выражением деятельности ферментов.

При выработке условий опыта мы неуклонно стремились по возможности упростить методику и сделать ее доступной более широким кругам исследователей. Исходили мы при этом из того соображения, что настоящие ферментные показатели могут быть установлены только массовыми систематическими исследованиями, при которых индивидуальные отклонения и ошибки компенсируются. Это — применение закона больших чисел к изучению ферментов.

### Методика

Каплю крови из кончика пальца\* или из мочки уха всасывают в пипетку емкостью в 20 мм<sup>3</sup> до черты и количественно переносят в колбочку, содержащую 20 см<sup>3</sup> дистиллированной воды.

Из полученного таким образом раствора крови для каждого определения берется по 1 см<sup>3</sup>, соответствующему 0.001 мм<sup>3</sup> крови.

### Определение каталазы и протеазы

Вначале мы определяли каталазу таким образом, что в колбочку, вместимостью в 15 см<sup>3</sup>, последовательно приливали 1 см<sup>3</sup> раствора крови (1 : 1000), 7 см<sup>3</sup> воды и 2 см<sup>3</sup> 1%-ной чистой перекиси водорода (Мерк). Эту смесь оставляли на полчаса в термостате при 37° и затем после подкисления 3 см<sup>3</sup> 10%-ной H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> определяли 0.1 N раствором перманганата неразложенную перекись водорода. Одновременно ставилась контрольная проба при прочих равных условиях, но с нагретым до кипячения раствором крови. Из разности между израсходованным перманганатом в контрольной и опытной пробках определялось количество перекиси водорода, разложенное 1 см<sup>3</sup> раствора крови (= 1 мм<sup>3</sup> крови). Когда впоследствии выяснилось, что определение каталазы и протеазы можно произвести в одной и той же операции, указанный способ определения каталазы был изменен нижеследующим образом.

В процессе изысканий мы заметили, что и в тех условиях, в которых мы работали, каталаза крови разлагает значительно больше перекиси водорода при комнатной температуре, нежели при 37°.

Аналогичное наблюдение было уже сделано Сентером<sup>1</sup> и истолковано в том смысле, что каталаза разрушается при высокой температуре перекисью водорода быстрее, чем при низкой. Однако нами установлено, что при оставлении раствора крови в продолжение 30 минут в термостате при 37° без прибавления перекиси водорода и последующем действии перекиси водорода при комнатной температуре в продолжение еще 30 минут активность каталазы так же понижается, как и при непосредственном 30-минутном действии перекиси водорода при 37°.

1 см<sup>3</sup> раствора крови 7 см<sup>3</sup> воды ставят в термостат при 37° на 30 минут; после охлаждения этой смеси до 17° к ней приливают 2 см<sup>3</sup> 1%-ной перекиси водорода и снова оставляют на 30 минут уже при 17°, затем титруют перманганатом. Одновременно ставится один контрольный опыт при 37° (без предварительного нагревания) и один при 17°.

\* Если кровь берется из пальца, следует предварительно опустить руку на 5 минут в теплую воду (40—45°).

|                                                            | Количество разложенной<br>$H_2O_2$ (в мг) |
|------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Контрольный опыт при $17^\circ$ . . . . .                  | 16.66                                     |
| После предварительного нагревания при $37^\circ$ . . . . . | 14.43                                     |
| При непосредственном действии $H_2O_2$ . . . . .           | 14.52                                     |

Уменьшение действия каталазы: в первом случае  $16.66 - 14.43 = 2.23$  мг, во втором случае  $16.66 - 14.52 = 2.14$  мг. Таким образом, уменьшение действия каталазы зависит только от повышения температуры и не зависит от того, подвергается ли раствор нагреванию сам по себе или в присутствии перекиси водорода. Относительно влияния высоких температур на каталазу в литературе встречаются противоречивые данные. По Либерману<sup>2</sup>, каталаза картофельного экстракта ослабляется уже при  $36^\circ$ , а каталаза солодовой вытяжки<sup>3</sup> при  $40-43^\circ$ .

В противоположность этому, по Исаеву<sup>4</sup>, каталаза дрожжей выносит более высокие температуры и даже при  $90^\circ$  еще не вполне разрушается.

Обычно объясняют эти противоречия предполагая, что при приготовлении ферментов в раствор увлекаются посторонние вещества, которые различно влияют на устойчивость каталазы при повышении температуры. Тот факт, что указанные опыты производились не с препаратами каталазы, предварительно хорошо очищенными, а исключительно с первоначальными экстрактами, дает нам возможность подойти к другому объяснению.

При получении каталазы в раствор попадают наряду с этим ферментом также и другие растворимые ферменты растительной или животной клетки, что ведет к возникновению автолитических процессов и взаимодействию между ферментами. Так, известно, что зимаза из сока дрожжей, полученного высоким давлением, довольно быстро разрушается под действием содержащейся в ней эндотрипсазы. Лев<sup>5</sup>, открывший каталазу, приписывал растворимой форме этого фермента свойства альбумоз. По Эйлеру<sup>6</sup>, каталаза из жира не является белковым веществом.

В противоположность этому Бах<sup>7</sup> нашел, что очищенная каталаза из жира дает отчетливые реакции на белок. Белковая природа каталазы была затем установлена Вэнтингом и Штехе<sup>8</sup>, которые обнаружили разрушение каталазы под влиянием трипсина. Впрочем, не исключается возможность, что каталаза сама по себе не есть белковое вещество, а встречается в адсорбированном состоянии на белках и разрушается при переваривании ее защитного коллоида.

Мы повторили опыты Вэнтинга и Штехе с очищенным препаратом каталазы, полученным из печени свиньи, и могли подтвердить их результат относительно уменьшения действия каталазы под влиянием трипсина. Если поэтому различные экстракты, содержащие каталазу, обнаруживают неодинаковую чувствительность к повышению температуры, то это происходит, вероятно, отчасти оттого, что они содержат неодинаковые количества протеазы. Так как действие протеазы постепенно возрастает с увеличением температуры до  $47^\circ$ , то легко понять, что чем больше препарат каталазы содержит протеазы, тем чувствительнее он будет к повышению температуры.

Тот факт, что более чистые препараты каталазы менее чувствительны к высоким температурам, чем экстракты, доказывается следующим опытом: каталаза из печени свиньи, предварительно очищенная трехкратным осаждением спиртом, была растворена в воде и полученный раствор соответствующим разбавлением был доведен до той же степени активности, как и раствор крови.

С раствором каталазы и раствором крови были произведены определения каталазы при  $17^\circ$  и после одного часа стояния при  $37^\circ$  по вышеописанному методу.

|                            | Количество разложившейся $H_2O_2$ (в мг) |         |
|----------------------------|------------------------------------------|---------|
|                            | при 17°                                  | при 37° |
| Раствор крови . . . . .    | 16.92                                    | 14.63   |
| Раствор каталазы . . . . . | 16.24                                    | 16.11   |

Что при разбавлении крови дистиллированной водой в раствор переходят все ферменты ферментных элементов, в том числе, и протеаза, — не подлежит никакому сомнению. Тотчас после перехода ферментов в раствор протеаза начинает действовать на каталазу, и обусловливаемое этим понижение действия каталазы увеличивается с возрастанием температуры от 0 до 47°. Чем выше температура, при которой производится опыт, тем быстрее протекает действие протеазы, тем меньше обнаруживается действие каталазы. Так как, с другой стороны, скорость, с которой протекает реакция каталазы, как и других ферментов, возрастает с увеличением температуры, то при определении каталазы в растворе крови определяется, собственно говоря, только та часть каталазы, которая не разрушена протеазой; определяется равнодействующая двух реакций: разложения перекиси водорода каталазой и разложения каталазы протеазой. Величина этой равнодействующей зависит от относительных количеств того и другого фермента и от температурного коэффициента обеих реакций.

Как видно из последующего ряда опытов, действие каталазы в нашем растворе крови увеличивается от 0° до 17° быстрее, чем действие протеазы; выше этой температуры происходит обратное явление.

Количество  $H_2O_2$ , разложенное 1 см<sup>3</sup> раствора крови

| Температура (°C) | 0     | 5     | 10    | 15    | 17    | 20    | 25    | 30    | 35    | 37    | 40    |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| $H_2O_2$ (в мг)  | 16.61 | 17.27 | 17.90 | 18.34 | 18.75 | 18.15 | 17.62 | 16.12 | 14.63 | 14.25 | 14.04 |

Указанные взаимоотношения каталазы и протеазы естественно приводят к мысли измерять действие последней уменьшением активности первой. Эта мысль была уже высказана Вэнтингом и Штехе, которые впервые исследовали влияние протеазы на каталазу. Однако до сих пор эту мысль не удалось подтвердить, вероятно, из-за трудностей иметь постоянные растворы каталазы для определения протеазы. Но это неудобство совершенно отпадает при определении протеазы в растворе крови. В лаковой крови мы имеем готовый раствор каталазы и готовый раствор протеазы. Остается только определить уменьшение действия каталазы, вызванное влиянием протеазы при повышенной температуре, чтобы получить числовое выражение действия протеазы.

Комбинированное определение каталазы и протеазы производится следующим способом.

В три эрленмейровские колбочки *a*, *b* и *c* наливают по 7 см<sup>3</sup> воды; колба *a* получает 1 см<sup>3</sup> кипяченого раствора крови, колбы *b* и *c* по 1 см<sup>3</sup> активного раствора крови. Колбы *a* и *b* оставляют при 17°, *c* — при 37° на 1 час. По истечении этого времени колбу *c* охлаждают до 17° и в каждую из трех колбочек прибавляют по 2 см<sup>3</sup> 1%-ной перекиси водорода, оставляют еще на полчаса при 17°, затем каждую колбу подкисляют 3 см<sup>3</sup> 10%-ной  $H_2SO_4$  и титруют 0.1 *N* раствором перманганата до розового окрашивания. Разность между *a* и *b*, перечисленная на миллиграммы  $H_2O_2$ , дает то количество перекиси, которое разлагается 1 см<sup>3</sup> активного раствора крови при 17° (*показатель каталазы*). Разность ме-

жду *a* и *c* дает то количество  $H_2O_2$ , которое разлагается активным раствором крови, предварительно стоявшим при  $37^\circ$ . Разность между количеством перекиси водорода, разложившейся при  $17^\circ$ , и количеством перекиси, разложившейся при  $37^\circ$ , дает выраженное в миллиграммах  $H_2O_2$  уменьшение активности каталазы под влиянием протеазы (*показатель протеазы*).

Таким образом, *показатель каталазы есть выраженное в миллиграммах количество  $H_2O_2$ , которое разлагается в указанных условиях 0.001 см<sup>3</sup> крови.*

*Показатель протеазы есть выраженное в миллиграммах перекиси водорода уменьшение активности каталазы под влиянием предварительного пребывания кровяного раствора в термостате при  $37^\circ$ .*

### П р и м е р

|                                                                | Кипяченый<br>раствор при $17^\circ$<br>(контрольная<br>проба)<br><i>a</i> | Активность<br>раствора при $17^\circ$<br><i>b</i> | Активность<br>раствора при $37^\circ$<br><i>c</i> |
|----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Количество употребленной $KMnO_4$ (см <sup>3</sup> ) . . . . . | 12.1                                                                      | 2.4                                               | 4.9                                               |
| Разность по отношению к <i>a</i> (см <sup>3</sup> ) . . . . .  | —                                                                         | 9.7                                               | 7.2                                               |
| Разложение $H_2O_2$ (мг) . . . . .                             | —                                                                         | $1.7 \times 9.7 = 16.66$                          | $1.7 \times 7.2 = 12.24$                          |

Показатель каталазы = 16.66.

Показатель протеазы =  $16.66 - 12.24 = 4.42$ .

По нашим наблюдениям, показатель каталазы крови людей, на вид здоровых, колеблется между 14 и 18. Показатель протеазы колеблется между 3 и 5. Для одного и того же индивидуума эти показатели довольно постоянны в определенных границах ( $\pm 10\%$  средней величины). Мы подчеркиваем, однако, что все эти числа мы рассматриваем как предварительные, ибо настоящие показатели могут быть установлены только на основании многих тысяч определений.

### Определение пероксидазы

Известно, что гемоглобин и его производные обладают способностью ускорять окислительные действия  $H_2O_2$  таким же образом, как и растительная пероксидаза. Это дало повод предположить, что в животном организме пероксидаза вообще не существует. Как главное доказательство приводится наблюдение, что окислительные действия перекиси водорода ускоряются как кипяченой, так и свежей кровью, что противоречит ферментному характеру реакции. Мы нашли, однако, что это наблюдение верно лишь постольку, поскольку дело идет о *неразбавленной* крови: после нагревания до кипячения она действительно сохраняет свое ускоряющее влияние на действие  $H_2O_2$ . Если же кровь, как в наших опытах, разводится в 1000 раз, то она еще действует ускоряющим образом в свежем состоянии и, напротив, совершенно неактивна после кипячения; действие пероксидазы еще продолжается, когда действие гемоглобина уже иссякло. Это обстоятельство объясняется тем, что пероксидаза более чувствительный катализатор, чем гемоглобин. В неразбавленной крови реакция пероксидазы покрывается реакцией гемоглобина, в разбавленных же рас-

ворах крови выступает на сцену одна пероксидаза и может быть определена количественно.

После многих предварительных опытов мы остановились на употреблении чистого гваякола в качестве реактива на пероксидазу, во-первых, потому что его водный раствор очень устойчив, во-вторых, потому что он сам по себе перекисью водорода не окисляется с измеримой скоростью (раствор остается долгое время бесцветным) и, в-третьих, потому что он в минимальных количествах дает интенсивно окрашенные продукты окисления: 0.00005 г окисленного гваякола еще легко определяются количественно колориметрическим путем.

Для определения пероксидазы наливают в узкую пробирку 1 см<sup>3</sup> раствора крови, 7 см<sup>3</sup> воды, 1 см<sup>3</sup> 0.7%-ного раствора гваякола и 1 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>. Смесь эту оставляют стоять при комнатной температуре на полчаса и сравнивают полученную окраску в колориметре с нижеопи-сываемой шкалой. Последняя состоит из нескольких запаянных трубок, из которых каждая заключает в себе по 10 см<sup>3</sup> стандартного раствора в возрастающей концентрации окрашивающего вещества. Как стандартную жидкость проще всего было бы применить растворы, содержащие точно определенные количества окисленного гваякола; к сожалению, растворы такого рода весьма непостоянны. Случайно мы натолкнулись в других изысканиях на довольно устойчивый раствор, который в колориметрическом отношении почти точно соответствует окисленному гваяколу и годится поэтому для установления шкалы. Для приготовления этой жидкости 10 г яичного белка, 5 г едкого натра, 2 г нитрата кобальта кипятят 30 минут в 250 см<sup>3</sup> воды и затем фильтруют через асбест. Красноовато-коричневая жидкость в систематических разбавлениях наливается по 10 см<sup>3</sup> в хорошо калиброванные трубки, которые запаиваются. Разбавления производятся таким образом, что в наиболее слабо окрашенной жидкости (трубка I) окраска несколько слабее той, которая получается при полном окислении 0.05 мг гваякола в 10 см<sup>3</sup>. Отношение между ступенями шкалы выражается числами:

$$1.0 : 1.5 : 2 : 3 : 3.5 : 4 : 5.$$

Для установки шкалы в калиброванные трубки наливают возрастающие количества 0.005%-ного раствора чистого гваякола (1; 1.5; 2 и т. д. до 5 см<sup>3</sup>), в каждую трубку прибавляют по 1 см<sup>3</sup> раствора пероксидазы (см. ниже), 1 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора перекиси водорода и воды до 10 см<sup>3</sup>. Эту смесь оставляют на 30 минут при комнатной температуре. При избытке окислителя (пероксидаза + Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>) весь наличный гваякол переходит в соответственный хиноноподобный продукт окисления. Полученные таким путем окрашенные жидкости сравниваются с трубками шкалы колориметра.

Если окраска раствора окисленного гваякола более интенсивна, чем стандартная жидкость в соответственной трубке шкалы, то раствор разбавляют водой из бюретки до полного уравнивания окраски обеих жидкостей; из объемных отношений легко вычислить количество окисленного гваякола, которому соответствует окраска данной стандартной трубки.

Пример. Для того чтобы уравнять окраску трубки 1 с раствором жидкости, содержащим 0.05 мг окисленного гваякола, надо было и последнему прибавить 1.5 см<sup>3</sup> воды.

Отсюда вычисляют:

$$0.05 \cdot \frac{10}{(10 + 1.5)} = 0.043 \text{ мг гваякола.}$$

Таким образом, окраска трубки I соответствует окраске раствора, который в 10 см<sup>3</sup> содержит 0.043 мг окисленного гваякола.

При определении пероксидазы в растворе крови по вышеописанному методу полученная окрашенная жидкость в случае, если ее окраска не соответствует ни одной из трубок, разбавляется водой из бюретки до тех пор, пока окраска ее не сравняется с окраской ниже ее стоящей трубки шкалы. Из объемных отношений вычисляют содержание окисленного гваякола во взятой пробе.

Пример. Взятая проба окрашена более интенсивно, чем трубка 1 (0.043 мг окисленного гваякола); для того чтобы сравнить окраску, нужно прибавить 3.4 см<sup>3</sup> воды. Имеем таким образом:

$$0.043 \cdot \frac{(10 \cdot 3.4)}{10} = 0.057 \text{ мг}$$

окислительного гваякола (показатель пероксидазы).

*Выраженное в тысячных долях миллиграмма количество гваякола, которое окисляется 0.001 см<sup>3</sup> крови при помощи перекиси водорода, есть показатель пероксидазы крови.* У здоровых людей показатель пероксидазы колеблется между 50 и 100. Встречаются иногда и более высокие показатели.

Раствор пероксидазы, необходимый для калибрования шкалы, так же как и для определения эстеразы (см. ниже), готовится следующим образом.

1 кг хорошо измельченного хрена (это лучший материал для извлечения пероксидазы) три дня мацерируют в 500 см<sup>3</sup> воды, затем отжимают. Полученный экстракт фильтруют и осаждают тремя объемами 96%-ного спирта. Осадок отфильтровывают, промывают спиртом, высушивают в вакууме над хлористым кальцием и затем снова растворяют в 500 см<sup>3</sup> воды. Отфильтрованный раствор сохраняется под толуолом. В то время как в твердом состоянии пероксидаза через короткое время теряет полностью свою активность (вероятно вследствие необратимой коагуляции), раствор пероксидазы долгие годы устойчив; активность полученного раствора пероксидазы была определена следующим образом.

В стакан наливают 5 см<sup>3</sup> раствора пероксидазы, 25 см<sup>3</sup> воды, 10 см<sup>3</sup> 10%-ного раствора пирогаллола и 15 см<sup>3</sup> 1%-ной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и оставляют при комнатной температуре. Образовавшийся продукт окисления — пурпуругалин, — малорастворимый в холодной воде, переносится на взвешенный фильтр, промывается 100 см<sup>3</sup> холодной дистиллированной воды, высушивается при 105° до постоянного веса и взвешивается; получено 0.315 г пурпуругалина, т. е. на каждый кубический сантиметр пероксидазы — 0.063 г пурпуругалина.

Для калибрования шкалы, так же как и для нижеописанных опытов, этот раствор пероксидазы разбавляется в 20 раз.

Все колориметрические определения следует производить при постоянном источнике света (электрическая лампа в 50 свечей удобна для этой цели), поместив молочное стекло между источником света и колориметрическими трубками.

При изменяющемся дневном освещении труднее получить хорошо сравнимые результаты.

Прибавим, что, в противоположность каталазе крови, пероксидаза крови дает при 37° те же результаты, что и при 17°. К происходящим в крови автолитическим процессам пероксидаза крови нечувствительна.

## Определение эстеразы

Несколько лет тому назад Бах<sup>9</sup> предложил для количественного определения минимальных количеств эстеразы в тканях новый метод, который состоит в том, что вместо эфиров жирного ряда применяют эфиры гваякола, окисляя отщепленный гваякол пероксидазой с перекисью водорода и определяют колориметрически, как указано выше. В основе этого метода лежит тот факт, что эта окислительная система очень быстро действует на свободные фенолы, но не действует на фенольные эфиры.

Для определения эстеразы в крови поступают следующим образом.

В узкую пробирку наливают 1 см<sup>3</sup> раствора крови (1 : 1000), 2 см<sup>3</sup> воды, 5 см<sup>3</sup> свежеприготовленного 4%-ного раствора тиюкола (гваяколсульфонат калия), 1 см<sup>3</sup> разбавленного раствора пероксидазы (см. выше) и 1 см<sup>3</sup> 1%-ной Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>. Контрольная проба — при прочих равных условиях с кипяченым раствором крови. После 30-минутного стояния при комнатной температуре отщепленный и окисленный гваякол определяют колориметрически тем же способом, что и в случае пероксидазы, — окислительная система прибавляется одновременно с раствором крови, чтобы окислять гваякол по мере его отщепления, так как в противном случае действие эстеразы прекращается, вероятно, вследствие тенденции к установлению равновесия. Если употреблять достаточно разбавленный раствор пероксидазы, то в контрольной пробе окрашивания не появляется. Более крепкие растворы пероксидазы дают и в контрольной пробе более или менее заметное окрашивание. В этом случае последнее определяется количественно и вычитается из опытной пробы. Величина конечного результата от этого не изменяется. Проще, однако, так выбирать концентрацию пероксидазы, чтобы контрольная проба давала 0.

Пример. Окраска опытной пробы более интенсивна, чем окраска трубки 3, которая соответствует 0,081 мг окисленного гваякола. Для того чтобы сравнить обе краски, нужно прибавить 2,1 см<sup>3</sup> воды. Контрольная проба=0. Таким образом, имеем:

$$0.081 \cdot \frac{(10 + 2.1)}{10} = 0.097 \text{ мг}$$

отщепленного и окислительного гваякола (показатель эстеразы).

Выраженное в тысячных долях миллиграмма количество гваякола, которое отщепляется 0,001 см<sup>3</sup> крови от гваякологового эфира, является показателем эстеразы у здоровых людей колеблется между 50 и 120.

Эстераза, так же как и пероксидаза, нечувствительна к повышению температуры.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Senter. Zs. physik. Chem., 44, 257 (1903).
2. Liebermann. Pflüg. Arch., 104, 176 (1904).
3. Liebermann. Pflüg. Arch., 104, 201 (1904).
4. Исаев. Zs. physiol. Chem., 44, 546 (1905).
5. Löw. U. S. Dept. Agric. Rep., 68 (1901).
6. Euler. Ark. vor Kemi, 1, 357 (1904).
7. Бах. Ber. Dtsch. chem. Ges., 38, 1878 (1905); настоящая книга, стр. 391.
8. Waenting u. Steche. Zs. physiol. Chem., 83, 315 (1914).
9. Бах. Fermentforschung 1, 151 (1915); настоящая книга, стр. 487.



## Сообщение II

СУТОЧНЫЕ КОЛЕБАНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАТАЛАЗЫ И ПРОТЕАЗЫ  
У ЖИВОТНЫХ И У ЧЕЛОВЕКА \*

(Совместно с Е. С. Иваницким-Василенко)

В первой работе о ферментных показателях крови Бах и Зубкова<sup>1</sup> отмечают, что, по их наблюдениям, которые они не считают окончательными, показатели каталазы у здоровых людей колеблются, повидимому, между 14 и 18, но что у каждого индивидуума в отдельности они гораздо более постоянны и отклонения от средней величины не превышают 10%. Определение показателя каталазы посредством титрования раствором перманганата в том виде, в каком оно применяется авторами, — операция настолько простая и точная, что ошибка опыта едва ли может достигнуть 1%.

Поэтому приходится предположить, что значительные колебания показателя, наблюдаемые у одного и того же индивидуума, отражают действительные изменения в работе фермента, вызываемые изменением в состоянии организма. Чтобы выяснить этот вопрос, мы решили проследить суточные изменения показателя каталазы у разных животных, производя определения ежечасно в течение 24 часов. Попутно с определением каталазы мы определяли также протеазу по методу, выработанному Бахом и Зубковой. В настоящей статье мы излагаем полученные результаты.

## Опыты на кроликах

В опыте было шесть взрослых кроликов обычной русской породы, четыре самца и две самки. Средний вес самцов был около 2300 г, вес самок 2000 г.

Животные оставались без пищи 12 часов до опыта и первые 12 часов опыта. После 12-го взятия крови они получали пареный овес и сено в количестве дневного рациона.

Кровь для исследования бралась из ушной вены каждый час в течение суток. Ночью животные по возможности изолировались от света и в периоды между каждым взятием крови отдыхали. За один прием обрабатывалось по три кролика. От момента взятия крови у первого кролика и до помещения стаканчиков с раствором крови в термостат и водяную баню проходило 15—20 минут.

Полученные показатели каталазы и протеазы для кроликов приведены в табл. 1.

Из этой таблицы мы видим, что говорить об *одном* показателе каталазы и об *одном* показателе протеазы приходится с известной поправкой на предельную для данного вида животных или даже индивидуума изменимость этих показателей в физиологических условиях. Поэтому мы остановились на введении для наших целей средней суточной величины ферментных показателей крови и уже от нее регистрируем колебания вверх (+) и вниз (—). Пределы колебаний показателей каталазы и протеазы для исследованных кроликов выявляются в табл. 2.

Итак, в исследованных нами случаях показатель каталазы имел амплитуду колебаний в среднем до 30% в обе стороны от средней суточной, амплитуда же колебаний для показателя протеазы заключалась между

\* Сб. работ по чистой и прикладной химии.— Тр. Хим. ин-та им. Л. Я. Карпова, 2, 26 (1924).

Таблица 1

| № кролика          | Показатели |     |      |     |      |     |      |     |      |     |      |     |
|--------------------|------------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|
|                    | 1          |     | 2    |     | 3    |     | 4    |     | 5    |     | 6    |     |
|                    | К *        | П * | К    | П   | К    | П   | К    | П   | К    | П   | К    | П   |
| 8                  | 15.5       | 1.4 | 16.0 | 0.4 | 15.5 | 1.0 | 13.8 | 1.1 | 17.8 | 0.9 | 14.8 | 1.2 |
| 9                  | 14.7       | 1.4 | 16.0 | 1.3 | 15.2 | 0.8 | 13.8 | 1.4 | 17.8 | 1.1 | 14.6 | 1.6 |
| 10                 | 14.3       | 1.3 | 16.2 | 0.9 | 14.9 | 0.3 | 13.8 | 1.6 | 17.8 | 1.4 | 14.9 | 1.9 |
| 11                 | 11.9       | 1.0 | 15.5 | 0   | 13.2 | 0.7 | 14.1 | 1.1 | 18.5 | 0.9 | 14.9 | 1.2 |
| 12                 | 13.5       | 1.0 | 14.7 | 0.8 | 14.3 | 0.5 | 14.1 | 1.8 | 18.8 | 1.7 | 12.0 | 0   |
| 13                 | 11.8       | 1.0 | 15.3 | 0.8 | 14.2 | 0.9 | 12.6 | 1.6 | 18.8 | 1.0 | 16.3 | 1.6 |
| 14                 | 14.0       | 1.5 | 15.2 | 0.6 | 13.7 | 0.7 | 13.7 | 0.9 | 18.1 | 1.2 | 16.0 | 1.7 |
| 15                 | 12.7       | 0.6 | 13.0 | 0.9 | 13.8 | 0.9 | 14.9 | 1.2 | 15.8 | 1.3 | 15.9 | 1.1 |
| 16                 | 13.9       | 1.3 | 15.5 | 1.5 | 14.4 | 0.8 | 14.3 | 1.4 | 18.7 | 0.9 | 14.9 | 1.3 |
| 17                 | 14.6       | 1.4 | 12.9 | 0   | 14.1 | 0.5 | 14.6 | 1.0 | 19.1 | 0.9 | 16.0 | 1.4 |
| 18                 | 12.8       | 0.9 | 13.8 | 2.2 | 14.9 | 1.9 | 13.8 | 1.4 | 18.4 | 1.0 | 16.1 | 1.8 |
| 19                 | 14.3       | 1.3 | 15.0 | 0.9 | 15.3 | 1.2 | 14.9 | 0.9 | 18.4 | 0.7 | 16.4 | 1.4 |
| 20                 | 12.7       | 1.2 | 11.6 | 1.0 | 14.8 | 0.9 | 13.8 | 1.4 | 18.2 | 1.4 | 16.5 | 1.3 |
| 21                 | 10.1       | 0.8 | 14.4 | 0.9 | 14.7 | 1.1 | 15.5 | 1.3 | 17.9 | 1.9 | 16.0 | 1.4 |
| 22                 | 9.5        | 1.2 | 14.4 | 0.9 | 14.6 | 1.1 | 12.4 | 1.5 | 17.8 | 1.4 | 14.2 | 1.4 |
| 23                 | 10.8       | 1.4 | 14.5 | 1.3 | 15.1 | 0.9 | 12.6 | 1.4 | 17.6 | 1.4 | 15.6 | 1.4 |
| 24                 | 11.6       | 1.4 | 15.5 | 0.8 | 15.3 | 1.4 | 13.0 | 1.3 | 17.9 | 0.8 | 14.2 | 1.4 |
| 1                  | 14.9       | 1.2 | 14.8 | 0.6 | 14.2 | 0.4 | 11.8 | 0.9 | 17.0 | 1.4 | 15.5 | 1.6 |
| 2                  | 15.0       | 2.0 | 12.6 | 0.7 | 14.6 | 1.1 | 13.3 | 1.1 | 17.7 | 1.0 | 15.4 | 1.0 |
| 3                  | 9.3        | 0   | 11.5 | 1.0 | 14.6 | 0.8 | 13.2 | 1.5 | 17.3 | 1.2 | 14.2 | 1.9 |
| 4                  | 10.5       | 0   | 9.3  | 0   | 13.2 | 0   | 13.4 | 2.0 | 14.1 | 1.1 | 13.9 | 1.3 |
| 5                  | 14.4       | 1.4 | 11.0 | 0.9 | 14.6 | 1.6 | 9.9  | 1.5 | 15.5 | 0.9 | 10.9 | 0.9 |
| 6                  | 12.9       | 1.2 | 15.4 | 1.2 | 15.3 | 1.2 | 11.6 | 0.5 | 15.8 | 1.3 | 15.4 | 1.5 |
| 7                  | 13.4       | 1.3 | 12.5 | 1.2 | 15.5 | 1.1 | 12.2 | 1.2 | 15.3 | 0.8 | 11.8 | 1.1 |
| Среднее за 24 часа | 12.9       | 1.1 | 14.0 | 0.9 | 14.6 | 0.9 | 13.4 | 1.3 | 17.5 | 1.1 | 14.9 | 1.3 |

\* К—показатель каталазы, П—показатель протеазы.

Таблица 2

| № кролика | Средняя суточная |     | Колебания в % от средней суточной |    |     |     |
|-----------|------------------|-----|-----------------------------------|----|-----|-----|
|           | К                | П   | К                                 |    | П   |     |
|           |                  |     | +                                 | -  | +   | -   |
| 1         | 12.9             | 1.1 | 20                                | 27 | 72  | 100 |
| 2         | 14.0             | 0.9 | 16                                | 33 | 16  | 100 |
| 3         | 14.6             | 0.9 | 6                                 | 10 | 116 | 100 |
| 4         | 13.4             | 1.3 | 15                                | 26 | 53  | 60  |
| 5         | 17.5             | 1.1 | 7                                 | 19 | 63  | 40  |
| 6         | 14.9             | 1.3 | 11                                | 26 | 40  | 100 |

100% (отсутствие) и + 116% от средней суточной. Следует добавить, что индивидуальность животного в этом случае играет, очевидно, не последнюю роль. В процессе работы нам встречались кролики, обнаруживающие почти полное отсутствие действия протеазы, в то время как в те же дни и часы в аналогичных условиях у других животных того же вида это действие было выражено достаточно рельефно.

## Опыты на кошках

В опыте было шесть кошек со средним весом около 2000 г.

|                       |                       |
|-----------------------|-----------------------|
| Кошка № 1, вес 2150 г | Кошка № 4, вес 2820 г |
| Кошка № 2, „ 2160 „   | Кошка № 5, „ 2450 „   |
| Кошка № 3, „ 2760 „   | Кошка № 6, „ 1830 „   |

Из бывших в нашем распоряжении 12 кошек мы остановились только на шести, так как эти животные относились к процессу взятия у них крови из хвоста без заметного беспокойства, что, по Джоблингу<sup>2</sup>, по крайней мере в отношении протеазы крови собак, гарантирует от искусственно вызванного увеличения содержания фермента в крови.

Животные с вечера, предшествующего дню опыта (за 12 часов), лишались пищи. Первые три кошки были без корма в течение также первых 15 часов опыта, для последних трех кошек этот срок был уменьшен до 12 часов. Каждая кошка после установленного для нее срока лишения пищи получала 50 см<sup>3</sup> молока. Помимо этого момента было обращено внимание на возможное изолирование кошек от всяких ассоциаций, связанных с пищей и кормлением. Кровь у кошек бралась для исследования из кончика хвоста каждый час в течение суток. Как уже указано, животные переносили

Таблица 3

| № кошки            | 1          |      |      |      |      |      | 2    |      |      |     |      |      | 3   |  |   |  |   |  | 4 |  |   |  |   |  | 5 |  |   |  |   |  | 6 |  |  |  |  |  |
|--------------------|------------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|------|------|-----|--|---|--|---|--|---|--|---|--|---|--|---|--|---|--|---|--|---|--|--|--|--|--|
|                    | Показатели |      |      |      |      |      |      |      |      |     |      |      |     |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |  |  |  |  |
| Время (час.)       | К          |      | П    |      | К    |      | П    |      | К    |     | П    |      | К   |  | П |  | К |  | П |  | К |  | П |  | К |  | П |  | К |  | П |  |  |  |  |  |
|                    | 8          | 12.7 | 1.0  | 13.9 | 0.9  | 14.0 | 0.5  | 13.3 | 0.9  | 9.0 | 0.7  | 12.3 | 1.7 |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |  |  |  |  |
| 9                  | 12.9       | 1.5  | 13.4 | 1.5  | 15.2 | 1.8  | 12.5 | 1.4  | 8.3  | 0.9 | 10.0 | 1.3  |     |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |  |  |  |  |
| 10                 | 13.0       | 1.4  | 14.3 | 1.9  | 15.0 | 1.7  | 12.0 | 1.6  | 9.3  | 1.3 | 10.1 | 1.5  |     |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |  |  |  |  |
| 11                 | 12.6       | 1.1  | 13.2 | 2.0  | 15.0 | 2.2  | 12.0 | 1.5  | 8.0  | 1.1 | 10.7 | 1.0  |     |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |  |  |  |  |
| 12                 | 11.7       | 1.4  | 13.9 | 1.7  | 15.4 | 1.5  | 12.5 | 1.1  | 9.4  | 1.1 | 9.9  | 1.5  |     |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |  |  |  |  |
| 13                 | 12.4       | 1.5  | 13.8 | 1.5  | 15.9 | 1.8  | 12.6 | 1.3  | 10.1 | 1.3 | 12.3 | 1.4  |     |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |  |  |  |  |
| 14                 | 13.2       | 1.5  | 14.9 | 1.9  | 17.9 | 1.5  | 12.3 | 1.4  | 10.5 | 1.5 | 11.0 | 1.1  |     |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |  |  |  |  |
| 15                 | 12.3       | 1.5  | 14.0 | 0.8  | 16.9 | 2.4  | 13.8 | 0.9  | 9.0  | 0.9 | 11.7 | 1.7  |     |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |  |  |  |  |
| 16                 | 14.0       | 2.0  | 14.5 | 1.8  | 16.0 | 2.0  | 12.7 | 1.4  | 9.9  | 1.2 | 11.0 | 1.3  |     |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |  |  |  |  |
| 17                 | 12.9       | 1.5  | 14.0 | 1.5  | 16.9 | 1.5  | 13.0 | 2.0  | 9.6  | 1.7 | 10.4 | 1.6  |     |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |  |  |  |  |
| 18                 | 13.4       | 1.6  | 15.0 | 1.7  | 17.2 | 1.7  | 12.8 | 2.3  | 9.0  | 1.2 | 12.4 | 1.8  |     |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |  |  |  |  |
| 19                 | 13.3       | 1.5  | 15.0 | 1.5  | 16.3 | 1.5  | 11.6 | 2.1  | 8.2  | 1.8 | 10.9 | 2.0  |     |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |  |  |  |  |
| 20                 | 14.5       | 1.0  | 14.5 | 1.1  | 16.9 | 1.7  | 11.8 | 2.0  | 10.3 | 1.5 | 11.6 | 1.9  |     |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |  |  |  |  |
| 21                 | 12.0       | 1.5  | 14.9 | 1.3  | 17.6 | 1.3  | 13.3 | 1.8  | 9.9  | 1.4 | 11.7 | 1.8  |     |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |  |  |  |  |
| 22                 | 14.2       | 1.5  | 14.0 | 1.9  | 17.0 | 1.9  | 14.1 | 2.0  | 11.1 | 1.9 | 12.5 | 2.1  |     |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |  |  |  |  |
| 23                 | 15.5       | 1.7  | 17.2 | 2.0  | 18.5 | 1.9  | 13.3 | 1.5  | 9.8  | 1.2 | 11.6 | 1.5  |     |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |  |  |  |  |
| 24                 | 13.6       | 2.0  | 15.0 | 1.5  | 18.0 | 1.9  | 13.3 | 1.6  | 9.9  | 1.2 | 9.9  | 1.2  |     |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |  |  |  |  |
| 1                  | 14.6       | 1.7  | 16.0 | 1.5  | 17.3 | 1.8  | 12.9 | 1.9  | 9.8  | 1.4 | 10.8 | 1.4  |     |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |  |  |  |  |
| 2                  | 14.5       | 1.9  | 15.0 | 0.6  | 18.4 | 1.6  | 11.8 | 1.7  | 10.0 | 1.4 | 11.6 | 1.5  |     |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |  |  |  |  |
| 3                  | 15.0       | 2.2  | 15.4 | 2.0  | 17.0 | 1.6  | 13.8 | 1.2  | 10.4 | 1.5 | 11.5 | 1.1  |     |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |  |  |  |  |
| 4                  | 14.5       | 2.0  | 16.2 | 1.3  | 18.8 | 1.9  | 13.0 | 0.9  | 10.5 | 1.4 | 12.1 | 1.2  |     |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |  |  |  |  |
| 5                  | 15.0       | 1.6  | 15.9 | 2.0  | 18.6 | 1.8  | 13.0 | 1.4  | 9.0  | 1.0 | 11.0 | 1.5  |     |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |  |  |  |  |
| 6                  | 14.7       | 2.1  | 15.9 | 1.7  | 17.7 | 1.9  | 13.9 | 1.5  | 9.8  | 1.2 | 12.4 | 1.5  |     |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |  |  |  |  |
| 7                  | 16.0       | 1.7  | 15.7 | 1.5  | 18.9 | 2.0  | 13.8 | 1.6  | 10.4 | 1.1 | 12.4 | 1.6  |     |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |  |  |  |  |
| Среднее за 24 часа | 13.7       | 1.6  | 14.8 | 1.5  | 16.9 | 1.7  | 12.9 | 1.5  | 9.6  | 1.3 | 11.3 | 1.5  |     |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |   |  |  |  |  |  |

эту маленькую операцию крайне легко. В промежутках между взятием крови кошки в большинстве случаев лежали и дремали. За один прием также обрабатывалось три животных. Время от момента взятия крови до помещения ее в термостат и водяную баню то же, что и для кроликов.

Суточная изменчивость показателей каталазы и протеазы для бывших в опыте кошек выражается в следующем виде (табл. стр. 548).

Если мы обратим внимание на пределы колебаний показателей каталазы и протеазы, то для бывших в нашем опыте кошек они будут таковы (табл. 4).

Таблица 4

| № кошки | Средняя суточная |     | Колебания в % от средней суточной |    |    |    |
|---------|------------------|-----|-----------------------------------|----|----|----|
|         | К                | П   | К                                 |    | П  |    |
|         |                  |     | +                                 | -  | +  | -  |
| 1       | 13.7             | 1.6 | 17                                | 14 | 38 | 36 |
| 2       | 14.8             | 1.5 | 16                                | 11 | 31 | 61 |
| 3       | 16.9             | 1.7 | 12                                | 18 | 38 | 70 |
| 4       | 12.9             | 1.5 | 9                                 | 10 | 49 | 45 |
| 5       | 9.6              | 1.3 | 15                                | 16 | 46 | 46 |
| 6       | 11.3             | 1.5 | 10                                | 13 | 41 | 32 |

Мы отмечаем, что амплитуда колебаний для каталазы лежит в границах 9—17% (+) и 10—18% (-), протеаза же испытывает большие колебания, именно 31—49% (+) и 32—70% (-).

#### Опыты на человеке

Всего проведено пять наблюдений (одно суточное и четыре по 8 часов). Понятно, что экспериментирование на человеке, представляя для нас особое значение и интерес, в то же время сопряжено с большими затруднениями, чем на животных. Суточное наблюдение выполнено одним из авторов на самом себе. Режим почти тот же, что и для животных: воздержание от пищи за 12 часов до опыта и лишение ее в течение первых 8 часов опыта. Кровь бралась уколом булавки в концевые фаланги 3 и 4-го пальцев левой руки, причем первые 8 раз кровь взята из 3-го пальца, 9, 10, 13, и 14-е определения произведены с кровью 4-го пальца, в остальных же случаях уколы были в мякоть 3-го пальца. Это, пожалуй, не безразлично, если принять во внимание литературные данные о неравномерном распределении ферментов по отдельным сосудам кровяного русла.

Результаты суточного определения для показателей каталазы и протеазы приведены в табл. 5.

Как видно из таблицы, амплитуда отклонений от средней суточной для показателей каталазы +13% и -9% в общем немногим различается от амплитуды колебаний, наблюдаемой у кошек; колебания же протеазы +107% и -51% вдвое превосходят наблюдаемые у кошек.

Следует обратить внимание и на обстановку опыта: эксперимент на самом себе при одновременной работе с животными, сосредоточение внимания в одном направлении, быстрота манипулирования при необходимости соблюдения крайней точности и работа в течение 26 часов без сна и отдыха с известным лишением пищи, естественно, могут так или иначе

Таблица 5

| Время<br>(в часах) | К    | П   | Время<br>(в часах) | К    | П   |
|--------------------|------|-----|--------------------|------|-----|
| 8                  | 15.9 | 1.0 | 20                 | 13.5 | 1.8 |
| 9                  | 16.5 | 1.0 | 21                 | 14.1 | 1.6 |
| 10                 | 15.5 | 1.3 | 22                 | 14.1 | 1.1 |
| 11                 | 15.0 | 2.2 | 23                 | 15.0 | 1.2 |
| 12                 | 14.6 | 1.2 | 24                 | 14.2 | 1.8 |
| 13                 | 15.0 | 0.8 | 1                  | 14.1 | 1.5 |
| 14                 | 14.5 | 1.3 | 2                  | 13.5 | 0.9 |
| 15                 | 14.5 | 0.9 | 3                  | 15.0 | 0.9 |
| 16                 | 15.0 | 1.2 | 4                  | 14.0 | 0.9 |
| 17                 | 14.0 | 0.8 | 5                  | 14.1 | 1.0 |
| 18                 | 14.0 | 1.3 | 6                  | 14.4 | 0.8 |
| 19                 | 13.3 | 2.5 | 7                  | 16.4 | 0.6 |
| Среднее за сутки   |      |     |                    | 14.6 | 1.2 |

отразиться на ферментных показателях крови. Один из авторов произвел на себе 8-часовой опыт (№ 4 табл. 6) в более нормальных условиях, и в этом случае при больших показателях каталазы и протеазы пределы колебаний ферментных показателей крови несколько меньше.

8-часовые наблюдения выполнены над работающим в Институте персоналом. Цифровые данные представлены в табл. 6.

Таблица 6

| № наблюдений       | Д-р Э. |     | Д-р З. |     | Д-р Г. |     | Д-р И. |     |
|--------------------|--------|-----|--------|-----|--------|-----|--------|-----|
|                    | К      | П   | К      | П   | К      | П   | К      | П   |
| 1                  | 18.8   | 1.1 | 18.9   | 1.0 | 17.5   | 1.6 | 17.3   | 1.5 |
| 2                  | 18.5   | 1.4 | 18.6   | 0.9 | 16.0   | 1.4 | 17.3   | 0.9 |
| 3                  | 19.0   | 1.2 | 19.3   | 1.0 | 18.0   | 1.7 | 17.0   | 1.6 |
| 4                  | 19.0   | 1.0 | 18.0   | 1.7 | 16.5   | 1.2 | 17.2   | 1.2 |
| 5                  | 17.8   | 2.1 | 17.5   | 2.2 | 16.6   | 2.9 | 16.9   | 2.2 |
| 6                  | 18.9   | 1.5 | 18.4   | 1.5 | 16.1   | 2.2 | 16.0   | 2.1 |
| 7                  | 19.2   | 1.5 | 18.6   | 1.7 | 15.2   | 1.5 | 15.3   | 1.7 |
| 8                  | 19.0   | 2.0 | 18.4   | 2.1 | 16.0   | 1.0 | 17.2   | 1.5 |
| Среднее за 8 часов | 18.8   | 1.5 | 18.4   | 1.5 | 16.5   | 1.7 | 16.7   | 1.6 |

Следует упомянуть, что при этих исследованиях объекты их находились в отношении работы в своих обычных условиях.

Что касается амплитуды колебаний ферментных показателей крови у человека, то в наших случаях она такова (табл. 7 стр. 550).

Конечно, подобно тому как «настоящие показатели могут быть установлены только на основании многих определений», так и приводимый нами в данной работе цифровой материал может быть рассматриваем только как отдельный кирпич в том здании, которое еще находится в процессе построения.

Мы считаем нелишним опубликовать свои наблюдения еще по той причине, что новая методика была применена в ряде работ по изучению ферментных показателей крови в патологических случаях. Но раньше чем

Таблица 7

|        | Средняя<br>суточная |     | Колебания в % от средней суточной |     |    |    |
|--------|---------------------|-----|-----------------------------------|-----|----|----|
|        | К                   | П   | К                                 |     | П  |    |
|        |                     |     | +                                 | -   | +  | -  |
| Д-р Э. | 18.8                | 1.5 | 2.6                               | 5.0 | 43 | 31 |
| Д-р З. | 18.4                | 1.5 | 4.0                               | 5.0 | 45 | 44 |
| Д-р Г. | 16.5                | 1.7 | 9.0                               | 8.0 | 72 | 39 |
| Д-р И. | 16.7                | 1.6 | 3.4                               | 8.7 | 40 | 40 |

говорить о патологических изменениях ферментных показателей, следует иметь в виду физиологические колебания их. Так, Богословский<sup>3</sup> в своих наблюдениях над больными малярией отмечает в периоде приступа «непостоянство в содержании протеазы: в части случаев она повышалась, в другой — представлялась уменьшенной». Колебания налицо, однако автор статьи считает показательными для болезненного процесса такие цифры, которые, возможно, должны уложиться в пределы нормальных колебаний.

В основу нашей работы легли наблюдения над 12 животными (шесть кроликов и шесть кошек) и пятью людьми. Всего было произведено 13 полных суточных определений показателей каталазы и протеазы, 18 полу-суточных и четыре определения 8-часовых. Все эти наблюдения, как и более ранние опыты, не приводимые здесь, согласно указывают на то, что ферментные показатели крови в течение суток испытывают значительные колебания, которые выходят весьма далеко за пределы ошибок опыта.

Следует отметить, что методика определения показателя протеазы через ослабление действия каталазы при стоянии в термостате (воздействие протеазы на каталазу) подверглась критике. Так, Дитрих и Головачева<sup>4</sup> не вполне уверены, что определяется именно протеаза. Они говорят, что возможно и то, что мы наблюдаем лишь ослабление каталазы, поставленной в неблагоприятные условия. Степун и Тимофеева<sup>5</sup> отказываются вовсе от определения протеазы по способу Баха, так как не считают «вопрос определения протеазы мерой потери каталазной способности крови вполне разрешенным».

Этот вопрос в процессе работы возникал и у нас. Однако, производя наблюдение одновременно над тремя животными или двумя людьми, мы обратили внимание на такие обстоятельства, которые вполне оправдывают определение показателя по новому способу. Это, во-первых, то, что в процессе наблюдения каждая кровь ведет себя индивидуально. Если мы обратимся к таблицам ферментных показателей, то заметим, что при одних и тех же условиях опыта (время взятия крови, температурные границы водяной бани и термостата и пр.) одна проба дает повышение протеолитического показателя, другая остается без изменения в этом отношении или обнаруживает падение протеазы. Трудно допустить, что для каталазы одной крови в аналогичных условиях создаются те «неблагоприятные для ее действия» факторы, которые отсутствуют для другой каталазы в этот же час. Во-вторых, обращает на себя внимание нередкий факт, что при одинаковом в течение двух смежных часов показателе каталазы у одного и того же животного показатель протеазы значительно разнится в те же часы. То же следует сказать и про совпадение показателей каталазы в раз-

ные часы того же дня и про значительную разницу в показателях протеазы за те же часы у подоытных животных и человека.

Для иллюстрации последнего положения приводим табл. 8.

Таблица 8

| Объект             | Часы наблюдений | Показатели |       | Примечание  |
|--------------------|-----------------|------------|-------|-------------|
|                    |                 | К          | П     |             |
| Кролик № 4 . . . { | 4               | 14.110     | 1.105 | См. табл. 1 |
|                    | 5               | 14.110     | 1.785 |             |
| Кролик № 6 . . . { | 3               | 14.875     | 1.870 | » » 1       |
|                    | 4               | 14.875     | 1.190 |             |
| Кошка № 2 . . . {  | 8               | 13.940     | 0.765 | » » 3       |
|                    | 10              | 13.940     | 1.530 |             |
| Кошка № 3 . . . {  | 6               | 16.660     | 0.680 | » » 3       |
|                    | 7               | 16.660     | 2.295 |             |
| Кошка № 4 . . . {  | 21              | 13.005     | 0.935 | » » 3       |
|                    | 22              | 13.005     | 1.445 |             |
| Кошка № 5 . . . {  | 6               | 9.520      | 1.190 | » » 3       |
|                    | 7               | 9.520      | 0.680 |             |
| Д-р Г. . . . . {   | 4               | 16.490     | 1.190 | » » 6       |
|                    | 5               | 16.660     | 2.890 |             |
| Д-р И. . . . . {   | 4               | 17.170     | 1.190 | » » 6       |
|                    | 5               | 16.910     | 2.210 |             |

Все эти факты, по нашему мнению, можно объяснить только непостоянной концентрацией протеазы в крови или же изменением активности этого фермента в известные моменты под влиянием тех или иных условий.

Самый факт колебаний ферментных показателей крови и отмечаемая волнообразность кривых еще не поддаются точному объяснению.

Вообще затронутая нами тема возбуждает сама по себе ряд вопросов, и дело будущих исследований и исследователей внести свои дополнения в эту полную научного интереса область энзимологии.

### ВЫВОДЫ

I. Показатели каталазы и протеазы крови животных (кролик и кошка) и человека представляют изменяющуюся в течение суток величину.

II. Суточная кривая каталазы допускает колебания от средней суточной ее величины для кроликов в среднем до 30% в обе стороны, для кошек до 17—18% в обе стороны, для человека между +13% и -9%.

Колебания протеазы имеют более резкий характер и простираются до 100% в обе стороны от средней суточной величины. Эти цифры предварительные и требуют еще многочисленных наблюдений.

III. При изучении ферментных показателей крови как в физиологических, так и в патологических условиях состояния животного организма следует иметь в виду эту суточную изменимость показателей.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бах и Зубкова. Сб. работ по чистой и прикл. химии, **1**, 65 (1923), Biochem. Zs., **125**, 283 (1924); настоящая книга, стр. 537.
2. Jobling, Eggstein a. Petersen. Exr. Med., **21**, 241 (1915).
3. Богословский. Юго-вост. вестн. здравсохр., № 7—8, 37—39 (1922).
4. Дитрих и Головачева. Мед. журн., № 8—9, 506 (1921).
5. Степун и Тимофеева. Арх. клин. и эксл. мед., № 1—2, 37 (1923).

## Сообщение III

## ПОКАЗАТЕЛЬ КАТАЛАЗЫ КРОВИ ТИРОИДОЭКТОМИРОВАННЫХ КОЗ

[Die Katalasezahl des Blutes thyreoidektomierter Ziegen] \*

(Совместно с Е. Херасковой)

Нам представился случай провести некоторые ориентировочные опыты по определению ферментных показателей крови тироидэктомированных коз. Эти козы принадлежали «ферме тироидэктомированных коз», которая снабжает различные лечебные учреждения Москвы «терапевтически активным» молоком. Для нашего исследования нам было предоставлено пять нормальных и семь оперированных животных. Первые же определения дали чрезвычайно низкие значения показателя каталазы как для нормальных, так и для тироидэктомированных коз. Мы удвоили концентрацию крови (т. е. 1 на 500 вместо 1 на 1000), но и после этого показатели пероксидазы, протеазы и эстеразы были настолько малы, что их нельзя было считать надежными. Мы поэтому ограничились определением показателей каталазы; опыты производились по описанному ранее методу ежедневно на всех животных в течение 10 дней. Полученные данные приведены в нижеследующих таблицах.

## Показатели каталазы

| Опыты   | Нормальные козы |      |      |      |      |
|---------|-----------------|------|------|------|------|
|         | 1               | 2    | 3    | 4    | 5    |
| 1       | 3.60            | 3.60 | 8.37 | 8.87 | 3.46 |
| 2       | 3.95            | 4.02 | 8.20 | 8.87 | 3.35 |
| 3       | 3.49            | 4.10 | 7.79 | 8.62 | 2.84 |
| 4       | 3.68            | 3.49 | 7.20 | 8.60 | 3.01 |
| 5       | 3.68            | 4.85 | 8.19 | 7.70 | 3.62 |
| 6       | 4.35            | 4.85 | 7.20 | 8.68 | 2.67 |
| 7       | 4.35            | 3.95 | —    | 7.95 | 3.68 |
| 8       | 4.10            | 3.95 | 7.70 | 8.70 | 3.85 |
| 9       | 4.35            | 3.35 | —    | 7.53 | 3.68 |
| 10      | 3.90            | 3.51 | 7.68 | 7.87 | 3.18 |
| Среднее | 3.95            | 3.99 | 7.78 | 8.11 | 3.33 |

\* Biochem. Zs., **148**, 474 (1924).



*Показатели каталазы*

| Опыты       | Тироидоэктомированные козы |      |      |      |      |       |      |
|-------------|----------------------------|------|------|------|------|-------|------|
|             | 1                          | 2    | 3    | 4    | 5    | 6     | 7    |
| 1           | 4.46                       | 6.19 | 6.13 | 2.84 | 4.02 | 9.97  | 5.28 |
| 2           | 4.10                       | 7.79 | 5.52 | 2.75 | 4.19 | 8.56  | 6.19 |
| 3           | 3.95                       | 6.02 | 5.01 | 2.68 | 3.85 | 9.79  | 6.36 |
| 4           | 3.93                       | 5.36 | 4.10 | 3.01 | 4.27 | 10.10 | 6.19 |
| 5           | 5.19                       | 5.27 | 4.46 | 2.76 | 3.68 | 10.04 | 6.19 |
| 6           | 4.59                       | 6.86 | 4.52 | 2.27 | 3.16 | 7.23  | 4.77 |
| 7           | 4.69                       | 5.02 | —    | 2.34 | 3.68 | 7.03  | 3.68 |
| 8           | 5.02                       | 6.03 | 4.69 | 2.85 | 4.86 | 8.12  | 3.28 |
| 9           | 4.52                       | 6.13 | 4.19 | 2.93 | 3.89 | 9.71  | 6.01 |
| 10          | 4.10                       | 5.86 | 4.69 | 2.85 | 3.68 | 9.71  | 5.10 |
| Среднее . . | 4.45                       | 6.05 | 4.81 | 2.75 | 3.92 | 9.18  | 5.31 |

Из этих таблиц видно, что по отношению к показателю каталазы тироидоэктомированные козы не более отличаются от нормальных, чем последние между собою. Тироидоэктомия, повидимому, не оказывает никакого влияния на показатель каталазы.

---

## О ЗАВИСИМОСТИ ХИМИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ ОТ ХАРАКТЕРА СРЕДЫ

### Сообщение I

#### О МНИМЫХ АУКСО- И АНТИФЕРМЕНТНЫХ СВОЙСТВАХ КРОВЯНОЙ СЫВОРОТКИ \*

(Совместно с В. И. Збарским и К. А. Николаевым)

В ряде сообщений Бах<sup>1</sup> показал, что давно известное свойство растительных и животных тканей восстанавливать красящие вещества в лейкоформы, нитраты в нитриты и т. д. обусловливается совместным действием двух факторов — фермента и кофермента, из которых каждый в отдельности никакого восстановительного действия не оказывает. Фермент, известный под названием салицилазы, альдегидазы, оксидоредуктазы, альдегидкаталазы, редуктазы, энзима Шардингера, альдегидмутаза, пергидридазы, дегидрогеназы, дисмутаза, оксигидраза, находится в свежем молоке отдельно от своего кофермента. Последний извлекается из тканей кипящей водой и может быть заменен в качестве кофермента альдегидами. Он представляет собой смесь различных продуктов распада белка, и его способность заменяться альдегидом объясняется тем, что образующиеся кетосоединения и аминокислоты дают по реакции Штрекера альдегиды. Так как неизмененные белки не являются коферментом пергидридазы\*\*, то было интересно установить, в какой стадии расщепления белка возникают продукты, образующие вместе с ферментом восстановительную систему.

Для этой цели чистый серумальбумин (Кальбаум) был подвергнут гидролизу серной кислотой; пробы, которые брались из смеси через определенные промежутки времени, точно нейтрализовались чистой содой и прибавлялись к свежему молоку вместе с нитратом натрия по вышеописанному способу. Смесь ставилась в термостат при 60° на полчаса, затем обрабатывалась основным уксуснокислым свинцом и исследовалась на содержание нитрита.

Оказалось, что в противоположность ферментативному гидролизу при гидролизе кислотами не получается продуктов, могущих играть роль кофермента пергидридазы. Можно было предполагать, что при кислотном

---

\* Сб. работ по чистой и прикл. химии.— Тр. Хим. ин-та им. Л. Я. Карпова, 2, 3 (1924).

\*\* Пока не установлена номенклатура данного фермента, мы будем пользоваться обозначением «пергидридаза».

гидролизе возникают вещества, тормозящие работу фермента. Однако, к нашему удивлению, произведенные опыты показали, что указанные продукты распада не тормозят, а активируют действие пергидридазы.

Для опыта смесь из 2 см<sup>3</sup> молока 0.25 г нитрата натрия, 0.0025 г уксусного альдегида и 1 см<sup>3</sup> нейтрализованного гидролизата была поставлена в термостат на 30 минут при 60°; затем после прибавления 1 см<sup>3</sup> насыщенного раствора уксуснокислого свинца жидкость фильтровалась через сухой фильтр, 3 см<sup>3</sup> прозрачного фильтрата смешивались с реактивом Илосвей-Лунге и содержание нитрита определялось колориметрическим способом. Одновременно производились контрольные опыты со свежим молоком, нитратом и уксусным альдегидом, но без гидролизата, а также с кипяченым молоком, нитратом, альдегидом и гидролизатом.

*Результаты опыта в мг N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>*

| Без гидролизата | С гидролизатом | Кипяченое молоко<br>с гидролизатом |
|-----------------|----------------|------------------------------------|
| 0.0218          | 0.0562         | 0                                  |

Так как для гидролиза мы употребляли серумальбумин, то нам было интересно установить, обладает ли активирующими свойствами кровяная сыворотка. Оказалось, что это действительно так.

Опыты были поставлены, как и прежде, но с 1 см<sup>3</sup> сыворотки (от козы) вместо гидролизата.

*Результаты опыта в мг N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>*

| Уксусный альдегид<br>без сыворотки | Сыворотка без уксусного<br>альдегида | Сыворотка и уксусный<br>альдегид |
|------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|
| 0.0285                             | 0                                    | 0.0923                           |

Аналогичные результаты получились с сывороткой от морских свинок, кроликов и лошадей. Несомненно, здесь мы имеем дело с новым свойством нормальной сыворотки. При просмотре новой литературы, поступившей после долгого перерыва, мы нашли работы Якоби и Фалька<sup>2</sup>, Якоби и Умеди<sup>3</sup>, Рона и Гьорги<sup>4</sup> и Якоби<sup>5</sup>, которые занимались изучением активирующего влияния сыворотки млекопитающих животных на действие уреазы. Якоби и Фальк предположили, что это активирующее свойство зависит от присутствия в сыворотке определенного вещества, которое они назвали «ауксоуреазой». По их мнению, вещество обладает специфичностью. Первоначально Рона<sup>6</sup> высказал предположение, что активирующее действие сыворотки на уреазу зависит от ее буферных свойств; но позднее Рона и Гьорги нашли, что сыворотка при продолжительном действии активирует уреазу также и в буферных растворах. На основании только что приведенных данных, наблюдение, сделанное нами, можно было объяснить тем, что в нормальной сыворотке находится вещество, активирующее пергидридазу (ауксопергидридаза). Но, в соответствии с первоначальным предположением Рона, мы думаем, что в данном случае дело сводится главным образом к изменению реакции опытной жидкости, вызванному прибавлением сыворотки. Чтобы выяснить этот вопрос, мы поставили опыты с молоком, нитратом, уксусным альдегидом и сывороткой в буферных растворах, но не получили удовлетворительных результатов, так как при последующем осаждении основным уксуснокислым свинцом и фильтровании получались мутные коллоидальные жидкости, непригодные для колориметрического определения. Поэтому мы избрали другой путь.

Как известно, окислительный фермент фенолаза или система «пероксидаза — перекись водорода» действуют на ряд веществ, для которых общим признаком является присутствие в молекуле подвижного водорода. Указанным окислителем одни из этих веществ окисляются предпочтительно при слабокислой, другие — при слабощелочной реакции. Таким образом, если действие сыворотки зависит от ее способности связывать ионы водорода, то, в зависимости от природы вещества, в реакции с фенолазой сыворотка будет обнаруживать то активирующие (ауксоферментативные), то тормозящие (антиферментативные) свойства. Напротив того, в буферных растворах сыворотка не окажет никакого влияния на ход окисления, независимо от природы самого вещества. Эти предположения вполне подтвердились.

Опыты производились с гваяколом, парафенилендиамином, бензидином, пирогаллолом, гидрохиноном и орцином. Для окисления первых трех веществ наиболее благоприятной является слабокислая реакция, для окисления трех последних — слабощелочная<sup>7</sup>. Раствор фенолазы, которым мы пользовались, был получен из грибов *Lactarius vellereus*. Активность препарата была такова, что 10 см<sup>3</sup> раствора фермента, будучи смешаны с 40 см<sup>3</sup> 2.5% раствора пирогаллола и оставлены на воздухе в течение 24 часов, дали 0.046 г пурпурогалина.

#### Опыты с гваяколом

Влияние сыворотки на окисление гваякола кислородом воздуха в присутствии фенолазы было изучено при помощи колориметрического метода, разработанного Бахом и Зубковой<sup>8</sup>. Концентрация реагирующих веществ была такова, что во время опыта получались только растворимые окрашенные продукты окисления. Для опыта в колориметрических трубках смешивались 1 см<sup>3</sup> 0.1%-ного раствора гваякола, 0.5 см<sup>3</sup> раствора фенолазы, 0.5 или 1 см<sup>3</sup> лошадиной сыворотки и затем все доводилось водой до 10 см<sup>3</sup>. Смесь хорошо взбалтывалась и сравнивалась в колориметре с пробирками шкалы, причем отмечалось время, протекшее до того момента, когда окраска опытной жидкости и той или иной трубки шкалы делалась одинаковой. Одновременно с этим производился опыт с тем же раствором в присутствии буфера, но без прибавления сыворотки. Буфер приготавлился по Михаэлису:

$$[H^+] = 1 \cdot 10^{-7}$$

| Шкала                     | № 1   | № 2   | № 3   | № 4   | № 5   | № 6   | № 7   | № 8   |
|---------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Окисленный гваякол (в мг) | 0.042 | 0.079 | 0.117 | 0.161 | 0.198 | 0.235 | 0.280 | 0.320 |

|                               | Время (в минутах) |       |     |     |     |     |     |     |
|-------------------------------|-------------------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                               | № 1               | № 2   | № 3 | № 4 | № 5 | № 6 | № 7 | № 8 |
| Без прибавления сыворотки     | 9.5               | 13.0  | 17  | 26  | 41  | 60  | 78  | 96  |
| 0.5 см <sup>3</sup> сыворотки | 16.0              | 81.0  | —   | —   | —   | —   | —   | —   |
| 1 » »                         | 18.0              | 103.0 | —   | —   | —   | —   | —   | —   |
| 1 » » с буфером               | 10.0              | 14.5  | 19  | 28  | 43  | 64  | 79  | 99  |

Следовательно, сыворотка в количестве от 0.5 до 1 см<sup>3</sup> значительно замедляет окисление гваякола посредством фенолазы и останавливает реакцию, после того как окислилась  $\frac{1}{12}$  часть имеющегося вещества. В растворе с буфером реакция протекает так же, как и в отсутствии сыворотки.

### Опыты с парафенилендиамином

При окислении *p*-фенилендиамина фиолетовые продукты окисления получаются только в кислой среде. Увеличение количества кислоты влечет за собою усиление фиолетового окрашивания и притом до известного максимума, соответствующего отношению: *p*-фенилендиамин:кислота = 1 экв.:0.5 экв.<sup>9</sup>. В нейтральном или слабощелочном растворе образуются продукты, окрашенные в желто-коричневый цвет. Опыты с окислением посредством фенолазы в присутствии сыворотки производились только качественно, вследствие значительного различия в окраске продуктов реакции в присутствии или отсутствии кислоты.

Если в пробирке смешать 1 см<sup>3</sup> 0.01 *N* раствора *p*-фенилендиамина, 0.5 см<sup>3</sup> 0.01 *N* соляной кислоты, 0.5 см<sup>3</sup> раствора фенолазы, 1.0 см<sup>3</sup> лошадиной сыворотки и все дополнить водою до 10 см<sup>3</sup>, то смесь постепенно принимает желто-коричневую окраску, но и после долгого стояния на воздухе нет даже и следов фиолетового окрашивания. Одновременно поставленная контрольная проба без сыворотки становится через короткое время интенсивно фиолетовой. Если вместо 1 см<sup>3</sup> сыворотки брать 0.5 см<sup>3</sup>, то смесь сейчас же принимает и коричнево-желтую и фиолетовую окраску. Если сыворотки взять 0.25 см<sup>3</sup>, то фиолетовое окрашивание становится более отчетливым. Ясно, что в данном случае прибавленная сыворотка потому задерживает образование фиолетового продукта, что она связывает необходимые для его образования водородные ионы. Если к опытной смеси, окрашенной в коричнево-желтый цвет, прибавлять осторожно кислоту, то получается чисто фиолетовый раствор.

### Опыты с бензидином

Аналогичные результаты получены в опытах с бензидином и соляной кислотой: темноголубое окрашивание в контрольной пробе, желто-коричневое в присутствии 1 см<sup>3</sup> лошадиной сыворотки, голубое с коричневым оттенком при прибавлении незначительных количеств сыворотки; в буферных растворах — нормальное голубое окрашивание.

### Опыты с пирогаллолом

Для опытов в каждую из пяти колориметрических трубок было налито по 1 см<sup>3</sup> 0.01 *N* раствора пирогаллола, 0.5 см<sup>3</sup> раствора фенолазы, 0.25 см<sup>3</sup> лошадиной сыворотки и в заключение все было доведено водою до 10 см<sup>3</sup>. Одновременно с этим был поставлен контрольный опыт без сыворотки. Через короткое время проба с сывороткой показала более интенсивное коричнево-желтое окрашивание, чем контрольная проба без сыворотки. Через 15 минут к пробе с сывороткой было прибавлено из бюретки столько воды, чтобы цвет жидкостей в опытной и контрольной пробках стал одинаковым. На основании объемных отношений вычислялась сравнительная интенсивность окрашивания (отношение контрольной пробки к пробе с сывороткой). Через 30 минут аналогичное определение было произведено с другой пробой с сывороткой. Точно таким же образом были произведены опыты с 0.5 и 1 см<sup>3</sup> сыворотки. Полученные результаты приведены в таблице на стр. 558.

В растворах с буфером прибавление сыворотки практически не оказывает влияния на окисление пирогаллола. В отсутствие фенолазы прибавление сыворотки не оказывает заметного влияния на окисление пирогаллола кислородом воздуха.

| Время<br>(в минутах) | Контрольная проба: проба с сывороткой |                                  |                                |
|----------------------|---------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
|                      | 0.25 см <sup>3</sup><br>сыворотки     | 0.5 см <sup>3</sup><br>сыворотки | 1 см <sup>3</sup><br>сыворотки |
| 15                   | 1 : 1.30                              | 1 : 1.60                         | 1 : 1.80                       |
| 30                   | 1 : 1.35                              | 1 : 1.65                         | 1 : 1.75                       |
| 45                   | 1 : 1.30                              | 1 : 1.70                         | 1 : 1.80                       |
| 60                   | 1 : 1.35                              | 1 : 1.70                         | 1 : 1.95                       |
| 90                   | 1 : 1.40                              | 1 : 1.60                         | 1 : 1.80                       |

#### Опыты с гидрохиноном

Каждая из шести колориметрических трубок заполнялась 1 см<sup>3</sup> 0.01 N раствора гидрохинона, 0.25 см<sup>3</sup> лошадиной сыворотки, 0.5 см<sup>3</sup> раствора фенолазы; затем все доводилось до 10 см<sup>3</sup>. Контрольная проба без сыворотки.

Кроме того, были еще поставлены опыты с 0.5 и 1 см<sup>3</sup> сыворотки.

| Время<br>(в минутах) | Контрольная проба: проба с сывороткой |                                  |                                |
|----------------------|---------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
|                      | 0.25 см <sup>3</sup><br>сыворотки     | 0.5 см <sup>3</sup><br>сыворотки | 1 см <sup>3</sup><br>сыворотки |
| 15                   | —                                     | 1 : 1.25                         | 1 : 1.60                       |
| 30                   | 1 : 1.15                              | 1 : 1.30                         | 1 : 1.65                       |
| 45                   | 1 : 1.15                              | 1 : 1.35                         | 1 : 1.60                       |
| 60                   | 1 : 1.10                              | 1 : 1.30                         | 1 : 1.60                       |
| 90                   | 1 : 1.20                              | 1 : 1.35                         | 1 : 1.60                       |
| 120                  | 1 : 1.20                              | 1 : 1.40                         | 1 : 1.65                       |

#### Опыты с ордином

Порядок предыдущий.

| Время<br>(в минутах) | Контрольная проба: проба с сывороткой |                                  |                                |
|----------------------|---------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
|                      | 0.25 см <sup>3</sup><br>сыворотки     | 0.5 см <sup>3</sup><br>сыворотки | 1 см <sup>3</sup><br>сыворотки |
| 15                   | —                                     | 1 : 1.25                         | 1 : 1.50                       |
| 30                   | 1 : 1.10                              | 1 : 1.30                         | 1 : 1.55                       |
| 45                   | 1 : 1.15                              | 1 : 1.25                         | 1 : 1.50                       |
| 60                   | 1 : 1.10                              | 1 : 1.25                         | 1 : 1.55                       |
| 90                   | 1 : 1.10                              | 1 : 1.30                         | 1 : 1.50                       |
| 120                  | 1 : 1.10                              | 1 : 1.30                         | 1 : 1.55                       |

Дальнейшими опытами, на описании которых мы здесь не будем останавливаться, было установлено, что чистые препараты серумальбумина, овальбумина и казеина, подобно нормальной сыворотке, активизируют действие как пергидридазы, так и фенолазы. Анало-

гичное наблюдение было сделано Якоби и его сотрудниками относительно действия уреазы.

### РЕЗЮМЕ

Из всего вышесказанного можно вывести следующее.

Нормальная сыворотка млекопитающих, которая активизирует действие пергидридазы и уреазы, то тормозит, то активизирует окислительное действие фенолазы, смотря по тому, лежит ли оптимум окисления взятого вещества при щелочной или кислой реакции. При употреблении буферного раствора или осторожной нейтрализации кислоты исчезает как активизирующее, так и тормозящее действие сыворотки. Из этого следует, что применительно к фенолазе речь может идти не о каких-либо ауко- или анти-веществах, содержащихся в сыворотке, а о свойстве последней связывать ионы водорода и тем изменять характер среды, в которой протекает реакция. При этом новые условия могут быть благоприятны для окисления одних субстратов и неблагоприятны для других. Тот факт, что на действие названных трех ферментов различные белковые вещества оказывают такое же влияние, как и сыворотка, тоже указывает на то, что здесь мы не имеем дело с какими-либо специфическими ауковеществами.

При исследовании влияния сыворотки на действие ферментов следует дальше считаться с ее солевым содержанием, так как известно, что соли играют огромную роль в ферментных реакциях. Наконец, необходимо не упускать из вида и физические свойства сыворотки. С прибавлением сыворотки хотя бы в минимальных количествах в реакционной смеси вызываются явления адсорбции, в результате которых существующие условия могут измениться в благоприятном или неблагоприятном для данной реакции направлении, т. е. может получиться видимость ауко- или антиферментных свойств. Поэтому раньше чем прибегнуть к гипотезе существования ауко- или антиферментных веществ, безусловно необходимо учесть влияние указанных трех факторов: буферных свойств сыворотки, ее солевого содержания и ее коллоидной структуры.

октябрь 1922 г.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Бах. *Biochem. Zs.*, **31**, 443; **33**, 282 (1911); **38**, 454 (1912); **52**, 418; **58**, 205 (1913); настоящая книга, стр. 490, 494, 462, 501, 507.
2. Якобу и Falk. *Biochem. Zs.*, **59**, 298, 316 (1914).
3. Якобу и Umeda. *Biochem. Zs.*, **68**, 23 (1914).
4. Рона и György. *Biochem. Zs.*, **111**, 115 (1920).
5. Якобу. *Biochem. Zs.*, **114**, 152 (1921).
6. Рона. *Sitzung d. Physiol. Ges. vom 24. Juli 1914* (цит. по Jacobi).
7. Бах. О реакциях пероксидазы, очищенной ультрафильтрацией [Sur les réactions de la peroxydase purifiée par ultrafiltration]. — *Arch. Sci. phys. nat* (1917); настоящая книга, стр. 483.
8. Бах совм. с Зубковой. Сб. работ по чистой и прикл. химии. — *Тр. Хим. ин-та им. Л. Я. Карпова*, **1**, 65. (1923); *Biochem. Zs.*, **125**, 283 (1921); настоящая книга, стр. 537.
9. Бах. *Fermentforschung*, **1**, 497 (1915); настоящая книга, стр. 476.

## Сообщение II

## ОБ АНТИФЕНОЛАЗЕ \*

(Совместно с В. А. Энгельгардтом)

Жессаром<sup>1</sup> было сделано наблюдение, что после подкожных впрыскиваний кроликам растворов фенолазы (лакказы) в сыворотке опытных животных спустя некоторое время появляется антифенолаза. Присутствие последней устанавливалось путем чисто качественных опытов, причем в виде субстрата автор пользовался эмульсией гваяковой смолы и гваяколом. Оказалось, что при прочих равных условиях сыворотка иммунизированного животного сильнее задерживала окисление этих субстратов, чем сыворотка нормальных животных.

Так как было установлено (см. предыдущую работу), что присущие нормальной сыворотке ауко- и антиферментативные свойства по отношению к фенолазе являются только кажущимися, то представлялось интересным проверить наблюдения Жессара и распространить их на другие субстраты.

Оптimum окисления гваякола и гваяковой смолы лежит при кислой реакции; поэтому особенно важно было испытать такие субстраты, optimum окисления которых лежит при щелочной реакции и окисление которых значительно ускоряется нормальной сывороткой.

Для приводимых ниже опытов мы пользовались раствором фенолазы из грибов *Lactarius vellereus*. 10 см<sup>3</sup> этого раствора, прибавленные к 2.5 г пирогаллола в 40 см<sup>3</sup> воды и оставленные на 24 часа, давали 0.046 г пурпурогалина. Кроликам впрыскивалось в ушную вену по 2—3 см<sup>3</sup> этого раствора фенолазы каждые 5—6 дней. Если после 6 инъекций сыворотка опытного животного по своему действию на фенолазу не отличалась заметным образом от сыворотки нормального кролика, то иммунизация временно прерывалась и возобновлялась через 2—3 недели. Таким образом, было иммунизировано семь кроликов. У четырех из них сыворотка обнаружила сильное задерживающее действие на фенолазу, у двух задержка была слабее и один вообще не дал задержки. Задерживающее действие проявлялось независимо от природы субстрата и от собственной реакции (концентрации водородных ионов) испытываемой сыворотки.

#### Влияние иммунной сыворотки на окисление гваякола в присутствии буферных растворов

Опыты были произведены с сыворотками четырех иммунизированных и десяти нормальных кроликов. Чтобы устранить буферное влияние самой сыворотки, к реакционной смеси всюду прибавлялась предложенная Михаэлисом смесь уксусной кислоты и уксуснокислого натрия с таким расчетом, чтобы реакция смеси была  $[H^+] = 2.5 \cdot 10^{-6}$ . Постановка опытов была следующая.

1 см<sup>3</sup> 0.1%-ного раствора гваякола, 2 см<sup>3</sup> ацетатной смеси (буфера), 0.1 см<sup>3</sup> раствора фенолазы и 0.1 см<sup>3</sup> сыворотки доводились водой до 10 см<sup>3</sup>. Через час в реакционной смеси определялось колориметрически по методу Баха и Зубковой<sup>2</sup> количество окисленного гваякола; для определения вместо шкалы трубок со стандартным раствором служил колориметр Аутенрита. Получены были следующие результаты:

\* Сб. работ по чистой и прикл. химии.— Тр. Хим. ин-та им. Л. Я. Карпова, 2, 11 (1924).



## Окисленный гваякол (в мг)

|                      |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Нормальная сыворотка | 1.122 | 0.108 | 0.111 | 0.116 | 0.130 | 0.110 | 0.110 | 0.119 | 0.116 |
| Иммунная сыворотка   | 0.059 | 0.052 | 0.062 | 0.058 | —     | —     | —     | —     | —     |

|               |   |                      |          |
|---------------|---|----------------------|----------|
| Средние цифры | { | Нормальные сыворотки | 0.115 мг |
|               |   | Иммунные сыворотки   | 0.057 »  |
|               |   | Без сыворотки        | 0.119 »  |

В то время как прибавление нормальной сыворотки в условиях опыта не влияет на окисление гваякола, прибавление иммунной сыворотки действует задерживающим образом; задержка равнялась приблизительно 50%.

## Влияние иммунной сыворотки на окисление пирогаллола

В качестве представителя той группы субстратов, оптимум окисления которых лежит при щелочной реакции, был выбран пирогаллол, продукт окисления которого может легко быть количественно определен.

0.1 г пирогаллола, 2 см<sup>3</sup> буферной смеси, 0.2 см<sup>3</sup> сыворотки и 0.1 см<sup>3</sup> фенолазы доводились водой до 10 см<sup>3</sup> и оставлялись в эрленмейеровских колбочках на 24 часа. По истечении этого времени образовавшийся пурпурогалин определялся по методу Баха и Збарского<sup>3</sup>; он собирался на асбестовом фильтре, промывался ледяной водой до тех пор, пока промывная вода не переставала редуцировать раствор перманганата, затем количественно растворялся в концентрированной серной кислоте, серноокислый раствор разводился в 7 раз водой и титровался 0.1 N перманганатом до появления стойкого розового окрашивания. Для того чтобы ускорить реакцию жидкость к концу титрования нагревалась до кипения.

Результаты приведены в следующей таблице:

Количество 0.1 N перманганата, пошедшего на титрование (в см<sup>3</sup>)

|                      | Опыт 1 | Опыт 2 | Среднее |
|----------------------|--------|--------|---------|
| Нормальная сыворотка | 3.45   | 4.10   | 3.76    |
| Иммунная сыворотка   | 2.20   | 2.20   | 2.20    |
| Без сыворотки        | 3.30   | 3.80   | 3.52    |

В тех же условиях, но без прибавления буферной смеси:

|                      |      |      |      |
|----------------------|------|------|------|
| Нормальная сыворотка | 6.35 | 5.80 | 6.07 |
| Иммунная сыворотка   | 2.75 | 2.85 | 2.80 |
| Без сыворотки        | 3.65 | 3.60 | 3.62 |

Таким образом, иммунная сыворотка задерживает окисление пирогаллола не только в присутствии буфера, но даже и без него, т. е. в таких условиях, при которых нормальная сыворотка вызывает значительное ускорение окисления.

Эти результаты, подтвердившиеся на целом ряде опытов, показывают, что сыворотки животных, получавших впрыскивания фенолазы, вызывают

задержку при окислении этим ферментом как таких субстратов, оптимум окисления которых лежит при кислой реакции, так и тех, которые лучше окисляются в щелочной среде. Этим иммунная сыворотка резко отличается от сыворотки нормальных животных.

Задерживающее действие иммунной сыворотки могло бы прежде всего зависеть от изменения буферных свойств сыворотки. Но не говоря уже о том, что такого изменения обнаружить нельзя, против такого предположения говорит и тот факт, что торможение проявляется как в опытах без буфера, так и при добавлении буферной смеси и, следовательно, не может зависеть от изменения реакции опытной смеси.

Предположение о задерживающем влиянии содержащихся в иммунной сыворотке солей также отпадает, во-первых, потому, что нельзя обнаружить какого-либо различия в содержании солей в нормальной и иммунной сыворотке, во-вторых, потому, что торможение проявляется при различных субстратах, что также исключает возможность влияния солей.

Из различных факторов, могущих обусловить кажущиеся ауко- и антиферментативные свойства сыворотки, о которых шла речь в предыдущей работе, остается еще возможность различия в физических свойствах нормальной и иммунной сывороток. Вопрос этот требует основательного экспериментального исследования, и в данный момент не представляет еще возможным решить, обусловлено ли антиферментативное действие иммунной сыворотки своеобразным физическим состоянием ее или же в ней находится истинное антитело. В этом отношении вопрос об антифенолазе так же мало выяснен, как и о многих других антителах. По своему отношению к диализу и к нагреванию антифенолаза также не отличается от обычных антител.

### Отношение антифенолазы к диализу

Иммунная сыворотка, разведенная в 10 раз дистиллированной водой, была подвергнута диализу в гильзах Шлейхера и Шюлля до тех пор, пока внешняя жидкость не перестала давать реакции на хлор. Одновременно была подвергнута диализу и нормальная сыворотка. Затем были поставлены опыты с окислением гваякола в присутствии диализированной и недиализированной, иммунной и нормальной сывороток, с добавлением буферного раствора и без него. Получились следующие результаты:

Окисленный гваякол (в мг)

|            | Иммунная сыворотка |                   | Нормальная сыворотка |                   | Без сыворотки |
|------------|--------------------|-------------------|----------------------|-------------------|---------------|
|            | диализированная    | недиализированная | диализированная      | недиализированная |               |
| Без буфера | Следы              | Следы             | 0.047                | 0.031             | 0.130         |
| С буфером  | 0.078              | 0.078             | 0.205                | 0.191             | 0.213         |

Диализированная сыворотка в той же степени тормозит окисление, как и недиализированная. Следовательно, задерживающие свойства принадлежат недиализирующей части сыворотки.

### Чувствительность антифенолазы к нагреванию

Уже Жессар установил, что при нагревании иммунной сыворотки в течение 30 минут до 60° антифенолаза еще не разрушается. Мы могли подтвердить это наблюдение и нашли, что антифенолаза разрушается только при получасовом нагревании до 74—76°. После такого нагревания иммунная сыворотка по своему действию на фенолазу ничем не отличается от нормальной. Опыты ставились с гваяколом в присутствии буфера.

Окисленный гваякол (в мг)

|                                | Сыворотка выдержана 30 мин. при |       |       |
|--------------------------------|---------------------------------|-------|-------|
|                                | 15°                             | 70°   | 85°   |
| Нормальная сыворотка . . . . . | 0.108                           | 0.113 | 0.110 |
| Иммунная сыворотка . . . . .   | 0.053                           | 0.064 | 0.108 |
| Без сыворотки . . . . .        | 0.116                           | —     | —     |

### Задерживающее действие нагретой до кипения сыворотки

Если инактивированную нагреванием до 80° иммунную сыворотку нагревать затем до кипения, то она вновь приобретает сильные задерживающие свойства. То же наблюдается и с нормальной сывороткой: после кипячения она приобретает задерживающие свойства, причем задерживающее действие таких кипяченых сывороток проявляется и в присутствии буфера.

Опыт с гваяколом, с прибавлением буфера. Ход реакции прослеживался в течение двух часов.

Окисленный гваякол (в мг)

|                                                | Время (в минутах) |       |       |       |
|------------------------------------------------|-------------------|-------|-------|-------|
|                                                | 30                | 60    | 90    | 120   |
| Обыкновенная нормальная сыворотка . . . . .    | 0.062             | 0.112 | 0.150 | 0.188 |
| Та же сыворотка, нагретая до кипения . . . . . | —                 | 0.038 | 0.050 | 0.082 |
| Без сыворотки . . . . .                        | 0.072             | 0.134 | 0.165 | 0.194 |

На первый взгляд казалось, что поразительная способность кипяченой сыворотки задерживать действие фенолазы стоит в какой-то связи с задерживающим действием иммунной сыворотки. Но поставленные в этом направлении опыты показали, что это не так.

Для того чтобы выяснить, обусловлено ли задерживающее действие белковыми или безбелковыми компонентами сыворотки, некоторое количество ее было осаждено спиртом, осадок промыт спиртом, высушен и растворен в прежнем объеме воды. С другой стороны, весь алкогольный фильтрат был упарен в вакууме при 40° и полученный остаток, в свою очередь, растворен в соответствующем объеме воды. Оба раствора были затем нагреты до кипения и испытаны на задерживающие свойства. Оказалось, что задержку дает только белковая порция.

Далее было установлено, что нагретые до кипения растворы чистого сывороточного или яичного альбумина тоже тормозят действие фенолазы. Чтобы выяснить влияние реакции белкового раствора на появление задерживающих свойств, был поставлен опыт таким образом, что к одинаковым количествам раствора белка прибавлялись эквивалентные количества кислоты или щелочи и эти растворы нагревались до кипения. После охлаждения растворы тщательно нейтрализовались и испытывались их задерживающие свойства; окисление велось в присутствии буфера. Активной оказалась только проба, нагревавшаяся со щелочью; проба же с кислотой никакого торможения не дала.

Так как при нагревании белков в присутствии щелочей отщепляется сероводород, возникло предположение, что задерживающее действие кипяченой сыворотки обусловлено сероводородом или сернистым натрием. Предположение это оправдалось. Если прибавить к смеси фенолазы и гваякола или пирогаллола слабый раствор сероводорода или сернистого натрия, то обнаруживается такое же задерживающее действие, как с кипяченой сывороткой. Торможение вызывается здесь не инактивированием фенолазы, а исключительно восстановлением продуктов окисления. Это видно уже из того, что когда все количество прибавленного сернистого соединения израсходуется на упомянутую редукцию, дальнейший процесс окисления протекает обычным путем.

Задерживающее действие сернистых соединений легко может быть устранено осторожным прибавлением иода или сулемы. Совершенно таким же образом удается устранить задерживающее влияние кипяченой сыворотки. Следует упомянуть, что присутствие сероводорода в кипяченой сыворотке легко можно доказать реакцией Фишера с диметилпарафенилендиаминном и хлорным железом; в некипяченых сыворотках эта реакция дает отрицательный результат.

Приведенные данные, подтвержденные многочисленными опытами, показывают, что задерживающее действие иммунных и кипяченых сывороток различается коренным образом. При кипяченой сыворотке задержка обусловлена редуцирующим действием сероводорода, в иммунной же сыворотке сероводорода не содержится, Задерживающее действие кипяченой сыворотки устраняется прибавлением иода или сулемы, на действие же иммунной сыворотки эти реактивы в тех же количествах никакого влияния не оказывают. Таким образом, антифенолатическое действие иммунной сыворотки не удастся отнести за счет каких-либо известных до сих пор кажущихся антиферментативных свойств сыворотки.

## РЕЗЮМЕ

Сделанное Жессаром на основании качественных опытов с гваяколовой смолой и гваяколом наблюдение о появлении антифенолазы в сыворотке иммунизированных фенолазой животных подтверждается количественными опытами и распространяется на такие субстраты, оптимум окисления которых лежит при щелочной реакции.

Сыворотка иммунизированных фенолазой животных задерживает окисление и таких субстратов, окисление которых нормальной сывороткой значительно ускоряется.

Действие антифенолазы проявляется в присутствии буферных растворов и, следовательно, не может сводиться к изменению буферных свойств сыворотки иммунизированных животных.

Остается пока невыясненным, обусловлено ли антифенолазное действие изменением физических свойств иммунной сыворотки или же оно зависит от появления истинного антитела.

Антифенолатическое действие связано с недиализующей частью сыворотки; оно исчезает при получасовом нагревании сыворотки до 76°.

Нагретые до кипения сыворотки, как нормальная, так и иммунная, сильно задерживают вызываемые фенолазой окислительные процессы. Это действие проявляется без прибавления буферов и в присутствии их и, следовательно, тоже не может зависеть от изменения реакции опытной смеси. Такое же торможение вызывают нагретые до кипения растворы сывороточного и яичного альбумина. Удалось установить, что это торможение вызывается отщепляющимся при кипячении белковых растворов сероводородом. Присутствие последнего в кипяченых белковых растворах и сыворотке может быть обнаружено реакцией Фишера с диметилпарафенилендиаминном и хлорным железом. Прибавлением иода или сулемы удается совершенно устранить задерживающее действие кипяченых сывороток или белковых растворов. Антифенолатическое действие иммунной сыворотки не имеет ничего общего с действием кипяченой сыворотки — при иммунной сыворотке прибавление иода и сулемы не устраняет торможения и сероводорода иммунная сыворотка не содержит.

Антифенолатическое действие иммунной сыворотки не удастся отнести ни к одному из известных случаев кажущихся антиферментативных свойств.

9 октября 1922 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Gessard. C. R. Soc. Biol., 55, 227 (1903).
2. Бах совм. с Зубковой. Biochem. Zs., 125, 283 (1921); настоящая книга, стр. 537.
3. Бах совм. со Збарским. Biochem. Zs., 34, 473 (1911).
4. Бах совм. с Марьянович. Biochem. Zs., 42, 417 (1912).

#### Сообщение III

#### О СПЕЦИФИЧНОСТИ АНТИФЕНОЛАТИЧЕСКИХ ИММУННЫХ СЫВОРОТОК \*

(Совместно с В. А. Энгельгардтом)

В предыдущей работе было показано, что при внутривенном введении кроликам растворов фенолазы сыворотка опытных животных приобретает истинные — не зависящие от природы субстрата и реакции среды — антифенолатические свойства. В течение дальнейшей работы были иммунизированы еще 13 кроликов. Всего за время работы были иммунизированы 19 кроликов, из которых 17 дали положительный результат. Таким образом, самый факт иммунизации по отношению к фенолазе не подлежит ни малейшему сомнению.

По сравнению с другими антигенами фенолаза представляет то преимущество, что течение иммунизации может быть легко и точно прослежено в количественном отношении. Поэтому мы выбрали эту реакцию, чтобы экспериментальным путем ближе подойти к некоторым проблемам иммунитета. Как известно, фенолаза совершенно не обладает специфичностью в обычном смысле этого слова. Совершенно независимо от своего происхождения этот фермент ускоряет окисление целого ряда различных фенолов и ароматических аминов, а также окисление подистоводородной кислоты.

\* Сб. работ по чистой и прикл. химии — Тр. Хим. ин-та им. Л. Я. Карпова, 2, 18 (1924).

Общим для всех этих субстратов является лишь присутствие в их молекуле легкоподвижного водорода. Из этого можно заключить, что действие фенолазы обусловлено не химическим составом или конфигурацией субстрата, а определенной химической функцией (водородом известного потенциала).

Согласно обычному представлению, всякий антиген вызывает образование в иммунной сыворотке специфического, установленного на данный антиген, антитела. Соответственно этому можно было бы ожидать, что фенолаза, которая всегда, независимо от происхождения, проявляет одни и те же неспецифические свойства, вызовет образование антитела, действующего на любые препараты фенолазы, т. е. неспецифическую сыворотку. Интересно было также посмотреть, как будет действовать антифенолатическая сыворотка на систему «пероксидаза — перекись водорода». Уже первые опыты показали, что полученные путем впрыскиваний сока гриба *Lactarius vellereus* иммунные сыворотки при испытании их в присутствии буферных растворов оказались совершенно недействующими на систему «пероксидаза — перекись водорода». Здесь мы в первый раз могли обнаружить разницу между системой «фенолаза — кислород» и системой «пероксидаза — перекись». Еще любопытнее было наблюдение, что названная иммунная сыворотка совершенно не действовала на фенолазу из другого гриба, именно из *Russula delica*. Ввиду теоретической важности затронутых здесь вопросов представлялось необходимым подробнее исследовать специфичность антифенолатических иммунных сывороток.

Несколько кроликов были подвергнуты иммунизации фильтрованным соком *Russula delica*. После, в среднем, шести инъекций сыворотка животных начинала проявлять задерживающие свойства по отношению к фенолазе из *Russula*. Одновременно аналогичным образом несколько других кроликов подвергались иммунизации соком из *Lactarius*. Опыты ставились следующим образом: путем соответственного разведения были приготовлены приблизительно одинаковой активности растворы фенолазы из *Lactarius* и из *Russula* и пероксидазы из хрена. С каждым из этих окислительных агентов были поставлены четыре опыта: без сыворотки, с прибавлением нормальной сыворотки, с сывороткой кролика, иммунизированного *Lactarius*, и с сывороткой кролика, иммунизированного *Russula*. 1 см<sup>3</sup> 0.1%-ного раствора гваякола, 2 см<sup>3</sup> раствора буфера, 1 см<sup>3</sup> раствора фермента и 1 см<sup>3</sup> разведенной в 10 раз сыворотки (в опыте с пероксидазой еще 1 см<sup>3</sup> 0.25% перекиси водорода) доводились водой до 10 см<sup>3</sup>, и через 30 минут при помощи колориметра Аутенрита по калиброванному клину определялось количество окисленного гваякола. Были получены следующие результаты:

Количество окисленного гваякола (в мг)

|                                           | Без сыворотки | Нормальная сыворотка | Сыворотка анти- <i>Lactarius</i> | Сыворотка анти- <i>Russula</i> |
|-------------------------------------------|---------------|----------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| Фенолаза из <i>Lactarius</i> . . . . .    | 0.179         | 0.169                | 0.072                            | 0.158                          |
| Фенолаза из <i>Russula</i> . . . . .      | 0.171         | 0.147                | 0.166                            | 0.083                          |
| Пероксидаза из хрена + перекись . . . . . | 0.199         | 0.213                | 0.210                            | 0.210                          |

Таким образом, в то время как действие фенолазы из *Lactarius* замедляется почти вдвое при прибавлении соответствующей иммунной сыворотки, та же сыворотка совершенно не влияет на действие фенолазы из *Russula*.

Наоборот, сыворотка кролика, иммунизированного *Russula*, задерживает действие этого фермента, не влияя на фенолазу из *Lactarius*. Наконец, ни та, ни другая сыворотка не действуют на систему «пероксидаза — перекись водорода».

Еще рельефнее выступают эти взаимоотношения при сравнительном опыте, поставленном с сыворотками трех кроликов, иммунизированных *Lactarius*, и четырех, иммунизированных *Russula*. Взятые в этом опыте чрезвычайно сильно действующие сыворотки анти-*Lactarius* были получены от животных, очень долго подвергавшихся иммунизации.

Количество окисленного гваякола (в мг)

|                                        | Нормальная сыворотка |       | Сыворотка анти- <i>Lactarius</i> |       |       | Сыворотка анти- <i>Russula</i> |       |       |
|----------------------------------------|----------------------|-------|----------------------------------|-------|-------|--------------------------------|-------|-------|
|                                        | 0.128                | 0.015 | 0.021                            | 0.011 | 0.120 | 0.120                          | 0.117 | 0.128 |
| Фенолаза из <i>Lactarius</i> . . . . . | 0.128                | 0.015 | 0.021                            | 0.011 | 0.120 | 0.120                          | 0.117 | 0.128 |
| Фенолаза из <i>Russula</i> . . . . .   | 0.132                | 0.132 | 0.132                            | 0.128 | 0.097 | 0.077                          | 0.050 | 0.088 |

Специфическое торможение, вызываемое иммунными сыворотками, может быть обнаружено и при действии фенолазы на пирогаллол.

Так как при прибавлении пирогаллола к реакционным смесям, содержащим сыворотки, образуются осадки белка, мешающие в дальнейшем определению пурпурогалина, то способ определения последнего был несколько видоизменен по сравнению с прежде употреблявшейся методикой.

1 см<sup>3</sup> 10%-ного раствора пирогаллола, 0.2 см<sup>3</sup> сыворотки, 1 см<sup>3</sup> раствора фенолазы и 2 см<sup>3</sup> буферной смеси доводились водой до 10 см<sup>3</sup> и оставлялись на три часа в термостате при 37°. По истечении этого срока реакционная смесь фильтровалась через плотный фильтр, колбочка, в которой велся опыт, ополаскивалась ледяной водой, которой затем промывался и осадок на фильтре. Когда промывная вода переставала восстанавливать раствор перманганата, то содержащийся в осадке на фильтре пурпурогалин количественно извлекался сперва спиртом, затем спиртом с эфиром и, наконец, чистым эфиром. Соединенные алкогольно-эфирные экстракты доводились спиртом до 25 см<sup>3</sup>, и определение содержания пурпурогалина затем производилось двумя путями. В 5 см<sup>3</sup> раствора количество пурпурогалина определялось колориметрически в приборе Аутенрита, по наполненному спирто-эфирным раствором и калиброванному клину. Кроме того, 10—20 см<sup>3</sup> испытуемого раствора выпаривалось, и полученный по выпаривании пурпурогалин растворялся в крепкой серной кислоте, разводился водой и титровался 0.1 N перманганатом. Полученные результаты приведены в следующей таблице:

|                                            | Фенолаза из <i>Lactarius</i>                    |                                                    | Фенолаза из <i>Russula</i>                      |                                                    |
|--------------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
|                                            | 0.1 N KMnO <sub>4</sub><br>(в см <sup>3</sup> ) | Пурпурога-<br>лин, колори-<br>метрически<br>(в мг) | 1.0 N KMnO <sub>4</sub><br>(в см <sup>3</sup> ) | Пурпурога-<br>лин, колори-<br>метрически<br>(в мг) |
| Нормальная сыворотка . . . . .             | 4.5                                             | 1.65                                               | 5.00                                            | 1.62                                               |
| Сыворотка анти- <i>Lactarius</i> . . . . . | 0.7                                             | 0.41                                               | 4.75                                            | 1.60                                               |
| Сыворотка анти- <i>Russula</i> . . . . .   | 5.5                                             | 1.80                                               | 3.50                                            | 0.95                                               |

Таким образом, и при окислении пирогаллола полученные путем иммунизации различными препаратами фенолазы иммунные сыворотки действуют специфическим образом.

### Иммунизация препаратами фенолазы, инактивированными путем кипячения

Чтобы выяснить, влияет ли активность фермента на результаты иммунизации, были поставлены опыты с иммунизацией кроликов инактивированными растворами фенолазы из *Lactarius* и из *Russula*. Один кролик получил 16 инъекций кипяченого сока *Lactarius*, другой 9 инъекций кипяченого сока *Russula*. Действие их сывороток испытывалось на гваяколе обычным путем, в присутствии буферных растворов.

Количество окисленного гваякола (в мг)

|                              | Без сыворотки | Нормальная сыворотка | Иммунная сыворотка                                                    |
|------------------------------|---------------|----------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| Фенолаза из <i>Lactarius</i> | 0.185         | 0.174                | Иммунная сыворотка<br>Анти- <i>Lactarius</i><br>0.174<br>(кролик № 5) |
| Фенолаза из <i>Russula</i>   | 0.183         | 0.171                | Анти- <i>Russula</i><br>0.170<br>(кролик № 12)                        |

Оказалось, таким образом, что кипяченый сок при внутривенном введении кроликам неспособен сообщить их сыворотке антифенолатические свойства. Так как не была исключена возможность, что мы в данном случае имеем дело с индивидуально невосприимчивыми кроликами, мы подвергли их затем иммунизации активными растворами соответствующих препаратов фенолазы. Уже после четвертой инъекции сыворотка кроликов обнаруживала ясно выраженные задерживающие свойства; при дальнейших инъекциях задерживающая сила их еще возросла.

Количество окисленного гваякола (в мг)

|                                  | № опыта | Без сыворотки | Нормальная сыворотка | Иммунная сыворотка |
|----------------------------------|---------|---------------|----------------------|--------------------|
| Кролик № 5                       |         |               |                      |                    |
| Фенолаза из <i>Lactarius</i> . . | 1       | 0.210         | 0.177                | 0.141 (4 инъекции) |
|                                  | 2       | 0.245         | 0.208                | 0.119 (6 инъекций) |
| Кролик № 12                      |         |               |                      |                    |
| Фенолаза из <i>Russula</i> . . . | 1       | 0.147         | 0.141                | 0.097 (4 инъекции) |
|                                  | 2       | 0.139         | 0.127                | 0.075 (6 инъекций) |

В связи с отрицательным результатом наших опытов с иммунизацией инактивированным ферментом можно упомянуть, что Брю\* удалось,

\* C. R. Soc. Biol., 76, 153 (1914).



иммунизируя коз инактивированным сычужным ферментом, получить сыворотку, задерживавшую действие этого фермента. Все же действие такой сыворотки было слабее, чем сывороток, полученных при иммунизации активными препаратами сычуга.

### Влияние продолжительности взаимодействия между иммунной сывороткой и фенолазой на величину торможения

Одни антигены очень быстро связываются своими антителами, другие же значительно медленнее. В последнем случае можно наблюдать, что чем дольше антиген находится в соприкосновении с антителом, тем больше он связывается. Подобное же явление наблюдается при действии антифенолатической сыворотки на раствор фенолазы.

Опыты были поставлены с фенолазой из *Lactarius* и соответствующей иммунной сывороткой.

Количество окисленного гваякола (в мг)

| Продолжительность действия сыворотки на фенолазу (часы) | Нормальная сыворотка | Иммунная сыворотка |
|---------------------------------------------------------|----------------------|--------------------|
| 0                                                       | 0.155                | 0.075              |
| 2                                                       | —                    | 0.059              |
| 4                                                       | 0.160                | 0.050              |

### Эффект Даниша

При некоторых антигенах обнаруживается так называемый эффект Даниша, который состоит в том, что если прибавить к определенному количеству антисыворотки одно и то же количество антигена в одном опыте сразу, а в другом по частям, то оказывается, что при дробном прибавлении первые порции антигена свяжут больше антитела, чем последующие, и в результате полученная смесь будет содержать больше свободного антигена, чем в том опыте, где антиген был прибавлен весь сразу. Как показывает следующая таблица, при антифенолатической сыворотке этого явления наблюдать не удается:

Дробное прибавление фермента

| Без сыворотки | Сыворотка  | Сыворотка + весь фермент выдержаны 4 часа | Фермент прибавлен в 4 приема с промежутками в 1 час | Сыворотка + весь фермент выдержаны 30 мин. |
|---------------|------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| 0.270         | Нормальная | 0.245                                     | —                                                   | 0.248                                      |
|               | Иммунная   | 0.163                                     | 0.169                                               | 0.174                                      |

Ни при той, ни при другой постановке опыта не удалось обнаружить ни малейшего влияния дробного прибавления ингредиентов; то различие, которое наблюдается между отдельными опытами, несомненно зависит только от более продолжительного соприкосновения фермента с иммунной сывороткой.

*Дробное прибавление сыворотки*

| Без сыворотки | Сыворотка              | Сыворотка +<br>+ весь фермент<br>выдержаны 4 часа | Сыворотка<br>прибавлена<br>в 4 приема<br>с промежутками<br>в 1 час | Сыворотка +<br>+ фермент<br>выдержаны<br>30 мин. |
|---------------|------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| 0.18          | Нормальная<br>Иммунная | 0.181<br>0.075                                    | 0.183<br>0.081                                                     | 0.183<br>0.089                                   |

**Обсуждение полученных результатов и дальнейшие перспективы**

Тот факт, что фенолазы различного происхождения вызывают образование специфически действующих иммунных сывороток, может быть истолкован двояким образом.

1. Можно предположить, что, несмотря на тождественность их химического действия, фенолазы различного происхождения отличаются друг от друга по своему химическому составу или строению и представляют собою специфические антигены. Другими словами, мы должны были бы считать фенолазы в энзимологическом смысле неспецифичными, а в серологическом — специфичными. Подобная видовая специфичность не представляется невозможной, но все же она мало вероятна. При большом количестве вызываемых фенолазой реакций можно было бы ожидать, что различию в строении будет соответствовать и какое-либо различие в действии; последнего, однако, до настоящего времени установить не удалось.

2. Гораздо легче объяснить наблюдаемые факты, если предположить, что при иммунизации антигеном служит не сама фенолаза, а те или иные связанные с нею сопутствующие вещества белкового характера.

В пользу последнего предположения говорит прежде всего то обстоятельство, что, согласно имеющимся до настоящего времени наблюдениям, только протеины и близко к ним стоящие вещества могут служить антигенами и вызывать образование специфических иммунных сывороток. Фенолаза, как и многие другие ферменты, не может быть отнесена к названному разряду веществ. Далее можно указать на то, что ферменты, которые удается получить в более чистом виде (например, инвертаза), не дают соответствующих антисывороток. Предположение, что специфичность антифенолатических сывороток обусловлена специфичностью сопутствующих веществ в различных препаратах фенолазы, является более приемлемым, чем предположение о серологической специфичности фенолазы, при энзимологической неспецифичности ее. Антисвойства иммунных сывороток, может быть, направлены, таким образом, не на фенолазу как таковую, а на сопутствующие вещества. Последние под воздействием иммунной сыворотки претерпевают те или иные изменения, — быть может, свертываются и при этом захватывают и фенолазу, благодаря чему и получается впечатление специфического антиферментного действия.

То обстоятельство, что инактивированные кипячением препараты не вызвали появления иммунной сыворотки, не может служить опровержением высказываемого здесь взгляда, так как известно, что при денатурации белков путем кипячения их антигенные свойства изменяются. Вполне возможно, что и в нашем случае свойства сопутствующих веществ, как антигенов, изменились.

Возможно, что подобным же образом дело обстоит и с другими так называемыми антиферментами и антитоксинами.

Если высказанное здесь предположение оправдается, то придется отказать от понятия об антиферменте как о веществе, действующем непосредственно на самый фермент. Это понятие придется заменить понятием об изменении среды, в которой фермент находится, и притом о таком изменении, в результате которого часть фермента захватывается и лишается возможности проявить свое действие.

Правда, такая постановка вопроса не разрешает проблемы о специфической иммунизации, она только переводит ее в другую плоскость. Но зато при этом появляется возможность более широкого экспериментального исследования этого вопроса. Можно будет попытаться, путем все большей очистки фенолазы, удалить все служащие антигенами сопутствующие вещества; если такой препарат, лишенный антигенных сопутствующих веществ, не будет вызывать образования антифермента, можно будет, искусственно прибавляя к нему те или иные белковые вещества, пытаться путем иммунизации этими смесями получить специфические, установленные именно на эти примеси, антисыворотки.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сыворотка кроликов, иммунизированных содержащим фенолазу соком *Lactarius vellereus*, оказалась совершенно недействительной по отношению к фенолазе из *Russula delica*, и наоборот. Обе антифенолатические сыворотки не проявляют никакого действия на систему «пероксидаза— $H_2O_2$ ».

Специфичность антифенолатических сывороток обнаруживается как при окислении гваякола, так и при окислении пирогаллола. Иммунизация кроликов препаратами фенолазы, инактивированными посредством кипячения, дала отрицательные результаты. При дальнейшей иммунизации активными препаратами те же животные дали специфические антисыворотки.

Чем продолжительнее действие иммунной сыворотки на соответствующую фенолазу, тем больше фермента она связывает.

Так называемый эффект Даниша не наблюдается в антифенолатических иммунных сыворотках.

Специфичность антифенолатических сывороток может быть объяснена различием в строении фенолаз разного происхождения. Но этому противоречит энзимологическая неспецифичность ее. Более правдоподобно предположение, что антигеном является не фенолаза, а сопутствующие ей белковые вещества.

4 апреля 1924 г.

---

## О РОЛИ СОПРОВОЖДАЮЩИХ ВЕЩЕСТВ ПРИ ИММУНИЗАЦИИ ПРЕПАРАТАМИ ИНВЕРТАЗЫ

[*Ueber die Rolle der Begleitstoffe bei der Immunisierung mit Invertasepräparaten*] \*

(Совместно с В. Энгельгардтом и А. Замысловым)

Бах и Энгельгардт<sup>1</sup> высказали предположение, что специфичность антифенолатических иммунных сывороток определяется присутствием определенных сопровождающих веществ, играющих роль настоящих антигенов; попадая в иммунную сыворотку, фермент связывается ими и инактивируется. В настоящей работе мы пытались подойти ближе к разрешению этого вопроса, исследуя антигенные свойства фермента, который легко можно получить разной степени чистоты. Если сделанное предположение правильно, то следует ожидать, что чем чище фермент, т. е. чем меньше в нем примесей, тем слабее будут его антигенные свойства. В качестве объекта для этих опытов была выбрана инвертаза.

В литературе имеется очень мало данных, касающихся иммунизации препаратами инвертазы. Шютце и Бергель<sup>2</sup> и Кнафл-Ленц<sup>3</sup> установили, что сыворотка иммунизированных животных снижает действие инвертазы всего процентов на десять. Это снижение настолько незначительно, что авторы не решаются считать его специфическим. Абдергальден и Вертгаймер<sup>4</sup> исследовали иммунизацию различными ферментами, в том числе и препаратами инвертазы. Они получили отрицательные результаты и поэтому предложили вообще не употреблять выражение «антифермент». Если явление торможения вызывается иммунной сывороткой, то можно в лучшем случае говорить об антиферментативном действии, но не об антиферменте. Так же как Бах и Энгельгардт, Абдергальден и Вертгаймер считают, что антигенами являются сопровождающие ферменты белковые соединения, а не сами ферменты.

### МЕТОДИКА

Иммунизация производилась автолизированным соком пивных дрожжей. Сухие дрожжи заливались двойным объемом воды и сохранялись под толуолом при комнатной температуре в течение 10—12 дней. По истечении этого времени первоначально густая масса становилась значительно более жидкой; она фильтровалась через большие складчатые фильтры, и фильтрат сохранялся под толуолом. Подвергавшиеся иммунизации кролики получали в вену от 2 до 5 см<sup>3</sup> этого сока через промежутки в 5—6 дней, — в общем обычно 5—6 инъекций. Этот препарат был впрыснут 8 кроликам;

\* Biochem. Zs., 160, 261 (1925).

двое из них погибли при третьей инъекции при явлениях анафилаксии. Остальные дали иммунные сыворотки различной активности.

Опыты инверсии ставились следующим образом: 2 см<sup>3</sup> буферного раствора (0.1 N ацетатная смесь в отношении 1 : 1), 2 см<sup>3</sup> 10%-ного раствора сахарозы и 5 см<sup>3</sup> воды смешивались с 1 см<sup>3</sup> исследуемого раствора и ставились на 30 минут в термостат при 37°. По истечении этого времени реакция приостанавливалась прибавлением раствора Фелинга (от 10 до 15 см<sup>3</sup>), и инвертированный сахар определялся по Бертрану. Количество фермента выбиралось таким образом, чтобы при данных условиях образовывалось около 20—30 мг инвертированного сахара, что соответствует от 7 до 9 см<sup>3</sup> 0.1 N раствора KMnO<sub>4</sub>.

Результаты везде даны в кубических сантиметрах 0.1 N KMnO<sub>4</sub>.

### ДЕЙСТВИЕ ИММУННОЙ СЫВОРОТКИ В РАСТВОРЕ

1 см<sup>3</sup> раствора фермента и 1 см<sup>3</sup> сыворотки, разбавленной в 10 раз, оставались при комнатной температуре на 30 минут. После этого инвертирующая способность определялась, как указано выше.

|                                            | О п ы т ы                              |     |     |     |
|--------------------------------------------|----------------------------------------|-----|-----|-----|
|                                            | 1                                      | 2   | 3   | 4   |
|                                            | См <sup>3</sup> 0.1N KMnO <sub>4</sub> |     |     |     |
| Инвертаза + нормальная сыворотка . . . . . | 8.3                                    | 7.3 | 6.0 | 7.6 |
| Инвертаза + иммунная сыворотка . . . . .   | 7.0                                    | 6.6 | 5.9 | 6.6 |

Приведенные данные в полной мере подтверждают результаты Шютце и Бергеля и Кнафл-Ленца, которые нашли, что сыворотка кроликов, получивших инъекции инвертазы из дрожжей, оказывает лишь незначительное влияние на действие этого фермента. Величина торможения также совпадает с данными указанных авторов: она составляет от 10 до 15%.

### Действие иммунной сыворотки в адсорбированном состоянии

Приведенные выше опыты не определяют с достаточной ясностью антиферментативную способность иммунной сыворотки. Для того чтобы ближе подойти к поставленной цели, необходимо было применить метод, который дал бы возможность выявить более отчетливо антиферментативные свойства иммунной сыворотки.

Нельсон и его сотрудники<sup>5</sup> установили, что инвертаза полностью сохраняет свою активность и в адсорбированном состоянии. Если рассматривать инактивирование фермента иммунной сывороткой как адсорбционный процесс, то следует ожидать, что инвертаза сохранит большую часть своей активности даже после того, как она связана иммунной сывороткой. Поэтому, если зафиксировать иммунную сыворотку на подходящем адсорбенте (см. Энгельгардт<sup>6</sup>) и затем взбалтывать ее с раствором инвертазы,

то фермент связывается иммунной сывороткой и может быть удален из раствора одновременно с адсорбированной сывороткой (например, путем центрифугирования). Опыты, которые были поставлены в этом направлении по методу, предложенному Энгельгардтом (1 с.), полностью подтверждают высказанное предположение.

К 1 см<sup>3</sup> сыворотки, разбавленной в десять раз, было прибавлено 1 см<sup>3</sup> ацетатного буфера и затем 1 см<sup>3</sup> 10%-ной суспензии каолина. Осадок промывался один раз на центрифуге дистиллированной водой, затем взвешивался в 2 см<sup>3</sup> буферного раствора и после прибавления 5 см<sup>3</sup> воды и 1 см<sup>3</sup> раствора инвертазы оставлялся при комнатной температуре на 30 минут. Затем раствор центрифугировался, жидкость сливалась в эрленмейеровскую колбу и сохранялась в течение получаса в термостате при 17° после прибавления 2 см<sup>3</sup> 10%-ного раствора сахарозы. По истечении этого времени инверсия прекращалась путем прибавления раствора Фелинга, и инвертированный сахар определялся по Бертрану. По количеству образовавшегося инвертированного сахара можно было судить о количестве фермента, оставшегося несвязанным.

В нижеследующую таблицу сведены результаты опытов с сыворотками различных животных:

|                                                       | О п ы т ы                              |     |     |     |     |     |     |
|-------------------------------------------------------|----------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                                                       | 1                                      | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   |
|                                                       | См <sup>3</sup> 0.1N KMnO <sub>4</sub> |     |     |     |     |     |     |
| Инвертаза . . . . .                                   | 8.6                                    | 8.0 | 6.5 | 7.4 | 7.3 | 7.5 | 9.7 |
| Инвертаза + нормальная сыворотка на каолине . . . . . | 8.0                                    | 7.2 | 5.6 | 6.6 | 7.0 | 7.3 | 8.7 |
| Инвертаза + иммунная сыворотка на каолине . . . . .   | 0.0                                    | 0.5 | 0.2 | 0.0 | 0.8 | 0.8 | 3.2 |

В цитированной работе Энгельгардт доказал антиферментативное действие антифенолатических иммунных сывороток, пользуясь фиксированием сыворотки различными адсорбентами: каолином, глиной, гидратом окиси железа, углем. В опытах с инвертазой можно было применять только каолин. В то время как последний, обработанный нормальной сывороткой, почти совершенно не адсорбировал инвертазу, гидраты окиси железа и алюминия сохраняли в тех же условиях способность сильно ее адсорбировать.

Кроме каолина оказалось возможным адсорбировать антифермент на фосфорномолибденовоокислом аммонии. В тех количествах, которые мы применяли (1 см<sup>3</sup> 25%-ной суспензии), фосфорномолибденовоокислый аммоний адсорбирует инвертазу в ничтожных количествах; однако тот же адсорбент, обработанный иммунной сывороткой, энергично связывает фермент. В противоположность опытам с каолином, в опытах с фосфорномолибденовоокислым аммонием производилась обработка адсорбента сывороткой, а затем адсорбата раствором инвертазы без прибавления буфера. Буферная смесь прибавлялась только перед тем, как ставить в термостат. Суспензия фосфорномолибденовоокислого аммония должна быть свежеприготовленной. Результаты, полученные с фосфорномолибденовоокислым аммонием, приведены в следующей таблице:

|                                                               | Опыты                                  |     |     |
|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------|-----|-----|
|                                                               | 1                                      | 2   | 3   |
|                                                               | См <sup>3</sup> 0.1N KMnO <sub>4</sub> |     |     |
| Инвертаза . . . . .                                           | 8.5                                    | 8.4 | 7.8 |
| Инвертаза + фосфорномолибденовокси-<br>слый аммоний . . . . . | 8.4                                    | 8.0 | 7.1 |
| То же + нормальная сыворотка . . .                            | 8.3                                    | 7.1 | 6.5 |
| То же + иммунная сыворотка . . .                              | 1.8                                    | 1.5 | 0.7 |

### Инактивирование иммунной сыворотки

Если иммунную сыворотку нагревать до 80° в течение 30 минут, то она теряет антиферментативные свойства. Сыворотка инактивировалась в адсорбированном состоянии. В качестве примера можно привести следующие данные:

|                                                                          | Опыты                                  |            |
|--------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|------------|
|                                                                          | 1                                      | 2          |
|                                                                          | См <sup>3</sup> 0.1N KMnO <sub>4</sub> |            |
| Сыворотка предварительно { нормальная<br>{ иммунная<br>{ необработанная  | 7.0<br>0.8                             | 7.6<br>0.0 |
| Сыворотка, сохранявшаяся { нормальная<br>{ иммунная<br>{ 30 мин. при 82° | 6.7<br>6.3                             | 8.1<br>7.1 |

### Сохранение активности инвертазы после ее связывания иммунной сывороткой, адсорбированной на каолине

Если наше предположение о механизме действия антиинвертазной сыворотки правильно, то следует ожидать, что фермент сохранит свою инвертирующую способность после того, как он будет связан иммунной сывороткой, адсорбированной на каолине. Для того чтобы проверить это предположение, был поставлен следующий опыт: к иммунной сыворотке, адсорбированной на каолине, прибавлялся раствор инвертазы; после 30 минут каолин центрифугировался, адсорбат промывался водой и переносился в указанную выше смесь воды, буфера и сахарозы. После 60-минутного пребывания в термостате смесь вновь центрифугировалась и от жидкости отбирались две одинаковые пробы. В первой немедленно определялся инвертированный сахар, вторая сохранялась еще в течение 60 минут в термостате. Если бы фермент перешел в раствор, то инверсия продолжалась бы во второй порции. Если же в обеих пробах мы находим одинаковое количество редуцирующего сахара, то это означает, что фермент активен в связанном состоянии. Опыт дал следующие результаты (стр. 576).

Из приведенных данных видно, что фермент, связанный адсорбированной иммунной сывороткой, сохраняет свою инвертирующую способность и действует, не переходя в раствор.

|                                                            |                                                | Опыты                                            |
|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Инвертаза . . . . .                                        |                                                | См <sup>3</sup> 0.1N<br>KMnO <sub>4</sub><br>3.7 |
| Инвертаза, обработанная адсорбатов сыворотки на<br>каолине | { нормальная сыворотка<br>{ иммунная сыворотка | 3.3<br>0.0                                       |
| Адсорбат нормальной сыворотки, обработанный<br>инвертазой  | { 1-я порция<br>{ 2-я »                        | 0.7<br>0.7                                       |
| Адсорбат иммунной сыворотки, обработанный инвер-<br>тазой  | { 1-я порция<br>{ 2-я »                        | 2.65<br>2.70                                     |

Возникает вопрос, не обладает ли иммунная сыворотка способностью связывать инвертазу только в том случае, если она была предварительно адсорбирована на каолине. На этот вопрос можно ответить отрицательно, так как можно показать, что и в растворе фермент связывается иммунной сывороткой. Если, в частности, смешать инвертазу с нормальной сывороткой и затем высадить из последней белки необходимым количеством спиртового раствора уксуснокислого цинка, то фермент не увлекается осадком. Если поставить тот же самый опыт с иммунной сывороткой, то инвертаза переходит в осадок. Взвесив осадок в обычной смеси воды, буфера и сахарозы, легко убедиться, что и в этом случае сохраняется активности фермента.

Результаты приведенных выше опытов не позволяют еще решить, играет ли роль антигенов активная молекула фермента или сопутствующие примеси белкового характера. Для того чтобы ответить на этот вопрос, были поставлены опыты в двух различных направлениях: 1) иммунизация очищенным ферментом и 2) иммунизация инактивированным ферментом. Мы исходили из следующих соображений: если роль антигена играет активная молекула фермента, то иммунизация очищенными препаратами должна привести к таким же активным иммунным сывороткам, как и с неочищенными препаратами, а при иммунизации инактивированным ферментом вообще нельзя ожидать, что получится иммунная сыворотка. Наоборот, если антигенами являются белковые примеси, то антиферментативные свойства иммунной сыворотки должны быть тем слабее, чем чище препарат, применяющийся для иммунизации.

### Иммунизация очищенными препаратами инвертазы

Эти опыты были проведены с четырьмя кроликами. Количество инъекций, количество введенного фермента и вся остальная методика были точно такие же, как в описанных выше опытах. Очистка инвертазы производилась по Эйлеру и Кульбергу<sup>7</sup>. Тот же автолизированный сок, который применялся в первом опыте для иммунизации, был обработан уксуснокислым свинцом. При этом большая часть белков выпадала, а фермент оставался в растворе. К отфильтрованному раствору прибавлялся спирт до содержания 48%; осадок растворялся в воде, обрабатывался каолином и еще раз осаждался спиртом. Осадок, растертый с абсолютным спиртом и отфильтрованный при помощи водоструйного насоса, дал белый порошок, который был высушен в эксикаторе над хлористым кальцием. Для иммунизации был взят раствор этого препарата, по своей активности соответствующий



первоначальному автолизированному соку. Этот раствор дал слабopоложительную реакцию с реактивом Шпиглера на белок. Результаты иммунизации приведены в нижеследующей таблице:

|                                                                        | № опытного животного                   |     |     |     |
|------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|-----|-----|-----|
|                                                                        | 1                                      | 2   | 3   | 4   |
|                                                                        | См <sup>3</sup> 0.1N KMnO <sub>4</sub> |     |     |     |
| Инвертаза . . . . .                                                    | 6.6                                    | 7.4 | 6.7 | 7.0 |
| Инвертаза + нормальная сыворотка, адсорбированная на каолине . . . . . | 6.3                                    | 7.1 | 6.2 | 6.7 |
| Инвертаза + иммунная сыворотка, адсорбированная на каолине . . . . .   | 4.4                                    | 4.6 | 4.2 | 3.8 |

Таким образом, мы видим, что антиферментативные свойства иммунных сывороток выражены слабее при иммунизации очищенными препаратами фермента, чем при иммунизации автолизированным соком. В то время как в последнем случае задержка, вызванная иммунизацией, достигает 75—100%, при применении очищенных препаратов она составляла всего 30—40%.

#### Иммунизация инактивированной инвертазы

Опыты были проведены с четырьмя кроликами. Двое из них были иммунизированы автолизированным соком, инактивированным путем нагревания на водяной бане при 68° в течение 30 минут. Для иммунизации двух последних кроликов применялся автолизированный сок, который был поставлен на 40 мин. в кипящую воду. Осадок, образовавшийся после кипячения, был отфильтрован. Контрольные опыты показывают в обоих случаях полное отсутствие активности препаратов как в начале, так и в конце иммунизации. Это следует отметить, так как в литературе приводятся данные о регенерации инактивированных ферментов. В следующей таблице приведены результаты этих опытов по иммунизации:

|                                                       | № опытного животного                   |     |     |     |
|-------------------------------------------------------|----------------------------------------|-----|-----|-----|
|                                                       | 1                                      | 2   | 3   | 4   |
|                                                       | См <sup>3</sup> 0.1N KMnO <sub>4</sub> |     |     |     |
| Инвертаза . . . . .                                   | 8.0                                    | 8.0 | 8.6 | 8.6 |
| Инвертаза + нормальная сыворотка на каолине . . . . . | 7.5                                    | 7.5 | 7.4 | 7.4 |
| Инвертаза + иммунная сыворотка на каолине . . . . .   | 5.9                                    | 2.6 | 1.3 | 5.4 |

Как видно, антигенные свойства инактивированного автолизированного сока не уменьшились, несмотря на полное отсутствие активности ферментов. Антиферментативное действие иммунной сыворотки вполне хорошо выражено. Приведенные данные соответствуют сывороткам, которые были получены после шести инъекций. После седьмой инъекции сыворотка

кролика № 3 оказалась способной связывать все применявшееся количество фермента. С очищенными препаратами последующие инъекции также не давали никакого повышения антиферментативных свойств сыворотки.

### ВЫВОДЫ

I. Инъекции препарата инвертазы приводят у кроликов к образованию антиинвертазной иммунной сыворотки.

II. Способность иммунных сывороток связывать фермент может быть доказана посредством адсорбции белка иммунной сыворотки на подходящий адсорбент.

III. Получасовое нагревание при 80° почти полностью уничтожает антиферментативные свойства иммунной сыворотки.

IV. Фермент сохраняет свою активность и после того, как он связан иммунной сывороткой.

V. Очищенные препараты инвертазы дают при иммунизации более слабые иммунные сыворотки, чем неочищенные препараты (автолизированный сок) той же самой активности.

VI. Фермент, инактивированный нагреванием, обладает способностью производить иммунные сыворотки.

VII. На основании данных, приведенных в пунктах V и VI, можно сделать вывод, что при иммунизации препаратом инвертазы роль антигена играют не активные молекулы фермента, а те примеси, связанные с ферментом, которые его сопровождают.

8 мая 1925 г.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Бах совм. с Энгельгардтом. *Biochem. Zs.*, **148**, 456 (1924); этот том, стр. 565.
2. Schütze u. Bergel. *Zs. Klin. Med.*, **61**, 356 (1907).
3. Knafl-Lenz. *Zs. Physiol. Chem.*, **120**, 119.
4. Abderhalden u. Wertheimer *Fermentforschung*, **6**, 286 (1923).
5. Nelson. *J. Amer. Chem. Soc.*, **38**, 1109 (1916); **43**, 1956 (1921).
6. Бах совм. с Энгельгардтом. *Biochem. Zs.*, **148**, 463 (1924).
7. Euler u. Kuhlberg. *Zs. physiol. chem.*, **73**, 335.

---

## О ПЕРОКСИДАЗНЫХ ФУНКЦИЯХ ОКСИГЕМОГЛОБИНА \*

(Совместно с А. К у л ь т ю г и н ы м)

А. Бах и С. Зубкова<sup>1</sup> выработали методику, которая дает возможность определять содержание пероксидазы в минимальных (0.001 см<sup>3</sup>) количествах крови. Оксигемоглобин крови, как известно, обладает способностью окислять в присутствии перекиси водорода целый ряд веществ (гваякол, бензидин, пирогаллол и т. п.). Бах и Зубкова в своем методе исходили, в соответствии с данными литературы, из положения, что в крови наряду с оксигемоглобином существует также фермент пероксидаза и что оксигемоглобин в отличие от последней термостабилен. Против этого положения было сделано возражение со стороны Вильштеттера и Полингера<sup>2</sup>, которые указали, что, согласно их наблюдениям, пероксидазное действие растворов оксигемоглобина после непродолжительного кипячения значительно понижается (приблизительно на  $\frac{1}{8}$ ). Так как это возражение казалось нам веским, мы и решили подробнее изучить вопрос о существовании в крови независимой от гемоглобина пероксидазы.

Вопрос этот не является новым. Линоссье<sup>3</sup>, а позднее Муатесье<sup>4</sup> установили, что лейкоциты дают обычную реакцию на пероксидазу с гваяковой эмульсией и перекисью водорода. Муатесье нашел, что такое же окисление гваяковой эмульсии происходит с оксигемоглобином, а также с его содержащими железо продуктами расщепления (гематин, гемин и др.). Это каталитическое действие оксигемоглобина сохраняется также после кипячения, тогда как пероксидазное действие лейкоцитов кипячением уничтожается. Чигларж и Фюрт<sup>5</sup> подтвердили данные Муатесье и полагали, что катализ реакции между иодистоводородной кислотой и перекисью водорода дает средство отличить действие пероксидазы от действия оксигемоглобина. Окисление иодистоводородной кислоты будто бы не ускоряется оксигемоглобином, но ускоряется гноем и лимфоидной тканью. Те же исследователи наблюдали, что окисление лейкоформы малахитовой зелени системой пероксидаза + перекись водорода дает характерное для фермента течение реакции, тогда как с оксигемоглобином этого не наблюдается.

Букмастер<sup>6</sup> подтвердил различие действия истинной пероксидазы и оксигемоглобина и предложил для последнего название «псевдопероксидазы». К подобным взглядам о существовании самостоятельной пероксидазы наряду с оксигемоглобином и о термостабильности последнего пришли также Пигини<sup>7</sup>, Зентер<sup>8</sup> и др. По Бателли и сотр.<sup>9</sup>, катализ реакции между иодистоводородной кислотой и перекисью водорода не является подходящим для отличия истинной пероксидазы от гемоглобина, так как в этом случае присутствующая каталаза нарушает реакцию, принимая участие в разло-

\* Журн. эксп. биол. и мед., № 1, 60 (1925).

жении перекиси водорода. Но если применять вместо перекиси водорода гидроперекись этила, на которую каталаза не действует, то оказывается, что оксигемоглобин, так же как и лимфоидная ткань, ускоряет реакцию окисления подистоводородной кислоты. С другой стороны, Бателли и сстр. считают, что окисление муравьиной кислоты перекисью водорода в присутствии крови и различных животных тканей дает возможность обнаружить и определять количественно животную пероксидазу, хотя при этом они оговариваются, что окислительную способность крови надо приписать, по крайней мере в значительной степени, красящему веществу крови — оксигемоглобину; они высказывают мнение, что пероксидаза, которая окисляет муравьиную кислоту, идентична с пероксидазой, окисляющей подистоводородную кислоту. Вольф и Штеклин<sup>10</sup> считают, что оксигемоглобин как при окислении подистоводородной кислоты, так и при окислении других субстратов в присутствии перекиси водорода обнаруживает то же самое каталитическое действие, что и растительная пероксидаза. Вильштеттер и Полингер (l. c.) нашли, что оксигемоглобин проявляет свойства и действие пероксидазного фермента, и, повидимому, высказываются за его ферментативную природу.

Так как нас прежде всего интересовал практический вопрос — целесообразность определения «пероксидазного» показателя крови химическим путем, то мы и пытались установить, насколько пероксидазное действие крови совпадает с действием содержащегося в ней оксигемоглобина и покрывается последним. Ниже мы сообщаем результаты опытов, поставленных в различных направлениях.

#### **РАСТВОРЫ КРОВИ, ОДИНАКОВЫЕ ПО ИНТЕНСИВНОСТИ ОКРАСКИ, ПРОЯВЛЯЮТ ОДИНАКОВЫЕ ПЕРОКСИДАЗНЫЕ ДЕЙСТВИЯ**

Пробы крови, взятые у различных лиц, при одинаковом разведении их водой обнаруживают в большинстве случаев различную интенсивность окраски и различное пероксидазное действие. Колебания в пероксидазных действиях могут быть отнесены или за счет различного содержания оксигемоглобина в пробах или, если допустить, что в крови наряду с оксигемоглобином существует особая пероксидаза, за счет различного содержания этого фермента. Если последнее допущение правильно, то должны быть растворы крови, которые при одинаковой интенсивности окраски проявляют различные пероксидазные свойства. Опыты с кровью людей и кроликов не подтвердили этого предположения. Кровь набиралась у людей из кончика пальца, у кроликов — из вены уха пипеткой в 20 кубических миллиметров. Тотчас же после взятия пробы крови гемолизировались в 20 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и полученные растворы (1 : 1000) располагались в 4 ряда по степени интенсивности их окраски. В каждом ряду неодинаково окрашенные растворы доводились соответственным разведением водой до интенсивности окраски самой слабой пробы (№ 1 каждого ряда). В неодинаково окрашенных растворах определялся показатель пероксидазы по методу Баха и Зубковой.

1 см<sup>3</sup> соответственных растворов крови смешивался с 7 см<sup>3</sup> воды, 1 см<sup>3</sup> 0,1%-ного раствора гваякола и 1 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора перекиси водорода, и после 15-минутного стояния при комнатной температуре количества окисленного гваякола определялись в колориметре Аутенрита. Клинический колориметр содержал соответствующую по цвету смесь азотнокислого кобальта и бихромата калия и был прокалиброван сравнением с окраской продуктов полного окисления (в присутствии растительной пероксидазы) определенных количеств гваякола. Показатель пероксидазы выражался в

тысячных долей миллиграмма гваякола, окисленного 1 см<sup>3</sup> раствора крови (1 : 1000) при данных условиях.

Полученные результаты помещены в табл. 1 и 2.

Столбец *A* означает первоначальные неодинаково окрашенные растворы крови (1 : 1000); столбец *B* — те же растворы после уравнивания их окраски соответственным разведением водой.

Таблица 1

*Показатели пероксидазы неодинаково и одинаково окрашенных растворов крови (людей)*

| № опыта | I ряд |    | II ряд |    | III ряд |    | IV ряд |    |
|---------|-------|----|--------|----|---------|----|--------|----|
|         | A     | B  | A      | B  | A       | B  | A      | B  |
| 1       | 36    | 36 | 37     | 36 | 50      | 49 | 31     | 32 |
| 2       | 42    | 35 | 45     | 37 | 52      | 49 | 46     | 32 |
| 3       | 46    | 36 | 47     | 36 | 54      | 50 | 51     | 32 |
| 4       | 52    | 36 | 49     | 38 | 54      | 49 | 52     | 33 |
| 5       | 54    | 35 | 52     | 36 | 57      | 49 | 56     | 33 |
| 6       | 61    | 36 | 54     | 36 | 60      | 49 | 59     | 32 |

Таблица 2

*Показатели пероксидазы неодинаково и одинаково окрашенных растворов крови (кроликов)*

| № опыта | I ряд |    | II ряд |    | III ряд |    | IV ряд |    |
|---------|-------|----|--------|----|---------|----|--------|----|
|         | A     | B  | A      | B  | A       | B  | A      | B  |
| 1       | 35    | 35 | 38     | 39 | 41      | 41 | 43     | 43 |
| 2       | 38    | 35 | 42     | 38 | 43      | 41 | 53     | 43 |
| 3       | 40    | 35 | 42     | 39 | 44      | 41 | 53     | 43 |
| 4       | 42    | 35 | 47     | 39 | 48      | 39 | 59     | 43 |
| 5       | 43    | 35 | 53     | 39 | 53      | 39 | 60     | 42 |
| 6       | 45    | 37 | 67     | 40 | 66      | 40 | 64     | 43 |

Из табл. 1 и 2 явствует, что растворы крови, которые первоначально имели неодинаковую интенсивность окраски и разные пероксидазные действия, после уравнивания их окраски дают одинаковые показатели пероксидазы. Эта тесная связь между интенсивностью окраски и пероксидазным действием говорит против предположения, что в крови наряду с оксигемоглобином встречается и особая пероксидаза.

**ОТНОШЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЯ ГЕМОГЛОБИНА К ПОКАЗАТЕЛЮ  
ПЕРОКСИДАЗЫ КРОВИ У ЛЮДЕЙ И У КРОЛИКОВ ЯВЛЯЕТСЯ  
ВЕЛИЧИНОЙ ПОСТОЯННОЙ**

Если оксигемоглобин является единственным пероксидазным агентом крови, то в пробах крови с различным содержанием красящего вещества и различной пероксидазной способностью должна быть прямая пропор-

циональность между первым и вторым, иначе говоря, отношение показателя гемоглобина к показателю пероксидазы должно быть постоянным. Опыты действительно это подтвердили. Для иллюстрации приводятся нижеследующие цифры (табл. 3).

Хотя содержание гемоглобина у людей и кроликов колеблется в довольно широких пределах (приблизительно около 40%), однако отношение показателя гемоглобина к показателю пероксидазы оказалось весьма постоянным. Это обстоятельство мы рассматриваем как веское доказательство того, что оксигемоглобин является единственным пероксидазным агентом крови. Конечно, можно еще предположить, что в животном организме все же встречается пероксидаза, подобная растительной и ассоциированная в постоянном отношении с красящим веществом крови, что дало бы иллюзию единого пероксидазного фермента. Однако такое предположение в данное время лишено всякого экспериментального обоснования.

Таблица 3

*Показатель гемоглобина по Сали и показатель пероксидазы по Баху и Зубковой*

| № опыта | У людей                |                        |                       | У кроликов             |                        |                       |
|---------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|
|         | показатель гемоглобина | показатель пероксидазы | отношение П.Г. : П.П. | показатель гемоглобина | показатель пероксидазы | отношение П.Г. : П.П. |
| 1       | 100                    | 61                     | 1.63                  | 90                     | 53                     | 1.69                  |
| 2       | 95                     | 54                     | 1.75                  | 105                    | 66                     | 1.59                  |
| 3       | 70                     | 42                     | 1.66                  | 73                     | 41                     | 1.78                  |
| 4       | 92                     | 52                     | 1.76                  | 75                     | 43                     | 1.74                  |
| 5       | 80                     | 46                     | 1.74                  | 80                     | 48                     | 1.66                  |
| 6       | 62                     | 36                     | 1.72                  | 76                     | 44                     | 1.72                  |
| 7       | 89                     | 54                     | 1.65                  | 83                     | 53                     | 1.56                  |
| 8       | 90                     | 54                     | 1.66                  | 96                     | 59                     | 1.62                  |
| 9       | 91                     | 54                     | 1.68                  | 96                     | 60                     | 1.60                  |
| 10      | 87                     | 50                     | 1.74                  | 101                    | 64                     | 1.57                  |
| 11      | 87                     | 52                     | 1.67                  | 84                     | 53                     | 1.58                  |
| 12      | 97                     | 60                     | 1.61                  | 70                     | 43                     | 1.62                  |
| 13      | 78                     | 45                     | 1.73                  | 79                     | 47                     | 1.66                  |
| 14      | 90                     | 52                     | 1.73                  | 68                     | 38                     | 1.78                  |
| 15      | 91                     | 54                     | 1.68                  | 72                     | 42                     | 1.71                  |
| 16      | 83                     | 47                     | 1.76                  | 72                     | 42                     | 1.71                  |
| 17      | 63                     | 37                     | 1.70                  | 89                     | 53                     | 1.67                  |
| 18      | 86                     | 49                     | 1.75                  | 101                    | 57                     | 1.77                  |
| 19      | 99                     | 59                     | 1.67                  | 74                     | 42                     | 1.76                  |
| 20      | 86                     | 51                     | 1.68                  | 68                     | 38                     | 1.78                  |
| 21      | 78                     | 46                     | 1.69                  | 68                     | 40                     | 1.70                  |
| 22      | 93                     | 56                     | 1.66                  | 63                     | 35                     | 1.80                  |
| 23      | 86                     | 52                     | 1.65                  | 75                     | 43                     | 1.74                  |
| 24      | 55                     | 31                     | 1.77                  | 76                     | 45                     | 1.69                  |

Среднее . . 1.69 { +0.08  
-0.06

Среднее . . 1.68 { +0.12  
-0.11

### СРАВНИТЕЛЬНЫЕ НАБЛЮДЕНИЯ НАД СВОЙСТВАМИ ОКСИГЕМОГЛОБИНА И РАСТИТЕЛЬНОЙ ПЕРОКСИДАЗЫ

Между пероксидазным действием оксигемоглобина и действием растительной пероксидазы не существует никакого качественного различия в отношении природы окисляемого субстрата. С другой стороны, принимая

во внимание, что Вильштеттер и Поллингер (1. с.) говорят о гемоглобине как о пероксидазном ферменте, хотя бы даже и «плохом», мы сочли небезынтесным ознакомиться с влиянием различных факторов на оксигемоглобин и растительную пероксидазу по возможности при сравнимых условиях.

### Влияние высокой температуры

Дважды перекристаллизованный оксигемоглобин (из собачьей крови) и очищенная посредством осаждения алкоголем пероксидаза (из хрена) растворялись в воде и полученные растворы соответственным разведением водой доводились до одинаковой силы пероксидазного действия. Пероксидазное действие подбиралось таким, чтобы 1 см<sup>3</sup> каждого раствора в смеси с 7 см<sup>3</sup> воды, 1 см<sup>3</sup> 0.1%-ного раствора гваякола и 1 см<sup>3</sup> 1%-ной перекиси водорода при комнатной температуре в течение 15 минут давал около 60 тысячных миллиграмма окисленного гваякола.

Из каждого раствора отмеривалось по 1 см<sup>3</sup> в 4 пробирки, которые затем сохранялись в водяной бане при 60°. Через определенные промежутки времени бралось по одной пробе и по охлаждении прибавлялось 7 см<sup>3</sup> воды, 1 см<sup>3</sup> гваякола, 1 см<sup>3</sup> перекиси водорода и после 15-минутного стояния при комнатной температуре окисленный гваякол определялся обычным образом. Подобные опыты были произведены также при 80 и 100°. Все опыты были повторены. Полученные результаты помещены в табл. 4.

Таблица 4

| Температура (в °C) |    | 60 |    |    |    |    | 80 |    |    |    | 100 |    |    |    |
|--------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|----|----|----|
|                    |    | 0  | 1  | 10 | 20 | 30 | 1  | 10 | 20 | 30 | 1   | 10 | 20 | 30 |
| Оксигемоглобин     | I  | 62 | 48 | 26 | 24 | 22 | 22 | 20 | 20 | 18 | 24  | 20 | 20 | 17 |
|                    | II | 60 | 48 | 26 | 25 | 20 | 23 | 20 | 20 | 20 | 22  | 19 | 19 | 18 |
| Пероксидаза        | I  | 64 | 49 | 41 | 38 | 36 | 37 | 20 | 14 | 6  | 15  | 0  | 0  | 0  |
|                    | II | 62 | 49 | 40 | 36 | 35 | 36 | 20 | 12 | 7  | 15  | 0  | 0  | 0  |

Вышеприведенные числа показывают, что по отношению к действию повышенной температуры между оксигемоглобином и растительной пероксидазой равной активности существует только та разница, что при 100° последняя разрушается полностью, тогда как первый теряет  $\frac{3}{4}$  своей активности.

### Влияние кислот

Из крови (собаки), оксигемоглобина (из собачьей крови) и пероксидазы (из хрена) были приготовлены растворы одинаковой пероксидазной силы. 1 см<sup>3</sup> из каждого раствора смешивался с 1 см<sup>3</sup> раствора гваякола, водой, повышающимися количествами серной кислоты и 1 см<sup>3</sup> перекиси водорода. Общий объем реакционной смеси в каждом случае равнялся 10 см<sup>3</sup>, нормальность кислотности смеси повышалась от 0.00001 до 0.1. После 15-минутного стояния при комнатной температуре количество окисленного гваякола определялось обычным образом. Параллельно с этим пробы из тех же растворов, предварительно нагретые до кипения, охлаждались и испытывались точно таким же образом, как и первые. При этом получились следующие результаты (табл. 5).

Таблица 5

## Влияние серной кислоты

|                        |                          | Серная кислота |          |         |        |       |      |    |
|------------------------|--------------------------|----------------|----------|---------|--------|-------|------|----|
|                        |                          | 0              | 0.00001N | 0.0001N | 0.001N | 0.01N | 0.1N |    |
| Некипяче-<br>ные пробы | Кровь . . . . .          | I              | 60       | 70      | 102    | 60    | 66   | 41 |
|                        |                          | II             | 62       | 70      | 100    | 61    | 66   | 42 |
|                        | Оксигемоглобин . . . . . | I              | 60       | 67      | 101    | 51    | 67   | 39 |
|                        |                          | II             | 57       | 64      | 96     | 50    | 65   | 39 |
|                        | Пероксидаза . . . . .    | I              | 59       | 52      | 42     | 29    | 0    | 0  |
|                        |                          | II             | 63       | 56      | 44     | 27    | 0    | 0  |
| Кипяченые<br>пробы     | Кровь . . . . .          | I              | 21       | 21      | 27     | 40    | 57   | 42 |
|                        |                          | II             | 20       | 21      | 29     | 42    | 60   | 44 |
|                        | Оксигемоглобин . . . . . | I              | 16       | 16      | 22     | 32    | 52   | 37 |
|                        |                          | II             | 17       | 17      | 21     | 34    | 53   | 36 |
|                        | Пероксидаза . . . . .    | I              | 0        | 0       | 0      | 0     | 0    | 0  |
|                        |                          | II             | 0        | 0       | 0      | 0     | 0    | 0  |

Как видно из приведенной таблицы, отношение растительной пероксидазы к серной кислоте иное, чем оксигемоглобина и крови. Растительная пероксидаза при возрастающей концентрации кислоты постепенно утрачивает свое пероксидазное действие и при концентрации 0.001 N серной кислоты становится совершенно недействительной. Пероксидазное действие растворов оксигемоглобина и крови под влиянием кислоты, наоборот, значительно повышается, достигая при 0.0001 N серной кислоты максимума, с тем чтобы при концентрации 0.1 N серной кислоты упасть до  $\frac{2}{3}$  своего первоначального действия. Это различие наблюдается еще отчетливее на кипяченых пробах. В то время как здесь активность пероксидазы совершенно исчезает, остаток пероксидазного действия кипяченых растворов крови и оксигемоглобина под влиянием кислоты повышается почти до первоначальной их величины, а затем при концентрации 0.1 N серной кислоты падает до того же уровня, как и в некипяченых пробах.

Причина увеличения пероксидазного действия оксигемоглобина заключается, по видимому, в повышении степени дисперсности его раствора под влиянием кислоты. Выше определенной концентрации кислоты происходит разрушение высокомолекулярного, содержащего железо комплекса, сопровождающееся ослаблением пероксидазного действия.

Опыты с соляной кислотой при тех же условиях дали следующие результаты (табл. 6).

Соляная кислота влияет на пероксидазное действие растворов крови и оксигемоглобина таким же образом, как и серная кислота.

## Влияние перекиси водорода

Тот факт, что красящее вещество крови при действии на него перекиси водорода быстро обесцвечивается и разрушается, известен давно. Однако нам представлялось интересным установить, как влияет перекись водорода



Таблица 6

## Влияние соляной кислоты

|                        |                          | Соляная кислота | 0  | 0.00001N | 0.0001N | 0.001N | 0.01N | 0.1N |
|------------------------|--------------------------|-----------------|----|----------|---------|--------|-------|------|
| Некипяче-<br>ные пробы | Кровь . . . . .          | { I             | 61 | 66       | 102     | 62     | 70    | 40   |
|                        |                          | { II            | 62 | 69       | 101     | 60     | 68    | 42   |
|                        | Оксигемоглобин . . . . . | { I             | 60 | 66       | 104     | 57     | 67    | 31   |
|                        |                          | { II            | 57 | 67       | 101     | 56     | 67    | 38   |
|                        | Пероксидаза . . . . .    | { I             | 59 | 51       | 42      | 29     | 0     | 0    |
|                        |                          | { II            | 62 | 50       | 43      | 30     | 0     | 0    |
| Кипяченые<br>пробы     | Кровь . . . . .          | { I             | 22 | 25       | 31      | 44     | 57    | 44   |
|                        |                          | { II            | 21 | 21       | 31      | 45     | 56    | 43   |
|                        | Оксигемоглобин . . . . . | { I             | 15 | 19       | 25      | 31     | 46    | 31   |
|                        |                          | { II            | 18 | 18       | 22      | 34     | 55    | 36   |
|                        | Пероксидаза . . . . .    | { I             | 0  | 0        | 0       | 0      | 0     | 0    |
|                        |                          | { II            | 0  | 0        | 0       | 0      | 0     | 0    |

на растворы крови, оксигемоглобина и растительной пероксидазы одинакового пероксидазного действия в условиях наших опытов.

1 см<sup>3</sup> раствора крови или оксигемоглобина и пероксидазы смешивался с 7 см<sup>3</sup> воды и 1 см<sup>3</sup> 1%-ной перекиси водорода и оставлялся на 10 минут при комнатной температуре. Затем к каждой пробе прибавлялось по 1 см<sup>3</sup> раствора гваякола и по истечении 15 минут пробы колориметрировались. В контрольных пробах смешивался 1 см<sup>3</sup> соответственного пероксидазного раствора с 7 см<sup>3</sup> воды и после 10-минутного стояния при комнатной температуре прибавлялись одновременно растворы гваякола и перекиси водорода. При этом получены следующие результаты (табл. 7).

Таблица 7

|                                          | Кровь                | Оксигемоглобин | Пероксидаза |
|------------------------------------------|----------------------|----------------|-------------|
|                                          | (в см <sup>3</sup> ) |                |             |
| Контрольные пробы .                      | 41                   | 40             | 40          |
| Пробы, стоявшие с перекисью водорода . . | 2                    | 1              | 36          |

В то время как при указанных условиях растительная пероксидаза едва ослаблена, красящее вещество как в крови, так и в чистом изолированном состоянии почти полностью теряет свое пероксидазное действие. Согласно еще не опубликованному исследованию Вильштеттера и Вебера, растительная пероксидаза по отношению к перекиси водорода гораздо устойчивее, чем это считалось до сих пор.

Процесс разрушения красящего вещества перекисью водорода в зависимости от времени действия был прослежен следующим образом. Из больших количеств реакционных смесей через определенные промежутки времени брались отдельные пробы и обрабатывались вышеописанным способом (табл. 8).

Таблица 8

| Продолжительность действия $H_2O_2$<br>(в мин.) | 0  | 2  | 4  | 6  | 8 | 10 |
|-------------------------------------------------|----|----|----|----|---|----|
| Кровь (в $см^3$ ) . . . . .                     | 41 | 27 | 17 | 10 | 4 | 2  |
| Оксигемоглобин (в $см^3$ ) . . . . .            | 40 | 24 | 14 | 6  | 2 | 0  |

Действует ли гваякол в процессе окисления на оксигемоглобин защитным образом, пока остается невыясненным. Следует еще заметить, что красящее вещество крови разрушается органическими перекисями так же, как и перекисью водорода.

#### Влияние окиси углерода

Так как гемоглобин соединяется как с кислородом, так и с окисью углерода, то нами исследовано и влияние окиси углерода на растворы крови, гемоглобина и растительной пероксидазы с одинаковым пероксидажным действием.

Растворы крови (1 : 1000), гемоглобина и пероксидазы обрабатывались окисью углерода в течение 15 минут при комнатной температуре. После этого обычным образом определялось пероксидазное действие как в содержащих окись углерода пробах, так и в контрольных (не содержащих таковой) пробах. Полученные результаты приведены в табл. 9.

Таблица 9

|                                         | Кровь       | Оксигемоглобин | Пероксидаза |
|-----------------------------------------|-------------|----------------|-------------|
|                                         | (в $см^3$ ) |                |             |
| Контрольные пробы .                     | 59          | 64             | 60          |
| Пробы, обработанные окисью углерода . . | 59          | 64             | 60          |

Как видно, окись углерода не оказывает ни малейшего влияния на пероксидазное действие гемоглобина и пероксидазы.

#### Ход реакции окисления гваякола оксигемоглобином и пероксидазой в присутствии перекиси водорода

Как было упомянуто, вначале Чигларж и Фюрт наблюдали, что при окислении лейкоформы малахитовой зелени растительной пероксидазой в присутствии перекиси водорода получается кривая, характерная для ферментных действий, тогда как при окислении лейкоформы оксигемоглобином этого не наблюдалось. Мы проследили количественно ход применяемой нами реакции с растворами оксигемоглобина и пероксидазы

одинакового пероксидазного действия и получили следующие данные (табл. 10).

Таблица 10

| Время (в мин.) |    | 1  | 3  | 5  | 7  | 9  | 11 | 13 | 15 |
|----------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Оксигемоглобин | I  | 47 | 69 | 72 | 74 | 74 | 74 | 74 | 74 |
|                | II | 45 | 69 | 71 | 74 | 74 | 74 | 74 | 74 |
| Пероксидаза    | I  | 12 | 37 | 55 | 61 | 64 | 66 | 68 | 69 |
|                | II | 11 | 39 | 55 | 60 | 64 | 66 | 67 | 69 |

Эти данные изображены на прилагаемом рисунке в форме кривой.

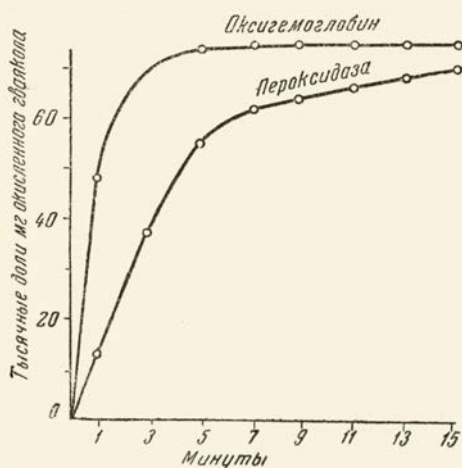


Рис. 1

Совершенно ясно видно, что между оксигемоглобином и пероксидазой в отношении кинетики их пероксидазного действия никакого принципиального различия не существует.

#### ОПЫТЫ С АДОРБЦИЕЙ РАСТИТЕЛЬНОЙ ПЕРОКСИДАЗЫ ОКСИГЕМОГЛОБИНОМ

Исходя из предположения о возможности существования какого-либо сродства между оксигемоглобином и растительной пероксидазой, мы попытались адсорбировать пероксидазу оксигемоглобином.

Эритроциты собачьей крови растворялись частью в чистой воде, а часть в водном растворе пероксидазы, и из растворов обычным образом выкристаллизовывался оксигемоглобин.

Кристаллы обоих сортов оксигемоглобина растворялись в воде и из полученных растворов, а равным образом из обоих маточных растворов путем соответственного разведения водой готовились одинаковые по интенсивности окраски пробы, пероксидазное действие которых определялось, как было описано выше (табл. 11).

Таблица 11

|                     | Оксигемоглобин |                                  | Маточные растворы |                                |
|---------------------|----------------|----------------------------------|-------------------|--------------------------------|
|                     | из чистой воды | из водно-пероксидазного раствора | в чистой воде     | в пероксидазе, содержащей воду |
| Проба Ia . . . . .  | 32             | 33                               | 33                | 54                             |
| » Ib . . . . .      | 32             | 32                               | 32                | 54                             |
| Проба IIa . . . . . | 75             | 75                               | 75                | 94                             |
| » IIb . . . . .     | 76             | 76                               | 75                | 94                             |

Из этих данных видно, что оксигемоглобин, кристаллизовавшийся в присутствии растительной пероксидазы, после первой кристаллизации обладает тем же пероксидазным свойством, что и оксигемоглобин, кристаллизовавшийся при обычных условиях; пероксидаза же остается в маточном растворе. Следовательно, растительная пероксидаза оксигемоглобином не адсорбируется.

### ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

То обстоятельство, что пробы крови после выравнивания их степени окраски всегда проявляют одинаковое пероксидазное действие, а также и постоянство величины отношения «индекс гемоглобина: индекс пероксидазы» в пробах крови с различным содержанием гемоглобина, — все это заставляет признать, что в крови наряду с гемоглобином не содержится никакого фермента, подобного растительной пероксидазе. Пероксидазная способность крови полностью покрывается такой же способностью оксигемоглобина. Так как, пользуясь определенным коэффициентом, всегда можно по индексу гемоглобина вычислить индекс пероксидазы, определение последней химическим путем утрачивает свой смысл. В обоих случаях дело сводится к колориметрированию, и, разумеется, следует предпочесть более простое, прямое колориметрирование гемоглобина по Сали определению продуктов окисления гваякола или какого-либо другого субстрата. Менее ясен вопрос о природе пероксидазных агентов молока, лейкоцитов и т. д. Имеем ли мы железосодержащие производные кровяного пигмента или истинные пероксидазы — может быть решено только дальнейшим исследованием.

Большой интерес представляет далее вопрос, можно ли отнести оксигемоглобин в одну категорию с биологическими катализаторами или ферментами. Если для этого есть достаточно веские основания, то в оксигемоглобине мы имели бы первый, хотя и давно известный случай химически вполне определенного энзима, могущего быть выделенным из организма в почти неизменном виде. На самом деле свойства оксигемоглобина вполне соответствуют понятию фермента. Он несомненно является катализатором, притом катализатором биологическим, вырабатываемым живой клеткой. Он термолабилен, хотя и в ограниченной степени. Известная устойчивость по отношению к высокой температуре еще не говорит против ферментной природы оксигемоглобина. Одному из нас (А. Баху) удалось получить при помощи ультрафильтрации очень чистый препарат пероксидазы из хрена, который даже после продолжительного кипячения не утрачивал полностью своей активности\*. В имеющей в скором времени быть

\* Неопубликованное наблюдение.

опубликованной работе А. Баха и А. Опарина было установлено, что многие ферменты после полного инактивирования нагреванием могут, при известных условиях, в большей или меньшей степени восстанавливать свою активность. В меньшем соответствии с обычными представлениями о ферментах находится отношение оксигемоглобина к кислотам. В отличие от растительной пероксидазы, которая нацело разрушается уже 0.01 *N* серной кислотой, оксигемоглобин при этой кислотности сохраняет свою исходную каталитическую способность; даже в 0.1 *N* серной кислоте способность эта уменьшается всего на  $\frac{1}{3}$ . Но эти различия имеют только количественный, а не качественный характер, так как и растительная пероксидаза может переносить сравнительно высокие концентрации кислоты. Если, кроме того, принять во внимание, что с точки зрения кинетики пероксидазного действия между оксигемоглобином и пероксидазой, вопреки мнению Фюрта и Чигларжа, нет никакого различия, то мы приходим к заключению, что ничто не мешает нам рассматривать оксигемоглобин как пероксидазный фермент.

5 октября 1925 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бах совм. с Зубковой. Сб. работ по чистой и прикл. химии.— Тр. Хим. ин-та им. Л. Я. Карпова, **1**, 65 (1923); настоящая книга, стр. 537.
2. Willstätter u. Pollinger. *Zs. physiol. Chem.*, **130**, 281 (1923).
3. Linossier. *C. R. Soc. Biol.*, **50**, 373 (1898).
4. Moitessier. *C. R. Soc. Biol.*, **57**, 373 (1904).
5. Czyhlarz u. Fürfh. *Beitr. Chem. Physiol. u. Pathol.*, **10**, 358 (1907).
6. Buckmaster. *J. Physiol.*, **37** (1908).
7. Pighini. *Arch. di fisiologie*, **4**, 67 (1907).
8. Senter. *J. Physiol.*, **36** (1907).
9. Battelli u. a. *Biol. Zs.*, **13**, 44 (1908).
10. Wolf u. Stöcklin. *C. R. Acad. Sci., Paris*, **15**, (151) 483 (1910).

---

## ОБ ОБРАЗОВАНИИ ФЕРМЕНТОВ В ПРОРАСТАЮЩИХ ЗЕРНАХ

[*Ueber die Fermentsbildung in keimenden Pflanzensammen*] \*

(Совместно с А. Опарным)

Вопрос об образовании ферментов в прорастающих зернах был предметом многочисленных исследований; однако имеющийся довольно обширный фактический материал не дает еще детального понимания истории развития и совместной деятельности ферментов клетки во время процесса прорастания<sup>1</sup>. Почти во всех работах рассматривалось образование только одного определенного фермента и не принималась во внимание деятельность других ферментов клетки. Так, например, Кьельдаль<sup>2</sup> и Браун и Морис<sup>3</sup> изучали образование амилазы в прорастающих злаках, Вайс<sup>4</sup> — образование протеазы и т. д. Так как опыты проводились на различных материалах и в различных условиях, то систематизация имеющихся данных по образованию ферментов во время прорастания бесцельна. Для выяснения роли ферментов в экономике живого организма понимание их одновременного образования и совместной деятельности не менее существенно, чем знание свойств изолированных ферментов. Исходя из этих соображений, мы поставили себе целью определить одновременное развитие каталазы, пероксидазы, оксигеназы, амилазы и протеазы в прорастающих зернах. В настоящей статье мы приводим результаты этих исследований.

### МЕТОДИКА

#### Подготовка материала

Для опытов применялись тщательно отобранные семена пшеницы и подсолнуха, способность к прорастанию которых была проверена. Порции по 2500 зерен размачивались в водопроводной воде в течение 24 часов и затем оставлялись для прорастания завернутые в полотно, положенное на влажные опилки, находящиеся в плоских чашках, в темноте, в термостате при 25°, причем тщательно соблюдалась определенная степень влажности. Через известные промежутки времени отбирались пробы по 300 проросших зерен, высушивались между листами фильтровальной бумаги, нарезались ножницами на маленькие куски и сушились предварительно в термостате при 40° в течение 5 часов. Семена подсолнуха до обработки очищались от лузги. После этой предварительной сушки в термостате зерна выдерживались в вакуум-эксикаторе над серной кислотой в течение

---

\* *Biochem. Zs.*, 134, 183 (1922).

5 часов, затем тонко растирались, просеивались сквозь сито с отверстиями 0.25 мм и хранились дальше в эксикаторе. Нарезанные на более крупные части проросшие семена подсолнуха сначала частично обезжиривались промыванием бензином, затем растирались в порошок, еще раз промывались бензином, просеивались и хранились в эксикаторе. Все пробы, отобранные через различные промежутки времени, хранились до конца опытов по прорастанию в эксикаторе и затем исследовались одновременно. Помимо определения названных выше ферментов, по причинам, которые будут указаны ниже, в пробах определялось еще содержание общего азота.

### Определение каталазы

1 г порошка, отобранный от каждой из подготовленных указанным образом проб, растирался с 50 см<sup>3</sup> воды; смесь оставлялась при комнатной температуре на 4 часа и фильтровалась затем через сухой фильтр. 20 см<sup>3</sup> прозрачного фильтрата наливались в эрленмейеровскую колбу и разбавлялись равным объемом воды; после прибавления 3—5 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора перекиси водорода (Мерк) смесь оставлялась при комнатной температуре на 30 минут, затем подкислялась 3 см<sup>3</sup> 10%-ной серной кислоты и титровалась раствором 0.1 N марганцовокислого калия до постоянного розового окрашивания. Одновременно ставились контрольные опыты с соответственными инактивированными экстрактами при прочих равных условиях. Инактивирование экстрактов достигалось путем 5-минутного нагревания на кипящей водяной бане. Разность между количеством потребленного перманганата в контрольном и в основном опытах соответствует количеству разложившейся перекиси водорода и характеризует содержание каталазы в исследуемой пробе.

### Определение пероксидазы

Экстракты, необходимые для определения пероксидазы, готовились таким же образом, как и для определения каталазы. **О с н о в н о й о п ы т:** 20 см<sup>3</sup> экстракта, 20 см<sup>3</sup> воды, 5 см<sup>3</sup> 10%-ного раствора пирогаллола, 5 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора перекиси водорода. **К о н т р о л ь н ы й о п ы т:** 20 см<sup>3</sup> инактивированного экстракта, остальное — как в основном опыте. Смеси оставлялись на 24 часа при 25°; образовавшийся пурпурогалин определялся титрометрически по методу Баха и Збарского<sup>5</sup>. Смеси фильтровались через трубки с асбестом (для этого вполне подходят обыкновенные хлоркальциевые трубки); осадок пурпурогалина промывался холодной водой до тех пор, пока промывная вода не переставала восстанавливать перманганат калия, и затем растворялся количественно в концентрированной серной кислоте. Растворы разбавлялись 7-кратным объемом воды и титровались раствором 0.1 N KMnO<sub>4</sub> до постоянного розового окрашивания. Перед концом титрования следует жидкость подогреть, что значительно ускоряет достижение конечной точки титрования. Разность между количеством потребленного перманганата в контрольном и в основном опытах является мерой действия пероксидазы.

### Определение оксигеназы

Большинство растительных материалов содержит наряду с пероксидазой также оксигеназу, т. е. вещество, которое обладает свойствами фермента, поглощает молекулярный кислород, образуя перекись, и составляет совместно с пероксидазой окислительную систему («полную оксидазу», кото-

рая по своему действию вполне равноценна системе «пероксидаза—перекись водорода»). Так как оксигеназа значительно менее устойчива, чем пероксидаза, то часто случается, что исследуемый материал содержит меньше оксигеназы, чем необходимо для полного использования пероксидазы. В этом случае добавление перекиси водорода вызывает дальнейшее окисление. В противоположном случае перекись водорода не оказывает никакого влияния и даже задерживает окисление. Причина последнего явления еще не вполне выяснена. По всей вероятности, в этом случае оксигеназа превращается под действием активного кислорода перекиси водорода в устойчивую окись, которая уже не обладает способностью поглощать молекулярный кислород с образованием перекиси, чем вызывается одновременно прямое и косвенное снижение количества активного (перекисного) кислорода в системе.

Для определения оксигеназы в эрленмейеровскую колбу наливают 20 см<sup>3</sup> экстракта, 25 см<sup>3</sup> воды и 5 см<sup>3</sup> 10%-ного раствора пирогаллола; смесь ставят на 24 часа в термостат при 25° и время от времени взбалтывают. В качестве контроля служит одновременный опыт с инактивированным экстрактом. Образовавшийся пурпурогалин затем титруют, как и для определения пероксидазы, раствором 0.1 N перманганата калия.

#### Определение амилазы

По 2 г от каждой пробы растирают с 5 см<sup>3</sup> воды и оставляют после прибавления толуола в термостате при 35° на 24 часа для осахаривания. В опытах с прорастающими семенами подсолнуха в каждом случае прибавлялось 0.2 г пшеничного крахмала. Контрольные опыты проводились как обычно. Определение образовавшегося сахара производилось по известному методу Бертрана — титрованием раствором 0.1 N KMnO<sub>4</sub>.

#### Определение протеазы

По 2 г вещества от каждой пробы растирались в 50 см<sup>3</sup> воды и после прибавления толуола оставались на 48 часов в термостате при 35°. Смесь затем кипятилась по методу Барнштейна<sup>6</sup>, после чего к ней прибавлялось 25 см<sup>3</sup> сернокислой меди (60 г CuSO<sub>4</sub> в 1 л) и 25 см<sup>3</sup> едкого натра (12.5 г NaOH в 1 л) при размешивании. После осаждения прозрачная жидкость фильтровалась, а осадок промывался сначала декантированием, а затем на фильтре до тех пор, пока промывная вода не переставала давать реакции на медь. В заключение высушенные осадки сжигались по Кьельдалю и образующийся аммиак титровался 0.1 N серной кислотой. В контрольных опытах по 2 г вещества в 50 см<sup>3</sup> воды кипятились без предварительного хранения в термостате и затем обрабатывались далее, как в основном опыте. Разность между количеством потребленной серной кислоты в контрольном и основном опытах дает (в кубических сантиметрах 0.1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) белковый азот, который отщепился под действием протеазы.

#### Определение общего азота

Общий азот определялся в пробах непосредственно по Кьельдалю по обычному методу.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ОПЫТОВ

Для того чтобы можно было сравнивать результаты различных анализов, их обычно относят к единице веса сухого вещества, рассматривающейся как постоянный фактор.



Однако в данном случае такое представление результатов опытов нецелесообразно: процесс прорастания связан с существенным уменьшением количества сухого вещества вследствие сгорания углерода и водорода при дыхании. Отношение «фермент : сухое вещество» может поэтому возрастать даже при неизменном абсолютном количестве фермента, создавая ошибочное представление об увеличении последнего. Независимо от трудностей, которые представляет доведение прорастающего материала до постоянного веса без потери вещества, обычный метод представления результатов опыта приводит, таким образом, сам по себе к ошибочным понятиям. Единственным фактором, который остается во время прорастания практически без изменения, является содержание общего азота в исследуемом материале, так как незначительные количества вещества, содержащего азот, теряющиеся в окружающем пространстве, можно не принимать во внимание.

Поэтому мы решили относить результаты анализа к этому фактору и перечислять содержание ферментов к каждой пробе на 100 мг общего азота; с этой целью определение общего азота проводилось во всех пробах. Так как действие каталазы, пероксидазы, оксигеназы и амилазы может наблюдаться количественно, то это дает возможность производить непосредственное сравнение одновременной деятельности этих ферментов. Косвенно можно сравнить и действие протеазы с действием других ферментов.

### ОБРАЗОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ В ПРОРАСТАЮЩЕЙ ПШЕНИЦЕ

Мы произвели описанным выше способом два параллельных опыта с порциями по 2500 зерен пшеницы. Зерна принадлежали к одной и той же расе и были взяты с одного участка, но материал для первой серии опытов был взят из урожая 1919 г., а для второй серии из урожая 1921 г. В нижеприведенной таблице сведены полученные результаты. Каждое из приведенных чисел является средним по меньшей мере двух определений.

*Количество ферментов в прорастающих пшеничных зернах*  
(перечисленное на 100 мг общего азота)

| Время<br>(в днях) | Каталаза                               |         | Пероксидаза |         | Оксигеназа |         | Амилаза |         | Протеаза                                            |         |
|-------------------|----------------------------------------|---------|-------------|---------|------------|---------|---------|---------|-----------------------------------------------------|---------|
|                   | 1919 г.                                | 1921 г. | 1919 г.     | 1921 г. | 1919 г.    | 1921 г. | 1919 г. | 1921 г. | 1919 г.                                             | 1921 г. |
|                   | см <sup>3</sup> 0.1N KMnO <sub>4</sub> |         |             |         |            |         |         |         | см <sup>3</sup> 0.1N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> |         |
| 0                 | 188.0                                  | 240.5   | 80.5        | 90.0    | 85.0       | 135.0   | 4.5     | 5.0     | 2.0                                                 | 2.5     |
| 1                 | 174.0                                  | 225.5   | 75.5        | 64.5    | 88.5       | 134.0   | 4.5     | 4.0     | 2.5                                                 | 3.0     |
| 2                 | 199.5                                  | 283.5   | 90.5        | 115.0   | 104.5      | 161.5   | 6.5     | 9.0     | 6.0                                                 | 7.5     |
| 3                 | 280.5                                  | 565.5   | 179.5       | 266.5   | 123.5      | 195.0   | 10.5    | 15.5    | 10.5                                                | 17.5    |
| 4                 | 478.5                                  | 562.2   | 318.5       | 458.0   | 143.5      | 211.0   | 20.5    | 52.5    | 22.0                                                | 30.0    |
| 6                 | 454.5                                  | 472.5   | 586.0       | 793.5   | 182.5      | 227.5   | 83.5    | 99.0    | 66.0                                                | 82.0    |
| 8                 | 380.0                                  | 278.0   | 756.5       | 825.5   | 197.5      | 197.0   | 107.5   | 114.0   | 92.5                                                | 100.5   |
| 11                | 203.0                                  | 139.5   | 729.5       | 688.0   | 159.0      | 158.5   | 98.5    | 114.5   | 90.0                                                | 91.0    |

Из этой таблицы видно, что рассматриваемые нами ферменты существуют уже в хранящихся зернах и что дыхательные ферменты (каталаза, пероксидаза, оксигеназа) содержатся в них в значительно большем количестве, чем гидролитические ферменты (амилаза, протеаза). Через 2 дня после начала опыта во всех случаях наблюдается заметное увеличение

количества фермента. Количество образующегося фермента затем возрастает до определенного максимума и вновь спадает. Максимальное значение достигается для каталазы на 3 и 4-й день, для других ферментов на 6 и 8-й день. Обращает на себя внимание соотношение между начальным значением и максимальным. Зерна урожая 1919 г. содержат значительно меньше ферментов, чем зерна урожая 1921 г. Если сравнить эти соотношения для каждого фермента в обеих сериях опытов, то получаются следующие результаты:

Начальное значение : максимальное значение

|         | Каталаза | Пероксидаза | Оксигеназа | Амилаза  | Протеаза |
|---------|----------|-------------|------------|----------|----------|
| 1919 г. | 1 : 2.4  | 1 : 9.3     | 1 : 2.3    | 1 : 46.2 | 1 : 23.9 |
| 1921 г. | 1 : 1.9  | 1 : 9.1     | 1 : 1.7    | 1 : 42.8 | 1 : 22.8 |

Таким образом, пшеничные зерна, имеющие в состоянии покоя более высокое содержание ферментов, производят их во время прорастания в сравнительно меньшем количестве, чем зерна с более низкими начальными показателями. Это явление еще отчетливее, если сравнить образование дыхательных ферментов с образованием гидролитических ферментов на одном и том же материале. Так, например, в зернах урожая 1919 г. достигнуто максимальное значение всего в 2.4 раза больше начального для каталазы и в 46.2 раза больше для амилазы. В состоянии покоя содержание каталазы в зернах соответствовало 188.0, содержание амилазы —  $4.5 \text{ см}^3 0.1 N \text{ KMnO}_4$ . Объяснение этого явления мы пока еще дать не можем.

Все приведенные выше числа выражают не абсолютное, а относительное действие фермента, т. е. то действие фермента, которое наблюдается при данных условиях, при одновременной активности всех других ферментов, содержащихся в экстракте. При изменении условий действие ферментов приобретает совершенно другой характер. В качестве примера можно привести следующий опыт.

В наших исследованиях наблюдалось в одном случае ненормальное действие каталазы, которое позволило предположить, что в соответствующем экстракте имело место ферментативное повышение кислотности. Две порции проросшего материала были переработаны описанным выше способом для получения экстракта, с той только разницей, что к одной из проб было прибавлено до экстракции 0.2 г углекислого кальция. Оба экстракта приготавливались в присутствии толуола. Одновременно с основными опытами ставились контрольные опыты с инактивированными экстрактами. Каталаза определялась описанным выше методом.

Количество каталазы в  $1 \text{ см}^3 0.1N \text{ KMnO}_4$

(перечисленное на 100 мг общего азота)

| Время (в днях)                          | 0     | 1     | 3      | 4      | 6      | 8      | 1      |        |
|-----------------------------------------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Без $\text{CaCO}_3$ . . . . .           | 224.0 | 224.0 | 285.0  | 565.5  | 563.5  | 474.5  | 279.0  | 139.0  |
| В присутствии $\text{CaCO}_3$ . . . . . | 240.0 | 210.0 | 1275.0 | 1870.0 | 2164.0 | 2613.0 | 2462.0 | 1985.0 |

Нейтрализация образующейся в экстракте кислоты, а может быть, также и задержка действия других ферментов вызвали, таким образом, огромное увеличение активности каталазы. Это веское доказательство

того, что при определении действия ферментов мы имеем дело с рядом реакций, которые протекают частично в одном направлении, а частично в различных направлениях. Те величины, которые определяются количественно при действии ферментов, являются лишь равнодействующими многочисленных, в большей части еще не исследованных процессов.

### ОБРАЗОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ В ПРОРАСТАЮЩИХ ПОДСОЛНЕЧНЫХ СЕМЕНАХ

Образование ферментов в прорастающих подсолнечных семенах исследовалось так же, как в пшеничных зернах. При определении амилазы к каждой пробе прибавлялось 0.2 г пшеничного крахмала. Полученные результаты сведены в следующей таблице.

*Количество ферментов в прорастающих подсолнечных семенах*  
(перечисленное на 100 мг общего азота)

| Время<br>(в днях) | Каталаза                               | Пероксидаза | Оксигеназа | Амилаза | Протеаза                                            |
|-------------------|----------------------------------------|-------------|------------|---------|-----------------------------------------------------|
|                   | см <sup>3</sup> 0.1N KMnO <sub>4</sub> |             |            |         | см <sup>3</sup> 0.1N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> |
| 0                 | 1131.0                                 | 41.0        | 87.0       | 12.0    | 0.0                                                 |
| 1                 | 811.0                                  | 30.5        | 89.0       | 12.0    | 5.0                                                 |
| 2                 | 1342.0                                 | 45.5        | 124.5      | 12.5    | 9.5                                                 |
| 3                 | 3509.0                                 | 90.0        | 135.5      | 17.0    | 19.0                                                |
| 4                 | 5316.5                                 | 120.5       | 143.0      | 21.0    | 31.5                                                |
| 6                 | 5588.5                                 | 140.0       | 148.0      | 36.0    | 58.5                                                |
| 8                 | 3923.0                                 | 119.0       | 143.0      | 41.5    | 55.5                                                |
| 11                | 2153.0                                 | 92.0        | 140.0      | 50.0    | 41.0                                                |
| 16                | 815.5                                  | 67.0        | 135.5      | 39.5    | 16.0                                                |

По сравнению с прорастающими пшеничными зернами в прорастающих подсолнечных семенах имеется значительно больше каталазы и меньше пероксидазы, амилазы и протеазы при приблизительно одинаковом количестве оксигеназы.

### ВЫВОДЫ

Образование ферментов в прорастающих зернах пшеницы и семенах подсолнуха определялось количественно методом, который позволял выражать действие каталазы, пероксидазы, оксигеназы и амилазы в кубических сантиметрах 0.1 N раствора перманганата калия и действие протеазы в кубических сантиметрах 0.1 N серной кислоты. Результаты анализа приведены не к единице сухого вещества, которое непрерывно убывает в прорастающих в темноте зернах, а к единице общего азота, который остается практически постоянным при прорастании. И в пшеничных зернах, и в подсолнечных семенах количество дыхательных ферментов (каталазы, пероксидазы, оксигеназы) значительно больше, чем гидролитических ферментов (амилазы, протеазы), как в состоянии покоя, так и при прорастании.

Количество ферментов в зернах возрастает во время прорастания до определенного максимума и затем вновь убывает. В прорастающей

пшенице количество каталазы достигает максимального значения между 3 и 4-м днем, количество других ферментов — между 6 и 8-м днем. В прорастающих подсолнечных семенах все ферменты достигают максимального значения на 6—7-й день.

Содержание каталазы в прорастающих подсолнечных семенах значительно выше, содержание других ферментов значительно ниже, чем в прорастающих пшеничных зернах.

Прибавление углекислого кальция к пробам прорастающих пшеничных зерен до экстракции вызывает чрезвычайно большое увеличение активности каталазы. Таким образом, изменение свойств экстракта изменяет протекающее в нем действие ферментов. Из этого следует, что при определении действия ферментов измеряется не само действие как таковое, а всегда лишь равнодействующая нескольких реакций, в большинстве случаев еще не исследованных, протекающих отчасти в одном и том же направлении, отчасти в различных направлениях.

16 августа 1922 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Литературу см. Чапек. Биохимия растений.
2. Kieldahl C. R. trav. lab. Carlsberg, 1, 189 (1881).
3. Brown a. Morris. C. R. Acad. Sci., Paris, 130 (1900).
4. Weiss. Zs. physiol. Chem., 31, 79 (1900).
5. Бах совм. со Збарским. Biochem. Zs., 34, 473 (1911); настоящая книга, стр. 446
6. Barnstein. Landw. Versuchsst., 54, 328 (1900).

---

## ЗНАЧЕНИЕ КИСЛОРОДА ДЛЯ ОБРАЗОВАНИЯ ФЕРМЕНТОВ В ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЕНАХ \*

(Совместно с А. И. Опариным)

Исследуя количественно образование ферментов каталазы, пероксидазы, оксигеназы, амилазы и протеазы в процессе прорастания семян, А. Бах и А. Опарин<sup>1</sup> нашли, что:

- 1) покоящиеся семена (пшеницы и подсолнуха) содержат более или менее значительные количества названных ферментов;
- 2) количества ферментов дыхания (каталазы, пероксидазы и оксигеназы) во много раз превышают количества ферментов пищеварения (амилазы и протеазы);
- 3) начиная с первого дня прорастания, количества всех ферментов постепенно возрастают, достигают максимума на 4—7-й день и затем постепенно понижаются;
- 4) ферменты дыхания возрастают относительно гораздо меньше, чем ферменты пищеварения.

В дальнейшей работе Опарин<sup>2</sup> показал, что присутствие кислорода необходимо для образования ферментов в прорастающих семенах. Выдерживая прорастающий материал попеременно сутки в атмосфере кислорода или воздуха, сутки в атмосфере водорода, он установил, что в последнем случае никакого новообразования ферментов не наблюдается, тогда как после перенесения материала в атмосферу кислорода происходит энергичное образование ферментов.

Каково значение кислорода для образования ферментов? Тут возможны два предположения: 1) кислород косвенно необходим для образования ферментов, так как в отсутствии кислорода нет образования новых клеток, а следовательно, нет и новообразования ферментов, и 2) кислород непосредственно необходим для окисления каких-то составных частей клеток, из которых образуются ферменты. Для решения этого вопроса нами и предпринята предлагаемая работа, сводящаяся к исследованию увеличения содержания ферментов в убитых растительных материалах.

Некоторыми авторами уже указывалось, что в растительных материалах, не содержащих живых клеток, наблюдается заметное увеличение количества ферментов. Любименко<sup>3</sup> нашел увеличение пероксидазы в выжатом соке спелых томатов при стоянии с антисептиками. Он объясняет свое наблюдение тем, что антисептики разрушают особого рода «антипероксидазу», препятствующую окислительным процессам.

---

\* Сб. работ чистой и прикл. химии.—Тр. Хим. ви-та им. Л. Я. Карпова, 1, 81 (1923).

Аналогичное наблюдение сделано Палладиным<sup>4</sup> над увеличением пероксидазы в наркотизированных и убитых замораживанием семенах. По его мнению, это увеличение обуславливается автолизом материала, влекущим за собой освобождение связанного фермента. Роль кислорода в этом процессе авторами не была принята во внимание.

Наши исследования над окислением автолитических смесей кислородом воздуха велись следующим образом. Семена пшеницы проращивались, высушивались и измельчались так, как описано в цитированных выше статьях, а именно: отобранные и проверенные на всхожесть семена вымачивались в течение суток в водопроводной воде и затем высеивались между двумя мокрыми кусками льняного полотна, положенными на влажные опилки, находящиеся в плоских глиняных чашках. Проращивание велось в термостате при 25°. Опилки, в которых лежали семена, все время поддерживались во влажном состоянии. Через определенные промежутки времени брались пробы ростков. Вынутые ростки обсушивались фильтровальной бумагой, разрезались ножницами на мелкие куски и высушивались в течение 5 часов в термостате при 40°. По истечении указанного времени материал помещался на 5 часов в вакуум-эксикатор над серной кислотой, затем измельчался, просеивался через 0.25 мм сито и вновь помещался в эксикатор.

Каждая полученная таким образом проба, представляющая собой муку ростков определенного возраста, делилась на три части. Навески из первой части смешивались на часовом стекле с чистым, очень мелко растертым мелом, с небольшим количеством воды и толуолом (на 1 г муки 0.5 г мела, 3—4 см<sup>3</sup> воды и 15—20 капель толуола). Довольно густая кашица размазывалась по стеклу и затем стекло ставилось в эксикатор, наполненный кислородом и содержащий на дне слабый раствор щелочи и некоторое количество толуола. Стеклянная палочка, которой производилось размазывание, с остатками прилипшего к ней вещества также помещалась в эксикатор. Навески из второй части пробы смешивались в маленьких стаканчиках с таким же количеством мела, воды и толуола и помещались в эксикатор, наполненный азотом. Навески из третьей части оставлялись сухими для контроля.

По истечении двух дней все навески количественно смывались в мерные колбочки и выдерживались в течение двух часов, после чего брались пробы для определения количества ферментов.

Самое определение велось следующим образом.

#### ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАТАЛАЗЫ

Содержимое колбочки фильтровалось через сухой фильтр, 5—10 см<sup>3</sup> фильтрата разбавлялось в эрленмейеровской колбе равным количеством воды, затем сюда же добавлялось 3—5 см<sup>3</sup> 1%-ной перекиси водорода (Мерк); смесь оставлялась в течение 30 минут при комнатной температуре, потом подкислялась 2 см<sup>3</sup> 10%-ной серной кислоты и титровалась 0.1 N раствором перманганата до появления устойчивого розового окрашивания. Одновременно с этим ставился при совершенно тех же условиях контрольный опыт с инактивированным экстрактом. Инактивирование достигалось 5-минутным нагреванием экстракта в кипящей водяной бане. Разность между количеством перманганата, потребленным в контрольном и основном опытах, обусловленная количеством разложившейся перекиси водорода, принималась за меру содержания каталазы в исследуемой пробе.

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРОКСИДАЗЫ

Для определения употреблялся экстракт, полученный фильтрованием содержимого колбочки через сухой фильтр. Основной опыт: 10—20 см<sup>3</sup> экстракта, 20 см<sup>3</sup> воды, 5 см<sup>3</sup> 10%-ного раствора пирогаллола, 5 см<sup>3</sup> 1%-ной перекиси водорода. К о н т р о л ь н ы й о п ы т: 10—20 см<sup>3</sup> инактивированного экстракта; все остальные условия те же, что и в основном опыте. Смесь оставлялась в течение 24 часов при 25°; образовавшийся при этом пурпурогалин определялся титрометрически по методу Баха и Збарского<sup>5</sup>. Смесь фильтровалась через асбестовый фильтр, осадок пурпурогалина промывался холодной водой до тех пор, пока промывные воды больше не восстанавливали перманганата; затем пурпурогалин количественно растворялся в концентрированной серной кислоте, раствор разбавлялся семью объемами воды и титровался 0.1 N KMnO<sub>4</sub>. Бывает полезно к концу титрования нагреть раствор; таким образом можно получить наиболее точные результаты. Разность между количеством перманганата, потребленным в контрольном и основном опытах, принималась за меру содержания пероксидазы в исследуемой пробе.

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИЛАЗЫ

Содержимое колбочки, представляющее собой смесь 2 г материала и 50 см<sup>3</sup> воды, оставлялось в течение 24 часов в термостате при 35°. Анти-септиком служил толуол. Аналогичным образом ставился контрольный опыт. Сахар, образующийся в результате разложения крахмала, определялся по методу Бертрана.

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТЕАЗЫ

Содержимое колбочки, представляющее смесь 2 г материала и 50 см<sup>3</sup> воды, оставлялось в течение 48 часов в присутствии толуола в термостате при 35°. Затем смесь кипятилась по Барнштейну<sup>6</sup> с дальнейшим прибавлением 25 см<sup>3</sup> раствора медного купороса (60 г CuSO<sub>4</sub> на 1 л) и 25 см<sup>3</sup> раствора едкого натра (12.5 г NaOH на 1 л). Образовавшийся осадок промывался сперва декантацией, а потом на фильтре и сжигался по Кьельдалю. Образующийся при этом аммиак определялся титрованием 0.1 N серной кислотой. Аналогичным образом ставился контрольный опыт. Разность между количеством серной кислоты, потребленным в контрольном и основном опытах, характеризовала собой количество протеазы в исследуемой пробе.

Кроме того, в каждой пробе материала производилось определение общего азота по Кьельдалю, и величины, полученные при определении количества ферментов, пересчитывались не на единицу веса материала, а на навеску, содержащую 100 мг общего азота.

Полученные результаты сведены в таблице на стр. 600.

Из приведенных данных следует:

1. Количество пероксидазы, протеазы и амилазы возрастает в смесях под влиянием автолитических процессов даже в отсутствии кислорода. Это увеличение согласуется с данными, приводимыми Палладиным в вышецитированной статье. Оно, по всей вероятности, может быть объяснено переходом связанных ферментов в растворимое состояние.

2. В присутствии кислорода для проб муки первых стадий прорастания это увеличение значительно повышается (до 30%). Для проб муки, полученной уже из взрослых ростков, повышения не наблюдается, наоборот, здесь проявляется угнетающее действие кислорода.

## Опыты по окислению муки из ростков кислородом воздуха

| Возраст ростков<br>(в днях) | Каталаза                               |      |          | Пероксидаза |      |          | Амилаза  |       |          | Протеаза                                            |       |          |
|-----------------------------|----------------------------------------|------|----------|-------------|------|----------|----------|-------|----------|-----------------------------------------------------|-------|----------|
|                             | Контроль                               | Азот | Кислород | Контроль    | Азот | Кислород | Контроль | Азот  | Кислород | Контроль                                            | Азот  | Кислород |
|                             | см <sup>3</sup> 0.1N KMnO <sub>4</sub> |      |          |             |      |          |          |       |          | см <sup>3</sup> 0.1N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> |       |          |
| —                           | 210                                    | 185  | 125      | 90          | 110  | 126      | 4.5      | 4.6   | 4.7      | 2.0                                                 | 2.0   | 2.5      |
| 1                           | 185                                    | 115  | 90       | 92          | 111  | 127      | 4.5      | 4.6   | 4.8      | 2.5                                                 | 3.5   | 3.0      |
| 2                           | 900                                    | 370  | 230      | 110         | 143  | 182      | 7.0      | 7.2   | 7.7      | 7.0                                                 | 7.5   | 9.5      |
| 3                           | 1675                                   | 695  | 430      | 175         | 220  | 280      | 12.5     | 13.5  | 14.8     | 13.5                                                | 14.5  | 18.5     |
| 4                           | 1995                                   | 1440 | 755      | 319         | 371  | 384      | 36.0     | 40.5  | 47.3     | 25.0                                                | 26.5  | 34.0     |
| 6                           | 2410                                   | 1670 | 610      | 592         | 633  | 615      | 89.5     | 96.5  | 104.0    | 71.0                                                | 75.0  | 80.0     |
| 8                           | 2505                                   | 1565 | 470      | 755         | 775  | 732      | 109.0    | 114.0 | 131.1    | 98.5                                                | 101.5 | 99.0     |

3. Каталаза ведет себя совершенно отлично от прочих ферментов: при автолитических процессах в отсутствии кислорода ее содержание постоянно падает, в присутствии кислорода это падение усиливается. Так как это нельзя объяснить возрастанием кислотности (образующиеся при автолитическом процессе кислоты нейтрализовались мелом), то наиболее вероятно предположение, что в условиях опыта каталаза разрушалась протеолитическими ферментами семян.

Из всего сказанного следует, что в первых стадиях прорастания в семенах содержатся или образуются вещества, способные при окислении переходить в ферменты. В более поздних стадиях прорастания эти вещества исчезают из семян.

Для более детального ознакомления с явлениями, изложенными выше, были предприняты опыты анодного окисления со смесями и экстрактами, полученными из проросших семян. Опыты велись следующим образом: испытуемые растворы наливались в пористый глиняный сосуд, в раствор опускался платиновый сетчатый электрод (поверхность 43 см<sup>2</sup>), служивший анодом; платиновая спираль, обвитая вокруг сосуда, служила катодом. Сосуд погружался в стеклянный стакан, содержащий дистиллированную воду. Обычно применялся ток 4 в и 7½ миллиампер. Окислительный потенциал, обычным образом измеренный на аноде, достигал 0.469 в, т. е. соответствовал приблизительно окислительному потенциалу хлорного железа.

Опыты продолжались от ½ часа до 4½ часов.

При этих исследованиях всегда нужно иметь в виду два явления, могущие послужить источником ошибок: во-первых, постоянное увеличение кислотности раствора, омывающего анод, и во-вторых, электроосмос воды и солей из пористого сосуда. Увеличение кислотности устранялось или прибавлением к раствору мела или нейтрализацией раствора содой на лакмус непосредственно перед определением ферментов. Последующие определения ферментов велись при этом всегда с прибавлением буферных растворов (уксуснокислых или фосфорнокислых). Для устранения концентрирования раствора в пористом сосуде поступали следующим образом: на поверхности стеклянного стакана наносили черту, до которой наливали дистиллированную воду; при выхождении раствора из сосуда уровень в стакане подымался, тогда вода отбиралась мерной пипеткой, и таким образом определялось количество вышедшей из сосуда воды.

Для опытов употреблялась мука трехдневных ростков пшеницы. Мука смешивалась с мелом и водой (на каждый грамм муки 10 г воды). Полученная смесь оставлялась в теплом месте в течение 1 часа и затем вылива-



лась в пористый сосуд и подвергалась окислению. Время от времени из сосуда брались пробы для определения ферментов.

Для другой серии пытов приготовлялся 12-часовой экстракт, который предварительно отфильтровывался, а затем уже подвергался окислению.

Результаты опытов приводятся в прилагаемой таблице. Как и в предыдущей таблице, все величины пересчитаны на навеску, содержащую 100 мг общего азота.

*Опыты по анодному окислению муки из ростков*

| Время окисления (в часах) | Каталаза                               |          | Пероксидаза |          | Амилаза |           | Протеаза                                            |
|---------------------------|----------------------------------------|----------|-------------|----------|---------|-----------|-----------------------------------------------------|
|                           | смесь                                  | экстракт | смесь       | экстракт | смесь   | экстракт* | смесь                                               |
|                           | см <sup>3</sup> 0.1N KMnO <sub>4</sub> |          |             |          |         |           | см <sup>3</sup> 0.1N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> |
| 0                         | 1660                                   | 850      | 180         | 204      | 12.5    | 10.0      | 13.5                                                |
| 1/2                       | 1825                                   | 885      | 188         | 213      | 13.0    | 10.2      | 14.5                                                |
| 1                         | 1440                                   | 690      | 198         | 222      | 13.5    | 10.4      | 15.5                                                |
| 1 1/2                     | 1080                                   | 550      | 207         | 231      | 14.1    | 10.7      | 16.0                                                |
| 2                         | 765                                    | —        | 219         | —        | 14.7    | —         | 16.0                                                |
| 2 1/2                     | 505                                    | 275      | 232         | 256      | 14.3    | 11.5      | 15.5                                                |
| 3 1/2                     | —                                      | 70       | —           | 268      | —       | 11.3      | —                                                   |
| 4 1/2                     | —                                      | 0        | —           | 248      | —       | 11.0      | —                                                   |

\* Для определения амилазы в экстракте к раствору прибавлялся крахмальный клейстер.

Из приведенных результатов видно, что при анодном окислении количество всех исследованных ферментов (даже каталазы) вначале возрастает, по истечении определенного времени, различного для различных ферментов, достигает своего максимума и затем начинает падать. Такой ход процесса легче всего объяснить, допустив, что в данном случае мы имеем дело с двумя одновременно идущими процессами: новообразованием ферментов из каких-то присутствующих в семенах веществ и разрушением готовых ферментов.

Для выяснения вопроса, не представляют ли собою вещества, из которых в процессе окисления образуются ферменты, продуктов белкового распада, были предприняты опыты переваривания различных белков трипсином и последующего их окисления.

Для первых опытов был взят препарат фибрина из растений (Кальбаум), представляющий собою слегка желтоватый мелкий порошок, нерастворимый в воде. Фибрин взбалтывался в слабо щелочном 0.1%-ном растворе трипсина и подвергался перевариванию в течение трех дней. Затем раствор отделялся из осадка центрифугированием и подвергался анодному окислению. Первоначальный (неокисленный) раствор не содержал пероксидазы, после окисления он давал все качественные реакции на этот фермент. Количественно в данном случае фермент не определялся.

Этот опыт можно было объяснить двояко: или фермент действительно образуется из продуктов распада белка, или просто растительный фибрин при своем получении захватил из семян как ферменты, так и зимогены, из которых эти ферменты образуются при окислении. Ферменты погибли при высушивании или при стоянии, а более устойчивые зимогены остались нетронутыми. При разрушении белка они перешли в раствор и затем при окислении образовали ферменты.

Опыты с перевариванием и окислением яичного альбумина и кристаллических глобулинов из масличных семян подтвердили последнее предположение. При всех условиях пробы на пероксидазу дали отрицательные результаты. Остальные ферменты в данном случае не определялись.

Для более детального изучения образования ферментов при окислении переваренной трипсином клейковины были проделаны следующие опыты. Отмыванием крахмала из пшеничной муки была получена клейковина, дающая сама по себе реакцию на пероксидазу. Клейковина помещалась в небольшие склянки, которые наполнялись слабощелочным 0.1%-ным раствором трипсина. Переваривание велось при 35° в присутствии толуола как антисептика. На 2,3 и 5-й день переваривания брались пробы растворов для опытов с окислением. Исследуемые растворы подвергались анодному окислению в течение 1 часа; затем ток переключался, в результате чего в испытуемый раствор оказывался погруженным уже не анод, а катод. Еще через 1 час ток вновь переключался, и раствор снова подвергался анодному окислению. Описанный прием, слабо отзываясь на увеличении количества ферментов, удобен в том отношении, что благодаря ему восстанавливаются первоначальная реакция и концентрация раствора.

Данные, полученные при определении ферментов в переваренной трипсином и окисленной анодным кислородом клейковине, сведены в прилагаемой таблице. Все величины пересчитаны на 100 мг общего азота раствора.

*Пероксидаза см<sup>3</sup> 0.1N KMnO<sub>4</sub>*

|                                          | 2-й день | 3-й день | 5-й день |
|------------------------------------------|----------|----------|----------|
| Контроль . . . . .                       | 142.5    | 131.4    | 114.4    |
| 1 час анодного окисления . . . . .       | 203.6    | 221.1    | 153.8    |
| 1 час катодного восстановления . . . . . | 206.8    | 225.0    | 158.1    |
| 1 час анодного окисления . . . . .       | 228.3    | 256.5    | 181.2    |

*Амилаза*

|                                          | 2-й день | 3-й день | 5-й день |
|------------------------------------------|----------|----------|----------|
| Контроль . . . . .                       | 26.7     | 23.7     | 19.4     |
| 1 час анодного окисления . . . . .       | 40.5     | 41.0     | 30.6     |
| 1 час катодного восстановления . . . . . | 43.9     | 42.3     | 31.2     |
| 1 час анодного окисления . . . . .       | 44.0     | 48.1     | 34.4     |

Из приведенных цифр видно, что увеличение количества фермента под влиянием окисления превышает в благоприятных условиях 100% первоначального содержания.

Принимая во внимание все вышеизложенное, можно прийти к заключению, что в семенах растений находятся некоторые вещества, зимогены, которые при окислении переходят в ферменты. Ввиду того, что в прорастающих даже при вполне нормальных условиях семенах увеличение ферментов достигает своего максимума задолго до того, как прекратился рост ростка и увеличение живой протоплазмы, мы можем предполагать, что количество этих веществ в семени ограничено. На это же указывает и тот

факт, что в поздних стадиях прорастания окислительные процессы не только не вызывают новообразования ферментов, но даже уменьшают их первоначальное качество.

### ВЫВОДЫ

I. Количество пероксидазы, протеазы и амилазы возрастает при двухдневном стоянии намоченной муки ростков пшеницы даже в отсутствии кислорода под влиянием автолитических процессов.

II. В присутствии кислорода для проб муки первых стадий прорастания это увеличение значительно повышается (до 30%). Для проб муки, полученной уже из взрослых ростков, повышения не наблюдается, наоборот, здесь проявляется угнетающее действие кислорода.

III. При автолитических процессах в отсутствии кислорода содержание каталазы постоянно падает; в присутствии кислорода это падение усиливается.

IV. При окислении муки и экстрактов из ростков пшеницы анодным кислородом количество всех исследованных ферментов (даже каталазы) вначале возрастает, по истечении определенного времени, различного для различных ферментов, достигает своего максимума и затем начинает падать.

V. При переваривании раствора растительного фибрина трипсином и последующем анодном окислении, в нем образуется пероксидаза, отсутствовавшая в первоначальном препарате.

VI. Аналогичные опыты с яичным альбумином и кристаллическими глобулинами семян дают отрицательные результаты.

VII. Увеличение количества пероксидазы и амилазы в растворе клейковины, переваренной трипсином, под влиянием окисления превышает в благоприятных условиях 100% первоначального содержания этих ферментов.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Бах совм. с Опариным. *Biochem. Zs.*, **134**, 183 (1922); настоящая книга, стр. 590.
2. Опарин. *Biochem. Zs.*, **134**, 190 (1922).
3. Любименко. *Зап. Акад. Наук*, **33**, 122 (1916).
4. Палладин. *Jährb. Wiss. Bot.*, **47**, 421.
5. Бах совм. со Збарским. *Biochem. Zs.*, **34**, 473 (1911); настоящая книга, стр. 446.
6. Barnstein. *Landw. Versuchsst.*, **54**, 328 (1900).

---

## ВОЗРОЖДЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ, ИНАКТИВИРОВАННЫХ НАГРЕВАНИЕМ \*

(Совместно с А. И. Опариным)

### ВВЕДЕНИЕ

Согласно общепринятым взглядам водные растворы ферментов, будучи подвергнуты нагреванию до 70—100°, теряют свои специфические свойства. Такое уничтожение ферментативных свойств под действием повышенной температуры считается основным признаком ферментов, отличающим их от небιологических катализаторов.

Однако уже сравнительно давно было замечено, что некоторые ферменты обладают способностью вновь приобретать свои специфические свойства спустя некоторое время после нагревания.

Еще в 1894 г. Дюрье<sup>1</sup>, работая с сахарозой дрожжей, нашел, что этот фермент, будучи нагрет в водном растворе до 100°, сперва теряет свои специфические свойства, но затем вновь их приобретает после некоторого стояния на воздухе. Совершенно непонятным в опытах указанного автора является наблюдение, что сок мацерации дрожжей, нагретый до 80°, навсегда теряет свои сахаролитические свойства, тогда как этот же сок, доведенный до 100°, вновь их приобретает после стояния.

Бертран и Розенблатт<sup>2</sup>, работавшие с тем же ферментом значительно позднее, подтвердили результаты Дюрье и, кроме того, показали, что свежие дрожжи, быстро высушенные, дают фермент, не восстанавливающийся ни при каких условиях, тогда как сок, полученный мацерацией старых, подвергшихся сильному автолизу дрожжей, дает сахаразу, регенерирующуюся после кипячения почти нацело. Попытка указанных авторов распространить это явление регенерации на другие ферменты дрожжей не увенчалась успехом: ни мальтаза, ни каталаза не обнаружили способности восстанавливать свои свойства после кипячения<sup>3</sup>.

М. Граменицкий<sup>4</sup>, работая с инвертазой така-диастазы (*Asperg. oris.*), получил результат, отличающийся от результатов Дюрье. Его инвертаза совершенно погибала при нагревании до 100° и, наоборот, обнаруживала некоторую (правда, очень слабую) способность к регенерации, если температурное воздействие ограничивалось 70—80°. Приведенными исследованиями исчерпываются опыты по регенерации сахаразы. Гораздо более обширен материал, посвященный пероксидазе. В этой области первым работал американский исследователь Вудс<sup>5</sup>. Он показал, что пероксидаза, так же как и оксидаза (фенолаза) листьев табака, теряет свои специфиче-

---

\* Сб. работ по чистой и прикл. химии.— Тр. Хим. ин-та им. Л. Я. Карпова, 4, 217 (1925).

ские свойства после кратковременного кипячения, однако после 4-часового стояния эти свойства к ней возвращаются, хотя и в ослабленном виде. Позднее Кульпсон<sup>6</sup> нашел, что пероксидаза, добытая им из редьки, будучи нагрета в водном растворе до 100° или даже до 115°, теряет свои ферментативные свойства не окончательно. После нескольких часов стояния на воздухе эти свойства в той или другой степени вновь регенерируются.

Аналогичные результаты получил Делеано<sup>7</sup>, работая с пероксидазой 2-дневных проростков клешевины; в опытах этого автора регенерация совершалась сравнительно медленно и только на 7-й день достигала своего максимума (20% взятого для опыта фермента). Делеано, между прочим, отмечает то не лишнее интереса обстоятельство, что способность к регенерации обладает только не очищенный фермент; если же раствор пероксидазы очистить при помощи коллоидальной окиси железа, то восстановления ферментативных свойств у такого очищенного раствора не наблюдается.

Граменицкий обнаружил также способность к регенерации пероксидазы, содержащейся в мерковском препарате мальтина.

Значительно позднее Галлагер<sup>8</sup>, работавший с пероксидазой сока, выжатого из корня свеклы, установил следующую зависимость степени регенерации фермента от силы температурного воздействия. После 1-минутного нагревания на водяной бане этот сок сохранял только 9% первоначального количества пероксидазы, но по прошествии 6 часов, во время которых раствор стоял на воздухе, это количество увеличилось до 40%. Если нагревание велось в течение 3 минут, то ферментативное действие исчезало совершенно, но через 6 часов оно восстанавливалось до 14%. Наконец, после 5-минутного нагревания происходило восстановление только до 10%.

В самое последнее время (когда экспериментальная часть настоящей работы была уже закончена) появилась статья Бидермана<sup>9</sup>, в которой автор описывает свои наблюдения, произведенные над регенерацией пероксидазы различного происхождения (из клубней картофеля, из корней хрена). К сожалению, эти наблюдения носили только качественный характер. Интересно в них то, что автор устанавливает связь между процессом регенерации пероксидазы и окислительными процессами, идущими в растворах при их стоянии на воздухе.

Из других ферментов, способных к регенерации, нужно отметить амилазу. Клемпин<sup>10</sup>, работая в 1908 г. с амилазой овса, отметил большую стойкость этого фермента по отношению к высоким температурам.

Однако Граменицкому<sup>4</sup> через два года после этого на примере такадиастазы удалось с несомненностью показать, что здесь дело идет не о стойкости фермента, а о способности его к регенерации. На основании весьма тщательно проведенных опытов этот автор мог заключить, что «ферментативное свойство водных растворов такадиастазы совершенно пропадает уже в первые моменты действия температуры в 80°. Однако если охладить раствор фермента до комнатной температуры, то он по прошествии более или менее короткого промежутка времени опять обнаруживает свои специфические свойства». В опытах Граменицкого с раствором такадиастазы, нагретым до 85°, а затем сейчас же охлажденным, амилитические свойства восстановились в течение 3 суток до 80—90%.

Раствор фермента, подвергнутый кипячению, восстанавливался значительно хуже (не выше 10%). Опыты цитируемого автора с мальтином Мерка и с амилитическим ферментом панкреатина (фирмы Парк-Девис) дали менее показательные результаты. Указанные ферменты, будучи нагреты до 100°, утрачивали свои амилитические свойства, повидимому,

навсегда, но автору удалось показать, что при более низких температурах (70—80°) и эти ферменты способны к регенерации, хотя и в очень слабой степени.

Спустя несколько лет после работ Граменицкого, Бидерман<sup>11</sup> наблюдал способность к регенерации амилолитического фермента слюны. Однако этот фермент восстанавливался в гораздо более скромных размерах, чем така-диастаза. Еще слабее (только сотые доли процента) восстанавливалась амилаза желудочного сока речного рака (*Potamobius astaeus* L.) в опытах Ловарца<sup>12</sup>.

Наконец, ряд указаний на восстановление амилолитических свойств в прокипяченных растворах амилазы мы находим в обширной статье Хруща<sup>13</sup>. В опытах указанного автора регенерация фермента, правда, очень незначительная, наступила после 3-часового кипячения раствора.

Таким образом, мы видим, что способность ферментов регенерировать свои свойства после кипячения была установлена рядом авторов, работавших с разнообразными объектами. Но характер и условия этой регенерации до сих пор еще не выяснены. Вудс высказал предположение, что зимоген существует в клетке в достаточном количестве, чтобы возродить приблизительно то же количество активного энзима, какое уже находится в клетке. Но никаких опытов в подтверждение своего предположения он не произвел.

#### ВЛИЯНИЕ КИСЛОРОДА НА ВОЗРОЖДЕНИЕ ИНАКТИВИРОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ

Исследуя образование ферментов в прорастающих семенах, мы<sup>14</sup> пришли к выводу, что ферменты как *in vivo*, так и *in vitro* образуются в результате окисления каких-то веществ, которые представляют собой зимогены. Поэтому интересно было выяснить, не играет ли кислород в возрождении инактивированных ферментов такую же роль, какую он играет в их образовании.

Для этой цели нами был поставлен ряд опытов, в которых растворы ферментов после кипячения или оставались при полном доступе воздуха или запаивались в тщательно эвакуированные ампулы. Наиболее удобным при таких опытах объектом является пероксидаза — фермент, особенно легко и полно регенерирующий свои свойства.

Опыты обычно велись следующим образом: 10 г тщательно измельченных ростков солода \* смешивались с 300 см<sup>3</sup> воды. Смесь оставалась 1 час, затем фильтровалась. Фильтрат кипятился в течение 5 минут на сетке. После охлаждения и вторичного фильтрования получалась довольно прозрачная жидкость, обладавшая кислой реакцией (рН=6.1). Эта жидкость разливалась в 4 колбы, в каждую из колб прибавлялось некоторое количество щелочного фосфата с тем расчетом, чтобы создать в растворе определенную концентрацию водородных ионов\*\*. Затем из каждой колбы половина раствора переливалась в ампулы, которые тщательно эвакуировались и запаивались. Вторая половина оставлялась при доступе воздуха. Через 24 часа во всех растворах производилось определение пероксидазы. Для этого растворы прежде всего тщательно нейтрализовались. Затем 1 см<sup>3</sup> экстракта смешивался с 1 см<sup>3</sup> раствора гваякола (0.1 %), 1 см<sup>3</sup> уксуснокислого буфера (80 см<sup>3</sup> 0.1 N CH<sub>3</sub>COONa + 10 см<sup>3</sup> 0.1 N CH<sub>3</sub>COOH),

\* Ростки были получены нами уже в готовом сухом виде с пивоваренного завода.

\*\* Эта концентрация затем всегда проверялась измерением, производимым при помощи газовой цепи.

7 см<sup>3</sup> воды и 2 каплями перекиси водорода (1%-ного раствора). Смесь стояла 15 минут.

По истечении указанного времени в ней колориметрически определялось количество окисленного гваякола. Получены следующие числа, выражающие тысячные доли миллиграмма:

|     |                                | При доступе воздуха |       | Без воздуха |      |
|-----|--------------------------------|---------------------|-------|-------------|------|
| № 1 | Основной (некипяченый) раствор | 1500 *              | 100%  |             |      |
| № 2 | Прокипяченный раствор рН 6.1   | 60                  | 4.0%  | 33          | 2.2% |
| № 3 | " " рН 7.4                     | 82                  | 5.5%  | 36          | 2.4% |
| № 4 | " " рН 7.8                     | 180                 | 12.0% | 40          | 2.7% |
| № 5 | " " рН 8.0                     | 65                  | 4.3%  | 32          | 2.1% |

Уже из этой таблицы можно видеть, что регенерация ферментативных свойств в прокипяченном растворе пероксидазы зависит от двух условий: 1) от актуальной кислотности раствора и 2) от присутствия атмосферного кислорода. Следующая серия опытов еще более ясно обнаруживает эту зависимость.

Для этих опытов 10 г муки из ростков солода смешивались с 300 см<sup>3</sup> воды, смесь стояла два дня (без антисептика), затем фильтровалась. Фильтрат кипятился. Потом с ним поступали так же, как и в предыдущей серии опытов. Определения пероксидазы производились через 3 часа после кипячения, через 24 часа и через 2 дня (в этих случаях к раствору прибавлялся толуол).

Растворы, стоявшие открытыми на воздухе, дали следующие цифры:

|     |                              | Через 3 часа |       | Через 24 часа |       | Через 2 дня |      |
|-----|------------------------------|--------------|-------|---------------|-------|-------------|------|
| № 1 | Некипяченый раствор          | 3800         | 100%  | —             | —     | —           | —    |
| № 2 | Прокипяченный раствор рН 5.1 | 0            | 0     | Следы         |       | Следы       |      |
| № 3 | " " рН 5.7                   | 7            | 0.2%  | 14            | 0.4%  | 40          | 1.1% |
| № 4 | " " рН 6.5                   | 30           | 0.8%  | 60            | 1.6%  | 100         | 2.6% |
| № 5 | " " рН 7.6                   | 1240         | 32.6% | 1600          | 42.1% | —           | —    |
| № 6 | " " рН 7.8                   | 1700         | 44.7% | 1800          | 47.4% | —           | —    |

Растворы, запаивные сейчас же после кипячения в ампулы и проанализированные через 24 часа, дали следующие результаты:

|     |     |      |
|-----|-----|------|
| № 1 | —   | —    |
| № 2 | 0   | 0    |
| № 3 | 0   | 0    |
| № 4 | 20  | 0.5% |
| № 5 | 150 | 3.8% |
| № 6 | 60  | 1.6% |

Итак, только при доступе кислорода воздуха пероксидазные свойства регенерируются в значительном размере. В эвакуированных ампулах эта регенерация, если и идет, то только в очень небольших количествах. При этом было замечено следующее соотношение: чем больше был промежуток времени, отделяющий момент кипячения и подщелачивания раствора от момента запаивания его в ампулы, тем большее количество фермента появлялось на следующий день в этом растворе. Сказанное можно иллюстрировать следующими примерами.

1. Экстракт, полученный при одночасовом настаивании ростков солода, был прокипячен, отфильтрован и подщелочен фосфатом (рН раствора равнялось 7.5). Часть раствора оставлялась на воздухе, часть немедленно

\* Некипяченый раствор перед определением разбавлялся 10 раз. При этом прямое определение давало 150 тысячных миллиграмма окисленного гваякола.

запаивалась в ампулы и, наконец, третья часть запаивалась в ампулу по прошествии 1 часа после подщелачивания раствора. Через один день все растворы анализировались.

|     |                                                                |           |
|-----|----------------------------------------------------------------|-----------|
| № 1 | Непрокипяченный раствор . . . . .                              | 1500—100% |
| № 2 | Прокипяченный раствор, все время стоявший на воздухе . . . . . | 101—6.7%  |
| № 3 | „ „ сейчас же запаянный . . . . .                              | 33—2.2%   |
| № 4 | „ „ запаянный через 1 час . . . . .                            | 98—6.5%   |

2. Все условия те же, что и в предыдущем примере, только раствор № 4 оставался стоять на воздухе не 1 час, а 4 часа.

|     |           |     |          |
|-----|-----------|-----|----------|
| № 1 | 1500—100% | № 3 | 34—2.3%  |
| № 2 | 108—6.8%  | № 4 | 145—9.6% |

3. Двухдневный экстракт кипятился, фильтровался и подщелачивался (рН равнялось 7.6). Раствор № 4 перед запаиванием оставался на воздухе в течение 1 часа.

|     |            |     |            |
|-----|------------|-----|------------|
| № 1 | 3800—100%  | № 3 | 92—2.4%    |
| № 2 | 1620—42.2% | № 4 | 1710—44.7% |

### РОЛЬ ХРОМОГЕНОВ В ВОЗРОЖДЕНИИ ИНАКТИВИРОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ

Ввиду того что употреблявшийся нами для опытов экстракт обладал способностью после подщелачивания сравнительно быстро поглощать кислород из воздуха, описанное явление могло быть объяснено следующим: за время стояния на воздухе раствор поглощал атмосферный кислород и затем за счет этого кислорода и происходило окисление зимогена, из которого при этом образовывался фермент. Может быть, и то небольшое количество пероксидазы, которое появлялось в эвакуированных ампулах в основном опыте, всецело зависело именно от того, что раствор во время охлаждения, фильтрования и переливания в ампулы мог поглощать некоторое, хотя бы и небольшое, количество кислорода.

Уже давно рядом авторов было замечено, что самые разнообразные растительные экстракты и соки способны поглощать атмосферный кислород. Это поглощение кислорода идет особенно энергично в том случае, если экстракты слегка подщелочены.

Палладин<sup>15</sup> показал, что указанный процесс обуславливается присутствием в растительных экстрактах особых веществ, «дыхательных хромогенов», способных присоединять к себе атмосферный кислород. При этом они переходят в окрашенные соединения, так называемые «дыхательные пигменты». Последним принадлежит выдающаяся роль в окислительных процессах клетки. Они окисляют тот водород воды, который освобождается при окислении разнообразных органических веществ за счет гидроксила воды. В отсутствии подобного рода водородных акцепторов процесс окисления останавливается.

Вполне естественно было предположить, что и в нашем случае мы имеем дело именно с такими дыхательными хромогенами, поглощавшими атмосферный кислород и переходившими вследствие этого в дыхательные пигменты. Но если это так, если действительно окисление зимогена, а следовательно регенерация фермента происходит через посредство дыхательных пигментов, то стоит только очистить экстракт, удалить из раствора хромогены и пигменты, и тогда все явление регенерации должно исчезнуть. Это на самом деле и происходит в том случае, если мы осадим экстракт из ростков солода солью какого-либо тяжелого металла, например сулемой. Опыты ставились следующим образом: 10 г муки ростков солода смеси.



вались с 300 г. воды, смесь стояла 1 час, затем отфильтровывалась. Совершенно прозрачный экстракт осаждался прибавлением 1%-ного раствора сулемы. Раствор оставлялся в течение ночи на холоду, затем фильтровался. Пероксидаза из раствора осаждалась спиртом и вновь растворялась в 100 см<sup>3</sup> воды. При обычном определении пероксидазы этот раствор давал цифру 1800. Таким образом, после обработки сулемой мы получали раствор, довольно богатый пероксидазой. Однако после кипячения ферментативные свойства этого раствора исчезали, повидимому, навсегда. Как бы мы ни подщелачивали раствор, какие бы условия аэрации мы ни создавали — регенерация не наступает. То же явление мы имели и при работе с пероксидазой, добытой по способу Баха и Шода из корней хрена. Раствор пероксидазы хрена сравнительно хорошо регенерируется, но если его очистить сулемой, он после кипячения теряет навсегда ферментативные свойства.

Таким образом, данные опыты, повидимому, не противоречили высказанному нами предположению, что процесс регенерации ферментов является окислительным процессом, происходящим при участии дыхательных пигментов. Но для того чтобы доказать это положение, необходимо было действительно произвести регенерацию того или другого фермента при помощи выделенного, очищенного пигмента.

Опарину<sup>16</sup> удалось показать, что весьма распространенное в растительном царстве вещество — хлорогеновая кислота, впервые выделенная Гортером<sup>17</sup> из семян кофе, является типичным дыхательным хромогеном. Благодаря тому, что эта кислота сравнительно легко кристаллизуется, ее можно получить в химически чистом виде. Водный раствор хлорогеновой кислоты на воздухе почти совершенно не изменяется, но стоит только его слегка подщелочить, как сейчас же начинается поглощение кислорода. Ранее бесцветный раствор окрашивается благодаря образованию дыхательного пигмента. При помощи этого последнего удается окислять ряд органических соединений. Так, например, смешивая щелочной раствор хлорогеновой кислоты с раствором аминокислот, можно вызвать окисление этих последних по уравнению Штрекера<sup>18</sup>. Реакция идет, конечно, только в присутствии атмосферного кислорода, так как в конце концов именно за счет этого кислорода и происходит окисление.

Для нашей работы мы употребляли хлорогеновую кислоту, выделенную нами из семян подсолнечника. Она представляла собой белый кристаллический порошок, состав которого соответствовал эмпирической формуле  $C_{32}H_{38}O_{19}$  и который по всем своим свойствам был тождествен с хлорогеновой кислотой Гортера.

В качестве объекта исследования нами был выбран препарат диастаза (absol.) фирмы Мерка. Этот препарат был особенно удобен для предпринятых нами исследований, так как, во-первых, обладал значительной диастатической силой, а во-вторых, был весьма термолабилен. Уже при нагревании раствора указанного препарата до 85° он нацело терял свои ферментативные свойства. После такой обработки, а тем более после кратковременного кипячения фермент, повидимому, погибал безвозвратно. Во всяком случае, даже при продолжительном стоянии на воздухе, он обнаруживал лишь весьма незначительную способность к регенерации (не выше 0.05%).

На основании ряда предварительных исследований были выработаны нижеследующие наиболее благоприятные условия опыта. Препарат фермента растворялся в свежеперегнанной дистиллированной воде в таких количествах, чтобы получился 0.1%-ный раствор. Раствор фильтровался через складчатый фильтр и сейчас же кипятился на сетке или в сильно подсолонной водяной бане в течение 3 минут. Температура кипения проверя-

лась термометром, опущенным в раствор фермента. По прошествии указанного срока раствор охлаждался под струей воды.

Параллельно с этим готовился раствор окисленной хлорогеновой кислоты следующим образом: 0.08 г хлорогеновой кислоты растворялись в 50 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, из которой путем кипячения под уменьшенным давлением был удален весь кислород. Бралась 10 см<sup>3</sup> указанного раствора, смешивались с 8 см<sup>3</sup> воды (тоже лишенной кислорода), 2 см<sup>3</sup> раствора K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (3 г на 100 см<sup>3</sup> воды) и 0.1 см<sup>3</sup> раствора сернистого железа (окисного) (0.05 г на 100 см<sup>3</sup> воды).

Полученный таким образом раствор наливался в колбу Виноградского с диаметром дна 12 см и оставлялся на воздухе при 12—14°.

Через определенные промежутки времени (1/2 часа или 1 час) из колб (которых обычно ставилось сразу несколько штук) брались пробы по 5 см<sup>3</sup> и смешивались с 10 см<sup>3</sup> прокипяченного раствора фермента. К смеси прибавлялись 0.3 см<sup>3</sup> 0.1 м раствора фосфорной кислоты, в результате чего рН раствора становилось равным 7.75. Смесь вливалась в ампулу, из которой с большой тщательностью удалялся кислород. Ампула запаивалась и выдерживалась в течение 20—24 часов. Затем она вскрывалась, раствор доводился путем прибавления фосфорной кислоты до нейтральной реакции (рН = 7.0), после чего 5 см<sup>3</sup> раствора смешивались с 15 см<sup>3</sup> раствора крахмала (Кальбаум). К смеси прибавлялся толуол в качестве антисептика и она оставлялась 24 часа при 25°. По истечении указанного срока производилось определение сахара по Бертрану. Параллельно с этим велись определения действия непрокипяченного фермента, а также контрольные опыты. Ввиду того что в прямых опытах раствор фермента разбавлялся на одну треть, обычно и непрокипяченный фермент брался в той же концентрации, т. е. две трети 0.1%-ного раствора фермента предварительно смешивались с одной третью объема воды. Так как такой раствор все же очень энергично осаживал крахмал, то для определений он обычно разбавлялся еще вдвое или вчетверо. Контрольные опыты велись следующим образом: 10 см<sup>3</sup> прокипяченного раствора смешивались с 5 см<sup>3</sup> фосфорнокислого буфера с тем расчетом, чтобы рН смеси было равно 7.75. Эта смесь или запаивалась в ампулы или оставлялась на воздухе в течение 20—24 часов (в данном случае запаивание в ампулы никак не отражалось на конечном результате). Затем раствор смешивался с раствором крахмала и через сутки в смеси производилось определение сахара. Параллельно с этим ставился другой контрольный опыт, в котором разбавленный на одну треть прокипяченный раствор фермента смешивался с надлежащим количеством раствора крахмала, и в смеси сейчас же производилось определение сахара.

Описанные контрольные опыты дали следующие результаты:

|                                                                                                           | см <sup>3</sup> 0.1 N KMnO <sub>4</sub> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| Непрокипяченный раствор фермента, разбавленный на 1/3 . . . . .                                           | 122.0                                   |
| Прокипяченный раствор фермента, до смешивания с раствором крахмала стоявший 1 сутки при рН=7.75 . . . . . | 2.8                                     |
| Смесь прокипяченного фермента и крахмала . . . . .                                                        | 2.6                                     |

Таким образом, мы видим, что в отсутствии хлорогеновой кислоты фермент почти не возрождается. Сравнительно высокая цифра контроля (2.8) обусловлена присутствием в препарате фермента и в растворе крахмала некоторого количества сахара.

Результаты, полученные при регенерации фермента хлорогеновой кислотой, сведены в нижеследующей таблице. Верхний ряд этой таблицы выражает в часах то время, которое простоял данный раствор хлорогеновой кислоты в колбе Виноградского до смешивания его с прокипяченным рас-

твором фермента. Вторая строка таблицы дает количество миллилитров 0.1 N раствора перманганата, затраченного при титровании для определения количества сахара, образовавшегося из крахмала под влиянием диастазы. Приводимые цифры представляют собой среднее из пяти параллельных определений. Величина контроля (2.8) из них уже вычтена. Наконец, в третьей строке даны проценты, в которых фермент возродился при данных условиях.

|                                                                                                   |     |      |      |       |      |       |     |     |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|------|------|-------|------|-------|-----|-----|-----|
| Время (в часах), в течение которого растворы хлорогеновой кислоты находились на воздухе . . . . . | 0   | 1/2  | 1    | 1 1/2 | 2    | 2 1/2 | 3   | 6   | 24  |
| Количество см <sup>3</sup> 0.1 N KMnO <sub>4</sub> , затраченное при титровании . . . . .         | 3.2 | 13.4 | 49.6 | 25.6  | 13.8 | 10.2  | 8.0 | 5.6 | 3.6 |
| %, в которых возродился фермент после кипячения . . . . .                                         | 2.6 | 10.9 | 40.7 | 20.9  | 11.3 | 8.9   | 6.5 | 4.6 | 2.9 |

Как можно видеть из таблицы, в оптимальных условиях диастаза может регенерироваться в довольно значительном проценте (40%). Эта регенерация не наступает в отсутствии хлорогеновой кислоты. Точно так же и в том случае, если в раствор фермента вносится неокисленная хлорогеновая кислота, регенерация наступает лишь в очень скромном размере. Только тогда, когда щелочной раствор хлорогеновой кислоты предварительно стоял определенное время на воздухе, он оказывает значительное действие на процесс регенерации. При продолжительном стоянии это действие постепенно ослабевает. Причины этого явления остаются пока не совсем ясными.

Величина регенерации очень сильно зависит от тех условий, при которых происходит окисление зимогена. Уже сравнительно небольшое изменение актуальной кислотности раствора влечет за собой значительное понижение процента регенерации. Точно так же очень сильно отзывается на ходе регенерации присутствие кислорода в ампулах. Если ампулы недостаточно хорошо эвакуированы, процент регенерации резко понижается.

Но даже при самых благоприятных условиях диастаза, повидимому, никогда не может регенерироваться вполне. Самый высокий процент регенерации, который нам удалось получить с вышеуказанным препаратом, равен 47.3%. Нужно отметить, что в этом отношении большую роль играют сила и продолжительность температурного воздействия. Это можно видеть из прилагаемых данных.

|                                           |       |
|-------------------------------------------|-------|
| Раствор фермента доведен до 85° . . . . . | 63.8% |
| »       кипятился 5 минут . . . . .       | 40.0% |
| »       »       15   » . . . . .          | 28.4% |
| »       »       60   » . . . . .          | 9.2%  |

Таким образом, чем дольше мы кипятим раствор, тем меньшее количество фермента регенерируется.

Присутствие в растворе фермента примесей, в частности электролитов, также сильно отражается на степени регенерации. Так, достаточно прибавить перед кипячением к 20 см<sup>3</sup> раствора фермента 0.02 г хлористого натрия, чтобы снизить регенерацию вдвое. В указанном направлении особенно энергично действуют Н<sup>+</sup>- и ОН<sup>-</sup>-ионы. Уже ничтожное отклонение от нейтральной реакции влечет за собой окончательную гибель ферментативных свойств раствора, подвергнутого кипячению. Поэтому перед растворением фермента в воде всегда полезно бывает предварительно удалить из нее углекислоту.

Кроме мерковского препарата диастазы, нами были при помощи хлорогеновой кислоты подвергнуты окислению и другие ферменты.

### Мальтин Кальбаума

Для опытов употреблялся 0.2%-ный раствор фермента.

Уже при таком сравнительно слабом температурном воздействии ферментативные свойства раствора пропадали полностью.

Кипячение велось в бане с соленой водой, с обратным холодильником.

В остальном отношении опыты велись совершенно так же, как и с диастазой Мерка. Результаты сведены в прилагаемой таблице.

|                                                                                                                            |      |       |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|-------|
| № 1. Некипяченый раствор фермента, разбавленный на $\frac{1}{3}$ . . . . .                                                 | 20.9 | 100%  |
| № 2. Первый контроль (раствор перед смешиванием с крахмалом стоял 1 день при pH=7.75) . . . . .                            | 3.0  | —     |
| № 3. Второй контроль (смесь прокипяченного фермента и крахмала)                                                            | 2.8  | —     |
| № 4. Прокипяченный раствор, окисленный хлорогеновой кислотой, стоявшей 1 час в колбе Виноградского (контроль вычтен) . . . | 6.4  | 30.5% |

### Амилаза, содержащаяся в препарате трипсина

Для опытов употреблялся 0.5%-ный раствор фермента. Все остальное, как и в предыдущем опыте.

|     |     |      |     |     |       |
|-----|-----|------|-----|-----|-------|
| № 1 | 7.1 | 100% | № 3 | 2.2 | —     |
| № 2 | 2.4 | —    | № 4 | 3.2 | 45.0% |

### Амилаза, добытая нами из солода

Амилаза добывалась путем осаждения спиртом водной вытяжки солода. После получения препарата он дважды очищался растворением в воде и осаждением спиртом.

Для опыта употреблен 0.1%-ный раствор.

|     |       |      |     |      |       |
|-----|-------|------|-----|------|-------|
| № 1 | 112.5 | 100% | № 3 | 2.2  | —     |
| № 2 | 2.6   | —    | № 4 | 40.5 | 36.1% |

Из других ферментов нами исследовались сахараза и эмульсин.

Для опытов с сахарозой нами употреблялся препарат фирмы Шухардт. Препарат был довольно старый и обнаруживал сравнительно слабое действие. Нами применялся 0.2%-ный раствор. Определение ферментативного действия растворов производилось следующим образом: 5 см<sup>3</sup> раствора смешивались с 15 см<sup>3</sup> раствора тростникового сахара. Раствор выдерживался при слабокислой реакции (pH=6.6) в течение 24 часов (температура 25°). По прошествии указанного срока бралась проба в 10 см<sup>3</sup> и в ней определялся сахар, способный восстанавливать фелинову жидкость. Приводимые ниже цифры выражают количество затраченных при этом миллилитров 0.1 N раствора перманганата.

|     |      |      |     |     |      |
|-----|------|------|-----|-----|------|
| № 1 | 16.9 | 100% | № 3 | 0.6 | —    |
| № 2 | 0.6  | —    | № 4 | 0.3 | 1.8% |

Ввиду того, что при обычной постановке опыта (кипячение в течение 3 минут на сетке) процент регенерации получался очень низкий, мы применили другой метод инактивирования. Раствор фермента оставался в термостате при 85° в течение 30 минут. После такой обработки он становился совершенно недействительным и в контрольных опытах давал те же цифры, что и прокипяченный фермент. Однако в этом случае регенерация сахаразы происходила в гораздо большем проценте.

### Эмульсин

Для опытов употреблялся 0.2%-ный раствор фермента. Определение ферментативного действия раствора производилось следующим образом: 5 см<sup>3</sup> раствора смешивались с 15 см<sup>3</sup> раствора амигдалина, в случае надобности раствор нейтрализовался и оставлялся в течение 24 часов при 25°. По прошествии указанного срока бралась проба в 10 см<sup>3</sup> и в ней определялся сахар, способный восстанавливать фелингову жидкость. Приводимые ниже цифры выражают количество затраченных при этом миллилитров 0.1 N раствора перманганата.

|     |      |      |     |     |    |
|-----|------|------|-----|-----|----|
| № 1 | 51.3 | 100% | № 4 | 0.0 | —  |
| № 2 | 0.0  | —    | № 5 | 3.6 | 7% |
| № 3 | 0.0  | —    |     |     |    |

При кипячении раствора эмульсина выпадает обильный осадок, состоящий из коагулировавшего белка, при этом не удается обнаружить в растворе никакого ферментативного действия, даже после окисления хлорогеновой кислоты. Ввиду этого мы применяли для инактивирования раствора эмульсина тот же метод, который только что был описан для сахаразы. Раствор эмульсина, простоявший 30 минут в термостате при 85°, не обнаруживает никакого ферментативного действия, однако он обладает некоторой способностью к регенерации при воздействии на него окисленной хлорогеновой кислотой.

### ВЫВОДЫ

I. Способность убитых кипячением ферментов вновь приобретать свои первоначальные свойства была установлена рядом авторов, но характер и условия этого процесса до сих пор оставались неясными.

II. Опыты с возрождением пероксидазы ростков солода устанавливают зависимость этого процесса: а) от актуальной кислотности раствора (наиболее благоприятной является слабощелочная среда, pH=7.8), б) от наличия свободного кислорода (в отсутствии этого газа регенерация идет лишь в очень небольшом проценте).

III. Для процесса возрождения ферментов необходимо не только наличие свободного кислорода, но и присутствие в испытуемом растворе дыхательных пигментов, посредством которых совершаются окислительные процессы. Растворы ферментов, лишённые дыхательных пигментов, после кипячения не регенерируют своих первоначальных свойств.

IV. При помощи изолированного в кристаллическом виде дыхательного пигмента (хлорогеновой кислоты) можно регенерировать ферментативные свойства даже у таких препаратов, которые сами по себе не обнаруживают способности к регенерации в сколько-нибудь заметном проценте (ряд препаратов амилазы, сахаразы и эмульсин).

V. Процесс возрождения убитых кипячением ферментов является окислительным процессом.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Durieux. Bull. Soc. Chim. Belg., 28, 99 (1894).
2. Bertrand et Rosenblatt. C. R. Acad. Sci., Paris, 158, 1455 (1914).
3. Bertrand et Rosenblatt. C. R. Acad. Sci., Paris, 1823 (1914).
4. Граменицкий. Zs. physiol., Chem., 69, 280 (1910). Влияние различных температур на ферменты и регенерация ферментативных свойств (1910). СПб.
5. Woods. Observations on the mosaic disease of tobacco.— U. S. Dept. Agric. Bull., No 18 (1902).

6. Кульпсон. Материалы к изучению физико-химических свойств оксидаз. (1908), СПб.
7. Deleano. *Biochem. Zs.*, **19**, 266 (1909).
8. Gallagher H. *Biochem. J.*, **18**, 39 (1924).
9. Biedermann. *Biochem. Zs.*, **150**, 477 (1924).
10. Klempin. *Biochem. Zs.*, **10**, 204 (1908).
11. Biedermann. *Fermentforschung*, **1**, 385 (1915).
12. Lowartz. *Fermentforschung*, **3**, 241 (1920).
13. Chrzaszcz. *Biochem. Zs.*, **150**, 60 (1924).
14. Опарин. *Biochem. Zs.*, **134**, 190 (1922); Бах и Опарин. Сб. работ по чистой и прикл. химии. — Тр. хим. ин-та им. Карпова, **1** (1923), Опарин и Бах. *Biochem. Zs.*, **148**, 476 (1944); настоящая книга, стр. 597.
15. Палладин. *Ber. Dtsch. bot. Ges.*, **29a**, 125, 278 (1908); **30**, 104 (1912); *Zs. physiol. Chem.*, **55**, 207 (1908); Палладин и Толстая. *Biochem. Zs.*, **49**, 381 (1913).
16. Опарин. *Biochem. Zs.*, **124**, 90 (1921).
17. Gorter. *Arch. Pharm.*, **247**, 148, 43E (1909); *Lieb. Ann.*, **358**, 327 (1907); **359**, 247 (1908).
18. Streckker. *Lieb. Ann.*, **123**, 363 (1862).

---

## КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ФЕРМЕНТОВ В ЗРЕЮЩИХ, ПОКОЯЩИХСЯ И ПРОРАСТАЮЩИХ ЗЕРНАХ ПШЕНИЦЫ \*

(Совместно с А. И. Опариным и Р. А. Венером)

Исследуя количественно образование ферментов в процессе прорастания зерен, Бах и Опарин<sup>1</sup> пришли к следующим выводам:

1. Ферменты существуют в готовом виде, хотя в сравнительно небольших количествах, в покоящихся семенах.
2. По мере прорастания семян количества ферментов увеличиваются, проходят через максимум и потом падают.
3. Для образования ферментов абсолютно необходимо присутствие кислорода.

Эти ориентировочные исследования, которые показали полную пригодность методов, примененных авторами, дали возможность приступить к систематической экспериментальной обработке ряда вопросов, связанных с деятельностью ферментов в зерне. В предлагаемой работе мы поставили себе задачей проследить количественно за движением ферментов в пшеничных зернах, начиная с образования семени, переходя через периоды созревания и покоя и кончая полным его прорастанием. Другими словами, мы пытались составить себе представление о ферментативной истории пшеничного растения с того момента, как оно начинало быть зерном, до того момента, когда оно перестало быть им.

Несмотря на довольно большое число работ<sup>2</sup>, посвященных процессу созревания семян, вопрос этот изучен далеко не полно. Большинство авторов ограничивали свои исследования лишь определениями тех или иных веществ зерна на различных стадиях его созревания. Работы с ферментами крайне немногочисленны и носят обычно случайный характер. Они сводятся главным образом к простому констатированию присутствия того или другого фермента в незрелых семенах<sup>3</sup>. Только немногие из авторов касаются в своих работах вопроса о количественном изменении ферментов в процессе созревания.

В. Залесский<sup>4</sup> определял количество протеолитического фермента на различных стадиях созревания семян гороха. Он нашел, что действие этого фермента убывает по мере созревания. Значительно позднее Люерс<sup>5</sup> тоже исследовал изменение количества протеолитического фермента в процессе созревания и хранения семян злаков. Он не получил таких определенных данных, как Залесский. При хранении семян, взятых на разных стадиях созревания, количество протеазы то увеличивалось, то уменьшалось, то, наконец, оставалось постоянным.

---

\* Сб. работ по чистой и прикл. химии.—Тр. Хим. ин-та им. Л. Я. Карпова, 5, 62 (1926).

Благовещенский<sup>6</sup> в своей обширной работе по созреванию семян *Vicia faba*, между прочим, сделал также несколько определенных амилолитического фермента на различных стадиях созревания. Он нашел, что в более ранних стадиях количество амилазы повышается, но затем к концу процесса оно более или менее резко падает.

На основании этих немногочисленных, отрывочных сведений совершенно невозможно составить себе точное представление о ходе количественного изменения ферментов в процессе созревания семян. Поэтому нами было предпринято систематическое исследование по указанному вопросу.

Объектом для исследования послужили два сорта озимых пшениц, выращенных на опытном поле Селекционной станции Тимирязевской сельскохозяйственной академии\*: сорт А2267 (*Triticum vulgare*, var. *erythrospertum*) и сорт С2965 (*Triticum vulgare* var. *vebstinum*).

Посев семян был произведен 3 сентября 1924 г. Всходы появились 13 сентября, 10 июня 1925 г. сорт А начал колоситься, и 22 наступило его цветение. Колосение сорта С началось только 15 июня. Цветение также запоздало дня на четыре (момент цветения был упущен). Первые пробы колосьев были взяты: 27 июня для сорта А и 1 июля для сорта С. Начиная с этого момента, пробы брались через каждые 1—2 дня.

Колосья, срезанные на поле, привозились в лабораторию, где из них немедленно выбирались семена, которые помещались для высушивания в вакуум-эксикатор над серной кислотой. После высушивания устанавливался средний вес 100 зерен. Затем вся проба семян измельчалась и просеивалась через 0.25-мм сито. Сейчас же после этого производились определения остаточной влажности, общего азота (по Кьельдалю) и четырех следующих ферментов: каталазы, пероксидазы, амилазы и протеазы. Ферменты определялись по методам, описанным Бахом и Опариным в цитированной выше статье<sup>1</sup>.

Последняя проба сорта А была взята 27 июля — за день до жатвы. Жатва сорта С производилась 31 июля. При этом на поле была оставлена несжатой полоса, из которой и продолжали брать пробы до 10 августа. Кроме того, 10 октября и 15 ноября производились определения ферментов в обмолоченных уже семенах, хранившихся в обычных условиях.

Часть семян сорта С спустя 70 дней после жатвы была подвергнута проращиванию, и в порядке, описанном раньше, в них определялись ферменты.

Результаты этих опытов, охватывающих период с 1 июля по 17 октября 1925 г., сведены в табл. 1 (стр. 617).

Полученные данные представлены в виде диаграммы (рис. 1), в которой на абсциссе отложено время в днях, а на ординате — количество ферментов, выраженное в миллилитрах децинормальных растворов.

Из приводимой таблицы прежде всего видно, что как в процессе созревания, так и в процессе прорастания количества ферментов сначала возрастают, достигают некоторого максимума и затем опять падают. Но в то время как кривые прорастания показывают весьма правильный, плавный ход, кривые созревания носят волнообразный характер: до наступления максимума и после него количества ферментов то возрастают, то уменьшаются. Каковы причины этого явления? Приписать эти колебания погрешностям методики нет основания, так как все опыты велись в строго тождественных условиях, а при исследовании прорастания та же методика дала весьма правильные результаты. Поставить эти колебания

\* Пользуемся случаем выразить нашу глубокую благодарность заведующему станцией С. И. Жигалову и заведующей химической лабораторией станции Н. Е. Прокopenko за предоставление необходимого нам растительного материала.



Таблица 1

Количество ферментов в 100 зернах

| № опыта | Дата сбора | Средний вес 100 зерен * |        | Общий азот (в мг) |      | Каталаза |     | Пероксидаза |     | Амилаза |       | Протеаза |      |
|---------|------------|-------------------------|--------|-------------------|------|----------|-----|-------------|-----|---------|-------|----------|------|
|         |            | А                       | С      | А                 | С    | А        | С   | А           | С   | А       | С     | А        | С    |
| 1       | 27 июня    | 0.2500                  | —      | 8.4               | —    | 27       | —   | 15          | —   | 10      | —     | —        | —    |
| 2       | 29 »       | 0.4161                  | —      | 13.0              | —    | 59       | —   | 29          | —   | 20      | —     | —        | —    |
| 3       | 1 июля     | 0.7420                  | 0.4582 | 22.2              | 11.5 | 87       | 55  | 59          | 40  | 25      | —     | —        | —    |
| 4       | 4 »        | 1.2784                  | 0.9127 | 23.9              | 20.5 | 90       | 111 | 58          | 27  | 19      | 31    | —        | 2.84 |
| 5       | 6 »        | 1.6662                  | 1.1209 | 41.2              | 21.7 | 116      | 158 | 41          | 16  | 30      | 33    | —        | 4.30 |
| 6       | 8 »        | 2.1182                  | 1.5318 | 49.4              | 31.1 | 71       | 57  | 92          | 32  | 30      | 23    | —        | 3.10 |
| 7       | 11 »       | 2.5795                  | 1.9849 | 53.1              | 40.2 | 167      | 181 | 130         | 26  | 30      | 23    | —        | 1.72 |
| 8       | 13 »       | 2.9549                  | 2.1599 | 67.1              | 46.2 | 147      | 196 | 147         | 83  | 33      | 20    | —        | 0.31 |
| 9       | 15 »       | 3.1780                  | 2.4366 | 69.2              | 55.6 | 121      | 156 | 143         | 120 | 25      | 20    | —        | 2.47 |
| 10      | 17 »       | 3.4129                  | 2.3896 | 71.7              | 49.4 | 122      | 138 | 158         | 124 | 2       | —     | —        | 1.90 |
| 11      | 20 »       | 3.5584                  | 2.4748 | 81.1              | 51.6 | 71       | 50  | 227         | 192 | 2       | 8     | —        | 1.88 |
| 12      | 23 »       | 3.4848                  | 3.0363 | 90.6              | 71.7 | 127      | 90  | 331         | 150 | 16      | 4     | —        | 1.33 |
| 13      | 25 »       | 3.4373                  | 3.1473 | 81.1              | —    | 111      | 87  | 172         | 168 | 15      | 4     | —        | 4.03 |
| 14      | 27 »       | 3.5715                  | 2.9142 | 85.7              | —    | 114      | 82  | 182         | 160 | 2       | 2     | —        | —    |
| 15      | 30 »       | —                       | 2.9665 | —                 | 66.3 | —        | 83  | —           | 179 | —       | 3     | —        | 2.97 |
| 16      | 1 августа  | —                       | 2.8643 | —                 | 61.3 | —        | 89  | —           | 162 | —       | 3     | —        | 2.28 |
| 17      | 3 »        | —                       | 2.8416 | —                 | 61.6 | —        | 85  | —           | 158 | —       | 9     | —        | 0.58 |
| 18      | 5 »        | —                       | 2.7935 | —                 | 63.0 | —        | 85  | —           | 162 | —       | 6     | —        | 1.40 |
| 19      | 7 »        | —                       | 2.8423 | —                 | 61.8 | —        | 82  | —           | 153 | —       | 6     | —        | 0.82 |
| 20      | 10 »       | —                       | 2.8271 | —                 | 63.6 | —        | 82  | —           | 156 | —       | 7     | —        | 0.57 |
| 21      | 10 октября | —                       | —      | —                 | —    | —        | 81  | —           | 158 | —       | 6     | —        | 0.7  |
| 22      | 15 ноября  | —                       | —      | —                 | —    | —        | 82  | —           | 157 | —       | 5     | —        | —    |
| 23      | 10 октября | —                       | —      | —                 | —    | —        | 81  | —           | 158 | —       | 6.0   | —        | 0.7  |
| 24      | 11 »       | —                       | —      | —                 | —    | —        | 69  | —           | 150 | —       | 6.0   | —        | 1.0  |
| 25      | 12 »       | —                       | —      | —                 | —    | —        | 99  | —           | 162 | —       | 14.0  | —        | —    |
| 26      | 13 »       | —                       | —      | —                 | —    | —        | 198 | —           | 202 | —       | —     | —        | 8.4  |
| 27      | 14 »       | —                       | —      | —                 | —    | —        | 33  | —           | 290 | —       | —     | —        | —    |
| 28      | 15 »       | —                       | —      | —                 | —    | —        | 12  | —           | —   | —       | 64.5  | —        | 14.8 |
| 29      | 16 »       | —                       | —      | —                 | —    | —        | —   | —           | 534 | —       | 135.0 | —        | 19.8 |
| 30      | 17 »       | —                       | —      | —                 | —    | —        | —   | —           | 704 | —       | 78.5  | —        | 16.4 |
| 31      | 18 »       | —                       | —      | —                 | —    | —        | —   | —           | —   | —       | —     | —        | —    |
| 32      | 19 »       | —                       | —      | —                 | —    | —        | —   | —           | 759 | —       | —     | —        | —    |

Созревание

Покой

Прорастание

\* С поправкой на влажность.

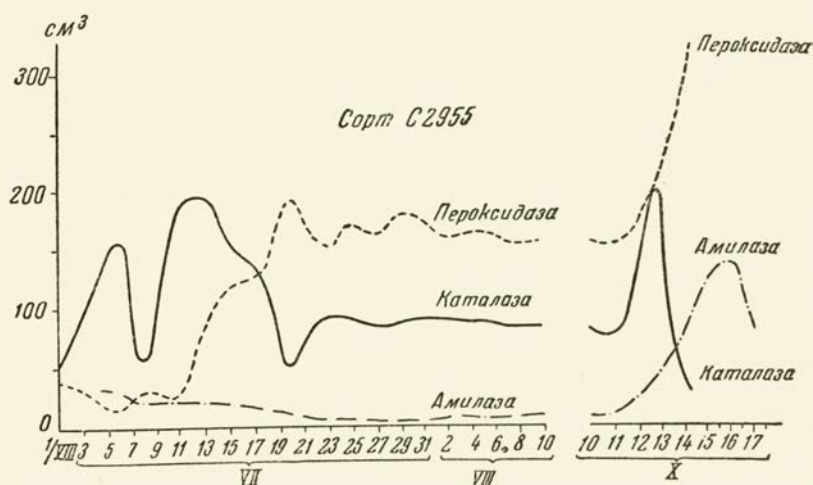


Рис. 1

в связь с изменением внешних условий, поскольку они регистрируются в метеорологических наблюдениях, тоже оказалось невозможным. В табл. 2 приведены метеорологические данные за период от 27/VI до 31/VIII 1925 г.

Кривые метеорологических наблюдений совершенно не совпадают с кривыми созревания семян.

Таблица 2

## Метеорологические наблюдения \*

| Дата  | Барометрич. давление | Температура | Осадки | Дата   | Барометрич. давление | Температура | Осадки | Дата   | Барометрич. давление | Температура | Осадки |
|-------|----------------------|-------------|--------|--------|----------------------|-------------|--------|--------|----------------------|-------------|--------|
| 27/VI | 738.00               | 20.23°      | 0      | 9/VII  | 740.50               | 20.03°      | 3.7    | 21/VII | 747.07               | 18.13°      | 0      |
| 29/VI | 739.60               | 21.93°      | 0.1    | 11/VII | 747.20               | 17.40°      | 0      | 23/VII | 747.40               | 20.53°      | 0      |
| 1/VII | 741.37               | 24.80°      | 0.1    | 13/VII | 747.67               | 21.07°      | 0      | 25/VII | 745.87               | 21.80°      | 3.8    |
| 3/VII | 741.90               | 19.27°      | 15.5   | 15/VII | 746.40               | 15.97°      | 0      | 27/VII | 749.20               | 20.70°      | 0      |
| 5/VII | 746.70               | 21.73°      | 0      | 17/VII | 746.47               | 14.57°      | 8.8    | 29/VII | 744.80               | 21.73°      | 0      |
| 7/VII | 744.50               | 21.23°      | 0      | 19/VII | 744.93               | 17.20°      | 0      | 31/VII | 740.00               | 18.17°      | 1.2    |

\* Данные получены нами от метеорологической станции Тимирязевской сельскохозяйственной академии.

Так как на ферментные реакции сильно влияет концентрация ионов водорода среды, то можно было предположить, что полученные в разное время экстракты из зреющих семян отличались друг от друга актуальной кислотностью. Но, как показывает табл. 3, pH экстрактов в разные периоды созревания отличается довольно большим постоянством.

Таблица 3

## pH экстрактов

| Дата       | 8/VII | 11/VII | 13/VII | 17/VII | 20/VII | 25/VII | 30/VII |
|------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Сорт А . . | —     | 6.7    | 6.8    | 7.0    | 7.0    | 6.9    | —      |
| » С . .    | 6.9   | 6.8    | 6.8    | 7.0    | 6.9    | —      | 6.9    |

Таким образом, и этот момент не может быть выдвинут в качестве причины разбираемого явления.

Извилистость ферментативных кривых объясняется, повидимому, какими-то другими, скорее всего внутренними, причинами. При рассмотрении данных, полученных прежними исследователями<sup>7</sup>, видно, что накопление белков, крахмала и прочих запасных веществ в созревающих семенах всегда идет скачками. Благовещенский даже прямо говорит о волнообразном ходе кривой накопления запасных веществ в созревающих семенах *Vicia faba*. Он объясняет это неравномерным притоком азотистых и безазотистых веществ и изменчивостью тех превращений, которые претерпевают эти вещества в се-

мени. Наблюдаемые кривые являются равнодействующими ряда процессов, происходящих в созревающем семени. Наряду с притоком веществ из материнского организма в семени идут конденсационные и гидролитические процессы. В зависимости от состояния организма берет верх то тот, то другой процесс: идет то увеличение, то уменьшение данного запасного вещества<sup>8</sup>.

То же самое можно сказать и по отношению к ферментам. Количество того или другого фермента в созревающем семени, с одной стороны, возрастает (притекает из материнского организма или образуется в процессе метаболизма самого семени), с другой стороны — падает (переходит в зимоген). В разные моменты, на разных стадиях развития берет верх то тот, то другой процесс. В связи с этим мы наблюдаем то повышение, то понижение общего количества ферментов в семени.

Однако если мы отвлечемся от этих колебаний, то, как уже указано, общий ход кривых у всех ферментов одинаков. Кривые (рис. 2) идут сначала вверх, достигают некоторого максимума и затем начинают более или менее круто падать. Различие между кривыми отдельных ферментов сводится только к положению максимума и к крутизне подъема и падения. У пероксидазы максимум кривых приходится на сравнительно поздние стадии созревания. Каталаза, амилаза и протеаза достигают этого максимума несколько раньше. Особенно рано его достигают амилаза и протеаза сорта С, где падение ферментативных кривых начинается уже в ранних стадиях молочной зрелости.

Такой ход кривых показывает, что в начале процесса созревания идет приток или новообразование ферментов, а в дальнейшем происходит их отложение в запас в виде недействительных зимогенов.

Сравнение кривых, полученных нами при исследовании процессов созревания и прорастания семян, показывает, что максимум кривых созревания для всех ферментов ниже максимума кривых прорастания. Этот факт находится в полном согласии с высказанными нами выше представлениями. При созревании семени всегда одновременно идут два противоположных процесса — образование активных ферментов и переход этих последних в недействительные зимогены. Приводимые выше кривые отражают только количество активных ферментов в определенные моменты созревания. Количество же ферментов, успевших к этому времени инактивироваться, перейти в недействительные зимогены, остается совершенно неучтенным; а между тем, именно за счет этих зимогенов и происходит увеличение количества ферментов в процессе прорастания.

Интересно также обратить внимание на отношение количества ферментов, заключенных в покоящемся семени, к тем максимальным количествам, которые можно обнаружить в процессе прорастания и созревания семени. В работе Баха и Опарина отмечено то обстоятельство, что в процессе прорастания образуется гораздо больше именно тех ферментов, которых мало в покоящемся семени. Так, например, для наших сортов, если принять количества фермента в покоящихся зернах за единицу, то в момент максимума прорастания мы будем иметь следующие цифры:

| Сорт С<br>(прорастание) | Каталаза | Пероксидаза | Амилаза | Протеаза |
|-------------------------|----------|-------------|---------|----------|
|                         | 2.5      | 5           | 22.5    | 28.5     |

т. е. в то время как каталаза увеличилась в 2.5 раза, а пероксидаза в 5 раз, амилаза увеличилась в 22.5, а протеаза в 28.5 раза.

Если исходить из данных, полученных при созревании, то получатся следующие соотношения:

| Сорт С<br>(созревание) | Каталаза | Пероксидаза | Амилаза | Протеаза |
|------------------------|----------|-------------|---------|----------|
|                        | 2.4      | 1.2         | 5.6     | 7.5      |

Максимумы здесь ниже, чем при прорастании, но общая картина явления остается та же.

Причину этих соотношений легко понять, если стать на высказанную нами выше точку зрения. При прорастании семян количество ферментов увеличивается за счет зимогенов, образовавшихся в процессе созревания; если этих зимогенов образовалось сравнительно немного, то и увеличение количества ферментов не может быть значительным.

Как и за счет чего идет образование ферментов в созревающих семенах и каким образом эти ферменты превращаются в недействительные зимогены, остается пока еще совершенно неясным. Мы рассчитываем заняться этими вопросами в ближайшем будущем.

Интересно еще отметить, что в процессе созревания ход развития каталазы и пероксидазы обнаруживает определенный антагонизм между этими ферментами, как это видно из приведенной диаграммы (рис. 2).

Когда каталаза возрастает, пероксидаза падает, и наоборот.

Причина этого явления, по всей вероятности, лежит в регулирующей функции каталазы по отношению к окислительным процессам, происходящим за счет перекиси водорода.

## ВЫВОДЫ

I. Изменение количества ферментов семени в процессе созревания идет весьма неровно, скачками. Количество того или другого фермента то быстро возрастает, то вновь падает.

II. Если отвлечься от этих колебаний, то можно заметить, что общий ход кривых у всех ферментов одинаков. Кривые идут сначала вверх, достигают некоторого максимума и затем начинают более или менее круто падать.

III. Количество ферментов в созревающем семени, постепенно понижаясь, достигает к моменту полной зрелости некоторого постоянного уровня. В дальнейшем оно почти со-

всем не меняется, независимо от того, остается ли семя в колосе на поле или лежит в зернохранилище.

IV. Сравнение кривых, полученных при исследовании процессов созревания и прорастания семени, показывает, что максимум кривых созревания для всех ферментов всегда ниже максимума кривых прорастания.

V. Содержание каталазы и пероксидазы падает в процессе созревания сравнительно неглубоко, и в процессе прорастания количество этих ферментов возрастает в 2—8 раз. Наоборот, количества амилазы и протеазы, которые исчезают в процессе созревания, довольно значительны, и в процессе прорастания эти ферменты образуются в количестве, в 20—30 раз превышающем исходные величины.

1925—1926 г.

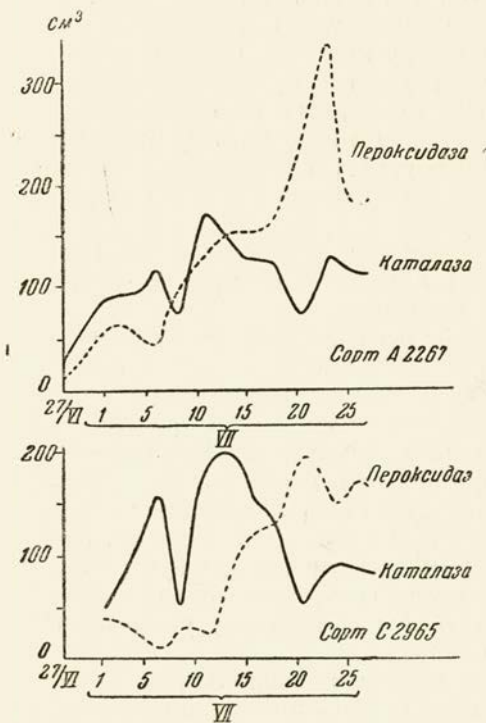


Рис. 2

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бах совм. с Опариным. *Biochem. Zs.*, **134**, 483, 190 (1922); *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **148**, 476 (1924); настоящая книга, стр. 446, 597.
  2. Сводку литературы см.: Благовещенский. *Biochem. Zs.*, **157**, 201 (1925).
  3. Деап. *Bot. Gazette*, **29**, 521 (1905); Ивапов. *Ber. Dtsch. bot. Ges.*, **29**, 595 (1914).
  4. Залесский. *Ber. Dtsch. bot. Ges.*, **23**, 126 (1905); *Beih. z. Bot. Cbl.*, **27**, 1, 63 (1911).
  5. Luers. *Biochem. Zs.*, **104**, 30 (1920).
  6. Благовещенский. *Л. с.* 2
  7. Кроме цитированных выше: Нелокучаев, *Landw. Versuchsst.*, **56** (1902); Ешмерлинг. Там же, **56** (1900).
  8. Johansen. *Inst's bot. Jahresber.*, 143 (1887).
-



## К ВОПРОСУ О ТЕРМОЛАБИЛЬНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

[*Zur Kenntnis der Thermolabilität der Fermente*]\*

(Совместно с Б. Виленским)

### О ВЛИЯНИИ НАГРЕВАНИЯ НА ЭКСТРАКТЫ ПЕРОКСИДАЗЫ, ОЧИЩЕННЫЕ ПУТЕМ УЛЬТРАФИЛЬТРОВАНИЯ

В связи с некоторыми опытами по очистке пероксидазы путем ультрафильтрации один из нас (А. Бах) сделал наблюдение, что активность экстрактов пероксидазы из хрена, возможно лучше очищенных от неколлоидальных составных частей, не падает даже при длительном нагревании на кипящей водяной бане, в то время как исходные экстракты обладают хорошо известной термолабильностью. Так как термолабильность считается наиболее существенным признаком биологических катализаторов, то представляло интерес исследовать более подробно замеченное явление.

#### МЕТОДИКА

Для приготовления экстрактов тонкоизмельченные корни хрена (1 кг) мацерировались с 2 л воды в присутствии толуола в течение 48 часов; отжатая жидкость отфильтровывалась через бумажный фильтр и затем подвергалась ультрафильтрации в вакууме в присутствии толуола\*\*. Оставшийся на ультраfiltре коллоидальный осадок промывался в тех же условиях 5 л дистиллированной воды, что потребовало около 6 недель. По другому методу исходный экстракт упаривался в вакууме до  $\frac{1}{10}$  первоначального объема и фильтровался через ультрафильтр меньшей плотности (коллодий DAB6, разбавленный 2 л спирта), который задерживал только белки. Ультрафильтрат, содержащий почти все количество пероксидазы, которое было в экстракте, был перелит в плотные коллоидные гильзы и подвергнут, после прибавления толуола, диализу в проточной воде, сначала водопроводной, а затем дважды перегнанной (от 2 до 4 недель). Полученные растворы пероксидазы вполне хорошо сохраняются в присутствии толуола. Оба метода дали аналогичные, если не вполне тождественные результаты.

Изучение термолабильности экстрактов пероксидазы производилось следующим образом. После определения активности очищенного и разба-

\* *Biochem. Zs.*, **226**, 482 (1930).

\*\* Применявшийся аппарат описан Виленским [*Biochem. Zs.*, **204**, 4; **204**, 433 (1928)].

вленного водой экстракта часть его была перелита в тонкостенные пробирки из иенского стекла и поставлена в кипящую водяную баню; температура жидкости внутри пробирок достигла  $99.6-99.8^\circ$  в течение полминуты. Через определенные промежутки времени вынималась одна из пробирок и после охлаждения в термостате при  $25^\circ$  в жидкости определялось содержание пероксидазы по методу окисления пирогаллола. С этой целью  $1 \text{ см}^3$  экстракта смешивался с  $0.25 \text{ г}$  пирогаллола в  $5 \text{ см}^3$  воды и с  $0.0025 \text{ г}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  в  $5 \text{ см}^3$  воды; по истечении 2 минут реакция прекращалась прибавлением серной кислоты. Количество образовавшегося пурпурогалина определялось сравнением полученного раствора со спиртовым раствором пурпурогалина определенной концентрации в колориметре Буркера. Если в жидкости выпадал пурпурогалин, то он вновь переводился в раствор прибавлением спирта. Все результаты выражены в единицах пурпурогалина (ЕП), т. е. в миллиграммах пурпурогалина на  $1 \text{ см}^3$  экстракта.

### БЫСТРОЕ РЕГЕНЕРИРОВАНИЕ ПЕРОКСИДАЗЫ, ОЧИЩЕННОЙ УЛЬТРАФИЛЬТРОВАНИЕМ И ИНАКТИВИРОВАННОЙ КИПЯЧЕНИЕМ

Первые количественные опыты показали уже следующее:

1. Остаточная активность пероксидазы, содержащейся в коллоидальном осадке после ультрафильтрации, уменьшается с увеличением продолжительности нагревания.

Пр и м е р. Активность до кипячения ЕП = 6.3.

*Определение остаточной активности после 5 мин.  
кипячения*

| Продолжительность кипячения (в мин.) | 10  | 15  | 20  | 30   |
|--------------------------------------|-----|-----|-----|------|
| Остаточная активность ЕП . . . . .   | 0.8 | 0.6 | 0.5 | 0.28 |

2. Остаточная активность увеличивается до определенного максимума при стоянии после кипячения.

Пр и м е р. Активность до кипячения ЕП = 7.3.

*Продолжительность кипячения 10 мин.*

| Время после кипячения              | 10 мин. | 20 мин. | 30 мин. | 40 мин. | 50 мин. | 24 часа |
|------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Остаточная активность ЕП . . . . . | 1.3     | 2.0     | 2.3     | 2.5     | 2.6     | 2.7     |

Таким образом, мы имеем здесь дело не с настоящей термостабильностью пероксидазы, содержащейся в коллоидальном остатке после ультрафильтрации, а с исключительно быстрой регенерацией после инактивирования нагреванием. Скорость регенерации настолько велика, что начальную точку можно определить только посредством экстраполяции. Исходный неультрафильтрованный экстракт не проявляет заметной

регенерации после 10 минут нагревания до кипения даже при длительном хранении.

Вопрос о регенерации пероксидазы, инактивированной нагреванием, не новый. Вудс<sup>1</sup> первый установил, что фенолаза и пероксидаза из листьев табака теряют свою специфическую активность после непродолжительного кипячения, но что она восстанавливается, хотя и не в полной мере, после 4-часового стояния. Кульпсон<sup>2</sup> нашел, что пероксидаза, приготовленная из хрена, не окончательно теряет свою активность после нагревания до 100° и даже до 115°. После нескольких часов стояния на воздухе она частично регенерируется. Аналогичное наблюдение было сделано Делеано<sup>3</sup> с двухдневными зародышами ржи зерен. Регенерация происходила в этом случае довольно медленно и достигала максимума только по истечении семи дней (около 20%). Согласно Делеано, только неочищенная пероксидаза способна регенерироваться. Если ее раствор очищается коллоидальной окисью железа, то фермент необратимо разрушается при кипячении. Граменицкий<sup>4</sup> наблюдал регенерирование после нагревания пероксидазы, содержащейся в диастазе Мерка. Галлагер<sup>5</sup>, который исследовал термолабильность пероксидазы, имеющейся в отжатом соке сахарной свеклы, нашел, что после 1-минутного нагревания в кипящей водяной бане сок обладает еще 8% исходной активности, через 3 минуты активность равна нулю, так же как и через 5 минут. Регенерация по истечении 6 часов: в первом случае — 40%, во втором случае — 14%, в третьем случае — 10%. Аналогичные результаты были получены Бахом и Опариным<sup>6</sup> с пероксидазой из пшеничных зародышей. Бидерман<sup>7</sup> также сообщает некоторые наблюдения над регенерацией пероксидазы различного происхождения, инактивированной нагреванием. Насколько нам известно, до сих пор не наблюдалось, чтобы экстракты пероксидазы, по возможности очищенные от неколлоидальных примесей ультрафильтрацией, были бы значительно устойчивее по отношению к нагреванию и гораздо скорее регенерировались бы, чем исходные экстракты.

#### ЗАВИСИМОСТЬ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕРОКСИДАЗЫ, ОЧИЩЕННОЙ УЛЬТРАФИЛЬТРОВАНИЕМ, ОТ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ НАГРЕВАНИЯ

Для того чтобы иметь более подробные данные по этому вопросу, мы произвели многочисленные опыты; в качестве примера мы приведем из них две серии. Опыты производились по указанному выше методу.

| Продолжительность нагревания (в мин.) | Продолжительность регенерации |         |         |         |         |         |         |         |
|---------------------------------------|-------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|                                       | 10 мин.                       | 20 мин. | 30 мин. | 40 мин. | 50 мин. | 60 мин. | 80 мин. | 24 часа |

##### А. Коллоидальный экстракт № 4. Активность до нагревания ЕП = 7.8

|    |         |      |      |      |      |      |      |      |
|----|---------|------|------|------|------|------|------|------|
| 10 | ЕП 0.85 | 1.62 | 2.05 | 2.50 | 2.69 | 2.85 | 3.20 | 3.50 |
| 15 | » 0.53  | 0.81 | 1.20 | 1.46 | 1.70 | 1.65 | 1.90 | 2.00 |
| 20 | » 0.25  | 0.50 | 0.78 | 0.80 | 0.90 | 1.06 | 1.14 | 1.36 |
| 30 | » 0.17  | 0.30 | 0.49 | 0.49 | 0.57 | 0.63 | 0.64 | 0.78 |

##### В. Экстракт № 7. Активность до нагревания ЕП = 5.3

|      |        |      |      |      |     |      |     |      |
|------|--------|------|------|------|-----|------|-----|------|
| 10   | ЕП 1.0 | 1.6  | 2.1  | 2.35 | 2.6 | —    | 2.8 | 2.9  |
| 13.5 | » 0.7  | —    | 1.6  | 1.8  | 1.9 | 2.05 | 2.1 | 2.3  |
| 20   | » 0.5  | 0.8  | 1.0  | 1.2  | 1.3 | —    | 1.5 | 1.6  |
| 30   | » 0.34 | 0.57 | 0.73 | 0.83 | —   | 0.95 | 1.0 | 1.05 |



Ни один из исходных экстрактов, не очищенных ультрафильтрованием, не показывал заметной регенерации активности после 10-минутного нагревания до кипения.

Из приведенных выше данных следует, что:

1) продолжительность нагревания определяет возможную степень регенерации активности

| Продолжительность нагревания (в мин.)                     | 10 | 15   | 20   | 30  |
|-----------------------------------------------------------|----|------|------|-----|
| Регенерация по истечении 80 мин. (экстракт А) (в %) . . . | 41 | 24.3 | 14.5 | 8.2 |

2) степень регенерации практически достигает максимума через 80 минут и остается затем постоянной.

### ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ Н<sup>+</sup>-ИОНОВ НА РЕГЕНЕРАЦИЮ ПЕРОКСИДАЗЫ

При ультрафильтровании концентрация Н<sup>+</sup>-ионов в экстрактах пероксидазы значительно меняется. Повторные определения показали, что в то время как в исходных экстрактах рН колеблется между 4 и 5, рН экстрактов, очищенных ультрафильтрованием, равно 6.4—6.8. Естественно было предположить, что различное действие кипячения на эти экстракты зависит от различной концентрации Н<sup>+</sup>-ионов. Для выяснения этого вопроса были поставлены следующие опыты.

Пробы экстракта № 2, очищенного ультрафильтрованием и обладающего до кипячения ЕП = 6.2, были доведены буферным раствором до рН 8.5, нагревались описанным способом в течение 12 минут в кипящей водяной бане, охлаждались до 25° и доводились до рН 7.1. После хранения в течение 24 часов определялась активность экстрактов.

|                |      |      |      |      |     |     |      |      |      |     |      |     |
|----------------|------|------|------|------|-----|-----|------|------|------|-----|------|-----|
| рН . . . . .   | 8.0  | 7.6  | 7.4  | 7.0  | 6.8 | 6.4 | 6.2  | 6.0  | 5.8  | 5.6 | 5.25 | 5.0 |
| Активность . . | 0.19 | 0.19 | 0.31 | 1.06 | 2.6 | 2.4 | 0.68 | 0.80 | 0.42 | 0.2 | 0.17 | 0   |

Из этих и из многих других опытов, давших вполне аналогичные результаты, следует, что для регенерации после нагревания до кипения пероксидазы, очищенной ультрафильтрованием, существует оптимальная концентрация Н<sup>+</sup>-ионов, находящихся в области около рН 6.8. Ниже и выше этой концентрации наблюдается уменьшение регенерации. Для того чтобы выяснить, вызывают ли неблагоприятные концентрации Н<sup>+</sup>-ионов повышенную необратимую инактивацию ферментов или только оказывают тормозящее действие на их регенерацию после нагревания, были поставлены с тем же препаратом № 2 следующие опыты.

Пробы экстракта, нагретые в течение 12 минут в кипящей водяной бане и затем охлажденные до 25°, были доведены прибавлением буфера до рН 5.8—7.0, а ход регенерации — исследован количественно. Исходная активность ЕП = 6.2.

| рН  | Продолжительность регенерации |         |         |         |
|-----|-------------------------------|---------|---------|---------|
|     | 20 мин.                       | 30 мин. | 60 мин. | 24 часа |
| 5.8 | —                             | —       | —       | 2.6     |
| 6.0 | 1.3                           | 1.5     | 2.0     | 2.9     |
| 6.2 | 1.4                           | 1.6     | 2.3     | 2.9     |
| 6.4 | 1.5                           | 1.9     | 2.7     | 3.1     |
| 6.8 | 1.0                           | 1.4     | 2.2     | 3.1     |
| 7.0 | 0.9                           | 1.3     | 2.0     | 3.1     |

Из этих данных следует, что неблагоприятная концентрация  $H^+$ -ионов, установленная после нагревания и охлаждения экстрактов, не оказывает никакого влияния на регенерацию пероксидазы. Неблагоприятный эффект определенной концентрации до нагревания приводит, таким образом, к предположению о необратимости инактивирования фермента.

Как бы то ни было, разница между действием нагревания на исходный экстракт и на ультрафильтрованный не полностью объясняется снижением концентрации  $H^+$ -ионов в последних. Действительно, доведение исходных экстрактов пероксидазы до рН 6.4—6.6 не оказывает, как было установлено в многочисленных опытах, сколько-нибудь заметного влияния на регенерацию после нагревания. При прочих равных в отношении рН условиях скорость и степень регенерации экстрактов пероксидазы, очищенных ультрафильтрованием, были еще значительно выше, чем в исходных.

#### ВЛИЯНИЕ СОЛЕЙ НА РЕГЕНЕРАЦИЮ ПЕРОКСИДАЗЫ

Так как при ультрафильтрации экстрактов содержание солей в них значительно уменьшается, то представляло интерес выяснить влияние солей на регенерацию инактивированной пероксидазы. В качестве примера можно привести следующие опыты.

1 см<sup>3</sup> экстракта смешивался с 4 см<sup>3</sup> воды и 5 см<sup>3</sup> 0.05 N раствора соли; смеси нагревались в течение определенных промежутков времени, охлаждались затем до 25° и по истечении 24 часов подвергались исследованию на активность. При выполнении контрольных опытов с ненагретыми экстрактами к каждой пробе прибавлялось непосредственно перед определением активности соответствующее количество соли.

Ход регенерации после 10-минутного инактивирования был определен количественно для одного и того же экстракта в присутствии хлористого натрия и хлористого аммония.

#### Препарат № 7. Активность до кипячения ЕП = 5.3

| В растворе               | Продолжительность нагревания (в мин.) |     |     |      |
|--------------------------|---------------------------------------|-----|-----|------|
|                          | 0                                     | 10  | 20  | 25   |
| 0.1N                     |                                       |     |     |      |
| NaCl . . . .             | ЕП 5.3                                | 2.4 | 1.1 | 0.7  |
| KCl . . . .              | » 5.3                                 | 2.5 | 1.2 | 0.85 |
| NH <sub>4</sub> Cl . . . | » 5.2                                 | 1.5 | 0.4 | 0.2  |
| CaCl <sub>2</sub> . . .  | » 5.5                                 | 2.3 | 1.0 | 0.7  |

Из этих опытов следует, что исследованные соли оказывают незначительное влияние на инактивацию пероксидазы при нагревании экстрак-

| Продолжительность регенерации | 20 мин. | 30 мин. | 40 мин. | 24 часа |
|-------------------------------|---------|---------|---------|---------|
| NaCl . . .                    | ЕП 1.8  | 2.3     | 2.5     | 2.9     |
| NH <sub>4</sub> Cl . . .      | » 1.5   | 1.8     | 2.0     | 2.5     |

тов, очищенных ультрафильтрованием. Только хлористый аммоний по сравнению с другими солями оказывает определенно отрицательное действие.

### ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАФИЛЬТРАТОВ НА РЕГЕНЕРАЦИЮ ПЕРОКСИДАЗЫ

Разница в действии нагревания на исходный экстракт и на экстракт, очищенный ультрафильтрованием, основана на выделении неколлоидальных составных частей, которые переходят в ультрафильтрат. Поэтому мы пытались восстановить посредством соединения коллоидальных остатков с соответственными ультрафильтратами исходную термолабильность пероксидазы.

Пробы экстрактов, очищенных ультрафильтрованием, смешивались с таким количеством ультрафильтрата, которое было необходимо для получения активности исходного экстракта. В контрольных опытах те же самые количества ультрафильтрата прибавлялись к экстракту после охлаждения до 25°.

*Активность до нагревания ЕП = 5.8*

Определение через 24 часа после нагревания

| Продолжительность нагревания (в мин.) | 5       | 10   | 12   | 20   | 25   | 30   | 35   |
|---------------------------------------|---------|------|------|------|------|------|------|
| Основной опыт . . . .                 | ЕП 1.63 | 0.68 | 0.36 | 0    | 0    | 0    | 0    |
| Контрольный опыт . .                  | —       | 2.20 | —    | 0.73 | 0.41 | 0.26 | 0.14 |

Таким образом, в то время как прибавление ультрафильтрата к коллоидальному остатку на ультрафильтре после нагревания не оказывает заметного влияния на регенерацию пероксидазы, соединение компонентов до нагревания вызывает заметное уменьшение термостабильности фермента. Уже по истечении 20 минут нагревания в последнем случае имеет место необратимое инактивирование фермента. Однако нам до сих пор не удалось полностью восстановить термолабильность исходных экстрактов, что бесспорно надо приписать изменению компонентов экстракта во время ультрафильтрования

### ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ НАГРЕВАНИЯ, НЕОБХОДИМАЯ ДЛЯ НЕОБРАТИМОГО ИНАКТИВИРОВАНИЯ ПЕРОКСИДАЗЫ, НАХОДЯЩЕЙСЯ В ОСТАТКЕ ПОСЛЕ УЛЬТРАФИЛЬТРОВАНИЯ

В качестве примера полученных результатов можно привести следующие данные:

Для необратимого инактивирования фермента, следовательно, необходимо его нагревать около 5 часов.

## Препарат № 9. Активность ЕП = 8.3

Определение регенерации через 24 часа после нагревания

| Продолжительность<br>нагревания (в мин.) | 10  | 20  | 40   | 50   | 80   | 120   | 180   | 240   | 300 |
|------------------------------------------|-----|-----|------|------|------|-------|-------|-------|-----|
| Остаточная активность                    | 4.1 | 2.0 | 0.48 | 0.28 | 0.03 | Следы | Следы | Следы | 0.0 |

## ВЫВОДЫ

Экстракты пероксидазы из хрена, возможно тщательнее очищенные от неколлоидальных составных частей ультрафильтрованием, значительно устойчивее по отношению к нагреванию, чем исходные экстракты.

Коллоидальный остаток после ультрафильтрования инактивируется при нагревании до кипения так же, как исходный экстракт пероксидазы, однако его активность чрезвычайно скоро регенерируется. Степень регенерации падает одновременно с продолжительностью нагревания. После 10-минутного нагревания в кипящей водяной бане регенерация достигает максимума (около 40% исходной активности) в течение 1—2 часов. При равных условиях исходный экстракт не обнаруживает сколько-нибудь заметной регенерации.

Необратимое инактивирование пероксидазы, содержащейся в коллоидальном остатке после ультрафильтрования, достигается только после 5-часового нагревания в кипящей водяной бане.

Опыты в этом направлении нами продолжаются.

7 августа 1930 г.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Woods. «Observations on the mosaic disease of tobacco». U. S. Dept. Agric. Bull. No 18 (1902).
2. Кульневсон. К вопросу о физико-химических свойствах пероксидаз (1908). СПб.
3. Deleano. Biochem. Zs., 19, 266 (1909).
4. Граменицкий. Zs. physiol. Chem., 69, 286 (1910).
5. Gallagher. Biochem. J., 18, 39 (1924).
6. Бах совм. с Опарным. Сб. работ по чистой и прикл. химии.—Тр. Хим. ин-та им. Л. Я. Карпова, 4, 217 (1925); настоящая книга, стр. 604.
7. Biedermann. Biochem Zs., 150, 477 (1924).

---

## БИОХИМИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ \*

Предварительное сообщение

(Совместно с Д. Михлиным)

В 1936 г. Кнооп и Мартиус<sup>1</sup> осуществили химический синтез лимонной кислоты посредством конденсации в щелочной среде щавелевоуксусной кислоты с пировиноградной и окисления конденсата перекисью водорода. В следующем году Кребс<sup>2</sup> описал синтез очень незначительных количеств лимонной кислоты из тех же исходных веществ посредством животной ткани; Брейшу<sup>3</sup>, однако, не удалось воспроизвести описанный Кребсом синтез. После введения животным янтарной, фумаровой или яблочной кислоты Смиту и Ортену<sup>4</sup> удалось обнаружить повышенное содержание лимонной кислоты в моче животных. Эти опыты, однако, не могут служить достаточным доказательством образования лимонной кислоты из названных дикарбоновых кислот и продуктов их превращений, так как такой же эффект получается и с малоновой кислотой, которую трудно поставить в непосредственную связь с лимонной кислотой.

Что касается химизма образования лимонной кислоты в растительных организмах, то высказанная Виртаненом<sup>5</sup> мысль о роли щавелевоуксусной кислоты при синтезе лимонной не была, насколько нам известно, подтверждена экспериментально. Недавно Буткевичем<sup>6</sup> были опубликованы экспериментальные данные и теоретические обоснования ранее выдвинутой им мысли об образовании лимонной кислоты из окисленной целой молекулы сахара.

Ввиду обилия противоречивых данных по вопросу о химизме образования лимонной кислоты, которой в последнее время стали приписывать большую роль в обмене веществ<sup>2</sup>, казалось целесообразным обратиться к такому представителю высших растений, в котором лимонная кислота является стабильным продуктом и где обмен веществ мог бы оказаться менее сложным, чем в плесневых грибах или в животном организме. Мы выбрали для этого один сорт табака *Nicotiana rustica*. Мы воспользовались также предложенным Мотесом<sup>7</sup> и тщательным разработанным Курсановым<sup>8</sup> методом вакуум-инфльтрации, позволяющим вводить в лист значительные количества некоторых веществ без нарушения целостности клетки. Таким путем удастся обнаружить новообразование лимонной кислоты в листе, где содержание этого вещества нормально достигает значительных количеств.

Применявшийся нами метод состоял в следующем: свежие табачные листья разрезаются по средней линии на равные части (половинки). Точно

---

\* Изв. АН СССР, серия биол., № 5, 991 (1938).

отвешиваются 2 г правых половинок и столько же левых. Обычно для этого требуется 4—5 листочков, которые нарезаются ножницами на пластинки по 2—3 см<sup>2</sup> каждая. Одна проба инфильтруется водой и служит контролем. Другая, соответствующая первой и состоящая из симметричных ей половинок, инфильтруется щавелевокислым натрием в смеси с нейтрализованной пировиноградной кислотой или без этой последней. Кроме щавелевокислого натрия были поставлены опыты с янтарной и яблочной кислотами, а также с глюкозой. Общий объем жидкости составляет 15 мл. После инфильтрации, которая достигается эвакуированием эксикатора, куда помещаются стаканчики с листьями в соответственных жидкостях, причем последние проникают в межклеточные пространства, листочки оставляются в жидкости на 18 часов при комнатной температуре (18°). На другой день прибавляется до 5% трихлоруксусной кислоты. Листочки растираются в этой жидкости с песком. Фильтруется. Из каждой пробы берется до 2 мл для определения лимонной кислоты по методу Пьючера<sup>9</sup>. Метод этот отличается большой чувствительностью и достаточной точностью. Колориметрическое определение производится посредством фетометра Пульфриха. Кроме лимонной кислоты, при этом определяется и ацетондикарбоновая кислота, если бы она не разрушалась предварительно кипячением в 2%-ной серной кислоте.

В опыт следует брать лишь здоровые молодые листья. Старые или поврежденные листья в условиях нашего опыта не синтезировали лимонной кислоты.

В нижеследующей таблице приведены результаты опытов, относящихся к лету и осени 1938 г. Инфильтровались однопроцентные растворы.

Как видно из приведенной таблицы, наибольший выход лимонной кислоты получается при введении в табачный лист смеси щавелевоуксусной

| Дата    | Состав жидкости                              | Количество лимонной кислоты (в мг) в 2 мл экстракта |
|---------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| 22.VIII | Глюкоза . . . . .                            | 0.82                                                |
|         | Вода . . . . .                               | 0.80                                                |
| 10.X    | Глюкоза . . . . .                            | 0.84                                                |
|         | Вода . . . . .                               | 0.86                                                |
| 22.VIII | Янтарная кислота . . . . .                   | 0.92                                                |
|         | Вода . . . . .                               | 0.78                                                |
| 10.X    | Янтарная кислота . . . . .                   | 0.85                                                |
|         | Вода . . . . .                               | 0.72                                                |
| 26.VIII | Яблочная кислота . . . . .                   | 0.90                                                |
|         | Вода . . . . .                               | 0.65                                                |
| 26.VIII | Яблочная + пировиноградная . . . . .         | 1.18                                                |
|         | Вода . . . . .                               | 0.78                                                |
| 28.VIII | Щавелевоуксусная + пировиноградная . . . . . | 2.08                                                |
|         | Вода . . . . .                               | 0.76                                                |
| 10.X    | Щавелевоуксусная + пировиноградная . . . . . | 1.06                                                |
|         | Вода . . . . .                               | 0.76                                                |
| 28.VIII | Щавелевоуксусная кислота . . . . .           | 1.34                                                |
|         | Вода . . . . .                               | 0.72                                                |

с пировиноградной кислотой. При введении одной нейтрализованной на лакмус щавелевоуксусной кислоты выход лимонной кислоты в некоторых случаях удваивается, в других случаях прирост превышает 50%. То же с яблочной кислотой. Меньший прирост дает янтарная кислота, но во всех наших опытах влияние и этой кислоты также сказывалось на содержании лимонной кислоты в табачных листьях. Мы вправе поэтому думать, что янтарная кислота через фумаровую и яблочную переходит в листе в щавелевоуксусную кислоту, которая, конденсируясь с пировиноградной, дает в результате декарбоксилирования и окисления лимонную кислоту. Лимонную кислоту можно в конечном счете рассматривать как продукт конденсации щавелевоуксусной кислоты с уксусной. Однако инфильтрация смеси названных веществ в достаточных концентрациях или одной только соли уксусной кислоты ведет лишь к быстрому увяданию листа, не отражаясь на содержании лимонной кислоты. Можно думать, что найденные нами превращения дикарбоновых кислот представляют собой общебиологический путь образования лимонной кислоты. Продолжающиеся у нас исследования имеют целью выяснение этого вопроса, а также отношение синтеза лимонной кислоты к азотистому и углеводному обмену.

3 ноября 1938 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Kroop u. Martius *Zs. physiol. Chem.*, **242**, 1 (1936).
2. Krebs. *Enzymologia*, **4**, 148 (1937).
3. Breusch. *Zs. physiol. Chem.*, **250**, 262 (1937).
4. Smith a. Orten. *J. Biol. Chem.*, **124**, 43 (1938).
5. Virtanen. Цит. по *Chem. Zbl.*, **II**, 588 (1931).
6. Буткевич. *ДАН СССР*, **18**, 659 (1938).
7. Motes. *Planta*, **19**, 117 (1933).
8. Курсанов. *Биохимия*, **1**, № 3, (1936).
9. Pucher, Sherman a. Wickery. *J. Biol. Chem.*, **118**, 235 (1936).

## БИБЛИОГРАФИЯ НАУЧНЫХ ТРУДОВ А. Н. БАХА

1893

1. О механизме разложения углекислоты под действием солнечных лучей. [Sur le mécanisme de la décomposition de l'acide carbonique sous l'influence des rayons solaires].—C. R. Acad. Sci., Paris, 116, 1145 (1893).
2. О распаде углекислоты под действием солнечного излучения [Sur le dédoublement de l'acide carbonique sous l'action de la radiation solaire].—C. R. Acad. Sci., Paris, 116, 1389 (1893).
3. Исследования химического механизма ассимиляции углекислоты хлорофильными растениями [Recherches sur le mécanisme chimique de l'assimilation de l'acide carbonique par les plantes à chlorophylle].—Mon. Sci., (4), 7, 669 (1893).

1894

4. Обусловлено ли изменение фенола под действием света образованием перекиси водорода? [L'altération du phenol sous l'action de la lumière est-elle due à la formation d'eau oxygénée?]—Mon. Sci., (4), 8, 217 (1894).
5. О происхождении перекиси водорода, находящейся в атмосферном воздухе и в атмосферных осадках.—ЖРФХО, 26, 101 (1894). Sur l'origine de l'eau oxygénée atmosphérique.—Mon. Sci., 8, 241 (1894).
- Ueber die Herstammung des Wasserstoffsperoxyds der atmosphärischen Luft und atmosphärischen Niederschläge.—Ber. Dtsch. chem. Ges., 27, 340 (1894).
6. О существовании перекиси водорода в зеленых растениях. Sur l'existence de l'eau oxygénée dans les plantes vertes].—C. R. Acad. Sci., Paris, 119, 286; Mon. Sci., (4), 8, 572 (1894).
7. О новой реакции, позволяющей доказать существование перекиси водорода в зеленых растениях. [Nouveau réactif permettant de démontrer l'existence de l'eau oxygénée dans les plantes vertes].—C. R. Acad. Sci., Paris, 119, 1218 (1894); Mon. Sci., (4), 8, 241 (1894).

1896

8. О механизме восстановления азотнокислых солей и образования азотистых соединений в растениях [Sur le mécanisme de la réduction des azotates et de la formation des matières azotées quaternaire dans les plantes].—C. R. Acad. Sci., Paris, 122, 1499 (1896); Mon. Sci. (4), 11, 5 (1897).
9. Об изомальтозе (Обзор основных работ, посвященных изомальтозе со времени ее открытия) [Sur l'isomaltose (Analyse des principaux travaux publiés sur l'isomaltose depuis sa découverte)].—Mon. Sci. (4), 10, 241 (1896).

1897

10. О взаимодействии формальдегида с белком. [Action de l'aldéhyde formique sur l'albumine].—Mon. Sci., février (1897); Arch. Sci. phys. nat., 3, 88 (1897).
11. О роли перекисей в процессах медленного окисления.—ЖРФХО, 29, 373 (1897). Du rôle des peroxydes dans les phénomènes d'oxydation lente—C. R. Acad. Sci., Paris, 124, 951 (1897); Mon. Sci. (4), 11, 479 (1897); Arch. Sci. phys. nat., 4, 91 (1897).

1898

12. О биохимическом круговороте углерода [Sur l'évolution biochimique du carbone].—Arch. Sci. phys. nat., 5, 401 (1898).
13. О связи между восстановлением, электролизом и фотолизом угольной кислоты.—ЖРФХО, 30, 297 (1898). Sur les rapports entre la réduction par l'hydrogène nais-



sant, la photolyse et l'électrolyse de l'acide carbonique.— C. R. Acad. Sci., Paris, 126: 479 (1898); Mon. Sci. (4), 12, 241 (1898).

## 1899

14. Формальдоксим как реактив для обнаруживания ничтожных количеств меди [La formaldoxime comme réactif pour déceler la présence de très petites quantités de cuivre].— C. R. Acad. Sci., Paris, 128, 363 (1899).

15. О формальдоксиме [Sur la formaldoxime].— Mon. Sci. (4), 13, 251 (1899); Arch. Sci. phys. nat., 7, 296 (1899).

## 1900

16. О высших перекисях водорода. I [Ueber höhere Wasserstoffsperoxyde. I] — Ber. Dtsch. chem. Ges., 33, 1506 (1900).

17. О высших перекисях водорода. II [Ueber höhere Wasserstoffsperoxyde. II].— Ber. Dtsch. chem. Ges., 33, 3111 (1900); Mon. Sci. (4), 15, 25 (1901).

18. Четырехокись водорода [Tetroxyde d'hydrogène].— Arch. Sci. phys. nat., (4) 11, 287 (1900).

## 1901

19. О действии безводной серной кислоты на сухой персульфат калия [Ueber die Einwirkung von wasserfreier Schwefelsäure auf trocknes Kaliumpersulfat].— Ber. Dtsch. chem. Ges., 34, 1520 (1901).

20. О механизме действия перекиси водорода на марганцовую кислоту [Zur Kenntnis des Mechanismus der Einwirkung von Hydroperoxyd auf Permangansäure.— Ber. Dtsch. chem. Ges., 34, 3851 (1901); Du mécanisme de l'action du peroxyde d'hydrogène sur l'acide permanganique].— Arch. Sci. phys. nat., (4) 13, 41 (1902); Mon. Sci., (4) 16, 16 (1902).

## 1902

21. К вопросу о существовании высших перекисей водорода [Zur Frage nach der Existenz höherer Hydroperoxyde.— Ber. Dtsch. chem. Ges., 35, 158 (1902); Sur l'existence des peroxydes d'hydrogène contenant plus d'oxygène que le bioxyde].— Mon. Sci., (4) 16, 337 (1902).

22. О действии хромовой кислоты на перекись водорода [Ueber das Verhalten der Chromsäure gegen Hydroperoxyd].— Ber. Dtsch. chem. Ges., 35, 872 (1902).

23. Исследования о роли перекисей в химии живой клетки. I. О действии перекиси водорода на живую клетку [Untersuchungen über die Rolle der Peroxyde in der Chemie der lebenden Zelle. I. Ueber das Verhalten der lebenden Zelle gegen Hydroperoxyd].— Ber. Dtsch. chem. Ges., 35, 1275 (1902).

[Совместно с Р. Шода]

24. Исследования о роли перекисей в химии живой клетки. II. Об образовании перекисей в живой клетке [Untersuchungen über die Rolle der peroxyde in der Chemie der lebenden Zelle. II. Ueber Peroxydbildung in der lebenden Zelle]. Ber. Dtsch. chem. Ges., 35, 2466 (1902).

[Совместно с Р. Шода]

25. Исследования о роли перекисей в химии живой клетки. III. Окислительные ферменты как вещества, образующие перекиси [Untersuchungen über die Rolle der Peroxyde in der Chemie der lebenden Zelle. III. Oxydationsfermente als Peroxyderzeugende Körper].— Ber. Dtsch. chem. Ges., 35, 3943 (1902).

[Совместно с Р. Шода]

26. Четырехокись водорода и озоновая кислота [Hydrotetroxyd und Ozonsäure].— Ber. Dtsch. chem. Ges., 35, 3424 (1902); Arch. Sci. phys. nat., 15, 97 (1903).

27. О взаимодействии хромовой кислоты с реактивом Каро [Ueber das Verhalten der Chromsäure gegen das Caro'sche Reagens].— Ber. Dtsch. chem. Ges., 35, 3940 (1902); Arch. Sci. phys. nat., 15, 231 (1903)

## 1903

28. Исследования о роли перекисей в химии живой клетки. IV. О пероксидазе. Untersuchungen über die Rolle der Peroxyde in der Chemie der lebenden Zelle. IV. Ueber Peroxydase].— Ber. Dtsch. chem. Ges., 36, 600 (1903).

[Совместно с Р. Шода]

29. Исследования о роли перекисей в химии живой клетки. V. Разложение так называемых оксидов на оксигеназы и пероксидазы [Untersuchungen über die Rolle der Peroxyde in der Chemie der lebenden Zelle. V. Zerlegung der sogenannten Oxydasen in Oxygenasen und Peroxydasen].— Ber. Dtsch. chem. Ges., **36**, 606 (1903).

[Совместно с Р. Шода]

30. Исследования о роли перекисей в химии живой клетки. VI. О каталазе [Untersuchungen über die Rolle der Peroxyde in der Chemie der lebenden Zelle. VI. Ueber Katalase].— Ber. Dtsch. chem. Ges., **36**, 1757 (1903).

[Совместно с Р. Шода]

31. Распад углеводов в животном организме [Dégradation des hydrates de carbone dans l'organisme animal].— C. R. Acad. Sci., Paris. **136**, 1351 (1903). Совместно с Ф. Бателли.

32. Современное состояние учения об окислительных ферментах растений [Ueber den gegenwärtigen Stand der Lehre von den pflanzlichen Oxydationsfermenten].— Biochem. Cbl., **1**, 417 (1903).

[Совместно с Р. Шода]

#### 1904

33. Исследования о роли перекисей в химии живой клетки. VII. О химической природе оксидов [Untersuchungen über die Rolle der Peroxyde in der Chemie der lebenden Zelle. VII. Einiges über die chemische Natur der Oxydasen].— Ber. Dtsch. chem. Ges., **37**, 36 (1904).

[Совместно с Р. Шода].

34. Исследования о роли перекисей в химии живой клетки. VIII. О действии пероксидазы [Untersuchungen über die Rolle der Peroxyde in der Chemie der lebenden Zelle. VIII. Ueber die Wirkungsweise der Peroxydase].— Ber. Dtsch. chem. Ges., **37**, 1342 (1904).

[Совместно с Р. Шода].

35. Исследования о роли перекисей в химии живой клетки. IX. Скорость реакции в присутствии пероксидазы [Untersuchungen über die Rolle der Peroxyde in der Chemie der lebenden Zelle. IX. Geschwindigkeit der Peroxydaseraktion].— Ber. Dtsch. chem. Ges., **37**, 2434 (1904).

[Совместно с Р. Шода]

36. Об окислительных ферментах [Sur les ferments oxydants].— Arch. Sci. phys. nat., **17**, 447 (1904).

37. Исследования по вопросу об окислительных ферментах [Recherches sur les ferments oxydant].— Arch. Sci. phys. nat., (4) **17**, 477 (1904).

[Совместно с Р. Шода]

38. Действие пероксидазы на реакцию между перекисью водорода и подистоводородной кислотой [Wirkungsweise der Peroxydase bei der Reaktion zwischen Hydroperoxyd und Jodwasserstoffsäure].— Ber. Dtsch. chem. Ges., **37**, 3785 (1904).

39. К вопросу о разложении углекислоты под действием света [Zur Kenntnis der Zersetzung der Kohlensäure unter dem Einflusse des Lichtes].— Ber. Dtsch. chem. Ges., **37**, 3985 (1904).

#### 1905

40. К вопросу о каталазе [Zur Kenntnis der Katalase].— Ber. Dtsch. chem. Ges., **38**, 1878 (1905).

#### 1906

41. Влияние пероксидазы на спиртовое брожение [Einfluss der Peroxydase auf die alkoholische Gärung].— Ber. Dtsch. chem. Ges., **39**, 1664 (1906).

42. Разложение каталазы дрожжей при бесклеточном спиртовом брожении [Ueber das Schicksal der Hefekatalase bei der zellfreien alkoholischen Gärung].— Ber. Dtsch. chem. Ges., 39, 1669 (1906).

43. Влияние пероксидазы на активность каталазы [Einfluss der Peroxydase auf die Tätigkeit der Katalase].— Ber. Dtsch. chem. Ges., 39, 1670 (1906).

44. Действие света на уксуснокислый уранил [Einwirkung des Lichtes auf Uranyl-acetat].— Ber. Dtsch. chem. Ges., 39, 1672 (1906).

45. Пероксидазы как специфически действующие ферменты. I [Peroxydasen als spezifisch wirkende Enzyme. I].— Ber. Dtsch. chem. Ges., 39, 2126 (1906).

46. Пероксидазы как специфические действующие ферменты. II (Ответ Р. Шода) [Peroxydasen als spezifisch wirkende Enzyme. II. Hrn. R. Chodat zur Antwort].— Ber. Dtsch. chem. Ges., 39, 3329 (1906).

47. Окислительные процессы в живой клетке [Processus d'oxydation dans la cellule vivante].— Mon. Sci., (4) 20. 321, 540 (1906).

1907

48. О действии йода на пероксидазу [Ueber das Verhalten der Peroxydase gegen Jod].— Ber. Dtsch. chem. Ges., 40, 230 (1907).

49. О действии гидроксилamina, гидразина и синильной кислоты на пероксидазу [Ueber das Verhalten der Peroxydase gegen Hydroxylamin, Hydrazin und Blausäure].— Ber. Dtsch. chem. Ges., 40, 3185 (1907).

1908

50. К вопросу о пероксидазе, содержащейся в тирозиназе [Zur Kenntnis der in Tyrosinase tätigen Peroxydase].— Ber. Dtsch. chem. Ges., 41, 216 (1908).

51. О механизме действия тирозиназы [Ueber die Wirkungsweise der Tyrosinase].— Ber. Dtsch. chem. Ges., 41, 221 (1908).

52. О действии света на пероксидазу [Ueber das Verhalten der Peroxydase gegen Licht].— Ber. Dtsch. chem. Ges., 41, 225 (1908).

53. О содержании азота в окислительных ферментах [Ueber den Stickstoffgehalt der Oxydationsfermente].— Ber. Dtsch. chem. Ges., 41, 226 (1908).

54. К вопросу об очистке пероксидазы [Zur Reinigung der Peroxydase].— Ber. Dtsch. chem. Ges., 41, 2345 (1908).

[Совместно с С. И. Черняком].

1909

55. К вопросу о тирозиназе [Zur Kenntnis der Tyrosinase].— Ber. Dtsch. chem. Ges., 42, 594 (1909).

56. Расщепление воды фосфорноватистокислыми солями в присутствии палладия в качестве катализатора [Spaltung des Wassers durch Hypophosphite in Gegenwart von Palladium als Katalysator].— Ber. Dtsch. chem. Ges., 42, 4463 (1909).

57. Новые работы в области растительных и животных оксидаз и пероксидаз [Neuere Arbeiten auf dem Gebiete der pflanzlichen und tierischen Oxydasen und Peroxydasen (Sammelreferat)].— Biochem. Cbl., 9 (1909).

1910

58. Метод быстрого приготовления окислительных ферментов из растительных экстрактов [Eine Methode zur schnellen Verarbeitung von Pflanzenextrakten auf Oxydationsfermente].— Ber. Dtsch. chem. Ges., 43, 362 (1910).

59. К теории действия оксидаз. I. Оксидазы, не содержащие ни марганца, ни железа [Zur Theorie der Oxydasewirkung. I. Mangan- und eisenfreie Oxydasen].— Ber. Dtsch. chem. Ges., 43, 364 (1910).

60. К теории действия оксидаз. II. Влияние металлических солей на дальнейшее превращение продуктов действия оксидазы [Zur Theorie der Oxydasewirkung. II. Einfluss der Metallsalze auf die weitere Produkte der Oxydasewirkung].— Ber. Dtsch. chem. Ges., 43, 366 (1910).

61. Медленное сгорание и окислительные ферменты [Die langsame Verbrennung und die Oxydationsfermente].— Fortschr. d. naturwiss. Forschung (Abderhalden), 1, 85 (1910).

1911

62. К вопросу о восстановительных ферментах. I. О ферменте Шардингера (пергидридаза) [Zur Kenntnis der Reduktionsfermente. I. Ueber das Schardinger-Enzym (Perhydridase)].— Biochem. Zs., 31, 443 (1911).

63. К вопросу о восстановительных ферментах. II. Восстановление нитратов системой «пергидридаза — альдегид — вода» [Zur Kenntnis der Reduktionsfermente-

II. Reduction der Nitrate durch Das System «Perhydridase — Aldehyd — Wasser»].— *Biochem. Zs.*, **33**, 282 (1911).

64. О действии кислот на фенолазу [Ueber das Verhalten der Phenolase gegen Säuren].— *Biochem. Zs.*, **34**, 473 (1911).

[Совместно с Б. И. Збарским]

65. Исследования над восстановительными ферментами. I [Recherches sur les ferments reducteurs. I].— *Arch. Sci. phys. nat.*, 116 (4) **32**, 27 (1911).

#### 1912

66. Химизм дыхательных процессов.— *ЖРФХО*, **44**, № 1—2 (1912).

67. К вопросу о восстановительных ферментах. III. О коферменте пергидридазы в животных тканях [Zur Kenntnis der Reduktionsfermente. III. Vorkommen eines Kofermentes der Perhydridase in tierischen Geweben].— *Biochem. Zs.*, **38**, 154 (1912).

68. К вопросу о специфичности действия фенолазы [Zur Kenntnis der Spezifitätserscheinungen bei der Phenolasewirkung].— *Biochem. Zs.*, **42**, 417 (1912); [Contribution à l'étude des phénomènes de spécificité dans l'action de la phénolase].— *Arch. Sci. phys. nat.*, **33**, 1 (1912).

[Совместно с В. Марианович].

#### 1913

69. Окислительные и восстановительные ферменты и их роль в процессах дыхания [Les ferments oxydants et réducteurs et leur rôle dans le processus de respiration].— *Arch. Sci. phys. nat.*, **35**, 240 (1913).

70. К вопросу о восстановительных ферментах. IV. Растительная пергидридаза [Zur Kenntnis der Reduktionsfermente. IV. Pflanzliche Perhydridase].— *Biochem. Zs.*, **52**, 412 (1913); [Perhydridase végétale].— *Arch. Sci. phys. nat.*, **36**, 168 (1913).

71. К вопросу о восстановительных ферментах. V. Новые данные о коферменте пергидридазы. Образование альдегидов из аминокислот [Zur Kenntnis der Reduktionsfermente V Weiteres über das Koferment der Perhydridase]. Bildung von aldehyden aus Aminosäuren].— *Biochem. Zs.*, **58**, 205 (1913).

72. О механизме окислительных процессов [Ueber das Mechanismus der Oxydationsvorgänge].— *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **46**, 3864 (1913).

73. Образование азотистой кислоты в растительных экстрактах путем окисления [Oxydative Bildung von Salpétrigsäure in Pflanzenextrakten].— *Biochem. Zs.*, **52**, 418 (1913).

74. Окислительные процессы в живых тканях. [Oxydationsprozesse in der lebenden Substanz].— *Oppenheimers Handb. d. Biochemie. Ergänzungsband*, 178 (1913). Jena.

#### 1914

75. О химизме действия тирозиназы [Ueber das Wesen der sogenannten Tyrosinase-wirkung].— *Biochem. Zs.*, **60**, 221 (1914).

76. Исследования над восстановительными ферментами. II [Recherches sur les ferments réducteurs. II].— *Arch. Sci. phys. nat.*, **37**, 409 (1914).

77. Чувствительность реакции пероксидазы [Empfindlichkeit der Peroxydase-reaktion].— *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **47**, 2122 (1914).

78. Выход пурпурогаллина при окислении пирогаллола посредством пероксидазы и перекиси водорода [Purpurogallinausbeuten bei der Oxydation des Pyrogallols mit Peroxydase und Hydroperoxyd].— *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, **47**, 2125 (1914).

#### 1915

79. О независимом существовании окислительных и восстановительных ферментов [Sur l'individualité des ferments oxydants et réducteurs].— *Arch. Sci. phys. nat.*, **39**, 5<sup>9</sup> (1915).

80. Окислительные и восстановительные ферменты дрожжей [Les ferments oxydants et réducteurs de la levure].— *Arch. Sci. phys. nat.*, **39**, 460 (1915).

81. Существует ли пероксидаза в дрожжах [La Peroxydase existe-t-elle dans la levure de bière?].— *Arch. Sci. phys. nat.*, **39**, 497 (1915); [Kommt Peroxydase in Hefen vor?].— *Fermentforschung*, **1**, 197 (1915).

82. Быстрый метод обнаруживания и количественное определение незначительных количеств эстеразы [Schneller Nachweis und quantitative Bestimmung geringer Esterasemengen].— *Fermentforschung*, **1**, 151 (1915).

#### 1916

83. О реакциях пероксидазы, очищенной путем ультрафильтрации [Sur les réactions de la peroxydase purifiée par ultrafiltration].— *Arch. Sci. phys. nat.*, [4], **42**, 56 (1916).

84. О новой реакции мочи [Sur une nouvelle réaction de l'urine].— C. R. Acad. Sci., Paris, **162**, 353 (1916).

85. Расщепление фенолазы путем дифференциальной адсорбции [Dédoublément de la phénoloxydase par absorption différentielle].— Arch. Sci. phys. nat., **41**, 424 (1916).

1917

86. Неспецифичность животных и растительных восстановительных ферментов [Non spécificité du ferment réducteur animal et végétal].— C. R. Acad. Sci., Paris, **164**, 248 (1917).

87. Исследования над восстановительными ферментами. III [Recherches sur les ferments reducteurs. III].— Arch. Sci. phys. nat., (4), **43**, 307 (1917).

1920

88. Определение продуктов распада белковых веществ в кровяной сыворотке [Dosage des produits de dégradation des matières protéiques dans le sérum sanguin].— C. R. Acad. Sci., Paris, **171**, 1175 (1920).

[Совместно с Б. И. Збарским].

89. К вопросу об исследовании ферментных показателей крови: определение каталазы, пероксидазы и эстеразы в капле крови [Contribution a l'étude des indices d'enzymes du sang. Dosage de la catalase, de la peroxydase et de l'éthérase dans une goutte de sang].— C. R. Acad. Sci., Paris, **171**, 967 (1920).

[Совместно с С. Р. Зубковой].

1921

90. О ферментных показателях крови. I. Количественное определение каталазы, пероксидазы, протеазы и эстеразы в капле крови.— Сб. работ по чистой и прикл. химии.— Тр. хим. ин-та им. Л. Я. Карпова, **1**, 65 (1923). Ueber die Fermentzahlen des Blutes. I. Quantitative Bestimmung der Katalase, der Peroxydase, der Protease und der Esterase in einem Blutropfen.— Biochem. Zs., **125**, 283 (1921).

[Совместно с С. Р. Зубковой].

1922

91. Действие перекиси водорода на формальдегид. К теории окислительных процессов.— Сб. работ по чистой и прикл. химии.— Тр. Хим. ин-та им. Л. Я. Карпова, **1**, 57 (1923). Einwirkung von Hydroperoxyd auf Formaldehyd. Zur Theorie der Oxydationsvorgänge.— Ber. Dtsch. chem. Ges., **50**, 2560 (1922).

[Совместно с А. В. Генерозовым].

92. Об образовании ферментов в прорастающих зернах [Ueber die Fermentbildung in keimenden Pflanzensamen].— Biochem. Zs., **134**, 183 (1922).

[Совместно с А. И. Опариним].

1923

93. О зависимости химического действия ферментов от характера среды. I. О мнимых ауко- и антиферментных свойствах кровяной сыворотки — Сб. работ по чистой и прикл. химии.— (Тр. Хим. ин-та им. Л. Я. Карпова, **2**, 3 (1924). Scheinbare auto- u. antifermmentative Eigenschaften des Serums.— Biochem. Zs., **135**, 32 (1923).

[Совместно с Б. И. Збарским и К. А. Николаевым].

94. О зависимости химического действия ферментов от характера среды. II. Об антифенолазе.— Сб. работ по чистой и прикл. химии.— (Тр. Хим. ин-та им. Л. Я. Карпова, **2**, 11 (1924). Ueber Antiphenolase (Antilakkase).— Biochem. Zs., **135**, 39 (1923).

[Совместно с В. А. Энгельгардтом].

95. О действии перекиси водорода на углекислые соли и о новой теории ассимиляции углекислоты растениями.— Сб. работ по чистой и прикл. химии.— Тр. Хим. ин-та им. Л. Я. Карпова, **1**, 75 (1923).

[Совместно с Э. Н. Ивановским].

96. Значение кислорода для образования ферментов в прорастающих семенах.— Сб. работ по чистой и прикл. химии.—Тр. Хим. ин-та им. Л. Я. Карпова, 1, 81 (1923). Ueber die Bedeutung des Sauerstoffs für die Fermentbildung in keimenden Pflanzensamen.—Biochem. Zs., 148, 476 (1924).

[Совместно с А. И. Опариным].

## 1924

97. Мнимое восстановление углекислоты в формальдегид перекисью водорода и теория ассимиляции Тунберга.— Сб. работ по чистой и прикл. химии.— Тр. Хим. ин-та им. Л. Я. Карпова, 3, 66 (1924). Die vermeintliche Reduktion der Kohlesäure zu Formaldehyd durch Hydroperoxyd und die Assimilations-Hypothese von Thunberg. Ber. Dtsch. chem. Ges., 57, 735 (1924).

[Совместно с А. М. Моносоном].

98. О зависимости химического действия ферментов от характера среды. III. О специфичности антифенолатических иммунных сывороток.— Сб. работ по чистой и прикл. химии.—Тр. Хим. ин-та им. Л. Я. Карпова, 2, 18 (1924). Ueber die Spezifität der antiphenolatischen Immunsere.— Biochem. Zs., 148, 456 (1924).

[Совместно с В. А. Энгельгардтом].

99. О ферментных показателях крови. II. Суточные колебания показателей каталазы и протеазы у животных и у человека.— Сб. работ по чистой и прикл. химии.— Тр. Хим. ин-та им. Л. Я. Карпова, 2, 26 (1924). Ueber die Fermentzahlen des Blutes. II. Schwankungen der Katalase- u. Proteasezahlen während 24 Stunden bei Tieren und Menschen.— Biochem. Zs., 148, 460 (1924).

[Совместно с Е. С. Иваницким-Василенко].

100. О ферментных показателях крови. III. Показатель каталазы крови тироидоэктомированных коз [Ueber die Fermentzahlen des Blutes. III. Die Katalasezahl des Blutes thyreoidektomierter Ziegen].— Biochem. Zs., 148, 474 (1924).

[Совместно с Е. Херасковой].

## 1925

101. Возрождение ферментов, инактивированных нагреванием.— Сб. работ по чистой и прикл. химии.—Тр. Хим. ин-та им. Л. Я. Карпова, 4, 217 (1925).

[Совместно с А. И. Опариным].

102. О роли сопровождающих веществ при иммунизации препаратами инвертазы. [Ueber die Rolle der Begleitsstoffe bei der Immunisierung mit Invertasepräparaten].— Biochem. Zs., 160, 261 (1925).

[Совместно с В. А. Энгельгардтом и А. Д. Замысловым].

103. Об активном водороде.— Сб. работ по чистой и прикл. химии.—Тр. Хим. ин-та им. Л. Я. Карпова, 4, 1 (1925) [Ueber aktiven Wasserstoff].— Ber. Dtsch. chem. Ges., 58, 1388 (1925).

104. О пероксидазных функциях оксигемоглобина.— Журн. эксп. биол. и мед., № 1, 60 (1925). Ueber die Peroxydasefunktion des Oxyhämoglobins.— Biochem. Zs., 167, 227 (1925).

[Совместно с А. Культюгиным].

105. О мнимом тождестве окислительных и восстановительных ферментов. Журн. эксп. биол. и мед. № 2, 152 (1925). Sind sauerstoffübertragende Enzyme mit wasserstoffübertragenden identisch?— Biochem. Zs., 169, 105 (1926).

[Совместно с К. А. Николаевым].

106. Количественные изменения ферментов в зреющих, покоящихся и прорастающих зернах пшеницы.— Сб. работ по чистой и прикл. химии.— Тр. Хим. ин-та им. Л. Я. Карпова, 5, 62 (1926). Untersuchungen über den Fermentgehalt von reifenden, ruhenden und keimenden Weizensamen.— Biochem. Zs., 180, 363 (1927).

[Совместно с А. И. Опариным и Р. А. Венером].

107. Активирование кислорода.— БСЭ, 2, 52 (1926).

108. Ассимиляция углекислоты.— БСЭ, 3, 609 (1926).

1927

109. Ферментативное превращение ксантина и гипоксантина в мочевую кислоту без участия посторонних акцепторов водорода.— Журн. эксп. биол. и мед., № 18, 385 (1927). Enzymatische Umwandlung des Xanthins u. Hypoxanthins in Harnsäure ohne Mitwirkung fremder Wasserstoffakzeptoren. Ber. Dtsch. chem. Ges., 60, 82 (1927).

[Совместно с Д. М. Михлиным].

110. О так называемой сукцино-дегидразе. [Ueber die sogenannte Succinodehydrase.— Ber. Dtsch. chem. Ges., 60, 827 (1927).

[Совместно с Д. М. Михлиным].

111. Биохимия.— БСЭ, 6, 358 (1927).

1930

112. К вопросу о термолабильности ферментов [Zur Kenntnis der Thermolabilität der Fermente].— Biochem. Zs., 226, 482 (1930).

[Совместно с В. В. Вилевским].

1931

113. О химической роли воды в окислительном действии хинона. К теории окислительных процессов.— ДАН СССР, 11 (1932). Ueber die chemische Beteiligung des Wassers an der oxydierenden Wirkung des Chinons. Zur Theorie der Oxydationsvorgänge.— Ber. Dtsch. chem. Ges., 64, 2769 (1931).

[Совместно с К. А. Николаевым].

1932

114. К вопросу о механизме каталитического действия железа при аутоокислениях [Zur Frage nach dem mechanismus der Eisenkatalyse bei Autoxydations-Prozessen].— Ber. Dtsch. chem. Ges., 65, 1788 (1932).

1933

115. К вопросу о цепном характере реакций разложения перекиси водорода под действием пероксидазы и каталазы.— Журн. физ. хим., 4, 505 (1933).

1934

116. Поглощение водорода палладием в отсутствие и присутствии воды.— Журн. физ. хим., 5, 809 (1934).

[Совместно с М. И. Темкиным].

117. Связывание атмосферного азота при обыкновенной температуре и давлении при посредстве энзимов, извлеченных из азотных бактерий.— ДАН СССР, 1 (1934).

[Совместно с З. В. Ермольевой и М. П. Степаниан].

118. Современное состояние учения о процессах медленного окисления и активации кислорода.— Усп. химии, 3, 177 (1934).

## 1936

119. О первых уловимых продуктах каталитического распада сахаров в бескислородной среде.— Биохимия, 1, 75 (1936).

[Совместно с Е. Н. Алексеевой и В. П. Древингом].

120. Биологическое и техническое значение ферментативных процессов.— Изв. АН СССР, серия биол. № 4, 627 (1936).

## 1937

121. Вступительное слово на совещании по вопросам биохимии сорта и наследования биохимических признаков.— Изв. АН СССР, серия биол. № 6, 1601 (1937).

## 1938

122. Биохимический синтез лимонной кислоты.— Изв. АН СССР, серия биол. № 5, 991 (1938).

[Совместно с Д. М. Михлиным].

123. К вопросу о предполагаемом тождестве белковых веществ (О работах проф. С. С. Перова).— Вестн. АН СССР, № 1, 67 (1938).

## 1940

124. Перекисная теория окисления.— Проблемы кинетики и катализа, сб. 4, 18 (1940). Théories de l'oxydation spontanée.— Acta Phys. Chim. URSS, 9, 381 (1938).

## 1942

125. Химизм процессов дыхания. 3-е Тимирязевское чтение (1942). Киргизгосиздат. Фрунзе.



ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ НАЗВАНИЙ ИСТОЧНИКОВ

В БИБЛИОГРАФИЧЕСКИХ ССЫЛКАХ

- Арх. биол. наук — Архив биологических наук. СПб.  
Арх. клин. и эксп. мед. — Архив клинической и экспериментальной медицины.  
Москва — Ленинград.  
Вестник АН СССР — Вестник Академии Наук СССР. Москва — Ленинград.  
ДАН СССР — Доклады Академии Наук СССР. Москва — Ленинград.  
ЖРФХО — Журнал русского физико-химического Общества. С. Петербург,  
Ленинград.  
Журн. эксп. биол. и мед. — Журнал экспериментальной биологии и медицины.  
Москва — Ленинград.  
Журн. физ. хим. — Журнал физической химии. Москва.  
Зап. Акад. Наук — Записки Академии Наук. СПб.  
Изв. АН СССР — Известия Академии Наук СССР. Москва — Ленинград.  
Изв. Ин-та физ.-хим. анализ. — Известия Института физико-химического анализа Академии Наук СССР. Москва.  
Мед. журн. — Медицинский биологический журнал. Москва.  
Тр. Хим. Ин-та им. Л. Я. Карпова — Труды Химического Института  
им. Л. Я. Карпова, Москва.  
Усп. Химии — Успехи химии. Москва.  
Юго-вост. вестн. здравоохран. — Юго-восточный вестник здравоохранения. Ростов  
на Дону.  
Abhandl. Münch. Akad. Wiss. — Abhandlungen der Kgl. Bayerischen Akademie der  
Wissenschaften. München.  
Amer. Chem. J. — American Chemical Journal. Easton Pa.  
Ann. Chim. Phys. — Annales de Chimie et de physique. Paris.  
Ann. Inst. Pasteur — Annales de l'Institut Pasteur. Paris.  
Ann. Ostetricia — Annali di Ostetricia e Gynecologia. Milano.  
Ark. vor Kemi — Arkiv for Kemi, mineralogi och geologi. Uppsala (Stockholm).  
Arch. di fisiologia — Archivio di fisiologia. Firenze.  
Arch. Entw. Mechanik d. Organismen — Archiv für Entwicklungsmechanik der Orga-  
nismen (Berlin) Leipzig.  
Arch. exp. Pathol. u. Pharm. — Archiv für experimentelle Pathologie und Pharma-  
kologie. Leipzig — Berlin.  
Arch. Hyg. — Archiv für Hygiene und Bakteriologie. München — Berlin.  
Arch. int. physiol. — Archives internationales de physiologie. Liège et Paris.  
Arch. mikroskop. Anat. — Archiv für mikroskopische Anatomie (und Entwicklungsmecha-  
nik). Bonn.  
Arch. Pharm. — Archiv der Pharmazie. Berlin.  
Arch. Pathol. — см. Arch. exp. Pathol. и Pharm.  
Arch. physiol. Heilk. — Archiv für physiologische Heilkunde. Stuttgart.  
Arch. Sci. phys. nat. — Archives des Sciences physiques et naturelles. Genève — Lau-  
sanne — Paris.  
Basler Verh. — Verhandlungen der naturforschenden Gesellschaft in Basel. Basel.  
Beih. z. Bot. Cbl. — Beihefte zum botanischen Centralblatt. Dresden.  
Beitr. chem. Physiol. u. Pathol. — Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie.  
Braunschweig.  
Ber. Dtsch. bot. Ges. — Berichte der Deutschen botanischen Gesellschaft. Berlin  
Ber. Dtsch. chem. Ges. — Berichte der Deutschen chemischen Gesellschaft. Leipzig —  
Berlin.  
Biochem. J. — Biochemical Journal. Liverpool — London.  
Biochem. Cbl. — Biochemisches Centralblatt. Berlin.

- Biochem. Zs.— Biochemische Zeitschrift. Berlin.  
 Biologica—Revue scientifique du médecin. Paris — Trabajos del Instituto de biología de la facultad de biología y ciencias medicas de la universidad de Chile. Santiago.  
 Biol. Zs.— Zeitschrift für Biologie München.  
 Bot. Gazette—Botanical Gazette. Chicago.  
 Bull. Acad. Roy. Belg.— Bulletin de l'académie royale de Belgique. Classe des Sciences. Bruxelles.  
 Bull. Acad. Sci. Cracovie — Bulletin international de l'Académie des Sciences de Cracovie. Cracovie.  
 Bull. Coll. Agric. Tokyo — Bulletin of the College of agriculture. Imperial University. Tokyo.  
 Bull. d. Sci. Pharmacol.—Bulletin des Sciences Pharmacologiques. Paris.  
 Bull. Hyg. Lab. Washington —Bulletin of the Hygiene Laboratory. Washington.  
 Bull. Inst. Bot. Buitenz.— Bulletin de l'Institut botanique de Buitenzorg. Buitenzorg.  
 Bull. Soc. Chim.— Bulletin de la Société chimique de France. Paris.  
 Bull. Soc. Chim. Belg.— Bulletin de la Société chimique de Belgique. Bruxelles.  
 Bull. Soc. mycol. de France — Bulletin de la Société mycologique de France. Paris.  
 Bull. Soc. Pharm.— Bulletin de travaux de la Société de Pharmacie de Bordeaux. Bordeaux.  
 C. R. Acad. Sci., Paris — Comptes Rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences. Paris.  
 C. R. Soc. Biol.—Comptes Rendus des Séances de la Société de biologie et de ses filiales. Paris.  
 C. R. trav. lab. Carlsberg — Comptes Rendus des travaux du Laboratoire de Carlsberg Copenhague.  
 Cbl. Bacteriol.— Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten. Jena.  
 Cbl. Physiol. —Centralblatt für Physiologie. Leipzig—Wien.  
 Chem. Ztg.— Chemiker-Zeitung. Kothen.  
 Enzymologia — Enzymologia. Haag.  
 Erdmanns Journ.— Journal für praktische Chemie (Erdmann). Leipzig.  
 Ergebn. Physiol.— Ergebnisse der Physiologie. Wiesbaden.  
 Fermentforschung — Fermentforschung. Leipzig.  
 Flora — Flora (oder Allgemeine botanische Zeitung). Jena.  
 Fortschr. d. naturwiss. Forschung (Abderhalden) — Fortschritte der naturwissenschaftlichen Forschung (Abderhalden). Berlin—Wien.  
 Gaz. chim. ital.— Gazzetta chimica italiana.— Roma.  
 Hofm. Beitr.—Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie—Fr. Hofmeister Braunschweig.  
 Hyg. Laboratory — Bulletin of hygiene. London.  
 Inst's bot Jahresber.— Jahresbericht des Instituts für angewandte Botanik. Hamburg.  
 Jahrb. wiss. Bot.— Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik. Leipzig — Berlin.  
 J. Amer. Chem. Soc.— Journal of the American chemical Society. Easton — Pa.  
 J. Biol. Chem.—The Journal of Biological Chemistry. Baltimore.  
 J. Chem. Soc.— Journal of the chemical Society. London.  
 J. Exp. Med.— Journal of Experimental Medicine. New-York.  
 J. Pharm. Chim.— Journal de Pharmacie et de Chimie. Paris.  
 J. Physiol.— Journal of physiology. London — Cambridge.  
 J. Physiol. et Pathol.—Journal de physiologie et de pathologie générale. Paris.  
 J. prakt. Chem.— Journal für praktische Chemie. Leipzig.  
 J. Suisse Chim. Pharm.—Journal Suisse de Chimie et de Pharmacie (Schweizerische Wochenschrift für Chemie und Pharmacie). Zürich.  
 Landw. Jb.— Landwirtschaftliche Jahrbücher. Berlin.  
 Landw. Versuchsst.— Landwirtschaftliche Versuchsstationen. Berlin.  
 Lieb. Ann.— Liebigs Annalen der Chemie. Leipzig — Heidelberg — Berlin.  
 Monatsh. f. Chem.— Monatshefte für Chemie und verwandte Teile anderer Wissenschaften. Wien.  
 Mon. Sci. — Moniteur Scientifique. Paris.  
 Naturwiss.— Naturwissenschaften. Berlin (Göttingen und Heidelberg).  
 Pflüg. Arch.—Pflügers Archiv für die gesamte Physiologie der Menschen und der Tiere.  
 Pharm. Bbl.—Pharmaceutische Centralblatt.  
 Bonn — Berlin.  
 Pharm. Cbl.— Pharmaceutische Centralblatt.  
 Planta — Planta. Archiv für wissenschaftliche Botanik. Berlin.  
 Pogg. Ann.— Poggendorffs Annalen der Physik. Leipzig.  
 Proc. Chem. Soc.— Proceedings of the Chemical Society of London. London.  
 Proc. Roy. Soc.— Proceedings of the Royal Society of London. London.  
 Rec. tr. chim. Pays-Bas — Recueil des travaux chimiques des Pays-Bas et de la Belgique. Leyden — Amsterdam.

- Samml. chem. u. chem.-techn. Votr.— Sammlung chemischer und chemischtechnischer Vorträge. Stuttgart.
- Skand. Arch. Physiol.— Skandinavisches Archiv für Physiologie. Leipzig.
- Soc. Biol.— Comptes rendus hebdomadaires des Séances et mémoires de la Société de Biologie. Paris.
- U. S. Dept. Agric. Bull.— Bulletin of the U. S. department of agriculture. Washington
- U. S. Dept. Agric. Rep.— Reports of the U. S. department of agriculture. Washington.
- Virchows Arch.— Virchow's Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin. Berlin.
- Woch. f. Brauer.— Wochenschrift für Brauerei. Berlin.
- Zs. analyt. Chem.— Zeitschrift für analytische Chemie.
- Zs. angew. Chem.— Zeitschrift für angewandte Chemie (und Zentralblatt für technische Chemie). Leipzig.
- Zs. anorg. Chem.— Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie. Hamburg — Leipzig.
- Zs. Biol.— Zeitschrift für Biologie. München — Berlin.
- Zs. Elektrochem.— Zeitschrift für Elektrochemie (und angewandte physikalische Chemie). Halle — Berlin.
- Zs. exp. Pathol. u. Therap.— Zeitschrift für experimentelle Pathologie und Therapie. Berlin.
- Zs. Klin. Med.— Zeitschrift für Klinische Medizin. Berlin.
- Zs. physik. Chem.— Zeitschrift für physikalische Chemie, Stöchiometrie und Verwandtschaftslehre. Leipzig.
- Zs. physiol. Chem.— Zeitschrift für physiologische Chemie. Berlin — Leipzig.
- Zs. Unters. Nahr.— u. Genussm.— Zeitschrift für Untersuchung der Nahrungs — und Genussmittel. Berlin.
-

## СО Д Е Р Ж А Н И Е

|                                                | Стр. |
|------------------------------------------------|------|
| Предисловие . . . . .                          | III  |
| А. И. Опарин. Алексей Николаевич Бах . . . . . | V    |

### Часть I

#### ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ ПО ХИМИИ И БИОХИМИИ

|                                                                                                              |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| О биохимическом круговороте углерода . . . . .                                                               | 3   |
| Современное состояние учения об окислительных ферментах растений . . . . .                                   | 17  |
| Новые работы в области растительных и животных оксидаз и пероксидаз . . . . .                                | 26  |
| Химизм дыхательных процессов . . . . .                                                                       | 50  |
| О механизме окислительных процессов . . . . .                                                                | 112 |
| Современное состояние учения о процессах медленного окисления и активации кислорода . . . . .                | 116 |
| Биологическое и технологическое значение ферментативных процессов . . . . .                                  | 135 |
| Вступительное слово на совещании по вопросам биохимии сорта и наследования биохимических признаков . . . . . | 142 |
| Перекисная теория окисления . . . . .                                                                        | 144 |

### Часть II

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ ПО ХИМИИ И БИОХИМИИ

##### Раздел I

##### АССИМИЛЯЦИЯ УГЛЕКИСЛОТЫ И СВЯЗЫВАНИЕ АЗОТА

|                                                                                                              |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Исследования химического механизма ассимиляции углекислоты хлорофильными растениями. . . . .                 | 155 |
| О взаимодействии формальдегида с белком . . . . .                                                            | 174 |
| О связи между восстановлением, электролизом и фотолизом угольной кислоты . . . . .                           | 179 |
| К вопросу о разложении углекислоты под действием света . . . . .                                             | 183 |
| Действие света на уксуснокислый уранил . . . . .                                                             | 185 |
| О действии перекиси водорода на углекислые соли и о новой теории ассимиляции углекислоты растениями. . . . . | 187 |
| Мнимое восстановление углекислоты в формальдегид перекисью водорода и теория ассимиляции. Тунберга . . . . . | 192 |
| О механизме восстановления азотнокислых солей и образования азотистых соединений в растениях. . . . .        | 196 |

|                                                                                                                                         |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| О формальдоксиге . . . . .                                                                                                              | 213 |
| Связывание атмосферного азота при обыкновенной температуре и давлении при посредстве энзимов, извлеченных из азотных бактерий . . . . . | 218 |

*Раздел 2*

## ТЕОРИЯ ОКИСЛЕНИЯ

|                                                                                                                  |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| О происхождении перекиси водорода, находящейся в атмосферном воздухе и в атмосферных осадках. . . . .            | 221 |
| О существовании перекиси водорода в зеленых растениях . . . . .                                                  | 225 |
| О новой реакции, позволяющей доказать существование перекиси водорода в зеленых растениях. . . . .               | 232 |
| О роли перекисей в процессах медленного окисления . . . . .                                                      | 242 |
| О высших перекисях водорода (I) . . . . .                                                                        | 259 |
| О высших перекисях водорода (II) . . . . .                                                                       | 269 |
| О действии безводной серной кислоты на сухой персульфат калия . . . . .                                          | 275 |
| О механизме действия перекиси водорода на марганцовую кислоту . . . . .                                          | 278 |
| К вопросу о существовании высших перекисей водорода . . . . .                                                    | 282 |
| О действии хромовой кислоты на перекись водорода . . . . .                                                       | 285 |
| Четырехокись водорода и озоновая кислота . . . . .                                                               | 290 |
| О взаимодействии хромовой кислоты с реактивом Каро . . . . .                                                     | 292 |
| Расщепление воды фосфорноватистокислыми солями в присутствии палладия в качестве катализатора. . . . .           | 295 |
| Действие перекиси водорода на формальдегид. К теории окислительных процессов . . . . .                           | 300 |
| Об активном водороде . . . . .                                                                                   | 306 |
| О химической роли воды в окислительном действии хинона. К теории окислительных процессов . . . . .               | 312 |
| К вопросу о механизме каталитического действия железа при аутоокислациях . . . . .                               | 316 |
| К вопросу о цепном характере реакций разложения перекиси водорода под действием пероксидазы и каталазы . . . . . | 318 |
| Поглощение водорода палладием в отсутствии и присутствии воды . . . . .                                          | 324 |
| О первых уловимых продуктах каталитического распада сахаров в бескислородной среде . . . . .                     | 327 |

*Часть III*

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ ПО БИОХИМИИ

*Раздел 1*

## ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ЖИВЫХ ОРГАНИЗМАХ

|                                                                            |     |
|----------------------------------------------------------------------------|-----|
| Исследования о роли перекисей в химии живой клетки . . . . .               | 341 |
| I. О действии перекиси водорода на живую клетку . . . . .                  | —   |
| II. Об образовании перекисей в живой клетке . . . . .                      | 344 |
| III. Окислительные ферменты как вещества, образующие перекиси . . . . .    | 346 |
| IV. О пероксидазе . . . . .                                                | 349 |
| V. Разложение так называемых оксидаз на оксигеназы и пероксидазы . . . . . | 353 |
| VI. О каталазе . . . . .                                                   | 356 |
| VII. О химической природе оксидаз . . . . .                                | 359 |

|                                                                                                      |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| VIII. О действии пероксидазы . . . . .                                                               | 365 |
| IX. Скорость реакции в присутствии пероксидазы . . . . .                                             | 370 |
| Распад углеводов в животном организме . . . . .                                                      | 376 |
| Действие пероксидазы на реакцию между перекисью водорода и иодистоводородной кислотой . . . . .      | 378 |
| К вопросу о каталазе . . . . .                                                                       | 391 |
| Влияние пероксидазы на спиртовое брожение . . . . .                                                  | 396 |
| Разложение каталазы дрожжей при бесклеточном спиртовом брожении . . . . .                            | 400 |
| Влияние пероксидазы на активность каталазы . . . . .                                                 | 402 |
| Пероксидазы как специфически действующие ферменты (I). . . . .                                       | 404 |
| Пероксидазы как специфически действующие ферменты (II) . . . . .                                     | 407 |
| О действии иода на пероксидазу . . . . .                                                             | 409 |
| О действии гидросиламина, гидразина и синильной кислоты на пероксидазу . . . . .                     | 413 |
| К вопросу о пероксидазе, содержащейся в тирозиназе . . . . .                                         | 419 |
| О механизме действия тирозиназы . . . . .                                                            | 423 |
| О действии света на пероксидазу . . . . .                                                            | 427 |
| О содержании азота в окислительных ферментах . . . . .                                               | 428 |
| К вопросу об очистке пероксидазы . . . . .                                                           | 429 |
| К вопросу о тирозиназе . . . . .                                                                     | 433 |
| Метод быстрого приготовления окислительных ферментов из растительных экстрактов . . . . .            | 439 |
| К теории действия оксидаз . . . . .                                                                  | 441 |
| I. Оксидазы, не содержащие ни марганца, ни железа . . . . .                                          | —   |
| II. Влияние металлических солей на дальнейшее превращение продуктов действия оксидазы . . . . .      | 443 |
| О действии кислот на фенолазу . . . . .                                                              | 446 |
| К вопросу о специфичности действия фенолазы . . . . .                                                | 452 |
| Образование азотистой кислоты в растительных экстрактах путем окисления . . . . .                    | 462 |
| О химизме действия тирозиназы . . . . .                                                              | 465 |
| Чувствительность реакции пероксидазы . . . . .                                                       | 472 |
| Выход пурпурогаллина при окислении пирогаллола посредством пероксидазы и перекиси водорода . . . . . | 474 |
| Существует ли пероксидаза в дрожжах? . . . . .                                                       | 476 |
| О реакции пероксидазы, очищенной путем ультрафильтрации . . . . .                                    | 483 |
| Быстрый метод обнаруживания и количественное определение незначительных количеств эстеразы . . . . . | 487 |

## Раздел 2

### ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ЖИВЫХ ОРГАНИЗМАХ

|                                                                                            |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| К вопросу о восстановительных ферментах . . . . .                                          | 490 |
| I. О ферменте Шардингера (пергидридаза) . . . . .                                          | —   |
| II. Восстановление нитратов системой «пергидридаза — альдегид — вода» . . . . .            | 494 |
| III. О коферменте пергидридазы в животных тканях . . . . .                                 | 501 |
| IV. Растительная пергидридаза . . . . .                                                    | 504 |
| V. Новые данные о коферменте пергидридазы. Образование альдегидов из аминокислот . . . . . | 507 |
| О новой реакции мочи . . . . .                                                             | 513 |

|                                                                                                                            |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Неспецифичность животных и растительных восстановительных ферментов . . .                                                  | 515 |
| Определение продуктов распада белковых веществ в кровяной сыворотке . . .                                                  | 517 |
| О мнимом тождестве окислительных и восстановительных ферментов . . . . .                                                   | 519 |
| Ферментативное превращение ксантина и гипоксантина в мочевую кислоту без участия посторонних акцепторов водорода . . . . . | 526 |
| О так называемой сукцино-дегидразе . . . . .                                                                               | 531 |

*Раздел 3*

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ФЕРМЕНТОВ

|                                                                                                  |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| О ферментных показателях крови . . . . .                                                         | 537 |
| I. Количественное определение каталазы, пероксидазы, протеазы и эстеразы в капле крови . . . . . | —   |
| II. Суточные колебания показателей каталазы и протеазы у животных и у человека . . . . .         | 545 |
| III. Показатель каталазы крови тироидэктомированных коз . . . . .                                | 552 |
| О зависимости химического действия ферментов от характера среды . . . . .                        | 554 |
| I. О мнимых ауко- и антиферментных свойствах кровяной сыворотки . . . . .                        | —   |
| II. Об антифенолазе . . . . .                                                                    | 560 |
| III. О специфичности антифенолатических иммунных сывороток . . . . .                             | 565 |
| О роли сопровождающих веществ при иммунизации препаратами инвертазы . . . . .                    | 572 |
| О пероксидазных функциях оксигемоглобина . . . . .                                               | 579 |
| Об образовании ферментов в прорастающих зернах . . . . .                                         | 590 |
| Значение кислорода для образования ферментов в прорастающих семенах . . . . .                    | 597 |
| Возрождение ферментов, инактивированных нагреванием . . . . .                                    | 604 |
| Количественные изменения ферментов в зреющих, покоящихся и прорастающих зернах пшеницы . . . . . | 615 |
| К вопросу о термолабильности ферментов . . . . .                                                 | 622 |
| Биохимический синтез лимонной кислоты . . . . .                                                  | 629 |
| Библиография научных трудов А. Н. Баха . . . . .                                                 | 632 |
| Принятые сокращения названий источников в библиографических ссылках . . . . .                    | 641 |



*Печатается по постановлению  
Редакционно-издательского совета  
Академии Наук СССР*

\*

Редактор издательства *В. Е. Соколова*  
Технический редактор *Е. Н. Симкина*

\*

РИСО АН СССР № 4201. Т-06470. Издат. № 2696.  
Тип. заказ. № 432. Подп. и печ. 5.XI 1950 г.  
Формат. бум. 70×108<sup>1/16</sup>. Печ. л. 56,65+6 вкл.  
Бум. 20,75. Уч.-издат. л. 52,75. Тираж 4000.

Цена в переплете 46 руб.

2-я типография Издательства  
Академии Наук СССР.  
Москва, Шубинский пер., д. 10



О П Е Ч А Т К И

| Стр. | Строка       | Напечатано                               | Должно быть                              |
|------|--------------|------------------------------------------|------------------------------------------|
| 57   | 26 стр.      | элементы,                                | элементы                                 |
| 60   | 28 стр.      | AO + B                                   | AO <sub>2</sub> + B                      |
| 111  | 18 и 19 стр. | Abelour и Abelaus                        | Abelous                                  |
| 117  | 5 стр.       | = 2OHII                                  | + 2OHII                                  |
| 127  | 6 стр.       | *SO <sub>3</sub> O                       | *SO II                                   |
| 173  | 2 стр.       | Trillai                                  | Trillat                                  |
| 173  | 5 стр.       | Dymonel                                  | Dymond                                   |
| 173  | 8 стр.       | Belluci                                  | Belluci                                  |
| 173  | 9 стр.       | Clermout                                 | Clermont                                 |
| 173  | 11 стр.      | Triedel                                  | Friedel                                  |
| 175  | 14—15 стр.   | или —NH <sub>2</sub><br>—NH <sub>2</sub> | —NH <sub>2</sub><br>или —NH <sub>2</sub> |
| 221  | 6 стр.       | Zur Frage,                               | Zur Frage                                |
| 232  | 5 стр.       | plantes]* [vertes]                       | plantes vertes]*                         |
| 266  | 5 стр.       | твора                                    | раствора                                 |
| 278  | 3 стр.       | Einwirkung                               | Einwirkung                               |
| 287  | 15 стр.      | 18.2×2                                   | 18.2×3                                   |
| 495  | 20 стр.      | во без                                   | но без                                   |
| 577  | Заголовок    | инактивированной<br>инвертазы            | инактивированной<br>инвертазой           |
| 639  | 1 стр.       | изменения ферментов . . .                | изменения ферментов . . .                |
| 642  | 13 стр.      | Hygienie                                 | Hygienic                                 |
| 642  | 19 стр.      | Snÿsse                                   | Suisse                                   |
| 642  | 9 стр.       | Bbl                                      | Cbl                                      |
| 644  | 3 стр.       | ассимиляция.                             | ассимиляция                              |

А. Н. Бах.





48.957

BIBLIOTEKA  
Instytutu im. M. Nenckiego

1549