

B.Jirgensons.

JAUNA PROTEINU UN TO SKALD-  
PRODUKTU VIENDABĪGUMA NOTEIKŠA-  
NAS METODE.



*AN*  
*# 10.576.*  
*(S)*

Rīga, 1933.



vērā sāļu iespaidu, Sörensen's nāca pie slēdziena, ka tīra albumina molekulārsvars ir ap 34000. Šim skaitlim tuvu arī dabu ja arī no analitiskiem datiem par aminoskābju un sēra saturu albuminā. Kristaliskā veida jau agrāk bij iegūts arī oksihemoglobins. Nosakot dzelzs daudzumu tajā, un pieņemot, ka molekulā ir viens Fe atoms, oksihemoglobina maksimālais molekulārsvars pēc Hüfner'a<sup>2)</sup> un Jaquet<sup>3)</sup> ir 16600. To pašu slaitli ieguva Hüfner's (l.c.) un Butterfields's<sup>4)</sup> no pētījumiem par O<sub>2</sub> un CO saistīšanos ar hemoglobīnu.

Ka šie apstākļi tomēr nav gluži droši, tas saprotams no špšā. Pirmkārt, analitiskās metodes dod minimālo molekulārsvaru. Otrkārt, iespējams, ka šķīstamais tīrais proteīns nav viendabīga viela, bet sastāv no vairākām, ķīmiskā zinā līdžīgām komponentēm. Iegūtais molekulārsvars tad būtu tikai caurmēra skaitlis. To arī pie dažiem proteīniem drīz vien pierādīja. Piem. no cistīna, sulfid-sēra un triptofāna satura spriežot, kazeīna molekulārsvars ir ap 191000<sup>5)</sup>. Kazeīns ir viegli atdalāms no pārējiem piena proteīniem un to, vairāk kārtīgi pārgulsnējot, var iegūt samērā ļoti tīrā veidā. Tomēr jau sen bij aizdomas, ka kazeīns nav viendabīgs proteīns. K. Linderström-Lang's ar šķīdinātāju palīdzību ieguva veselu rindu kazeīna frakciju, kurām bij dažādas ķīmiskās un fizikāli-ķīmiskās īpašības. Minētais pēt-nieks kazeīnu fracionēja ar siltu, nedaudz HCl saturošu, 60-70% alkoholu.

2) Arch. f. Anat. u. Physiol. 1894, 130. Handb. biol. Arbeitsmeth. Lieferung 306. (1929).

3) Zeitschr. f. <sup>physiol</sup> Chem. 14, 289 (1898).

4) Zeitschr. f. physiol. Chem. 62, 173 (1909).

5) E. Cohn u. J. B. Conan, Ztschr. f. physiol. Chem. 159, 94 (1926).

6) Compt. rend. d. Labor. Carlsberg, 17 (1929).

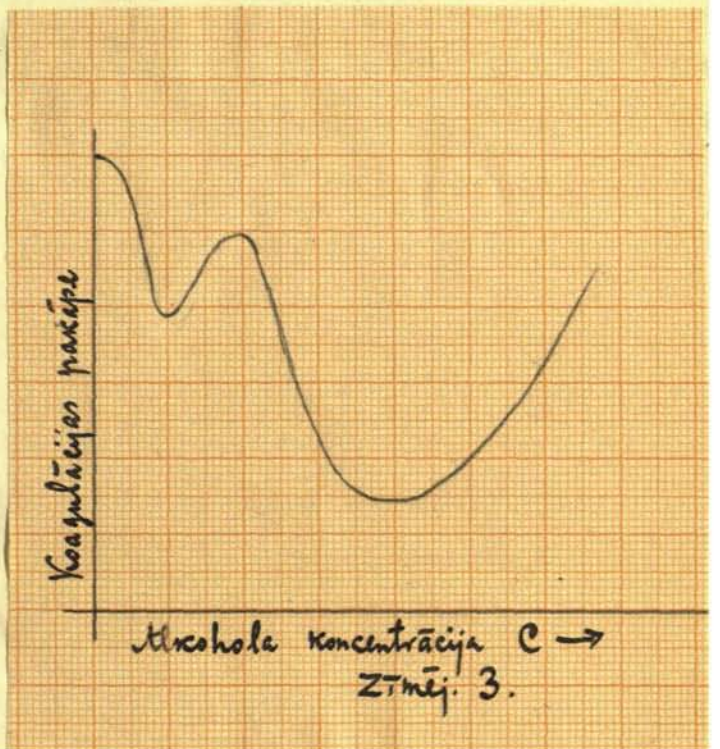
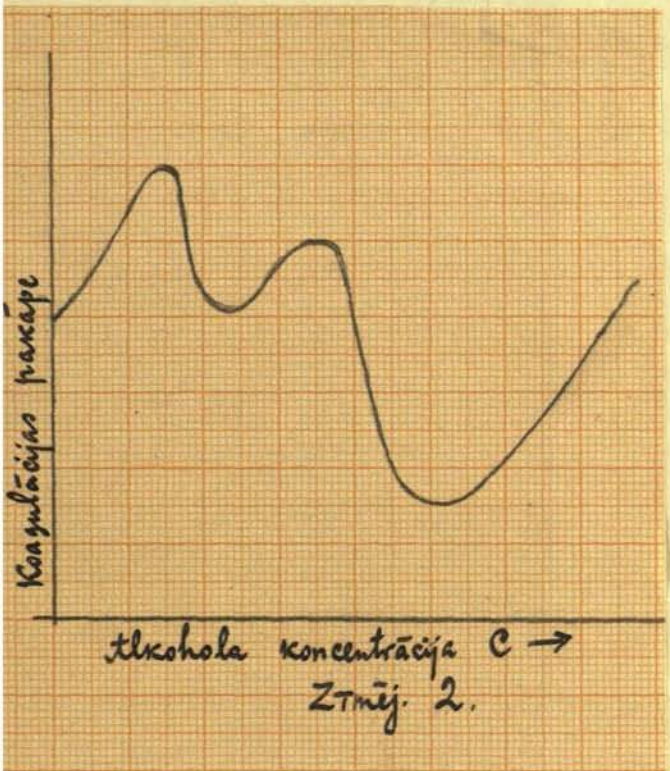
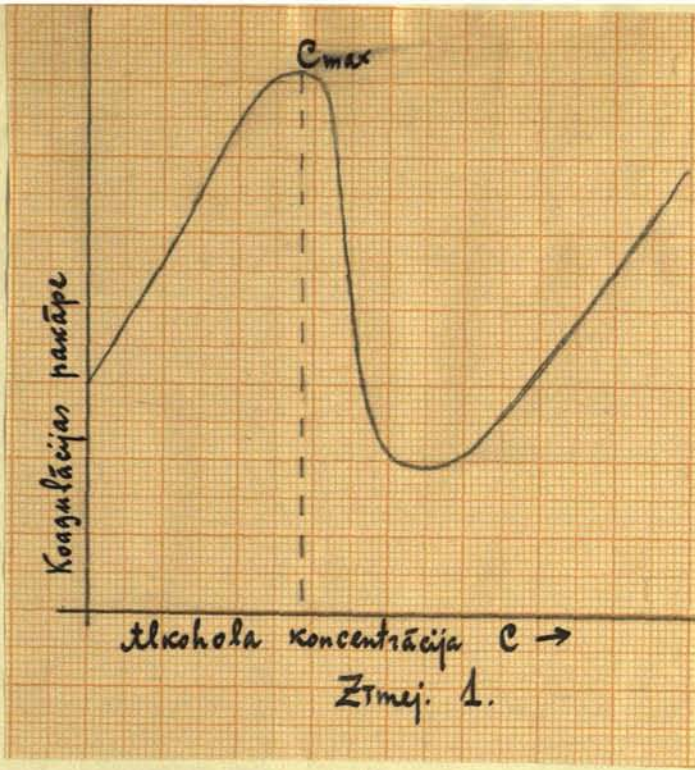
Pret frakcionēšanu tomēr var celt iebildumus, jo iespējams, ka šķīdinātājs dabīgo kazeīnu daļai pārvērš, t.i. ka frakcijas dabīgā kazeinā nav bijušas, bet ir šķīdinātāja iedarbības rezultāts. Šeit tamdēļ ļoti no svara būtu metode, kas par viendabīgumu atļauj pārliect nāties arī citādā, fizikāli-kīmiskā ceļā.

Proteīna viendabīguma jautājumu noskaidrošanā vislielākais ieguvums bez šaubām ir T. Svedberg'a<sup>7)</sup> ultracentrifugēšanas metode. Ar tās palīdzību ļoti evidenti nosakams, vai šķīdinātā augstmolekulārā viela ir viendabīga vai ne? tālāk viegli nosakams dotās vielas molekulārsvars, daļiņu lielums un pat forma. Ultracentrifugēšanas metode rāda, ka, piem., olu albumīns, hemoglobīns un legūmīns ir viendabīgi proteīni; turpretim želatīna, gliadīns, glutenīns, ovoglobulīns, laktoalbumīns un kazeīns sastāv no vairākām komponentēm, kurām dažāds molekulu svārs. Albumīna molekulārsvars pēc Svedberg'a ir 34500, kas labi saskan ar agrākiem Sørensen'a datiem. Hemoglobīna molekulārsvaram ultracentrifuga turpretim deva skaitli 68000, kas ir ap 4 reizes lielāks par agrāk aprēķināto. Kazeīns, kā jau teikts, izrādījās par saliktu proteīnu: pēc van Slyke un Baker'a metodes iegūtā kazeīna molekulārsvars svārstas starp 75000-100000. Viendabīga turpretim izrādījās tā kazeīna frakcija, kas šķīst 60-70% alkoholā; tās molekulārsvars ir 375000. Svedberg's atrod par iespējamu pieņemt, ka šī frakcija patiesībā ir dažu kazeīna komponentu polimerizācijas produkts, kas veidojas alkohola iespaidā.

Ultracentrifuga ir viens no komplicētākiem un dārgākiem aparātiem

7) T. Svedberg, Koll.-Beih. 26, 230 (1928); Koll.-Zeitschr. 51, 10 (1930); T. Svedberg u. Nichols, Journ. Chem. Soc. 48, 3081 (1926); T. Svedberg, L. M. Carpenter, and D. C. Carpenter, Journ. Amer. Chem. Soc. 52, 241 (1930) u.c.





kādi līdz šim lietoti laboratorijās, un jau tamdēļ vien tās pielietošanai ir novilkta diezgan šauras robežas. Bez tam ultracentrifuga nav lietojama peptonveidīgo proteīna skaldproduktu pētīšanā, jo to molekulas ir par mazām un nav centrifugējamas.

Šo apstākļu dēļ, ievēribu pelna arī citi, vienkāršāki panēmieni, ar kuriem palīdzību būtu iespējams spriest par proteīnu un to skaldproduktu viendabīgumu. Viens no šādiem vienkāršiem panēmieniem autoram atklājās <sup>(pētījumos)</sup> par biokolloīdu koagulāciju ar mainītu alkohola koncentrāciju. <sup>8)</sup> Ja kādu proteīnu, piem., albumīnu koagulē ar mainītu alkohola koncentrāciju, tad zināmos nosacījumos rindā var novērot koagulācijas pakāpes maksimumu un minimumu; t. i. pie zināmas alkohola koncentrācijas duļķu pakāpe sasniedz maksimālo intensitāti, tad atkal mazinas līdz minimumam, un pie ļoti lielam alkohola koncentrācijam atkal spēji aug. Vislabāko pārskatu dod grafisks attēls: ja uz abscises liek alkohola koncentrāciju ( $c$ ), uz ordinātes koagulācijas pakāpi (zināmā, noteiktā laikā pēc saliešanas), tad iegūst I zīmējumā redzamo līknes tipu. Alkohola maksimālās koagulācijas koncentrācijas ( $C_{max}$ ) ir tiešā, lineārā sakarā ar to dielektriskā konstantēm;  $C_{max}$  bez tam atkarīgas arī no vides  $P_K$ . Ļoti ievērojams un uzkrītošs nu ir fakts, ka tīrs albumīns deva vienmēr un visos nosacījumos tikai I zīmējumā redzamo līknes tipu; dabīgais kazeīns, kas, kā tagad zināms, turpretim sastāv no vairākām komponentēm, zināmos nosacījumos deva komplikētākas līknes ar diviem maksimumiem un diviem minimumiem, vai diviem minimumiem un vienu maksimumu. <sup>9)</sup>

8) Br. Jirgensons. Pētījumi par biokolloīdu koagulāciju ar organiskām vielām un sāļīm (Dissertācija), Rīga, 1932; Izvilkumi: Biochem. Zetschr. 240, 218 (1931); 246, 219 (1932); Koll.-Zeitschr. 46, 114 (1928); Zeitschr. f. physik. Chem. 158, 56 (1931) u. c.

9) Koll.-Zeitschr. 61, 28 (1932) (izvilkumi).

Attiecīgās līknes redzamas zīmējumos 2 un 3. KomPLICĒTĀS kazeīna koagulācijas līknes bij ļoti pārsteidzošs fakts, kas radīja aizdomas, ka te darīšana ar mēģinājuma klūdu. Autors šīs parādības novēroja jau 1932g. sākumā, bet tikai apmēram pēc I gada varēja tās vest sakarā ar citiem faktiem, līdz ar to dodot zināmu noskaidrojumu. Vairākkārtīgas pārbaudes rādīja, ka komPLICĒTĀS serijas parādās tad, ja kazeīns koagulē zināmās, noteiktās  $P_H$  robežās. Kad tas bij noskaidrots un pierādīts, ka 2-minimumu līknes kazeīna gadījumā ir neapstrīdams fakts, tad kā pirmais šā fakta izskaidrojums arī radās doma, ka komplikāciju pamatā ir kazeīna nevien-  
dabīgums. Lai par to pārliecinātos un pierādītu, ka koagulācijas līknes var izlietot ka materiālu viendabīguma noteikšanā, bij jaizmēģina vairāki citi viendabīgi un nevien-  
dabīgi proteīni. Pirmkārt visādos nosacījumos izmēģināja albumīnu: to koagulēja ar dažādiem alkoholiem pie dažāda  $P_H$ , novēroja minimālu sāls koncentrāciju iespaidu uz maksimumiem u. t. t. Visos nosacījumos tomēr ieguva vienkāršās līknes ar vienu maksimumu un vienu minimumu.<sup>10)</sup> Tālāk izdarīja mēģinājumus ar viendabīgo, 60-70% alkohola šķīstošo kazeīna frakciju, un arī šeit dažādos nosacījumos dabūja vienmēr tikai vienkāršās līknes (I zīm.). Nākošais, labi pazīstamais pētīšanas objekts bija E. Mercka fabrikas hemoglobīns, kas spektroskopiski pierādījās par oksī- un metemoglobīna maisījumu; tas deva zīm. 3. redzamo līkņu tipu, kā to arī varēja sagaidīt. Bez tam literatūrā bij atrodami dati par želatīnu, kas, kā zināms, ir nevien-  
dabīgs proteīns un pēc A. Dumanska<sup>11)</sup> pētījumiem dod ļoti sarežģītu koagulācijas līkni ar diviem maksimumiem un 3 minimumiem (koagulācija ar konstantām NaCl un mainītām etilalkohola koncentrācijām). Arī augstmolekulārie kazeīna

10) l. c. 9 un Koll.-Zeitschr. 63, 78 (1933) (izvilkumi).  
11) Koll.-Beih. 31, 418 (1930).



skaldprodukti, kas iegūti kazeinu šķēlot ar karstu rezorcīnu, un pēc Fodor'a <sup>12)</sup> pētījumiem nav viendabīgi, zināmos nosacījumos deva 2 un 3 zīm. redzamās līknes. Turpretim ar glicerīna palīdzību iegūtie skaldprodukti, kas pēc Fodora pētījumiem ir noteiktas, viendabīgas vielas, <sup>13)</sup> deva ~~pie visiem P~~ <sup>gandrīz vienmēr</sup> vienmēr vienkāršas līknes.

No mazāk pazīstamiem objektiem izmēģināja alkoholā nešķīstošo kazeīna frakciju. Pēc Linderström-Lang'a pētījumiem šī frakcija nav viendabīga. Tiešām, arī koagulācijas līknes šajā gadījumā ir līdzīgas komplicētajam dabīgā kazeīna līknēm un stipri atšķiras no tām, kas iegūtas koagulējot viendabīgo, 60-70% alkoholā šķīstošo kazeīnu. Beidzot 2-maksimumu līknes uzradīja arī daži kazeīna skaldprodukti, kas iegūti ar ūdeni saturoša glicerīna palīdzību. Beidzamos īpatnējā, autora atklātā veidā tīrot, var iegūt arī vairāk homogēnā veidā, kas atkal ļoti labi atspoguļojas koagulācijas līknēs.

Šie daudzie fakti pierāda, ka no koagulācijas serijām iespējams taisīt slēdzienus par proteīna viendabīgumu.

#### Eksperimentālā daļa.

Koagulācijas seriju vispārējais izvešanas veids sīki aprakstīts autora iepriekšējos darbos (l.c. 8). Darba veids īsumā sekošs: vienādu stobriņu rindām ar pipetēm iemēro noteiktus proteīna šķīduma, destillēta ūdens un alkohola daudzumus, samaisa un noteiktos laika sprīžos (piem. pēc 5 minūtēm, 2, 6 un 20 stundām) novēro koagulācijas gaitu. Koptilpums visos stobriņos vienāds un vienmēr bija 12,5 ccm. Seriju novērojot stobriņus salīdzina citu ar citu un vienmēr ar standartšķī-

12) A. Fodor u. S. Kuk, Biochem. Zeitschr. 245, 350 (1932).

13) A. Fodor u. S. Kuk, Biochem. Zeitschr. 240, 123 (1931).

dumu, kur atrodas tikai proteīns ar ūdeni bez koagulātorā. Parasti šādā, tiešā, salīdzinošā veidā maksimāli un minimāli duļķainie šķīdumi un līdz ar to arī maksimālās un minimālās koagulācijas koncentrācijas ļoti viegli nosakāmas. Dažas agrāk izdarītos mēģinājumos lietoja kā palīginstrumentu fotometru (Stufenphotometer von Zeiss). Visas koagulācijas serijas šajā darba izdarītas pie noteikta  $P_H$ . Ūdenraža ionu koncentrācija noteica ar  $H_2$ -elektrodes palīdzību. Lietoto alkoholu tīrības pakāpi parbaudīja destillācijas ceļā (nosakot viršanas temperatūru).

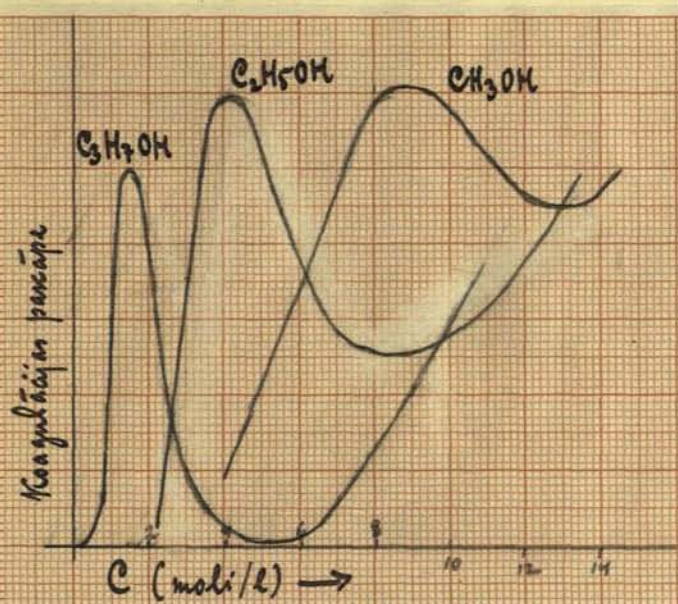
Proteīnu un to derivātu iegūšana un tīrīšana aprakstīta katrā gadījumā atsevišķi.

### I. A l b u m i n s.

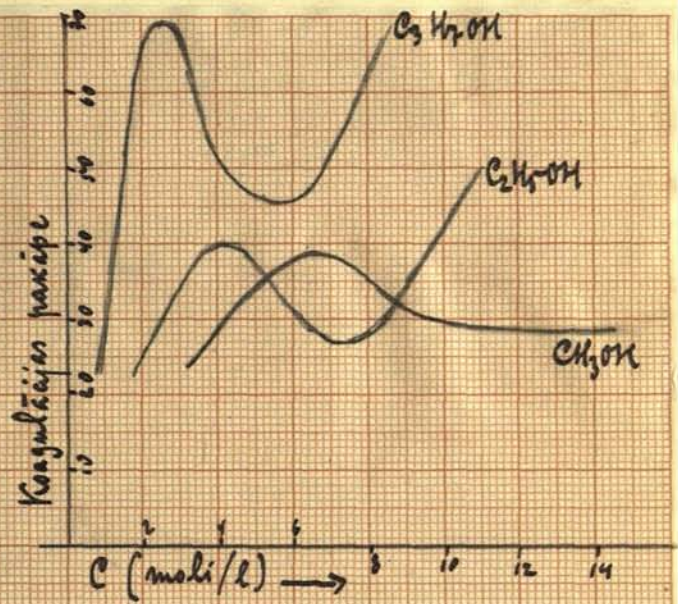
Darbā lietoja pirmkārt E. Merck'a firmas olu albumīnu. Tas iegūts <sup>no</sup>vistas olu baltuma, tam istvaicējot ūdeni. Šāds albumīns ir iedzeltena cieta viela, kas šķīst ūdenī. Iepriekš to saberž smalkā pulverī, nosver un šķīdina noteiktā ūdens daudzumā. Šķīšana norisinās 1-2 stundas, pie kam dabū duļķainu šķīdumu. Šāds albumīna šķīdums nav tīrs arī pēc filtrēšanas, jo olas baltumā bez albumīna ir vēl sāļi, globulīni un ļoti mazā daudzumā arī dažas citas vielas. Gandrīz visus šos piemaisījumus var atdalīt ar dialīzes palīdzību: šķīdumu ievietoja kolodija maisīnā, kuru gremdēja glāzē ar destilētu ūdeni. Beidzamo ik pēc katrām 2-3 stundām maina. Pēc 36-40 stundām albumīns jau ir ļoti tīrs: sāļi un citas molekulārdispersas vielas iziet ārā, bet globulīni nogulsņējas. Tos nofiltrē. Dialīzējot albumīns ir atšķaidījies, tamdēļ izmēro tilpumu, un, ja vajadzīgs, vēl atšķaida. Parasti, lietojot albumīna šķīdumu koncentrācija bij 1 g 100 ccm-os, bet koagulācijas



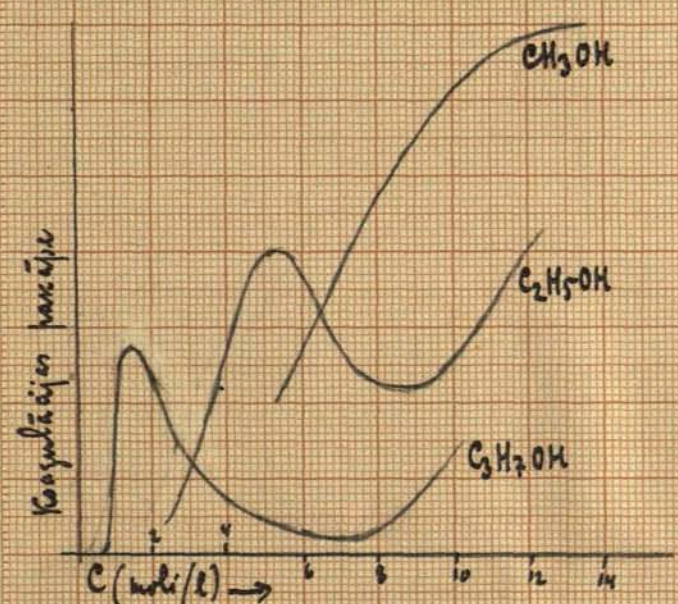




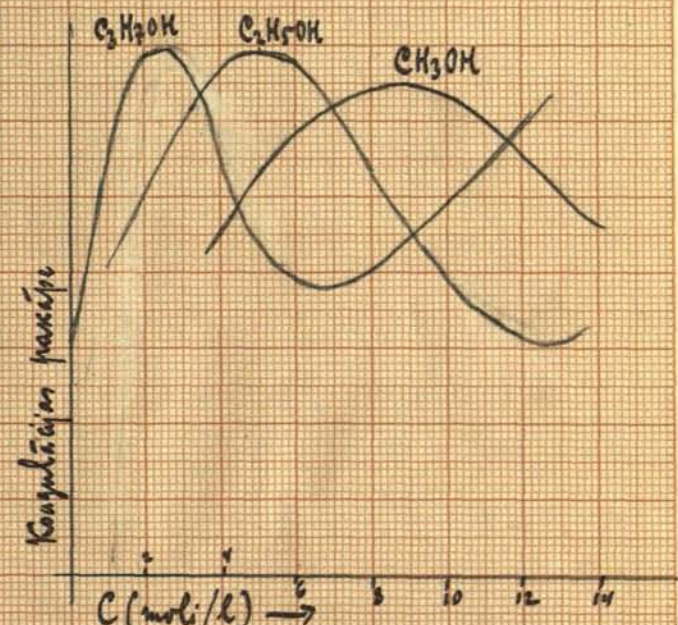
Zīm. 4. albumīns  
p<sub>H</sub> = 6,9.



Zīm. 5. albumīns  
p<sub>H</sub> = 5,0

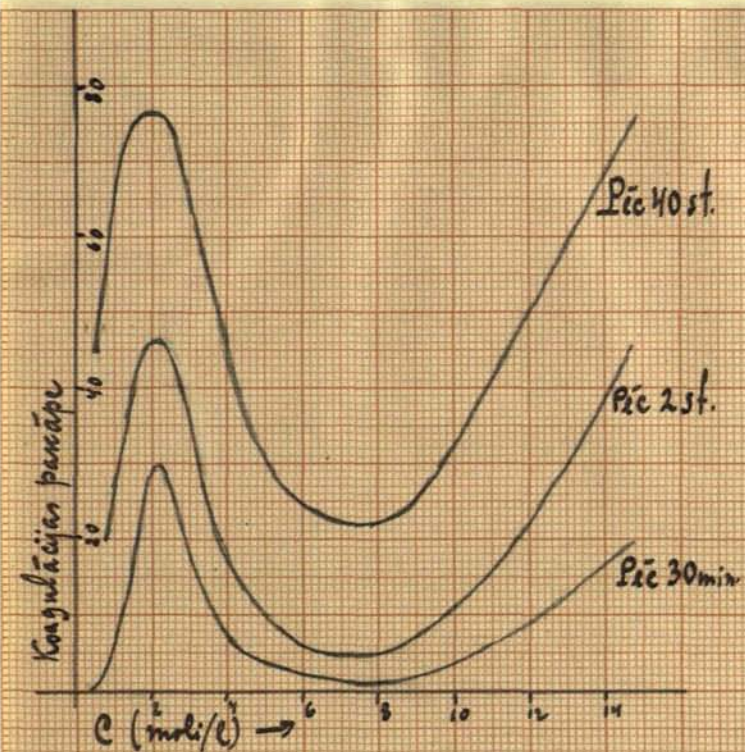
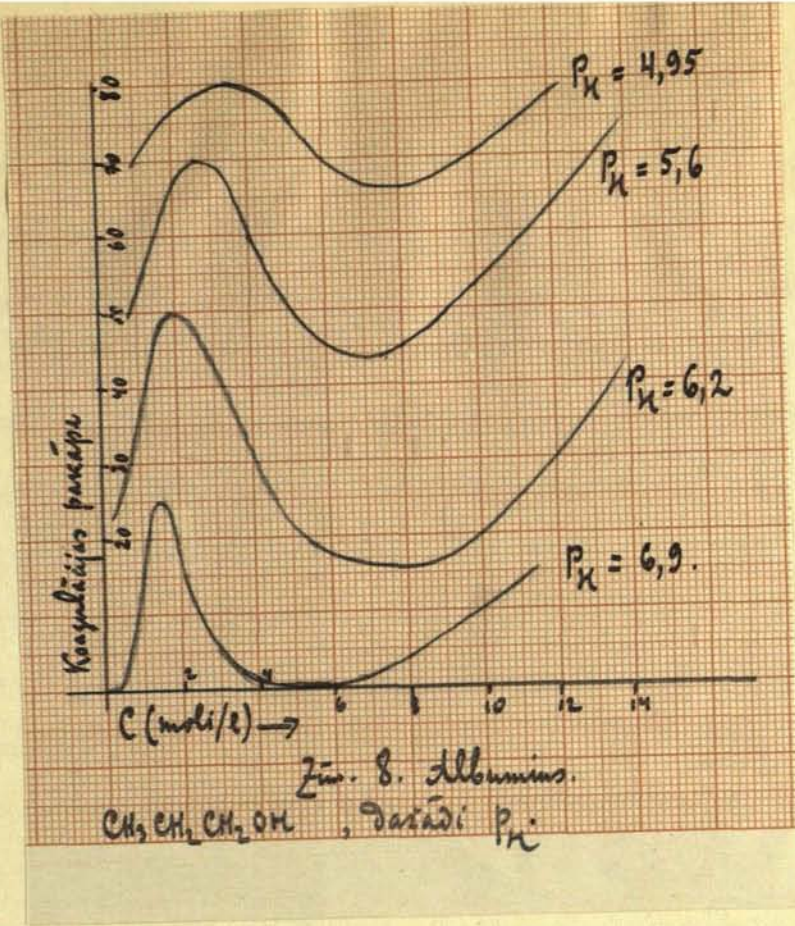


Zīm. 6. albumīns; p<sub>H</sub> = 4,4

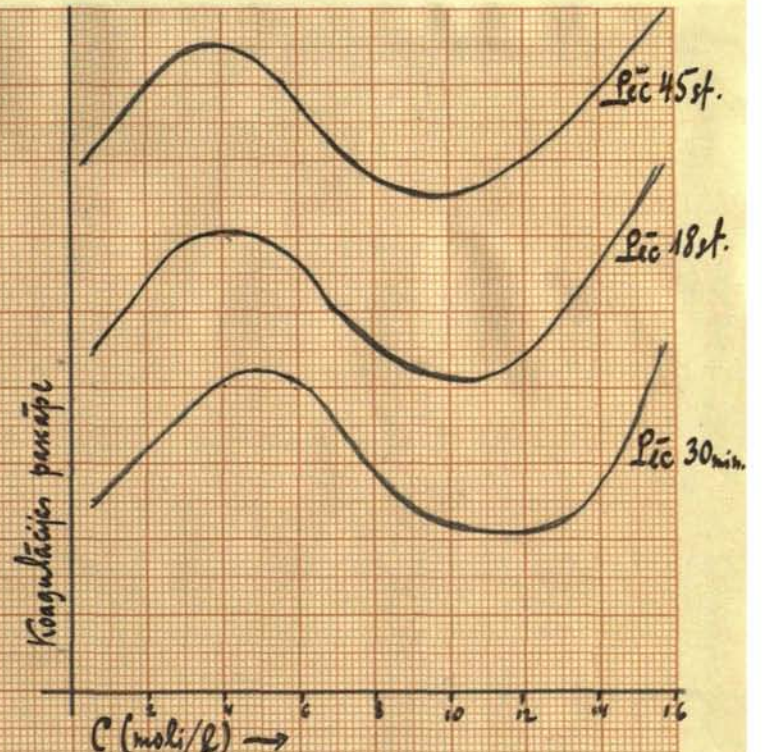


Zīm. 7. albumīns; p<sub>H</sub> = 5,8.





Zīm. 9. albumins  
 $n-C_3H_7OH$ ;  $P_H = 6,5$



Zīm. 10. albumins  
 $C_5H_{11}OH$ ;  $P_H = 5,15$

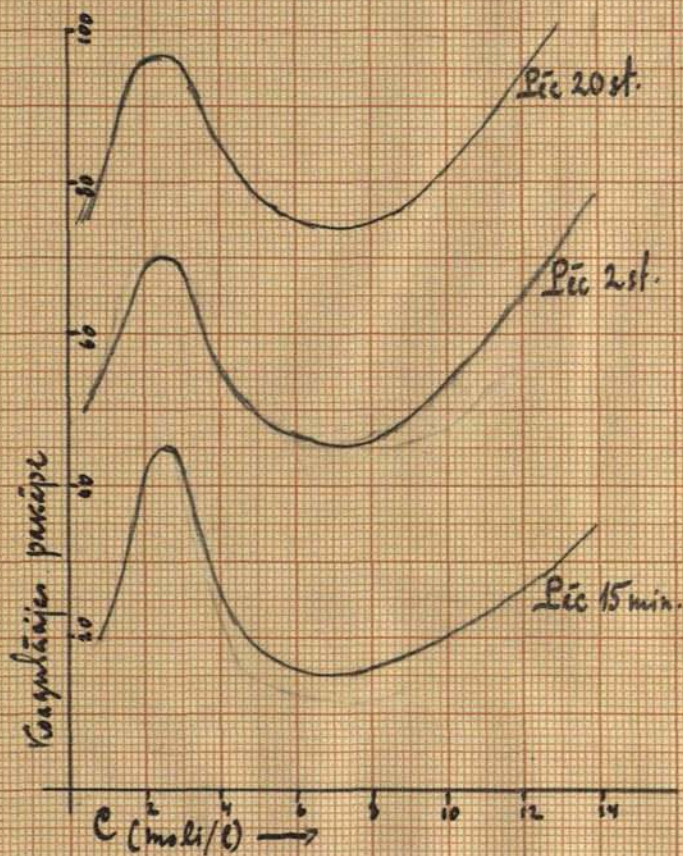


serijās, kur albuminam nāk vēl klāt ūdens un alkohols, tā koncentrācija bij 0,2%. Zinot, ka albumina molekulārsvars 34500, iznāk, ka šādā 0,2% albuminā ir  $5,79 \cdot 10^{-5}$  moli/l albumina. Tīrais albumins koagulēja pie  $53^{\circ}$  un ta vadītspējas mainījās no  $5 \cdot 10^{-5}$  līdz  $9 \cdot 10^{-5}$  recipr. omu. Miecīgajiem elektrolītu piemaisījumiem, kas šajās robežās nosaka vadītspējas mainu, vairs nav nekāda iespaids uz koagulācijas līkni. Liela starpība koagulācijā turpretim ir starp tīro un nemaz nedializēto albuminu.

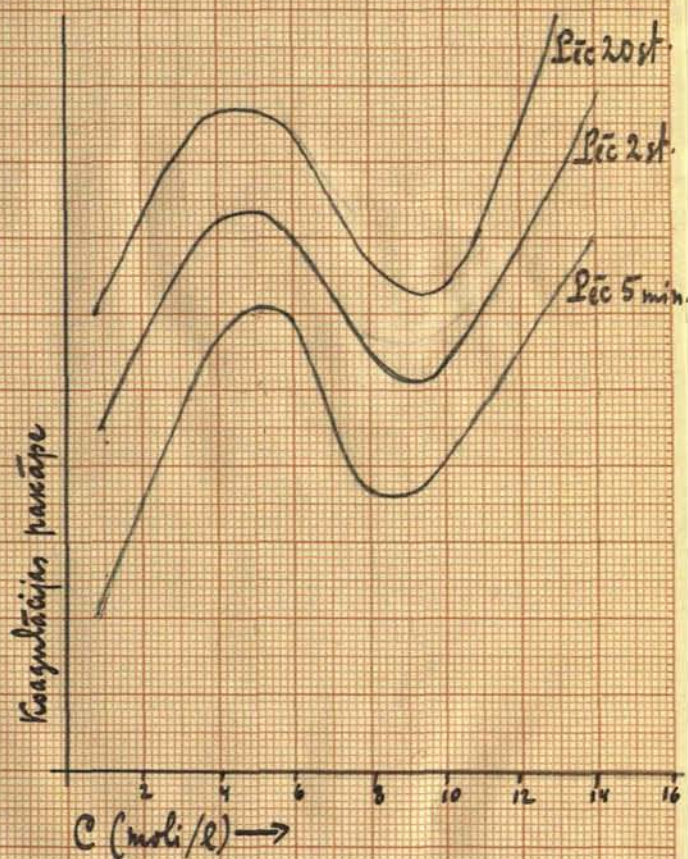
Galvenie rezultāti, kas iegūti albuminu koagulējot ar alkoholiem, sakopoti zīmējumos 4-8. Zīm. 4 un 6 rāda koagulāciju 20 stundas pēc saliešanas, bet 5, 7 un 8, 2 stundas pēc saliešanas. Zīmējumos 5 un 8 attēlotās serijās novērotas arī ar fotometru: uz ordinātes liktie skaitļi ir nolasījumi no fotometra skalas, kā salīdzinošo šķīdumu, nemot attiecīgās koncentrācijas albuminu bez alkohola. Pārējos gadījumos koagulācija novērota bez optiskiem palīglīdzekļiem. Parasti serijās bija 8-II stobrini, t. i. katra līkne veidota no 8-II punktiem.

Redzams, ka līknes veids un stāvoklis koordinātu sistēmā ir atkarīgs no alkohola īpašībām un no  $P_K$ . Visasākos maksimumus dod n-propilalkohols, vismazākais liekums ir  $\text{CH}_3\text{OH}$  līknēs. Vistuvāk ordinātei atrodas propilalkohola līknes, bet vistālāk tās, kas izsaka albumina koagulāciju ar metilalkoholu. Ja koncentrāciju izsaka tilpumprocentēs, tad maksimumi stāv daudz tuvāk cits pie cita, nekā tad, ja nemolārās koncentrācijas. Visvarīgākais, zīmējoties uz sākumā uzstādīto jautājumu par vispārējo līkņu veidu, šeit tomēr tas, ka it visos nosacījumos albumins dod vienkārša tipa līknes (zīm. I). Nekur nav redzama arī jauna maksimuma veidošanās tendence. No svera arī tas, ka maksimumi nemaina, vai ļoti maz maina savu stāvokli ar laiku: pēc 30 un pat 40 un 50 stun-



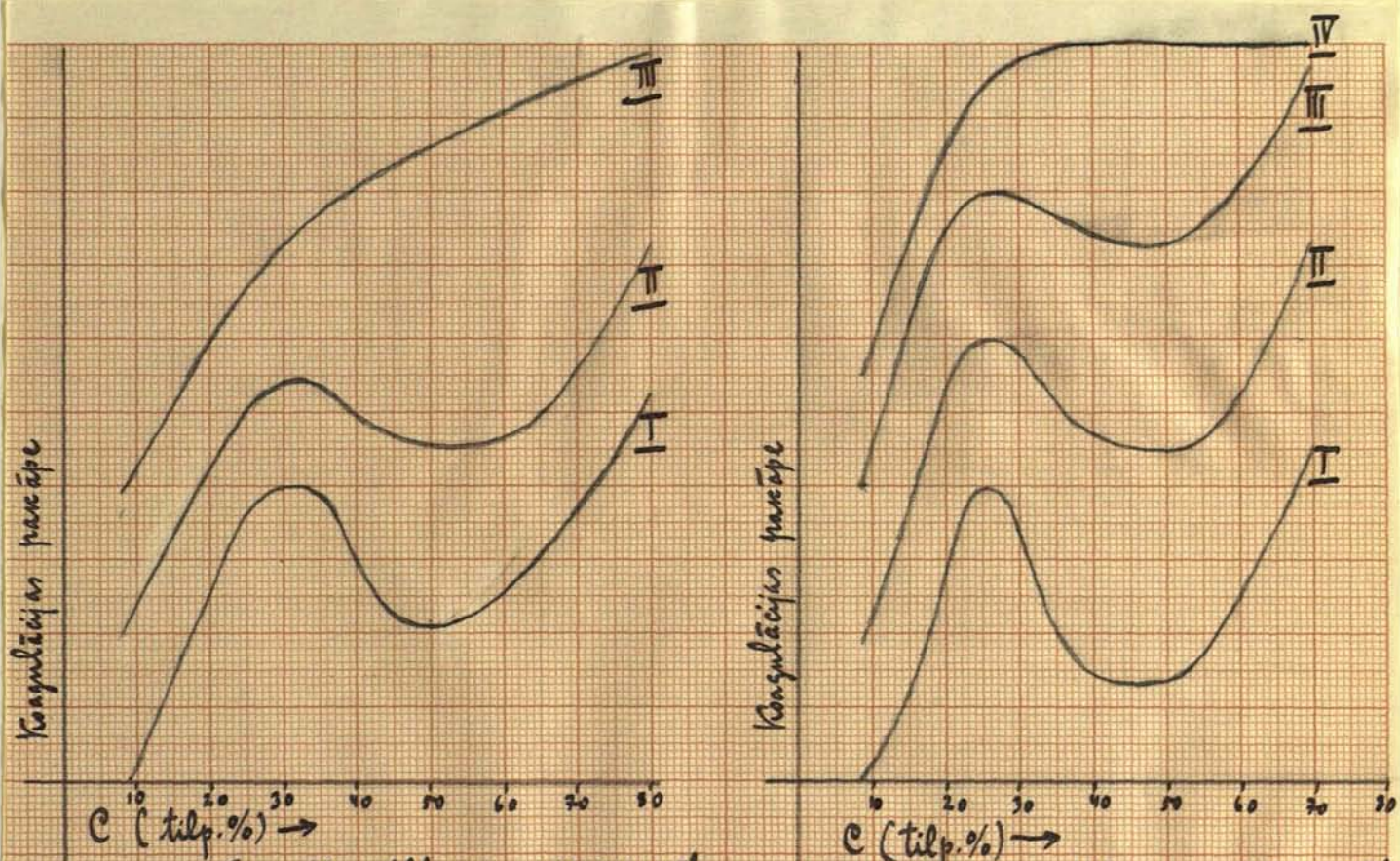


Zīm. 11. albumīns  
 $n\text{-C}_3\text{H}_7\text{OH}$ ;  $P_H = 5,6$ .



Zīm. 12. albumīns  
 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ;  $P_H = 4,07$ .





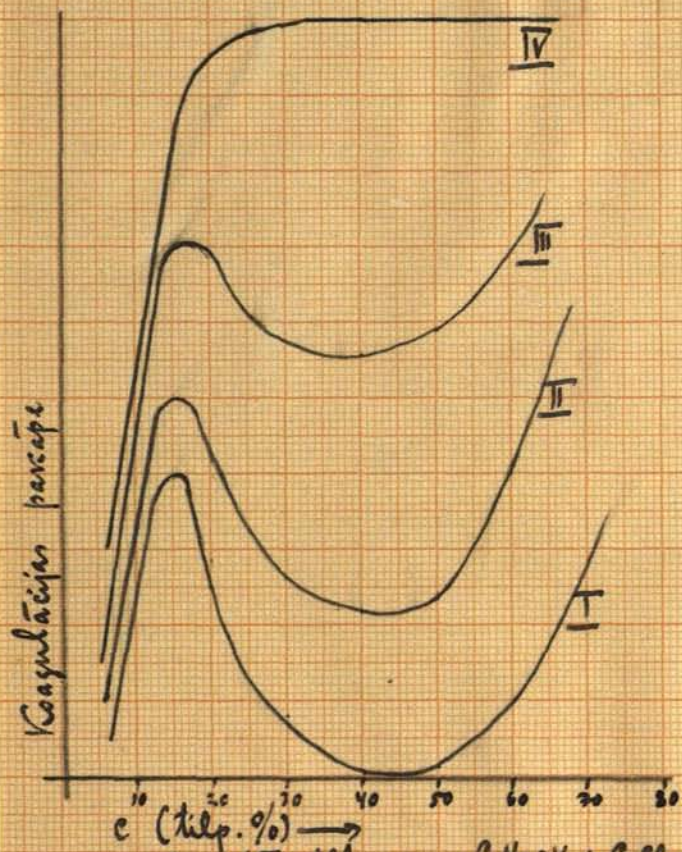
Zīm. 13. albumins +  $\text{CH}_3\text{OH}$  + sāļi.

I	albumins + $\text{CH}_3\text{OH}$	bez $\text{CaCl}_2$
II	"	+ " + $\text{CaCl}_2$ 0,00004 mol/l
III	"	+ " + $\text{CaCl}_2$ 0,00010 " "

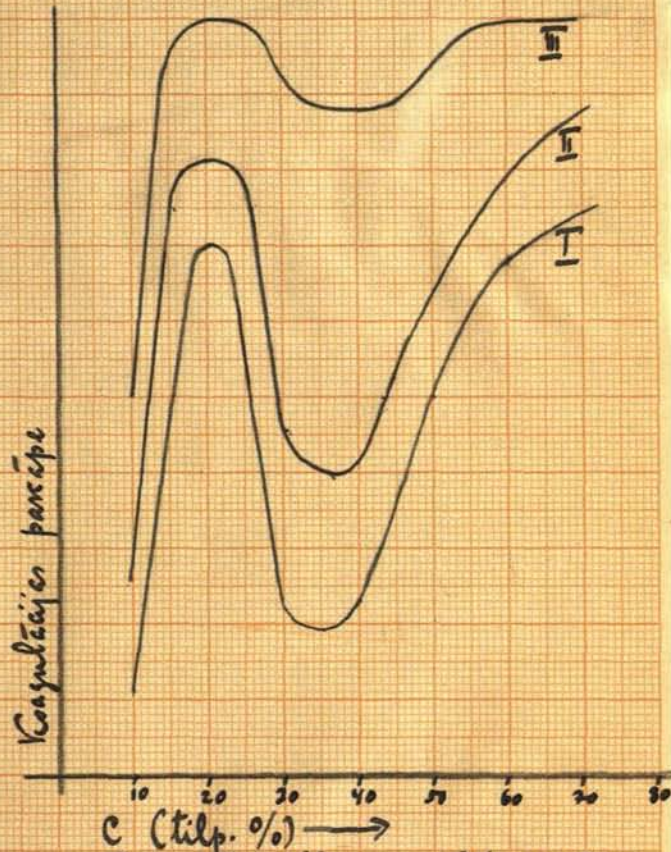
Zīm. 14. albumins +  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  + sāļi

I	albumins + $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	bez $\text{CaCl}_2$
II	"	+ " + $\text{CaCl}_2$ 0,00002 mol/l
III	"	+ " + " 0,00008 "
IV	"	+ " + " 0,00016 "





$c$  (tilp. %)  $\rightarrow$   
 Ztm. 15. albumins +  $\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$  +  $\text{CaCl}_2$   
 I — bez  $\text{CaCl}_2$   
 II —  $\text{CaCl}_2$  0,000016 moli/l  
 III —  $\text{CaCl}_2$  0,000030 " "  
 IV —  $\text{CaCl}_2$  0,000160 " "



$c$  (tilp. %)  $\rightarrow$   
 Ztm. 16. albumins +  $\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$  +  $\text{CaCl}_2$   
 $\text{pH} = 4,75$   
 I — bez  $\text{CaCl}_2$   
 II —  $\text{CaCl}_2$  0,00004 moli/l.  
 III —  $\text{CaCl}_2$  0,00016 " "

dam tie strodas turpat ( vai gandrīz turpat ), kur tie bij koagulācijas sākumā. Šos faktus ilustrē zīmējumi 9-12. Kā redzams, tad maksimums ar laiku vai nu nemaz nemaina savu vietu ( attiecībā pret ordināti ), vai arī nedaudz pāvirzās uz ordinātes pusi.

Maksimumu stāvokli un vispārējo līknes veidu nemaina arī mazas sāls koncentrācijas. Ja tās palielina, tad novērojama sensibilizācija: koagulācija pastiprinās un izliekumi nogludinas. Sāls koncentrācijai sasniedzot zināmu līdumu, diskontinuitātes pazūd pilnīgi, bet pie sevišķi lielas sāls koncentrācijas atkal parādas no jauna. Minimālās sāls koncentrācijas, kuras tikko sākmānāmi sensibilizēt ir dažādas, atkarībā no sāls dabas, no alkohola un no vi-  
des  $P_H$ . Attiecīgie dati sakopoti tabulā I.

Tabula I.

Sāls	Albumina $P_H$	Alkohols	Alkohola koncen. serijā (tilp. %):	Minimālā sāls koncen- trācija (moli/l), kas sensibilizē.
CaCl <sub>2</sub>	5,27	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	16	0,000016
CaCl <sub>2</sub>	5,27	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	40	0,000016
CaCl <sub>2</sub>	5,27	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	16	0,000016
CaCl <sub>2</sub>	5,43	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	24	0,000016
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5,52	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	16	0,00032
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5,52	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	24	0,00032
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6,43	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	16	0,00080
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6,43	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	40	0,00160
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,02	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	16	0,00016
NaCl	6,28	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	16	0,00080
NaCl	4,02	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	16	0,00320

Mazu sāls koncentrāciju <sup>iespaids</sup> uz koagulācijas līknēm redzams zīmējumos I3-I6. Zīm. I3, I4 un I5 attēlotās serijas taisītas ar neitrālu albuminu ( $p_H = 6,2-6,6$ ), bet zīm. I6 rāda sāls iespaidu uz skāba albumina koagulāciju ar propilalkoholu. Līknes izsaka I3 serijas koagulācijas pakāpi pēc 20 stundām pēc saliešanas. Galvenais slēdziens, kas te krīt svarā, atkal tas, ka arī sāls klātbūtnē novērojams vienkāršais līknes tips, un nekur līknes neuzrāda tendenci veidot jaunu maksimumu, resp. minimumu. To pašu novēroja nevien  $CaCl_2$ , bet arī  $NaCl$ ,  $KCl$ ,  $K_2SO_4$ ,  $BaCl_2$  un citu sāļu gadījumā.

Vispārīgais koagulācijas līkņu veids nemainās, arī tad, ja maina albumina koncentrāciju.

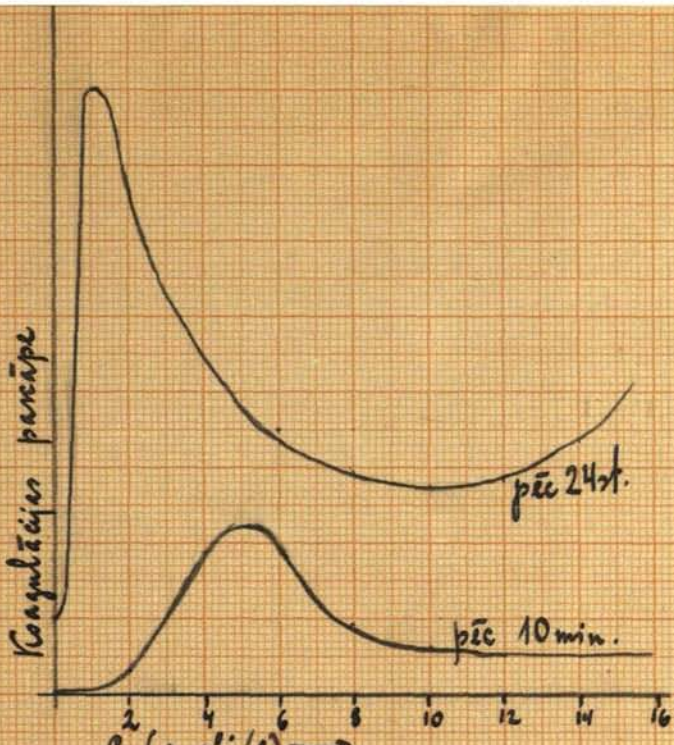
Albumins tā tad vīdāžādākos nosacījumos dod tikai vienkāršo, zīm. I redzamo līkņu tipu.

## 2. D a b ī g a i s k a z e i n s.

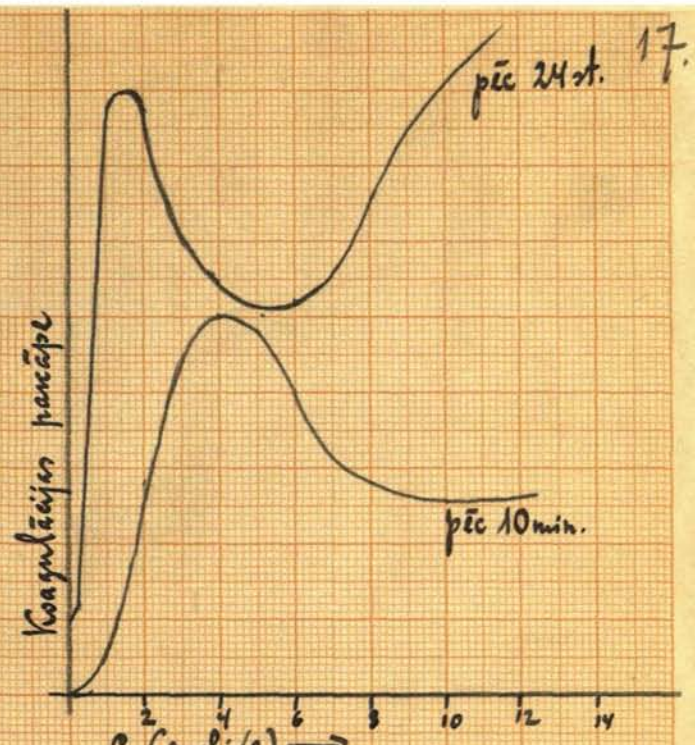
Mēģinājumos lietoja kazeīnu, kas iegūts pēc Hammarsten'a metodes, nogulsējot vājpienu ar atšķ. etiķskābi; kazeīna nogulsnes šķīdina atšķaidītā zoda vai sārmā un atkal nogulsnē ar etiķskābi; šādu pārgulsnēšanu vairākas reizes atkārtojot iegūst tīru kazeīnu. Sausā veidā tas ir balts pulveris, kas nešķīst ūdenī, bet ļoti labi sārmos. Nosvērtu kazeīna daudzumu šķīdināja 0,1n NaOH, pievienoja 0,1n HCl līdz tikko sāk parādīties opalescence un dializēja kolloīdija maisinā pret ūdeni. Dialīzi turpināja tik ilgi, līdz arēja ūdenī veirs nebija konstatējams  $Cl^-$ . Pēc tam ar  $H_2$ -elektrodes palīdzību noteica  $p_H$ . Kazeīna koncentrācija koagulācijas maisījumā bija 0,2%.

Koagulācijas serijas teisiņa tadā pat veidā, kā ar albumīnu. Pie kam jau pašā sakumā uzkrīta, ka ar kazeīnu strādājot ne vienmēr var ie-

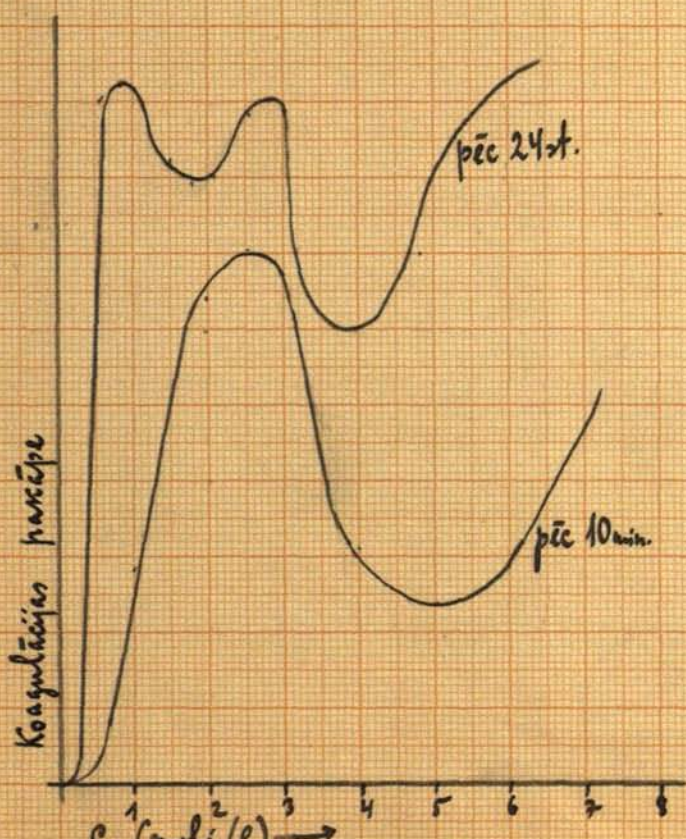




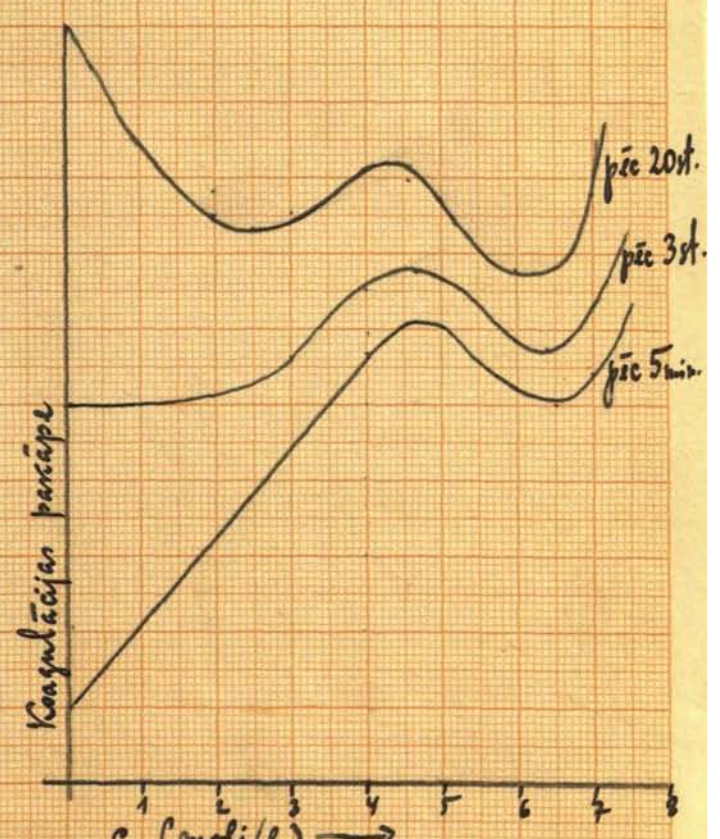
Zīm. 17. Dab. kazeīns  
 $\text{CH}_3\text{OH}$  ;  $p_H = 6,08$



Zīm. 18. Dab. kazeīns  
 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  ;  $p_H = 6,08$

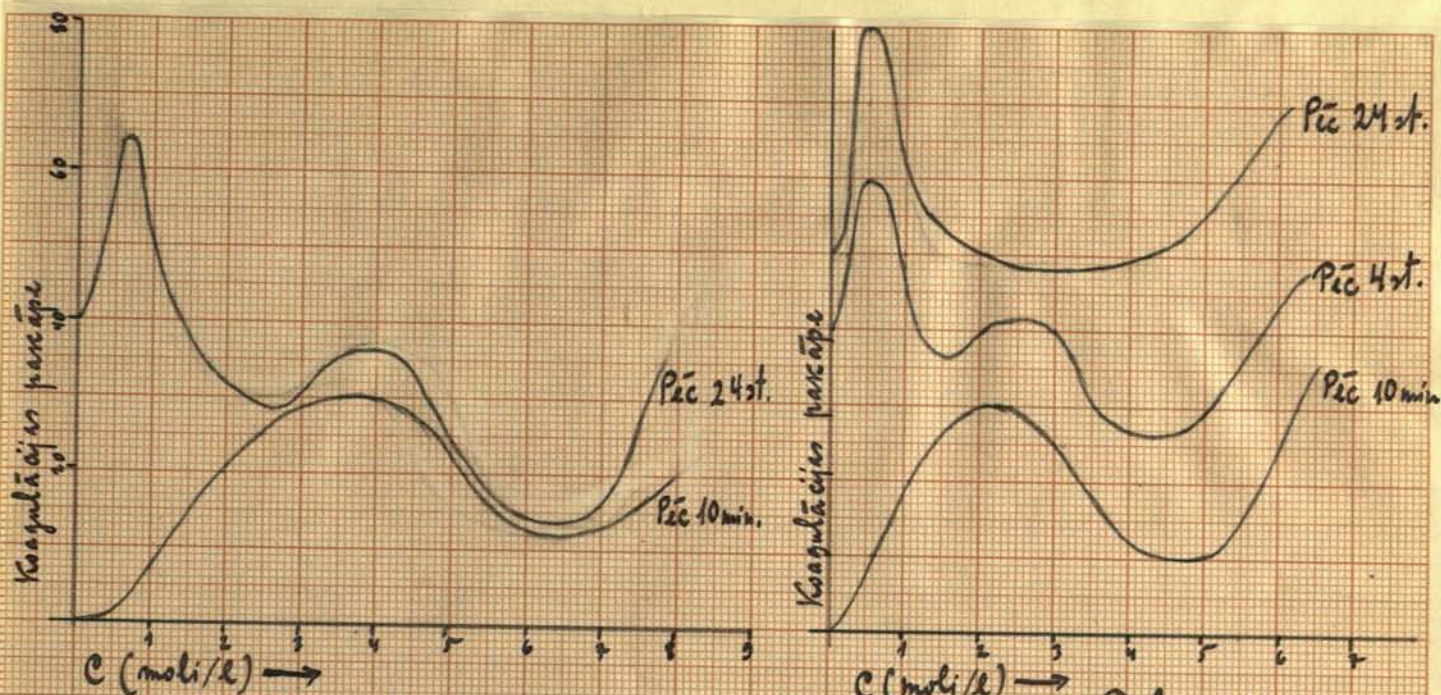


Zīm. 19. Dab. kazeīns.  
 $n\text{-C}_3\text{H}_7\text{OH}$  ;  $p_H = 6,08$



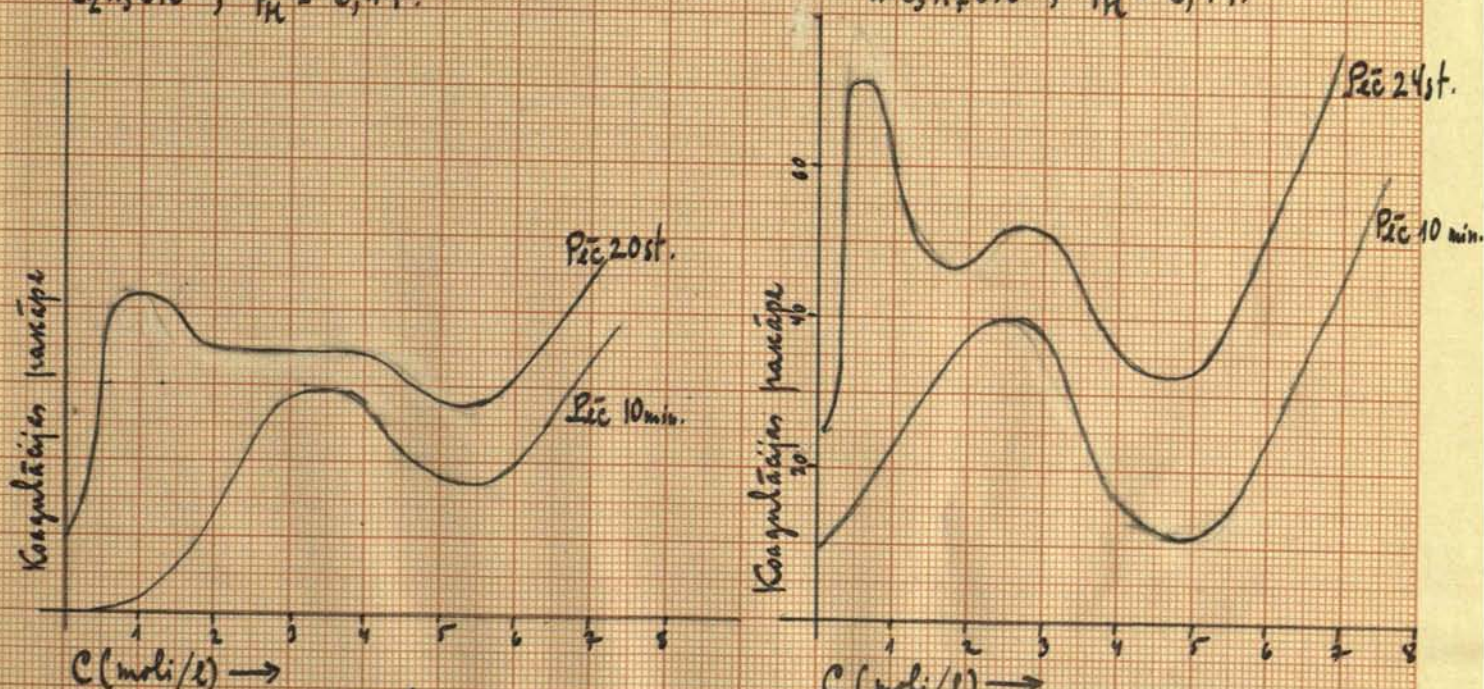
Zīm. 20.  
 Dab. kazeīns ;  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  ;  $p_H = 5,46$





Zīm. 21. Dab. kazeīns  
 $C_2H_5OH$ ;  $P_H = 6,14$ .

Zīm. 22. Dab. kazeīns  
 $n-C_3H_7OH$ ;  $P_H = 6,14$ .



Zīm. 23. Dab. kazeīns  
 $C_2H_5OH$ ;  $P_H = 6,25$

Zīm. 24. Dab. kazeīns  
 $n-C_3H_7OH$ ;  $P_H = 6,25$ .



gūt parstās, vienkāršās koagulācijas līknes. Tādas ir gan iegūstamas ja ņem kazeīna šķīdumus, kuru  $p_{\kappa}$  stāv tālu no izoelektriskā punkta. Ja, piem., kazeīnu koagulē ar dažādiem alkohola daudzumiem pie  $p_{\kappa} = 3,4$  vai pie  $p_{\kappa} = 6,4$ , tad dabu parstās, zīm. 1 redzamā tipa līknes.<sup>14)</sup> Ja turpretim koagulē šķīdumus, kuru  $p_{\kappa}$  ir starp 5,7 un 6,2, tad var novērot komplicētas dulku pakpes mainas, pie kam ļoti bieži veidojās divi maksimumi (zīm. 2 redzamais līkņu tips). Parsti tie neparādās tūlīt, bet tikai pēc zināma laika.

Dabīgā kazeīna koagulācijas rezultāti redzami zīm. 17-25. Zīmējumos 21 un 24 uz ordinātes ir skaitli, kas nolasīti no fotometra skalas. Zīmējumos 19, 21, 22, 24 un 25 skaidri parādās 2-maksimumu līknes, kuras atbilst vispārīgajam 2 zīm. attēlotam līkņu tipam. Zīm. 20 parādās 3 zīm. attēlotais 2-minimumu līkņu tips. Zīm. 23 pēc 20 stundām divi maksimumi gan nav veidojušies, bet līknes veids uzkrītoši atšķiras no parastajām vienkāršajām līknēm. Zīm. 17 un 18 redzamās līknēs gan nekur nav divi maksimumi, bet šeit ļoti uzkrītoša ir maksimuma „celošana”. Parvietošanās patiesībā ir tikai šķietama, jo vienmēr veidojas jauns maksimums, kas dažreiz veco pilnīgi pārsedz. Šo faktu ļoti labi ilustrē zīmējums 22: pēc 10 minūtem ir tikai viens maksimums pie apm. 2,2 molien/1; novērojot seriju pēc 4 stundām, redz 2 maksimumus; bez vecā ir vēl radies jauns pie 0,5 molien/1. Pēc 24 stundām vairs atkal redzams tikai viens maksimums, kas atrodas pie 0,5 molien/1, jo koagulācija mazās alkohola koncentrācijās tagad tik ātra, ka starpleikā novērotais minimums (pie 1,5 molien/1) tiek pilnīgi izlīdzināts. Zīm. 25 attēlotā serijā kazeīnu koagulēja skābā šķīdumā ar metilalkoholu un NaCl, kurš bija 0,04 moli/1 litra koagul. maisījuma. Šeit līkne atšķiras ar sevišķi lielo attālumu, kāds redzams starp abiem maksimumiem. Bez tam abi optimumi serijā veidojas jau pašā koagulā-

14) Sk. l. c. 8 un Koll.-Zeitschr. 61, 41 (1932).



cija sākumā. Visos gadījumos komplikācijas liknē rada koagulācijas ātruma palielināšanās mazās alkoholu koncentrācijās. Jaunais maksimums veidojas pie 4 tilp.% alkohola, resp. 0,5-Imolam (atkarībā no tam, ar kādu alkoholu strādā)

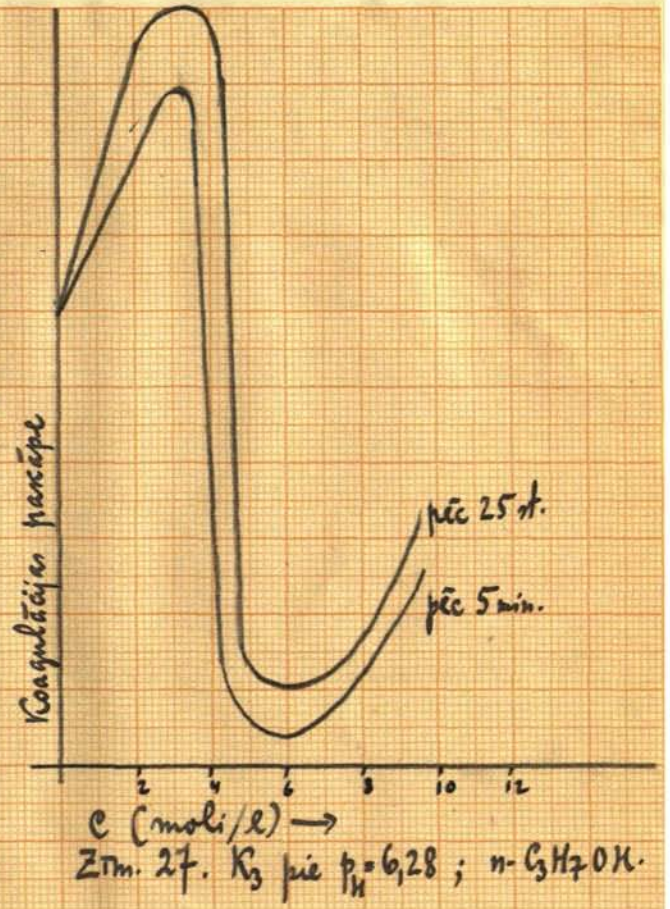
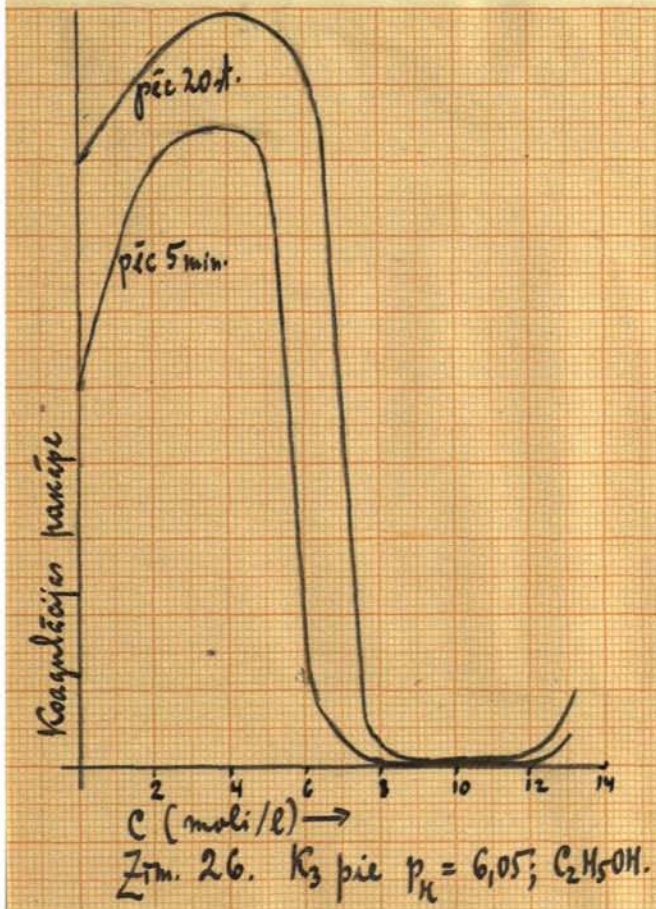
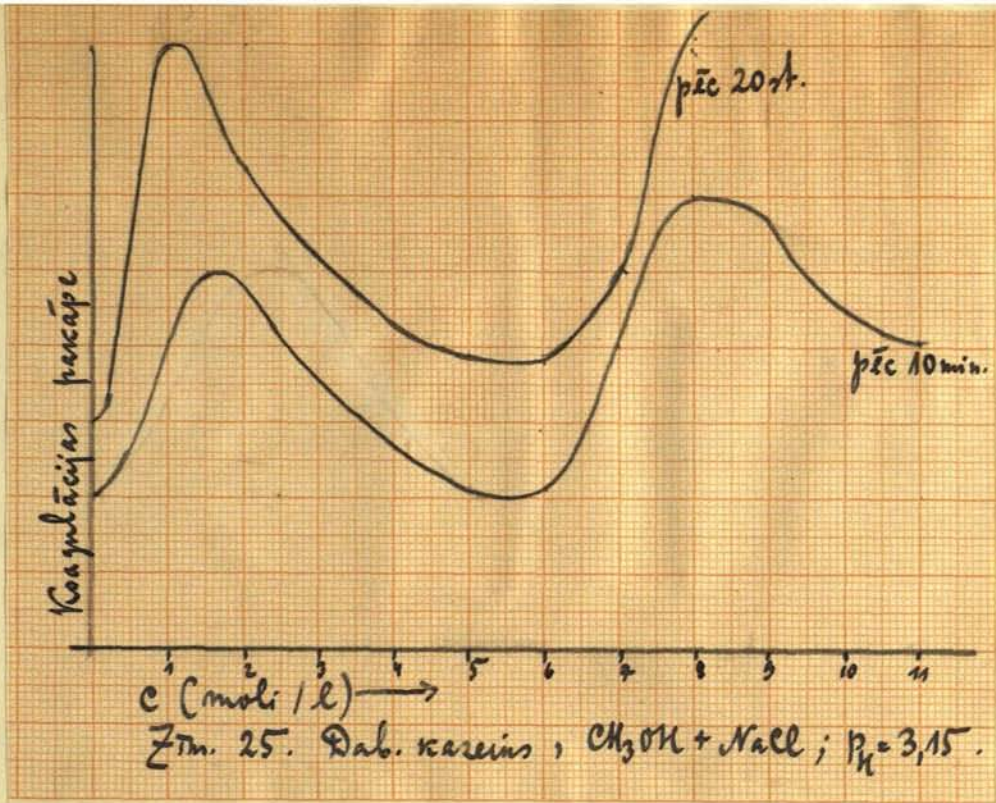
Lietoto kazeinu raksturo vēl sekoši dati. Starp  $p_H = 3,44$  un  $p_H = 5,44$  tas šķīdumā nepastāv, bet koagulē. Pie minētiem  $p_H$  šķīdumi tūlīt pēc to sagatavošanas ir ļoti vāji duļķaini, opalescējoši. Nestabilitātes maksimums tā tad ir pie  $p_H = \frac{5,44 + 3,44}{2}$ , t.i. pie  $p_H = 4,44$ .

Vēl noteica kazeina šķīdumu optisko aktivitāti. 2 g. kazeina šķīdināja 50ccm-os 0,1n NaOH un no iegūtā šķīduma iemēroja 25 ccm mērkolbinās ik pa 6,25ccm katrā. Pēc tam pievienoja zināmu daudzumu 0,1n HCl un uzpildīja ar destilētu ūdeni līdz strīpai. Polarizēja 2 decimetru caurulē pie sarkanās gaismas; temperatūra bija konstanta  $22^\circ$ . Iegūtie dati sakopoti tabulā 2:

Tabula 2.  
Kazeina optiskā aktivitāte,  $c = 1,00$ ;  $l = 2$ ;  $T = 22^\circ$ .

Maisījuma sastāvs	$[\alpha]_{H_2}$	šķīduma reakc. e. pret lakmusu:
6,25ccm 4% kazeins 0,1n NaOH + 5,25ccm 0,1n HCl + H <sub>2</sub> O līdz 25c.	-64,7	skāba
" " " " 4,75ccm " " " "	-67,2	vāji skāba
" " " " 4,25 " " " "	-68,5	neitrāla
" " " " 3,75 " " " "	-71,1	vāji sārma.
" " " " 3,25 " " " "	-73,7	sārmaina
" " " " 2,00 " " " "	-83,0	" "

Zināma interese varētu būt arī alkohola iespaidam uz optisko aktivitāti. Tas redzams sekošā tabulā 3.





Tabula 3.

Kazeina optiskā aktīvitāte. Alkohola iespāids,  $c=1,00$ ;  $l=2$ ;  $T=25^\circ$ 

Maisījuma sastāvs		$[\alpha]_{\text{H}_2\text{O}}^{25}$
6,25 ccm 4% kazeins	0,1n NaOH + H <sub>2</sub> O līdz 25 ccm	-85,5
" " "	" 2,5ccm C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH + H <sub>2</sub> O līdz 25c-8I,7	
" " "	" 5,0 " " " " " " " " -78,5	
" " "	" 7,5 " " " " " " " " -67,0	
" " "	" 12,5 " " " " " " " " -59,3	

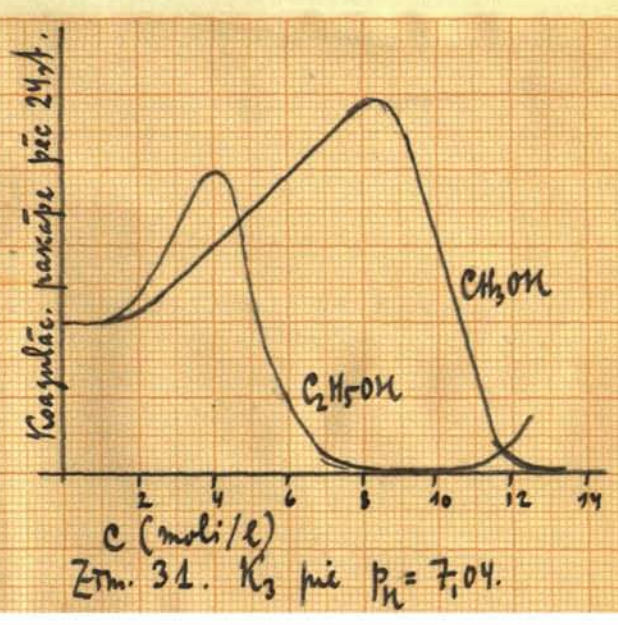
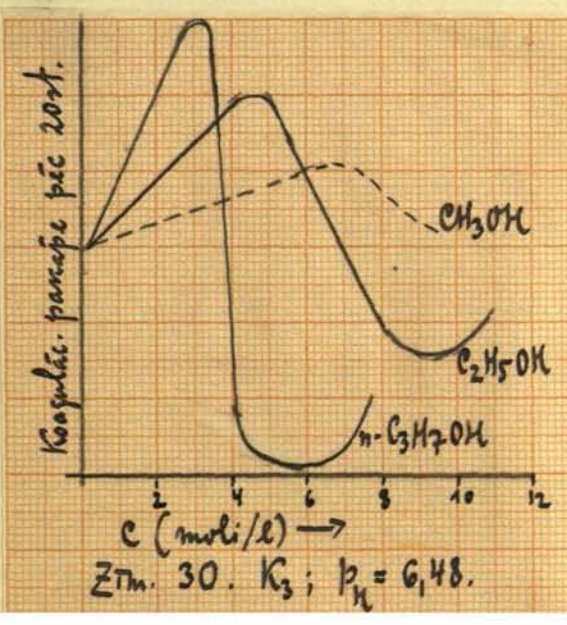
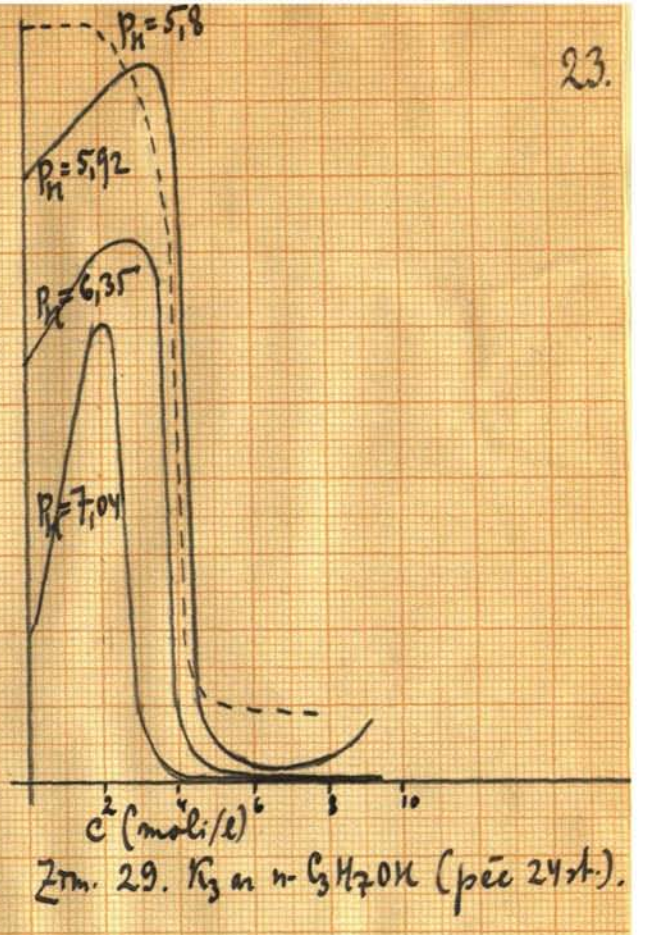
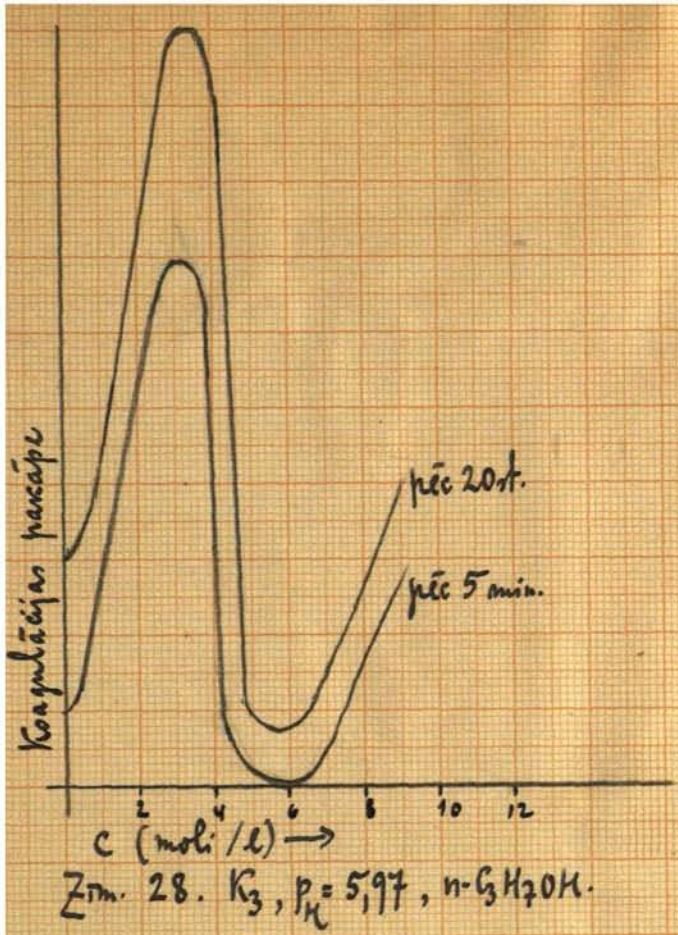
Visi novērotie šķīdumi bija pilnīgi skaidri.

Kā redzams, tad alkohols griešanas spēju ievērojami pamazina. Šis fakts interesants kā pieturas punkts koagulācijas līkņu noskaidrošanā. Griešanas spēja visstraujāk mazinas starp 25-30 tilp% alkohola klātbūtnē, t.i. tanīs pat koncentrāciju robežās, kur koagulācijas līknēm ir vislielākais liekums. Par nožēlošanu šķīdumus nav iespējams polarizēt pie tiem  $p_{\text{H}}$ , kur novērojama koagulācija, jo tad polarimetriskā novērošana stipri apgrūtināta un uz iegūtiem skaitļiem vairs nevar droši palaisties. Pie šiem jautājumiem vēl atgriezīsimies beigās, rezultātu diskussijā.

Šo nodaļu beidzot vēl reiz pastrīposim: dabīgais kazeins, ja to koagulē ar mainītam alkoholu koncentrācijām, starp  $p_{\text{H}} = 5,7$  un  $6,2$ , bieži vien dod komplicētā, zīņejumos 2 un 3 redzamā tipa līknes.

### 3. K a z e i n a f r a k c i j a s.

K. Linderström-Lang's (l.c.6) dabīgo kazeinu frakcionē, savā galvenajā panēmienā, ar  $n/500$  60% alkoholisku HCl. 100g kazeinu vairākkārtīgi ekstragē pie 60-70° ar 2 litriem minētā sastāva šķīdinātāja. Pie tam šķīdumā pāriet viena, bet nogulsnes otra frakcija. Pirmo minētais pētījis apzīmē ar  $K_3$ ; no šķīduma to izgulsnē ar atšķaidītu NaOH, pie kam  $K_3$  izkrit kā parslainas, baltas nogulsnes.  $K_3$  no 100g iegust ap 17g, t.i. 17%. 60% alko-





holiskā atšk. HCl nešķīstošo daļu apzīmē ar  $K_6$ .  $K_3$  no  $K_6$  atšķiras galvenā kārtā ar fosfora saturu: pirmajā ir ap 0,5 - 0,6% P, bet otrajā 0,8-0,95% P

T. Svedberg's ar saviem līdzstrādniekiem<sup>15)</sup> noteica  $K_3$  molekulār-svaru un minēto frakciju ieguva sekoši. 13g Hammarsten'a kazeinu ekstragē 1 stundu pie 40° ar 2 litriem 0,00In 70% alkoholisku HCl. Paliekas tādā pat veidā apstrādā vēlreiz. Šķīdumā pārgājušo kazeinu nogulsnē ar atšk. NaOH. No pirmās ekstrakcijas iegūti 2,15g, no otrās 2,19g kazeina  $K_3$ . Pavīsam tā tad  $K_3$  iegūts ap 33%. Ultracentrifugēšanas ceļā minētie pētīnieki pierādīja, ka  $K_3$  ir viendabīgs proteīns ar mol.svaru 375000.

Šajā darbā frakcionēšana izdarīta tieši pēc Svedberg'a priekšraksta. 15g Hammarsten'a kazeinu aplēja ar 2 l 0,00In 70% alkoh.HCl, un bieži maisot sildīja 1 stundu uz ūdens vannas pie 40-45°. Nogulsnes nonučeja un vēlreiz tāpat apstrādāja ar alkoholisku HCl. Savienotos filtrātus pa daļai neitralizēja ar 0,1n NaOH, līdz tie uzrādā uz lakmusu vāji skābu reakciju<sup>x)</sup>. Panazām izkrīt baltas pārslainas nogulsnes; tās pēc 24 st. filtrē ar nučfiltru, no sākuma ar mazu, vēlāk lielāku spiedienu. Nogulsnes ir stipri amorfas. Tās mazga ar alkoholu, pēc tam ar eteri, sausina vakuumeksikatorā. Iznākums 4,5g, t.i. 30% no nentā kazeina svara. Šajā frakcijā  $K_3$  bija 0,394% P un ar to izdarīta lielāka daļa no zemāk aprakstītiem seriju mēģinājumiem. 70% HCl saturošā alkoholā nešķīstošās paliekas mazgāja ar ūdeni, alkoholu un eteri un sausināja vakuumeksikatorā. Iznākums 9g. Šajā frakcijā  $K_6$  bija 0,857% P.

Sekojošos seriju mēģinājumos lietoto  $K_3$  ieguva arī vēl frakcionējot ar 60% izopropilalkoholu, ar attiecīgu HCl piedevu. Mēģinājums notika

15) T. Svedberg, L.M. Carpenter, D.C. Carpenter, Journ. Amer. Chem. Soc. 52, 241 (1930).

x) Ja 0 In NaOH, pievieno līdz pilnīgi neitrālai reakcijai, tad nogulsnes atkal sak šķīst.

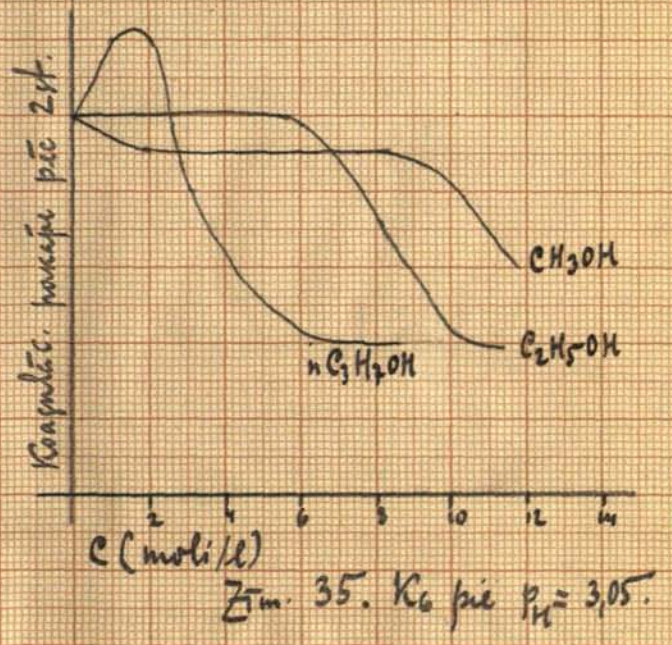
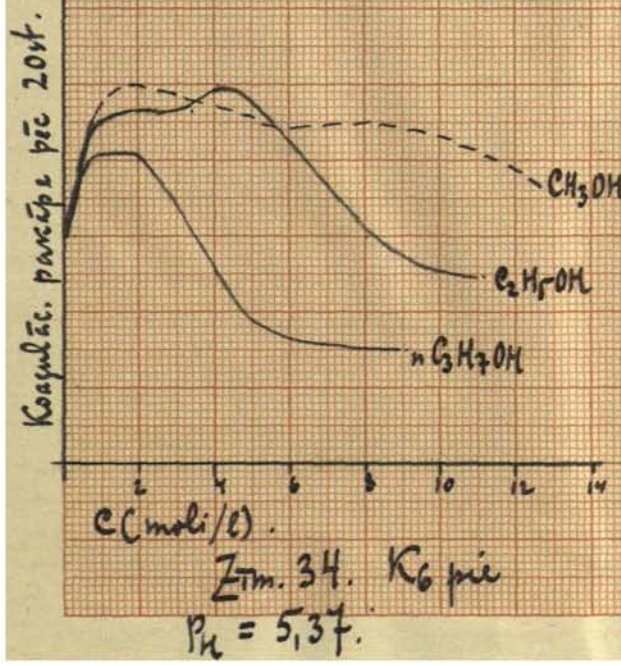
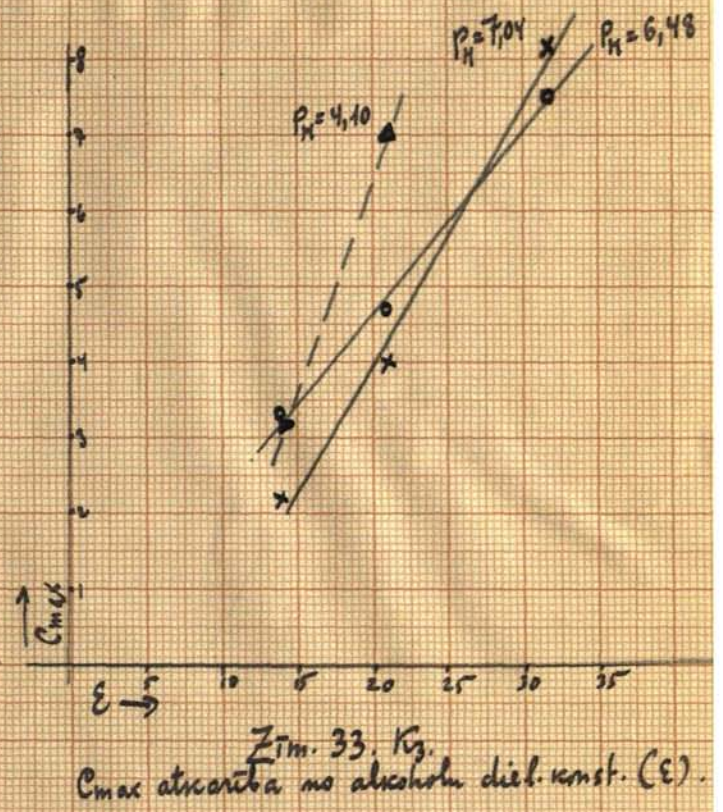
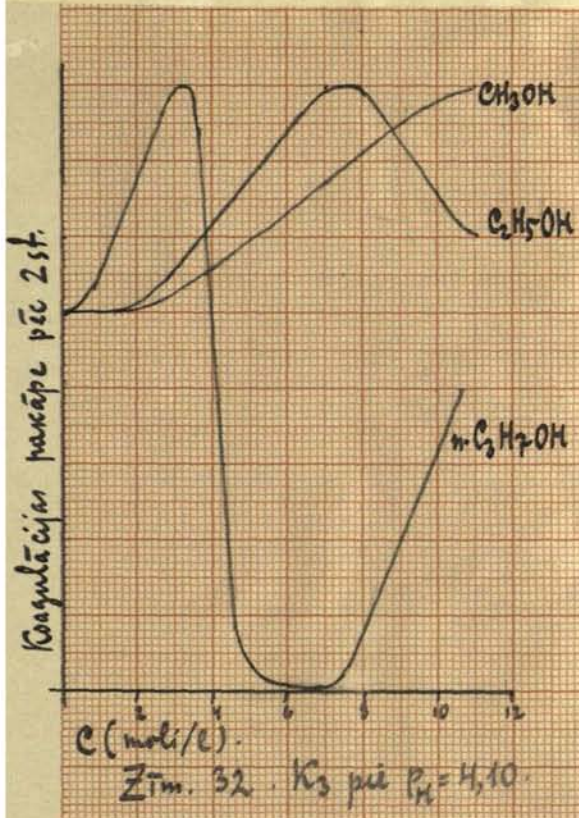
sekoši. 20g Hammarsten'a kazeinu aplēja ar 1,5 litriem 60% izopropilalkoh. 0,00In HCl un bieži maisot sildīja 1 stundu uz ūdensvannas pie 40-50°. Filtrē, un nogulsnes tāpat apetrādā vēlreiz. Savienotos filtrātus pa daļai neitralizē ar 0,1n NaOH (līdz reakcija uz lakm. vāji skāba), un pēc 24 stundām nonuče izkritušās nogulsnes; tās mazgā vispirms ar alkoholu, pēc tam ar eteri un sausina vakuumsikatorā. Iznākums 5,6g, t.i. 28% no ņemtā kazeina daudzuma. Šīs K<sub>3</sub> frakcijas P-saturs bija 0,422%. Koagulācijas zinā abos veidos iegūtās K<sub>3</sub> frakcijas bija tik līdzīgas, ka nav nozīmes tas atsevišķi apzīmēt.

Priekšmēģinājumiem izlietoja vēl kādu K<sub>3</sub>, kas iegūta no 50g dabīgā kazeina, to divreiz izvelkot ar 2 l 60% etilalkoholisku 0,00In HCl, pie 50-60°. Šādā veidā ieguva tikai 15% K<sub>3</sub> no ņemta kazeina svara. Preparats bija ļoti amorfs, želatīnveidīgs.

Koagulācijas serijas sastādīja parastā veida. K<sub>3</sub> šķīdināja 0,1n NaOH, pievienoja 0,1n HCl līdz vēlamam p<sub>H</sub> un dializēja kolloidija maisinā pret destilētu ūdeni. Jau dializējot parādījās sevišķa K<sub>3</sub> īpašība: zaudējot elektrolītus tas dulkojās. Šī parādība nav novērojama ne pie dabīgā kazeina, nedz arī pie K<sub>6</sub>. Pēc dializes noteica šķīduma p<sub>H</sub>. K<sub>3</sub> koncentrācija serijās viscaur bija 0,2%.

Ievērojamas ir pirmā kārtā K<sub>3</sub> robežas, kurās tas nav šķīdumā kolloidkīmiski stabils. K<sub>3</sub> šķīdumi sāk stipri dulkoties jau pie p<sub>H</sub> = 5,8; starp 5,7 un 4,3 K<sub>3</sub> nemaz neturas šķīdumā: skābā daļā no p<sub>H</sub> = 4,3 līdz p<sub>H</sub> = 3,5 šķīdumu dulku pakāpe mazinas. Ja kā robežas, kur sākās nogulsnesšanās, ņem p<sub>H</sub> = 5,8 un 3,5, tad nestabilitātes maksimums iznāk pie p<sub>H</sub> = 4,65; ja turpretim ņem kā robežas p<sub>H</sub> = 5,7 un 4,3, tad nestabilitātes maksimums ir pie p<sub>H</sub> = 5,0. Salīdzinot ar dabīgo kazeinu, K<sub>3</sub> nestabilitātes cona tā tad mazliet pabidīta uz sārmaino pusi. Ar alkoholiem K<sub>3</sub> koagulējams nestabilitātes conas sārmainā pusē starp p<sub>H</sub> = 5,7 un 7,2, bet skābā







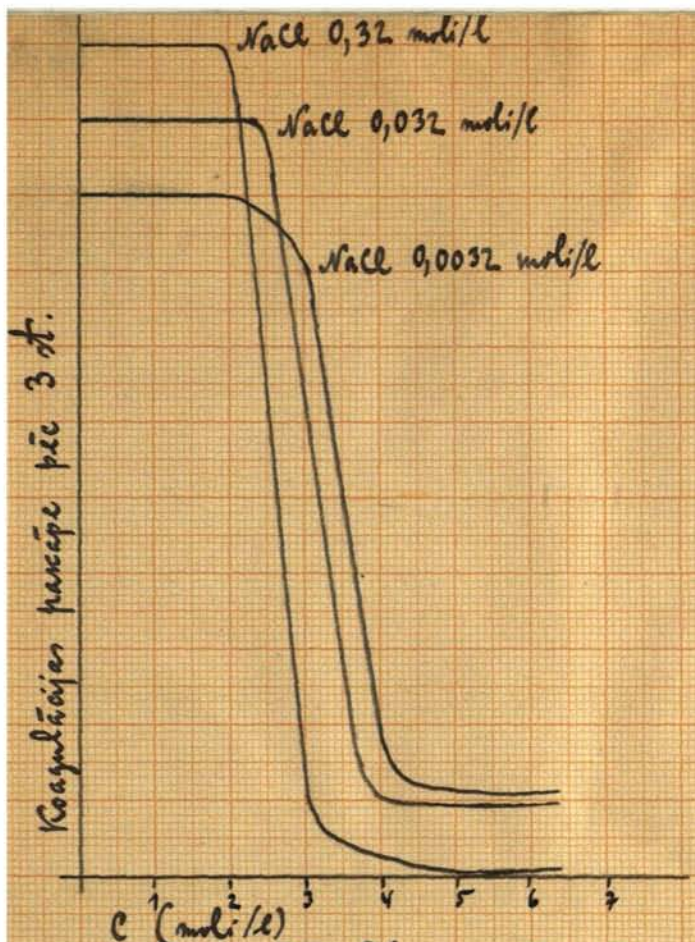
pusē starp 4,2 un 3,2.

$K_3$  koagulācijas rezultāti grafiski attēloti zīmējumos 26-32. Zīm. 26,27 un 28 redzams, ka līknes veids, pretēji dabīgajam kazeīnam, nemainas ar laiku. Nekur arī neparādās tendence veidot otru maksimumu. Ar nolūku pievestie taisni šie rezultāti, kas iegūti pie  $p_H = 6,05, 6,28$  un  $5,97$ , jo taisni šādos nosacījumos dabīgais kazeīns visvieglāk deva komplikētās līknes. Grafikas tuvāk apskatot var vērot, ka dažos gadījumos arī propilalkohola pienēros maksimumi nav visai asi. Tas atkaras no  $p_H$  un no šķīduma dialīzes pakāpes. Dializējot, kā jau minēts,  $K_3$  šķīdumi pēc dažām stundām sāk dulķoties. Ja nu dialīzi turpina ilgi un grib atbrīvoties no elektrolītiem (praktiski), tad galu galā iegūst - atkarībā no  $p_H$  - vairāk vai mazāk stipri dulķainus šķīdumus. Piem. zīm. 26 un 27 atbilstošie  $K_3$  šķīdumi bija labi dializēti un tā tad jau bez alkohola tie bija dulķaini (punkti uz ordinātes stāv augstu). Zīm. 28 atbilstošais  $K_3$  šķīdums turpretim nemaz nebija dializēts.  $p_H$  iespaids vislabāk redzams zīmējumā 29. Šajās serijās lietotie šķīdumi visi bija apmēram vienādā mērā (30 stundās, 4-5 reizes mainot ārējo ūdeni) dializēti. Jo tālāk stāv šķīdumu  $p_H$  no izoelektriskā punkta (resp. nestabilitātes maksimuma), jo mazāka ir koagulācijas pakāpe tiros, bezalkohola šķīdumos.

Zīmējumos 30, 31 un 32 redzama dažādu alkoholu iedarbība. Maksimumi stāv parastajā kārtībā un  $C_{max}$  ir tiešā sakarā ar alkoholu dielektriskām konstantēm. Šī sakarība savukārt atkarīga no vides  $p_H$ , ko ilustrē zīmējums 33.

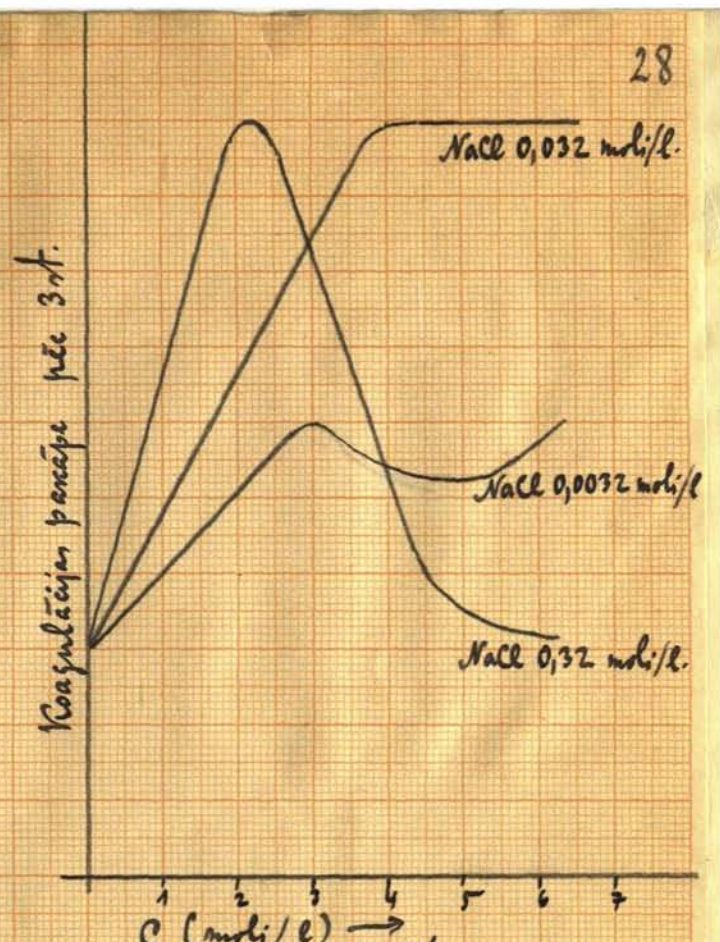
Ievērojamas ir arī ļoti plašās peptizācijas, resp. stabilitātes zonas. Gandrīz visos gadījumos starp 4-10 vai 6-14 moli/l, vai apmēram 30-70 tilpuma % (robežas dažādas, atkarībā no alkohola dabas u.c. nosacījumiem) koagulācijas maisījumi ir skaidrāki par standartšķīdumiem (bez





Z<sub>TM</sub>. 36.

K<sub>3</sub> ar  $n-C_3H_7OH$  un NaCl;  $P_H = 5,80$ .



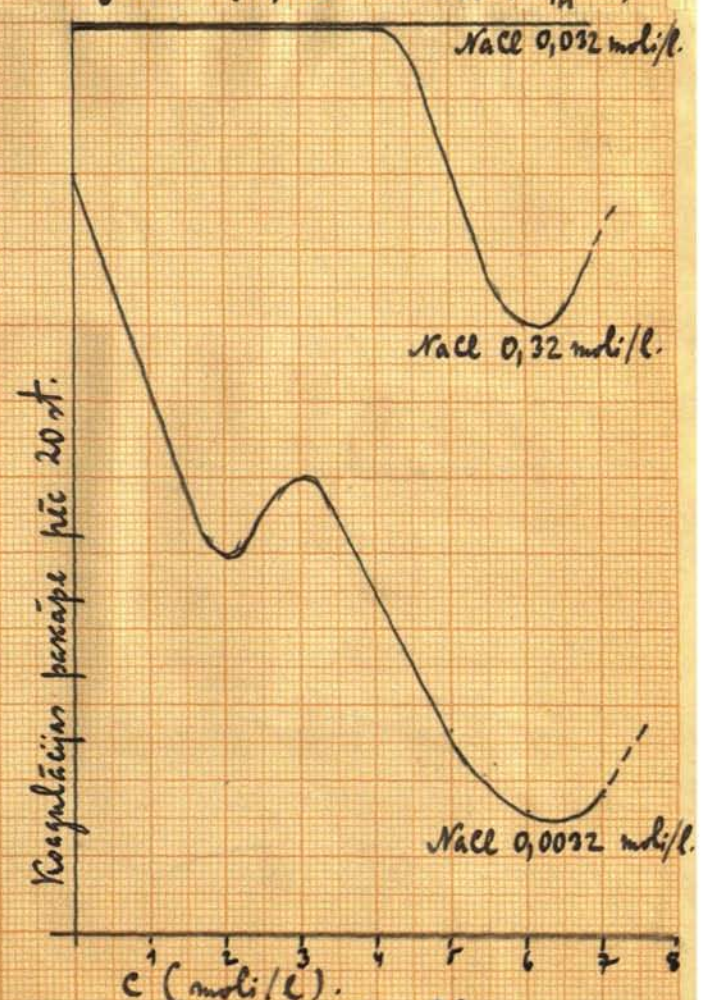
28

Z<sub>TM</sub>. 37.

K<sub>6</sub> ar  $n-C_3H_7OH$  un NaCl;  $P_H = 5,15$ .



Z<sub>TM</sub>. 38. K<sub>3</sub> ar  $n-C_3H_7OH$  + NaCl;  $P_H = 3,58$ .



Z<sub>TM</sub>. 39.

K<sub>6</sub> ar  $n-C_3H_7OH$  + NaCl;  $P_H = 3,16$ .



alkohola), n-Propilalkohola gadījumā starp 30 - 70 tilp.% peptizācija ne-  
 vērojama viemmēr, pie kam šķīdumi pa lielākai daļai ir pilnīgi skaidri  
 (punkti atrodas uz abscises). Etilalkohols peptizē jau vājāk, bet tomēr  
 ļoti intensīvi, sevišķi starp  $p_{\kappa} = 6-7$ , pie kam minimuma robežas ir starp  
 40-75%  $C_2H_5OH$ . Metilalkohola serijās peptizāciju var novērot tikai pie  
 $p_{\kappa} = 7$ .

Grafikās 34 un 35 attēlota  $K_6$  koagulācija ar mainītam alkoholu  
 koncentrācijām.  $K_6$  šķīdumā nepastāv, bet koagulē, starp  $p_{\kappa} = 3,0$  un  $5,2$ .  
 Nestabilitātes maksimums tā tad ir pie  $p_{\kappa} = 4,1$ . Dializējot  $K_6$  šķīdumus  
 tie tikai ļoti neievērojamā mērā dulkojas.  $K_6$  tā tad šajā zinā izturas  
 līdzīgi dabīgam kazeīnam un pretēji  $K_3$ . Koagulācijas līknes, kā redzams,  
 arī vairāk līdzinās dabīgā kazeīna, nekā  $K_3$  līknēm. Redzama tendence  
 veidot 2 maksimumus un 2 minimumus. Pie viena un tā paša  $p_{\kappa}$  serijas ar  
 $K_3$  un  $K_6$  nav izvedamas dažādo stabilitātes robežu dēļ: piem. starp  
 $p_{\kappa} = 5,9 - 7,0$   $K_6$  ar alkoholiem vairs nemaz nekoagulē, bet starp  $p_{\kappa} =$   
 $5,1 - 5,7$  savukārt  $K_3$  šķīduma nemaz nepastāv, bet tūlīt koagulē, tā kā  
 te alkoholu iespaidu nemaz nevar novērot.

Ievēribu pelna rezultāti, kas iegūti  $K_3$  un  $K_6$  koagulējot ar  
 alkoholu un sāli. Tie redzami zīmējumos 36-39. Zīm. 36 attēlo rezultātus  
 kas iegūti novērojot vairākas serijas ar mainītam propilalkohola un  
 dažām, konstantam NaCl koncentrācijām. Redzams, ka NaCl ļoti stipri sen-  
 sibilizē mazu alkohola daudzumu klatbutnē. Sākot ar 3 - 4 molien/l, jeb  
 25 - 30 tilp.% alkohola, sākas pilnīgas peptizācijas cona. Jo lielāka  
 ir sāls koncentrācija, jo stiprāk tas sensibilizē mazās alkohola kon-  
 centrācijās un jo pie mazākām alkohola koncentrācijām sākas peptizācija.  
 Peptizācijas cona ir ļoti plaša: koagulācija sākas atkal tikai pie  
 apm. 90 tilp.% alkohola (zīmējumā tas nav redzams). Pavisam citādu ainu

rāda  $K_6$ . Tas dod parastās, pie daudziem stipri solvatizētiem kolloidiem novērotās serijas (l.c.8): ļoti mazās sāls koncentrācijas sensibilizē, pie kam liekumi liknēs izgludinas (no 0,003 - 0,032 molēm/l); ja sāls koncentrācija ļoti liela, tad atkal parādās maksimums un minimums (zīm.37). Līdzīgas ainas redzamas grafikās 38 un 39, kur attēlota  $K_3$  un  $K_6$  koagulācija ar mainītu propilalkohola un konstantam sāls koncentrācijām pie maza  $\rho_K$ , skābā šķīdumā.  $K_3$  gadījumā (zīm.38) mazās alkohola koncentrācijās viscaur redzama stipra koagulācija; starp 0,032 - 0,32 molēm/l NaCl, šķīdumi, kušos ir no 0 līdz 4 molēm/l propilalkohola, pat ir pilnīgi koagulējuši; lielās alkohola koncentrācijās, turpretim novērojama pilnīga peptizācija. Pavisam citādi izturas  $K_6$  (zīm.39): pie 0,0032 molēm/l NaCl te redzams komplicētais līknes tips, pie 0,032 molēm/l NaCl visi šķīdumi pilnīgi koagulē, bet pie 0,32 molēm/l atkal parādās mazs minimums.

Šie fakti būtu ievērojami tamdēļ, ka uz to pamata iespējams dot jaunu kazeīna frakcionēšanas metodi. Ja pie 0,032 molēm/l NaCl un 40 - 80 tilp. % propilalkohola  $K_6$  vienmēr koagulē, bet  $K_3$  pilnīgi peptizējas, tad skaidrs, ka ar šādiem šķīdumiem apstrādājot dabīgo kazeīnu,  $K_3$  pāries viegli šķīdumā, bet  $K_6$  ne. Mēģinājumi šo slēdzienu pilnīgi apstiprināja: ar 0,03 molēm/l NaCl saturošu 40 - 50% n-propilalkoholu iespējams jau vienā panēmienā atdalīt no dabīgā kazeīna līdz 35 %  $K_3$ . Tas ļoti atvieglo frakcionēšanu, jo pēc vecajiem Linderström-Lang'a panēmieniem nevien otrā, bet pat trešā un ceturtnā ekstrahēšanas panēmienā vēl iegūst diezgan ievērojamus daudzumus  $K_3$ . Dažādu atšķiršanas panēmīnu efekts redzams tabulā 4.

Tabula 4.

Hammarsten'a kazeina frakcionēšana ar 0,00In 60% <sup>alkoholiska nel</sup>. 10g kazeina sildīja ar 1 litru šķīdinātāja 1 stundu pie 40-50°.

	K <sub>3</sub> no I ekstrakc.	K <sub>3</sub> no II ekstrakc.	K <sub>3</sub> pavi- sam %	K <sub>3</sub> P saturs
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH bez NaCl	1,5g	1,0g	25%	0,299% P
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH.OH " "	1,7	1,1	28	0,491 "
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH " "	1,8	1,2	30	-
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH ar 0,03mo- li/l NaCl	3,5	0,5	40	0,612 "

Tālākie frakcionēšanas mēģinājumi rādīja, ka pārskōbinašana nav nepieciešama. Var iztikt arī ar daudz mazāku šķīdinātāja daudzumu. Visērtākais ir sekošais paņēmieni: 10g kazeina (pēc Hammarsten'a) aplej ar 600 ccm 50% n-propilalkoholu, kas satur 0,03 moli/l NaCl, un bieži maisot silda 1 stundu uz ūdensvannas pie 40 - 50°. Nogulsnes (K<sub>6</sub>) nofiltrē un šķīdumā pārgājušo K<sub>3</sub> nogulsnē, pamazām atšķaidot ar ūdeni līdz 2 litru lielam tilpumam. Jo lēnāk atšķaida un vairāk maisa, jo labākas ir nogulsnes. K<sub>3</sub> nogulsnēšana šeit dibinas uz to, ka jāpamazina ir alkohola koncentrācija vismaz līdz 20 tilp%, kur sākas koagulācijas cōna. Pēc atšķaidīšanas ieteicams pievienot vēl dažus kubikcentimetrus 2n NaCl, jo ar to tiek veicināta pārslu nosēšanās. Maisījumu pēc tam atstāj 1-2 dienas mierīgi stāvēt; pa šo laiku viss K<sub>3</sub> ir nosēdies. Virs tā esošo šķīdumu uzmanīgi noņem ar sifonu un apakšā palikušo nogulšņu putru nonuče. Nogulsnes uz filtra mazgā ar metil- vai etilalkoholu un pēc tam ar eteri un sausina vakuumsikatorā. Piemēri: I ekstrakcijā iegūts 3,2g K<sub>3</sub>, bet otrā 0,4g, pavisam tā tad 36% no ņemtā dabīgā kazeina; K<sub>3</sub>- preparatā bija

0,444% P.

Jaunā frakcionēšanas panēmiena galvenās priekšrocības tās, ka nav jāstrādā ar milzīgajiem etilalkohola tilpumiem un ekstragēšanas process nav vairākas reizes jāatkārto.  $K_3$  iegūšanai pilnīgi pietiek ar vienreizēju apstrādāšanu. Otrkārt, arī  $K_3$  nogulsnešana no šķīduma šādā ceļā, ļoti ērta un vienkārša. Strādājot ar pašskābinātiem šķīdumiem zināmas grūtības rada neitralizēšana; jāņem vairāki šķīduma paraugi un pielejot atbilstīgu sārma daudzumu, jānovēro duļķu pakāpe; pēc tam jāaprēķina sārma daudzums visam šķīdumam. Jaunajā panēmiena šis darbs atkrīt.

P- daudzums kazeina frakcijās.

Nosakot dažādos, 60% alkoholā šķīstošās frakcijas  $K_3$ , paraugos fosforu, uzkrīta lielās svarstības; piem. tabulā 4, ar alkoholu iegūtajā  $K_3$  atrasts tikai 0,299% P, kamēr beidzamajā piemērā ar propilalkoholu ir 0,612% P. Tā ir milzīga starpība. K.Landerström-Lang's<sup>16)</sup> savās  $K_3$  frakcijās atrod starp 0,48 - 0,56% P. Ļoti maz fosfora ir frakcijā  $K_1$ , kuru iegūst, pēc  $K_3$  nogulsnešanas, no alkoholiska filtrāta, beidzamo ietvaicējot. Šajā frakcijā  $K_1$  ir tikai 0,02 - 0,1% P; tā tad lielās svarstības.  $K_6$  preparātos turpretim P saturs ir konstantāks: pēc Linderström-Langa datiem tur ir starp 0,71 - 0,95% P, bet autors savos preparātos dabūja starp 0,675 - 0,970% P.

No kā atkarīgas P daudzuma svarstības? Varētu būt iespē-

16) Compt-Rend. d. Trav. du Labor. Carlsberg 17, I (1929); H. Holter, K. Linderström-Lang u. J. Brönniche Funder. Zeitschr. f. physiol. Chem. 206, 85 (1932); Sal. arī E. Cherbuliez u. Schneider, Helv. 15, 597 (1932).

jams, ka šāda komplicētā vielā kā kazeīns, frakcionēšana un visi tie procesi, kas ar to sakarā, var norisināties dažādi. Tomēr iespējams arī vienkāršāks izskaidrojums: ka dažādību pamats ir vielas nogulsnēšanā izsuktās nogušu fizikālo īpašību dažādības. Bieži vien nogulenes ir ļoti amorfas un iespējams, ka tās cieši saistījušas šķīdinātāju. Tādas, <sup>10</sup> amorfas nogulenes bija visos gadījumos, kur atrada mazu fosfora procentu. Turpretim visi tie  $K_3$  preparāti, kuru nogulnes bija graudainas, un atgādināja kristalisku vielu nogulnes, saturēja no 0,4 - 0,6% P.

Autore fosforu noteica sekojot galvenos vilcienos E. Cherbuliez un Meyer <sup>17)</sup> dotajam priekšrakstam, to tikai nedaudz grozot un vienkāršojot. Analīzes izpildīja sekoši: 1,00 līdz 1,50g kazeīna ievietoja 100 ccm Kjeldahl'a kolbās, pielika 1-2g  $\text{NaNO}_3$ , un aplēja ar 30 ccm kūpošās slāpekļskābes. Kolbas kaklu nosedz ar mazu piltuvi. Kolbu novieto smilšu vannā un silda 6-8 stundas. Pa šo laiku, maisījumam intensīvi vāroties, lielākā  $\text{HNO}_3$  daļa ir iztvaicējusies. Tagad pielej vēl 10 ccm kūpošo  $\text{HNO}_3$ , nonem piltuvi un iztvaicē gandrīz sausu. Paliekas (kurām jābūt baltām) izšķīdina destillētā ūdenī un pārlej vārglāzē. Nu fosforskābi var tieši nogulsnēt ar amonija molibdatu pēc Woy'a. Iegūtās dzeltanās nogulnes izšķīdina 2,5% amonjakā, paskābina ar  $\text{HCl}$  līdz vāji skābai reakcijai un nogulsnē pēc Schmitz'a kā  $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . To izkarsē un sver, ka  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ . Daži rezultāti pievesti tabulā 5.

17) Helv. chim. Acta, 16, 613 (1933).

Tabula 5.

1,15g $K_3^I$	0,0211g $Mg_2P_2O_7$	0,511 % P	} vidējais
1,04 "	0,0176 "	0,471 "	
1,27 g $K_6$	0,0390 "	0,856 "	} vidējais
1,25 "	0,0385 "	0,858 "	
0,535 g $K_3^II$	0,0094 "	0,489 "	} vidējais
0,640 "	0,0092 "	0,400 "	
1,05 g $K_3^{III}$	0,0237 "	0,628 "	} vidējais
1,09 "	0,0233 "	0,596 "	

Nodalu beidzot rezultāti īsi apvienojami sekošā formulējumā:

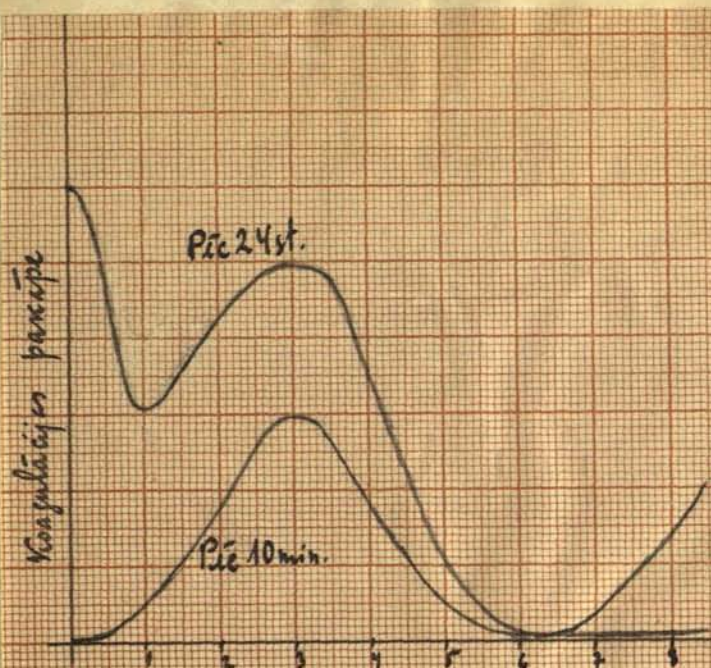
60 - 70 % alkoholā šķīstošā, viendabīgā kazeina frakcija  $K_3$  visdāžādos nosacījumos dod tikai vienkāršā, zīm. I attēlotā tipa koagulācijas līknes.

60 - 70 % alkoholā nešķīstošā frakcija  $K_6$ , turpretim dod līknes, kas līdzīgas dabīgā, neviendabīgā kazeina līknēm.

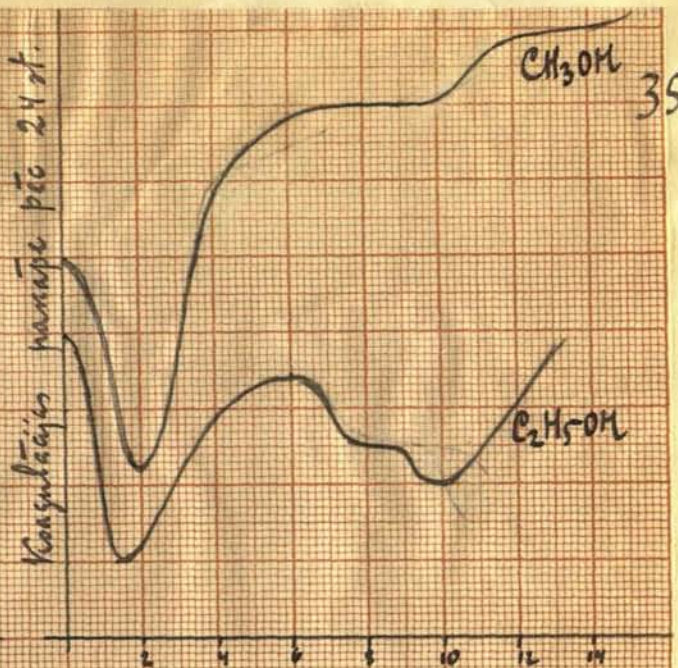
#### 4.0 k s i - u n m e t h e m o g l o b i n s .

Lietoja E. Mercka Hemoglobin in lamell. Tas iegūts no asinīm, tās vispirms defibrinējot; pēc tam centrifugēšanas ceļā atdala serumu un nocentrifugētos asinsķermenīšus hemolizē mazgājot ar ūdeni, vai dializējot. Iegūto oksihemoglobina šķīdumu centrifugējot atbrīvo no stromas un nogulsnē ar alkoholu un eteri. Šo beidzamo reagentu iespaidā hemoglobins pamazām pāriet methemoglobina. Methemoglobins vispār ir stabilākā forma, kurā oksihemoglobins pāriet dažādu vielu iespaidā; pat tīrā ūdens šķīdumā ilgāku laiku stāvēt, oksihemoglobina spektrā parādās methemoglobina josla. ~~Kā~~ lietotais hemoglobins ir maisījums, par to vispirms pārliccinājās spektroskopiskā ceļā: variējot koncentrāciju, spraugas platumu u.c. noteik-



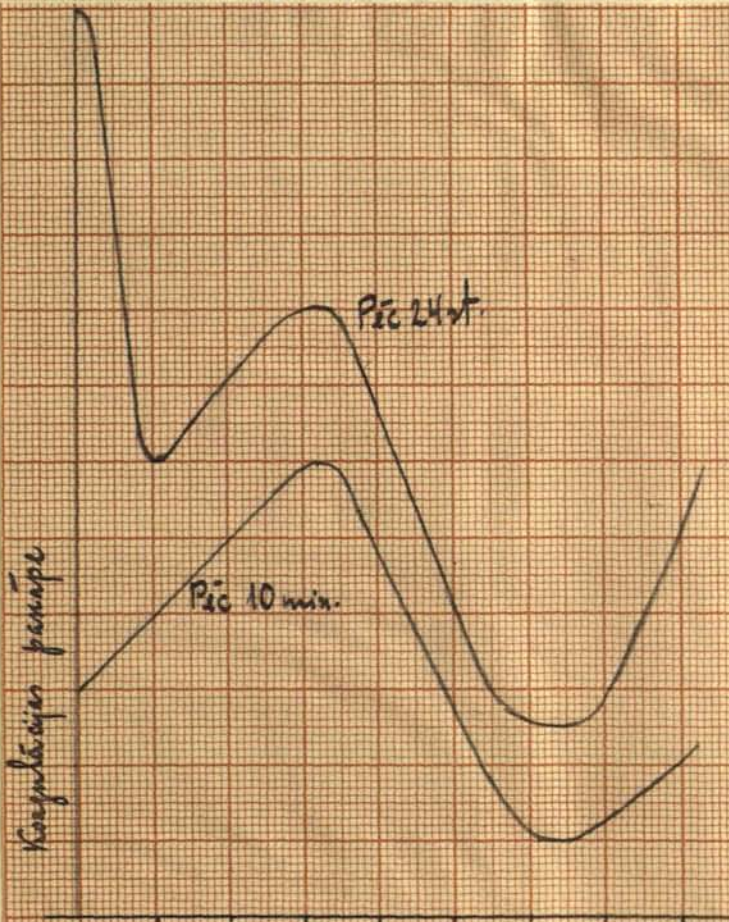


C (moli/l) →  
 Zīm. 40. Oksī- un methemoglob.  
 dializēts, ar  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ;  
 $p_{\text{H}} = 7,04$ .

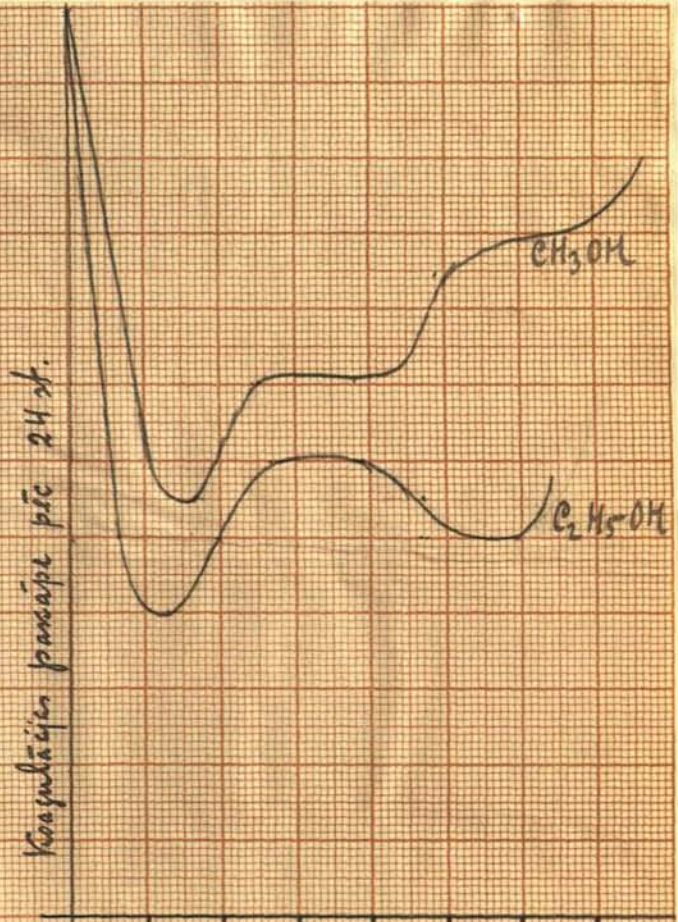


C (moli/l) →  
 Zīm. 41. Oksī- un methemoglob.  
 nedializēts, ar  $\text{CH}_3\text{OH}$  un  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ;  
 $p_{\text{H}} = 7,04$ .

35.



C (moli/l) →  
 Zīm. 42. Oksī- un methemoglobins,  
 dializēts, ar  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$   
 $p_{\text{H}} = 6,87$ .



C (moli/l) →  
 Zīm. 43. Oksī- un methemoglobins,  
 dializēts, ar  $\text{CH}_3\text{OH}$  un  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$   
 $p_{\text{H}} = 6,87$ .



ti varēja konstatēt bez trim parastajam oksihemoglobina joslām starp 495 - 510 $\mu\mu$ , 525 - 550 $\mu\mu$  un 575 - 585 $\mu\mu$  vel arī pazīstamo methe- moglobina joslu, spektra sarkanā daļā starp 628 - 638 $\mu\mu$ . Noverojumus iz- darija ar C. Zeissa à vision directe mazo spektroskopu (ar regulējamu skalū).

Koagulācijas mēģinājumiem noteiktu hemoglobina daudzumu šķīdi - nāja ūdenī un dializēja. Dializētie šķīdumi ar alkoholiem koagulēja diez- gan viegli. Nedializētos šķīdumus ar alkoholu grūti nogulsēt: mazās alko- holu koncentrācijās, kur varēja sagaidīt maksimumus, dulces nemaz nero- das. Tas tomēr iespējams izsaukt arī nedializētos šķīdumos, ja tiem ie- priekšpievieno nedaudz 0,01n HCl. Pirms seriju sastādīšanas vienmēr no- teica lietoto šķīdumu p<sub>H</sub>. Nedializētā 0,5% hemoglobina p<sub>H</sub> bija 8,15, bet dializētā ap 7. Hemoglobina koncentrācija koagulācijas maisījumos bija 0,3%.

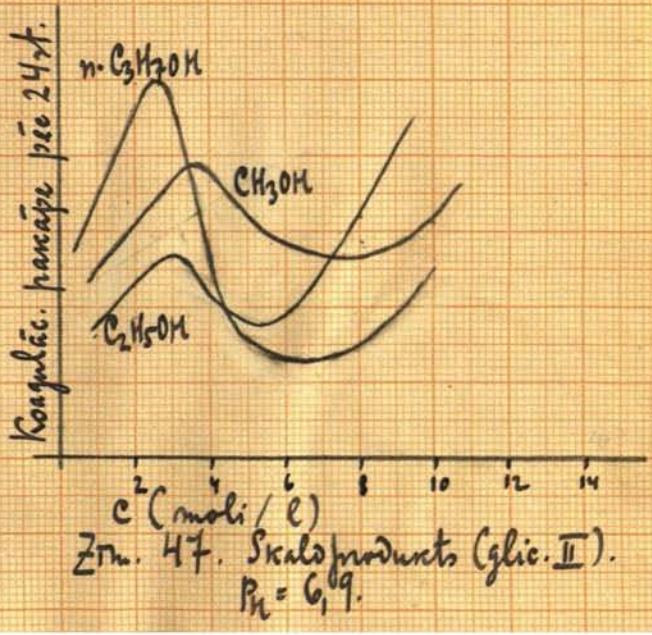
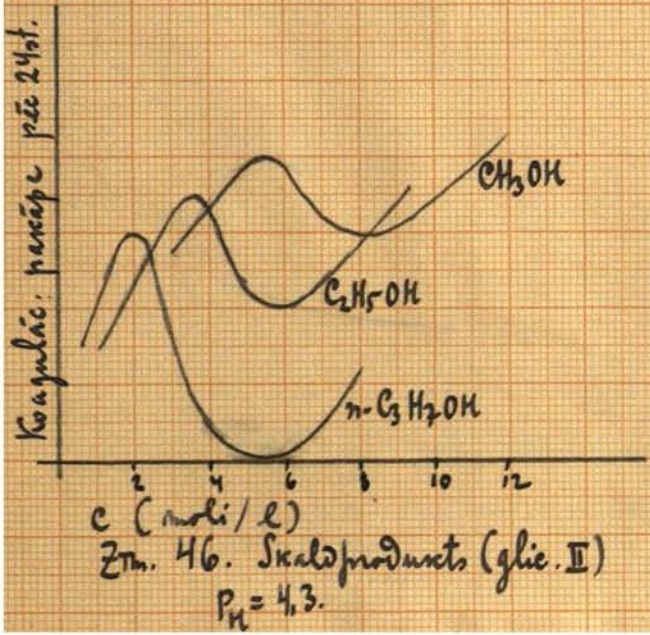
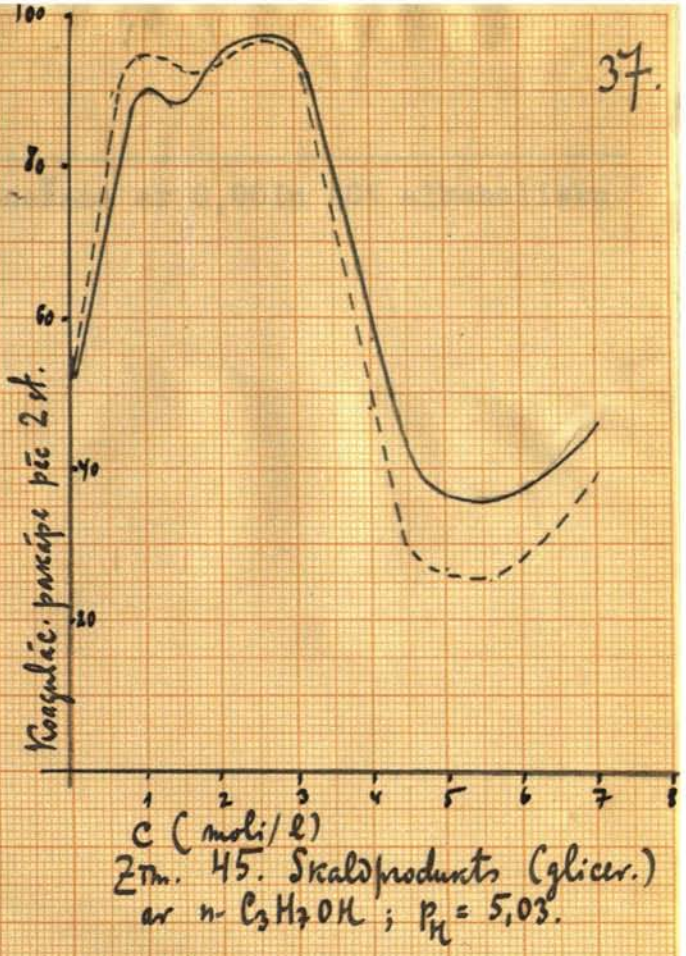
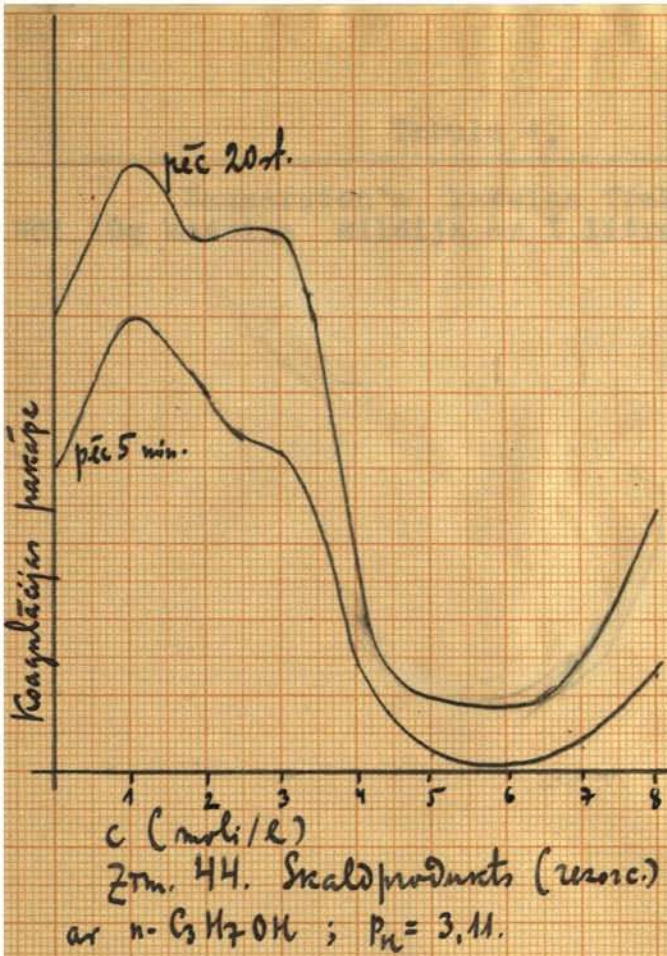
Koagulācijas rezultāti attēloti grafikās 40 - 43. Redzams, ka vi- sos gadījumos pēc ilgāka laika veidojas komplicētās, pa lielākai daļai zīm. 3. attēlota tipa līknes.

### 5. K a z e i n a s k a l d p r o d u k t i.

Pēc A. Fodora un S. Kuk pētījumiem (l. c. 12) nevienmērīgi ir tie kazeina skaldprodukti, kurus iegūst šķēlot kazeīnu ar karstu rezorcīnu un iegūto produktu pēc tam tīrot ar ledusetika palīdzību. Skaldproduktu

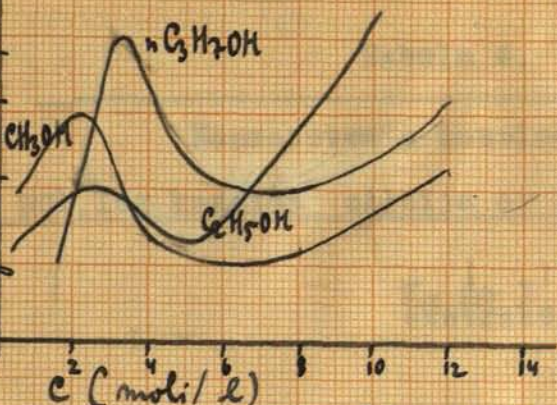
18) Agrākos mēģinājumos (Sk. Br. Jirgensons, Latv. Univ. Raksti 17, 639, (1928), 20, 400 (1929) u. c.), kur pētīja hemoglobina koagulāciju ar organiskām vielām un sāļiem, taisni tamdēļ, serijās bez sāls piedevs nevarēja no- vērot maksimumus, ka strādāja ar nedializētiem hemoglobina šķīdumiem.



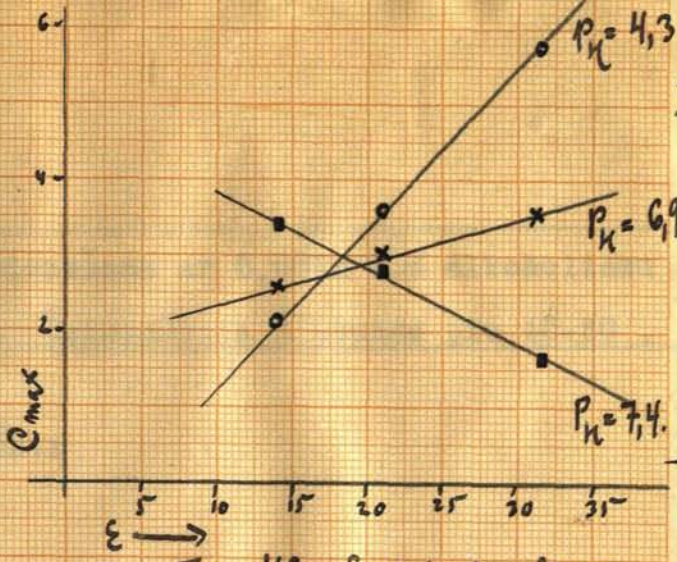




Koagulācijas parāpne pēc 24 st.



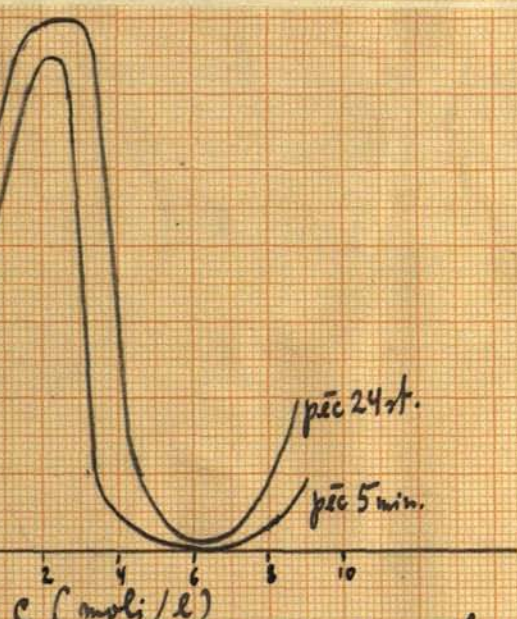
Zīm. 48. Skaļšprod. (glic. II),  $P_H = 7,4$ .



38

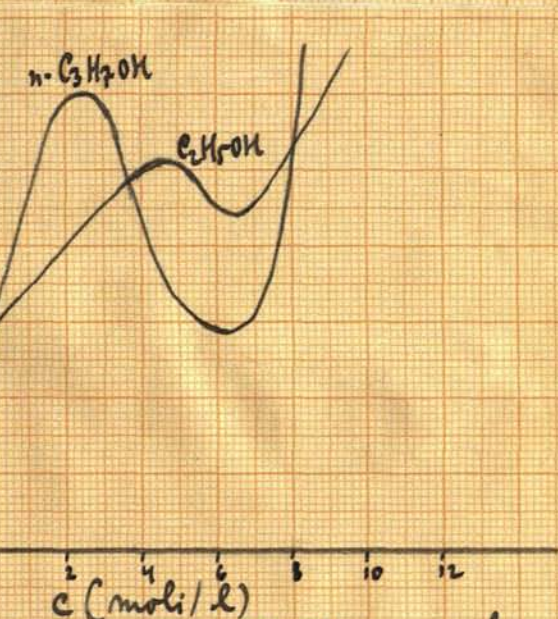
Zīm. 49. Skaļšprod. glic. II.

Koagulācijas parāpne



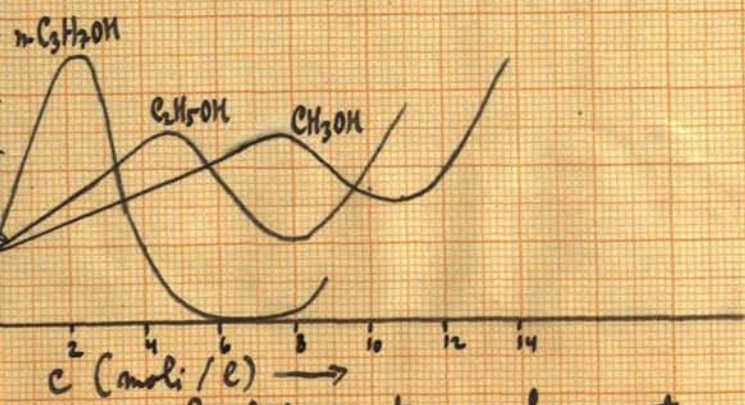
Zīm. 50. Skaļšprod. ar frāncionēti ar 50%-propilālskoh. Koagulācijas ar  $n-C_3H_7OH$ ;  $P_H = 4,31$ .

Koagulācijas parāpne pēc 24 st.



Zīm. 51. Skaļšprod. ar frāncionēti ar 50%-propilālskoh;  $P_H = 5,70$ .

Koagulācijas parāpne pēc 24 st.



Zīm. 52. Skaļšprod. ar frāncionēti ar 50%-propilālskoh;  $P_H = 6,48$ .



Ieguva sekošā celā. 100g rezorcīnu izkausē eļļas vannā un turot temperatūru starp 130-140° šķīdina 8g kazeīnu; maisa. Pēc 1 stundas gandrīz viss kazeīns ir izšķīdis. Silda vēl 1 stundu pie 131-140°, pēc tam atdzese līdz 100° un lēni lej 1 litrā alkohola; intensīvi maisa. Iegūst baltas nogulsnes. Tās nonuče, izmazgā ar alkoholu, žāvē un pēc tam šķīdina 70 ccm-os ledusetikī. Nešķīstošās paliekas nfiltrē ar stikla vati un filtrātu nogulsnē ar eteri; beidzamo lej klat ļoti lēni un intensīvi maisa. Izkrīt baltas nogulsnes. Tās nonuče, mazgā ar eteri un sausina vakuumsikatorā virs natronkalkiem. Iznākums 5 g.

Iēgūtais skaldprodukts ir gandrīz bezkrasaina viela, kas nešķīst ūdeni, bet viegli šķīst atšķaidītās skābēs, sārmos un 30-70% propilalkoholā. Tajā ir 13,25% N. Mol. svars (ledusetikī) 590. Optiskā aktivitāte 0. In HCl šķīdumā ( $c = 1,0, T = 18^\circ$ )  $[\alpha]_{H\lambda} = -60,9^\circ$ , bet 0, In NaOH tādos pat nosacījumos  $[\alpha]_{H\lambda} = -72,1^\circ$ . Koagulācijas mēģinājumien nēma sārmaino skaldprodukta šķīdumu. Pielejot atšķaidītu HCl tāds šķīdums sāk dulķoties pie  $p_H = 5,5$ . Vēl palielinot  $[H^+]$  novērojama pilnīga koagulācija un tikai pie  $p_H = 3,1$  atkal nogulsnes šķīst, pie kam veidojas vāji dulķains, opalescējošs šķīdums. Pie šāda  $p_H$  arī vislabāk izdevās iegūt līknes, kas stipri argādina zīm. 2 redzamo līknes tipu. Rezultāti attēloti zīmējumā 44. Līknē noteikti redzama tendence veidot divus maksimumus.

Tipiskas 2-maksimumu līknes dod, pie noteikta  $p_H$ , skaldprodukti, kas iegūti šķēlot kazeīnu ar karstu glicerīnu. Šķelšanu izdarīja sekošā veidā. 100 g. glicerīna uzsildīja eļļas vannā līdz 120-130° un tad pamazām šķīdina 8g kazeīna. Šķīstot novērojama intensīva putošana. Pēc 3 st. ilgas sildīšanas pie 130 - 150°, šķīdumu atdzeseja līdz 80-100° un ieleja 1 litra alkohola. Nogulsnes nonučeja, mazgāja ar alkoholu un šķīdi -



nāja 50 cm-os ledusetikī. Šķīdumu filtrēja caur stikla vati, kas aiztur daudz gallertveidīgu nogulšņu, un nogulsnē ar eteri, nonuče un pamatīgi izmazgā ar eteri. Pēc tam sausina vakuumsikatorā. Iznākums 3 g. Iegūtā viela ir gandrīz bezkrāsaina, šķietami sīkkristaliski-graudaina. Tā viegli šķīst ūdenī un dod vāji iedzeltanu, pilnīgi skaidru šķīdumu. Skaldproduktā bija 13,54% N. Ūdens šķīduma  $[\alpha]_{D}^{20} -67,5^{\circ}$  ( $c=1,0$ ;  $T=18^{\circ}$ ). Ūdens šķīdumam ir vāji skāba reakcija,  $p_{H} = 4,05$ . Pielejot atšķ. NaOH, šķīdums pie  $p_{H} = 4,8$  sāk stipri dulkoties un pie  $p_{H} = 6,9$  atkal kļūst skaidrs.

Koagulācijas mēģinājumus izdara parastā veidā, pie kam šeit, tāpat kā iepriekšējā piemērā, skaldprodukta koncentrācija koagulācijas maisījumos bija 0,1%. Zīmējumā 45 ir attēloti koagulācijas rezultāti ar propilalkoholu pie  $p_{H} = 5,03$ , kad šķīdumi jau ļoti ātri koagulē un pēc 6-8 stundām jau viscaur novērojama vairāk vai mazāk pilnīga koagulācija. Dulķu pakāpes salīdzināšanai te lietots fotometrs. Zīm. 45 skaidri redzama 2-maksimumu līkne; punktētā līkne rāda, kādā mērā šādi rezultāti reproducējami.

Jāpiezīmē, ka 2-maksimumu līknes, koagulējot glicerinskaldišanā iegūtās vielas var iegūt tikai ļoti šaurās  $p_{H}$ -robežās. Pie  $p_{H} = 4,8-4,9$  dabū parastās, vienkāršās līknes. Tāpat pie vēl mazākiem  $p_{H}$ , un arī nestabilitātes zonas sarmainā pusē, pie  $p_{H} = 6,8-7,5$  dabū vienmer vienkāršas līknes.<sup>19)</sup> Gekojošos zīmējumos 46-48 grafiski attēlota kāda cita, ar karstu glicerīnu iegūta kazeīna noārdīšanas produkta koagulācija ar mainītām alkohola koncentrācijām. Skaldprodukts šinī gadījumā iegūts tieši pēc A. Fodor'a priekšraksta,<sup>20)</sup> karsējot kazeīnu bezūdens glicerīnā. Pie 105-110° vakuumā sausinātā

19) l. c. 8, tad Biochem. Zeitschr. 246, 219 (1932) un 257, 427 (1933).

20) A. Fodor u. S. Kuk, Biochem. Zeitschr. 240, 123 (1931).

skaldrproduktā bija 14,30% N. Kā redzams, tad pie  $p_{\kappa} = 4,3, 6,9$  un  $7,4$  redzamas tikai parastās, vienkāršās līknes. Pie  $p_{\kappa} = 4,9-5,0$  nebija iespējams iegūt skaidrus rezultātus pārāk ātrās koagulācijas dēļ. Zīmējumā 49 redzams lineārais sakars starp alkoholu dielektriskām konstantēm ( $\epsilon$ ) un maksimāli koagulējošam viņu koncentrācijam ( $C_{\max}$ ). Taisnes stavokļa maiņa atkarībā no  $p_{\kappa}$  ir ļoti interesanta un pie kazeīna skaldproduktiem parādās daudz spilgtāk, nekā pie kazeīna vai albumina.<sup>21)</sup> Šis fenomens pierāda, ka maksimumu veidošanā liela nozīme daļinās veidojošo grupu disociācijai; attiecīgie ioni pie tam ar ūdens-alkohola kompleksiem, kuriem polāra daba, var saistīties, izsaucot peptizāciju. Pārbaudamu fizskaidrojumu visā pilnībā dot pagaidam tomēr nav iespējams (Sk. rezultātu diskussiju).

Tālākos mēģinājumos lietoja skaldproduktu, kas ievērojami atšķiras no iepriekšējiem un kuru ieguva sekoši. 20 g  $K_6$  (Hamarstena kazeīns no kura atšķirta 60-70% alkoholā šķīstoša frakcija  $K_3$ ) šķīdina pie  $120-125^{\circ}$  200 gramos parastā glicerīna un pie tam šķīdumu silda  $2\frac{1}{2}$  st. ūdens vannā pie  $125-135^{\circ}$ . Pēc tam adzesē līdz  $100^{\circ}$  un ielej  $1\frac{1}{2}$  litros alkohola. Kad nogulsnes nosēdušās, tad nonuče, pamatīgi izmazgā ar metilalkoholu un šķīdina 100 ccm-os 50% n-propilalkohola. Pie parastās temperatūras šķīšana norisinās ļoti lēni, tādēļ silda 30 minutes uz ūdens vannas. Šajā laikā daļa vielas ir izšķīdusi. Filtrē un filtrātu iztvaicē uz ūdensvannas līdz apm. 40 ccm. Ģādi iztvaicētam šķīdumam atdziestot sāk atdalīties pārslas un nogulsnes. Pielejot metilalkoholu, to daudzums palielinās. Pavisam pielej ap 100 ccm  $CH_3OH$ . Vienas dienas laikā nogulsnes ir pilnīgi nosēdušās. Tās nonuče, mazgā ar metilalkoholu un eteri un sausina vakuumsikatorā virs konc.  $H_2SO_4$ . Iznākums 6g. Iegūtā viela ir balta, tā

21) Sk. zīmēj. 33, tad Koll.-Zeitschr. 61, 41 (1932).



nešķīst ūdenī, bet gan ļoti atšķaidītā HCl, O, In NaOH sērme un 50% propil-  
 alkohola. Sāļskābiem šķīdumiem pielejot atšķ. NaOH, tie sāk dulķoties pie  
 $p_H = 4,3$ . Vēl palielinot  $[OH^-]$ , novērojama <sup>nogulsn</sup> koagulēšanās, bet pie  $p_H = 5,7$  no-  
 gulsnes atkal šķīst, pie kam dabū vāji dulķainu, opalescējošu šķīdumu. Nes-  
 tabilitātes robežas šim skaldproduktam tā tad ir starp  $p_H = 4,3$  un  $5,7$ , t.i.  
 apmēram tāpat, kā kazeīna frakcijai  $K_3$ , kamēr iepriekš aprakstīto skald-  
 produktu nestabilitātes robežas bija pavisam citas. No  $K_6$  iegūtā un ar  
 50% propilalkoholu fracionētā <sup>skaldprodukta</sup> optiskā aktivitāte uzdots sekošā tabulā 6.

Tabula 6.

skaldprodukta optiskā aktivitāte;  $c = 1,0$ ;  $l = 1$ ;  $T = 20^\circ (\pm 2^\circ)$ .

Maisījuma sastāvs	$[\alpha]_{H_2O}$
0,2500g skaldprod. + 1 ccm 0, In HCl + H <sub>2</sub> O līdz 25 ccm	-66
0,2500" " 5 " " " "	-70
0,2500" " 25 " " " "	-66
0,2500" " 2 ccm 0, In NaOH H <sub>2</sub> O līdz 25 ccm	-48
0,2500" " 5 " " " "	-68
0,2500" " 25 " " " "	-72

No šiem datiem pēc O. Lutz'a<sup>22)</sup> metodes var konstruēt attiecīgo rotācijas likni.

Jaunajā panēmienā iegutos skaldproduktus autors vēl nav pabeid-  
 zis pētīt, bet ir parliecināts, ka šādā veidā iespējams iegūt viendabī-  
 gus, reproducējamus produktus. Skaldot un tīrot pēc Fodor'a metodes ar

22) O. Lutz, Festschrift z. fünfzigjährigen Jubiläum d. Rigaschen Polytechni-  
 schen Instituts 1862-1912. 831p.p., W.H. Häcker, Riga, 1912; B. 62, 1916  
 (1929); Sk. arī O. Lutz u. B.E. Jirgensons, B. 63, 448 (1930); 64, 1221 (1931).

ledusetiki, grūti iegūt reproducējamus rezultātus. Tādēļ autors šo tīrīšanas metodi atmet un strādā analogiski Linderström-Lang'am. Ja dabīgo kazeīnu apstrādājot ar 60-70% alkoholu (vai 40-60% propilalkoholu) iespējams dabūt viendabīgu kazeīna frakciju, tad var sagaidīt, ka viendabīgu vielu iegūs arī no skaldproduktiem, ja tos frakcionē ar šādu atšķaidītu alkoholu. Skaldprodukta iegūšana no kazeīna tad būtu attēlojama sekoši:

Dabīgais Hammersten'a kazeīns.

Frakcionēšana ar 60-70% NaCl saturošu etilalkoholu, resp.  
40-60% 0,03 moli/l NaCl saturošu propilalkoholu.

Šķīdumā pāriet viendabīga frakcija  $K_3$ .

Pāri paliek  $K_6$   
To šķīdina karstā glicerīnā un nogulsne ar alkoholu. Nogulsnes šķīdina karstā 50% n-propilalkoholā. Šķīst pa daļai.

Šķīdumā viendab. skaldprodukts.

Nogulsnes.

Protams, līdzīgā veidā viendabīgus skaldproduktus var sagaidīt arī no  $K_3$ , ja to skalda un skaldproduktus tīra augšminētā veidā. Iegūt šādus viendabīgus skaldproduktus no  $K_3$  ir autora tuvākais nodoms. Koagulācijas sērijās, kas līdz šim taisītas ar jaunajā veidā tīrīto skaldproduktu rāda, ka tas izturas tāpat, kā citi viendabīgie objekti. Rezultāti redzami grafikās



50,51 un 52.

Īsi sanemot kopā šīs nodalās rezultātus, par skaldproduktu koagulācijas līknēm var teikt sekošo: ar glicerīnu vai rezorcīnu skaldot iegūtie un ar ledusetīki frakcionētie objekti, pie zināma  $p_H$  dažos gadījumos deva 2-maksimumu līknes; ar glicerīnu skaldot iegūtās un ar 50% propilalkoholu frakcionētās vielas deva viennēr vienkārša tipa līknes.

### R e z u l t ā t u d i s k u s s i j a.

Šā darba rezultātus nevar plaši un pamatīgi diskutēt pirmkārt jau tandēl, ka alkoholkoagulācijas mehānisms un būtība vēl vispār nav zināmi. Maksimumu un minimumu cēloni diskutēti jau iepriekšējos darbos (l.c.8). Proteīna pastāvēšana šķīduma atkarīga galvenā kārtā no hidratācijas. Tā kā alkohols pazīstams kā dehidratizētais, tad tā koagulējošais iespaids nebūtu grūti saprotams. Grūtības rada alkoholu peptizējošās darbības izskaidrošana, jo vajadzētu sagaidīt, ka ar augošu alkohola koncentrāciju koagulācijas pakāpe augs. Ievērojama ir koagulācijas līknes nokrišana, resp. minimumu eksistence. Jau agrākos darbos taisīts pieņēmums, ka zināmās alkohola koncentrācijās var rasties labili, polāri ūdens-alkohola molekulu kompleksi, kas dalīnas stipri solvatizē. Šo <sup>23)</sup> ~~pieņēmumu~~ <sup>pieņēmumu</sup> pamatoja 1) uz viskozitātes mērījumiem un sledzieniem no tiem, 2) uz sakarībām, kādas pastāv starp alkoholu dielektriskām konstantēm un to kolloidkīmisko iedarbību. Ka stabilizācijas iestāšanās atkarīga no dalīnas virskārtā esošo grupu dissociācijas, to rāda arī  $p_H$  iespaids uz  $C_{max}$  un optiskās aktivitātes maina no alkohola. No grupu dissociācijas atkarīga nevien sola vispārīgā stabilitāte, bet arī

23) Sk. seviški Koll.-Zeitschr. 63, 78 (1933).

peptizācijas iespēja, jo ionu gadījumā polārie ūdens-alkohola asociāti ar daļiņu saistīsies vieglāk, neka tad, ja daļiņa būs elektriski neitrāla. Šis sledziens pilnīgi saskan ar novērojumiem: jo tālāk no izoelektriskā punkta (nestabilitātes maksimuma) stāv koaguletā sola  $p_{\mu}$ , jo pilnīgāka ir peptizācija. Iespējams, ka  $p_{\mu}$  pie tam atstāj iespaidu nevien uz daļiņu, bet arī uz polāro ūdens-alkohola kompleksu veidošanos. Pieņemot šādu iespēju ir izredzes izskaidrot dažādo alkoholu maksimālo koagulācijas koncentrāciju ( $C_{max}$ ) mainu ar  $p_{\mu}$  (sk. zīm. 33, bet sevišķi zīm. 49). Straujā optiskās aktivitātes maina pie 20 - 25 tilp.%  $C_2H_5OH$  (tab. 3) savukārt rāda, ka alkohols proteīnu kautkā iespaido; domājams, šajās koncentrāciju robežās sākas intensīvie solvatācijas procesi, kas atspoguļojas kā optiskās aktivitātes datos, tā arī koagulācijas līknēs. Parādības pilnīgākai noskaidrošanai būtu ļoti vēlams noteikt optisko aktivitāti dažādu alkohola koncentrāciju klātbūtnē pie viendabīgiem proteīniem vai to skaldproduktiem, kas arī ietilpst autora tuvākos nodomos.

Nevien dabīgo proteīnu gadījumā komplikācijas ir vēl daudz lielākas. Koagulācijas līknes uzrāda divreizēju kritumu, divus minimumus, un dažreiz arī divus maksimumus. Ievērojams tas, ka otrais kritums parādās pie mazam alkohola koncentrācijam, pie tam samērā šaurās koncentrāciju robežās, visbiežāk pie apm. 4 tilp.%, kamēr pie viendabīgiem proteīniem (un arī jauktiem) novērotā parastā peptizācija sākas tikai pie 20-40 tilp.% alkohola. Vispirms varētu jautāt, vai abi procesi norisinās neatkarīgi, vai katrs saistīts ar savu proteīna komponenti? Uz šo jautājumu jāatbild noliedzīgi. Viendabīgie proteīni, piem. kazeīna frakcija  $K_3$ , nekādos nosacījumos nedod līknes nokrišanas efektu pie 4% alkohola. Komplikāciju veidošanā atbildīgas tā tad abas komponentes, jauno kritumu izsauc



abu komponentu kopdarbība.

Labi apskatot dažādos, zīm. 2 un 3 redzamo līkņu tipu piemērus, sevišķi uzkrītoša ir lielā atšķirība, kāda novērojama mazās un lielās alkohola koncentrācijās. Mazās alkohola koncentrācijās <sup>koagulācija</sup> norisinās pavisam citādi nekā lielās. Ja salīdzina kāda viendabīga proteīna seriju ar neviendabīga proteīna rindu, tad par pašu koagulācijas gaitu var teikt sekošo. Pirmajā laika periodā (līdz apm. 30-60 minūtem no saliešanas) abas rindas ir vienādas: abās pie apmēram 20 tilp.% alkohola ir koagulācijas pakāpes maksimums, pie 20-60% minimums. Pie 20% alkohola tā tad koagulācija norisinās visātrāk, pie 40-60% vislēnāk. Ja nu rindas novēro, <sup>tālāk</sup> tad viendabīgo proteīnu gadījumā nekas sevišķs vairs nav redzams; maksimums aug, bet savu vietu gandrīz nemaz nemaina. Savu visparīgo izskatu serija patur ļoti ilgi. Pavisam citādi turpretim ir ar neviendabīgā proteīna rindu. Pēc dažām stundām mazās alkohola koncentrācijās koagulācijas ātrums sāk augt un pēc zināma laika te veidojas jauns minimums (un maksimums). Jātaisa tā tad slēdziens, ka pie apmēram 4% alkohola, kompleksajā sistēmā var norisināties ar laiku zināmas pārmaiņas, kas izsauc stabilitātes mazināšanos. (Gāls klatbutnē, kad koagulācija vispār paātrināta, dažās serijās tomēr 2-maksimumi veidojas jau pašā sākumā). Saņemot visu kopā, var teikt, ka raksturīga jaukto proteīnu pazīme ir lielas dažādības koagulācijas ātruma maiņas ar laiku, pie dažādām alkohola koncentrācijām. Jaukto proteīnu piemēros, pirmajā laika periodā (30-60 min. pēc saliešanas) vislielākais koagulācijas ātrums ir pie 15-30 tilp.%, vismazākais pie 40-60 tilp.% alkohola; tālākā laikā ļoti strauji koagulācijas ātrums aug tajos šķīdumos, kur ap 4% alkohola, bet pārējos nemainas.

Kas ir šo koagulācijas ātruma maiņu pamats? Un kāpēc jaukto proteīnu piemēros šīs maiņas lielākas, nekā pie viendabīgiem objektiem? Ja

proteinā ir vairākas vielas, tad skaidrs, ka šāds komplicēts objekts dos arī kompleksu solu; bet šāds sols var pastāvības zinā stiprā atšķirties no vienkāršāka. Viegli saprotams, ka tāda kompleksā solā var norisināties arī dažādas iekšējas pārmaiņas, zināmos nosacījumos var komponentu starpā norisināties pat savstarpēja iedarbība. Piem., ļoti iespējams, ka mazo alkohola koncentrāciju klatbūtne komponentes dod labilus, viegli koagulējošus asociātus, kas veidojas pēc zināma laika un tad ātri koagulē.

Komplicētas, dažādos veidos liektas līknes ir iegūtas novērojot arī dažādus citus procesus ūdens-alkohola u.c. vielu maisījumos. Piem., dažiem proteīniem, (gliadinam) ir pie noteiktas alkohola koncentrācijas šķīdības maksimums. Tāds ir arī aprakstītiem kazeīna skaldproduktiem, olbaltuma noārdīšanas produktiem<sup>24)</sup> (protelbīnskabei) un pat dažām, samērā vienkāršām organiskām vielām. W.M. Fischer's<sup>25)</sup>, pētot nitrofenolu sāļu šķīdību ūdens-alkohola maisījumos, ieguva līknes, kas stipri atgādina šajā darbā attēlotās koagulācijas līknes. Piem. natrija pikratam pie 25%  $C_2H_5OH$  ir šķīdības minimums, bet pie 50%  $C_2H_5OH$  ir šķīdības maksimums. Šķīdības minimums atbilst aprakstītam koagulācijas maksimumam. Natrija pikrata līkne atšķiras no koagulācijas līknes tikai ar to, ka pirmajai ir vēl otrs minimums pie 95%  $C_2H_5OH$ , t.i. ka absolūtā 100% alkohola šķīdība ir ļoti liela, kas pie proteīniem nekad nav novērojama. Pēc W.M. Fišera domām anomālijas šķīdības līknē izskaidrojamas ar nitrofenolu sāļu mainīgo strukturu.

Līdzīgas līknes ar maksimumiem un minimumiem iegūtas arī pētot ķīmiskas reakcijas dažāda sastāva ūdens-alkohola maisījumos. Bobtelsky's<sup>26)</sup>

24) C. Paal, B. 35, 2195 (1902).

25) В. М. Фишер, Ж. Р. Реч. Физ.-Хим. Отд. 46, 1250 (1914)

26) W. Bobtelsky u. Ch. Radovensky, Ztschr. f. anorg. Chem. 199, 241 (1931).



Šādas līknes dabu jā pētīt chromskābes reducēšanu ar alkoholu; pie 20-25%  $C_2H_5OH$  reakcijas ātrums ir vislielākais, bet pie 50-60% vismazākais. Arī šeit tā tad maksimumi un minimumi sakrīt ar attiecīgam diskontinuitātes koagulācijas līknēs. Līdzīgus rezultātus ieguvis arī M. Prasad's<sup>27)</sup>, pētīt reakciju starp natrija tiosulfātu un metil- vai etiljodīdu ūdens-alkohola maisījumos. Šī reakcijai ir ātruma maksimums pie 40 tilp.%  $C_2H_5OH$  un 20 tilp.%  $CH_3CH_2CH_2OH$ . Vēl būtu mināmi A. Ganguli<sup>28)</sup> darbi par cukura inversijas ātrumu ūdens-alkohola, ūdens-glicerīna u.c. maisījumos. Arī viņš dabū komplikētas līknes, kas tomēr stipri atšķiras no līdz šim aprakstītām. Pilnīgu izskaidrojumu minētām parādībām tomēr neviens no minētiem pētniekiem nav devis.

Noslēdzot šīs pārrunas un atgriežoties vēl pie sākumā dotā līkņu tipu iedalījuma, pēc visa teiktā ir skaidrs, ka par jaukto proteīnu pazīmi jāuzskata dažādības koagulācijas ātruma mainā ar laiku pie dažādām alkohola koncentrācijām. Šīs dažādības koagulācijas līknē (kur uz abscissas ir koagulācijas pakāpe, bet uz ordinātes alkohola koncentrācija) izpaužas tā, ka pēc zināma laika veidojas vairāki maksimumi, vai vairāki minimumi. Visiem pētītiem proteīniem ir viens pamatmaksimums, kas atrodas pie 15-25 tilp.% alkohola, un pamatminimums, kas stāv pie 40-60 tilp.%. Šādi pamatmaksimumi un pamatminimumi novēroti arī pie daudziem citiem processiem ūdens-alkohola maisījumos un domājams, ka tiem ir kāds sakars ar īpatnējiem asociācijas procesiem, kas norisinās starp ūdens un alkohola molekulām,

27) M. Prasad, Journ. Indian Chem. Soc. 7, 127 (1930); C. 1930, II, 1187.

28) A. Ganguli u. A. B. Malkani, Journ. phys. chem. 35, 2364 (1931).

pie kam var veidoties polāri kompleksi un mainīties visas sistēmas dielektriskās īpašības. Jaunās diskontinuitātes, kas parādās pie neviendabīgajiem proteīniem mazās alkohola koncentrācijās, ir sakarā ar ipatnējām pārmainām kompleksajā sistēmā, kur ar laiku norisinās vēl nenoskaidroti procesi komponentu starpā.

### KOPSAVILKUMS .

Šajā darbā pētīta dažādu proteīnu un to skaldproduktu koagulācija ar mainītām alkoholu koncentrācijām pie noteikta  $p_H$ . Liekot uz abscises alkohola koncentrāciju un uz ordinātes koagulācijas pakāpi, iegūtas koagulācijas līknes. Iegūtas koagulācijas līknes iedalāmas divos pamattipos: pie pirmā tipa pieder līknes, kurām ir viens maksimums un viens minimums, pie otrā tipa tās, kurām vairāki minimumi, <sup>vai</sup> ~~un~~ vairāki maksimumi.

Darbā pierādīts, ka komplicētās otrā tipa līknes dod proteīni, kas nav viendabīgi-dabīgie kazeīns, oksi- un methemoglobīna maisījums, želatīna <sup>x)</sup> un daži kazeīna skaldprodukti, kas iegūti frakcionējot ar ledus-etiki. Pirmā, vienkāršākā tipa līknes dod viendabīgie proteīni - albumīns un 60-70% alkohola šķīstošā <sup>kazeīna</sup> frakcija  $K_3$ . Otrā tipa līknes iegūtas vēl koagulējot 60-70% alkohola nešķīstošo kazeīna frakciju  $K_6$ , bet pirmā tipa līknes  $K_6$  skaldprodukta (kas frakcionēts ar 50% propilalkoholu) koagulācijā. Otrā tipa līknes iegūstamas tikai noteiktās  $p_H$  robežās.

No šiem rezultātiem taisams slēdziens, ka proteīnu viendabīgums atspoguļojas koagulācijas līknēs un no vairākām koagulācijas serijām, kas taisītas pie dažādiem  $p_H$ , var spriest par proteīna, vai tā skaldprodukta viendabīgumu: ja pie dažādiem  $p_H$  vienmēr iegūst pirmā tipa līknes, tad viela viendabīga, bet ja pie zināma  $p_H$  parādās otrā tipa līknes, tad viela nav viendabīga.

x) Pēc A. Dumanska pētījumiem.



Galvenie maksimumi koagulācijas liknēs ir starp 12-30 tilp.% alkohola, bet galvenie minimumi starp 30-70 tilp.%. Svārstības ir atkarīgas no alkohola dabas un šķīduma  $p_H$ . Jaukto <sup>ne</sup>viendabīgo proteīnu gadījumā bez tam parādās jauns maksimums vai minimums mazās alkohola koncentrācijās starp 2-8 tilp.%( parasti pie 4%). Diskontinuitātes visspilgtāk parādās serijās ar propilalkoholu, mazāk raksturīgi ar etilalkoholu, bet visvājāk metilspirta gadījumā. Diskontinuitātes novērojamas arī mazu sāls koncentrāciju klātbūtnē.

Koagulējot 60-70% alkoholā šķīstošo kazeīna frakciju  $K_3$  un šādā alkoholā nešķīstošo frakciju  $K_6$  ar mainītu  $n$ -propilalkohola un konstantām NaCl koncentrācijām, konstatēts, ka frakcijas izturas pretēji:  $K_3$  pilnīgi koagulē mazās alkohola koncentrācijās (līdz 30 tilp.%), bet lielās pilnīgi peptizējas;  $K_6$  turpretim vispilnīgāk koagulē lielās alkohola koncentrācijās, sevišķi tad, ja klāt ir 0,03 moli/l NaCl. Uz šo rezultātu pamata izstrādāta jauna kazeīna frakcionēšanas metode ar 50-60% propilalkoholu un NaCl 0,03 moli/l.

Analogiski kazeīna frakcionēšanai, izstrādāta arī jauna kazeīna skaldproduktu frakcionēšanas metode ar 50% propilalkoholu.

Darbu noslēdzot, izsaku pateicību savam cienītam skolotājam un šefam, profesoram Dr. O. Lutca kungam par pastāvīgo gādību un interesi, ar ko viņš manu darbu vienmēr veicinājis. Deklam, prof. Dr. A. Petrikalna kungam, un savam bijušam skolotājam prof. Dr. A. Janeka kungam pateicos par atļauju izlietot viņu pārziņā esošos aparātus.