

Z. KASPRZYKÓWNA i W. JACHYMCZYK

SAPONINY TRÓJTERPENOWE ROŚLIN RODZINY *COMPOSITAE*II. SAPONINA KWIATÓW SŁONECZNIKA (*HELIANTHUS ANNUUS*) *)

Z Katedry Fizjologii Roślin i Katedry Chemii Organicznej Uniwersytetu Warszawskiego

Kwiaty rozpowszechnionych na terenie Europy środkowej roślin należących do rodziny *Compositae*, a mianowicie: dziko rosnących arniki (*Arnica montana*), podbiału (*Tussilago farfara*) i mniszka (*Taraxacum officinale*) oraz uprawnych nogietka (*Calendula officinalis*) i słonecznika (*Helianthus annuus*), wykazują podobieństwo grupowe niektórych metabolitów wtórnych z grupy izoprenoidów. Zabarczenie tych kwiatów wywołane jest obecnością barwników karotenoidowych; arnika zawiera alkohole: luteol, epoksyluteol [18] i zeaksantol [10], mniszek — luteol [14], taraksantol [19] i flawoksantol [13], nogietek — wiolaksantol [24] i luteol [12] obok węglowodorów karotenu i likopenu [24], podbiał — wiolaksantol i taraksantol [11], słonecznik — taraksantol, kryptosantol [26] i luteol [19].

We wszystkich tych kwiatkach występują należące do grupy pięciocyklicznych trójterpenów dwuwodorotlenowe alkohole: faradiol i arnidiol [27]. Inny przedstawiciel tej samej grupy związków — kwas oleanolowy jest aglikonem saponiny wyodrębnionej z nogietka [23, 15].

Ze względu na obecność tzw. „substancji gorzkich”, do których między innymi zalicza się i saponiny wykazane również w arnicy, mniszku, słoneczniku i podbiale [9], zajęliśmy się stwierdzeniem, czy kwiaty tych roślin zawierają saponiny o aglikonach należących do grupy trójterpenów pięciocyklicznych.

Obecność saponiny w arnicy wykazali Thies i Herrlinger [22], a w słoneczniku Koczwarą [16] metodą hemolizy żelatyny z krwią. Metodą stosowaną do otrzymywania saponin [23] przygotowaliśmy z kwiatów czterech wyżej wymienionych roślin frakcje wytrącające się z wyciągu metanolowego acetonem (frakcja S) i użyliśmy do oznaczenia indeksu hemolitycznego metodą podaną przez Koeflera [17].

*) I. Z. Kasprzykówna: Prace Badawcze Główn. Inst. Chemii Przemysł. zeszyt 3 s. 39, 1951.

Stwierdziliśmy, że 1% - roztwór frakcji S otrzymanej z kwiatów słonecznika wywołuje hemolizę po upływie 30 sekund, tj. w tym samym czasie, co roztwór saponiny otrzymanej z kwiatów nogietka. Roztwór frakcji S podbiału hemolizował dopiero po 3 godz., natomiast frakcje S arniki i mniszka w teście hemolitycznym okazały się nieczynne.

- Test hemolityczny, jakkolwiek często stosowany w badaniach farmakologicznych, nie jest specyficzny dla saponin. Wiele z nich nie wywołuje hemolizy, a dodatni test hemolityczny ze skrawkami tkanek nie zawsze świadczy o obecności saponiny w badanym materiale, gdyż może być wywołany innymi składnikami rośliny. Tym prawdopodobnie należy tłumaczyć rozbieżność wyników Thiesa i Herrlingera oraz naszych w odniesieniu do arniki.

Ze względu na największe podobieństwo indeksu hemolitycznego frakcji S z kwiatów słonecznika i saponiny trójterpenowej nogietka zajęliśmy się przede wszystkim tą frakcją słonecznika. Badania polegały na stwierdzeniu, czy frakcja ta zawiera heterozyd hydroksykwasu trójterpenowego, tj. saponinę trójterpenową, oraz na ustaleniu budowy jego składników.

Część doświadczalna

1. WYODRĘBNIANIE SUROWEJ SAPONINY

240 g wysuszonych w temp. 40° i zmielonych kwiatów języczkowych słonecznika ekstrahowano eterem etylowym w ekstraktorze typu Schoebela o pojemności 1 litra w ciągu 10 godzin. Susz słonecznikowy uwolniony w ten sposób od tłuszczowców, karotenoidów, wolnych trójterpenów i estrów alkoholi trójterpenowych ekstrahowano następnie w ciągu 10 godzin alkoholem metylowym w tym samym ekstraktorze.

Zawartość składników wyciągu metanolowego (frakcja A) wynosiła 30% ciężaru użytych do ekstrakcji kwiatów.

Zatężony do objętości 150 ml wyciąg metanolowy wkroplono do 5-krotnej objętości bezwodnego acetonu oziębionego do — 5°. Wytrącony osad frakcji S odsączono szybko na lejku sitowym, przemyto 10 ml suchego acetonu i wysuszono w eksykatorze próżniowym w temperaturze pokojowej. Świeżo wytrącony produkt jest bardzo hygroskopijny i należy chronić go przed zetknięciem z wilgocią powietrza, gdyż natychmiast rozplywa się, natomiast po wysuszeniu własności hygroskopijne w znacznym stopniu maleją.

Z 240 g suszonych kwiatów otrzymano 32 g kremowo zabarwionego proszku (frakcja S), co stanowi 13,3% wagi suszu.

W celu oczyszczenia frakcję S rozpuszczono dwukrotnie w 97% alkoholu metylowym i wytrącono acetonem. Otrzymana w ten sposób surowa saponina ma gorzki smak, rozpuszcza się bardzo łatwo w wodzie — dając silnie pieniące się roztwory — trudniej w alkoholu metylowym i etylowym, bardzo trudno w acetonie i eterze etylowym, nie rozpuszcza się w eterze naftowym. Ze stężonym kwasem siarkowym wytwarza charakterystyczne dla saponin czerwone zabarwienie.

2. HYDROLIZA SAPONINY DZIAŁANIEM KWASU

2 g surowej saponiny otrzymanej w p. 1 rozpuszczono w 20 ml metanolu zawierającego 7% chlorowodoru i ogrzewano w ciągu 4 godzin do wrzenia. Po skończonej reakcji dodano 40 ml wody i oddestylowano częściowo alkohol, a następnie wyekstrahowano hydrolizat eterem (frakcja E).

3. OZNACZANIE SKŁADNIKÓW CUKROWYCH W HYDROLIZACIE SUROWEJ SAPONINY

Roztwór wodny hydrolizatu po ekstrakcji eterowej przepuszczono w celu usunięcia jonów Cl przez kolumnę z jonitu (*Amberlite IR-4B*) — pH po odkwaszeniu wynosiło 6,8 — i zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem dc objętości 5 ml. Rozdzielenie cukrów przeprowadzono na bibule Whatmana Nr 1 metodą chromatogramu wstępującego stosując jako rozpuszczalnik mieszaninę butanol : kwas octowy : woda w stosunku 4 : 1 : 5. Chromatogram wywołano za pomocą kwaśnego ftalanu aniliny w roztworze wodnym nasyconym butanolem. Otrzymano trzy wyraźnie oddzielone od siebie plamy: środkowa — największa — miała barwę brązowoczerwoną, obie pozostałe — brązową.

R _F	plamy 1	0,18
R _F	„ 2	0,24
R _F	„ 3	0,36

W celu identyfikacji typu cukrów sporządzono chromatogram, na którym równoległe obok hydrolizatu rozdzielono mieszaninę trzech czystych cukrów: glikozy, ksylozy i ramnozy. Odpowiednie plamy umieściły się na tych samych poziomach, co wskazuje, że cukier plamy 1 jest heksozą (glikozą lub galaktozą), cukier plamy 2 — pentozą (ksylozą lub arabinozą), cukier plamy 3 — metylopentozą.

4. ROZDZIELANIE SKŁADNIKÓW FRACJI E

Roztwór eterowy otrzymany w p. 2 (frakcja E) przemyto wodą do odczynu obojętnego w celu usunięcia alkoholu i resztek kwasu solnego, a na-

stępnie wyekstrahowano wyczerpująco 5-ml porcjami 2% roztworu wodorotlenku potasowego. Wydzieliła się charakterystyczna dla szeregu kwasów trójterpenowych nierozpuszczalna sól potasowa, którą odsączono (frakcja Ts). Z przesączu po zakwaszeniu wytrącił się drugi składnik kwasowy (kwas K), którego sól potasowa jest łatwo rozpuszczalna w wodzie. Kwas ten rozpuszczono ponownie w eterze i wyekstrahowano 2% wodnym KOH. Odsączono niewielką ilość wydzielonej soli Ts i dołączono ją do głównej porcji. Z przesączu zregenerowano kwas K przez zakwaszenie kwasem solnym. Otrzymano 120 mg soli Ts i 40 mg kwasu K. Sól Ts (120 mg) rozpuszczono w niewielkiej ilości alkoholu etylowego, rozłożono przez zakwaszenie kwasem solnym i wytrącono wolny kwas wodą. Otrzymano 90 mg kwasu T. Stosunek wagowy kwasów T do K wynosi około 2:1.

5. OTRZYMYWANIE KWASÓW T I K Z FRAKJI METANOLOWEJ A

Ze 100 g kwiatów słonecznika otrzymano wyciąg metanolowy w sposób opisany w p. 1 (frakcja A). Wyciąg zatężono do objętości 150 ml, dodano 150 ml 14%-metanolowego roztworu chlorowodoru i ogrzewano do wrzenia w ciągu 4 godzin. Hydrolizat zatężono do 150 ml, dodano do niego 300 ml wody i wyekstrahowano wyczerpująco eterem. Wyciąg eterowy (frakcja E) przerobiono w sposób opisany w p. 4. Otrzymano 720 mg kwasu T i 350 mg kwasu K.

6. WŁAŚNOŚCI I ANALIZA KWASU T

Kwas T przekryształizowano czterokrotnie z uwodnionego alkoholu etylowego, otrzymując bezbarwne igły. Ogrzewany w kapilarze kwas T kurczy się począwszy od temp. 270° i topi nieostro w temp. 283—287°. Związek ten rozpuszcza się bardzo dobrze w bezwodnym etanolu, metanolu, pirydynie, eterze etylowym i chloroformie. Nie rozpuszcza się w wodzie.

Daje on następujące reakcje barwne:

a) reakcja Nollera [20]: 2—3 mg próbkę zadano 1 ml 1% roztworu chlorku cynawego w chlorku tionylu i ogrzano, powstało zabarwienie czerwone, przechodzące w fioletowe.

b) reakcja Storcha-Morawskiego: 2—3 mg próbkę zadano 1 ml 1% roztworu waniliny w stęż. kwasie siarkowym, powstało zabarwienie czerwone.

c) reakcja Liebermanna — Burchardta: 2—3 mg próbkę rozpuszczono w 2 ml chloroformu, dodano 20 kropli bezwodnika octowego i 1 kroplę stęż. kwasu siarkowego, po zmieszaniu powstało zabarwienie różowe, przechodzące w czerwone, fioletowe, a po kilku godzinach w niebieskie.

d) reakcja z kwasem chlorosulfonowym [2]: 2—3 mg próbkę rozpuszczono w 1 ml kwasu chlorosulfonowego, powstało zabarwienie wiśniowoczerwone.

e) reakcja z czteronitrometanem: 2—3 mg próbkę w 0,5 ml alkoholu etylowego zadano kilku kroplami czteronitrometanu, powstało zabarwienie jasnożółte.

Wszystkie reakcje barwne z kwasem T przeprowadzono porównując z odpowiednimi reakcjami kwasu oleanolowego ($C_{30}H_{48}O_3$) jako substancji wzorcowej.

Analiza elementarna dała następujące wyniki:

25,34 mg subst. dało 71,07 mg CO_2 i 22,19 mg H_2O

22,73 mg „ „ 64,14 mg „ „ 19,88 mg „ „

znaleziono: C 76,54⁰/₀; 76,82⁰/₀

H 9,80⁰/₀; 9,81⁰/₀

dla $C_{30}H_{48}O_4$

obliczono C 76,27⁰/₀; H 10,17⁰/₀

dla $C_{31}H_{50}O_4$

obliczono C 76,54⁰/₀; H 10,28⁰/₀

7. POCHODNE KWASU T

a) Octan

200 mg kwasu T rozpuszczono w 10 ml bezwodnej pirydyny i dodano 5 ml bezwodnika octowego. Mieszaninę pozostawiono w ciągu 24 godzin w temp. pokojowej, a następnie wylano do wody z lodem. Wydzielony osad odsączono, przemyto dokładnie zimną wodą i wysuszono w eksykatorze próżniowym. Otrzymany produkt przekrystalizowany z uwodnionego kwasu octowego topi się w temp. 101—105°. Po wysuszeniu w temp. 110° nad P_2O_5 pod zmniejszonym ciśnieniem t. t. wynosiła 152—158°.

Oznaczenie grup acetylowych:

14,2 mg substancji zużyło 1,22 ml NaOH 0,021 n, co odpowiada 7,75⁰/₀ reszt acetylowych.

12,2 mg substancji zużyło 1,1 ml NaOH 0,021 n, co odpowiada 8,14⁰/₀ reszt acetylowych.

Wyliczono dla jednooctanu $C_{32}H_{50}O_5$ — 7,9⁰/₀ reszt acetylowych

b) ester metylowy

200 mg kwasu T rozpuszczono w 10 ml bezwodnego eteru etylowego. Do roztworu dodano w nadmiarze eterowy roztwór dwuazometanu i pozosta-

wiono mieszaninę w ciągu 24 godzin w temp. pokojowej. Po skończonej reakcji eter i nadmiar dwuazometanu odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymaną substancję przekrystalizowano z uwodnionego alkoholu metylowego i wysuszono w temp. 110° nad P_2O_5 pod zmniejszonym ciśnieniem. T. t. wysuszonego estru metylowego $185-189^{\circ}$.

Analiza elementarna i oznaczenie grup metoksyowych metodą Zeisela dały następujące wyniki:

19,93 mg subst. dało 56,07 mg CO_2 i 17,57 mg H_2O

18,84 mg „ „ 52,99 mg „ „ 16,35 mg „ „

znaleziono: C 76,68⁰/₀; 76,63⁰/₀

H 9,86⁰/₀; 10,44⁰/₀

OCH_3 6,2⁰/₀

dla $C_{31}H_{50}O_4$

obliczono C 76,54⁰/₀ H 10,28⁰/₀ OCH_3 6,6⁰/₀

dla $C_{32}H_{52}O_4$

obliczono C 76,80⁰/₀ H 10,4⁰/₀ OCH_3 6,2⁰/₀

8. KWAS K

Kwas K przekrystalizowany z eteru naftowego ciemniej w temp. 175° i topi się w temp. $194-196^{\circ}$. Związek ten rozpuszcza się łatwo w alkoholach i eterze etylowym, trudniej w eterze naftowym i wodzie.

Orientacyjna analiza elementarna dała następujące wyniki:

21,09 mg subst. dało 54,30 mg CO_2 i 16,52 mg H_2O

znaleziono: C 70,29⁰/₀ H 8,81⁰/₀

Dyskusja

Przeprowadzone badania wykazały obecność saponiny trójterpenowej w kwiatach słonecznika.

W wyniku kwaśnej hydrolizy surowej saponiny otrzymano dwa kwasy różniące się t. t. i składem chemicznym. Kwasu K o t.t. $194-196^{\circ}$ na razie nie badano bliżej. Orientacyjny wynik analizy elementarnej wskazuje, że nie należy on do grupy trójterpenów. Natomiast przynależność kwasu T do tej grupy związków nie ulega żadnej wątpliwości. Wykazuje on wszystkie reakcje barwne, charakterystyczne dla trójterpenów. Reakcje Nollera, Storcha-Morawskiego i Liebermanna-Burchardta dają co prawda również aglikony saponin steroidowych. Natomiast występowanie czerwonego zabarwienia z kwasem chlorosulfonowym jest typowe dla trójterpenów — steroidy dają z tym odczynnikiem zabarwienie jasnożółte [2]. Jasnożółte za-

Tablica 1

Nazwa	Wzór sumaryczny	t. t.		
		Kwas	Ester metylowy	Octan
Kw. echinocystowy (7)	$C_{30}H_{48}O_4$	305–312 ^o	213–215 ^o	271–272 ^o
Kw. gwajawolowy (1)	$C_{30}H_{48}O_4$	306–308	210–211	242–244
Hederagenina (7)	$C_{30}H_{48}O_4$	332–334	238–239	198–200
Kw. kochalowy (6)	$C_{30}H_{48}O_4$	303–306	192–194	304–310
Kw. krategolowy (21)	$C_{30}H_{48}O_4$	252–254	217–219	—
Kw. macherinowy (5)	$C_{30}H_{48}O_4$	—	232–234	—
Kw. poliporenowy A (4)	$C_{30}H_{48}O_4$	199–200	148–149	—
Kw. poliporenowy B (8)	$C_{30}H_{48}O_4$	300–310	168–171	159–161
Kw. siaresinolowy (7)	$C_{30}H_{48}O_4$	292	kurczy się 160 topi 182	280–281
Kw. sumaresinolowy (7)	$C_{30}H_{48}O_4$	298	220–221	227
Kw. tumulozowy (3)	$C_{31}H_{50}O_4$	306	164	217–228
Kw. heliantowy		283–287 ^o	185–189 ^o	152–158 ^o

barwienie kwasu T z czteronitrometanem wskazuje na obecność jednego wiązania podwójnego.

Wynik analizy elementarnej zarówno kwasu, jak i jego pochodnych nie pozwala na razie rozstrzygnąć między wzorami $C_{30}H_{48}O_4$ i $C_{31}H_{50}O_4$, niemniej jednak wskazuje wyraźnie na obecność czterech atomów tlenu w cząsteczce. Dwa z nich wchodzi w skład grupy karboksylowej (wytworzenie monoestru), zaś dwa należą do dwóch grup alkoholowych (wytworzenie acetylowej pochodnej, brak reakcji na grupę karbonylową).

Z powyższych danych wynika, że kwas T jest dwuhydroksyjednokarboksylowym kwasem trójterpenowym; t. t. jego pochodnej acetylowej i estru metylowego nie odpowiadają stałym, podanym dla znanych kwa-

sów trójterpenowych dwuhydroksyjednokarboksyłowych, których zestawienie podano w tabl. 1. Kwas T jest zatem prawdopodobnie związkem dotychczas nie opisanym. Proponujemy dla niego nazwę kwasu heliantowego.

W hydrolizacie kwaśnym surowej saponiny stwierdzono obecność trzech rodzajów cukrów: heksozy, pentozy i metylopentozy.

Ilość kwasu oleanolowego w hydrolizacie wyciągu metanolowego kwiatów nogietka wynosi 3% [15], natomiast ilość kwasu heliantowego w hydrolizacie wyciągu kwiatów słonecznika tylko 0,72%. Jakkolwiek nie ustaliliśmy jeszcze masy cząsteczkowej saponiny słonecznika, porównanie zawartości aglikonów wskazuje jednak na mniejszą zawartość saponiny w kwiatach słonecznika niż nogietka.

Otrzymanie w wyniku hydrolizy surowej saponiny dwóch składników kwasowych wskazuje, że: 1) w surowej saponinie występują dwa różne heterozydy o różnych aglikonach kwasowych albo — 2) oba kwasy wchodziły w skład tej samej saponiny. Drugie przypuszczenie wydaje się bardziej prawdopodobne.

Pani prof. dr Irenie Chmielewskiej składamy serdeczne podziękowanie za cenne rady i wskazówki udzielane w czasie wykonywania niniejszej pracy.

Streszczenie

1. Z suszonych kwiatów słonecznika wyodrębniono surową saponinę i wykazano jej przynależność do grupy saponin trójterpenowych.

2. W hydrolizacie kwaśnym surowej saponiny stwierdzono obecność trzech rodzajów cukrów: heksozy, pentozy i metylopentozy.

3. Z wyciągu eterowego hydrolizatu wyodrębniono dwa kwasy K i T, różniące się własnościami i składem chemicznym. Orientacyjny wynik analizy elementarnej wskazuje, że kwas K nie należy do grupy trójterpenów.

4. Stwierdzono, że kwas T jest nie opisanym dotychczas dwuhydroksykwasem trójterpenowym. Wynik analizy elementarnej nie pozwala na razie rozstrzygnąć między wzorami $C_{30}H_{48}O_4$ i $C_{31}H_{50}O_4$. Zaproponowano dla kwasu T nazwę kwasu heliantowego.

L I T E R A T U R A

[1] Arthur H., Hui W. *J. Chem. Soc.* 1404, 1954.

[2] Brieskorn C., Briner M. *Pharm. Acta Helv.* 28, 139, 1953.

- [3] Cort L., Gascoigne R., Holker J., Rolph B., Robertson A., Simes J. *J. Chem. Soc.* 3713, 1954.
- [4] Curtis R., Heilbron J., Jones E., Woods G. *J. Chem. Soc.* 457, 1953.
- [5] Djerassi C., Lippman A. *J. Am. Chem. Soc.* 77, 1825, 1955.
- [6] Djerassi C., Thomas C., Mensimer H., *J. Am. Chem. Soc.* 77, 3579, 1955.
- [7] Elseviers' *Encyclopaedia of Organic Chemistry* tom 14, s. 1 — 933, 1941 i supplement. tom 14, s. 939 — 1346, New York 1952.
- [8] Guider J., Halsall T., Hodges R., Jones E. *J. Chem. Soc.* 3234, 1954.
- [9] Hagers *Handbuch der Pharmazeutischen Praxis*, Springer, Berlin 1949.
- [10] Karrer P., Jucker E., Krause E., *Helv. Chim. Acta* 30, 573, 1947.
- [11] Karrer P., Morf R., *Helv. Chim. Acta* 15, 863, 1932.
- [12] Karrer P., Notthaft L., *Helv. Chim. Acta* 15, 1196, 1932.
- [13] Karrer P., Rutschmann J., *Helv. Chim. Acta* 25, 1144, 1942.
- [14] Karrer P., Salomon H. *Helv. Chim. Acta* 13, 1063, 1930.
- [15] Kasprzykówna Z., *Prace Badawcze Główn. Inst. Chemii Przemysł.*, zeszyt 3 s. 39, 1951.
- [16] Koczwarą M. PAU, *Dissertationes Pharmaceuticae* 1, 63, 1949.
- [17] Koeffler L. *Die Saponine*, Wien 1927.
- [18] Kuhn R., Winterstein A., *Naturwiss.* 18, 754, 1930.
- [19] Kuhn R., Lederer E. *Z. physiol. Chem.* 200, 108, 1931.
- [20] Noller C., Smith R., Harris C., Walker J., *Am. Chem. Soc.* 64, 347, 1942.
- [21] Tschesche R., Fugmann R. *Ber.* 84, 810, 1951.
- [22] Thies H., Herrlinger F. *Pharmazie* 5, 119, 1950.
- [23] Winterstein A., *Z. physiol. Chem.* 199, 25, 1931.
- [24] Zechmeister L., Cholnoky L., *Z. physiol. Chem.* 203, 26, 1932.
- [25] Zechmeister L., Tuzson P. *Ber.* 63, 320, 1930.
- [26] Zechmeister L., Tuzson P. *Ber.* 67, 170, 1934.
- [27] Zimmermann J. *Helv. Chim. Acta* 24, 393, 1941.

ТРИТЕРПЕНОВЫЕ САПОНИНЫ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА COMPOSITAE

II. САПОНИНЫ ЦВЕТОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА (*HELIANTHUS ANNUUS*)

Резюме

1. Из сушеных цветов подсолнечника изолировано сырой сапонин и доказано его принадлежность к группе тритерпеновых сапонинов.
2. В кислом гидролизате сырого сапонина констатировано наличие трех родов моносахаридов: гексозы, пентозы и метилпентозы.
3. Из эфирного экстракта гидролизата изолировались две кислоты К и Т, отличающиеся как свойствами, так и химическим составом. Ориентировочный результат элементарного анализа указывает на то, что кислота К не принадлежит к группе тритерпенов.

4. Констатирован факт, что кислота Т является до настоящего момента не описанной, тритерпеновой диоксикислотой. Результат элементарного анализа пока не позволяет избрать одну из формул $C_{30}H_{48}O_4$ и $C_{31}H_{50}O_4$. Предлагается назвать Т-кислоту гелиантовой кислотой.

TRITERPENE SAPONINS OF PLANTS OF THE FAMILY *COMPOSITAE*

II. SAPONIN OF SUNFLOWER (*HELIANTHUS ANNUUS*)

Summary

1. Crude saponin was isolated from dried sunflowers and was shown to belong to the group of triterpene saponins.

2. It was established that acid hydrolysate of the crude saponin contained three types of sugars: hexose, pentose and methylpentose.

3. Two acids, K and T, differing in properties and composition were isolated from an ether extract of the hydrolysate. Preliminary results of elementary analysis indicated that acid K does not belong to the group of triterpenes.

4. It was established that acid T is a triterpene dihydroxy acid hitherto unknown. Results of elementary analysis make no decision possible between the formulae $C_{30}H_{48}O_4$ and $C_{31}H_{50}O_4$; the name of helianthic acid has been proposed for acid T.

Otrzymano 18.1. 1956 r.

J. NOWORYTKO i M. SARNECKA-KELLER

CHROMATOGRAFICZNA ANALIZA AMINOKWASÓW WYDALANYCH Z MOCZEM

*Z Zakładu Chemii Fizjologicznej A. M. w Krakowie
Kierownik Zakładu prof. dr B. Skarżyński*

Obecność różnych aminokwasów w moczu osobników prawidłowych jest faktem znanym od dawna, a może jeszcze dawniej znane jest pojawianie się dużej ilości pewnych aminokwasów w moczu przypadków patologicznych, jak np. żółty, ostry zanik wątroby, cystynuria itd. Trudności, na jakie napotykało dawniej identyfikowanie poszczególnych aminokwasów w moczu, a tym bardziej ich ilościowe oznaczanie, uniemożliwiały rozleglejsze badania nad problemem fizjologicznej i patologicznej aminoacydurii. Dopiero zastosowanie nowoczesnej, subtelnej techniki analitycznej pozwoliło postawić to zagadnienie na szerszej zakreślonej płaszczyźnie doświadczalnej.

Pierwsze systematyczne badania dotyczące jakości i ilości aminokwasów w moczu przeprowadzone były przy zastosowaniu metod mikrobiologicznych [10, 11, 23, 29]. Trudności, z jakimi połączone jest stosowanie tych metod, ograniczały zasięg badań i wykluczały całkowicie rutynowe badania kliniczne. O wiele rozleglejsze możliwości otwierało zastosowanie chromatografii, i to zarówno chromatografii bibułowej, jak i kolumnowej. Dopiero wykorzystanie tej metodyki stworzyło podstawy do systematycznych badań nad zagadnieniem aminoacydurii u człowieka, wykazując równocześnie zawłość samego problemu fizjologicznego, jak i wartość tego typu badań dla celów klinicznych. Szczególnie chromatografia bibułowa w postaci postępowania dwukierunkowego stała się podstawową metodą badawczą.

Chromatografia bibułowa mieszaniny aminokwasów zawartych w moczu wiąże się jednak z pewnymi szczególnymi trudnościami, jakich nie spotykamy przy analizie mieszaniny czystych aminokwasów lub też produktów hydrolizy białka. Badając mocz mamy do czynienia z bardzo rozcieńczonym roztworem aminokwasów (przeciętna ilość dobową 0,5—1,0 g), któ-

re.nu towarzyszy bardzo duża ilość jonów nieorganicznych oraz inne składniki organiczne, zawierające azot. Te substancje towarzyszące aminokwasom w moczu zmieniają wartości R_f aminokwasów i zdecydowanie zacierają granice plam odpowiadających poszczególnym aminokwasom. Toteż podstawowym warunkiem przeprowadzania chromatograficznej analizy aminokwasów występujących w moczu jest jego należyte odsolenie oraz zredukowanie do minimum wpływu innych niż aminokwasy organicznych składników. Ten techniczny problem utrudnia zresztą analizę składu aminokwasowego wszystkich płynów pochodzenia biologicznego. Co prawda niektórzy autorzy [9] używają do chromatografii bibułowej płynów pochodzenia biologicznego bez uprzedniego odsalania, twierdząc, że domieszka soli nieorganicznych w niezbyt dużych ilościach nie wywiera większego wpływu na obraz chromatogramu. Większość jednak autorów, zainteresowanych tym zagadnieniem jest przeciwnego zdania.

Trudności związane z odsalaniem płynów biologicznych są tak poważne, że opracowano metody eliminujące wpływ soli nieorganicznych bez stosowania bezpośredniego procesu odsalania. P. Decker i współpracownicy [8] postępują w ten sposób, że przeprowadzają równoległe analizy chromatograficzne standardowego roztworu czystych aminokwasów, mieszaniny tego roztworu z moczem oraz samego moczu. Ten sposób postępowania ma pozwolić na określenie wpływu soli nieorganicznych na wartości R_f aminokwasów w badanym moczu. Sądząc jednak z opisu tej metody, jest ona nawet bardziej zawiła, niż inne metody, opierające się na chromatografii moczu uprzednio odsolonego. Zresztą nasze osobiste doświadczenie poucza nas, że zawarte w moczu stężenie soli nieorganicznych z reguły do tego stopnia zamazuje obraz chromatogramu, że odcyfrowanie plam odpowiadających poszczególnym aminokwasom często staje się niemożliwe.

W początkowych etapach rozwoju techniki chromatograficznej odsalanie płynów biologicznych przeprowadzano przy pomocy elektrodializy [7]. Pomijając konieczność dysponowania odpowiednią aparaturą, ten sposób odsalania jest niedogodny z powodu konieczności stosowania dużych objętości badanego płynu oraz ze względu na znaczne straty ilościowe niektórych aminokwasów, szczególnie argininy. Pierwotną metodę elektrodializy dla przygotowania płynów do chromatografii usiłowano zmodyfikować i ulepszyć [1, 2], nie uzyskując jednak zadowalających wyników. Dla małych objętości płynu próbowano zastosować odsalania za pomocą elektroforezy [3].

Nowe perspektywy analizy chromatograficznej płynów pochodzenia biologicznego otworzyło zastosowanie wymienników jonowych. W ostatnich latach pojawił się szereg publikacji opisujących różnorodne sposoby

postępowania, zmierzające do przygotowania roztworu, który ma być podany chromatografii. Największą trudność stanowi dobór odpowiedniego wymiennika, pozwalającego na oddzielenie nieorganicznych jonów od amfoterycznych aminokwasów. Omówimy w krótkości te sposoby postępowania, które znajdowały zastosowanie przy analizie składu aminokwasowego płynów pochodzenia biologicznego.

Posługiwano się kolejnym stosowaniem słabego anionitu i słabego kationitu [6]. Metoda ta jest jednak zbyt czasochłonna ze względu na konieczność wielokrotnego powtarzania procesu przepuszczania badanego płynu przez kolumny z adsorbentem, a poza tym połączona jest ze zbyt dużą stratą aminokwasów obojętnych, pomijając już to, że nie daje się zastosować do roztworów zawierających aminokwasy kwaśne i zasadowe.

Stosowano również wymienniki silnie zasadowe z czynnymi grupami wodorotlenowymi i dwuwęglanowymi [21]. Metoda ta pozwala na całkowite usunięcie nieorganicznych anionów i kationów z roztworów, ale prowadzi do poważnych strat aminokwasów zasadowych. Arginina jest zupełnie nieuchwytna przy tym sposobie postępowania, a lizynę odzyskuje się tylko częściowo.

Najdogodniejszą metodą okazało się zastosowanie silnie kwaśnych wymienników. Wymienniki te przepuszczają aniony, zatrzymując całkowicie kationy i wszystkie aminokwasy. Stosując z kolei odpowiedni eluent można wypłukać aminokwasy i uzyskany w ten sposób roztwór poddać następnie chromatograficznej analizie na bibule. Szczególnie rozbudował ten sposób postępowania S. M. Partridge [17, 18, 19, 20], opracowując metodę analizy hydrolizatów białka. Badał różne rodzaje wymienników stwierdzając, że najdogodniejszymi są żywice polistyrenowe, zawierające jako grupę czynną jedynie grupę $-\text{SO}_3\text{H}$. Zasadniczo jednak we wszystkich swych pracach posługuje się wymiennikiem Zeo-Karb 215, który jest żywicą fenolową z czynnymi grupami $-\text{OH}$ i $-\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$. Po uwolnieniu analizowanej mieszaniny aminokwasów od anionów nieorganicznych, polegającym na przepuszczeniu jej przez kolumnę z wymiennikiem, wypłukuje następnie Partridge aminokwasy z wymiennika rozcieńczonym roztworem amoniaku, rozdzielając wyciek na 7 kolejno po sobie następujących frakcji, z których każda zawiera kilka odmiennych aminokwasów. Aminokwasy w poszczególnych frakcjach zostają zidentyfikowane przy pomocy dwukierunkowej chromatografii.

Sposób postępowania opracowany przez Partridge'a został przyjęty z nieznacznymi modyfikacjami przez innych autorów. Pozwala on istotnie uchwycić wszystkie aminokwasy występujące w badanym płynie, a nawet określić ilościowo aminokwasy zawarte w każdej z pojedynczych

frakcji. Właśnie możliwość ilościowego ujmowania wyników analizy stanowi największą zaletę tej metody. Co prawda ilościowa analiza aminokwasów w moczu daje się najdokładniej przeprowadzić za pomocą znanej metody Steina i Moore'a, polegającej na użyciu kolumn adsorpcyjnych ze skrobią [24, 25] lub żywicami polistyrenowymi [26] i rozdzielaniu badanej mieszaniny na dziesiątki lub setki frakcji, ale skomplikowana aparatura i czasochłonność tego sposobu postępowania wyklucza jej stosowanie do badań masowych.

Jak już o tym była mowa powyżej, zasada, na której opiera się metoda Partridge'a, z drobnymi modyfikacjami używana jest dziś powszechnie przy wszystkich badaniach nad aminoacydurią. Mimo że w porównaniu z dawniejszymi metodami metoda Partridge'a jest o wiele dokładniejsza, to zastosowanie jej do celów klinicznych napotyka na duże trudności, szczególnie wówczas, gdy zachodzi konieczność wykonania większej ilości analiz i to w możliwie krótkim czasie. Niemalym utrudnieniem jest konieczność używania chromatografii dwukierunkowej i to stosowanej siedmiokrotnie, dla 7 frakcji aminokwasowych, uzyskanych z jednego badanego płynu.

Dogodność chromatograficznej analizy mieszaniny aminokwasów, jaką przedstawia opracowana przez nas metoda chromatografii jednokierunkowej przy użyciu izatyny i jej pochodnych dla różnicowania plam poszczególnych aminokwasów [16], skłoniła nas do prób odpowiednich modyfikacji zastosowania wymienników jonowych do przygotowania moczu, mającego być poddanym chromatografii. Chodziło nam o opracowanie możliwie prostej, taniej i łatwej do zastosowania metody, która pozwoliłaby na jakościową analizę składu aminokwasowego moczu w warunkach laboratorium klinicznego. Poniżej przedstawiamy wyniki naszych badań oraz opis opartej na nich metody.

Część doświadczalna

Doświadczenia nasze miały na celu wyjaśnienie dwóch zasadniczych punktów. Pierwszym z nich była sprawa ewentualnego wpływu jonów nieorganicznych i składników organicznych moczu na przebieg jednokierunkowej chromatografii bibułowej mieszaniny aminokwasów. Pragnęliśmy sprawę tę wyświecić, gdyż jak już wspomniano, niektórzy autorzy [9] poddają mocz dwukierunkowej analizie chromatograficznej bez zastosowania uprzednich zabiegów. Ponieważ stwierdziłyśmy, że odsolenie moczu jest niezbędne dla przeprowadzenia jednokierunkowej chromatografii aminokwasów, postawiłyśmy sobie jako drugie zadanie wyszukanie najprostszej metody przygotowania moczu do tego sposobu postępowania.

1. WPŁYW NIEORGANICZNYCH I ORGANICZNYCH SKŁADNIKÓW NA CHROMATOGRAMY MIESZANIN AMINOKWASÓW

Poddawaliśmy analizie chromatograficznej następujące roztwory:

- a) mieszanina standardowa aminokwasów (cysteina, lizyna, arginina, glikokol, alanina, tryptofan, walina, leucyna),
- b) mieszanina standardowa aminokwasów + mocznik,
- c) mieszanina standardowa aminokwasów + kwas moczowy,
- d) mieszanina standardowa aminokwasów + kreatynina,
- e) mieszanina standardowa aminokwasów + NaCl + KCl.

Chromatografię przeprowadzano jednokierunkowo na krążkach i paskach w układzie n-butanol + CH₃COOH + H₂O (w stosunku 4 : 1 : 5), posługując się papierem Whatmana Nr 1 i wybarwiając plamy aminokwasów izatyną wg poprzednio podanej metody [16]. Mocznik wykrywano odczynnikami Ehrlicha (aldehyd p-dwumetyloaminobenzoesowy) [12], kreatyninę odczynem Jaffego (kwas pikrynowy) [14], kwas moczowy próbą redukcyjną oraz metodą Markhama przy użyciu światła pozafioletkowego [13].

Postępując w ten sposób stwierdzono, że ani mocznik (w warunkach chromatografii krążkowej $R_f = 0,47$), ani kreatynina ($R_f = 0,40$), ani kwas moczowy ($R_f = 0,26$) nie wpływają na obraz chromatogramu mieszaniny aminokwasów. Natomiast obecność soli nieorganicznych powoduje zatarcie granic plam aminokwasów i ich przemieszczenie, szczególnie w odcinku odpowiadającym R_f 0,1 — 0,26, w warunkach doświadczeń przez nas wykonywanych.

Te wstępne badania wykazały nam, że posługiwanie się chromatografią jednokierunkową dla analizy aminokwasów bez uprzedniego odsolenia moczu jest niemożliwe.

2. WYEBÓR WYMIENNIKA

Próby zastosowania Amberlitu IRC-50 oraz kationitu, uzyskanego z firmy Leight (bez określonego bliższego charakteru wymiennika), do wiązania nieorganicznych kationów w mieszaninach standardowych oraz w moczu skończyły się niepowodzeniem. Dlatego nie podajemy ich opisu.

Opierając się na danych z literatury zwróciliśmy uwagę na żywice polistyrenowe. Westall [27, 28] używa do odsalania moczu Zeo-Karb 215, ale Partridge w swych pracach podkreśla jednak równocześnie ujemny wpływ grup fenolowych, tkwiących w tym wymienniku, na proces wymywania zasadowych aminokwasów. W metodzie stosowanej przez Westalla aminokwasy zasadowe w ogóle nie są wykrywane. Zdecydowaliśmy się więc na użycie wymiennika Zeo-Karb 225, w którym nie ma grup fenolowych, a grupy czynne są reprezentowane jedynie przez reszty — SO₃H.

Próby zatrzymywania poszczególnych aminokwasów przez Zeo-Karb 225 przeprowadzaliśmy w następujący sposób: mieszaniny różnych kombinacji 8—10 aminokwasów, zawierające w 1 ml roztworu 0,26 mg N aminokwasowego, przepuszczaliśmy przez kolumnę wypełnioną wymiennikiem, postępując wg sposobu, który opiszemy poniżej. Stwierdziłyśmy, że tylko tauryna nie jest zatrzymywana przez Zeo-Karb 225, co pokrywa się z wynikami Priora i Whitehead'a [22], którzy posługiwali się tym wymiennikiem dla analizy aminokwasów w płynie mózgowodzeniowym i Boulanger'a i Bisserte'a [4, 5], którzy używali wymiennika Permutyt 50, będącego również żywicą polistyrenową z czynnymi grupami — SO_3H .

3. ZACHOWANIE SIĘ MOCZNIKA, KWASU MOCZOWEGO I KREATYNINY NA KOLUMNIE Z ZEO-KARB 225

Odpowiednie próby ze składnikami azotowymi moczu dodawanymi do wzorcowej mieszaniny aminokwasów wykazały, że:

1) kwas moczowy przechodzi przez kolumnę z Zeo-Karb 225 niemal całkowicie; drobna jego ilość pozostaje na kolumnie, ale wymywa się o wiele łatwiej niż aminokwasy;

2) inną sytuację zaobserwowano odnośnie mocznika i kreatyniny. Oba te związki zostają zatrzymane przez Zeo-Karb 225, ale również nieco łatwiej ulegają wymyciu od aminokwasów, przy czym jednak kreatynina okazuje silniejsze powinowactwo do wymiennika niż mocznik.

4. ODSALANIE WZORCOWEJ MIESZANINY AMINOKWASÓW

Przygotowano wzorcową mieszaninę 12 różnych aminokwasów zawierającą kationy Na^+ i K^+ . Przy przygotowaniu tej mieszaniny nie dodawałyśmy kationów Ca^{++} i Mg^{++} , licząc się z tym, że są one silniej wiązane przez żywicę. Aniony były reprezentowane jedynie przez Cl^- .

Skład wzorcowej mieszaniny odpowiadał w przybliżeniu składowi moczu wykazując zawartość:

767 mg % azotu (ozn. met. Kjeldahla, w tym 27% N aminowego, oznaczanego metodą van Slyke'a),

1548 mg % Cl^- (ozn. met. Volharda)

725 mg % Na } (ozn. za pomocą fotometru płomieniowego).
458 mg % K }

5 ml mieszaniny wzorcowej wprowadzono na kolumnę z Zeo-Karb 225, przygotowaną według sposobu niżej podanego. Ustalono szybkość przepływu cieczy, odpowiadającą 8 — 10 kropli na minutę. Po ukończeniu przepływu roztworu wzorcowego kolumnę przemyto 25 ml H_2O bi-

dest. Wycieki zebrano w kolbce miarowej, uzupełniając je do 50 ml przy pomocy H_2O . Uzyskany w ten sposób roztwór badano na zawartość azotu, Cl^- , K^+ i Na^+ . Wyniki podane są w tabl. 1.

Tablica 1

Ilość substancji w mg	Kolumna					
	1	2	3	4	5	6
N	—	—	—	—	—	—
Cl^-	77,36	77,98	76,98	77,00	77,45	77,60
Na^+	—	—	—	—	—	—
K^+	—	—	—	—	—	—

Jak z danych w tabl. 1 wynika, w wycieku otrzymanym w powyżej opisany sposób uzyskuje się całkowicie anion chlorkowy, natomiast kationy i związki azotowe zostają zatrzymane na kolumnie wymiennikowej.

5. WYMYWANIE AMINOKWASÓW Z KOLUMNY

Dane z literatury podają dotychczas 2 sposoby wymywania aminokwasów zatrzymywanych na kolumnach wymienników polistyrenowych. Jednym z nich jest użycie HCl [15], drugim — użycie amoniaku.

Stosowanie kwasu solnego wymaga doboru odpowiedniego stężenia tego odczynnika, przy którym zostałyby wypłukane wyłącznie aminokwasy bez równocześnie zaadsorbowanych kationów. Natomiast użycie amoniaku zamiast kwasu solnego ma tę wyższość, że nawet duże stężenie tego odczynnika nie doprowadza do wypłukiwania kationów. Poza tym o wiele łatwiej jest odpędzić z roztworu amoniak niż kwas solny. Partridge i współpracownicy [17, 18, 19] używają amoniak w stężeniu 0,14 — 0,2 n, usuwając w ten sposób z kolumny adsorpcyjnej wolne od kationów aminokwasy, jednak bez aminokwasów zasadowych. Boulanger [4,5] i Prior [22] posługują się 1 n amoniakiem, wypłukując wszystkie aminokwasy, z poważnymi stratami jednak aminokwasów zasadowych.

Zdecydowaliśmy się na użycie 2 n amoniaku w objętości 25 ml, wylukując w ten sposób wszystkie aminokwasy i uzyskując równocześnie małe objętości płynu, nie sprawiające trudności przy dalszych manipulacjach.

Uzyskany przy użyciu 25 ml 2 n amoniaku wyciek odparowaliśmy w próżni w temperaturze 37°C do suchości. W celu całkowitego usunięcia amoniaku proces zagęszczenia przeprowadzaliśmy 3-krotnie, stosując w ramach zestawu pompy próżniowej dodatkową płuczkę ze stężonym H₂SO₄. Pozostałość rozpuszczoną w 0,5 ml H₂O bidest. badaliśmy na zawartość kationów (używając fotometru płomieniowego) i na zawartość azotu oznaczanego metodą mikro-Kjeldahla. Wyniki tych prób podaje tabl. 2.

Tablica 2

Ilość substancji w mg	Kolumna					
	1	2	3	4	5	6
N	40,01	38,25	38,10	37,67	39,00	38,05
Na ⁺	—	—	—	—	—	—
K ⁺	—	—	—	—	—	—

Otrzymany w powyższy sposób roztwór poddawaliśmy chromatografii stosując zarówno chromatogram krążkowy, jak i chromatografię na pasku wstępującym, rozwijaną w układzie butanol-CH₃COOH-H₂O, i barwiąc plamy aminokwasowe izatyną. Uzyskane w ten sposób chromatogramy pokrywały się dokładnie z chromatogramem wzorcowej mieszaniny aminokwasów, wolnej od domieszki soli nieorganicznych i innych związków azotowych. Jedyne intensywność plam aminokwasów zasadowych była nieco mniejsza.

Ponieważ założenia teoretyczne i wyniki naszych wstępnych badań nasuwały przypuszczenie, że przy zastosowanym przez nas postępowaniu część aminokwasów zasadowych nie zostaje wylukana z kolumny wypełnionej wymiennikiem, zawartość kolumny potraktowanej w sposób uprzednio opisany zadawaliśmy 5 ml 2 n amoniaku na przeciąg 10 godzin, po czym przemywaliśmy niewielką ilością wody. Uzyskany w ten sposób wyciek z kolumny zagęszczaliśmy i badaliśmy w sposób wyżej opisany. Okazało się, że otrzymany płyn zawiera N w ilościach nie dających

się wykazać mikro-Kjeldahlem, a na chromatogramie daje ledwo dostrzegalne plamy, odpowiadające aminokwasom zasadowym.

Te wstępne badania przekonały nas, że możliwe jest uwolnienie mieszaniny aminokwasów i innych najważniejszych składników moczu od nieorganicznych kationów i anionów, co w rezultacie zezwala na jednowymiarową jakościową analizę mieszaniny aminokwasów. Poniżej podajemy bardziej szczegółowe sposoby postępowania, które zastosowaliśmy z powodzeniem do analizy składu aminokwasowego moczu.

6. POSTĘPOWANIE PRZY JAKOŚCIOWEJ ANALIZIE AMINOKWASOWEGO SKŁADU MOCZU

Do odsolenia moczu używamy kolumny wypełnionej żywicą Zeo-Karb 225, która znajduje się w handlu w postaci soli sodowej o wielkości ziarn 16—50 czepek (mesh). Przed użyciem żywica zostaje zaktywowana przez zadanie dwukrotną objętością 10% HCl na przeciąg 1—2 godzin z wstrząsaniem od czasu do czasu.

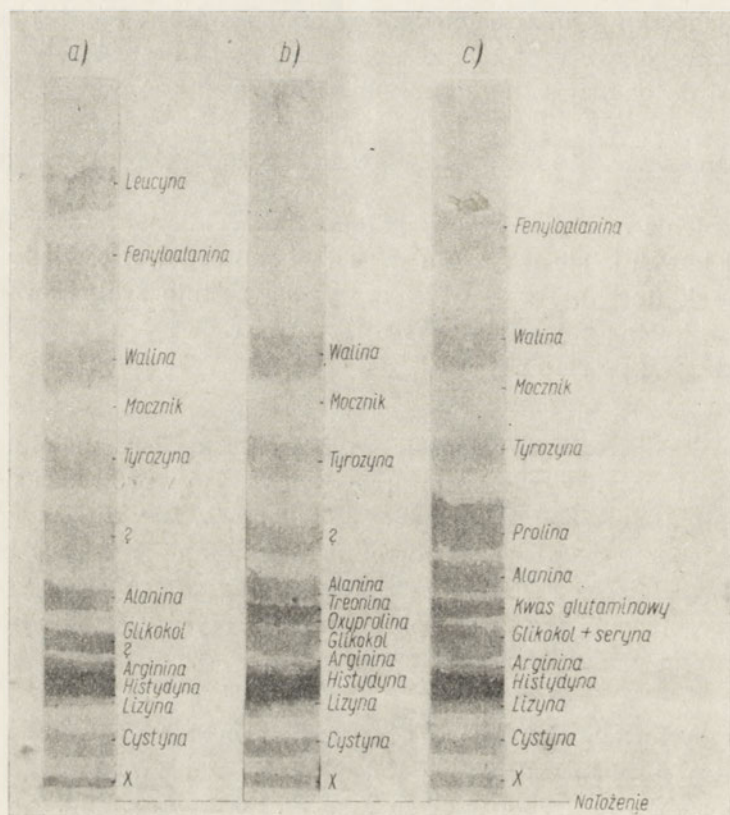
Kolumną jest rura szklana o średnicy 0,6 cm, długości 35 cm, zaopatrzona u dołu w kurek ze szlifem. Rura ta zawiera u dołu warstwę odtłuszczonej waty. Wypełnia się ją wodą, po czym wprowadza się do niej żywicę małymi porcjami, jako zawiesinę w wodzie. Aby umożliwić równomierne układanie się ziarn wymiennika w kolumnie i usunąć bańki powietrza, wypełnienie kolumny przeprowadzamy przy stałym przepływie wody. Przygotowaną w ten sposób kolumnę przechowuje się stale w stanie wilgotnym przez utrzymywanie poziomu wody ponad górną warstwą żywicy.

Dla przeprowadzenia odsolenia moczu nalewa się na powierzchnię warstwy żywicy 5 ml moczu, ustalając szybkość przepływu cieczy przez kolumnę równą 8—10 kropeł w ciągu minuty. Po ukończeniu wypływu moczu kolumna zostaje przemyta 25 ml H₂O bidest.

Z kolei zostaje doprowadzone do kolumny 25 ml 2 n amoniaku. Wyciekający roztwór zebrany do kolby zostaje odparowany w próżni do suchości w temp. 37°. Dla całkowitego usunięcia amoniaku dodaje się do suchej pozostałości wodę i ponownie odparowuje w próżni. Zabieg ten jest powtarzany trzykrotnie. Pozostałość rozpuszczoną w 0,5 ml H₂O bidest. używa się do przeprowadzenia chromatografii.

Regenerację kolumny przeprowadza się przepuszczając przez warstwę wymiennika 50 ml 10% HCl z szybkością 8—10 kropeł/min. Nadmiar kwasu solnego zostaje usunięty przez H₂O, przepuszczaną przez kolumnę aż do chwili zaniku reakcji na jon Cl⁻. Ten sposób regeneracji jest wystarczający do odzyskania pierwotnej aktywności kolumny.

Rys. 1 przedstawia schematy chromatogramów
 a — moczu prawidłowego
 b — moczu kobiety w dziewiątym miesiącu ciąży
 c — moczu dziecka dziewięciomiesięcznego, cierpiącego na dystrofię.



Rys. 1

W każdym przypadku chromatografii poddawano około 10 μ l moczu odsolonego, zagęszczonego 10-krotnie, a więc ilość odpowiadającą 0,1 ml moczu pierwotnego.

Zaznaczyć należy, że chromatogramy moczu prawidłowego przygotowane na materiale pochodzącym od kilkunastu dorosłych, zdrowych osób z reguły pokrywają się. Brak pewnych aminokwasów (proliny, treoniny, tryptofanu) wynika niewątpliwie stąd, że aminokwasy te w objętości moczu użytej do chromatografii występują w stężeniach nieuchwytnych dla używanej przez nas metody. Plamy zaznaczone znakiem zapytania odnoszą się do jakichś aminokwasów nie będących składnikiem białka, których wobec braku odpowiednich wzorców nie mogliśmy zidentyfikować.

Plamy zaznaczone x dają z izatyną typowe zabarwienia peptydów. Porównanie podanych na rys. 1 chromatogramów wykazuje wybitne wzmożenie ilości histydyny i treoniny w moczu ciężarnej oraz pojawienie się proliny i wolnego kwasu glutaminowego w moczu dziecka dystroficznego.

O wynikach zastosowań opracowanej przez nas metody do celów klinicznych doniesiemy w przygotowywanej, odrębnej pracy.

Za cenne uwagi i wskazówki składamy prof. dr B. Skarżyńskiemu serdeczne podziękowania.

Streszczenie

W celu przeprowadzenia analizy chromatograficznej składu aminokwasowego moczu normalnego i patologicznego opracowano metodę odsalania z zastosowaniem żywicy polistyrenowej Zeo-Karb 225. Przy przepuszczeniu przez kolumnę z wymiennikiem odpowiedniej ilości moczu zostają na niej zatrzymane wszystkie kationy nieorganiczne i aminokwasy, natomiast aniony nieorganiczne przechodzą swobodnie przez żywicę.

Aminokwasy zatrzymane na wymienniku eluuje się 2 n amoniakiem, który usuwa się następnie przez odparowanie roztworu do suchości pod próżnią. Po rozpuszczeniu suchej pozostałości w wodzie roztwór poddaje się jednowymiarowej analizie chromatograficznej wybarwiając plamy aminokwasów izatyną.

L I T E R A T U R A

- [1] Acker R., Jutisz M., Fromageot C., *Biochim. et Biophys. Acta* **8**, 442, 1952.
- [2] Astrup T., Stage A., Olsen E., *Acta Chim. Scand.* **5**, 1343, 1951. **6**, 1302, 1952.
- [3] Biserte G., Boulanger P., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **32**, 601, 1950.
- [4] Boulanger P., Biserte G., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **33**, 1930, 1951.
- [5] Boulanger P., Biserte G., Courtot F., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **34**, 366, 1952.
- [6] Brenner M., Frey R., *Helv. Chim. Acta* **34**, 1701, 1951.
- [7] Consdan R., Gordon A. H., Martin J. P., *Biochem. J.* **41**, 590, 1947.
- [8] Decker P., Riffart W., Wagner H., *Klin. Wochschr.* **29**, 418, 1951.
- [9] Dent C. E., *Lancet* **2**, 637, 1946.
- [10] Dunn M. S., Camien M. N., Shankman S., Block H., *Arch. Biochem.* **13**, 207, 1947.
- [11] Eckhardt R. D., Davidson C. S., *J. Clin. Invest.* **27**, 727, 1948.
- [12] Hais I. M., Macek K., *Papirova Chromatografie*. Praha, 1954.
- [13] Markham R., Smith J. D., *Nature* **163**, 250, 1949.
- [14] Maw G. A., *Nature* **160**, 261, 1947.

- [15] Mueller G. C., Bowman G., Herranen A., *Analyt. Chem.* **27**, 1357, 1955.
- [16] Noworytko J., Sarnecka-Keller M., *Acta Biochim. Pol.* **2**, 91, 1955.
- [17] Partridge S. M., Westall R. G., *Biochem. J.* **44**, 418, 1949.
- [18] Partridge S. M., Brimley R. C., *Biochem. J.* **44**, 513, 1949.
- [19] Partridge S. M., *Biochem. J.* **44**, 521, 1949.
- [20] Partridge S. M., Brimley R. C., *Biochem. J.* **51**, 628, 1952.
- [21] Piez K. A., Tooper E. B., Fosdick L. S., *J. Biol. Chem.* **194**, 669, 1952.
- [22] Prior A. P., Whitehead T. P., *Nature* **172**, 358, 1953.
- [23] Steele B. F., Sauberlich H. E., Reynolds M. S., Baumann C. A., *J. Nutr.* **33**, 209, 1947.
- [24] Stein W. H., Moore S., *J. Biol. Chem.* **176**, 337, 367, 1948.
- [25] Stein W. H., Moore S., *J. Biol. Chem.* **178**, 53, 1949.
- [26] Stein W. H., Moore S., *J. Biol. Chem.* **192**, 663, 1951.
- [27] Westall R. G., *Biochem. J.* **52**, 638, 1952.
- [28] Westall R. G., *Biochem. J.* **60**, 247, 1955.
- [29] Woodson H. W., Hier S. W., Salomon J. D., Bergeim O., *J. Biol. Chem.* **172**, 613, 1948.

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ АМИНОКИСЛОТ,
УДАЛЯЕМЫХ С МОЧЕЙ

Резюме

С целью провести хроматографический анализ аминокислотного состава нормальной и патологической мочи, авторы разработали метод высаливания, применяя полистироловую смолу Зео-Карб 225.

При пропускании соответственного количества мочи через колонку с обменителем, на ней задерживаются все неорганические катионы и аминокислоты, тогда как неорганические анионы свободно проходят через смолу.

Задержанные на обменителе аминокислоты элюируются 2 н аммиаком, устранимым затем путем полного выпаривания раствора в вакуум-аппарате.

После растворения сухого остатка в воде, раствор подвергают одномерному хроматическому анализу, обесцвечивая пятна аминокислот изатином.

CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF AMINO ACIDS ELIMINATED WITH URINE

Summary

In order to analyse chromatographically the amino acid composition of normal and pathological urine, a method of desalting was evolved using

polystyrene resin Zeo-Karb 225. When urine is passed through such a column, all inorganic cations and amino acids are retained in it while inorganic anions easily pass through the resin.

Amino acids retained in the exchanger are eluated with 2 N ammonia and the eluate is then vacuum dried. The dry residue is dissolved in water and analysed by one-dimensional chromatography. The amino acid spots are developed with isatin.

Otrzymano 21.1.1956 r.

M. GUMIŃSKA i M. ECKSTEIN

**PRZECIWKRZEPOWE DZIAŁANIE NAFTYLOWYCH
POCHODNYCH INDANDIONU-1,3^{*)}**

Z Zakładu Chemii Fizjologicznej A. M. w Krakowie, Kierownik prof. dr B. Skarżyński
i Zakładu Chemii Farmaceutycznej A. M. w Krakowie, Kierownik prof. dr A. Kocwa

Ostatnich kilka lat wzbogaciło arsenał syntetycznych związków chemicznych o działaniu przeciwwkrzepowym o grupę substancji, rokujących nadzieje na wielkie korzyści w praktyce klinicznej. Oprócz wielu pochodnych 4-hydroksykumaryny jak dwukumarol (wzór I), pelentan, cyklokuumarol, markumar i oprócz badanych przez Chmielewską pochodnych naftochinonowych [4], [5], [6], przedmiotem badań laboratoryjnych i klinicznych stały się pochodne indandionu-1,3 [9], [12], [13], jak np. 2-fenyloindandion-1,3 (FID) [1-3], [7-8], [14], [15], [17], [19-21], [26-29] i 2-dwufenyloacetyloindandion-1,3 [9-11], [25], [30]. Dotychczasowe dane przemawiają za tym, że preparaty grupy indandionu okazują w porównaniu z preparatami grupy kumaryny szybsze działanie i mniejszą toksyczność.

Mentzer i współpracownicy [15], [17], którzy w roku 1947 wprowadzili do praktyki leczniczej 2-fenyloindandion-1,3 (FID) (wzór IV), w roku 1953 opublikowali wyniki swoich badań nad wpływem 3- α -naftylo-4-hydroksykumaryny (α -NHK) (wzór II) na poziom protrombiny [16], [18], stwierdzając, że α -NHK okazuje znacznie silniejsze działanie przeciwwkrzepowe niż 3-fenylo-4-hydroksykumaryna (wzór III). Autorzy ci sformułowali wniosek, iż zdolność pełnienia roli antywitaminu K przez syntetycznie otrzymane związki jest w dużej mierze zależna od symetrii cząsteczki. Większa ogólna symetria cząsteczki α -NHK w porównaniu z 3-fenylo-4-hydroksykumaryną ma warunkować — zdaniem tych autorów — silniejsze biologiczne działanie.

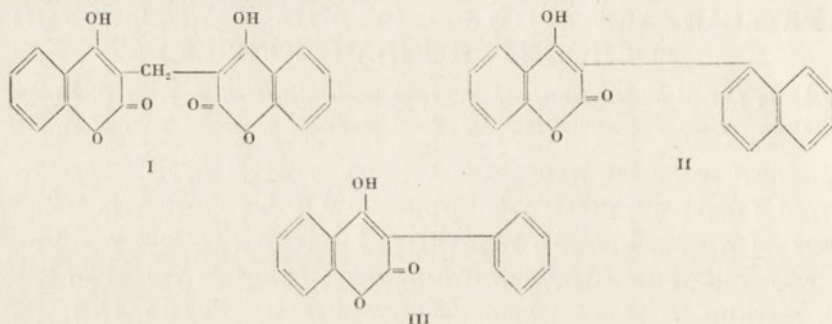
Dla sprawdzenia tego wniosku jeden z autorów niniejszej pracy otrzymał syntetycznie 2-naftyłowe pochodne indandionu-1,3, tj.: 2- α -naftyloindandion-1,3 (α -NID) (wzór V) oraz 2- β -naftyloindandion-1,3 (β -NID) (wzór VI)¹. Cząsteczki tych dwóch związków, zbudowane z dwóch układów dwupierścieniowych, posiadają strukturę z wyraźniej zaznaczoną sy-

^{*)} Praca była referowana na Konferencji PAN i P.T.Ch. na temat leku syntetycznego (Gdańsk, X. 1954).

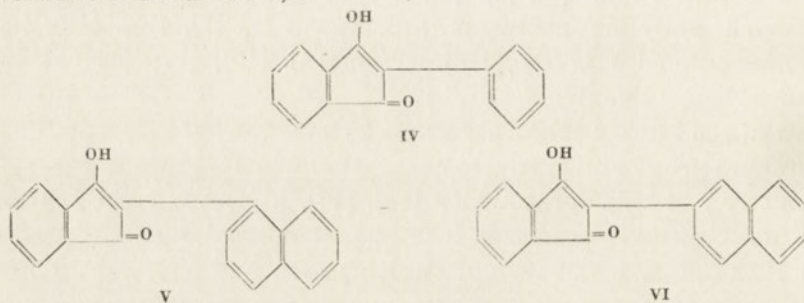
¹ Część chemiczna opublikowana będzie oddzielnie (M. Eckstein, A. Kocwa — w druku. Praca była referowana na Konferencji P.A.N. i P.T.Ch. na temat leku syntetycznego (Gdańsk X. 1954 r.).

metrią niż w przypadku FID, w swej symetrii są zbliżone do α -NHK i do dwukumarolu, wobec czego należałoby się spodziewać, że będą okazywały wybitne działanie przeciwzakrzepowe.

Pochodne 4-hydroksykumaryny:



Pochodne indandionu-1,3:



Poniżej przedstawione badania miały na celu określenie siły działania antyprotrombinowego obu wyżej wymienionych pochodnych naftyłowych indandionu i rozpatrzenie wyników z punktu widzenia hipotezy Mentzera.

Metody

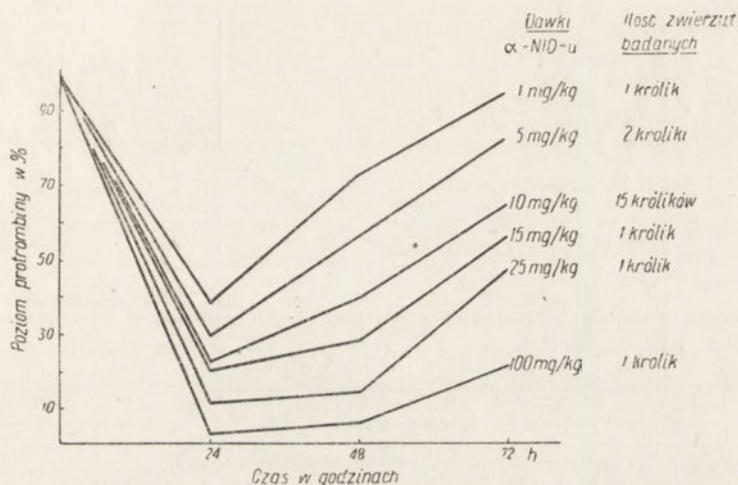
Badania przeprowadzono na królikach o wadze 2—3 kg, karmionych zwykłą paszą. Badane preparaty podawano doustnie w postaci zawiesiny w oleju arachidowym, w dawkach przeliczonych na kg wagi ciała. Oznaczano poziom protrombiny według jednostopniowej metody Quicka [22], [23], [24] na osoczu nierozcieńczonym, posługując się tromboplastyną sporządzoną z mózgów króliczych, w sposób podany przez tegoż autora. Krew do oznaczeń pobierano z żyły brzeżnej ucha królika, używając 0,1 M szczywanu sodu w stosunku 1 : 9. Procentową zawartość protrombiny obliczano jako średnią z pięciu pomiarów według krzywej wzorcowej Quicka na podstawie określenia czasu protrombiny wyrażonego w sekundach.

W celu ustalenia okresu maksymalnego działania preparatu i szybkości powrotu krzepnięcia do normy, oznaczano poziom protrombiny po 6, 12, 24, 48, 72 i 96 godz., potem wyłącznie po 24, 48 i 72 godz.

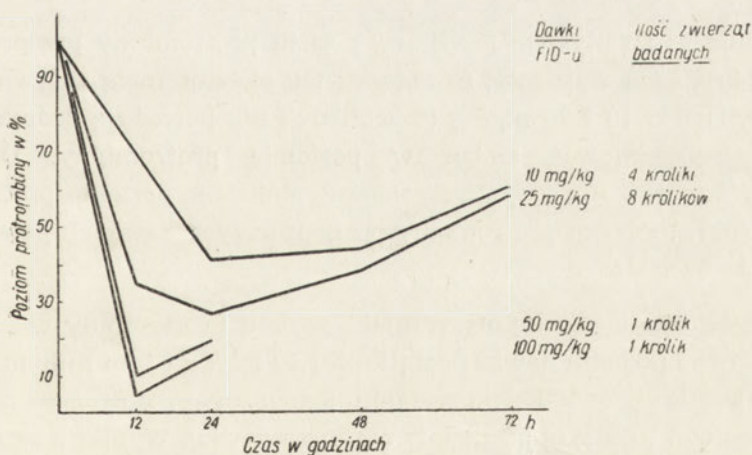
Badanie stopnia kumulacji α -NID w organizmie królika przeprowadzono, podając jako pierwszą dawkę 10 mg/kg, a następnie co 24 godz. 1/5 — 1/2 dawki początkowej przez okres 3—7 dni.

Wyniki

Rysunki 1 i 2 przedstawiają wyniki badań nad wpływem jednorazowego podawania różnych dawek α -NID i FID na poziom protrombiny.

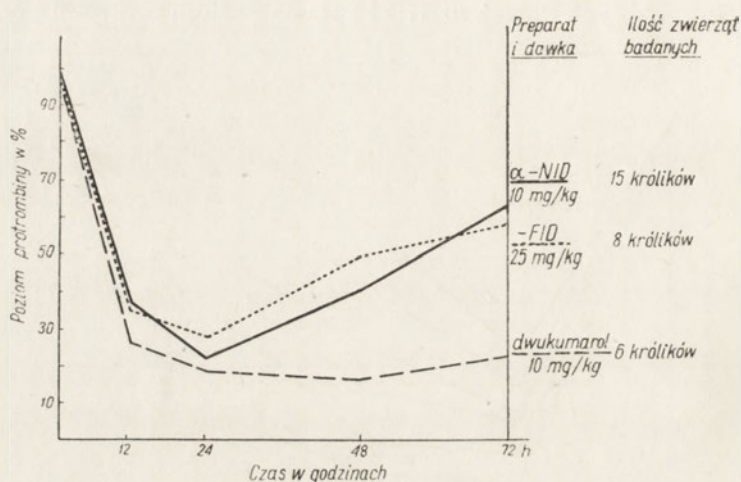


Rys. 1. Procentowa zawartość protrombiny po różnych dawkach 2- α -naftyloindandionu-1,3, podanych jednorazowo



Rys. 2. Procentowa zawartość protrombiny po różnych dawkach 2-fenyloindandionu-1,3, podanych jednorazowo

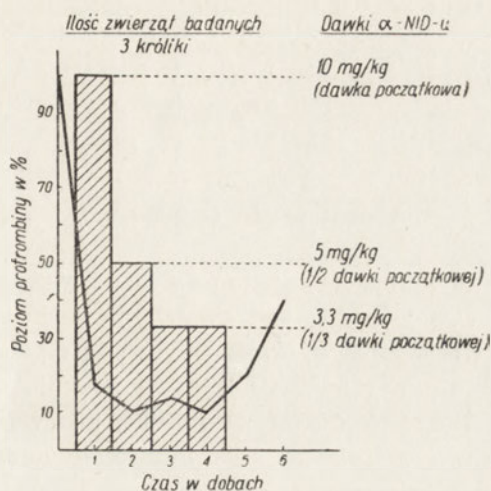
Rysunek 3 przedstawia porównawczo wpływ α -NID, FID i dwukumarolu na poziom protrombiny po jednorazowym podaniu w dawkach wywołujących w przybliżeniu ten sam efekt. Zaobserwowane przez nas wyniki działania FID i dwukumarolu zgodne są z danymi z literatury.



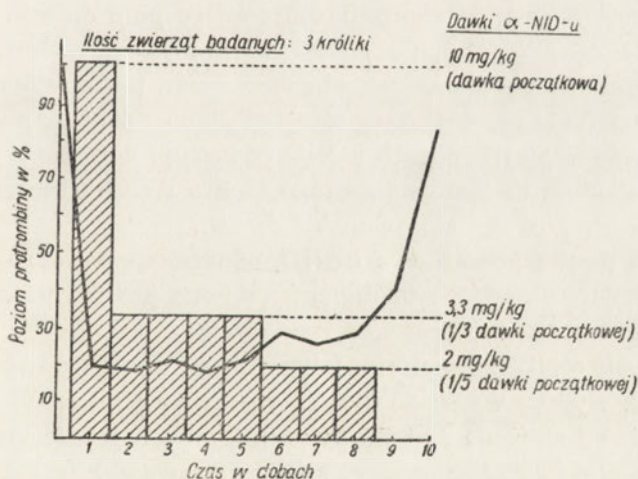
Rys. 3. Porównanie procentowej zawartości protrombiny po jednorazowym podaniu 2- α -naftyloindandionu-1,3 (α -NID), 2-fenylindandionu-1,3 (FID) i dwukumarolu w dawkach o zbliżonej sile działania

Badania nad wpływem β -NID na poziom protrombiny przeprowadzane na 8 królikach wykazały, że związek ten okazuje małą aktywność biologiczną. Dawki 10 i 30 mg/kg (6 królików) nie powodują żadnych dających się zaobserwować zmian w poziomie protrombiny. Dawki 80 i 100 mg/kg powodują jedynie nieznaczne obniżenie poziomu protrombiny (do 60—70%). Poziom protrombiny po tych dużych dawkach powracał do normy po 48 godz.

Pragnąc ustalić dawkę otrzymującą poziom protrombiny w granicach około 20% po podaniu dawki początkowej 10 mg/kg i tym samym określić stopień kumulacji α -NID, po podaniu jednorazowej dawki początkowej, podawano co 24 godz. odpowiednio mniejszą dawkę. Wyniki 2 serii badań, przeprowadzonych w każdym przypadku na 3 królikach, podają krzywe zaznaczone na rys. 4 i 5.



Rys. 4. Zawartość procentowa protrombiny po codziennym podawaniu różnych dawek 2- α -naftyloindandionu-1,3. Diagramy obrazują wielkość stosowanych dawek. Na tle diagramów krzywa rysuje zachowanie się poziomu protrombiny w 24 godz. po podaniu odpowiedniej dawki



Rys. 5. Zawartość procentowa protrombiny po codziennym podawaniu różnych dawek 2- α -naftyloindandionu - 1,3.

Diagramy obrazują wielkość stosowanych dawek. Na tle diagramów krzywa rysuje zachowanie się poziomu protrombiny występujące w 24 godz. po podaniu odpowiedniej dawki

Toksyczność dla myszy po podskórnym podaniu roztworu soli sodowych badanych preparatów przedstawia się następująco:²

DL ₅₀ — α -NID	160 mg/kg (wyniki z 44 myszy)
DL ₅₀ — FID	140 mg/kg (wyniki z 40 myszy)
DL ₅₀ — dwukumarolu	130 mg/kg (wyniki z 36 myszy)

Omówienie wyników

2- α -Naftyloindandion-1,3 wykazując wyraźny wpływ na poziom protrombiny już w dawce 1 mg/kg jest związkiem cechującym się wybitną aktywnością przeciwzakrzepową, obdarzonym siłą działania leżącą w rzędzie aktywności dwukumarolu. Jednorazowe podanie doustne 10 mg/kg α -NID powoduje w przybliżeniu ten sam efekt, jaki wywołuje identyczna dawka dwukumarolu, a w porównaniu z 2-fenyloindandionem-1,3 okazuje aktywność 3—5 razy silniejszą. Efekt biologiczny po podaniu α -NID ujawnia się już po upływie 6—12 godz., przy czym maksymalne obniżenie poziomu protrombiny występuje po upływie 24 godz. Pod tym względem α -NID wykazuje analogię do FID, w przeciwieństwie do dwukumarolu i innych pochodnych 4-hydroksykumaryny, powodujących maksymalny efekt dopiero po 48 godz. Po jednorazowej dawce doustnej powrót poziomu protrombiny do normy występuje przy zastosowaniu α -NID i FID po 4—5 dniach, natomiast po dwukumarolu dopiero po 8 dniach.

2- α -Naftyloindandion-1,3, podobnie jak inne syntetyczne preparaty tego typu kumuluje się w organizmie zwierzęcym, na co wskazuje utrzymywanie się działania przez dłuższy okres czasu oraz fakt, że podany w kilku po sobie następujących dniach α -NID powoduje narastanie efektu biologicznego względnie utrzymywanie tego efektu na tym samym poziomie w zależności od wysokości stosowanych dawek.

Optymalną dawką początkową α -NID, obniżającą poziom protrombiny do około 20%, jest dawka 8—10 mg/kg, a dawką podtrzymującą 1/3—1/5 dawki początkowej, tj. 2—3 mg/kg.

Z porównania α -NID ze znanymi lekami przeciwzakrzepowymi, jak FID i dwukumarol, wynika wyższość α -NID, wyrażająca się w tym, że działanie jego ilościowo zbliżone jest do dwukumarolu, a jakościowo (szybkość występowania efektu biologicznego i czas jego trwania) do FID. Poza tym α -NID cechuje się nieco mniejszą toksycznością. Wpływ tego związku na poziom protrombiny jest równomierny i pozwala na utrzymanie efektu terapeutycznego przy pomocy niewielkich dawek podtrzymujących.

² Szczegółowe dane odnośnie toksyczności podane zostaną w oddzielnej pracy o farmakologii α -NID (J. Maj, J. Sierosiławska, M. Eckstein: *Disser. Pharm.* (w druku).

Silniejsze biologiczne działanie α -NID w porównaniu z FID stanowi analogię do znanego faktu, wyrażającego się w tym, że 3- α -naftylo-4-hydroksykumaryna działa silniej przeciwzakrzepowo aniżeli 3-fenylo-4-hydroksykumaryna. Można by w tym upatrywać potwierdzenie wspomnianej już hipotezy Mentzera, według którego działanie przeciwzakrzepowe wzmagają się w miarę wzrostu symetrii cząsteczki związku biologicznie czynnego. Przeciwnie tej hipotezie przemawia jednak wykazana przez nas w części doświadczalnej słaba aktywność biologiczna β -naftyloindandionu-1,3.

β -NID mimo wyraźnie zaznaczonych cech symetrii cząsteczki okazuje aktywność biologiczną około 100 razy mniejszą niż α -NID. Być może jednak, że słabe działanie izomeru β - jest wynikiem jego wielkiej wrażliwości na wpływ różnych czynników utleniających, a nawet tlenu powietrza, w przeciwieństwie do α -NID, który jest odporny na środki utleniające.

O tym, do jakiego stopnia hipoteza Mentzera, wiążąca aktywność antywitaminową K z ogólną symetrią cząsteczki, jest słuszna, można by powiedzieć dopiero coś bardziej pewnego po zbadaniu aktywności biologicznej 3- β -naftylo-4-hydroksykumaryny, związku dotychczas w literaturze nie znanego.

Autorzy dziękują prof. dr B. Skarżyńskiemu i prof. dr A. Kocwie za pomoc udzieloną podczas przygotowywania pracy.

Streszczenie

1. Badano wpływ 2- α -naftyloindandionu-1,3 oraz 2- β -naftyloindandionu-1,3 w różnych dawkach na poziom protrombiny, po podaniu doustnym jednorazowym i wielokrotnym, na nierozcieńczonym osoczu króliczym, jednostopniową metodą Quicka. Uzyskane wyniki porównywano z analogicznym działaniem dwukumarolu i 2-fenyloindandionu-1,3.

2. 2- α -Naftyloindandion-1,3 jest substancją czynną antywitaminowo K, o sile działania zbliżonej do dwukumarolu, a około 3—5 razy bardziej aktywny od 2-fenyloindandionu-1,3. W typie działania zbliżony jest do 2-fenyloindandionu-1,3, będąc od niego nieco mniej toksyczny.

3. 2- α -Naftyloindandion-1,3 kumuluje się, o czym świadczy utrzymywanie się działania przez dłuższy okres czasu i narastanie efektu biologicznego lub utrzymywanie się tego efektu na tym samym poziomie zależnie od ilości i wysokości stosowanych powtórnie dawek.

4. 2- β -Naftyloindandion-1,3 jest antyprotrombinowo około 100 razy mniej aktywny niż izomer α .

LITERATURA

- [1] Blaustein H., *Canad. Med. Ass. J.* **62**, 470, 1950.
- [2] Blaustein A., Shnayerson N., Wallach R., *Am. J. Med.* **14**, 704, 1953.
- [3] Bjerkelund Ch. J., *Scand. J. Clin. Labor. Invest.* **2**, 83, 1950.
- [4] Chmielewska I., *Przem. Chem.* **6**, 238, 740, 1950.
- [5] Chmielewska I., Kowarzyk H., Jurecka B., Pachecka A., *Badania nad ciałami o działaniu antyvitaminu K*, Prace Wrocławskiego T-wa Naukowego, B. Nr **40**, 1951.
- [6] Chmielewska I., *Przem. Chem.* **7**, 111, 1951.
- [7] O'Connor W. R., Thompson Ch. F., Baker L. A., *Quart. Bull. Northwestern Univ. Med. School* **26**, 193, 1952; cyt. wg *Chem. Abstr.* **46**, 10444, 1952.
- [8] Conn W. W., Duff J. F., Hodgson P. E., Dennis E. W., *Am. Surgery* **138**, 467, 1953.
- [9] Correl J. T., Coleman L. L., Long S., Willy R. F., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **80**, 139, 1952.
- [10] Duff J. F., Dennis E. W., Hodgson P. E., Conn W. W., *Univ. Mich. Med. Bull.* **19**, 43, 1953.
- [11] Field J. B., Goldfarb M. S., Ware A. G., Griffith G. C., *Proc. Soc. Exp. Biol.* **81**, 678, 1952.
- [12] Gori E., Molteni L., *Rend. Ist. Lomb. Sc. Lett.* **86**, 555, 1953.
- [13] Kabat H., Stohlmann E. F., Smith M. J., *J. Pharmacol.* **80**, 160, 1944.
- [14] Long H., *Scand. J. Clin. Labor. Invest.* **5**, 4, 1953.
- [15] Meunier P., Mentzer Ch., Molho D., *Compt. rend. Acad. Sc.* **224**, 1666, 1947.
- [16] Mentzer C., Referat na franc.-niem. zjeździe chemików 13—14.II.1953 w Tübingen, cyt. w *Angew. Chem.* **65**, 213, 1953.
- [17] Molho D., *Compt. rend. Acad. Sc.* **231**, 1323, 1952.
- [18] Moreaux J., Meunier P., Mentzer C., *Arch. Intern. Pharmacodyn.* **94**, 470, 1953.
- [19] Morris F., *Yale J. Biol. and Med.* **25**, 374, 1953.
- [20] Ovren P. A., *Schw. Med. Wschr.* **84**, 822, 1954.
- [21] Polak R. J., *Farmakol. i Toksikol.* **18**, 4, 30, 1955.
- [22] Quick A. J., *J. Biol. Chem.* **109**, 73, 1935.
- [23] Quick A. J., *Am. J. Physiol.* **114**, 282, 1936.
- [24] Quick A. J., *Am. J. Physiol.* **118**, 216, 1937.
- [25] Reitmeier J., Baker N. W., Mann F. D., *Schw. Med. Wschr.* **84**, 827, 1954.
- [26] Soulier J. P., Gueguen J., *Rev. hematol.* **3**, 180, 185, 1948. *Praxis* 1948, 696; cyt. wg *Chem. Abstr.* **46**, 6761, 1952.
- [27] Taylor J., Lepp, *Feder. Proceed.* **81**, 1949.
- [28] Toohey M., *Brit. Med. J.* **1**, 650, 1953.
- [29] Townsend S. R., Fray K. J., Downing J. R., Laing R., Cameron D. G., *Canad. Med. Ass., J.* **69**, 149, 1952.
- [30] Willis P. W., MacCris J. A., Dennis E. W., Hodgson P. E., Conn W. W., Gamble J. R., Duff J. F., *Proc. Soc. Clin. Res.* **26**, 114, 1953.

ПРОТИВОТРОМБОЗНОЕ ДЕЙСТВИЕ НАФТИЛПРОИЗВОДНЫХ
ИНДАНДИОНА 1,3

Резюме

1. Исследовали влияние 2- α -нафтилиндандиона-1,3 и 2- β -нафтилиндандиона-1,3 в разных дозах на уровень протромбина, после пероральной однократной и многократной подачи, в неразведенной плазме кроликов, одноступенчатым методом Квика. Полученные результаты сравнивали с аналогичным действием дикумарола и 2-фенилиндандиона-1,3.

2. 2- α -нафтилиндандион-1,3 является активной против витамина К субстанцией, обладающей силой действия, приближенной к дикумаролу и приблизительно 3—5 раз более активной, чем 2-фенилиндандион-1,3. По типу действия он приближается к 2-фенилиндандиону-1,3, будучи несколько менее токсичен, чем этот последний.

3. 2- α -нафтилиндандион-1,3 куммулируется, свидетельством чего являются факты его действия в течение более длительного промежутка времени, и нарастания биологического эффекта или удерживания этого эффекта на том же уровне в зависимости от высоты повторно применяемых доз.

4. 2- β -нафтилиндандион-1,3 приблизительно стократно менее активен, чем изомер α , в смысле антипротромбинового их действия.

THE ANTI-COAGULANT EFFECT OF NAPHTHYL DERIVATIVES OF INDANDIONE - 1,3

Summary

1. The effect on the level of prothrombin of 2- α -naphthylindandione and of 2- β -naphthylindandione-1,3 was examined: after single and repeated oral administration, on undiluted rabbit serum, by the one-degree method of Quick. The results obtained were compared with analogous activities of dicoumarole and 2-phenylindandione-1,3.

2. 2- α -Naphthylindandione-1,3 is an active anti-vitamin- K substance. Its efficiency approaches that of dicoumarole and exceeds by 3 to 5 times that of 2-phenylindandione-1,3. In mode of action it resembles 2-phenylindandione-1,3 but is less toxic.

3. 2- α -Naphthylindandione-1,3 accumulates, which is borne out by prolonged action and increasing biological effect, or by the persistence of the effect on the same level irrespective of number and amount of additional doses.

4. 2- β -Naphthylindandione-1,3 is about 100 times less antiprothrombin active than the α -isomer.

Otrzymano 21.1.1956 r.

T. BORKOWSKI

CHROMATOGRAFICZNA ANALIZA AMINOKWASÓW W ŻÓŁCI

*Z Zakładu Chemii Fizjologicznej A. M. w Lublinie
Kierownik Zakładu prof. dr J. Opieńska-Blauth*

Wstęp

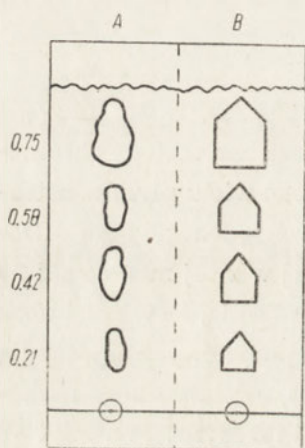
W ciągu ostatnich lat stosowano z dużym powodzeniem metodę chromatografii bibułowej do badania składu aminokwasowego wielu płynów ustrojowych. Stosunkowo najmniej poznanym pod tym względem płynem ustrojowym jest żółć. Cantarow i Trumper [1] w swej monografii na temat biochemii klinicznej ograniczają się do stwierdzenia, że w żółci obok mukoproteidów, amoniaku, mocznika i pochodnych purynowych występują także aminokwasy oraz, że w przypadkach ciężkiego, nekrotycznego uszkodzenia wątroby mogą pojawiać się w żółci leucyna i tyrozyna. Hawkins i współpracownicy [4] przeprowadzając doświadczenia na psach z przetoką żółciową stwierdzili metodą chromatografii bibułowej w żółci niehydroлизованей obecność śladów tauryny, waliny, kwasu glutaminowego i kwasu asparaginowego. Natomiast po hydrolizie kwasem solnym stwierdzono duże ilości tauryny, a zaznaczone jedynie plamy leucyny, waliny, alaniny, glicyny, seryny, kwasu glutaminowego i kwasu asparaginowego.

Celem niniejszej pracy było przebadanie składu aminokwasowego żółci przy pomocy chromatografii bibułowej oraz wykazanie ewentualnych jakościowych różnic w przypadkach schorzeń wątroby. Chociaż ilość danych metodycznych odnośnie chromatograficznej analizy aminokwasów jest bardzo pokąźna, jednakże żadna ze stosowanych metod nie jest wolna od trudności i pewnych niedogodności praktycznych. Dlatego też część wstępną badań poświęcono opracowaniu schematu postępowania chromatograficznego, najdogodniejszego do analizowania składu aminokwasowego żółci.

Część doświadczalna

METODA CHROMATOGRAFICZNA

Do analizy składu aminokwasowego bogatych mieszanin biologicznych najczęściej stosowana jest technika chromatografii dwukierunkowej. Procedura ta jest długotrwała i wymaga dużej ilości bibuły. W ciągu ostatnich lat opracowano wiele modyfikacji omijających technikę dwukierunkową, jak np. metodę krążkową z dodatkowym przepływem przez rurkę zawierającą watę [8], metodę rechromatografii skrawków [7] i inne. W niniejszej pracy zastosowano nową technikę, polegającą na rechromatografowaniu nie rozdzielonych w układzie fenol-woda poszczególnych skupień aminokwasów w odpowiednich układach rozpuszczalników.



Rys. 1

- A — część paska wywołana ninhydriną
 B — część paska do rechromatografii

Postępowanie jest następujące:

Analizowaną mieszaninę aminokwasów umieszcza się w dwóch punktach na pasku bibuły i rozwija chromatogram wstępujący w układzie fenol-woda 7:3. Po rozwinięciu chromatogram rozcina się i jedną część pozostawia bez wywołania, a drugą wywołuje 0,2% acetonowym roztworem ninhydryny. Dla uzyskanych na pasku kontrolnym plam wyznacza się wartość R_F i oznacza położenie plam na pasku niewywołanym. Wycięte z niewywołanego odcinka chromatogramu skrawki bibuły (kształtu jak na rys. 1) z miejsc odpowiadających skupieniom aminokwasów poddaje się rechromatografowaniu w różnych układach rozpuszczalników stosownie do właściwości rozdzielczych danej grupy aminokwasów. Rechromatografowanie

dokonyuje się bezpośrednio z wyciętych skrawków w sposób niżej podany:

Wycięty skrawek chromatogramu zawieszają się na szklanym pręciku i zanurza prostokątną podstawę paska w szklanej płytce, zawierającej fazę ruchomą układu rozpuszczalników (rys. 2). Faza ruchoma przechodzi wzdłuż skrawka i dochodzi aż do jego wierzchołka, na którym opiera się krążek bibuły. Z punktu oparcia szczytu skrawka o krążek rozpuszczalnik przechodzi centrycznie na cały krążek, na którym zachodzi rozdzielanie rechromatografowanej mieszaniny aminokwasów. Cały wyżej opisany proces wtórnego rozdzielania mieszaniny na krążku bibuły odbywa

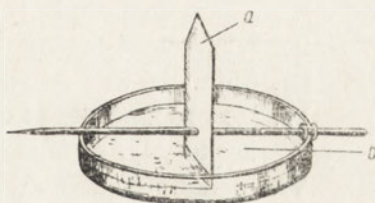
się w pomieszczeniu zamkniętym, sporządzonym z dużego lejka o średnicy 18 cm, jak to przedstawia niżej podany rysunek (rys. 3).

Po rozwinięciu chromatogram krążkowy rozcina się na dowolną ilość wycinków i każdy z nich wywołuje odpowiednim testem barwnym. W niniejszej pracy oprócz testu z ninhydryną [9] stosowano także bromoizatynę [5, 6], reakcję Sakaguchi [10] i test dwuazowy [2]. Lokalizację aminokwasów uzyskiwano na podstawie obecności barwnych krążków i porównania ich w różnych testach barwnych.

Przed zastosowaniem wyżej opisanej techniki do oznaczania składu aminokwasowego żółci przeprowadzono szereg doświadczeń nad rozdzielaniem sztucznie sporządzonych mieszanin aminokwasowych. Mieszaniny sporządzono z czystych roztworów etanolowych zakwaszonych kwasem solnym. Wartość R_F poszczególnych aminokwasów oznaczono w układzie fenol-woda dla stałych warunków doświadczalnych.

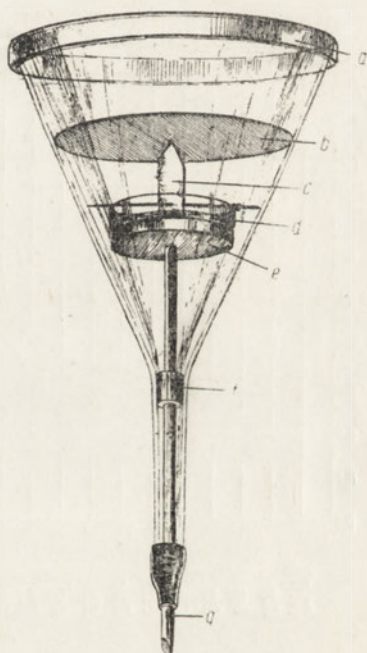
Już na wstępie przekonano się, że do rechromatografowania według wyżej podanej techniki nadają się tylko wyraźnie odgraniczone skupienia aminokwasów posiadających bliskie wartości R_F w układzie fenol-woda. W przypadku rozdzielania mieszaniny o bogatym składzie aminokwasowym po rozwinięciu w układzie fenol-woda tworzy się jedna barwna plama przez całą długość rozwiniętego chromatogramu. W tych warunkach rozdzielanie na drodze rechromatografowania jest praktycznie niewykonalne.

Do rechromatografii stosowano i wypróbowano 6 najczęściej używanych układów rozpuszczalników:



Rys. 2

- a — odcinek rechromatografowany
b — układ rozpuszczalników



Rys. 3

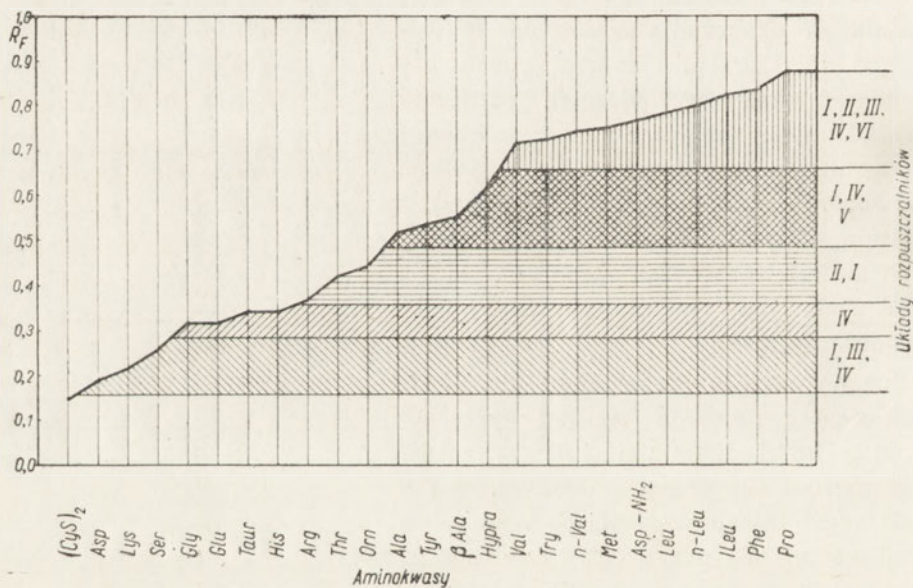
- a — pokrywa lejki
b — krążek bibuły
c — skrawek rechromatografowany
d — układ rozpuszczalników
e — podstawa
f — korek uszczelniający
g — przęt szklany ruchomy

- I. n-propanol-woda (7 : 3)
- II. III-bunatol-metanol-woda (4 : 5 : 1),
- III. butanol-kwas octowy-woda (4 : 1 : 5),
- IV. izo-propanol-kwas octowy-woda (7 : 2 : 1),
- V. 2-6-lutydyna-etanol-woda (10 : 4 : 5),
- VI. etanol-III-bunatol-amoniak-woda (12 : 4 : 1 : 3).






Poniższa tabelka podaje wyniki przeprowadzonych doświadczeń nad rozdzielaniem poszczególnych grup aminokwasów przy pomocy podanych powyżej układów (tabl. 1). Jak wynika z tabeli, każda z grup aminokwa-

T a b l i c a 1

Zależności między wartościami R_f aminokwasów w układzie fenol-woda a doбором odpowiedniego układu rozpuszczalników do rechromatografii



Zakresy R_f w układzie fenol-woda*):

	0,85	-	0,65:	do rechromatografii nadają się układy I, II, III, IV, VI
	0,65	-	0,48:	do rechromatografii nadają się układy I, IV i V
	0,48	-	0,37:	do rechromatografii nadają się układy II, I
	0,37	-	0,29:	do rechromatografii nadaje się układ IV
	0,29	-	0,17:	do rechromatografii nadają się układy I, III, IV

*) Cyfry rzymskie oznaczają numery układów rozpuszczalników podane w tekście.

sowych może być rozdzielana w rechromatografii przy pomocy odpowiednich układów rozpuszczalników. Tym samym zwiększa się możliwość i zakres rozdzielania mieszanin aminokwasów. Wskazuje to równocześnie na wyższość powyższej techniki w stosunku do chromatografii dwukierunkowej, gdzie stosuje się tylko dwa układy.

PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO ANALIZY CHROMATOGRAFICZNEJ

Próbkę żółci poddawano odbiałczaniu przez potraktowanie jej potrójną objętością 96% etanolu. Po odsączeniu wytrąconego całkowicie w tych warunkach białka odbarwienie próbki uzyskuje się przez wytrząsanie na zimno z węglem aktywnym.

Wstępne doświadczenia wykazały, że stosowanie tego rodzaju odbarwienia próbki nie wpływa w sposób widoczny na zmianę składu jakościowego analizowanej mieszaniny aminokwasów. W ten sam sposób Giddey [3] odbarwiał próbki moczu przed chromatograficzną analizą składu aminokwasowego. Po przesączeniu bezbarwną próbkę odparowywano w próżni w temp. 37°C, a suchą pozostałość ekstrahowano 96% etanolem, zakwaszonym przy pomocy 1 kropli 2N kwasu solnego. Objętość używanego do ekstrakcji etanolu była każdorazowo dobierana w ten sposób, aby otrzymać 10-krotne zagęszczenie próbki wyjściowej. 40 µl ekstraktu podawano analizie chromatograficznej w modyfikacji powyżej podanej oraz przeprowadzono kontrolę otrzymanych wyników wykonując równocześnie chromatogramy dwukierunkowe. W pierwszym kierunku stosowano układ propanol-woda (7 : 3), w drugim fenol-woda (7 : 3). Otrzymane chromatogramy wywoływano testem izatynowo-ninhydrinowym (9). We wszystkich doświadczeniach używano bibuły Whatman Nr 1.

Wyniki

Badania przeprowadzono w próbkach żółci zarówno ludzi zdrowych, jak i chorych z różnymi zaburzeniami wątrobowymi. Próbki żółci otrzymywano na drodze zgłębnikowania dwunastniczego, przeprowadzanego na czczo u osób znajdujących się od 3 dni na diecie bezbiałkowej. Analizie poddawano żółć „A” (frakcja dwunastnicza uzyskana bez działania czynników pobudzających wydzielanie żółci), żółć „B” (żółć z opróżnionego woreczka żółciowego po podaniu do dwunastnicy siarczanu magnezu) i żółć „C” (frakcja wypływająca po opróżnieniu woreczka żółciowego). W sumie przebadano żółć pochodzącą od 5 osobników zdrowych i 5 chorych. W trzech przypadkach osób zdrowych oraz dwóch osób chorych nie udało się uzyskać frakcji „C” i analizie poddano tylko żółć „A” i „B”.

T a b l i c a 2

Skład aminokwasowy różnych próbek żółci

Aminokwas	„A”		„B”		„C”		żółć wreczkowa	
	zdrowy	chory	zdrowy	chory	zdrowy	chory	zdrowy	chory
cystyna	—	—	—	—	—	—	±	—
kwas asparaginowy	—	—	—	—	—	—	±	—
kwas glutaminowy	+	+	+	+	+	+	±	+
glikokof	+	+	+	+	+	+	+	+
tauryna	—	—	±	—	—	—	±	±
ornityna	—	—	+	—	+	+	+	±
alanina	+	+	+	+	+	+	+	+
arginina	—	+	±	±	±	±	—	—
tyrozyna	+	+	+	+	+	+	±	+
leucyna	+	+	+	+	+	+	+	+
prolina	+	+	±	±	+	+	+	+
walina	+	+	+	+	±	±	+	+

Objaśnienia znaków:

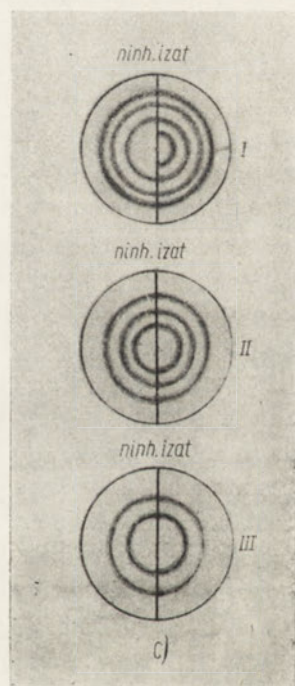
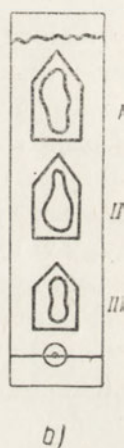
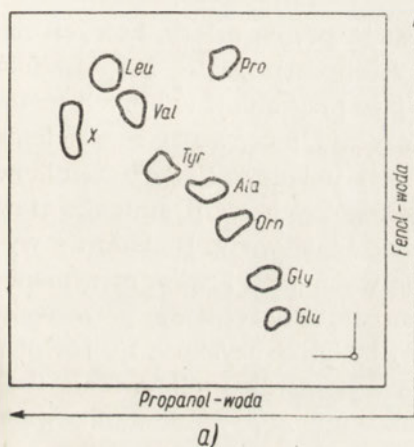
- + aminokwas obecny we wszystkich analizowanych próbkach żółci
- ± aminokwas obecny w jednej lub dwóch analizowanych próbkach żółci
- brak aminokwasu we wszystkich analizowanych próbkach żółci.

Tabl. 2 podaje zestawienie składu aminokwasowego różnych frakcji analizowanej żółci. Jak wynika z przytoczonej tabeli, we wszystkich frakcjach żółci występują stale: kwas glutaminowy, glikokof, alanina, tyrozyna, leucyna, prolina i walina. Nie zawsze natomiast spotyka się taurynę i argininę.

Porównując skład aminokwasowy żółci osobników zdrowych i chorych nie stwierdzono żadnych różnic w poszczególnych frakcjach. Żółć

pobierano od osób chorych w przypadkach żółtaczki zakaźnej, przebiegającej z wyraźnymi objawami uszkodzenia mięszu wątrobowego (3 osoby) i w przypadkach zmian zapalnych dróg żółciowych (2 osoby).

Oprócz analizy próbek żółci pobranych zgłębnikiem dwunastniczym poddano również badaniu żółć otrzymaną bezpośrednio z woreczka żółciowego usuniętego na drodze operacyjnej. Ogółem przebadano 7 próbek żółci woreczkowej, przy czym w 5 przypadkach w woreczku znajdowano kamienie żółciowe. W dwóch pozostałych przypadkach woreczek usunięto ze względu na zrosty pozapalne z dwunastnicą. Zarówno w jednej, jak i w drugiej grupie przypadków obraz aminokwasowy nie różnił się zupełnie od obrazu aminokwasowego żółci pobranej zgłębnikiem dwunastniczym.



Rys. 4

- a) — chromatogram dwuwymiarowy
- b) — chromatogram jednowymiarowy poddawany rechromatografii
- c) — chromatogramy krążkowe odpowiednich wycinków

We wszystkich analizowanych próbkach żółci obserwowano stale obok wymienionych wyżej aminokwasów obecność jednej plamy, której lokalizację na chromatogramie dwukierunkowym przedstawiono na rys. 4. Po przeprowadzeniu hydrolizy próbki żółci 6N kwasem solnym plama ta zniknęła, co może świadczyć o tym, że pochodziła od związku złożonego. Nie stwierdzono wprawdzie dodatkowych plam, lecz duże stężenia glikokolu i tauryny uwolnione w czasie hydrolizy utrudniały w znacznym stopniu identyfikację plam na chromatogramach dwukierunkowych, a techniką

jednokierunkową nie otrzymano w ogóle rozdzielania. Oprócz tego stwierdzano niekiedy dodatkowo plamy związków ninhydryno-pozytywnych, których nie identyfikowano.

Omówienie wyników

Opisana w niniejszej pracy modyfikacja chromatograficznego rozdzielania mieszaniny aminokwasów została z powodzeniem zastosowana do rozdzielania i identyfikacji wolnych aminokwasów występujących w żółci ludzkiej. Jak to zostało stwierdzone na wstępie pracy, aminokwasy występujące w żółci ludzkiej po rozwinięciu w układzie fenol-woda dawały trzy ściśle odgraniczone skupienia aminokwasów, dające się łatwo rechromatografować.

Podana w niniejszej pracy metoda posiada pewne zalety, których nie mają stosowane dotychczas modyfikacje. Rechromatografia bezpośrednia ze skrawków usuwa błędy i straty powstające przy elucji w innych metodach rechromatografii. Zwiększają się znacznie możliwości rozdzielania dzięki zastosowaniu większej ilości różnych układów rozpuszczalników bardziej swoistych dla rozdzielania poszczególnych grup aminokwasów uprzednio podzielonych na grupy w układzie fenol-woda. Dodatkowe wykonanie specyficznych testów barwnych na wycinkach krążka otrzymanego po rechromatografii ułatwia jeszcze bardziej identyfikację poszczególnych aminokwasów. Przy zastosowaniu tej techniki uzyskuje się również znaczną oszczędność czasu potrzebnego do wykonania analizy. Małe ilości zarówno bibuły, jak i układów rozpuszczalników, nieskomplikowane urządzenie dodatkowe — wszystko to przemawia za tym, że powyższa modyfikacja może być dostępna dla każdego laboratorium. Dobre wyniki uzyskane przy oznaczaniu składu aminokwasowego żółci zachęcają do wykorzystania tej techniki w badaniach składu aminokwasowego również i innych płynów biologicznych. Należy jednak dodać, że powyższej techniki nie można zastosować w warunkach, w których aminokwasy po rozwinięciu w układzie fenol-woda nie rozdzieliły się na wyraźnie odgraniczone skupienia.

Porównując skład aminokwasowy żółci ludzkiej zwraca uwagę brak większych różnic w poszczególnych próbkach żółci pobranych od osób zdrowych. Celem potwierdzenia, że wykrywane w żółci „A” aminokwasy nie są pochodzenia trawiennego, przeprowadzono pobieranie żółci na czczo, po uprzednim dwudniowym przebywaniu pacjenta na diecie bezbiałkowej. Ponieważ pobrana zgębnikiem dwunastniczym żółć jest zmieszana z sokiem trzustkowym, dlatego też dla określenia składu aminokwaso-

wego czystej żółci poddawano analizie również żółć otrzymaną bezpośrednio z woreczków operacyjnie usuniętych. Wykazywane w żółci woreczkowej aminokwasy były takie same, jak we frakcji „A”. Mogłoby to wskazywać, że na skład aminokwasowy żółci „A” nie wpływają towarzyszące soki trawienne. Niezależnie od tego, czy analizowane były próbki żółci „A”, „B” czy „C”, stale obserwowano występowanie kwasu glutaminowego, glikokolu, alaniny, tyrozyny, proliny, leucyny i waliny. Czy aminokwasy te są stałym składnikiem żółci i przenikają do niej w miejscu jej produkcji (kanałki wątrobowe), czy też przenikają do niej z naczyń krwionośnych w przebiegu dróg żółciowych, trudno byłoby odpowiedzieć na podstawie przeprowadzonych badań. Obecność tych samych aminokwasów w żółci „A” i „C” mogłaby raczej wskazywać na wątrobowe pochodzenie aminokwasów. Drugim interesującym faktem jest całkowity brak różnic w jakościowym składzie aminokwasowym żółci ludzi zdrowych i z uszkodzoną funkcją wątroby czy też zmianami zapalnymi dróg żółciowych. Otrzymane wyniki mogłyby świadczyć o tym, że uszkodzenie funkcji wątroby, obserwowane klinicznie oraz testami na wydolność wątroby, nie wpływa na skład aminokwasowy żółci. Znajdowałoby się to w pewnej sprzeczności z przytoczonymi na wstępie danymi Cantarowa i Trumpera, którzy wiążą obecność tyrozyny i leucyny w żółci tylko z uszkodzeniem mięszu wątrobowego. Tymczasem zarówno tyrozyna, jak i leucyna były wykazywane w niniejszej pracy w żółci ludzi zdrowych. Brak różnic jakościowych w składzie aminokwasowym żółci ludzi zdrowych i osób z uszkodzeniem funkcji wątroby utrudnia zastosowanie tego rodzaju badań do celów diagnostycznych.

Pragnę złożyć podziękowanie panu doc. drowi Mieczysławowi Zakrysiowi za umożliwienie korzystania z materiału operacyjnego II Kliniki Chirurgicznej oraz panu Stanisławowi Trojnarowi za pomoc laboratoryjną przy wykonywaniu niniejszej pracy.

Streszczenie

1. Opracowano nową technikę „paskowo-krażkową” dla chromatograficznego rozdzielania aminokwasów. Wstępnie rozdzielone w układzie fenol-woda poszczególne grupy aminokwasów rechromatografuje się bezpośrednio ze skrawków bibuły na krążki.
2. Opisaną metodę zastosowano z powodzeniem do rozdzielania i identyfikacji wolnych aminokwasów znajdujących w żółci ludzkiej.
3. Określono skład aminokwasowy różnych frakcji żółci ludzkiej. Ana-

lizie poddano próbki żółci „A”, „B” i „C”, pobrane od ludzi zdrowych, jak również chorych z zaburzeniami wątrobowymi. Ponadto analizowano próbki żółci, pobrane z operacyjnie usuniętego wreczka żółciowego.

4. Stwierdzono, że niezależnie od tego, z jakim rodzajem analizowanej próbki ma się do czynienia, stale występowały: kwas glutaminowy, glikockol, alanina, tyrozyna, leucyna, prolina i walina oraz niestale cystyna, kwas asparaginowy, tauryna, ornityna i arginina.

LITERATURA

- [1] Cantarow A., Trumper M., *Clinical Biochemistry*, W. B. Saunders Comp. Philadelphia 1949.
 [2] Dent C. E., *Biochem. J.* **43**, 169, 1948.
 [3] Giddey C., *Schweitz. Med. Wochenschr.* **83**, 331, 1953.
 [4] Hawkins W. B., Hanson P. C., Coon R. W., Terry R., *J. Exp. Med.* **90**, 461, 1949.
 [5] Jepson J. B., Smith I., *Nature* **172**, 1100, 1953.
 [6] Noworytko J., Sarnecka-Keller M., *Acta Biochim. Pol.* **2**, 91, 1955.
 [7] Schlogl K., Siegel A., *Z. Physiol. Chem.* **292**, 263, 1953.
 [8] Schwerdfeger E., *Naturwiss.* **40**, 201, 1953.
 [9] Smith I., *Nature* **171**, 43, 1953.
 [10] Sorm F., Sebesta K., Tursky T., *Chem. Listy* **46**, 375, 1952.

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ АМИНОКИСЛОТ В ЖЕЛЧИ

Резюме

1. Разработана новая „полосково-кружковая” техника хроматографического разделения аминокислот. Вступительно разделенные в системе фенол-вода отдельные группы аминокислот рехроматографируются непосредственно с полосок фильтровальной бумаги на кружки.

2. Описанный метод успешно применен к разделению и идентификации свободных аминокислот, находящихся в человеческой желчи.

3. Определен состав аминокислот в различных фракциях человеческой желчи. Анализу подвергались пробы желчи А, В, С, взятые как у здоровых лиц, так и у больных расстройствами деятельности печени. Кроме того, анализировались пробы желчи, полученные из удаленного оперативным путем желчного пузыря.

4. Констатировали, что независимо от рода анализируемой пробы, постоянно выступали: глутаминовая кислота, гликоколь, аланин, тирозин, лейцин, пролин и валин, а также непостоянно: цистин, аспарагиновая кислота, таурин, орнитин и аргинин.

CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF BILE AMINO ACIDS

Summary

1. A new „strip-disc” technique for chromatographic partition of amino acids was developed. After preliminary partition in a phenol-water system the particular amino acid groups are chromatographed from paper strips directly on to discs.

2. The method described was used successfully for the partition and identification of free amino acids found in human bile.

3. The amino acid composition of various fractions of human bile was determined. Samples of bile „A”, „B” and „C” were taken from healthy subjects as well as from liver patients. In addition, samples were taken from excised gall bladders.

4. It was established, that, irrespective of the kind of sample, the following substances were always present: glutamic acid, glycine, alanine, tyrosine, leucine, proline, valine. Cystine, aspartic acid, ornithine and arginine were not always present.

Otrzymano 30.1.1956 r.

M. WIEWIÓROWSKI i J. AUGUSTYNIAK

ELEKTROFOREZA BIBUŁOWA BIAŁEK NASION ŁUBINU

Z Zakładu Chemii Ogólnej Wyższej Szkoły Ekonomicznej w Poznaniu
Kierownik: doc. dr M. Wiewiórowski

Jedną z roślin zdobywających sobie ostatnio coraz większe znaczenie gospodarcze jest łubin. Chociaż znaczenie to zawdzięcza łubin przede wszystkim dużej zawartości białka, białko łubinowe jest dotychczas mało zbadane. Dlatego też podjęliśmy w tym zakresie badania, a niniejszy komunikat podaje pierwsze osiągnięte wyniki.

Pierwsze poważniejsze i przez długi okres czasu jedyne wiadomości o białku łubinowym zawdzięczamy T. B. Osborne'owi [11]. Osborne stwierdził, że prawie całe białko łubinu żółtego i wąskolistnego należy do globulin, przy czym wg T. B. Osborne'a białko to znacznie różni się od globulin wyodrębnionych z nasion innych roślin motylkowych. Dalej T. B. Osborne stwierdził, że można rozdzielić globuliny łubinu na drodze frakcjonowanego wysalania na przynajmniej 2 składniki różniące się składem (tabl. 1), rozpuszczalnością i ilościowym stosunkiem produktów rozpadu. Te dwa składniki zostały przez niego nazwane konglutyną α i konglutyną β .

Preparaty konglutyn T. B. Osborne otrzymał w następujący sposób: białko z nasion łubinu ekstrahował 10% roztworem chlorku sodowego, roztwór dializował aż do całkowitego usunięcia soli, osad wytrąconych globulin rozpuścił w rozcieńczonym roztworze siarczanu amonu i po przesączeniu ponownie poddał dializie. Po wytrąceniu się globulin rozpuścił je ponownie w rozcieńczonym roztworze siarczanu amonu i zwiększając stężenie tej soli wytrącił przy 6/10 stanu nasycenia konglutynę α , przy 7/10 — konglutynę β . Obydwie konglutyny, podobnie jak inne globuliny, są rozpuszczalne w rozcieńczonych roztworach ługów, soli i kwasów, natomiast nie są rozpuszczalne w wodzie.

Skład elementarny konglutyn wg T. B. Osborne'a [11]:

	N	C	O	S	H
konglutyna α	17,57%	51,75%	23,10%	0,62%	6,96%
konglutyna β	18,40%	49,49%	23,63%	1,67%	6,81%

W pewnej sprzeczności z wynikami badań T. B. Osborne'a stoją nowsze prace, przeprowadzone przez C. E. Danielsona [2] i M. J. Smirnową wraz ze współpracownikami [18].

C. E. Danielson przeprowadzając badania ultrawirówkowe globulin różnych roślin motylkowych doszedł do wniosku, że nie ma różnic między globulinami różnych gatunków łubinów, a nawet, że praktycznie wszystkie rośliny motylkowe posiadają identyczne składniki globulinowe. Wniosek swój opiera na tym, że wszystkie rośliny motylkowe wykazały w jego badaniach obecność globulin o bardzo podobnych stałych sedymentacji.

M. J. Smirnowa zajmując się charakterystyką nasion różnych roślin pastewnych określała między innymi ilości białka rozpuszczalnego w wodzie i stwierdziła, że z nasion łubinu można przy pomocy wody wyekstrahować 12—37% ogólnej ilości białek. Wskazywałoby to na dużą zawartość w nich albumin, co jest w pewnej mierze sprzeczne z danymi T. B. Osborne'a.

Piszemy „w pewnej mierze sprzeczne”, gdyż każdy z wymienionych autorów badał materiał roślinny wyhodowany w innym czasie, innym miejscu, różnych odmian i to może do pewnego stopnia usprawiedliwiać duże różnice w uzyskanych wynikach. Dalsze różnice mogły powstać na skutek stosowania różnych metod badawczych.

Nasze badania postanowiliśmy przeprowadzić przy pomocy elektroforezy bibułowej [1, 10, 13], wychodząc z założenia, że ta bardzo prosta metoda jest równocześnie jedną z najsubtelniejszych metod frakcjonowania mieszanin białkowych. Dodatkowym celem było stwierdzenie, w jakim stopniu elektroforeza bibułowa może być przydatna do badania mieszanin białek roślinnych, gdyż w dotychczasowych publikacjach z dziedziny elektroforezy bibułowej białek, niemal że jedynym obiektem były białka surowicy krwi [3,12,4,5,6,9,15,19], a pierwsze znane nam dwie prace dotyczące elektroforezy bibułowej białek roślinnych ukazały się — jedna w 1953 r. [17], a druga w ostatnich miesiącach 1955 r. [16].

Metody

1. ODCZYNNIKI I MATERIAŁY

- a) 10% roztwór chlorku sodowego,
- b) nasycony roztwór siarczanu amonu,

- c) papka bibułowa,
- d) bibuła Whatman 4,
- e) bufor boranowy pH ok. 8,4 (33,92 g H_3BO_3 + 110 ml 1-n NaOH + 5 g NaCl uzupełnić do objętości 1 l.),
- f) roztwór azokarminu B (50 ml nasyconego wodnego roztworu azokarminu + 40 ml alkoholu metylowego + 10 ml kwasu octowego lodowatego),
- g) alkohol metylowy,
- h) kwas octowy 10%.

2. PRZYGOTOWANIE ROZTWORU BIAŁEK

Suche nasiona łubinu zmielone na drobną mączkę odtłuszczano ekstrahując eterem etylowym przez 8 godzin w aparacie Soxleta. Odtłuszczoną mączkę mieszano z 5-krotną ilością 10% roztworu chlorku sodowego, po czym wytrząsano na wytrząsarce przez 1,5 godz. W butelce, w której przeprowadzano ekstrakcję, znajdowało się na każde 10 g mączki 8—10 kulek porcelanowych (1 kulka ważyła ca 1,7 g), dzięki czemu uzyskiwano podczas wytrząsania duże rozdrobnienie ekstrahowanego materiału. Po wytrząsaniu mieszaninę odstawiano na ok. 0,5 godz., po czym sączono przez warstwę rozbitej bibuły. Pierwsze partie przesącza odrzucano, następne brano do badań. Tak otrzymany ekstrakt białka będziemy w dalszym ciągu nazywali „surowym wyciągiem białka”.

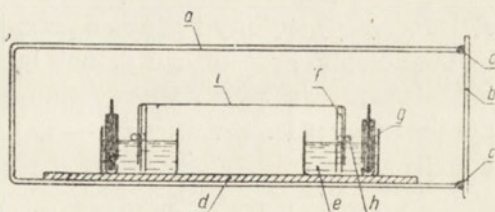
Dializę surowego wyciągu białka przeprowadzano w małych woreczkach celofanowych najpierw przez 12 godzin w stosunku do bieżącej wody wodociągowej, później przez 6 godzin w stosunku do wody destylowanej.

3. APARAT DO ELEKTROFOREZY

W badaniach posługiwano się aparatem własnej konstrukcji, przedstawionym na rys. 1.

Rys. 1. Schemat stosowanego aparatu do elektroforezy bibułowej:

- a) komora szklana o wymiarach 60 cm × 21 cm × 17 cm
- b) przykrywa szklana
- c) uszczelki gumowe
- d) wysuwana płyta szklana o wymiarach 50 × 20 cm, na której ustawiono krystalizatory i bagietki wspierające bibułę
- e) krystalizatory o pojemn. 300 ml.
- f) bagietki wspierające bibułę odległe od siebie o 20 cm



- g) elektrody wraz z urządzeniem labiryntowym (9)
- h) bagietki obciążające pasek bibuły
- i) pasek bibuły

Przy wykonywaniu wszystkich analiz stosowano napięcie 120 V (wyższe różnice potencjału nie powodowały ostrzejszych rozdziałów poszczególnych frakcji). Prąd pobierano z prostownika zasilanego wprost z sieci (stąd możliwe były pewne wahania napięcia). W obwód w celu kontroli przebiegu analizy włączony był stale miliamperomierz.

4. POSTĘPOWANIE

Do dwóch krystalizatorów (e) nalewano po ca 250 ml roztworu buforowego (tak, by poziomy cieczy w obu naczyniach były jednakowe), na bagietkach (f) umieszczano pasek bibuły (i) o wymiarach 28,8 x 6 cm. Zawieszano go zawsze w ten sposób, żeby w obu krystalizatorach zanurzone były jednakowo długie końce paska bibuły. W ten sposób uzyskano „długość roboczą” paska (dł. mierzona wzdłuż paska pomiędzy dwoma powierzchniami roztworu elektrolitu), wynoszącą 26 cm. W celu utrzymania bibuły w pozycji poziomej końce paska obciążano dwoma bagietkami połączonymi gumkami w ten sposób, żeby bibuła mogła być między bagietkami ściśnięta (h). Po zawieszeniu paska komorę (a) zamykano szczelnie płytą (b) i po 2 godz., kiedy komora była częściowo nasycona parą wodną, a pasek bibuły całkowicie buforem — nakładano na niego badany roztwór białka.

Poszczególne roztwory białek наносzono przy pomocy wykalibrowanej kapilary (2 mm²) dokładnie na środek paska bibuły — na odcinek długości 1 cm. Ponieważ szerokość paska wynosiła 6 cm, na 1 pasku można było równocześnie badać trzy różne mieszaniny białkowe. Określenie punktu startowego okazało się w naszym postępowaniu elektroforetycznym bardzo istotnym czynnikiem rozdziału, a mianowicie przy nałożeniu badanej mieszaniny w innym miejscu niż na środku paska znaczny ruch dośrodkowy buforu, wynikający ze stosunkowo silnego parowania wody z bibuły, uniemożliwiał rozdział. Dość silne parowanie wody z bibuły było spowodowane tym, że używany bufor był (w stosunku do zwykle stosowanych do elektroforezy) stężony i podczas przepływu prądu wywiązywała się znaczna ilość ciepła. Przy użyciu jednak buforu rozcieńczonego nie otrzymywano dobrych rozdziałów. Mniej istotnym, ale również ważnym czynnikiem był czas trwania elektroforezy — najlepsze rozdziały uzyskiwano w ciągu 6 godzin.

Po upływie 6 godz. prąd wyłączano, pasek bibuły suszono w 100°C przez 0,5 godz., a następnie zdenaturowane na bibule białko wybarwiano azokarminem. Pasek bibuły zanurzano w roztworze barwnika przez 15 minut — po tym czasie nadmiar barwnika wmywano najpierw alkoholem metylowym, a później 10% roztworem kwasu octowego. Ilościowy stosu-

nek poszczególnych frakcji określano przy pomocy fotoabsorpcjometru [12], obliczając i porównując powierzchnię pod maksimami krzywych elektroforetycznych. Ponieważ jednak szczelina używanego przez nas fotoabsorpcjometru jest za krótka i pomiar jednej analizy trzeba określać mierząc absorpcję 4 razy (kolejno w 4 pasmach plamy), dlatego uzyskane na tej podstawie wyniki nie są dokładne i przytaczamy je raczej jako dane orientacyjne.

Wyniki i dyskusja

Głównym przedmiotem badań był łubin wąskolistny, na którego białku została wypracowana metoda postępowania elektroforetycznego. Dodatkowo, stosując ten sam tok postępowania, przebadano fragmentarycznie białko łubinu białego i żółtego. Do badań użyto łubinów następującego pochodzenia:

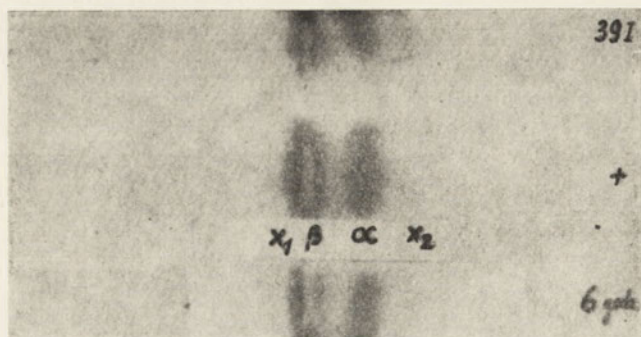
- 1) łubin wąskolistny różowy, gorzki, ze stacji Hodowli Nasion Udycz (zbiór 1951 r.),
- 2) łubin biały grupa V — mieszanina kilku biotypów wyhodowanych przez stację Przebędowo I.H.A.R. (zbiór 1953 r.),
- 3) łubin żółty nr 97 ze stacji selekcyjnej w Wierzenicy (zbiór z 1954 r.).

Surowy wyciąg białka z nasion łubinu wąskolistnego rozdziela się w warunkach poprzednio przedstawionych na 4 składniki (rys. 2 i 3a). Badane w tych samych warunkach surowe wyciągi białka z nasion łubinu białego rozdziela się na 2 składniki (rys. 3c), a wyciągi z nasion łubinu żółtego nie rozdziela się w sposób wyraźny (rys. 3b).

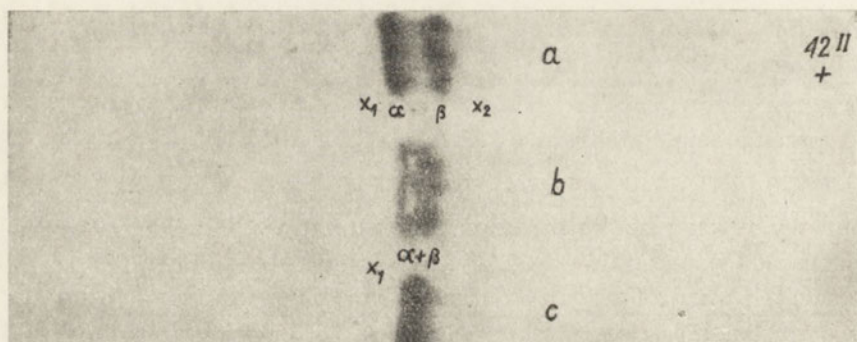
W celu zidentyfikowania, który z rozdzielonych składników łubinu wąskolistnego odpowiada konglutynie α , a który konglutynie β , przeprowadzono na tym samym pasku bibuły analizę elektroforetyczną:

- 1) preparatu konglutyny α ,
- 2) „ „ „ β (przygotowanych metodą T. B. Osborne'a) oraz
- 3) surowego wyciągu białka z nasion łubinu wąskolistnego.

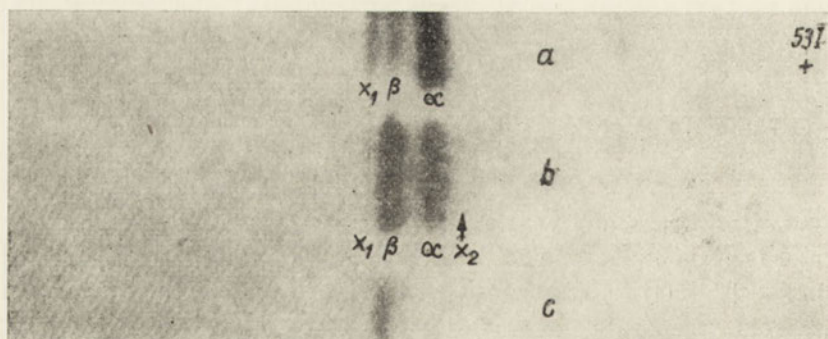
Analizując otrzymany w ten sposób elektroforegram (rys. 4) stwierdziliśmy, że frakcja oznaczona znakiem x_1 jest globuliną, za nią znajduje się konglutyna β , dalej konglutyna α i frakcja x_2 . Jak widać na zamieszczonym zdjęciu, preparat konglutyny α (rys. 4a) oprócz zanieczyszczeń konglutyną β zawiera również składnik x_1 , a stąd wniosek, że ta globulina wytrąca się albo przy 6/10 stanu nasycenia siarczanem amonu albo przy mniejszym stężeniu (odpowiednich badań porównawczych z wysalaniem jesz-



Rys. 2. Zdjęcie elektroforegramu surowego wyciągu białka z nasion łubinu wąskolistnego. Warunki elektroforezy: bufor boranowy (patrz: „Odczynniki i materiały”), napięcie ok. 4 V/cm „długości roboczej paska”



Rys. 3. Zdjęcie elektroforegramu surowych wyciągów białka z nasion: a) łubin wąskolistny; b) łubin żółty; c) łubin biały. Warunki j.w.



Rys. 4. Zdjęcie elektroforegramu białek nasion łubinu wąskolistnego: a) preparat konglutyny α; b) surowy wyciąg białka; c) preparat konglutyny β. Warunki elektroforezy j. w.

cze nie przeprowadzono). Brak frakcji x_2 na elektroforegramach preparatów otrzymanych przez rozpuszczenie osadu wytrąconego w wyniku dializy surowego wyciągu białka w stosunku do wody sugeruje, że jest to albumina.

Orientacyjne oznaczenia ilościowe stosunku poszczególnych frakcji białkowych wyodrębnionych z nasion łubinu wąskolistnego dały następujące wyniki (podane wyniki są średnią z 5 pomiarów):

frakcja x_1 stanowi ok.	4%	ogólnej zawartości białka w nasionach					
konglutyna β	„ „	46%	„	„	„	„	„
konglutyna α	„ „	41%	„	„	„	„	„
frakcja x_2	„ „	9%	„	„	„	„	„

W dotychczasowych naszych badaniach przede wszystkim zajmowaliśmy się dostosowaniem elektroforezy bibułowej do badania białka nasion łubinu. Zdajemy więc sobie sprawę, że szczupłość przebadanego materiału biologicznego nie upoważnia nas do wyciągnięcia daleko idących stwierdzeń. Mimo to rezultaty naszych badań zamykamy w formie 3 wstępnych wniosków:

1. W nasionach łubinu wąskolistnego znajdują się przynajmniej 3 globuliny, a nie 2, jak dotychczas podawano. Wniosek ten pokrywa się częściowo z wynikami równolegle prowadzonych badań F. J. Jouberta [7], który badając metodą ultrawierowania i metodą tzw. „klasycznej” elektroforezy mieszaniny globulin wyodrębnionych z nasion łubinu wąskolistnego (pochodzenia afrykańskiego) znalazł również 3 składniki. F. J. Joubert rozwijając koncepcję C. E. Danielsona [2], przyjmuje, że jeden ze składników (odpowiadający konglutynie α) ulega w środowisku alkalicznym odwracalnej dysocjacji — asocjacji, przy czym przy pH 8,8 cały ten składnik jest wg autora zdysocjowany na dwie części o mniej więcej równej masie cząsteczkowej.

2. Pomiedzy kompleksami białek zapasowych różnych gatunków łubinu istnieją wyraźne różnice. Wniosek ten przeczy hipotezie C. E. Danielsona [2] zakładającej, że rośliny motylkowe posiadają praktycznie identyczne składniki globulinowe. Pokrywa się natomiast częściowo z wynikami prac F. J. Jouberta [8] oraz E. M. Petriego i współpr. [14]. Ostatnio wymienieni autorzy badali globuliny łubinu żółtego i doszli do wniosku, że również jedna z globulin łubinu żółtego ulega odwracalnej dysocjacji-asocjacji, ale przy pH innym niż globulina łubinu wąskolistnego. Wskazuje to na istnienie różnic pomiędzy białkiem obu tych gatunków.

3. Elektroforeza bibułowa nadaje się dobrze do badania zapasowych białek roślinnych. Naszym zdaniem w pełni opłacają się trudności, które

trzeba pokonać przy dostosowaniu jej do rozdziału określonej mieszaniny białkowej. Przypuszczamy, że po dalszych metodycznych udoskonaleniach przy jej pomocy będzie można również badać mieszaniny roślinnych białek konstytucyjnych.

Streszczenie

Sprecyzowano warunki postępowania dla elektroforezy bibułowej zapasowego białka łubinu. W oparciu o opracowane postępowanie przeprowadzono wstępne badania nad typami białek występujących w nasionach łubinu wąskolistnego. Zgodnie z równoległymi badaniami F. J. Jouberta stwierdzono obecność w nich 3 frakcji globulinowych. Przeprowadzając analogiczne badania elektroforetyczne białka wyodrębnionego z nasion łubinu żółtego i białego stwierdzono, że pomiędzy kompleksami zapasowych białek badanych gatunków łubinu istnieją wyraźne różnice.

Stwierdzono, że elektroforeza bibułowa w pełni nadaje się do badania mieszanin zapasowych białek roślinnych.

LITERATURA

- [1] Cremer H. D., Tiselius A., *Biochem. Z.* **320**, 273, 1950.
- [2] Danielson C. E., *Biochem. J.* **44**, 387, 1944.
- [3] Flyn F. V., de Mayo, *Lancet* **261**, 253, 1951.
- [4] Fišer-Herman M., Davorin P., *Biochem. Z.* **324**, 96, 1953.
- [5] Hardwicke J., *Biochem. J.* **57**, 166, 1954.
- [6] Hoch H., Barr G. H., *Science* **122**, 243, 1955.
- [7] Joubert F. J., *Biochim. Biophys. Acta* **16**, 370, 1955.
- [8] Joubert F. J., *Biochim. Biophys. Acta* **17**, 444, 1955.
- [9] Krawczenko U. A., Samarina O. P., Kricman M. G., *Biochimja* **18**, 34, 1953.
- [10] Michl H. *Mh. Chem.* **85**, 166, 1954.
- [11] Osborne T. B., *Handlexikon der Biologischen Arbeitsmethoden*, E. Abderhalden, tom 4, Berlin 1911.
- [12] Ostrowski W. i Mikucki A., *Acta Physiol. Pol.* **1952**, **3**, 277, 1952.
- [13] Ostrowski W., *Wiad. Chem.* **9**, 21, 1955.
- [14] Petri E. M., Staverman J., Pals D. T. F., *Biochim. Biophys. Acta* **17**, 446, 1955.
- [15] Ramshorn K., *Die Pharmazie* **9**, 181, 1954.
- [16] Schneider G., Sparmann G., *Naturwiss.* **42**, 391, 1955.
- [17] Schwarze P., *Naturwiss.* **40**, 21, 1953.
- [18] Smirnowa M. J., Ikonnikowa, Wiesjołowa E. P., *Doklady Akademii Nauk Z.S.R.R.* **77**, 1071, 1951.
- [19] Werner G., Westphal O., *Angew. Chem.* **67**, 251, 1955.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ СЕМЕННЫХ БЕЛКОВ ЛЮПИНА
ПУТЕМ ПРИМЕНЕНИЯ ФИЛЬТРОВАЛЬНОЙ БУМАГИ

Р е з ю м е

Авторы уточнили метод электрофореза (при применении фильтровальной бумаги) запасных белков люпина. На основании разработанного метода проводились вступительные исследования типов белков, выступающих в семенах узколистного люпина. Согласно с параллельными исследованиями Ф. И. Жуберта констатировали наличие в них трех глобулиновых фракций. Проводя аналогичные электрофоретические исследования белка, изолированного из семян желтого и белого люпина, авторы констатировали, что между комплексами запасных белков исследуемых видов люпина существуют отчетливые различия.

Констатирован факт, что электрофорез при применении фильтровальной бумаги вполне пригоден к исследованию смесей запасных растительных белков.

DIE PAPIERELEKTROPHORESE VON LUPINENSAMENPROTEIN

Z u s a m m e n f a s s u n g

Die Mitteilung enthält eine Beschreibung der Bedingungen für Papierelektrophorese von Lupinensamenprotein. Mit Hilfe des beschriebenen Verfahrens wurden Untersuchungen der Eiweiss-typen der Samen der schmalblättrigen Lupine (*L. angustifolius*) eingeleitet. In Übereinstimmung mit den parallel durchgeführten Arbeiten F. J. J o u b e r t s wurden in den genannten Lupinensamen 3 Globulinfraktionen festgestellt. Ähnliche papierelektrophoretische Versuche mit Samenprotein der gelben (*L. luteus*) und weissen (*L. albus*) Sorte erwiesen, dass zwischen den Samenproteinkomplexen der untersuchten Lupinensorten deutliche Unterschiede bestehen.

Es wurde festgestellt, dass sich die Papierelektrophorese sehr gut zur Untersuchung von Samenproteingemischen eignet.

Otrzymano 4.2.1956 r.

A. B. WOJTCZAK

**ZWIĄZKI FOSFOROWE W WYDALINACH MOLA WOSKOWEGO
(GALLERIA MELLONELLA)****I. IDENTYFIKACJA**

Z Zakładu Biochemii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego w Warszawie
Kierownik: prof. dr W. Niemierko

S. Niemierko i W. Niemierko [9], [10], [11] stwierdzili, że gąsienice mola woskowego wydają fosfor nie tylko jako ortofosforan, ale także w znacznej części pod postacią labilnych połączeń fosforowych, hydrolizujących po 7 minutach w N HCl w 100° do ortofosforanu. We frakcji tej wymienieni autorzy wykryli metafosforan. Obecność jego stwierdzono na podstawie reakcji metachromatycznej z błękitem toluidynowym oraz reakcji strącania białka. Próbne ilościowe oznaczenia metafosforanu za pomocą strącania octanem ołowiu przy pH = 2 wykazały, że stanowi on około 50% labilnych związków fosforowych wydalin.

W latach ostatnich stwierdzono obecność metafosforanów w drożdżach i bakteriach [3, 4] oraz w pleśniach [8]. Ingelman i Malmgren [6] izolowali z pleśni *Aspergillus niger* związek o własnościach zbliżonych do syntetycznej soli Grahama (wysokocząsteczkowy polimer). Wśród zwierząt meta- i polifosforany znaleziono jedynie u owadów: *Galleria mellonella* [9 — 11] i *Celerio euphorbiae* [5].

Badania metafosforanów utrudnia w znacznym stopniu fakt, że związki te występują pod postacią różnego rodzaju polimerów cyklicznych i łańcuchowych, których własności chemiczne są bardzo zbliżone. Terminologia metafosforanów nie jest ustalona. Na ogół terminem „metafosforany” w ścisłym znaczeniu obejmuje się polimery cykliczne, np. trój- i tetrametafosforan. Polimery łańcuchowe nazywa się „polifosforanami”; zalicza się tutaj zarówno niskocząsteczkowe połączenia (pirofosforan, trójpolifosforan i inne), jak i związki wysoko spolimeryzowane o ciężarze cząsteczkowym dochodzącym do 1 miliona (np. sól Grahama) [14].

Celem niniejszej pracy jest bliższe scharakteryzowanie występującego w wydalinach gąsienic mola woskowego metafosforanu oraz zidentyfikowanie pozostałych labilnych połączeń fosforowych.

Stosowano następujące sposoby rozdzielania i charakterystyki labilnych związków fosforowych z wydalin gąsienic:

- 1) wytrącanie w postaci soli Mn i Ba,
- 2) rozdział i identyfikacja chromatograficzna,
- 3) dializa,
- 4) identyfikacja enzymatyczna.

Część metodyczna

Związki fosforowe, które były przedmiotem badań, wydobywano z wydalin gąsienic *Galleria mellonella* za pomocą kilkakrotnej ekstrakcji wodnej w temp. 0°. Większość analiz wykonano na wodnych wyciągach z wydalin gąsienic głodzonych, ponieważ wydaliny gąsienic żerujących zawierają dużą ilość niestrawionych wosków, które utrudniają ekstrakcję związków rozpuszczalnych w wodzie. Fosfor nieorganiczny (ortofosforan) oznaczano natychmiast po sporządzeniu ekstraktu wodnego metodą Fiskego i Subbarowa [15]. Labilne związki fosforowe oznaczano po 7 minutach hydrolizy w N HCl w 100°. Pirofosforan oznaczano przez wytrącenie soli manganowej [7]. Przy frakcjonowanym strąceniu solami baru postępowano według metod M a n n a [8] oraz E b e l a [3], którzy rozdzielali związki fosforowe pochodzące z pleśni i drożdży. Autorzy ci podają, że przy pH = 2 wytrącają się metafosforany wysokocząsteczkowe, przy pH od 4 do 5 — pirofosforan oraz niskocząsteczkowe metafosforany. Rozdzielenie chromatograficzne przeprowadzano w rozpuszczalnikach stosowanych przez E b e l a [2]. Przy rozwijaniu i wywoływaniu chromatogramów postępowano według metody opisanej przez O p i e ń s k ą - B l a u t h i współpracowników [13].

Do chromatografii i doświadczeń enzymatycznych używano: ortofosforanu, pirofosforanu i glicerofosforanu ch. cz. firmy Merck oraz trój- i tetra- metafosforanu, trójpolifosforanu i soli Grahama pochodzących z pracowni prof. E. Thilo w Berlinie¹. Metafosforan z drożdży izolowano metodą Wiame'a [16].

Część doświadczalna

Jak już wspomniano na wstępie, gąsienica mola woskowego wydała fosfor w znacznej części pod postacią labilnych połączeń fosforowych. W wy-

¹ Związki te otrzymaliśmy dzięki uprzejmości prof. J. Hellera.

dalinach gąsienic głodzonych znajdują się: ortofosforan w ilości odpowiadającej około 50% całego fosforu zawartego w wydalinach, związki fosforowe hydrolizujące w $N HCl$ w 100° w ciągu 7 minut do ortofosforanu (P_7) w ilości odpowiadającej 40% — 50% fosforu oraz bardzo mało lub wcale innych połączeń fosforowych. Fosfor całkowity stanowi około 1% — 2% masy wydalin [11].

Celem zbadania, z jakich związków składa się frakcja P_7 , zastosowaliśmy frakcjonowane strącanie solami baru. Z wyciągu wodnego z wydalin próbowano wytrącać związki fosforowe przy pomocy 10% $BaCl_2$ przy $pH = 2$, następnie przy $pH = 5$. Przy $pH = 2$ nie wytrącał się żaden osad. Przy pH wynoszącym 4,5 — 5,0 wytrącało się około połowy frakcji P_7 . Wynika z tego możliwość występowania we frakcji P_7 niskocząsteczkowych metafosforanów i pirofosforanu. Przy wytrącaniu soli barowej z poszczególnych pró-

T a b l i c a 1

Strącanie labilnych związków fosforowych (P_7) wydalin mola woskowego za pomocą $BaCl_2$ i $Mn(CH_3COO)_2$ przy $pH=5$

Nr łóśw.	Badany materiał	Ilość wytrąconego fosforu w %/0 całego labilnego fosforu	
		$BaCl_2$	$Mn(CH_3COO)_2$
1	Ekstrakt wodny	50; 47; 45*)	44; 44*)
2	„ „	50; 60*)	52; 52*)
3	„ „	56	65
1	Osad alkoholowy	72; 75*)	30; 30*)
2	„ „	49	60
3	„ „	60	46; 47*)
4	„ „	—	85
5	„ „	—	71; 72*)

*) Równoległe oznaczenia z tego samego materiału.

bek tego samego ekstraktu występowały dość duże różnice pomiędzy równoległymi oznaczeniami, co wskazywałoby na nieilościowe wytrącanie się w tych warunkach pewnych związków fosforowych zawartych we frakcji P_7 . Aby przekonać się, czy we frakcji P_7 występuje pirofosforan, wytrącono osad przy pomocy 5% $Mn(CH_3COO)_2$ przy $pH = 5$. Okazało się, że mangan wytrąca około 50% P_7 , podobnie jak bar. W wypadku wytrącania man-

ganem ilości związków fosforowych, zawarte w równoległych próbach z tego samego ekstraktu, są prawie identyczne.

W celu oddzielenia metafosforanów od pirofosforanu Mann [8] stosował strącanie metafosforanu 50% etanolem przy pH około 5. Próbowa-
liśmy wyizolować polifosforan z ekstraktu wodnego z wydalin przez wy-
trącanie 50 % alkoholem przy pH od 5 do 8. Otrzymane osady rozpuszcza-
no w wodzie i badano, ile fosforu wytrąca się barem, a ile manganem. Na-
sze analizy wykazały, że osad alkoholowy wytrącany z ekstraktu wodnego
z wydalin mola woskowego zawiera w dalszym ciągu mieszaninę polifosfo-
ranów, ponieważ część związków fosforowych strącała się solami manganu
a część solami baru.

Tablica 2

Rozdzielanie labilnych związków fosforowych z ekstraktu wodnego z wydalin przez kolejne
strącanie solami baru i manganu przy pH=5

I typ doświadczeń: kolejność strącania — najprzód przy pomocy $Mn(CH_3COO)_2$, następnie
przy pomocy $BaCl_2$;

II typ doświadczeń: kolejność strącania odurotna.

Typ doświadczeń	Numer doświad- czenia	Strącanie przy pomo- cy $Mn(CH_3COO)_2$			Strącanie przy pomocy $BaCl_2$			P_7 w prze- sączu		Suma P_7 w obu osadach i w przesączu	
		$P_o^{**})$ w mg	P_7		P_o w mg	P_7		w mg	w %/ całkowi- tego P_7	w mg	w %/ %*)
			w mg	w %/ całkowi- tego P_7		w mg	w %/ całkowi- tego P_7				
Ekstrakt wodny I	1	0,011	0,78	41,7	0,02	0,85	46,4	0,29	15,5	1,87	100
	2	0,014	0,95	50,7	0,17	0,81	43,3	0,08	4,3	1,84	98
	3	0,048	0,72	38,4	0,06	0,82	43,8	0,12	6,4	1,66	89
	4	0,045	0,76	40,7	0,04	0,90	48,2	0,08	4,3	1,75	93
Ekstrakt wodny										0,72	100
II	1	0,14	0,29	40,3	ślady	0,35	48,7	0,09	12,5	0,73	101
	2	0,19	0,28	38,9	ślady	0,34	47,2	0,09	12,5	0,71	99

*) Ilość P_7 w ekstrakcie wodnym, oznaczoną po hydrolizie, przyjęto za 100 %.

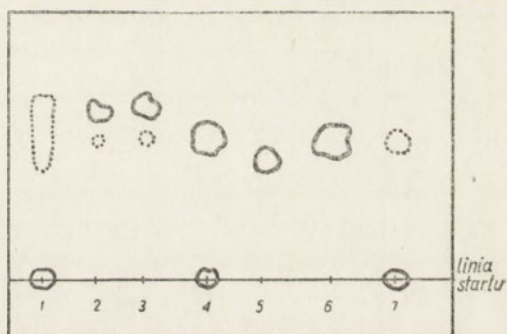
**) P_o — fosfor ortofosforanu

Dane zawarte w tablicy 1 podają ilości fosforu strącane bądź barem,
bądź manganem z ekstraktu wodnego z wydalin oraz z osadu alkoholowe-
go. Z danych tych widać, że zarówno mangan jak i bar strącają tylko
część frakcji P_7 . Nie wykluczone jest przy tym, że istnieją jakieś składni-

ki tej frakcji, które nie są strącane ani przez bar, ani przez mangan. Aby przekonać się o słuszności tego przypuszczenia, zastosowano kolejne strącanie związków fosforowych w tej samej próbie zarówno barem, jak i manganem: do przesączu po strąceniu chlorkiem baru dodawano octanu manganu i na odwrót. Wyniki zestawiono w tablicy 2. Z danych tych wynika, że frakcjonowane strącanie barem i manganem daje w sumie przeszło 90% wytrąconego P₇. Niezależnie od kolejności strącania manganu i baru wytrącają podobne ilości fosforanów, zawsze jednak pozostaje pewna ilość P₇ w przesączu. Wydaje się, że przy postępowaniu pierwszym, to znaczy strącaniu najpierw manganem, a następnie w przesączu — barem, otrzymuje się lepsze wyniki (mniej fosforanów pozostaje ostatecznie niestrąconych). Tak z solą barową jak i manganową wytrąca się razem z labilnymi związkami fosforowymi nieznaczna ilość ortofosforanu, którego zawartość oznaczano po rozpuszczeniu odpowiedniego osadu w 1 N H₂SO₄; ortofosforan oznaczano natychmiast po sporządzeniu roztworu, związki labilne — po 7 minutach hydrolizy w 100°.

W dalszych badaniach usiłowaliśmy scharakteryzować dokładniej obie frakcje labilnych związków fosforowych, to znaczy przekonać się, czy sól manganowa jest pirofosforanem, jak wynikałoby z metody Kornberga [7], a następnie określić bliżej pirofosforan występujący we frakcji soli barowej. Stosowano w tym celu chromatografię bibułową. Poddawano analizie chromato-

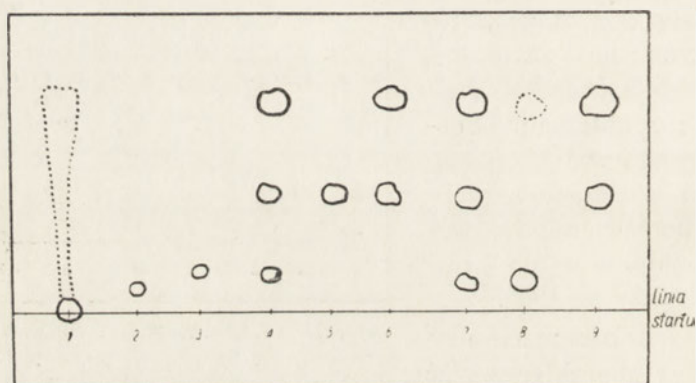
graficznej ekstrakt wodny z wydaliny oraz roztwory soli manganowej i barowej polifosforanów. Używano dwóch układów rozpuszczalników: kwaśnego, do rozdzielania polifosforanów łańcuchowych, o składzie: izopropanol 75 ml, woda 25 ml, kwas trójchlorooctowy 5 g, NH₃ stęż. 0,3 m, oraz alkalicznego do rozdzielania metafosforanów cyklicznych, o składzie: izopropanol 20 ml, izobutanol 20 ml, woda 39 ml, NH₃ stęż. 1 ml [2]. Chroma-



Rys. 1. Chromatogram związków fosforowych z wydaliny gąsienic mola woskowego i syntetycznych meta- i polifosforanów. Skład rozpuszczalnika: izopropanol 20 ml, izobutanol 20 ml, woda 39 ml, amoniak stęż. 1 ml. Oznaczenia: (1) sól Grahama, (2) tetrametafosforan, (3) trójmetafosforan, (4) ekstrakt wodny z wydaliny, (5) pirofosforan, (6) ortofosforan i pirofosforan, (7) osad soli barowej z ekstraktu wodnego z wydaliny otrzymany po uprzednim wytrąceniu soli manganowej. Słabe plamy i smugi oznaczono linią kropkowaną

togramy rozwijano (chromatografia wstępująca) w temp. 27° — 30° na bibule Whatman Nr 1 przemytej rozcieńczonym kwasem octowym. Czas nasycania 12 godzin, czas rozwijania około 8 godzin. Fosfor wywoływano odczynnikami benzydynamowo-molibdenowym. Jeden chromatogram wywoływano bez hydrolizy, drugi taki sam — po ogrzewaniu w suszarce bibuły rozpostartej na szkle i zwilżonej NH_4Cl w temp. około 80° przez 7—10 minut.

W rozpuszczalniku alkalicznym wyciąg wodny z wydalin daje dwie plamy: górna pochodzi od orto- i pirofosforanu (te dwa związki rozdzielają się źle w rozpuszczalniku alkalicznym), druga plama leży na linii startowej, pochodzi więc od związków, które nie wędrują w tych warunkach. Z umieszczonych obok dla porównania substancji syntetycznych: ortofos-



Rys. 2. Chromatogram związków fosforowych z wydalin gąsienic mola woskowego i syntetycznych meta- i polifosforanów. Skład rozpuszczalnika: izopropanol 75 ml, woda 25 ml, kwas trójchlorooctowy 5 g, amoniak stęż. 0,3 ml.

Oznaczenia: (1) sól Grahama, (2) tetrametafosforan, (3) trójmetafosforan, (4) ekstrakt wodny z wydalin, (5) pirofosforan, (6) ortofosforan i pirofosforan, (7) osad soli barowej z ekstraktu wodnego z wydalin otrzymany po uprzednim wytrąceniu soli manganowej, (9) osad soli manganowej z ekstraktu wodnego z wydalin. Słabe plamy i smugi oznaczono linią kropkowaną

foranu, pirofosforanu, trój- i tetrametafosforanu oraz soli Grahama — na linii startu pozostaje tylko sól Grahama (rys. 1). W rozpuszczalniku kwaśnym wyciąg wodny daje trzy wyraźne plamy: jedna odpowiada ortofosforanowi, druga pirofosforanowi, trzecia położona jest najbliżej linii startu i znajduje się na tym samym poziomie, co plama trójmetafosforanu (rys. 2).

Przypuszczeniu, że w wyciągu wodnym z wydalin znajduje się trójmetafosforan, przeczy fakt, że na chromatogramie w rozpuszczalniku alkalicznym nie było odpowiadającej mu plamy. Z drugiej strony istnieje możliwość rozłożenia się labilnego związku wielkocząsteczkowego na związek o małej cząsteczce podczas rozwijania chromatogramu w rozpuszczalniku kwaśnym.

Chromatografia soli barowej otrzymanej przez bezpośrednie strącenie samym barem (bez uprzedniego usunięcia pirofosforanu manganem) daje trzy plamy identyczne z otrzymanymi z wyciągu wodnego (rozpuszczalnik kwaśny). Chromatografia soli manganowej daje dwie plamy: orto- i pirofosforanu. Analiza chromatograficzna soli barowej, otrzymanej przez strącenie barem po uprzednim usunięciu pirofosforanu, daje tylko jedną plamę na poziomie trójmetafosforanu w rozpuszczalniku kwaśnym (rys. 2), a w rozpuszczalniku alkalicznym plamę na linii startu (rys. 1).

Metodą chromatografii potwierdzono więc poprzednie wyniki, otrzymane przy frakcjonowanym strącaniu solami baru i manganu. Przekonano się, że frakcja soli manganowej zawiera tylko pirofosforan i ortofosforan, natomiast frakcja soli barowej — polifosforan, który podczas chromatografii w rozpuszczalniku alkalicznym zachowuje się tak jak związek wielkocząsteczkowy, natomiast podczas chromatografii w rozpuszczalniku kwaśnym prawdopodobnie rozkłada się na związek o mniejszej cząsteczce.

W dalszych próbach identyfikacji polifosforanu stosowano dializę. Chcieliśmy przekonać się, czy polifosforan z wydalin dializuje, czy też jest to związek wielkocząsteczkowy, niedializujący. Stosowano dializę ekstraktu wodnego z wydalin przez celofan wobec wody w temp. 0°. Stwierdzono, że po dializie z przepływem, trwającej 24 godziny, nie przedializowało około $\frac{1}{4}$ zawartego początkowo P₇. Octan manganu nie strącał osadu z pozostającego roztworu, chlorkiem baru przy pH = 5 strąciło się około 85% całego fosforu w tej pozostałości. Po dializie 48 godzinnej z przepływem pozostało tylko 13% P₇ początkowo zawartego. W pozostałości chlorkiem baru przy pH = 5 wytrąciło się 70% P₇. Substancję nie dializującą badano następnie chromatograficznie; w rozpuszczalniku alkalicznym dawała ona tylko jedną plamę na linii startu. Roztwór niedializującego polifosforanu wykazuje bardzo wyraźnie reakcję metachromatyczną z błękitem toluidynowym, podobnie jak cała frakcja strącająca się solami baru; sól manganowa reakcji tej nie wykazuje. Wszystko to wskazuje, że polifosforan z frakcji P₇ wydalin jest związkiem o dużej cząsteczce, dializującym bardzo wolno w porównaniu z pirofosforanem, który szybko przechodzi przez celofan, bądź też ulegającym rozpadowi w czasie 24 lub 48 godzin dializy.

Związki wchodzące w skład frakcji P₇ wydalin próbowaliśmy również scharakteryzować za pomocą ich enzymatycznej hydrolizy. Już S. Niemierko i W. Niemierko [11] wykazali, że miazga z gąsienic mola

woskowego hydrolizuje labilne związki fosforowe zawarte w wydalinach tych gąsienic. Następnie S. Niemierko i A. Wojtczak [12] stwierdziły w miazdze obecność pirofosfatazy. Własności pirofosfatazy mola woskowego zostały obecnie dokładniej poznane [17], przy czym stwierdzono aktywowanie enzymatycznej hydrolizy pirofosforanu przez jony Mg^{++} , a hamowanie przez jony Mn^{++} . Opierając się na tych spostrzeże-

Tablica 3

Wpływ jonów Mg^{++} i Mn^{++} na enzymatyczną hydrolizę labilnych związków fosforowych z wydalin przy użyciu miazgi z gąsienic mola woskowego

Każda próba zawierała: 1) labilne związki fosforowe w ilości odpowiadającej 1 mg P, 2) 2 ml miazgi, 3) 0,5 ml 0,01 M $MgCl_2$ względnie 0,5 ml 0,01 M $MgCl_2$ i 0,5 ml 0,01 M $MnCl_2$, 4) roztwór buforowy glikokolowo-węglanowy o pH=8 lub octanowy o pH=5,5 do ogólnej objętości 5 ml. Czas inkubacji: 2 godz., temperatura 37°

pH	Substrat	Dodane jony	
		Mg^{++}	Mg^{++} i Mn^{++}
		ilość rozłożonego P ₇ w %/%	
8	Ekstrakt wodny z wydalin	100	—
	Pirofosforan syntetyczny	100	50
	Sól manganowa z wydalin	93	30
	Sól manganowa z wydalin	90	57
	Sól barowa z wydalin	100	100
	Sól barowa z wydalin	100	93
5,5	Ekstrakt wodny z wydalin	47	20
	Pirofosforan syntetyczny	10	7
	Sól manganowa z wydalin	17	10
	Sól barowa z wydalin	36	—

niach przebadaliśmy zachowanie się soli barowej i soli manganowej frakcji P₇ pod wpływem enzymów miazgi z gąsienic. Doświadczenie przeprowadzono przy pH = 7,5 do 8, optymalnym dla pirofosfatazy [17] oraz przy pH = 5 (słabe działanie pirofosfatazy). Z roztworów soli barowej bar usunięto jako $BaSO_4$, z roztworów soli manganowej manganu nie usuwano. Tablica 3 zestawia wyniki enzymatycznej hydrolizy piro- i polifosforanu z wydalin pod wpływem miazgi z gąsienic przy pH około 8 oraz pH 5,5. Dla porównania podano, jak przebiega enzymatyczna hydroliza pirofosforanu syntetycznego. Widzimy, że związek strącający się z ekstraktu wodnego manganem hydrolizuje pod wpływem miazgi podobnie jak piro-

fosforan syntetyczny. W obu wypadkach występuje charakterystyczne dla pirofosfatazy obniżenie aktywności pod wpływem jonów Mn w porównaniu do aktywności w obecności jonów Mg. Przy $\text{pH} = 5,5$ miazga wykazuje słabą aktywność enzymatyczną zarówno względem pirofosfo-

Tablica 4

Enzymatyczna hydroliza meta- i polifosforanów syntetycznych i pochodzenia biologicznego oraz glicerofosforanu pod wpływem miazg z jelita i wątroby żaby oraz miazgi z gąsienicy mola woskowego. Każda próba zawierała: substrat w ilości odpowiadającej około 1 mg P, 3 ml miazgi w roztworze buforowym o $\text{pH}=8$, (300 mg tkanki rozartej w 2,7 ml buforu). 0,5 ml 0,01 M MgCl_2 . Czas inkubacji — 2 godz., temperatura — 37°

Substrat	Miazga z:		
	jelita żaby	wątroby żaby	gąsienic mola wos- kowego
	ilość rozłożonego P_7 w %%		
Ekstrakt wodny z wydalin	100	100	100
Pirofosforan	100	100	100
Glicerofosforan	30	—	50
Trójpolifosforan	—	100	100
Trójmetafosforan	—	3*)	5*)
Tetrametafosforan	—	0	0
Sól Grahama	—	0	0
Polifosforan z drożdży	—	0	0

*) Jak wykazały analizy chromatograficzne, trójmetafosforan był nieznacznie zanieczyszczony trójpolifosforanem.

ranu syntetycznego i soli manganowej z wydalin, jak również ekstraktu wodnego z wydalin. Frakcja związków fosforowych z wydalin wytrącających się barem zachowuje się odmiennie pod wpływem enzymów z miazgi niż sól manganowa. Jony Mg i Mn aktywują w tym samym stopniu enzymatyczną hydrolizę soli barowej. Przy $\text{pH} = 5$ intensywność enzymatycznego rozkładu soli barowej jest prawie dwukrotnie wyższa niż intensywność hydrolizy pirofosforanu. Wynika z tego, że polifosforan z wydalin nie jest rozkładany przez pirofosfatazę, lecz przez inny enzym.

Aby przekonać się, czy polifosforany frakcji P_7 rozkładane są przez jakiś szczególny enzym występujący tylko u owadów, działaliśmy na ekstrakt wodny z wydalin miazgą z jelita oraz wątroby żaby. (W pracach poprzednich [11] działano na labilne związki fosforowe z wydalin gąsienic miazgą z mięśni królika i otrzymywano częściowy ich rozkład). Jak wiadomo, w narządach tych obecne są zarówno pirofosfataza, jak i różne inne fosfatazy. Dla porównania poddawano działaniu miazg również metafosforany syntetyczne, pochodzący z drożdży wielkocząsteczkowy polifosforan izolowany metodą Wiame'a [16] oraz glicerofosforan (tablica 4). Pod wpływem miazgi z jelita i wątroby żaby oraz miazgi z gąsienic rozkłada się 100% P_7 z wydalin, a więc zarówno piro- jak i polifosforan.

Z doświadczenia tego widać, że z przebadanych związków jedynie pirofosforan i trójpolifosforan rozkładają się równie łatwo jak frakcja P_7 z wydalin. Z poprzednich jednak badań (chromatografia i dializa) wynika jasno, że polifosforan frakcji P_7 nie jest trójpolifosforanem, lecz związkiem wysoko-cząsteczkowym.

W dalszych badaniach próbowaliśmy oznaczyć skład ilościowy polifosforanu, mierząc stosunki ilościowe metalu do fosforu w soli srebrowej. Nie mogliśmy jednak uzyskać prawidłowych wyników, ponieważ przeszkadza strącający się razem ze związkami fosforowymi kwas moczowy, znajdujący się w znacznych ilościach w wydalinach.

Badając jakościowo skład soli barowej, stwierdziliśmy obecność pentozy na podstawie reakcji z orcyną. W dalszych badaniach będziemy usiłowali osądzić, czy pentoza ta jest związana z badanym przez nas polifosforanem.

Dyskusja i wnioski

Badania niniejsze wykazały, że wydaliny gąsienic mola woskowego zawierają pirofosforan oraz nie zidentyfikowany bliżej polifosforan. Związki te, stanowiące w sumie frakcję labilnych połączeń fosforowych (P_7), występują w wydalinach mniej więcej w jednakowych ilościach. Obecność pirofosforanu stwierdzono za pomocą kilku metod: wytrącania solami manganu, chromatograficznie, enzymatycznie — rozkładając sól manganową miazgą z gąsienic, przy czym stwierdzono, że optimum pH i zachowanie względem jonów Mg i Mn jest podobne jak dla hydrolizy enzymatycznej pirofosforanu syntetycznego.

Próby charakterystyki polifosforanu wytrącającego się jako sól barowa wykazały, że jest on związkiem wielkocząsteczkowym, ponieważ daje reakcję metachromatyczną, trudno lub wcale nie dializuje, nie wędruje na bibule podczas chromatografii (w rozpuszczalniku alkalicznym). Ze wzglę-

du na wyżej wymienione cechy polifosforan z wydalin podobny jest do polifosforanu syntetycznego, tak zwanej soli Grahama. Polifosforan ten różni się jednak od soli Grahama tym, że 1) nie wytrąca się chlorkiem baru przy $\text{pH} = 2$, lecz wytrąca się dopiero przy $\text{pH} = 5$, 2) jest rozkładany enzymatycznie przez miazgi z narządów zwierząt wyższych (żaba), które nie wykazują aktywności enzymatycznej względem soli Grahama.

Stwierdzono, że polifosforan z wydalin gąsienicy mola woskowego nie jest identyczny z żadnym z meta- i polifosforanów, z którymi próbowano go w tych badaniach porównać.

Streszczenie

Stwierdzono, że frakcja labilnych połączeń fosforowych, znajdujących się w wydalinach gąsienic *Galleria mellonella*, zawiera około 50% pirofosforanu oraz tyleż samo polifosforanu. Pirofosforan izolowano z ekstraktu wodnego z wydalin w postaci soli manganowej. Pirofosforan manganu zidentyfikowano: 1) metodą chromatografii bibułowej, 2) enzymatycznie — dzięki stwierdzeniu, że miazga z gąsienic rozkłada go do ortofosforanu w takich samych warunkach, w jakich rozkłada syntetyczny pirofosforan. Polifosforan wyizolowano z wydalin jako sól barową. Na podstawie badań chromatograficznych i dializy stwierdzono wysokocząsteczkowy charakter tego związku. Przeprowadzono enzymatyczną hydrolizę polifosforanu przez miazgi z jelita i wątroby żaby oraz miazgę z gąsienic *Galleria mellonella*. Wykazano, że hydroliza polifosforanu pod wpływem wyżej wymienionych miazg zachodzi najlepiej przy pH około 8 i wobec jonów Mg^{++} lub Mn^{++} .

LITERATURA

- [1] Ebel J. P., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **34**, 321, 1952.
- [2] Ebel J. P., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **34**, 330, 1952.
- [3] Ebel J. P., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **34**, 491, 1952.
- [4] Ebel J. P., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **34**, 498, 1952.
- [5] Heller. J., Karpiak St., Zubikowa I., *Nature* **166**, 187, 1950.
- [6] Ingelman B., Malmgren H., *Acta Chem. Scand.* **4**, 478, 1950.
- [7] Kornberg A., *J. Biol. Chem.* **182**, 782, 1950.
- [8] Mann T., *Biochem. J.* **38**, 345, 1944.
- [9] Niemierko S., Niemierko W., *Abstr. of Commun. 1-st Internat. Congress of Biochem.*, Cambridge, 620, 1949.
- [10] Niemierko S., Niemierko W., *Nature* **166**, 268, 1950.
- [11] Niemierko S., Niemierko W., *Acta Biol. Exper.* **15**, 111, 1950.
- [12] Niemierko S., Wojtczak A., *Acta Physiol. Pol.*, Prace III Zjazdu P. T. Fizjol., 217, 1952.

- [13] Opieńska-Blauth J., Madecka-Borkowska J., Borkowski T., *Acta Physiol. Pol.* 3, 315, 1952.
- [14] Thilo E., *Chemische Technik* 4, 345, 1953.
- [15] Umbreit W. W., Burris R. H., Stauffer J. F., *Manometric techniques and related methods for the study of tissue metabolism*. Burgess Publishing Co, Minneapolis 1945.
- [16] Wiame J. M., *J. Biol. Chem.* 178, 919, 1949.
- [17] Wojtczak A. B., *Acta Biochim. Pol.* 3, 369, 1956.

ФОСФОРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ В ЭКСКРЕМЕНТАХ
БОЛЬШОЙ ВОЩИННОЙ МОЛИ (*GALLERIA MELLONELLA*)

I. Идентификация

Резюме

Автор констатировал, что в экскрементах гусениц большой воцинной моли (*Galleria mellonella*) пиро- и полифосфаты выступают в приблизительно равных количествах. Пиро- и полифосфаты были изолированы из водного экстракта экскрементов путем очередного осаждения уксуснокислым марганцем и хлористым барием при $\text{pH} = 5$.

Пирофосфат марганца идентифицировано хроматографическими методами, а также используя факт, что пирофосфатаза разлагает его до ортофосфата в тех же условиях, в каких она разлагает и синтетический пирофосфат.

Изолированный в виде соли бария полифосфат исследовался путем как хроматографии, так и диализа. Хроматографические исследования проводились с применением кислого и щелочного растворителей. В щелочном растворителе полифосфат из экскрементов ведет себя аналогично, как макромолекулярный синтетический полифосфат. В кислом растворителе, по всей вероятности, наступает гидролиз полифосфата до соединения, состоящего из более мелких молекул.

Полифосфат из экскрементов диализуется очень медленно по сравнению с пирофосфатом. В водном растворе он проявляет интенсивную метахроматическую реакцию. Хроматографический анализ, реагирование во время диализа и метахроматическая реакция указывают на высокомолекулярный характер полифосфата, полученного из экскрементов воцинной моли.

Изолированный из экскрементов в виде бариевой соли полифосфат, подвергался ферментатическому гидролизу. Констатировано, что под влиянием кашицы из гусениц воцинной моли, а также из кишечника и печени лягушки гидролизуется он до ортофосфата. Наиболее быстро гидролиз протекал при pH около 8 и в присутствии ионов Mg^{++} или Mn^{++} .

PHOSPHOROUS COMPOUNDS IN THE EXCRETA OF THE WAX MOTH
GALLERIA MELLONELLA

I. IDENTIFICATION

Summary*)

The nature of the labile phosphorous fraction derived from the excreta of the wax moth (*Galleria mellonella* L.) larvae was investigated. Pyrophosphate and some polyphosphate were found to be the main components of this fraction. Pyrophosphate was identified by means of chromatographic analysis of the manganese precipitate from the water extract of excreta and by the way it was split by the pyrophosphatase of the wax moth larvae. Pyrophosphate amounted to a half of the labile phosphorous compounds of excreta.

Polyphosphate was isolated from the excreta as barium salt. When examined chromatographically and by means of dialysis it appeared to be a rather macromolecular polymer, very labile in acid medium. The metachromatic reaction with toluidine blue of this polyphosphate was very pronounced. It was easily hydrolyzed enzymatically to orthophosphate by the wax moth larvae homogenates and by the homogenates of frog organs.

Otrzymano 18.2.1956 r.

*) The full text appears in English in *Acta Biologiae Experimentalis*, 17, 232, 1956.

A. B. WOJTCZAK

**ZWIĄZKI FOSFOROWE W WYDALINACH MOLA WOSKOWEGO
(*GALLERIA MELLONELLA*)****II. ENZYMATYCZNA HYDROLIZA**

Z Zakładu Biochemii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego w Warszawie
Kierownik: prof. dr W. Niemierko

W poprzednich pracach [13, 14] stwierdzono, że miazga z gąsienic *Galleria mellonella* rozkłada piro- i polifosforany wydalone przez te gąsienice. Celem niniejszych badań było ustalenie optymalnych warunków enzymatycznej hydrolizy piro- i polifosforanów oraz zbadanie pirofosfatazy, występującej u gąsienic mola woskowego.

Metody

W doświadczeniach nad enzymatyczną hydrolizą piro- i polifosforanów używano miazgi ze świeżych gąsienic mola woskowego (*Galleria mellonella*). Gąsienice homogenizowano w oziębionym do temp. 0° roztworze buforowym (na 100 mg masy gąsienic — 0,9 ml buforu) w homogenizatorze Pottera i Elvehjema [15], następnie odwirowywano nieroztarte części chitynowe. Stosowano roztwory buforowe o następującym składzie: 1) roztwór o pH = 8 : glikokol 0,3 M i NaHCO₃ 0,15 M w stosunku 1 : 1; 2) roztwór o pH = 9 : NH₄Cl 0,15 M i roztwór wodny amoniaku 0,2% w stosunku 1 : 1; 3) bufor octanowy o pH 5,5.

Badanymi substratami były: 1) ekstrakt wodny z wydalin gąsienic mola woskowego zawierający piro- i polifosforan (ekstrakt ten zawierał i inne substancje z wydalin rozpuszczalne w wodzie, a więc między innymi sole nieorganiczne oraz dość duże ilości kwasu moczowego; oznaczone w wydalinach zawartości wapnia i magnezu wynoszą odpowiednio 0,3% i 0,4%; pH ekstraktu wodnego waha się około 5), 2) pirofosforan sodu Na₄P₂O₇ bezwodny, Merck p. a., 3) polifosforany syntetyczne: trój- i tetrametafosforan,

trójpolifosforan i sól Grahama pochodzące z pracowni prof. Thilo w Berlinie, 4) glicerofosforan sodu, Merck p. a.

Enzymatyczną hydrolizę przeprowadzono w probówkach trzymanyh w łaźni wodnej ultratermostatu Höplera w temp. 37° od 15 minut do 3 godzin zależnie od rodzaju doświadczenia. Każda badana próba zawierała: 3 ml miazgi w roztworze buforowym, substraty: pirofosforan, trójmetafosforan, tetrametafosforan i trójpolifosforan w stężeniu ostatecznym 0,004 M oraz sól Grahama i wyciąg wodny z wydalin w ilościach odpowiadających 0,2 mg P/ml oraz jony aktywatorów lub inhibitorów w ostatecznym stężeniu 0,001 M. Objętość próby wynosiła 5 ml. Próby kontrolne zawierały: 1) ekstrakt wodny z wydalin lub roztwór fosforanów w buforze, 2) 3 ml miazgi w roztworze buforowym. Reakcję enzymatyczną przerywano przez umieszczenie probówek w lodzie i odbiałczenie 10% kwasem trójchlorooctowym. Odbiałczony roztwór sączono w temp. 0°. Ortofosforan i labilne związki fosforowe (P₇) oznaczono metodą Fiskego i Subbarowa [17]. Ilość rozłożonego enzymatycznie piro- względnie polifosforanu obliczano odejmując od Δ P₇ oznaczonego w próbie badanej wartość Δ P₇ w próbie kontrolnej.

W badaniach nad własnościami pirofosfatazy mola woskowego enzym izolowano z gąsienic uproszczoną przez nas metodą Elroy'a [11]. Sposób otrzymywania częściowo oczyszczonego preparatu enzymatycznego był następujący: 5 g gąsienic wysuszonych w próżni nad kwasem siarkowym w temp. pokojowej rozcierano w wodzie w temp. 0° ekstrahując kilka razy, łącznie 100 ml wody. Następnie odwirowywano w temp. 0° przy 3000 obrotów/min. Supernatant doprowadzano za pomocą N NaOH do pH = 7, po czym dodawano acetonu w takiej ilości, by stężenie acetonu wyniosło 60%. Całość oziębiano w temp. -17° przez 15 minut, po czym wirowano również w temp. -17°. Osad rozpuszczano w temp. 0° w 30 ml wody i dodawano stałego siarczanu amonu do 30% nasycenia. Roztwór doprowadzano do pH = 7 i pozostawiano w temp. 0° przez 15 minut, po czym odwirowywano i osad odrzucano. Do supernatantu dodawano stałego siarczanu amonu do 80% nasycenia i odwirowywano jak poprzednio. Osad rozpuszczano w 20 ml wody. Wprowadzone przez nas uproszczenie polegało na opuszczeniu drugiego frakcjonowania acetonem i pominięciu końcowej absorpcji enzymu na żelu krzemionkowym. Otrzymany w ten sposób preparat pirofosfatazy jest zanieczyszczony APT-azą, której aktywność równa jest około 1/5 aktywności pirofosfatazy. Celem zinaaktywowania ATP-azy preparat zamrażano do temperatury około -5° przez noc, a następnie przetrzymywano w temperaturze pokojowej 3-4 godz. Według L i p m a n a i K a p l a n a [5] procedura taka niszczy ATP-azę; w naszych warunkach metoda ta okazała się również skuteczna.

Po tygodniowym przechowywaniu preparatu w stanie zamrożonym pirofosfataza traciła około połowy aktywności.

Część doświadczalna

I. HYDROLIZA PIRO- I POLIFOSFORANÓW (FRAKcji P.) Z WYDALIN GĄSIENIC MOLA WOSKOWEGO POD WPŁYWEM ENZYMÓW ZAWARTYCH W MIAZDZE

Ponieważ ekstrakt wodny z wydalin zawiera piro- i polifosforan, obserwowany efekt enzymatyczny jest sumą działania enzymów miazgi na te dwa substraty.

1. Wpływ pH. Wpływ pH na enzymatyczną hydrolizę piro- i polifosforanów występujących w wydalinach mola woskowego przedstawia rysunek 1. Badano aktywność enzymatyczną w zakresie pH od 5 do 9. Optimum pH hydrolizy frakcji P₇ wynosi, jak widać z rysunku 7—7,5. W miarę wzrostu pH powyżej optimum aktywność enzymu maleje szybciej niż w miarę obniżenia pH poniżej optimum; przy pH = 5 hydrolizowało około 50% P₇, przy pH = 9 tylko około 10% P₇.

2. Wpływ temperatury. Zbadano przebieg hydrolizy w temperaturach 24°, 37° i 54°. W doświadczeniach tych pozostałe warunki, to jest stężenie substratu, stężenie enzymu (miazgi) i pH były jednakowe, zmiany w zachodzącym procesie można więc było odnieść tylko do wpływu różnych temperatur. Hydrolizę enzymatyczną prowadzono przez 3 godziny, badając w kolejnych odcinkach czasu: 15 min., 30 min., 1 godz., 2 godz. i 3 godz. ilość uwolnionego ortofosforanu. Wyniki ilustruje rysunek 2, wartości są średnimi z 3—6 doświadczeń.

Temperatura 37° okazała się optymalną; po 3 godzinach zostaje rozłożone prawie 100% P₇, przy czym po 1 godzinie już 80% P₇ ulega hydrolizie. W temp. 24° hydroliza przebiega bardzo wolno; szybkość hydrolizy w pierwszych 15 minutach jest o połowę mniejsza w porównaniu z szybkością w temp. 37°. Po 2 godzinach dochodzi tylko do 40% rozkładu, podczas gdy w temp. 37° w tym samym czasie ulega rozpadowi ponad 90% P₇. Temperatura 54° leży powyżej optymalnej; pomimo że szybkość hydrolizy w pierwszych 15 minutach jest wyższa o 50% od szybkości w temperaturze 37°, to jednak w dalszym przebiegu doświadczenia, prawdopodobnie na skutek inaktywacji cieplnej enzymu, hydroliza zachodzi znacznie wolniej, osiągając po 1 godzinie tylko 60% rozkładu P₇ przy całkowitej inaktywacji enzymu.

3. Wpływ jonów Mg, Mn, Co, Zn, Ag i Hg. Celem dalszych doświadczeń było zbadanie wpływu aktywującego względnie inhibitującego różnych kationów na enzymatyczną hydrolizę poli- i pirofosforanów. Wyniki przedstawia tablica 1. Należy zwrócić uwagę, że we wszystkich próbach, a więc

i w tych, do których nie dodawano żadnego metalu, znajdowało się wiele substancji występujących normalnie w wydalinach gąsienic. Nie przeprowadzono dokładnej analizy związków nieorganicznych, znajdujących się w wydalinach, oznaczono jedynie zawartość wapnia i magnezu, które występują w ilościach 0,4% i 0,3%.

Z tablicy widać, że: 1) silny wpływ aktywujący wykazują jony Mg i Co; przy wyższym pH wpływ ten jest słabszy, 2) przy pH = 6,6 aktywują rów-

Tablica 1

Wpływ jonów metali na enzymatyczną hydrolizę piro- i polifosforanów wydalaných przez gąsienicę mola woskowego
 Próby zawierały: 3 ml miazgi, labilne związki fosforowe z wydalin (hydrolizujące w N HCl w 100° w ciągu 7 minut do ortofosforanu) w ilości odpowiadającej 1 mg fosforu oraz badany kation o ostatecznym stężeniu 0,003 M. Inkubacja trwała 15 minut w temperaturze 37°

Dodane sole	pH=5,5		pH=6,6	
	Ilość uwolnionego P w mg	Aktywność w %/%)	Ilość uwolnionego P w mg	Aktywność w %/%)
—	0,12	100	0,20	100
MgSO ₄	0,25	208	0,24	135
MnCl ₂	0,08	67	0,25	145
CoSO ₄	0,28	234	0,26	155
ZnSO ₄	0,09	75	0,03	15
AgNO ₃	0,05	42	.	.
HgCl ₂	0,02	17	.	.

*) Ilość rozłożonego P, w próbie nie zawierającej dodanego kationu przyjęto za 100 %.

niez jony Mn, jakkolwiek przy pH = 5,5 mangan w małym stopniu hamuje hydrolizę, 3) Zn przy pH = 6,6 hamuje reakcję w stopniu bardzo znacznym, 4) silnymi inhibitorami przy pH = 5,5 są jony Hg i Ag oraz w mniejszym stopniu jony Zn.

II. WŁASNOŚCI PIROFOSFATAZY MOŁA WOSKOWEGO

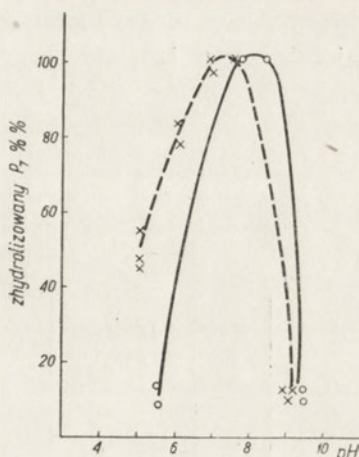
Obecność pirofosfatazy w tkankach gąsienicy mola woskowego wykazana została już poprzednio [14]. W pracy niniejszej przystąpiliśmy do zbadania jej własności. Chcieliśmy również ustalić, czy polifosforan hydrolizowany przez miazgę z gąsienic rozkładany jest przez pirofosfatazę, czy też przez inny enzym zawarty w miazdze.

W poniższych doświadczeniach substratem był pirofosforan sodu bezwodny firmy Merck. We wszystkich doświadczeniach używaliśmy miazgi, z gąsienic, z wyjątkiem doświadczeń mających na celu stwierdzenie specyficzności enzymu. Do badania specyficzności sporządzono częściowo oczyszczony preparat enzymatyczny według metody podanej w części metodycznej.

1. Optimum pH. Badano aktywność enzymatyczną w zakresie pH od 5,5 do 9,3. Optymalne pH rozkładu pirofosforanu okazało się wyższe niż dla poli- i pirofosforanu z wydalin (P_7) i wynosi 7,5 — 8,3 (rysunek 1). Silniej hamuje hydrolizę pirofosforanu środowisko bardziej alkaliczne od optymalnego niż bardziej kwaśne. Przy pH = 9,3 rozkłada się tylko około 10% pirofosforanu, a przy pH = 6,6 jeszcze około 70%. Zbliżone optimum pH posiadają pirofosfatazy z wątroby świni (1) oraz z robaczka świętojańskiego *Phctinus pyralis* [11]. Natomiast pirofosfatazy z drożdży [3] i z pleśni *Penicillium chrysogenum* (8) mają optima niższe, wynoszące odpowiednio 7,0 i około 6.

2. Wpływ temperatury. Optimum temperatury wynosi około 37°. Podwyższenie temperatury do 50° szybko inaktywuje enzym. Miazga z gąsienic ogrzewana przez 1 godzinę w temp. 60° (pH = 7) całkowicie traci aktywność pirofosfatazy.

3. Wpływ jonów Mg^{++} , Co^{++} , Mn^{++} , Ca^{++} i Fe^- . Stwierdzono, że pirofosfataza z miazgi z gąsienic jest zupełnie nieaktywna w nieobecności jonów Mg^{++} . Optymalne stężenie Mg^{++} , powyżej którego nie obserwuje się już wzrostu aktywności, wynosi 0,004 M. Przy dużo wyższych stężeniach Mg^{++} , około 0,1 M, obserwowano znaczne hamowanie pirofosfatazy (około 80% hamowania). Wpływ jonów Mg^{++} , Co^{++} , Mn^{++} , Ca^{++} i Fe^- po-



Rys. 1. Wpływ pH na enzymatyczną hydrolizę pirofosforanu (o—o) i frakcji labilnych związków fosforowych z wydalin gąsienic mola woskowego (x---x). Hydrolizę pirofosforanu przeprowadzano w temperaturze 37° w ciągu 1 godziny. Próby zawierały: 3 ml miazgi w roztworze buforowym, 1 ml 0,02 M pirofosforanu sodu i 0,5 ml 0,05 M $MgSO_4$. Hydrolizę frakcji P_7 z wydalin przeprowadzano w temperaturze 37° w ciągu 3 godzin. Próby zawierały: 3 ml miazgi w roztworze buforowym i 2 ml ekstraktu wodnego z wydalin zawierającego około 0,5 mg labilnego fosforu. Stosowane roztwory buforowe: w zakresie pH od 5 do 6 — bufor octanowy, w zakresie pH od 6,5 do 8,5 — bufory glikokolowe (glikokol + HCl lub glikokol + $NaHCO_3$) oraz dla pH 9 i 9,5 chlorek amonu + amoniak

daje tablica 2. Jony Mn^{++} hamują hydrolizę prawdopodobnie dlatego, że wytrąca się nierozpuszczalny pirofosforan manganu. Stopień zahamowania zależy od stężenia substratu; im wyższe stężenie pirofosforanu, tym słabszy efekt hamujący manganu. To samo zjawisko stwierdził S j ö b e r g [16] w przypadku pirofosfatazy z erytrocytów konia

Tablica 2

Wpływ jonów metali oraz fluorku na aktywność pirofosfatazy mola woskowego.

Warunki hydrolizy: stężenie pirofosforanu 0,004 M, pH=8, czas inkubacji 15 minut, temperatura 37°

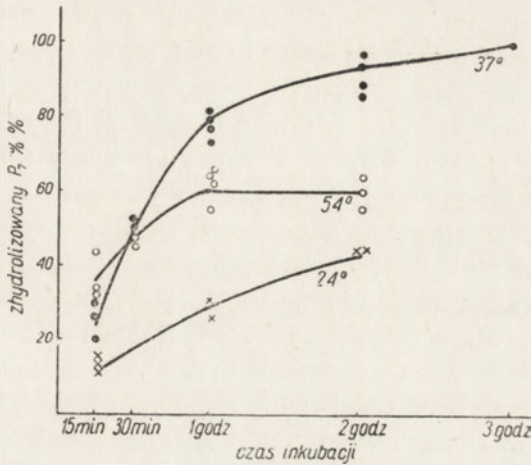
Nr dośw.	Dodane sole	Ostateczne stężenie	Ilość uwolnionego P w mg	Aktywność w %/%)*)
1	MgSO ₄	5 · 10 ⁻³ M	0,152	100
2	MgSO ₄	1 · 10 ⁻³ M	0,099	66
3	CaCl ₂ MgSO ₄	1 · 10 ⁻³ M 5 · 10 ⁻³ M	0,086	56
4	CaCl ₂ MgSO ₄	5 · 10 ⁻³ M 5 · 10 ⁻³ M	0,008	5
5	MnSO ₄ MgSO ₄	1 · 10 ⁻³ M 5 · 10 ⁻³ M	0,077	50
6	MnSO ₄ MgSO ₄	1 · 10 ⁻³ M 5 · 10 ⁻³ M	0,039**)	26
7	CoSO ₄ MgSO ₄	1 · 10 ⁻³ M 1 · 10 ⁻³ M	0,150	100
8	NaF MgSO ₄	1 · 10 ⁻³ M 5 · 10 ⁻³ M	0,034	22

*) Aktywność pirofosfatazy w obecności Mg^{++} o stężeniu 5 · 10⁻³ M przyjęto za 100%

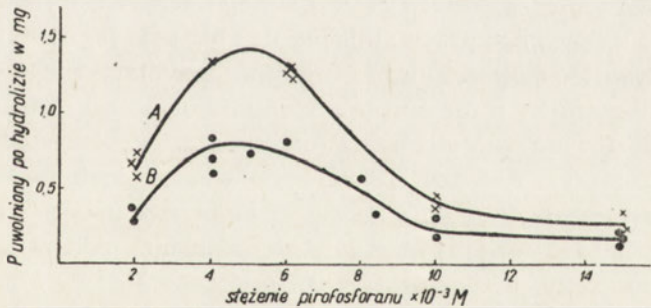
***) Stężenie pirofosforanu wynosiło 0,002 M.

i M c E l r o y [11] dla pirofosfatazy z robaczka świętojańskiego. W doświadczeniach niniejszych stwierdzono, że jony Co^{++} aktywują enzym jedynie w obecności choćby niewielkiej ilości jonów Mg^{++} . Inaktywacja jonami Ca zależy od stosunku Ca : Mg. Przy stosunku Ca : Mg wynoszącym 0,2 osiąga się około 50% aktywności, przy stosunku Ca : Mg = 1 — prawie

całkowite zahamowanie. Ten sam efekt opisano dla pirofosfatazy robaczka świętojańskiego [11]. Silnym inhibitorem badanego przez nas enzymu, podobnie jak i wszystkich znanych pirofosfataz, są jony Fe^{2+} .



Rys. 2. Wpływ temperatury na enzymatyczną hydrolizę frakcji P_7 z wydaliny. Próby zawierały: 3 ml miazgi w buforze glikokolowo-węglanowym o $pH = 7,5$ i 2 ml ekstraktu wodnego z wydaliny zawierającego około 0,5 mg labilnego fosforu



Rys. 3. Wpływ stężenia substratu na enzymatyczną hydrolizę pirofosforanu. Krzywa A — 1 ml miazgi z gąsienic, krzywa B — 0,5 ml miazgi; stężenie $MgSO_4$ 0,004 M. Każdą próbę dopełniono do objętości 5,0 ml buforem glikokolowo-węglanowym o $pH = 8$.

Czas inkubacji wynosił 15 minut, temperatura 37°

4. Wpływ stężenia substratu. Wszystkie opisane pirofosfatazy [3], [11], [16] posiadają szczególną własność odróżniającą je od innych enzymów. Jest to zjawisko hamowania enzymatycznej hydrolizy przez nadmiar substratu. Celem przekonania się, czy podobnie zachowuje się pirofosfataza

z *Galleria mellonella*, przeprowadzono szereg doświadczeń, w których zmienne było stężenie pirofosforanu. Wyniki przedstawiono na rysunku 3, który podaje zależność aktywności enzymu od stężenia pirofosforanu w mg fosforu uwolnionego w postaci ortofosforanu podczas pierwszych 15 minut hydrolizy. Stwierdzono, że optymalne stężenie pirofosforanu dla pirofosfatazy gąsienic mola woskowego wynosi 0,004 M. Powyżej tego stężenia następuje znaczne obniżenie aktywności enzymu; przy stężeniu 0,008 M, to jest dwukrotnie wyższym niż optymalne, szybkość hydrolizy jest dwukrotnie niższa, a przy stężeniu 0,015 M maleje do kilkunastu procent w stosunku do prędkości maksymalnej. Wyliczona z wykresu stała Michaelisa wynosi $2,3 \cdot 10^{-3}$ M. Optymalne stężenia substratu dla innych pirofosfataz wahają się dość znacznie: dla pirofosfatazy robaczka świętojańskiego wynosi ono 0,0004 M [11], z erytrocytów konia 0,001 M [16], z drożdży 0,0001 M [3]. Stała Michaelisa dla wszystkich tych enzymów jest bardzo mała, rzędu 10^{-4} — 10^{-3} M. Świadczy to o dużym powinowactwie enzymu do substratu, co sprawia, że pirofosfataza intensywnie rozkłada pirofosforan już przy bardzo niskich jego stężeniach w środowisku. Z tego właśnie względu przypisuje się pirofosfatazie ważną rolę regulującą w tych przemianach biochemicznych, w których powstaje pirofosforan jako jeden z produktów reakcji. Dla przykładu przytoczyć tu można reakcje syntezy nukleotydów [7], aktywacji kwasów tłuszczowych [6] oraz zjawisko emisji światła u robaczka świętojańskiego [12].

5. Specyficzność enzymu. Celem dalszego scharakteryzowania pirofosfatazy mola woskowego przystąpiliśmy do zbadania jej specyficzności. Badaliśmy aktywność oczyszczonego preparatu enzymatycznego wobec następujących substratów: pirofosforanu, trójmetafosforanu, tetrametafosforanu, trójpolifosforanu, soli Grahama (wysokocząsteczkowy polifosforan sodu), polifosforanu z drożdży izolowanego według metody Wiame'a [18], ATP, polifosforanu z wydaliny gąsienic mola woskowego otrzymanego w postaci soli barowej [19] oraz glicerofosforanu. Aktywność enzymatyczną badano przy pH 5 i 8 oraz wobec jonów Mg^{++} i Mn^{++} . Preparat pirofosfatazy rozkłada tylko pirofosforan. Podobnie więc jak w wypadku innych pirofosfataz pirofosfataza mola woskowego jest enzymem bardzo specyficznym.

Dyskusja

Przeprowadzone badania nad własnościami pirofosfatazy mola woskowego wykazały, że enzym ten posiada charakterystyczne cechy innych znanych pirofosfataz [3, 11, 16]. Podobnie jak inne pirofosfatazy jest aktywowany przez Mg^{++} i Co^{++} , inhibitowany przez Mn^{++} , Ca^{++} i Fe^{-} , inhibito-

wany przez nadmiar substratu, inaktywowany w temperaturze 50° przy pH około 7 oraz posiada dużą specyficzność. Rola i znaczenie wysoce aktywnej pirofosfatazy u gąsienic mola woskowego są nam na razie nieznanne. Zwłaszcza trudny do zrozumienia jest fakt, że mimo obecności w organizmie bardzo aktywnej pirofosfatazy gąsienica wydała znaczne ilości pirofosforanu. Być może, czynność enzymu jest w ustroju lub w poszczególnych narządach w jakiś sposób zahamowana. Dalsze badania będą miały na celu wyjaśnienie tego zjawiska.

Nie zostało ustalone, jaki enzym rozkłada polifosforan z wydalin gąsienic. Z pracy wynika jasno, że nie jest tu czynna pirofosfataza, gdyż oczyszczony preparat pirofosfatazy nie hydrolizuje izolowanego w postaci soli barowej polifosforanu z wydalin. Doświadczenia z całą miazgą również to potwierdzają, mianowicie krzywe enzymatycznej hydrolizy w zależności od pH całej frakcji P₇ oraz pirofosforanu różnią się: przy pH = 5,5 pirofosforan prawie nie hydrolizuje, natomiast frakcja P₇ rozkłada się w ilości przeszło 40%. Optimum pH dla rozkładu frakcji P₇ waha się około 7, optimum pH dla rozkładu pirofosforanu wynosi około 8. Ponadto hydroliza wyizolowanego polifosforanu jak i całej frakcji P₇ jest aktywowana zarówno przez Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, i Co⁺⁺, podczas gdy hydroliza pirofosforanu jest aktywowana przez Mg⁺⁺ i Co⁺⁺, natomiast hamowana przez Mn⁺⁺.

Nie stwierdziliśmy w miazdze obecności polifosfatazy typu polifosfataz obecnych w drożdżach i pleśniach [9, 10], rozkładających meta- i polifosforany. Istnieje więc możliwość, że albo obecny jest w miazdze specyficzny enzym hydrolizujący polifosforan wydalany przez gąsienice, albo działa tu niespecyficzna fosfataza typu fosfatazy alkalicznej i kwaśnej. Na tę ostatnią możliwość wskazywałby fakt, że polifosforan z wydalin jest hydrolizowany również przez miazgi z jelita i wątroby żaby [19]. Wiemy wprawdzie z prac innych autorów [2, 4], że ekstrakty z narządów zwierząt wyższych rozkładają wysokocząsteczkowe polifosforany, nawet sól Grahama. W doświadczeniach Malmgrena [9] i naszych fakt ten nie potwierdza się. Jak widać, sprawa obecności polifosfatazy u zwierząt nie jest na razie wyjaśniona.

Doc. dr Stelli Niemierko pragnę wyrazić gorące podziękowanie za cenne wskazówki i dyskusje nad pracą.

Streszczenie

Zbadano warunki enzymatycznej hydrolizy piro- i polifosforanów pochodzących z wydalin gąsienic mola woskowego (*Galleria mellonella*), pod wpływem miazgi z tychże gąsienic. Stwierdzono, że optimum temperatury wynosi około 37°, optimum pH 7,0 — 7,5. Enzymatyczna hydroliza akty-

wowana jest przez jony Mg^{++} i Co^{++} . Jony Mn^{++} aktywują hydrolizę przy pH 6,6, natomiast inhibują przy pH 5,5. Silnymi inhibitorami są jony Zn^{++} , Ag^+ i Hg^{++} .

Z gąsienic mola woskowego wyizolowano pirofosfatazę w postaci oczyszczonego preparatu i zbadano jej własności. Optimum pH wynosi 7,5 — 8,3. Pirofosfataza z mola woskowego jest aktywna tylko w obecności jonów Mg^{++} . Optymalne stężenie Mg^{++} wynosi 0,004 M. Jony Co^{++} również aktywują enzym, lecz tylko w obecności jonów Mg^{++} . Optymalne stężenie substratu wynosi 0,004 M; powyżej tego stężenia następuje silne zahamowanie działania enzymu. Stała Michaelisa równa jest $2,3 \cdot 10^{-3}$ M. Oczyszczony preparat enzymatyczny pirofosfatazy wykazuje dużą specyficzność — hydrolizuje wyłącznie pirofosforan. Enzym ten nie działa na następujące związki: trójpolifosforan, trójmetafosforan, tetrametafosforan, sól Grahama, polifosforan z drożdży, polifosforan z wydalin z gąsienic *Galleria mellonella*, ATP i glicerofosforan.

L I T E R A T U R A

- [1] Bamann E., Gail H., *Biochem. Z.* **293**, 1, 1937.
- [2] Barnabei O., Gieri C., Tria E., *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* **26**, 868, 1950.
- [3] Beiley K., Weeb E. C., *Biochem. J.* **38**, 394, 1944.
- [4] Berg G. G., *J. Cell. Comp. Physiol.* **45** 435, 1955.
- [5] Kaplan N. O., Lipman F., *J. Biol. Chem.* **174**, 37, 1948.
- [6] Kornberg A., Jr. Pricer W. E., *J. Biol. Chem.* **204**, 329, 1953.
- [7] Kornberg A., Lieberman J., Simms E. S., *J. Biol. Chem.* **215**, 389, 1955.
- [8] Krishnan P. S., *Arch. Biochem. Biophys.* **37**, 224, 1952.
- [9] Malmgren H., *Acta Chem. Scand.* **6**, 16, 1952.
- [10] Mattenheimer H., *Biochem. Z.* **322**, 36, 1951.
- [11] Mc Elroy W. D., Coulombre J., Hays R., *Arch. Biochem. Biophys.* **32**, 207, 1951.
- [12] Mc Elroy W. D., Hastings J. W., Coulombre J., Sommenfeld V., *Arch. Biochem. Biophys.* **46**, 399, 1953.
- [13] Niemierko S., Niemierko W., *Acta Biol. Exper.* **15**, 111, 1950.
- [14] Niemierko S., Wojtczak A., *Acta Physiol. Polon.*, Prace III Zjazdu PTF, 217, 1952.
- [15] Potter V. R., Elvehjem C. A., *J. Biol. Chem.* **114**, 495, 1936.
- [16] Sjöberg K., *Acta Physiol. Scand.* **32**, 131, 1954.
- [17] Umbreit W. W., Burris R. H., Stauffer J. F., *Manometric techniques and related methods for the study of tissue metabolism*. Burgess Publishing Co, Minneapolis 1945.
- [18] Wiame J. M., *J. Biol. Chem.* **178**, 919, 1949.
- [19] Wojtczak A. B., *Acta Biochim. Pol.* **3**, 355, 1956.

ФОСФОРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ В ЭКСКРЕМЕНТАХ
БОЛЬШОЙ ВОЩИННОЙ МОЛИ (*Galleria mellonella*)

II. Энзиматический гидролиз

Резюме

Автор исследовал условия энзиматического гидролиза пиро- и полифосфатов, происходящих из экскрементов гусениц большой вощинной моли (*Galleria mellonella*), под влиянием кашицы из тех же гусениц. Автор констатировал, что оптимальная температура равняется приблизительно 37° , оптимальный pH 7,0 — 7,5. Энзиматический гидролиз активируется ионами Mg^{++} и Co^{++} . Ионы Mn^{++} активируют гидролиз при pH 6,6, ингибируют же при pH 5,5. Сильными ингибиторами являются ионы Zn^{++} , Ag^{++} и Hg^{++} . Из гусениц большой вощинной моли (*Galleria mellonella*) автор изолировал пирофосфатазу в виде очищенного препарата и исследовал ее свойства. Оптимальный pH равен 7,5 — 8,3. Пирофосфатаза из большой вощинной моли активна только в присутствии ионов Mg^{++} . Оптимальная концентрация Mg^{++} равняется 0,004 М. Ионы Co^{++} также активируют энзим, но только в присутствии ионов Mg^{++} . Оптимальная концентрация субстрата — 0,004 М; при повышении указанной концентрации наступает сильное заторможение действия энзима. Константа Михаэлиса равна $2,3 \times 10^{-3}$ М. Очищенный энзиматический препарат пирофосфазы проявляет значительную специфичность — гидролизует исключительно пирофосфат. Этот энзим не действует на следующие химические соединения: триполифосфат, триметафосфат, тетраметафосфат, соль Грагама, полифосфат из дрожжей, полифосфат из экскрементов *Galleria mellonella*, А.Т.Ф. и глицерофосфат.

PHOSPHOROUS COMPOUNDS IN THE EXCRETA OF THE WAX MOTH,
GALLERIA MELLONELLA

II. ENZYMATIC HYDROLISIS

Summary*)

Optimum conditions were established for the enzymatic hydrolysis of the labile phosphorous fraction of excreta of the wax moth larvae, brought about by wax moth larvae homogenates. The temperature and pH optima are 37° and 7.5 — 8 respectively. For full activity the hydrolyzing enzyme requires the presence of bivalent cations, Mg^{++} and Co^{++} being most effective. Mn^{++} activates the hydrolysis at pH 6.6, and is inhibitory at pH 5.5. Zn^{++} , Ag^{+} and Hg^{++} are potent inhibitors.

*) The full text appears in English in Acta Biol. Exper. 17, 232, 1956.

An enzyme which hydrolyzes inorganic pyrophosphate to orthophosphate was isolated from the wax moth larvae and partially purified. The maximum rate of pyrophosphate hydrolysis was obtained at 37° and in pH range 7.5 — 8.3. Magnesium ions are essential for the enzyme activity, the optimum concentration of Mg^{++} being 0.004 M; Co^{++} ions increase the rate of hydrolysis only in the presence of Mg^{++} ions. The enzyme was inhibited by Mn^{++} , Ca^{++} and F^{-} . The optimum substrate concentration proved to be 0,004 M. At higher substrate concentrations a decrease in the rate of hydrolysis was observed. The Michaelis constant, as calculated from the substrate concentration curve, was $2.3 \cdot 10^{-3}$ M. The purified enzyme showed high specificity with respect to pyrophosphate. No orthophosphate was liberated when the enzyme was incubated with the following substances: tripolyphosphate, trimetaphosphate, tetrametaphosphate, Graham's salt, yeast polyphosphate, polyphosphate of the wax moth excreta, adenosine triphosphate and glycerophosphate.

Otrzymano 18.2.1956 r.

I. REIFER i K. TOCZKO

**MIKROMETODA ILOŚCIOWEGO OZNACZANIA PIĘCIU
GŁÓWNYCH ALKALOIDÓW OPIUM**

*Z Pracowni Biochemii Roślin Zakładu Biochemii PAN
Kierownik Pracowni prof. I. Reifer*

I. Wstęp.

Piśmiennictwo dotyczące ilościowego oznaczania morfiny w opium jest bardzo obszerne. Trudności metodyczne, jak również ocena opium oparta tylko na zawartości w nim morfiny, stały się powodem, że pozostałych alkaloidów bądź nie oznaczano, bądź też oznaczano je sumarycznie jako tzw. alkaloidy poboczne. Dlatego też istnieją tylko nieliczne prace dotyczące ilościowego oznaczania pozostałych ważniejszych alkaloidów opium.

Pierwszą metodę oznaczania sześciu głównych alkaloidów opium, tj. morfiny, narkotyny, papaweryny, kodeiny, tebainy i narceiny opublikował w 1887 r. Plugge [7]. Znacznie później (1933 r.) Kliaczkina [5] dokładnie przebadła własności fizyczne tych zasad i na podstawie uzyskanych wyników podała pięć schematów ich rozdzielania. Anneler [2] w oparciu o te dane opracował metodę rozdzielania i oznaczania morfiny i czterech alkaloidów niefenolowych. Według tej metody po oddzieleniu morfiny oddziela się narkotynę, papawerynę i tebainę w postaci rozpuszczalnych w chloroformie chlorowodorków. Z roztworów wodnych, zawierających chlorowodorki tych alkaloidów wytrąca się narkotynę i papawerynę za pomocą octanu sodowego, tebainę natomiast wytrąca się z alkoholowego roztworu w postaci trudno rozpuszczalnej soli kwasu winowego, którą następnie oznacza się wagowo. Oddzielenie narkotyny od papaweryny dokonuje się przez zmydlenie jej alkoholowym ługiem potasowym i następnie po zregenerowaniu za pomocą kwasu solnego i wykrystalizowaniu z eteru oznacza się grawimetrycznie. Papawerynę wykrystalizowuje się w formie szczawianu i oznacza również wagowo. Pozostałą w kwaśnym roztworze wodnym kodeinę po zalkalizowaniu przejmuje się do chloroformu i oznacza miareczkowo.

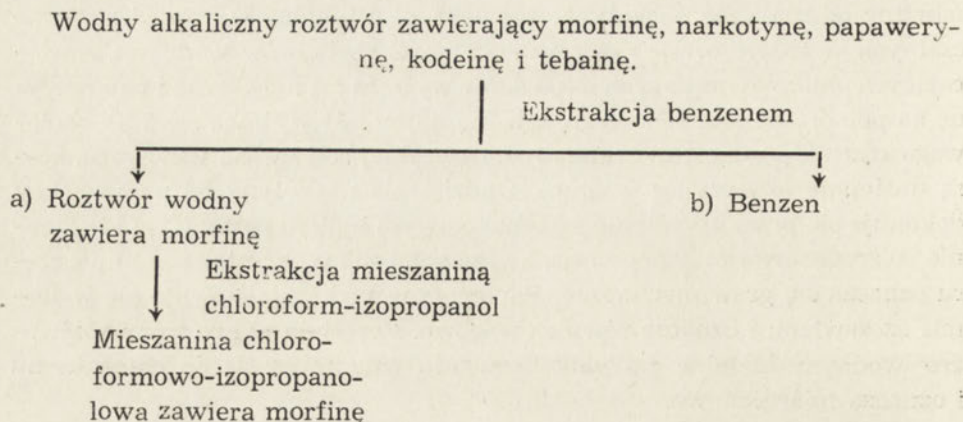
Postępowania tego nie można zastosować w mikroanalizie, stąd też w ostatnich latach do rozdzielania alkaloidów opium zaczęto stosować metodę chromatografii bibułowej i kolumnowej [1,3,4,6,10].

W niniejszej pracy opisano metodę ilościowego oznaczania pięciu głównych alkaloidów opium, tj. morfiny, narkotyiny, papaweryny, kodeiny i tebainy w ilościach poniżej 0,1 mg każdego alkaloidu w próbce. Metoda polega na wyekstrahowaniu z alkalicznego i odwodnionego opium wymienionych alkaloidów do mieszaniny chloroformu z alkoholem etylowym, na ich podzieleniu na trzy następujące grupy: 1) morfinę, 2) narkotyinę z papaweryną, 3) kodeinę z tebainą i następnie kolorymetrycznym oznaczeniu. Ilościowe oznaczenie pojedynczych zasad przy takim ich rozdziale jest możliwe dzięki opracowaniu metody oznaczania narkotyiny w obecności papaweryny i tebainy w obecności kodeiny.

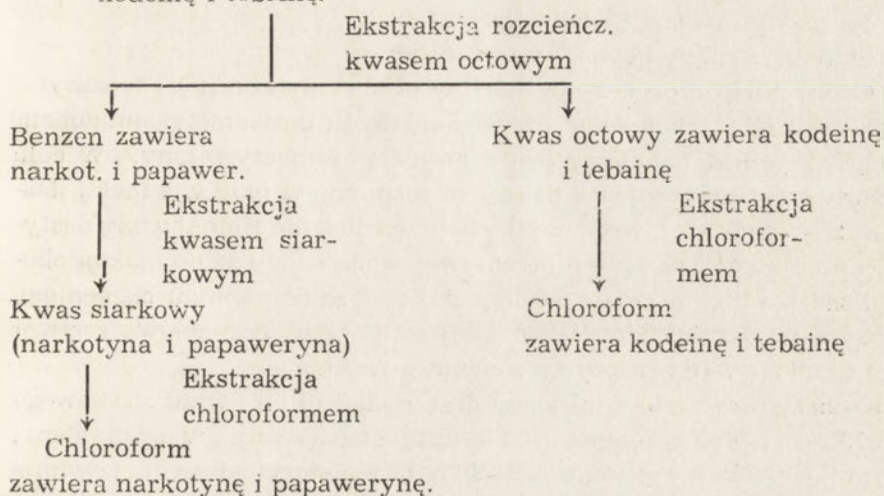
Rozdział alkaloidów oparto na ich różnej rozpuszczalności w wodnych roztworach zasad i słabych kwasów oraz rozpuszczalnikach organicznych. Morfina, w odróżnieniu od pozostałych czterech zasad, jest dobrze rozpuszczalna w alkalicznych roztworach wodnych, w benzenie natomiast praktycznie się nie rozpuszcza. Za pomocą ekstrakcji alkalicznych roztworów wodnych benzenem do rozpuszczalnika tego przechodzą ilościowo narkotyina, papaweryna, kodeina i tebaina, morfina natomiast pozostaje w roztworze wodnym.

Kodeina i tebaina są mocnymi zasadami, tworzą dobrze rozpuszczalne w wodzie sole z rozcieńczonym kwasem octowym i z benzenu dają się łatwo do niego ekstrahować. Narkotyina i papaweryna zaś jako słabe zasady nie tworzą soli z rozcieńczonym kwasem octowym i w odróżnieniu od kodeiny i tebainy pozostają w benzenie.

W oparciu o te własności opracowano metodę rozdzielania, której schematyczny przebieg jest następujący:



b) Benzen zawiera narkotyne, papawerynę, kodeinę i tebainę.



Znane barwne testy jakościowego wykrywania alkaloidów dostosowano i opracowano do celów kolorymetrycznego oznaczania wymienionych alkaloidów.

Morfinę oraz sumę kodeiny i tebainy oznacza się za pomocą aldehydu p-dwumetyloaminbenzoesowego w kwasie siarkowym (odczynnik Wasicky'ego). Tebainę w obecności kodeiny w około 29 N kwasie siarkowym. Sumę narkotyne i papaweryny oznacza się za pomocą kwasu molibdenowego w kwasie siarkowym (odczynnik Fröhdego), a narkotyne w obecności papaweryny za pomocą kwasu arsenowego w mieszaninie równych ilości kwasów siarkowego i o-fosforowego (zmodyfikowany odczynnik Rosenthalera-Türka).

II. Część doświadczalna

A. ODCZYNNIKI

1. Chloroform;
2. Benzen;
3. Alkohol etylowy 96⁰/₀;
4. Alkohol izopropylowy;
5. Odczynnik octanowy: 20 g octanu sodowego ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) rozpuścić w ok. 200 ml wody destylowanej, dodać 20 ml lodowatego kwasu octowego i dopełnić wodą dest. do 1 litra;
6. Około 0,1 N kwas siarkowy;
7. Około 2 N kwas solny;

8. Około 2 N wodorotlenek sodowy;
9. Około 10⁰/₀ wag./obj. roztwór chlorku amonowego;
10. Nasycony roztwór węglańu sodowego;
11. Siarczan sodowy bezwodny *in substantia*;
12. Odczynniki do oznaczania morfiny oraz sumy kodeiny i tebainy:
 - a) 5⁰/₀ wag./obj. alkoholowy roztwór aldehydu p-dwumetyloaminobenzoowego. Preparat handlowy jest zazwyczaj zanieczyszczony. W celu otrzymania czystego preparatu należy go rozpuścić w możliwie małej ilości lodowatego kwasu octowego, wytrącić przez dodanie zimnej wody destylowanej, przesączyć i na sączku przemywać wodą z lodu aż do reakcji obojętnej. Suszyć w temperaturze pokojowej pod zmniejszonym ciśnieniem. Tak otrzymany preparat jest jasno żółty o t.t. 74°C. Alkoholowy roztwór należy przechowywać w naczyniu z ciemnego szkła.

- b) Kwas siarkowy: do 4 ml wody dest. dodać 30 ml kwasu siarkowego o c. wł. 1,82 — 1,84. Kwas musi być absolutnie bezbarwny i w próbie ślepej z odczynnikiem 12a przepuszczalność światła w kolorymetrze nie powinna wynosić poniżej 90⁰/₀. W przeciwnym razie należy kwas siarkowy przedestylować. Przechowywać w butelce ze szczelnie doszlifowanym korkiem.

13. Odczynnik do oznaczania narkotyny w obecności papaweryny:
0,5 g $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ rozpuścić w 50 ml kwasu siarkowego o c. wł. 1,84 i dopełnić kwasem o-fosforowym o c. wł. 1,7 do 100 ml. Kwas siarkowy i fosforowy muszą być bezbarwne i nie mogą zawierać jonów metali. Przechowywać w butelce ze szczelnym korkiem.

14. Odczynnik do oznaczania sumy narkotyny i papaweryny: 2 g molibdenianu amonowego: $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ rozpuścić w ok. 90 ml kwasu siarkowego o c. wł. 1,84 i dopełnić tym samym kwasem do 100 ml. Czystość kwasu i przechowywanie jak wyżej.

15. Kwas siarkowy ok. 30⁰/₀ obj./obj.: do 200 ml wody destylowanej dodać ostrożnie 800 ml kwasu siarkowego o c. wł. 1,84. Odczynnik ten powinien być bezbarwny. Zanieczyszczenia metalami nie przeszkadzają.

16. Kwas siarkowy ok. 40⁰/₀ obj./obj.: przygotować przez odpowiednie rozcieńczenie odczynnika 15.

B. OZNACZANIE POSZCZEGÓLNYCH ALKALOIDÓW W CZYSTYCH ROZTWORACH

1. Oznaczanie morfiny oraz sumy kodeiny i tebainy

Aldehyd p-dwumetyloaminobenzoowy w kwasie siarkowym (odczynnik Wasicky'ego) tworzy z niektórymi alkaloidami, a wśród nich z morfiną, kodeiną i tebainą intensywne, czerwone zabarwienie. Odczynnik ten był przystosowany do ilościowego oznaczania alkaloidów tropowych. Ostatnio Reifer i Buchowicz [9] opracowali mikrometodę ilościowego ozna-

czania tych alkaloidów. Metodę tę dostosowano do ilościowego oznaczania morfiny oraz sumy kodeiny i tebainy. Stwierdzono, że używany przez autorów wymienionych do rozcieńczania kompleksu barwnego 60% kwas siarkowy okazał się za słaby. W tych warunkach połączenie barwne z alkaloidami opiumowymi jest nietrwałe. Jek wynika z tablicy 1 użycie 80% kwasu siarkowego daje trwałe i intensywne zabarwienie.

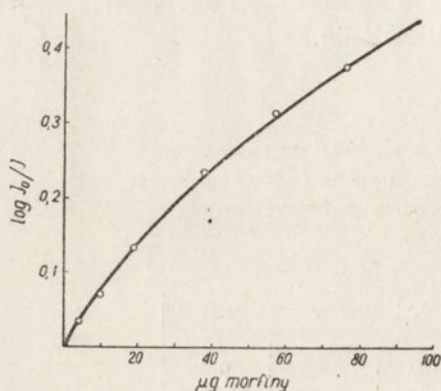
Tablica 1

Wpływ stężenia kwasu siarkowego na trwałość i intensywność zabarwienia przy oznaczaniu morfiny oraz sumy kodeiny i tebainy metodą z aldehydem p-dwumetyloaminobenzoesowym

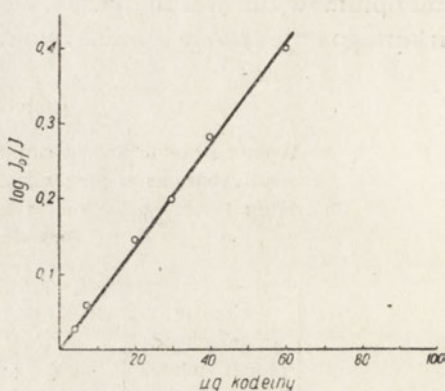
Czas w minutach od chwili zmieszania z kwasem	Odczyty w %/0 przepuszczalności			
	60% H ₂ SO ₄	70% H ₂ SO ₄	80% H ₂ SO ₄	90% H ₂ SO ₄
0	74,0	64,0	62,5	64,0
5	78,0	64,0	62,5	63,5
10	82,0	64,0	62,5	63,5
15	—	—	62,5	63,0
30	—	69,0	62,0	—

Wykonanie: Do próbki o średnicy ok. 15 mm i długości 50 mm odmierzają się pipetą 1 lub 2 ml alkoholowego roztworu alkaloidu w ilościach od 10 do 100 µg morfiny lub tebainy i od 7 do 60 µg kodeiny. Próbę odparowuje się na łaźni wodnej i do suchej próbki dodaje się pipetą 0,2 ml odczynnika 12a, odparowuje alkohol do sucha, przy czym po ostudzeniu aldehyd p-dwumetyloaminobenzoesowy krystalizuje w postaci jasnożółtych kryształów. W przypadku, gdy barwa osadu jest brązowa, należy oznaczenie powtórzyć. Następnie odmierzają się pipetą 0,2 ml odczynnika 12 b, rozpuszcza osad przez lekkie ogrzanie na łaźni wodnej i po dokładnym wymieszaniu przez wstrząsanie wstawia się próbki na 5 min. do wrzącej łaźni wodnej. Przedłużenie czasu ogrzewania na łaźni wodnej o dalsze 2—3 min. nie wpływa na intensywność zabarwienia. Zbyt długie ogrzewanie na łaźni wodnej powoduje częściowe zwęglanie, a więc ciemnienie próby ślepej i pełnej. Po ostudzeniu dodaje się do próbki pipetą 4,8 ml odczynnika 15 i miesza roztwory kilkakrotnie przelewając z próbki do próbki kolorymetrycznej. Intensywność zabarwienia odczytuje się w fotokolorymetrze przy niebieskim filtrze wobec identycznie przygotowanej ślepej odczynnikowej.

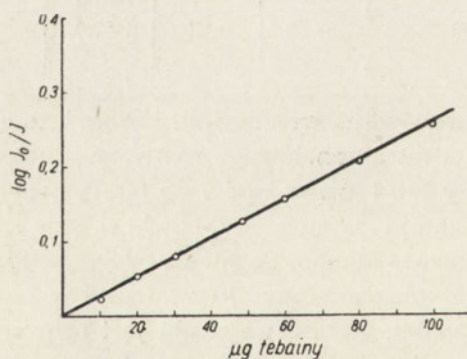
Na rysunkach 1, 2, i 3 przedstawione są krzywe wzorcowe dla morfiny, kodeiny i tebainy oznaczonych w kolorymetrze Leitza, filtr C. Jak wynika z rysunków, kodeina w granicach od 6 do 60 μg , a tebaina w granicach 10 do 100 μg dają wykresy zgodne z prawem Beera-Lamberta. Morfina nato-



Rys. 1. Krzywa wzorcowa dla morfiny oznaczonej metodą z aldehydem p-dwumetyloaminobenzoesowym w kolorymetrze Leitza, filtr C



Rys. 2. Krzywa wzorcowa dla kodeiny oznaczonej metodą na sumę kodeiny i tebainy w kolorymetrze Leitza, filtr C



Rys. 3. Krzywa wzorcowa dla tebainy oznaczonej metodą na sumę kodeiny i tebainy w kolorymetrze Leitza, filtr C

miast w granicach od 10 do 100 μg tworzy w wyżej wymienionych warunkach zabarwienie, którego intensywność nie jest zgodna z wymienionym prawem. Dla każdego kolorymetru należy sporządzić odpowiednie krzywe wzorcowe w granicach stężeń alkaloidów podanych wyżej.

W tablicach 2, 3 i 4 podane są wyniki analiz chlorowodoru morfiny oraz wolnych zasad kodeiny i tebainy w czystych roztworach opisaną metodą. Błąd oznaczenia morfiny i kodeiny nie przekracza 7%.

Tablica 2

Wyniki oznaczeń morfiny metodą z aldehydem p-dwumetyloamino-benzoowym w kolorymetrze Leitza, filtr C

Użyto morfiny HCl.3H ₂ O w µg	Wyniki oznaczeń w log Io/I	Średnia	Maksymalne odchylenie od średniej w %%
100	0,377 0,377 0,377 0,367	0,375	+0,5 -2,0
75	0,319 0,310 0,310	0,313	+1,9 -1,0
62,5	0,280 0,276 0,280 0,284	0,280	+1,4 -1,4
50	0,237 0,229 0,233 0,244 0,229	0,234	+4,3 -2,2
37,5	0,194 0,190 0,194 0,187	0,192	+1,1 -1,6
25	0,143 0,137 0,128 0,125	0,133	+7,6 -6,0
12,5	0,076 0,073 0,073 0,071	0,073	+4,1 -2,7
6,25	0,039 0,036 0,039 0,036	0,038	+4,0 -4,0

Tablica 3

Wyniki oznaczeń kodeiny w czystych roztworach metodą z aldehydem p-dwumetyloaminobenzoesowym w kolorymetrze Leitza, filtr C

Użyto kodeiny w µg	Wyniki oznaczeń w log Io/I	Średnia	Maksymalne odchylenie od średniej w %%
60	0,403 0,398 0,403 0,398	0,401	+0,5 -0,7
40	0,278 0,278 0,284 0,276	0,279	+1,8 -1,1
30	0,197 0,197	0,197	0,0 0,0
20	0,146 0,146 0,143	0,145	+0,7 -1,4
7,5	0,060 0,055 0,055	0,057	+5,3 -3,5
4	0,027 0,027 0,027	0,027	0,0 0,0

Tablica 4

Wyniki oznaczeń tebainy w czystych roztworach metodą z aldehydem p-dwumetyloaminobenzoesowym w kolorymetrze Leitza, filtr C

Użyto tebainy w μg	Wyniki oznaczeń w $\log I_0/I$	Średnia	$K = \log I_0/I$ dla 1 μg	K średnie
100	0,260 0,256	0,258	0,0026	0,0026
80	0,204 0,204 0,218 0,204	0,207	0,0026	
60	0,155 0,158 0,158	0,157	0,0026	
40	0,105 0,105	0,105	0,0026	
30	0,086 0,076	0,081	0,0027	
20	0,051 0,053	0,052	0,0026	
10	0,027 0,022	0,025	0,0026	

2. Oznaczanie tebainy w obecności kodeiny

Tebaina w stężonym kwasie siarkowym ulega na zimno rozkładowi i tworzy połączenia o intensywnym żółtym zabarwieniu. Przebadano po-

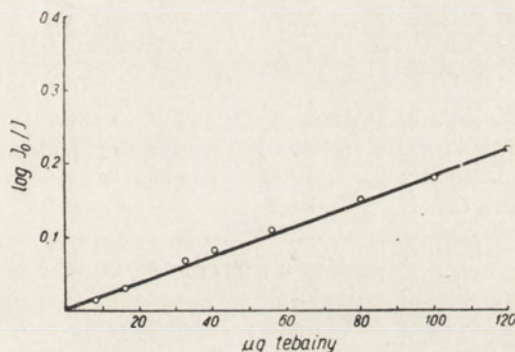
Tablica 5

Wyniki oznaczeń tebainy w czystych roztworach metodą na oznaczanie tebainy w obecności kodeiny (kolorymetr Leitza, filtr C)

Użyto tebainy w μg	Wyniki oznaczeń w $\log I_0/I$	Średnia	Maksymalne odchylenie od średniej w %
120	0,222 0,222 0,215 0,218	0,220	+0,9 -2,3
100	0,186 0,180 0,182 0,180	0,182	+2,2 -1,1
80	0,152 0,152 0,149 0,155	0,152	+2,0 -2,0
56	0,114 0,114 0,111 0,111	0,112	+1,8 -0,9
40	0,086 0,086 0,084 0,086	0,085	+1,2 -1,2
32	0,073 0,071 0,073 0,071	0,072	+1,3 -1,3
16	0,032 0,034 0,034 0,032	0,033	+3,0 -3,0
8	0,015 0,018 0,015 0,018	0,017	+8,8 -8,8

wstawanie połączeń barwnych produktów rozkładu tebainy w kwasie siarkowym i stwierdzono, że najbardziej intensywne zabarwienie powstaje w obecności około 29 N kwasu siarkowego. W tych warunkach kodeina w ilościach nie większych aniżeli 200 μg nie tworzy barwnych połączeń. Własność tę wykorzystaliśmy do ilościowego oznaczania tebainy w obecności kodeiny.

Wykonanie: W probówkach o wymiarach podanych wyżej, zawierających 1 lub 2 ml alkoholowego roztworu tebainy w ilościach od 10 do 120 μg , odparowuje się alkohol na łaźni wodnej do sucha i dodaje 5 ml odczynnika 15. Po dokładnym wymieszaniu przez kilkakrotne przelewanie roztworu



Rys. 4. Krzywa wzorcową tebainy oznaczonej metodą oznaczania tebainy w obecności kodeiny w kolorymetrze Leitza, filtr C

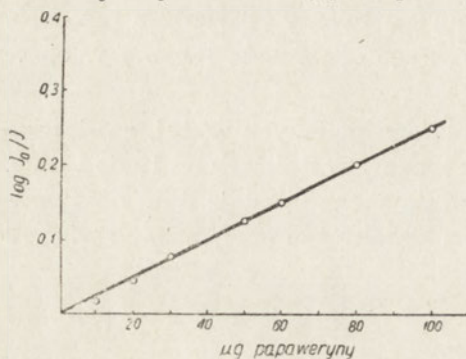
z próbki do próbki kolorymetrycznej, intensywność zabarwienia oznacza się w kolorymetrze stosując niebieski filtr jak wyżej. Otrzymane barwne połączenie jest trwałe w temperaturze pokojowej przez co najmniej jedną godzinę. Na rys. 4 podana jest krzywa wzorcową dla tebainy oznaczonej tą metodą w kolorymetrze Leitza stosując filtr C.

Tablica 5 zawiera wyniki oznaczeń tebainy. Jak wynika z tablicy, tebainę można oznaczać w ilościach od 10 do 120 μg z błędem nie przekraczającym 6%.

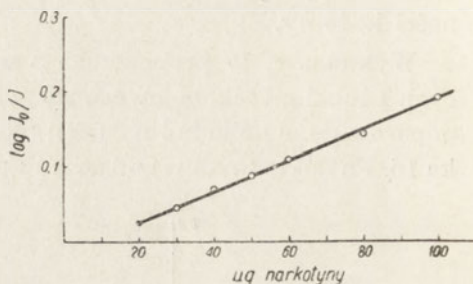
3. Oznaczanie sumy narkotyń i papaweryny

Kwas siarkowy zawierający kwas molibdenowy (odczynnik Fröhde) tworzy z niektórymi alkaloidami, m. i. z narkotyńą i papaweryną barwne połączenia, które dotychczas wykorzystane były wyłącznie do ich jakościowego wykrywania. Reakcję tę przebadano w naszym laboratorium i opracowano warunki do ilościowego mikrooznaczania sumy narkotyńy i papaweryny.

Wykonanie: 1 lub 2 ml alkoholowego roztworu zawierającego od 10 do 100 μg papaweryny lub 20 do 100 μg narkotyny odparowuje się na łaźni wodnej w probówkach, jak opisano przy morfinie. Następnie dodaje się



Rys. 5. Krzywa wzorcowa dla papaweryny oznaczonej metodą na sumę narkotyny i papaweryny w kolorymetrze Leitza, filtr C



Rys. 6. Krzywa wzorcowa dla narkotyny oznaczonej metodą na sumę narkotyny i papaweryny w kolorymetrze Leitza, filtr C

Tablica 6

Wyniki oznaczeń papaweryny w czystych roztworach metodą na sumę papaweryny i narkotyny (kolorymetr Leitza, filtr C)

Użyto papaweryny w μg	Wyniki oznaczeń w $\log I_0/I$	Średnia	Maksymalne odchylenie od średniej w %
100	0,252 0,248	0,250	+0,8 -0,8
80	0,208 0,201	0,205	+1,5 -2,0
60	0,155 0,152 0,146 0,152	0,151	+2,6 -3,3
50	0,125 0,116 0,128 0,124	0,123	+4,1 -5,7
40	0,097 0,097 0,099 0,103	0,099	+4,0 -2,0
30	0,079 0,079 0,076	0,078	+1,3 -2,6
20	0,051 0,048 0,048 0,048	0,049	+4,1 -2,1
10	0,022 0,020 0,022 0,020	0,021	+4,8 -4,8

0,5 ml odczynnika 14, miesza i wstawia do wrzącej łaźni wodnej na okres 10 minut. Po ostudzeniu dodaje się pipetą 4,5 ml odczynnika 15, miesza jak podano wyżej i intensywność zabarwienia oznacza w kolorymetrze stosując niebieski filtr, wobec identycznie przygotowanej ślepej odczynnikowej. Po-

wstały barwny związek jest trwały w temperaturze pokojowej do dwóch godzin. Dla papaweryny w podanych wyżej granicach otrzymuje się wykres zgodny z prawem Beera-Lamberta (rys. 5), natomiast dla narkotyny w ilościach mniejszych od 40 μg alkaloidu wykres odbiega od wymienionego prawa (rys. 6).

W tablicach 6 i 7 podane są wyniki oznaczeń papaweryny i narkotyny w czystych roztworach, wykonanych w kolorymetrze Leitza wobec niebieskiego filtra C. Jak widać z tablicy 6, papawerynę można oznaczać opisaną metodą z błędem nie przekraczającym 6%.

Tablica 7

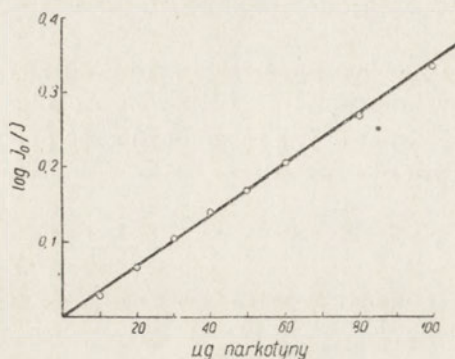
Wyniki oznaczeń narkotyny w czystych roztworach metodą na sumę narkotyny i papaweryny (kolorymetr Leitza, filtr C)

Użyto narkotyny w μg	Wyniki oznaczeń w $\log I_0/I$	Średnia	$K = \log I_0/I$ dla 1 μg	K średnie
100	0,184 0,184	0,184	0,0018	} 0,0018
80	0,143 0,143	0,143	0,0018	
60	0,108 0,108	0,108	0,0018	
50	0,084 0,089	0,087	0,0017	
40	0,068 0,066	0,067	0,0017	
30	0,043 0,043	0,043	0,0014	
20	0,025 0,022	0,024	0,0012	

4. Oznaczanie narkotyny w obecności papaweryny

W literaturze nie znaleziono wzmianki na temat możliwości wykrywania narkotyny w obecności papaweryny za pomocą reakcji barwnych, które można by przystosować do ilościowego oznaczania. Po długich poszukiwaniach wykryto warunki, w których można oznaczyć kolorymetrycznie w mikroilościach narkotynę w obecności papaweryny. Stwierdzono, że odczynnik zawierający kwas arsenowy w obecności mieszaniny jednakowych ilości kwasu siarkowego i kwasu o-fosforowego tworzy z narkotyną, po krótkim podgrzewaniu, trwale czerwone zabarwienie, proporcjonalne do ilości narkotyny w próbce. Ten sam odczynnik w obecności tylko papaweryny pozostaje bezbarwny. W mieszaninie z narkotyną papaweryna tworzy barwne połączenia, co stwierdza się przez otrzymanie zabarwienia o większej intensywności, niżby wynikało z ilości obecnej narkotyny. W odróżnieniu od barwnego połączenia narkotyny związek barwny papaweryny zanika przez rozcieńczenie 40% kwasem siarkowym. Na tej własności oparto metodę oznaczania narkotyny w obecności papaweryny.

Wykonanie: 1 lub 2 ml alkoholowego roztworu narkotyiny w ilościach od 10 do 100 μg lub mieszaniny narkotyiny i papaweryny w ilościach do 200 μg odparowuje się na łaźni wodnej do sucha. Do suchych próbek dodaje się 0,5 ml odczynnika 13 i po dokładnym wymieszaniu przez wstrząsanie wstawia się na 10 min. do wrzącej łaźni wodnej. Do ostudzonych próbek dodaje się 4,5 ml odczynnika 16 i przenosi do próbki kolorymetrycznej w sposób podany wyżej. Intensywność zabarwienia oznacza się wobec identycznie przygotowanej ślepej odczynnikowej w kolorymetrze, stosując filtr niebieski.



Rys. 7. Krzywa wzorcową dla narkotyiny oznaczonej metodą na oznaczenie narkotyiny w obecności papaweryny w kolorymetrze Leitza, filtr C

Powstałe połączenie barwne samej narkotyiny jest trwale w temperaturze pokojowej przez godzinę, nato-

Tablica 8

Wyniki oznaczeń narkotyiny i narkotyiny w obecności papaweryny w czystych roztworach metodą na oznaczenie narkotyiny w obecności papaweryny (kolorometr Leitza, filtr C)

Użyto narkotyiny μg	Użyto papaweryny μg	Wyniki oznaczeń w $\log I_0/I$	Średnia	Maksymalne odchylenie od średniej w %
100	0	0,333 0,335	0,334	+0,3 -0,3
80	0	0,272 0,270	0,271	+0,3 -0,3
60	0	0,204 0,204	0,204	+0,0 -0,0
50	0	0,171 0,171	0,171	+0,0 -0,0
40	0	0,140 0,134 0,143 0,140	0,139	+2,9 -3,7
30	0	0,105 0,105	0,105	+0,0 -0,0
20	0	0,068 0,067	0,068	+0,0 -1,5
10	0	0,027 0,027 0,031 0,029 0,031	0,029	+6,9 -6,9
48,5	48	0,166 0,170	0,168	-1,0
53	48	0,189 0,191	0,190	+4,0
100	48	0,352 0,352	0,352	+2,5
40	100	0,127 0,133	0,130	-6,2

U w a g a: W ostatnich czterech wierszach tablicy 8 podano nie maksymalne odchylenie, lecz błąd z jakim wykryto narkotyinę.

miast w obecności papaweryny barwa stopniowo zanika, stąd odczyty należy wykonać w czasie nie przekraczającym 10 minut od chwili dodania odczynnika 16.

Jak wynika z rys. 7, narkotyina w ilościach od 10 do 100 μg oznaczona w kolorymetrze Leitza filtr C daje wykres zgodny z prawem Beera-Lamberta. Z tablicy 8 wynika, że narkotyinę w roztworach czystych można oznaczać z błędem poniżej 7%.

C. OZNACZANIE ALKALOIDÓW W OPIUM

1. Ekstrakcja alkaloidów z opium

Ilościowe oznaczenie alkaloidów w opium zależy w dużym stopniu od sposobu ich ilościowego wydobycia z materiału. W piśmiennictwie podanych jest wiele metod, z których najczęściej stosuje się, szczególnie w pracach starszych, ekstrakcję za pomocą rozcieńczonego kwasu solnego. Ujemną stroną tej metody jest powstawanie emulsji w czasie ekstrakcji alkaloidów do organicznych rozpuszczalników, utrudniających w dużym stopniu rozdział fazy wodnej od rozpuszczalnika. Podobne trudności napotyka się przy ekstrakcji metanolem z dodatkiem kwasu solnego.

Emulsji unika się stosując dwuchlorometan, jednak metoda ta wymaga co najmniej 8 godzin ekstrakcji w aparacie Soxhleta.

Metoda ekstrakcji opracowana przez nas polega na wydzieleniu alkaloidów z odwodnionego opium za pomocą mieszaniny chloroformu z alkoholem etylowym, zmieszanych w stosunku objętościowym 9 : 1. W mieszaninie tej dobrze rozpuszczają się wszystkie omawiane pięć alkaloidów i po 20 minutach wstrząsania całkowicie przechodzą do rozpuszczalnika. W oparciu o doświadczenia wykonane na czystych preparatach alkaloidów oraz na próbkach opium z dodatkiem znanych ilości preparatów czystych zasad opracowano następujący sposób ekstrakcji:

Naważkę 50 mg opium przenosi się do moździerza o średnicy ok. 10 cm, dodaje ok. 1 ml nasyconego roztworu węgla sodowego i zawartość moździerza dokładnie rozciera przez ok. jedną minutę. Następnie dodaje się ok. 5 g bezwodnego siarczanu sodowego i po dokładnym roztarciu suchy proszek przenosi się ilościowo do butelki o pojemności 150 ml z szczelnym korkiem. Moździerz „przemywa się” ok. 1 g siarczanu sodowego i dodaje do poprzedniego. Po dodaniu ok. 30 ml chloroformu zawierającego 10% 96-procentowego alkoholu etylowego, wytrząsa się na wytrząsarce mechanicznej przez 20 minut. Zawartość butelki sączy się przez watę do kolbki stożkowej o poj. ok. 100 ml., butelkę i osad przemywa się cztery razy porcjami po 5 ml chloroformu z alkoholem etylowym. Otrzymany wyciąg zawiera obok alkaloidów zanieczyszczenia, które podczas rozdzielania alkaloidów zostają usunięte.

2. Rozdział alkaloidów

Roztwór chloroformowo-alkoholowy zawierający alkaloidy oddestylowuje się na łaźni wodnej do obj. 1 — 3 ml. Resztę ostrożnie odparowuje się na łaźni do sucha. Pozostałe w kolbce alkaloidy z zanieczyszczeniami w postaci żółtego mazistego osadu rozpuszcza się w 5 ml benzenu, który przenosi się do rozdzielacza o poj. 100 ml ze szczelnym korkiem i kranem (do uszczelniania nie należy używać smarów tłuszczowych). Nierozpuszczalną w benzenie morfinę oraz ewentualne ślady pozostałych alkaloidów rozpuszcza się w ok. 0,1 N kwasie siarkowym, którym trzykrotnie porcjami po 5 ml przeemywa się kolbkę. Kwas ten dodaje się do rozdzielacza z benzenem. Zawartość rozdzielacza energicznie wytrząsa się przez ok. 1 minutę. Po rozdzieleniu się płynu na dwie fazy (przy zachowaniu stosunku benzenu do wody równego 1 : 3, rozdział jest szybki i ostry) frakcję wodną zbiera się w drugim, podobnym rozdzielaczu. Benzen wytrząsa się ponownie, dodając 5 ml 0,1 N kwasu siarkowego i 10 ml wody destylowanej. Połączone w drugim rozdzielaczu wyciągi wodne zawierają wszystkie badane alkaloidy, natomiast benzen, w którym pozostały tylko zanieczyszczenia, nie podlega dalszej analizie.

Celem oddzielenia morfiny od pozostałych alkaloidów kwaśny wyciąg wodny, zebrany w drugim rozdzielaczu, alkalizuje się 5 ml nasyconego roztworu węgla sodowego i po usunięciu dwutlenku węgla przez wstrząsanie, ekstrahuje się czterokrotnie benzenem porcjami po 5 ml. Frakcję benzenową sączy się do następnego rozdzielacza przez suchy sączek z bibuły o śr. 5 — 7 cm. Do benzenu przechodzą narkotyna, kodeina, papaweryna i tebaina.

Alkaliczny roztwór wodny, zawierający tylko morfinę, zakwasza się 5 ml ok. 2 N kwasu solnego celem rozłożenia węgla, alkalizuje 5 ml ok. 2 N wodorotlenku sodowego, całość przenosi do kolbki miarowej o poj. 50 ml i dopełnia wodą destylowaną do znaku. 5 ml tego roztworu w rozdzielaczu doprowadza się za pomocą ok. 3 ml 10% chlorku amonowego do pH ok. 9 i ekstrahuje cztery razy po 5 ml mieszaniną chloroformu z alkoholem izopropylowym zmieszanych w stosunku objętościowym 3 : 1. Wyciąg chloroformowo-izopropanolowy zbiera się w kolbce miarowej o poj. 25 ml, dopełnia się chloroformem do znaku. Ślady wody wiąże się przez dodanie do kolbki ok. 1 g bezwodnego siarczanu sodowego i kilkakrotne wstrząśnięcie. W 1 lub 2 ml tego roztworu oznacza się morfinę, jak podano na str. 385.

Wyciąg benzenowy, zebrany w rozdzielaczu, zawierający pozostałe cztery alkaloidy, wytrząsa się czterokrotnie, porcjami po 5 ml odczynnika 5, do którego przechodzą kodeina i tebaina, narkotyna i papaweryna natomiast pozostają w benzenie.

Kwaśny wyciąg wodny, zawierający kodeinę z tebainą, alkalizuje się przez dodanie 10 ml nasyconego roztworu węgla sodowego i ekstrahuje chloroformem 4 razy po 5 ml. Chloroform zbiera się w kolbce miarowej o poj. 25 ml, dopełnia chloroformem do znaku i odwadnia jak wyżej. W roztworze tym oznacza się tebainę metodą podaną na str. 389 oraz sumę kodeiny i tebainy metodą opisaną na str. 385.

Benzen, po oddzieleniu kodeiny i tebainy, zawiera jeszcze obok narkotyiny i papaweryny zanieczyszczenia i nie może być użyty do bezpośredniego oznaczenia zawartych w nim alkaloidów. W tym celu ekstrahuje się je do kwasu siarkowego, podczas gdy zanieczyszczenia pozostają w benzenie. Ekstrakcję wykonuje się czterokrotnie, porcjami po 5 ml ok. 0,1 N kwasu siarkowego. Kwaśny wyciąg wodny w rozdzielaczu alkalizuje się przez dodanie 5 ml nasyconego roztworu węgla sodowego i wytrząsa chloroformem 4 razy po 5 ml. Zebrany i odwodniony w kolbce miarowej o poj. 25 ml wyciąg chloroformowy służy do oznaczania narkotyiny metodą podaną na str. 392 oraz sumy narkotyiny i papaweryny wg metody podanej na str. 390.

3. Obliczenia

Zawartość morfiny, narkotyiny i tebainy w analizowanej próbce wyrażoną w μg , odczytuje się bezpośrednio z wykresów 1, 4 i 7.

Zawartość kodeiny oblicza się w sposób następujący:

Ekstynkcję dla kodeiny oblicza się z wzoru:

$$E_{\text{kod}} = E_{\text{sumy}} - K_b$$

gdzie E_{kod} = ekstynkcja dla kodeiny, E_{sumy} = ekstynkcja dla sumy kodeiny i tebainy oznaczonej metodą na sumę obu alkaloidów $K = 0,0026$ = ekstynkcja dla 1 μg tebainy oznaczonej metodą na sumę kodeiny i tebainy, b = μg tebainy. Z wykresu 2 odczytuje się ilość kodeiny w μg dla obliczonej wartości E_{kod} .

Zawartość papaweryny oblicza się podobnie jak kodeiny, przy czym $K = 0,0017$ dla ilości narkotyiny powyżej 40 μg w próbce. Dla ilości mniejszych wartość K_b odczytuje się z rysunku 6.

Z rysunku 5 odczytuje się ilość papaweryny wyrażoną w μg dla obliczonej wartości E_{pap} .

Przykład. Do analizy pobrano próbę zawierającą 2,00 mg chlorowodoru morfiny i po 1,00 mg pozostałych czterech alkaloidów. Zgodnie z wyżej podanym przebiegiem rozdzielania alkaloidów, objętość roztworu zawierającego morfinę wynosiła 50 ml, pozostałe dwa roztwory zawierające narkotyinę z papaweryną i kodeinę z tebainą rozcieńczone były do objętości 25 ml. Tym samym w 1 ml każdego z roztworów znajdowało się po 40 μg każdego alkaloidu.

$T^0\%$ dla 1 ml morfiny: $63,5 \ 63,0 = E = \log I_0/I = 0,197 = 39,5 \ \mu\text{g}$

$T^0\%$ „ „ „ narkotyny: $73,0 \ 73,5, E = 0,135 = 39,0 \ \mu\text{g}$

$T^0\%$ „ „ „ tebainy: $81,5 \ 82,5 E = 0,086 = 40,0 \ \mu\text{g}$

$T^0\%$ dla sumy narkotyny i papaweryny: $69,5 \ 70,0, E = 0,157$

$T^0\%$ dla sumy kodeiny i tebainy: $41,0 \ 42,0 \ E = 0,382$

$E_{\text{pap.}} = E_{\text{sumy}} - K_b = 0,157 - 0,0017 \cdot 39,0 = 0,091$

Dla tej wartości E odczytuje się z wykresu 5, $38,0 \ \mu\text{g}$ papaweryny.

$E_{\text{kod}} = E_{\text{sumy}} - K_b = 0,382 - 0,0026 \cdot 40,0 = 0,278$

Tej wartości E odpowiada na wykresie 2, $41,0 \ \mu\text{g}$ kodeiny.

Tablica 9

Wyniki oznaczeń morfiny, narkotyny, papaweryny, kodeiny i tebainy po wykonaniu ekstrakcji i rozdzielaniu nową metodą, na preparatach czystych alkaloidów

Nr próby	Użyto do analizy μg					Wykryto μg				
	Morf.	Nar-kot.	Pa-paw.	Kod.	Teb.	Morf.	Nar-kot.	Pa-paw.	Kod.	Teb.
W 1	100	—	—	—	—	98	—	—	—	—
2	—	80	—	—	—	—	78	—	—	—
3	—	—	104	—	—	—	—	103	—	—
4	—	—	—	100	—	—	—	—	97	—
5	—	—	—	—	40	—	—	—	—	40
6	—	—	—	28	40	—	—	—	26,5	40
7	100	80	40	40	40	97	77	41	39	40
8	60	60	30	30	30	61	58,5	28	31	29

Tablica 10

Ekstrakcja i oznaczenie morfiny, narkotyny, papaweryny, kodeiny i tebainy w opium

Nr próby	Dodano alkaloidów w μg					Wykryto w μg				
	Morf.	Nar-kot.	Pa-paw.	Kod.	Teb.	Morf.	Nar-kot.	Pa-paw.	Kod.	Teb.
1	—	—	—	—	—	43	14	57	46	97
1	40	—	—	—	—	82	14	57	46	97
2	—	—	—	—	—	40	12,5	64	36	101
2	—	45,5	—	—	—	40	56	64	36	101
3	—	—	—	—	—	40,5	15	45	40	90
3	—	—	38	—	—	40,5	15	83	40	90
4	—	—	—	—	—	42	15,5	59	43	71
4	—	—	—	33	50	42	15,5	59	75	124

Warunki metody opracowano na czystych preparatach alkaloidów; każda czynność została opracowana najpierw na pojedynczych zasadach, a następnie na ich mieszaninie. Podane w tablicy 9 wyniki oznaczeń alkaloidów po wykonaniu ekstrakcji i rozdzielania na czystych preparatach wykazują, że ekstrakcja i rozdział alkaloidów według opisanej metody przebiega ilościowo i dokładnie uzyskanych wyników nie jest mniejsza niż przy bezpośrednim oznaczeniu.

Wykonano następnie oznaczenie omawianych alkaloidów w próbkach opium, do których dodano przed ekstrakcją czyste preparaty zasad w znanych ilościach. Zestawione w tablicy 10 wyniki tych oznaczeń wskazują, że zarówno ekstrakcja, jak również rozdział jest ilościowy i błąd oznaczenia nie jest większy niż w wypadku czystych alkaloidów.

Ponadto wykonano oznaczenia chromatograficzne poszczególnych roztworów i znaleziono, że plamy na chromatogramach badanych były identyczne z odpowiednimi chromatogramami kontrolnymi.

Oznaczenie morfiny nową metodą porównano poza tym z metodą Pride'a i Sterna [8] na trzech próbkach opium. Otrzymano następujące wyniki:

Opium	Metoda Pride'a i Sterna	Nowa metoda
Nr 1	17,0%	17,4%
Nr 2	16,8%	16,0%
Nr 3	17,0%	16,2%

III. Dyskusja

Nowo opracowana metoda oznaczania alkaloidów w opium pozwala na ich oznaczenie w jednej próbce o wadze nie większej aniżeli 50 mg. Stosowanie małych ilości surowca znacznie zmniejsza trudności związane z powstawaniem emulsji między fazą wodną i fazą rozpuszczalnika podczas wielokrotnych ekstrakcji, stanowiących podstawę rozdziału poszczególnych alkaloidów. Stosowany w nowej metodzie podział alkaloidów na trzy grupy znacznie upraszcza ich oznaczenie i umożliwia analizę w jednej próbce materiałowej. Podział ten można zastosować dzięki opracowaniu metody oznaczania narkotyny w obecności papaweryny i tebainy w obecności kodeiny. Należy zaznaczyć, że w opracowanej metodzie nie uwzględniono oznaczania narceiny, która znajduje się w wyciągu obok morfiny. W porównaniu z morfiną w reakcji z p-dwumetyloaminobenzaldehydem narceina tworzy zabarwienie o znacznie mniejszej intensywności. Ze względu na

kilkadziesiąt razy mniejszą jej zawartość w opium nie może ona wpływać na dokładność oznaczenia morfiny.

W opisanej metodzie używa się do reakcji barwnych stężonego kwasu siarkowego. Z tego powodu stosowane organiczne rozpuszczalniki nie mogą zawierać organicznych zanieczyszczeń, bowiem na gorąco ulegają spaleniowi z wytworzeniem dodatkowego zabarwienia, które przeszkadza w końcowym kolorymetrycznym oznaczeniu. Przed użyciem należy je przedestylować i przechowywać w szczelnie zamkniętych butelkach.

Najbardziej istotnym czynnikiem uzyskiwania powtarzalnych wyników jest jakość kwasu siarkowego, użytego do sporządzania odczynników służących do wywoływania reakcji barwnych. Kwas powinien być absolutnie bezbarwny o c. wł. 1,82 — 1,84 i nie może zawierać jonów metali ciężkich. Jeżeli nie odpowiada tym wymogom, należy go przedestylować.

Używany preparat aldehydu p-dwumetyloaminobenzoesowego powinien być bezbarwny bądź o barwie słomkowo-żółtej, o t.t. 74°C. Taki preparat w próbie ślepej daje powyżej 90% przepuszczalności w porównaniu z wodą destylowaną.

Opisaną metodą można wykonać oznaczenie w dwóch powtórzeniach w ciągu jednego dnia roboczego.

Streszczenie

1. Opisano kolorymetryczną metodę mikrooznaczania pięciu głównych alkaloidów opium, tj. morfiny, narkotyny, papaweryny, kodeiny i tebainy.

2. Metoda polega na ilościowym wyekstrahowaniu alkaloidów z odwodnionego opium do mieszaniny chloroformu z alkoholem etylowym i następnie na ich rozdzieleniu na trzy następujące grupy:

a) morfinę, b) narkotynę z papaweryną i c) kodeinę z tebainą.

3. Kolorymetrycznie oznacza się morfinę oraz sumę kodeiny i tebainy za pomocą reakcji barwnej z aldehydem p-dwumetyloaminobenzoesowym w kwasie siarkowym, tebainę w obecności kodeiny za pomocą reakcji barwnej z około 29 N kwasem siarkowym, sumę narkotyny i papaweryny odczynnikiem zawierającym kwas molibdenowy w stężonym kwasie siarkowym oraz narkotynę w obecności papaweryny za pomocą odczynnika zawierającego kwas arsenowy w mieszaninie jednakowych ilości kwasu siarkowego i o-fosforowego.

4. Opisaną metodą można oznaczać kodeinę w granicach od 6 do 60 µg, pozostałe cztery alkaloidy w granicach od 10 do 100 µg każdego.

5. Według opisanej metody można oznaczać wymienione alkaloidy w jednej próbce opium o wadze nie przekraczającej 50 mg.

6. Oznaczenie alkaloidów w opium w dwóch powtórzeniach można wykonać w ciągu jednego dnia roboczego.

L I T E R A T U R A

- [1] Abdel Aiziz, Abdel Rahman, *Arch. Pharm.* 288/60, 53, 1955.
- [2] Anneler E., *Barell Festschrift* 344, 1936.
- [3] Berggner A., Bjorling C. O., *J. Pharm. and Pharmacol.* 5, 615, 1953.
- [4] Böhme H., Strohecker R., *Arzneimittel Forsch.* 3, 236, 1953.
- [5] Kliączkina B., *Arch. Pharm.* 271, 558, 1933.
- [6] Mc Elheny G. C., De Lamater G., Rands R. A., *Analyt. Chem.* 26, 819, 1953.
- [7] Plugge, *Arch. Pharm.* 225, 343, 1887.
- [8] Pride R. R. A., Stern E. S., *J. Pharm. and Pharmacol.* 6, 590, 1954.
- [9] Reifer I., Buchowicz J., *Acta Biochem. Pol.* 2, 187, 1955.
- [10] Svendsen A. B., Aarnes D. E., *Scientia pharm.* 23, 18, 1955.

МИКРОМЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЯТИ ОСНОВНЫХ АЛКАЛОИДОВ ОПИЯ

Резюме

1. Описан колориметрический метод микроопределения пяти основных алкалоидов опия, т.е. морфина, наркотина, папаверина, кодеина и тебаина.

2. Метод состоит в количественном экстрагировании алкалоидов из обезвоженного опия в смесь хлороформа и этанола, а затем в их разделении на три следующие группы: а) морфин, б) наркотин с папаверином и в) кодеин с тебаином.

3. Колориметрическим путем определяются морфин, а также сумма кодеина и тебаина при помощи цветной реакции с парздиметиламинобензойным альдегидом в серной кислоте; тебаин в присутствии кодеина — при помощи цветной реакции с, приблизительно 29 н серной кислотой; сумма наркотина и папаверина — реактивом, содержащим молибденовую кислоту в концентрированной серной кислоте; наркотин в присутствии папаверина при помощи реактива, содержащего мышьяковую кислоту в смеси серной и о-фосфорной кислот, взятых в равных количествах.

4. При помощи описанного метода можно определять кодеин в пределах от 6 до 60 μg , остальные же четыре алкалоида в пределах от 10 до 100 μg каждого.

5. По вышеуказанному методу можно определять приведенные алкалоиды в одной пробе опия, весом не более 50 мг.

6. Определение алкалоидов в опиуме может быть исполнено в течение одного рабочего дня в двух повторениях.

A COLORIMETRIC MICRODETERMINATION OF THE MAIN FIVE ALKALOIDS IN OPIUM

Summary

1. A colorimetric microdetermination of the 5 main alkaloids of opium: morphine, narcotine, papaverine, codeine and thebaine has been described.

2. The method is based on the quantitative partition of the alkaloids into 3 groups: a) morphine, b) narcotine and papaverine, c) codeine and thebaine. In group *b* and *c* the sums of both alkaloids are determined, as well as narcotine alone in the presence of papaverine, and thebaine alone in the presence of codeine.

3. With this method codeine can be determined in amounts from 6—60 μg , the remaining 4 alkaloids in amounts from 10—100 μg each.

4. The weight of the analysed sample of opium need not exceed 50 mg.

5. A complete analysis of a duplicate sample of opium can be carried out in one working day.

Otrzymano 20.2.1956 r.

A. KRAWCZYK, W. OSTROWSKI, B. SKARŻYŃSKI

POŁĄCZENIA WITAMINU B₁₂ Z BIAŁKAMI

V. CIĘŻAR CZĄSTECzkOWY POŁĄCZENIA WITAMIN B₁₂-BIAŁKO Z SUROWICY KRWI BYDLĘCEJ

Z Zakładu Chemii Fizjologicznej A. M. w Krakowie
Kierownik prof. dr B. Skarżyński

W poprzednich naszych publikacjach [13], [14], [15], [19] wykazaliśmy egzystencję i opisaliśmy pewne własności połączenia witamin B₁₂-białko, występującego w surowicy krwi zwierzęcej, nazwanego przez nas erytroglobulinem. Dla bliższej charakteryzacji tego proteidu oraz dla porównania z innymi podobnymi połączeniami, wyosobnionymi z innych materiałów biologicznych, wskazane było określenie rzędu wielkości ciężaru cząsteczkowego tej substancji białkowej. W tym celu zastosowaliśmy metodę dyfuzji przez przegrody porowate opracowaną przez Northropa i Ansona [12].

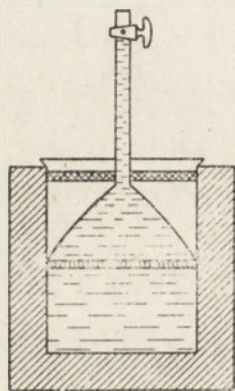
Zaletą metody Northropa i Ansona jest jej prostota i względnie dosyć duża dokładność, osiągalna przy zachowaniu odpowiednich warunków doświadczenia. Szczególnie korzystną właściwością tej metody jest możliwość określania ciężaru cząsteczkowego białka znajdującego się w mieszaninie z innymi składnikami, o ile tylko badane białko wyróżnia się w jakiś charakterystyczny sposób od tych składników [6]. Metoda polegająca na zastosowaniu porowatej przegrody była już niejednokrotnie używana do określania ciężaru cząsteczkowego różnych białek oraz do badania ich jednorodności [4], [11], [18]. Dokładne opracowanie teoretycznych zasad tej metody jest podane przez Ansona i Northropa [3] oraz przez Gordona [7].

WYZNACZENIE STAŁEJ SĄCZKA [12]

Do badania współczynnika dyfuzji na podstawie metody przegrody porowatej nadaje się najlepiej — zdaniem wielu autorów — sączek ze szkła

spiekane, produkowany przez firmę Schott w Jenie pod symbolem G-4 (średnica kanalików 5-15 μ).

Stosowaliśmy te sączki w kształcie zaznaczonym na rys. 1 o obj. $V = 49-64$ ml, efektywnej powierzchni płytki ok. 34 cm^2 (średnica ok. 6,5 cm), grubość płytki ok. 2,3 mm. Objętość sączka oznaczano ważąc go przed i po napełnieniu wodą. Sączek przed użyciem gotowano w stężonym kwasie azotowym, następnie przepłukiwano wodą destylowaną, wciągając wodę przez płytkę za pomocą pompy wodnej. Badany roztwór wciągano do sączka również przy zastosowaniu pompy próżniowej, przy czym pierwszą porcję wciągniętego gazu wylewano z powrotem celem wypłukania i wypędzenia powietrza z kanalików płytki. Po napełnieniu roztworem do wysokości kurka, kurek zamykano i sączek wstawiano do zlewki zawierającej tę samą objętość wody, jaka odpowiadała objętości sączka. Zewnętrzna powierzchnia płytki musi być równoległa do powierzchni płynu w zlewce i stykać się z nią całkowicie. W ten sposób zestawioną aparaturę pozostawiano na 1 1/2 godz. w temp. pokojowej, aby mógł



Rys. 1. Urządzenie do oznaczania stałej dyfuzji

wiano na 1 1/2 godz. w temp. pokojowej, aby mógł przedyfundować roztwór zawarty w kanalikach płytki, a następnie sączek przenoszono do drugiej zlewki z wodą, stosując się do powyżej podanych przepisów. W celu równomiernego rozprowadzania ciepła aparaturę wstawiano do grubościennego bloku miedzianego i umieszczano w termostacie o odpowiedniej temperaturze. Po upływie określonego czasu dyfuzji sączek wyjmowano ze zlewki i wypychano przez płytkę zawarty w nim roztwór. Roztwór ten, jak również zawartość zlewki używano do analizy.

Stałą sączka K w temp. 25° wyznaczano za pomocą 0,01 N KCl, przyjmując jako wartość współczynnika dyfuzji $D_{25^\circ} = 1,836 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ sek}^{-1}$. (wg G o r d o n a) [7]. Ilość przedyfundowanej substancji ustalono oznaczając chlorki metodą Mohra. Stałą sączka w temperaturze 5° wyznaczono używając 1 N NaCl o współczynniku dyfuzji $D_5^\circ = 83,3 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ sek}^{-1}$ (wg Ö h o l m a) [16]. Wszystkie roztwory do badań dyfuzyjnych przygotowywano używając wody podwójnie destylowanej i wygotowanej, gdyż rozpuszczony w wodzie CO_2 wydziela się w czasie dyfuzji i zatyka kanaliki sączka. Tablica 1 zawiera wyniki oznaczeń stałej K sączka, którą obliczono z wzoru:

$$(1) \quad K = \frac{Dt}{Q}$$

gdzie D = współczynnik dyfuzji roztworu wzorcowego, dyfundującego w czasie t, Q = ilość ml przedyfundowanego roztworu.

T a b l i c a 1

Sączek G-4, V—49,3 ml, temp. 5°

	t sek.	Q ml	K
1	7 200	1,57	0,0382
2	10 800	2,36	0,0382
3	20 100	4,04	0,0379
średnia śr. o.	—	—	0,0381 ±0,0004

roztworu wewnątrz sączka, tzn. $V_1 = V_2$. W analogiczny sposób wyznaczano stałe innych sączków.

Część doświadczalna i wyniki

W celu skontrolowania metody rozpoczęto od szeregu oznaczeń substancji zarówno białkowych, jak i niebiałkowych o znanym współczynniku dyfuzji. Tablica 2 podaje wyniki oznaczeń stałej dyfuzji krystalicznego witaminu B₁₂ (f-my R i c h t e r, Budapeszt). Sporządzono roztwór wodny witaminu, zawierający 28 mg/ml i po odpowiednim czasie dyfuzji oznaczano ilość przedyfundowanego witaminu metodą mikrobiologiczną [15].

Dość znaczne wahania wartości uzyskanych w poszczególnych oznaczeniach przypuszczalnie tkwią głównie w błędach nieuniknionych przy stosowaniu mikrobiologicznej analizy stężenia witaminu. Stała dyfuzji dla B₁₂ w temp. 20° oznaczona inną metodą wynosi według danych z piśmiennictwa $4,44 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ sek.}^{-1}$ [5]. Według teoretycznych obliczeń współczynnik D_{25° winien wynosić ok. 5,5.

Znając stałą K sączka obliczono współczynnik dyfuzji substancji badanej z równania:

$$(2) \quad D = \frac{KQ}{t}$$

Należy podkreślić, że aby móc stosować wzór (1) i (2) stężenie roztworu C₂ w zlewce na początku doświadczenia, tj. w czasie $t = 0$, musi się równać 0, a objętość roztworu w zlewce musi równać się objętości

T a b l i c a 2

Wyznaczanie współczynnika dyfuzji krystalicznego witaminu B₁₂. Sączek G-4, V—64,0 ml, K—0,1401 w temp. 25°

	t sek.	Q ml	10 ⁻⁶ cm ² sek ⁻¹
1	90 000	3,24	5,05
2	173 000	6,05	5,27
3	176 200	6,19	4,89
średnia śr. o.	—	—	5,07 ± 0,41

OZNACZENIE WSPÓŁCZYNNIKA DYFUZJI ORAZ CIĘŻARU CZĄSTECZKOWEGO LIZOZYMU, OKSYHEMOGLOBINY I KOMPLEKSU WITAMIN B₁₂-BIAŁKO

Znając współczynnik dyfuzji można obliczyć ciężar cząsteczkowy danej substancji na podstawie określenia promienia cząsteczki z wzoru Einsteina:

$$(3) \quad D = \frac{RT}{N} \cdot \frac{1}{6\pi r\eta}$$

gdzie: R — stała gazowa

T — temperatura bezwzględna

N — liczba Avogadry

r — promień cząsteczki w cm

η — lepkość wody w danej temp.

Po obliczeniu promienia r , ciężar cząsteczkowy wyliczyć można z wzoru:

$$(4) \quad M = \frac{4}{3} \pi r^3 gN$$

gdzie: M — ciężar cząsteczkowy

g — ciężar właściwy białka, 1,30 — 1,33 g cm⁻³

N — liczba Avogadry

Lizozym uzyskano z białka jaja kurzego wg metody Aldertona i Fevolda [1]. Preparat ten krystalizowano dwukrotnie z roztworu 5% NaCl przy pH 9,5-10,0, używając do badania roztwór o stężeniu 1,325 mg lizozymu w 1 ml H₂O. Ilość przedyfundowanego lizozymu oznaczano nefelometrycznie metodą taninową [10]. Określony przez nas współczynnik dyfuzji dla lizozymu w temperaturze 5° wynosił 8,55 x 10⁻⁷, stąd $r = 1,55$ a ciężar cząsteczkowy ok. 13 000. Dane w literaturze określają D_{20° dla lizozymu jako 11,2 x 10⁻⁷, z czego wynika ciężar cząsteczkowy ok. 14 — 17 000 [2]. Uzyskana przez nas wartość jest więc niższa w porównaniu z danymi literatury. Przyczyna różnicy tkwi prawdopodobnie w zanieczyszczeniach naszego preparatu lizozymu, gdyż znaną przez nas wartość stwierdzano każdorazowo przy kilkakrotnym powtarzaniu doświadczenia.

Inne kontrolne oznaczenia przeprowadzaliśmy z oksyhemoglobina krwi końskiej, otrzymaną wg metody Heidelbergera [9], przekrystalizowaną z wody z dodatkiem 12% etanolu. Przemyte kryształy HbO₂ rozpuszczano w wodzie sporządzając roztwór o stężeniu 12 mg/ml. Ilość przedyfundowanej HbO₂ oznaczano spektrofotometrycznie, na podstawie współczynnika ekstynkcji przy 500 mμ. Tablica 3 podaje wyniki oznaczeń współczynnika dyfuzji oraz wypośredkowanego na tej podstawie ciężaru cząsteczkowego.

Ciężar cząsteczkowy HbO₂ krwi końskiej oznaczony metodą osmometryczną wyraża się cyfrą średnio 67 000 [17]. Wyniki nasze są więc nieco wyższe, podobnie jak w przypadku lizozymu wartości uzyskane przez nas są nieco niższe od wartości uzyskanych na podstawie innych metod. Niemniej zgodnym jest rząd wielkości i to uprawnia nas do stosowania powyżej opisanej metody w celu określenia rzędu wielkości masy cząsteczkowej erytroglobulinu.

W celu oznaczania ciężaru cząsteczkowego erytroglobulinu użyto frakcję F-2, wyosobnioną z surowicy krwi bydlęcej wg przepisu podanego w jednej z poprzednich naszych prac [14]. Roztwór poddawany badaniu zawierał erytroglobulin w stężeniu 200-600 $\mu\text{g/ml}$ w przeliczeniu na witamin

Tablica 3

Współczynnik dyfuzji i ciężar cząsteczkowy HbO₂; sącdek G-4, V-49,3 ml, K-0,0381 w temp. 5°

	t sek.	Q ml	D ₅₀ × 10 ⁻⁷	r × 10 ⁻⁷ cm	M
1	28 400	0,346	4,72	2,81	73 000
2	61 900	0,766	4,71	2,82	74 000
3	87 000	1,087	4,75	2,80	72 400
średnia	—	—	—	—	73 000
śr. o.	—	—	—	—	±500

B₁₂. Ponieważ roztwór przygotowano w 0,01 N NaCl, dyfuzję przeprowadzano również do roztworu NaCl, a nie do czystej wody. Ilość przedyfundowanego erytroglobulinu obliczano na podstawie mikrobiologicznych oznaczeń witaminu B₁₂ uwolnionego z kompleksu przez autoklawowanie [15]. Ponieważ część witaminu B₁₂ znajdowała się w badanym roztworze za-

Tablica 4

Współczynnik dyfuzji i ciężar cząsteczkowy kompleksu witamin B₁₂-białko, Sącdek G-4, V-51,2 ml, K-0,0758 w temp. 5°

	t sek.	Q ml	D ₅₀ × 10 ⁻⁷	r × 10 ⁻⁷	M
1	165 000	1,14	5,21	2,55	56 200
2	173 000	1,22	5,35	2,48	51 700
3	310 000	2,38	5,82	2,29	41 500
średnia	—	—	—	—	50 000
śr. o.	—	—	—	—	±5 000

równy przed dyfuzją, jak i po dyfuzji w postaci wolnej, oznaczano osobno witamin B₁₂ znajdujący się w wolnym stanie i witamin B₁₂ związany, odejmując te wartości od ogólnej ilości witaminu. Wyniki pomiarów podane są w tablicy 4.

Uderzające są w tym wypadku dosyć znaczne różnice wartości uzyskanych w poszczególnych oznaczeniach, o wiele większe od różnic, jakie zaznaczały się przy określaniu ciężaru cząsteczkowego oksyhemoglobiny. Różnice te niewątpliwie wynikają z pokaźnego błędu doświadczalnego, jakim obarczona jest mikrobiologiczna metoda oznaczania witaminu B₁₂ ($\pm 20\%$). Jeżeli poza tym weźmiemy pod uwagę tę okoliczność, że w czasie długotrwałego doświadczenia pewien odsetek cząsteczek erytroglobulinu może ulec dysocjacji na część białkową i witamin B₁₂, dochodzimy do wniosku, że uzyskane przez nas wartości nie mogą być ściśle, lecz jedynie orientują nas ogólnie w rzędzie wielkości, w jakim musi obracać się ciężar cząsteczkowy połączenia witaminu B₁₂-białko występującego w surowicy krwi bydłowej.

Omówienie wyników

Jedynie dostępna dla nas metoda oznaczania ciężaru cząsteczkowego białka na podstawie współczynnika dyfuzji dała nam w przypadku kontrolnych badań przeprowadzonych z lizozymem i z oksyhemoglobina krwi końskiej wartości nieco różne od tych, jakie uzyskano za pomocą bardziej dokładnych metod. W każdym razie uzyskane przez nas wyniki poszczególnych oznaczeń są na ogół zgodne między sobą i leżą w rzędzie wielkości ciężaru cząsteczkowego białek kontrolnych, oznaczonego metodami bardziej precyzyjnymi. Fakt ten uprawnia nas do wniosku, że wartość 50 000 dla ciężaru cząsteczkowego erytroglobulinu — jakkolwiek nie będzie wartością dokładną — leży w rzędzie wielkości rzeczywistego ciężaru cząsteczkowego tego połączenia witaminu B₁₂ z białkiem. Na uwagę zasługuje fakt, że wydzielone przez nas połączenie posiada ciężar cząsteczkowy bardzo zbliżony do ciężaru cząsteczkowego analogicznego kompleksu wyosobnionego przez Gregory i Holdswortha [8] z serwatki mleka świńskiego (55 000).

Uzyskane przez nas wyniki stanowią dalsze uzupełnienie cech charakteryzujących badany przez nas proteid występujący w surowicy bydłowej.

Streszczenie

Stosując metodę dyfuzji przez płytki porowate wg Northropa i Ansona, oznaczono współczynnik dyfuzji i wyliczono ciężar cząsteczkowy erytroglobulinu, połączenia B₁₂ z białkiem, występującego w surowicy krwi bydłowej. Współczynnik dyfuzji D_5^0 w 0,01 M NaCl, wynosi $\approx 5,45 \times 10^{-7}$ cm² sek⁻¹, skąd promień cząsteczki $r \approx 2,44 \times 10^{-7}$ cm i ciężar cząsteczkowy $50\,000 \pm 5\,000$.

LITERATURA

- [1] Alderton G., Fevold H. L., *J. Biol. Chem.* **164**, 1, 1946.
 [2] Alderton G., Ward W. H., Fevold H. L., *J. Biol. Chem.* **157**, 43, 1945.
 [3] Anson M. L., Northrop J. H., *J. Gen. Physiol.* **20**, 575, 1937.
 [4] Bielig H. J., Bayer E., *Experientia*, **10**, 300, 1954.
 [5] Diehl H., Morrison J. J., Sealock R. R., *Experientia* **7**, 60, 1951.
 [6] Edsall J. T., *The proteins*, vol. I. B. str. 632, Academic Press N. Y., 1953.
 [7] Gordon A. R., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **46**, 285, 1945.
 [8] Grègory M. E., Holdsworth E. S., *Biochem. J.* **59**, 329, 1955.
 [9] Heidelberger M., *J. Biol. Chem.* **53**, 31, 1922.
 [10] Mejbaum-Katzenellenbogen W., *Acta Biochim. Pol.* **2**, 279, 1955.
 [11] Northrop J. H., *J. Gen. Physiol.* **13**, 739, 1930.
 [12] Northrop J. H., Anson M. L., *J. Gen. Physiol.* **12**, 543, 1929.
 [13] Ostrowski W., *Acta Biochim. Pol.* **2**, 297, 1955.
 [14] Ostrowski W., Niewiarowska A., *Acta Biochim. Pol.* **3**, 171, 1956.
 [15] Ostrowski W., Skarżyński B., Żak Z., *Acta Biochim. Pol.* **1**, 13, 1954.
 [16] Öholm L. W., *Z. physikal. Chem.* **50**, 309, 1905.
 [17] Roche J., Roche A., Adair G. S., Adair M. E., *Biochem J.* **26**, 1811, 1932.
 [18] Scherp H. W., *J. Gen. Physiol.* **16**, 795, 1933.
 [19] Skarżyński B., Ostrowski W., Niewiarowska A., Żak Z., *Acta Biochim. Pol.* **2**, 115, 1955.

СОЕДИНЕНИЯ В₁₂ С БЕЛКАМИ

Резюме

Применяя метод диффузии через пористые пластинки по Нортропу и Ансону, определили коэффициент диффузии и вычислили молекулярный вес эритроглобулина, соединения В₁₂ с белком, выступающего в сыворотке крови рогатого скота. Коэффициент диффузии D₅⁰ в 0,01 M NaCl равняется $\cong 5,45 \times 10^{-7}$ см² сек⁻¹, откуда радиус молекулы $r \cong 2,44 \times 10^{-7}$ см, а молекулярный вес 50.000 ± 5000 .

PROTEIN-VITAMIN B₁₂ COMPLEXES

Summary

The authors have used the porous plate diffusion method of Northrop and Anson for determining the diffusion coefficient and molecular weight of erythroglubulin, a complex of vitamin B₁₂ and protein, present

in the serum of ox-blood. The diffusion coefficient D_{50} in 0.01 M NaCl is $\approx 5.45 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$, hence, molecular radius $r \approx 2.44 \times 10^{-7} \text{ cm}$. and the molecular weight $50,000 \pm 5,000$.

Otrzymano 26.3.1956 r.

A. KRAWCZYK, W. OSTROWSKI, B. SKARŻYŃSKI

POLAROGRAFICZNIE CZYNNE SUBSTANCJE W SUROWICY KRWI

*Z Zakładu Chemii Fizjologicznej A. M. w Krakowie
Kierownik prof. dr B. Skarżyński*

W ostatnich latach przed wojną Brdička [2] opublikował dane dotyczące opracowanej przez niego tzw. filtracyjnej reakcji polarograficznej, zastosowanej do badania surowicy krwi w celach diagnostycznych. Metoda czeskiego badacza wzbudziła bardzo żywe zainteresowanie wyrażające się w licznych doniesieniach z różnych pracowni [13]. Reakcja Brdički polega na rejestrowaniu fali polarograficznej w przesączu surowicy uzyskanym po zadaniu tej cieczy kwasem sulfosalicylowym, w obecności amoniakalnego roztworu soli kobaltu lub związków aminokobaltowych. Według Brdički i wielu innych badaczy, wybitny wzrost tej fali daje się stwierdzić w surowicach patologicznych, a szczególnie w surowicach osobników obciążonych nowotworami.

Brdička utrzymywał pierwotnie, że przyczyną wzrostu wysokości fali polarograficznej bezbiałkowego przesączu surowicy krwi są rozpuszczalne w kwasie sulfosalicylowym produkty rozpadu białka. Waldschmidt-Leitz [13] doszedł do wniosku, że odpowiedzialną za odczyn polarograficzny Brdički jest jakaś substancja o charakterze mukoproteidu, której zawartość ma wzrastać szczególnie w schorzeniach nowotworowych. Badacz ten [13] wytrącił alkoholem z przesączu po odbiałczeniu surowicy kwasem sulfosalicylowym frakcję białkową, zawierającą glikozaminę i cechującą się wybitną aktywnością polarograficzną. Badania Waldschmidta-Leitza rozwinął Winzler wraz ze współpracownikami [14], [16], [17] wykazując, że polarograficznie czynna substancja rejestrowana w reakcji Brdički jest mukoproteidem wędrującym z frakcją α_1 -globulinów, cechującym się wybitnie kwaśnym charakterem (punkt izoelektryczny = pH 1,8) o ciężarze cząsteczkowym ok. 40 000. W owym mukoproteidzie stwierdzono obecność glikozaminy, galaktozy i mannozy. Substancja ta jest ciepłotrwała, nie wypada z roztworu przy

ogrzewaniu surowicy w 80° przy pH 4,7 [11], a daje się wytrącić alkoholem lub acetonem albo przy całkowitym nasyceniu roztworu siarczanem amonu [14]. Zaznaczyć przy tym należy, że podobny odczyn polarograficzny daje mukoid uzyskany z białka jaja kurzego, zawierający te same cukrowce i cechujący się takim samym składem aminokwasowym jak mułko-proteid Winzlera [15].

H o m o l k a [6] stosując kombinację elektroforezy bibułowej surowicy i polarografii poszczególnych frakcji białkowych badał rozmieszczenie polarograficznie czynnej substancji w frakcjach białkowych surowicy, stwierdzając, że substancja powodująca najwyższą falę polarograficzną wędruje z frakcją α_1 -globulinów. Posługując się sposobem postępowania **H o m o l k i** stwierdziliśmy w jednej z naszych prac [10], że przy gruźlicy skóry, a zwłaszcza w przypadkach leczonych tiosemikarbazonem, wzrost fali polarograficznej w surowicy łączy się z występowaniem jakiejś substancji wędrującej głównie z frakcją α_2 - i β -globulinów. Fakt ten nasunął przypuszczenie, że w surowicy krwi występuje więcej niż jedna substancja polarograficznie czynna. Dla wyjaśnienia tego zagadnienia badaliśmy systematycznie szereg surowic osobników prawidłowych i przypadków patologicznych, zwracając uwagę przede wszystkim na rozmieszczenie substancji polarograficznie czynnych w różnych frakcjach białkowych surowicy, uzyskanych zarówno przy pomocy elektroforezy bibułowej, jak i przy zastosowaniu klasycznej już dziś metody Cohna.

1. ROZMIESZCZENIE POLAROGRAFICZNIE CZYNNYCH SUBSTANCJI W FRAKcjACH BIAŁKOWYCH SUROWICY, ROZDZIELANYCH PRZY POMOCY ELEKTROFOREZY

a) Metoda. Posługiwaliśmy się zasadą, na której opiera się postępowanie **H o m o l k i** [6], tzn. po przeprowadzeniu rozdziału elektroforetycznego surowicy na szerokim pasku bibuły, odcinaliśmy z niego podłużny skrawek, na którym przez odpowiednie wybarwienie ustalaliśmy rozmieszczenie poszczególnych frakcji białkowych. Z pozostałego nie barwionego paska bibuły przygotowywaliśmy poprzeczne wycinki, odpowiadające poszczególnym frakcjom. Z wycinków tych wyciągaliśmy białko roztworem 0,9% NaCl, po czym w każdej uzyskanej w ten sposób frakcji białkowej przeprowadzaliśmy polarograficzny pomiar wg klasycznej metody **B r d i c k i**. Ponieważ α_1 -globuliny nie zawsze oddzielają się dobrze od albuminów, obie frakcje badano razem. Ten sposób postępowania nie mógł mieć większego wpływu na ocenę zawartości polarograficznie czynnej substancji we frakcji α_1 -globulinów, gdyż w warunkach, w których przeprowadzaliśmy doświadczenia, frakcja albuminowa wykazuje z reguły tylko nieznaczny odczyn polarograficzny.

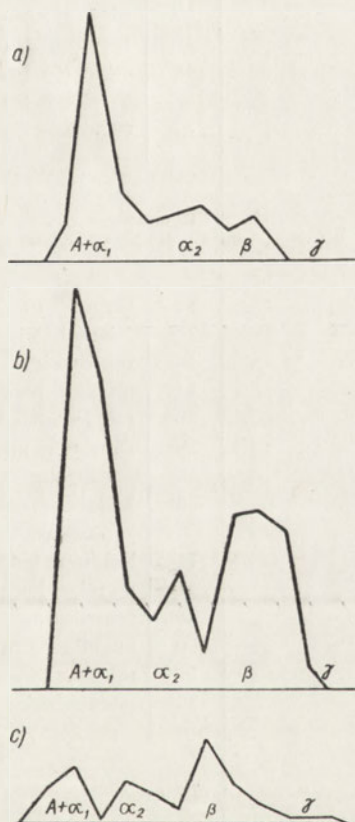
Elektroforezę bibułową przeprowadzano stosując metodę i aparaturę

uprzednio przez nas opisaną [8]. Oznaczenia polarograficzne przeprowadzono posługując się aparaturą Heyrovsky'ego z kroplową elektrodą rtęciową. Wysokość fali mierzono na odciętej odpowiadającej — 1,6 V, stosując 4-woltowy akumulator i polarografując przy czułości 1/15.

b) Wyniki. W powyżej opisany sposób zbadano 37 prawidłowych i patologicznych surowic stwierdzając, że polarograficznie czynna substancja wędruje zarówno z α_1 -, jak i α_2 oraz β -globulinami, przy czym w surowicach osobników prawidłowych wysokość fali polarograficznej jest najwyższa w frakcji α_1 -globulinów. Intensywność odczynu w frakcji α_2 - i β -globulinów w surowicach prawidłowych jest stosunkowo mała; w γ -globulinach nie spotykamy nigdy odczynu polarograficznego Brdički.

Sytuacja przedstawia się odmiennie w większości surowic patologicznych. W wielu wypadkach wysokość fali polarograficznej cechującej α_2 -globuliny jest znacznie wyższa niż wysokość tej fali w α_1 -globulinach. Wybitnie nasila się również często odczyn polarograficzny w β -globulinach. γ -Globuliny zawsze dają ujemny odczyn Brdički. Wzajemny stosunek wysokości fali polarograficznej dla trzech frakcji białkowych jest w różnych przypadkach różny. W dwóch przypadkach nie stwierdzono np. zupełnie odczynu polarograficznego w β -globulinach, w jednym przypadku (anaemia) stwierdziliśmy zdumiewająco niską falę polarograficzną frakcji α_1 -globulinów.

Badane surowice ujęto w trzy grupy: 1) surowice prawidłowe, 2) surowice z przypadków patologicznych, w których wzrost wysokości fali polarograficznej w poszczególnych frakcjach był bardzo znaczny w porównaniu z wartościami prawidłowymi, 3) surowice patologiczne, w których odczyn polarograficzny był niewiele silniejszy od odczynu surowicy prawidłowej lub nawet wyrażał się wartościami niższymi od prawidłowych. Tablica 1 podaje cyfrowe wyniki ba-



Rys. 1. Graficzne przedstawienie występowania polarograficznie czynnych substancji: a) w surowicy prawidłowej, b) w zapaleniu mięszo-wym wątroby (przypadek 26 z tabl. 1), c) w nerczyicy (przypadek 7 z tabl. 1.)

lub nawet wyrażał się wartościami niższymi od prawidłowych. Tablica 1 podaje cyfrowe wyniki ba-

Tablica 1

Wysokość fali polarograficznej w poszczególnych frakcjach białkowych. Liczby przedstawiają wysokość fali w mm

Nr surowicy	Przypadek	A+ α_1	α_2	β	γ
39	surowica prawidłowa	68	14	11	0
43	surowica prawidłowa	33	8	6	0
44	surowica prawidłowa	90	10	18	0
52	surowica prawidłowa	61	7	19	0
53	surowica prawidłowa	19	21	0	0
II grupa					
55	kłębuszkowe zapalenie nerek	72	94	20	0
56	rak macicy	125	111	130	0
61	gruźlica płuc	130	118	175	0
20	rak żołądka	67	71	13	0
26	zapalenie mięszone wątroby	108	33	48	0
30	białaczka szpikowa chroniczna	111	72	5	0
11	Erythematodes acutus	62	35	35	0
12	marskość wątroby	72	93	0	0
46	reumatyzm	101	18	138	0
50	anemia ostra	5	155	60	0
51	mięsak	100	70	8	0
35	nadnerczak	86	51	0	0
III grupa					
34	szpiczak	73	30	9	0
40	plazmocytoma	36	23	8	0
41	chroniczne zapal. szpiku	20	16	4	0
57	choroba Cushinga	47	54	34	0
58	gruźlica płuc	32	6	2	0
59	gruźlica płuc	22	46	13	0
60	gruźlica płuc	34	68	23	0
28	nerczyca	57	36	3	0
31	rak szyjki macicy	98	21	3	0
32	białaczka	52	5	16	0
33	białaczka	71	34	16	0

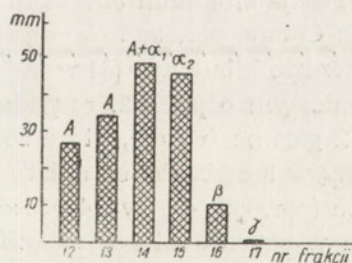
Ciąg dalszy tabl. 1

Nr surowicy	Przypadek	A+ α_1	α_2	β	γ
1	zapalenie wątroby miąższowe	44	24	23	0
5	żółtaczka zakaźna	23	7	6	0
7	nerczyca	15	11	23	0
15	zapalenie gruczołów chłonnych chroniczne	26	27	26	0
18	zapalenie szpiku	21	19	15	0
47	konflikt serologiczny Rh	60	19	27	0
48	konflikt serologiczny Rh	17	48	2	0
49	rak płuc	44	53	8	0

dań poszczególnych surowic, ugrupowanych wg powyżej podanych kryteriów (por. również rys. 1).

Z danych zawartych w tabl. 1 wynika, że w surowicy ludzkiej występują co najmniej trzy różne polarograficznie czynne substancje, których zawartość nie pozostaje w żadnej wzajemnej zależności, zmieniając się w różnych przypadkach patologicznych. Niestety wartości uzyskane przez nas nie stanowią cech charakterystycznych dla poszczególnych typów schorzeń, jak o tym możemy sądzić na podstawie naszego szczupłego materiału doświadczalnego.

Wszystkie powyżej omówione badania przeprowadzane były na surowicy rozdzielanej elektroforetycznie w buforze weronalowym przy pH 8,6. Poddając elektroforezie surowice w buforze octanowym o pH 4,2 uzyskuje się odmienne rozmieszczenie polarograficznie czynnych substancji w poszczególnych frakcjach białkowych (por. rys. 2). Znacznie większa aktywność polarograficzna cechuje albuminy i α_2 -globuliny. Natomiast w γ -globulinach nie stwierdza się odczynu polarograficznego, podobnie jak wówczas, gdy surowica jest rozdzielana przy pH 8,6. Również i te fakty przemawiają za egzystencją kilku niezależnych od siebie różnych polarograficznie czynnych substancji.



Rys. 2. Odczyn polarograficzny we frakcjach surowicy ludzkiej po rozdzieleniu w buforze octanowym o pH 4,2 μ — 0,05, s — 1/100; wartości rzędnej wskazują wysokość fali

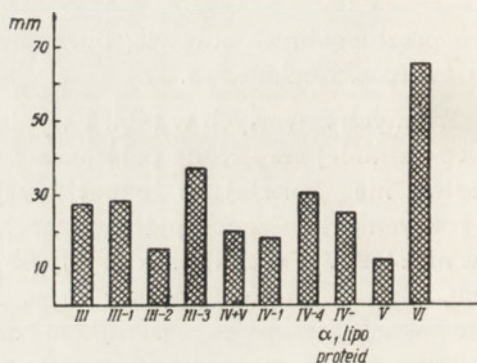
2. ROZMIESZCZENIE POLAROGRAFICZNIE CZYNNYCH SUBSTANCJI WE FRAKCJACH COHNA

a) **Metoda.** Używaliśmy frakcji białek surowicy otrzymanych metodą Cohna Nr 10 [4], uzyskanych dzięki uprzejmości Instytutu Hematologii w Warszawie. Niektóre frakcje (IV + V i VI) otrzymaliśmy w naszym Zakładzie postępując się metodą Cohna Nr 11 [7].

20 mg suchego proszku badanej frakcji rozpuszczano w 1,5 ml 0,90% NaCl, po czym dodawano 1,5 ml buforu octanowego o pH 4,7 i mieszaninę ogrzewano w 80° przez kilka minut. Po odsączeniu osadu wytrąconych białek dodawano do 1 ml przesączu 1 ml odczynnika kobaltowego Brdicki i mieszaninę polarografowano.

b) **Wyniki.** Rys. 3 przedstawia wysokości fal polarograficznych w poszczególnych frakcjach. Frakcja I (fibrynogen) oraz II (γ -globuliny) nie zawierają polarograficznie czynnych substancji. W pozostałych frakcjach zawsze występuje odczyn polarograficzny, najbardziej intensywny we frakcji VI, wypadającej przy najwyższym stężeniu etanolu. Dość wyraźną polarograficzną aktywność okazują również frakcje III-3 oraz IV-4. Frakcja V (albuminy) okazuje tylko słabą falę polarograficzną.

Frakcja albuminu uzyskana metodą Cohna, poddana ciągłej elektroforezie bibułowej [9] w buforze octanowym o pH 4,2, rozpada się na 2 główne frakcje, które zebraliśmy w 8 oddzielnych odbieralnikach (por. rys. 4). Rys. 4 przedstawia wysokości fal polarograficznych w przesączach poszczególnych próbek rozdzielanego w powyższy sposób albuminu. Wykres przedstawia dwa wyraźne szczyty aktywności polarograficznej, świadczące o tym, że w albuminach surowicy ludzkiej otrzymanych metodą Cohna, poddawanych elektroforezie w odczynie kwaśnym, występują co najmniej 2 polarograficznie czynne substancje.



Rys. 3. Rozmieszczenie polarograficznie czynnych substancji we frakcjach Cohna; s — 1/200, objaśnienie w tekście

WŁASNOŚCI POLAROGRAFICZNIE CZYNNEGO GLIKOPROTEIDU WĘDRUJĄCEGO z α -GLOBULINAMI

a) **Metoda.** Surowcem, z którego uzyskano najbardziej charakterystyczną polarograficznie czynną substancję surowicy ludzkiej, była surowica konserwowanej krwi, uzyskana dzięki uprzejmości Stacji Przetaczania Krwi

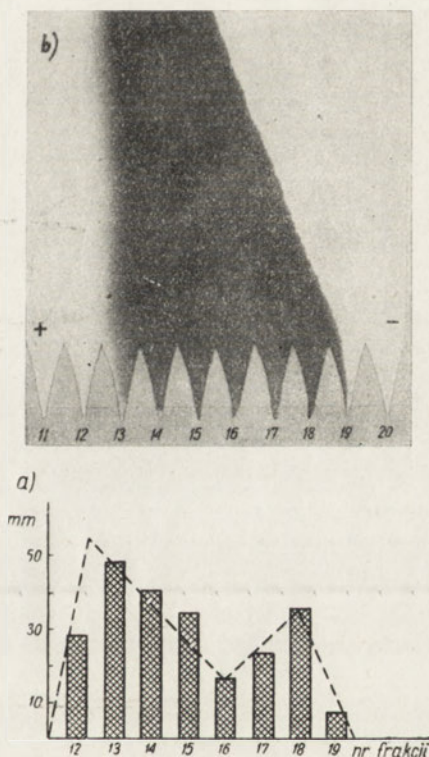
w Krakowie. W celu wydzielenia polarograficznie czynnej substancji wykorzystano postępowanie opisane przez Waldschmidt-Leitz a [13], uzupełniając je zabiegami stosowanymi przez Cohna do frakcjonowania osocza.

Osocze rozcieńczano dwukrotnie wodą, zadawano 20% roztworu kwasu sulfosalicylowego aż do całkowitego wytrącenia białka. Po upływie 10 minut mieszaninę sączono przez sączek z twardej bibuły, odrzucano pierwsze opalizujące partie, zbierając zupełnie przejrzysty przesącz, celem dalszego frakcjonowania. Wszystkie te czynności przeprowadzano w temp. 0°.

Do klarownego przesącza, otrzymanego po usunięciu białka ochłodzonego do temp. -4°, dodawano porcjami 60% objętości 96% etanolu i pozostawiano w chłodni na przeciąg 48 godzin. Po zdekantowaniu płynu znajdującego się nad osadem, osad odwirowywano i przemywano etanolem celem wypłukania resztek kwasu sulfosalicylowego. Preparat ten rozpuszczano w fizjologicznym roztworze NaCl, dializowano wobec 0,9% NaCl i używano do dalszych badań.

b) Wyniki. Uzyskany w powyżej opisany sposób związek wykazywał dodatnie odczyny na białka. Pomiar absorpcji w świetle pozafioletkowym, którego wyniki obrazuje krzywa absorpcyjna, podana na rys. 5, wykazuje dwa maksima — jedno przy ok. 290 m μ , drugie — przy ok. 238 m μ . Różnica krzywej absorpcji wyznaczonej w buforze fosforanowym o pH 7,2 i w 0,1 N NaOH pozwala wnioskować, że maksima absorpcji są uwarunko-

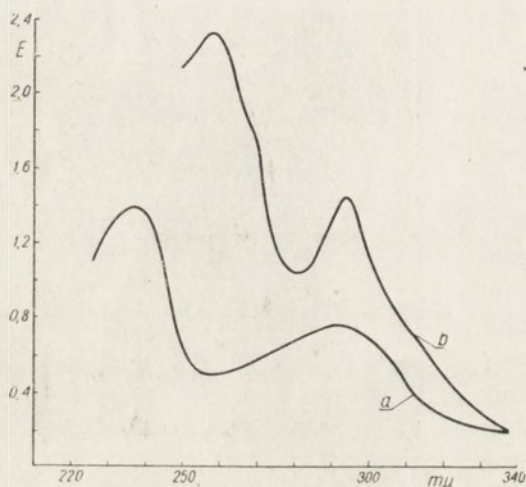
wane w badanym preparacie obecnością tryptofanu i tyrozyny. Oba te aminokwasy zostały wykazane w analogicznym produkcie otrzymanym przez wytrącenie siarczanem amonu uzyskanym z surowicy, również przy użyciu klasycznych metod analizy chemicznej [14]. Badana substancja hydrolizowana kwasem siarkowym wykazuje przy zastosowaniu elektroforezy bibu-



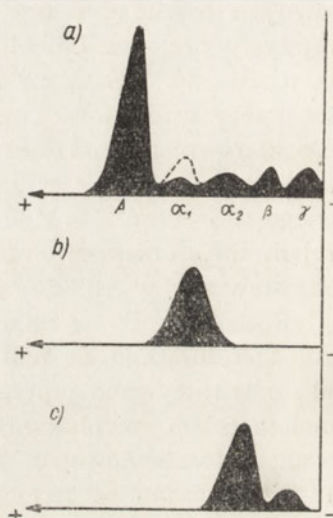
Rys. 4. Odczyn Brdički we frakcjach albuminu surowicy ludzkiej po rozdzieleniu w buforze octanowym przy pH 4,2, μ — 0,05, s — 1/100. Linia przerywana ogranicza dwa maksima aktywności polarograficznej

lowej [5] zawartość glikozaminy i galaktozy. Mannozy, o której obecności mówią inni autorzy [15], nie mogliśmy wykryć.

Nasz preparat glikoproteidu w buforze weronalowym o pH 8,6 i sile jonowej 0,05 wędruje do anody jako jednolity produkt. Podobny charakter okazuje ten glikoproteid w buforze octanowym o pH 4,0 cechując się jednak mniejszą ruchliwością niż ta, która charakteryzuje go w buforze weronalowym. Przy pH 4,0 glikoproteid rozdziela się na dwie frakcje — jedną



Rys. 5



Rys. 6

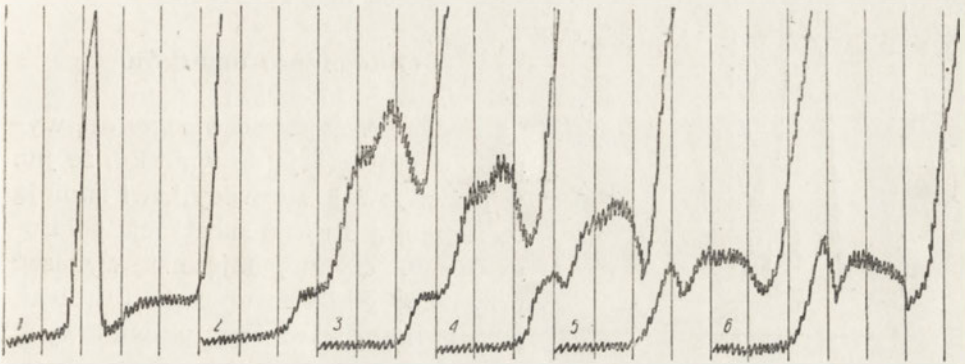
Rys. 5. Widmo absorpcyjne α_1 -glikoproteidu; stężenie 1 mg/ml. a) krzywa w 0,15 M buforze fosforanowym pH 7,2 b) w 0,1 N NaOH

Rys. 6. Elektroforetyczne badanie α_1 -glikoproteidu: a) frakcje surowicy ludzkiej z dodanym α_1 -glikoproteidem, który wędruje z frakcją α_1 -globulinów, b) α_1 -glikoproteid w buforze weronalowym pH 8,6 c) w buforze octanowym o pH 4,0

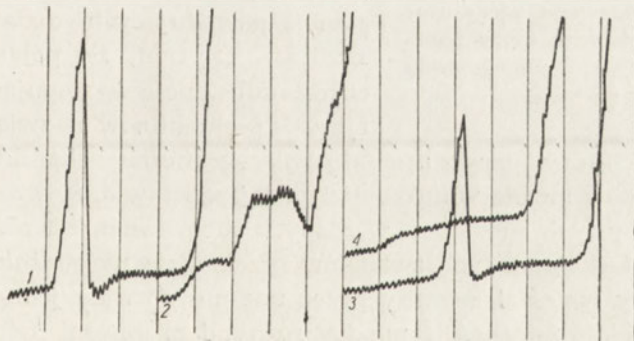
o większej ruchliwości anodowej, reprezentującą ok. 90% masy preparatu i drugą — o mniejszej ruchliwości, zawierającą resztę białka (rys. 6).

Badany glikoproteid cechuje się wybitną aktywnością polarograficzną. Rys. 7 przedstawia dwustopniowe fale polarograficzne glikoproteidu, otrzymane przy jego różnych stężeniach w odczynniku Brdički z Co^{III} . W miarę malejącego stężenia glikoproteidu drugi stopień fali opada szybciej niż pierwszy i przy stężeniu ok. 0,013 mg na 1 ml pierwszy stopień fali jest wyższy od drugiego. Mamy tu do czynienia ze zjawiskiem charakterystycznym dla większości białek, z tzw. efektem krzyżowym Troppa [12]. Polarograficzną falę glikoproteidu badano również w roztworze Co^{II} ; wyniki tych badań przedstawia rys. 8. Z badanych krzywych wynika, że glikoproteid w obecności Co^{II} , nie daje widocznej fali polarograficznej, tłumia nato-

miast wybitnie fałę jonu kobaltowego. Zjawiska tego nie jesteśmy w stanie obecnie wytłumaczyć, gdyż zasadniczo wszystkie białka, zarówno w obecności Co^{II} , jak i Co^{III} dają wyraźną dwustopniową katalityczną fałę. Być może, że badany glikoproteid posiada odmienną zdolność tworze-



Rys. 7. Dwustopniowe fałę α_1 -glikoproteidu przy różnym stężeniu preparatu. 1) krzywa kobaltu trójwartościowego, 2—6 α_1 -glikoproteid o stężeniu azotu w ml: 0,071, 0,054, 0,04, 0,017, 0,013 mg. S — 1/200, odcięte odpowiadają 200 mV, polarografowano od $-0,8 - 2,0$ V

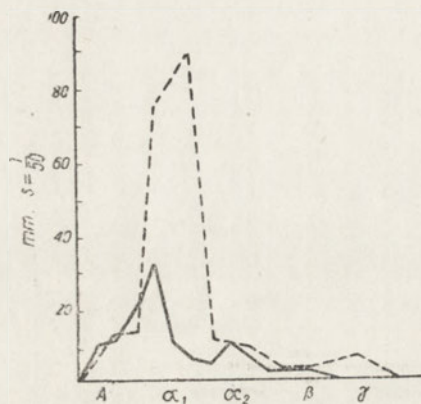


Rys. 8. Polarografowanie α_1 -glikoproteidu w obecności Co^{II} . 1) Co^{III} , 2) α_1 -glikoproteid + Co^{III} , 3) Co^{II} , 4) α_1 -glikoproteid + Co^{II} , s — 1/100. Stężenie α_1 -glikoproteidu i kobaltu w obu przypadkach jednakowe

nia kompleksu z jonem II- i III-wartościowego kobaltu i że z kobaltem II-wartościowym daje fałę katalityczną przy innym stężeniu i w innych warunkach niż te, które stosowane były przez nas.

Po dodaniu roztworu oczyszczonego glikoproteidu do surowicy krwi ludzkiej i po poddaniu tej surowicy rozdzielni elektroforetycznemu, wybitna fałę polarograficzna występuje we frakcji α_1 -globulinów, jak to wy-

kazuje rys. 9. Z powyższych danych wynika, że badany przez nas glikoproteid jest właśnie tym charakterystycznym prawidłowym polarograficznie czynnym składnikiem surowicy krwi ludzkiej, który w warunkach normalnych spotykamy w szczególnie dużym stężeniu we frakcji α_1 -globulinów.



Rys. 9. Rozmieszczenie α_1 -glikoproteidu we frakcjach elektroforetycznych surowicy ludzkiej prawidłowej oraz po dodaniu do surowicy czystego preparatu (linia przerywana). Obecność fali w γ -globulinach jest spowodowana zdenaturowanym glikoproteidem, który pozostaje w miejscu umieszczenia próbki na bibule

nymi od tego, który powoduje falę polarograficzną charakterystyczną dla α_1 -globulinów można wnioskować na tej podstawie, że wzajemny stosunek ilościowy tych substancji w różnych surowicach jest różny. Wahań ilościowe każdego z tych związków przebiegają niezależnie od siebie. Dotychczasowy materiał zebrany przez nas nie pozwala jednak na sformułowanie jakiegś zależności między różnymi procesami patologicznymi a wzrostem zawartości poszczególnych polarograficznie czynnych składników. Wzrost ich zawartości zaznacza się w wielu różnorodnych sprawach patologicznych, co pozwala na sformułowanie twierdzenia, że wartość odczynu Brdički dla rozpoznawania schorzeń nowotworowych jest problematyczna. Znamienny jest również fakt, że nigdy nie spotyka się polarograficznie czynnych substancji towarzyszących γ -globulinom.

Wszystkie składniki surowicy dające dodatni odczyn Brdički wykazują pewne wspólne cechy, jak rozpuszczalność w kwasie sulfosalicylowym i ciepłotrwałość. Muszą więc to być związki o stosunkowo małej masie cząsteczkowej, odporne na działanie czynników denaturujących. Jeden z nich, towarzyszący α_1 -globulinom, próbowaliśmy bliżej scharakteryzo-

Omówienie wyników

Podane w części doświadczalnej wyniki doprowadzają do wniosku, że już w prawidłowej surowicy krwi istnieją co najmniej 3 różne substancje polarograficznie czynne, dające się wykazać przy pomocy klasycznej reakcji Brdički, przy czym w warunkach prawidłowych najwięcej takiej substancji wędruje z frakcją α_1 -globulinów. Poza tym doświadczenia przeprowadzane z oczyszczonymi albuminami surowicy wskazują na to, że i te białka zawierają domieszkę jakichś dwóch różnych substancji powodujących dodatni odczyn Brdički. O tym, że polarograficznie czynne substancje występujące we frakcji α_2 - i β -globulinów są związkami róż-

wać, stwierdzając jego glikoproteidowy charakter, co zresztą pokrywa się z cechami opisywanymi przez innych autorów.

Streszczenie

1. Przeprowadzono odczyn Brdički z poszczególnymi frakcjami surowicy krwi ludzkiej, rozdzielonymi za pomocą elektroforezy bibułowej. Stwierdzono niemal zawsze obecność polarograficznie czynnych substancji we frakcji α_1 -, α_2 - i β -globulinów.

2. Wędrujące z poszczególnymi frakcjami białkowymi polarograficznie czynne substancje w wielu przypadkach patologicznych występują we wzmożonych ilościach, przy czym zmiany w intensywności odczynu Brdički w poszczególnych frakcjach białek surowicy nie wykazują żadnej wzajemnej zależności. Mamy więc do czynienia niewątpliwie z trzema różnymi polarograficznie czynnymi substancjami. Poza tym z albuminami wędruje również drobna ilość dwóch polarograficznie czynnych związków, natomiast frakcja γ -globulinów daje zawsze ujemny odczyn Brdički.

3. Z frakcji VI Cohna wydzielono polarograficznie czynną substancję, będącą glikoproteidem, zawierającym glikozaminę i galaktozę. Substancja ta jest najprawdopodobniej identyczna z polarograficznie czynnym składnikiem α_1 -globulinów.

LITERATURA

- [1] Boyland E., Butler O. L., Conway B. E., *Brit. J. Cancer* 5, 235, 1951.
- [2] Brdička R. *Nature* 142, 817, 1938; *Klin. Wschrft.* 18, 305, 9139; *Research* 1, 25, 1947.
- [3] Butler L. O., *Brit. J. Cancer* 5, 225, 1951.
- [4] Cohn E. J., Gurd F. R. N., Surgenot D. M., Barnes B. A., Brown R. K., Deronaux G., Gillespie J. M., Kahut F. W., Lever W. F., Liu C. H., Mittelman D., Monton R. F., Schmidt K., Uroma E., *J. Am. Chem. Soc.* 72, 465, 1952.
- [5] Galos B. i Ostrowski W., *Acta Biochim. Pol.* 1, 171, 1954.
- [6] Homolka J. *Cas. Lek. Ces.*, 92, 633, 1953.
- [7] Lever W. F., Gurd F. R. N., Uroma E., Brown R. K., Barnes B. A., Schmidt K., Shultz E. J., *J. Clin. Invest.* 30, 99, 1951.
- [8] Ostrowski W. i Mikucki A., *Acta Physiol. Pol.* 3, 277, 1952.
- [9] Ostrowski W. i Niewiarowska A., *Acta Biochim. Pol.* 3, 171, 1956.
- [10] Ostrowski W. i Oszast Z., *Pol. Tyg. Lek.* 10, 982, 1955.
- [11] Stary Z., Ayten Ugur, *Klin. Wschrft.* 33, 766, 1955.
- [12] Tropp C., Jühling L., Geiger F., *Z. Physiol. Chem.* 262, 225, 1939.
- [13] Waldschmidt-Leitz E., *Angew. Chem.* 55, 344, 1938.
- [14] Weimer H. E., Mehl J. W., Winzler R. J., *J. Biol. Chem.* 185, 561, 1950.

- [15] Wheatley M., Valenta Z., *Experientia* **11**, 438, 1955.
[16] Winzler R. J., Devor A. W., Mehl J. W., *Feder. Proc.* **6**, 303, 1947.
[17] Winzler R. J., Devor A. W., Mehl J. W., Smith J. M., *J. Clin. Invest.* **27**, 609, 1948.

ПОЛЯРОГРАФИЧЕСКИ-АКТИВНЫЕ СУБСТАНЦИИ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Резюме

1. Авторы провели реакцию Брдички с отдельными фракциями сыворотки человеческой крови, разделенными путем электрофореза с применением фильтровальной бумаги. Почти всегда констатировали наличие полярографически-активных субстанций во фракциях α_1 -, α_2 - и β - глобулинов.

2. Странствующие с отдельными белковыми фракциями полярографически-активные субстанции во многих патологических случаях выступают в увеличенных количествах, причем изменения интенсивности реакции Брдички в отдельных фракциях белков сыворотки не обнаруживают никакой взаимной зависимости. Таким образом, в этих случаях встречаются, несомненно, три различные полярографически-активные субстанции. Кроме того, с альбуминами странствует также незначительное количество двух полярографически-активных соединений, фракция же γ -глобулинов дает всегда отрицательную реакцию Брдички.

3. Из фракции VI Кона выделена полярографически-активная субстанция, являющаяся глюкопротеидом, содержащим глюкозамин и галактозу. Эта субстанция, по всей вероятности, идентична с полярографически-активным компонентом α_1 -глобулинов.

POLAROGRAPHICALLY ACTIVE SUBSTANCES IN BLOOD SERUM

Summary

1. The Brdička reaction was applied to various human blood serum fractions separated by paper electrophoresis. α_1 -, α_2 - and β -globulin fractions were almost invariably found to contain polarographically active substances.

2. The polarographically active substances travelling with the particular protein fractions increase in quantity in numerous pathological cases, but changes in the intensity of the Brdička reaction in particular plasma protein fractions failed to reveal any correlation. The results suggest the presence of three different polarographically active substances.

Albumins also include small quantities of two polarographically active substances, while the γ -globulin fraction invariably yields a negative Brdička reaction.

3. Fraction VI of Cohn yielded a polarographically active substance which was a glycoprotein and contained glucosamine and galactose. This substance is most likely identical with the polarographically active constituent of α_1 -globulin.

Otrzymano 26.3.1956 r.

P. SZAFRAŃSKI

**ENZYMY CYKLU PENTOZOWEGO U MYCOBACTERIUM TBC.
H37Rv**

Z Zakładu Biochemii PAN w Warszawie
Kierownik prof. dr Józef Heller
Pracownia Biochemii Ewolucyjnej
Kierownik prof. dr Irena Mochńska

W poprzedniej pracy [3] wykazaliśmy istnienie przemian cyklu pento-
zowego u *Mycobacterium phlei*. Różnice występujące między saprofitami
i patogennymi bakteriami nie pozwalają jednak na uogólnienie tych wy-
ników na szczepy zjadliwe *Mycobacterium*.

Celem tej pracy było zbadanie enzymów biorących udział w bezpo-
średnim utlenianiu glikozy u gruźliczego szczepu ludzkiego H37Rv.

Część doświadczalna**STOSOWANE PREPARATY**

Preparat enzymatyczny z *Mycobacterium tbc.* H37Rv. Uzyskano go w następujący sposób: bakterie (ze zbioru Inst. Gruźlicy w Warszawie) hodowano na płynnej pożywce DGK używanej przez nas [8] do tych celów. Hodowlę prowadzono przez cztery tygodnie, po czym utworzony kożuch odsączono. Około 40 g wilgotnej masy bakteryjnej przenoszono do emulgatora, dodawano 150 ml oziębionego do -30° acetonu i w tej temperaturze ekstrahowano przez 10 minut. Następnie osad odwirowano zwracając uwagę, aby temperatura po zakończeniu wirowania nie przekraczała $3-5^{\circ}$. Odwirowany osad powtórnie ekstrahowano w emulgatorze. W sumie przeprowadzono trzy ekstrakcje acetonem. Uzyskany proszek acetonowy suszono w temp. 0° . Służył on nam do otrzymywania preparatów enzymatycznych. Metoda otrzymywania opisana szczegółowo w poprzedniej naszej pracy [8] polega na wyciąganiu z proszku acetonowego rozpuszczalnych w wodzie białek i parokrotnym frakcjonowaniu siarczanem amonu. Wytrącone przy nasyceniu 0,7 białko rozpuszczano w wodzie i dializowano. Z dwóch gramów acetonowych dezintegratów otrzymuje się

około 4 ml możliwie zagęszczonego roztworu enzymatycznego. Uzyskany w ten sposób preparat przechowywany przez 7 miesięcy w temp. -15° wykazywał tylko niewielki spadek aktywności enzymatycznej. Również proszek acetonowy, przechowywany w tych warunkach, całkowicie spełnia zadanie jako materiał wyjściowy do otrzymywania preparatów enzymatycznych.

Ester rybozo-5-fosforowy (R-5-P). Używano dwa preparaty. Jeden o czystości 87%, drugi 98%. Czystość obu preparatów obliczano na podstawie oznaczenia organicznego fosforu metodą Fiskego Subbarowa w modyfikacji Kinga [10]. Preparat o czystości 87% otrzymano z ATP (8,15) izolowanego z mięśni królika [24]. Drugi o czystości 98% uzyskano z kwasu inozynowego [14], który wyosobniono z mięśni konia [19]. Oba preparaty przechowywane jako sól barowa wolne były od fosforu nieorganicznego i chromatograficznie w teście fosforanowym wykazywały tylko jedną plamę. Do doświadczeń używano roztworów po usunięciu baru i doprowadzeniu pH do 7,6 przez dodawanie 0,1 N ługu sodowego. Przy stosowaniu obu preparatów nie zauważono różnic.

Ester glikozo-6-fosforowy (G-6-P). Sól barowa tego związku została otrzymana [23] przez lek. Teresę Szymczyk, st. asystenta Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Warszawie. Czystość preparatu sięgała 96%.

Kwas 6-fosfoglikonowy (K-P-G). Uzyskano go utleniając 6-fosfoglikozę bromem [21]. Otrzymano preparat o czystości 79%. W badaniu chromatograficznym nie wykazano zanieczyszczenia fosfoglikozą.

Dehydrogenaza alkoholowa. Izolowano ją z drożdży piwnych według metody Rackera [20].

Dehydrogenaza G-6-P. Materiałem wyjściowym do otrzymywania tego enzymu były drożdże piekarskie. Postępowano według metody Glasera i Browna [6] aż do frakcjonowania alkoholem etylowym włącznie. W początkowym stadium preparatyki pominięto zastosowanie siarczanu protaminy.

Kozymaza (DPN). Izolowano ją z drożdży piwnych według metody Ohlmevera [18]. Czystość DPN określano mierząc w spektrofotometrze przy $340\text{ m}\mu$ absorpcję preparatu zredukowanego dehydrogenazą alkoholową. Do wyliczenia czystości DPN stosowano współczynnik absorpcji $6,22 \cdot 10^6\text{ cm}^2/\text{mol}$ podany przez Horeckera i Kornberga [9]. Czystość preparatu wynosiła 33%.

Preparat kozymazy zbadano również na obecność TPN. W tym celu użyliśmy dehydrogenazy 6-fosfoglikozy wraz z jej substratem. Według Kornberga [11] enzym ten odznacza się wysoką specyficnością w stosunku do TPN. Brak absorpcji przy $340\text{ m}\mu$ jest dowodem nieobecności TPN w naszym preparacie kozymazy.

D w u f o s f o t i a m i n a (ThPP). W pierwszych doświadczeniach użyto preparatu otrzymanego od mgr A. S z e w c z u k a¹. Do dalszych doświadczeń rozporządzaliśmy preparatem firmy L. Light & Co Ltd. Nie zauważono różnic w działaniu obu preparatów.

Doświadczenia przeprowadzono na dwóch różnych preparatach z *Myc. tbc.* H37Rv., powtarzając parokrotnie z każdym preparatem.

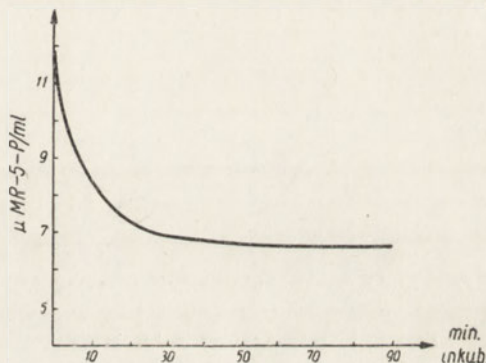
BADANIA ENZYMATYCZNE

W pierwszych próbach zbadano szybkość znikania 5-fosforybozy pod wpływem preparatu enzymatycznego z *Mycobacterium tbc.*

Do doświadczeń brano mieszaninę o następującym składzie: 0,3 ml R-5-P, 0,039 M; 0,2 ml buforu weronalowego 0,1 M, pH 7,6; 0,3 ml preparatu enzymatycznego z M.37Rv 0,2 ml wody. Mieszaninę inkubowano w 37°. Co pewien czas pobierano 0,2 ml, dodawano 1 ml 10% kwasu trójchloro-octowego i rozcieńczano wodą do 15 ml w kolbce miarowej. W 1 ml uzyskanego w ten sposób roztworu oznaczono rybozę metodą orcynolową [17]. Próbkę do oznaczania rybozy pobierano na początku reakcji, po 10 min., 25, 50 i 90 minut.

Preparat enzymatyczny z *Mycobacterium* używał fosforybozę, przy czym reakcja zatrzymywała się po zużyciu 44% R-5-P. Znikanie fosforybozy ilustruje rys. 1.

Produkty powstałe z R-5-P podczas inkubacji z preparatem enzymatycznym z *M. H37Rv* badano spektrofotometrycznie stosując metodę Dischego CyRI (4,8). Pobierano w czasie 0 min., 30 min. i 1140 min. od początku inkubacji 0,1 ml mieszaniny rozcieńczano wodą do 1 ml i wykonywano reakcję Dischego. Odczytanie absorpcji w zakresie od 330 m μ do 560 m μ pozwala zidentyfikować cukrowe składniki mieszaniny i ocenić ich stężenie. Wyniki podaje rys. 2.

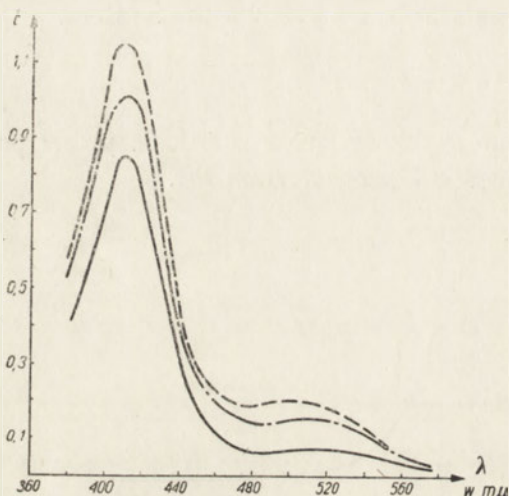


Rys. 1. Szybkość znikania (R-5-P) pod wpływem preparatów enzymatycznych z *M.H37Rv*

0,3 ml R-5-P, 0,039 M; 0,2 ml buforu weronalowego 0,1 M, pH 7,6;
0,3 ml preparatu enzymatycznego z *M. H37Rv*; 0,2 ml wody

¹ Składamy podziękowanie mgr A. S z e w c z u k o w i, st. asystentowi Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej we Wrocławiu za syntezę i ofiarowanie nam dwufosfotiaminy.

Przedstawione krzywe posiadają dwa maksima absorpcji. Jedno z nich przy 415 m μ odpowiada heksozom, zaś maksimum około 520 m μ charakteryzuje heptulozę. Z kształtu krzywych możemy wnioskować, że nasz preparat enzymatyczny zawiera transketolazę niezbędną do wytworzenia sedoheptulozy i transaldolazę umożliwiającą powstawanie fosfoheksozy.



Rys. 2. Krzywe absorpcyjne produktów przemiany R-5-P uzyskanych pod wpływem działania preparatów z *M. H37Rv*.

0,4 ml R-5-P, 0,031 M; 0,2 ml buforu weronalowego 0,15 M, pH 7,6; 0,05 ml MgCl₂ 0,01 M; 0,3 ml preparatu enzymatycznego z *M. H37Rv*; 0,05 ml wody; — 0 min.
 - - - 30 min., - - - - 1140 min.

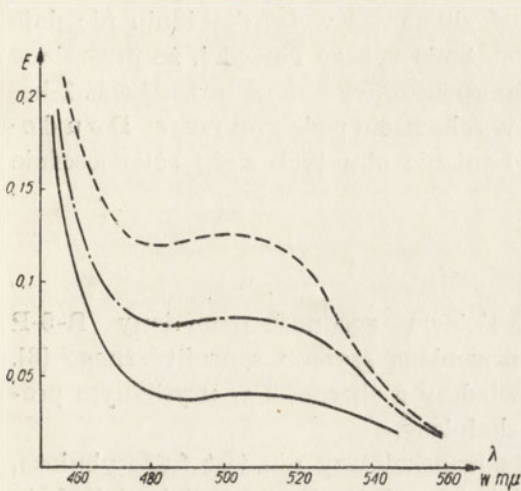
Stosunkowo niewielki wzrost absorpcji po inkubacji odpowiadający heptulozie w porównaniu z wynikami uzyskanymi na innym materiale [1,8] nasuwał przypuszczenie, że czynność transketolazy jest tu upośledzona na skutek niedostatku dwufosfotiaminy. Jednakże wzbogacenie mieszaniny inkubowanej przez dodanie 100 μ g ThPP nie zmieniła charakteru krzywej. W naszym preparacie nie mamy zatem do czynienia z brakiem dwufosfotiaminy. Negatywny wynik powyższego doświadczenia kazał zastanowić się nad możliwością, czy transketolaza u *Mycobacterium tbc.* w odróżnieniu od transketolaz pochodzących z innych źródeł może się obywać bez ThPP.

Wykonano więc następujące doświadczenia: z preparatu enzymatycznego usunięto dwufosfotiaminę według wskazówek podanych przez Gunsalus a i innych [7]. W tym celu do około 2 ml preparatu dodawano 0,1 N kwasu solnego do pH 5,2, odwirowano wytrącony osad, a do płynu znad osadu dodawano stałego siarczanu amonu do osiągnięcia 0,7 nasycenia. Po 15 min. odwirowano wytrącone białko, rozpuszczono w 2 ml wody i dializowano przez 3 godz. do 10 l 0,005 M roztworu wersenianu dwusodowego. Wszystkie czynności przeprowadzano w temp. nieprzekraczającej + 3°. Preparat przechowywano w -15°.

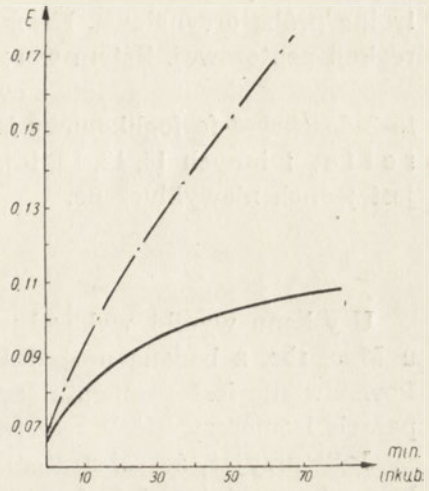
Przygotowany w ten sposób preparat nie zużywał fosforybozy. Dodanie 100 μ g dwufosfotiaminy reaktywowało nasz preparat. Przebieg tego doświadczenia ilustruje rys. 3.

Na rysunku 3 krzywa zerowa powstała z przykrycia dwóch krzywych: a) natychmiast po dodaniu ThPP oraz b) krzywej uzyskanej po 24 godz. z preparatu pozbawionego ThPP. Krzywe oznaczone liniami przerywanymi

obrazują absorpcję heptulozy powstałej z R-5-P po dodaniu dializowanego preparatu enzymatycznego wzbogaconego dwufosfotiaminą. Otrzymane wyniki dowodzą, że transketolaza z *M. H37Rv.* nie różni się pod względem



Rys. 3



Rys. 4

Rys. 3. Wpływ dwufosfotiaminy na przemianę R-5-P w preparacie enzymatycznym z *M. H37Rv.*, z którego usunięto dwufosfotiaminę przez zakwaszenie i dializę. 0,4 ml R-5-P, 0,031 M; 0,2 ml buforu weronalowego 0,15 M, pH 7,6 0,05 ml $MgCl_2$ 0,01 M; 0,05 ml ThPP 0,002 M (lub 0,05 ml wody); 0,3 ml preparatu enzymatycznego z *M. H37Rv.*; — krzywa zerowa, — · — 30 min, - - - 24 godz.

Rys. 4. Redukcja DPN obrazująca utlenianie G-6-P i K-P-G przez preparat z *M. H37Rv.*

1,95 ml buforu weronalowego 0,15 M, pH 7,6; 0,3 ml G-6-P 0,003 M (lub 0,3 ml K-P-G 0,27 M); 0,45 ml DPN 0,0037 M; 0,3 ml preparatu enzymatycznego; — G-6-P, — · — K-P-G

zapotrzebowania na ThPP od transketolaz otrzymanych z materiałów zwierzęcych i roślinnych.

Dalsze próby miały na celu zbadanie, czy uzyskane z *M. H37Rv.* preparaty enzymatyczne zawierają dehydrogenazę G-6-P oraz dehydrogenazę K-P-G. W tym celu inkubowano preparat z właściwymi substratami i DPN w temp. 22° śledząc narastanie DPNH w spektrofotometrze przy 340 m μ . Równocześnie wykonano dwie próby kontrolne, z których jedna była bez substratu, druga bez enzymu. W obu tych kontrolach nie stwierdzono zmian w absorpcji przy 340 m μ . Załączony rys. 4 obrazuje szybkość redukcji DPN we właściwych doświadczeniach. Jak widać, redukcja DPN wobec kwasu fosfoglikonowego jest znacznie intensywniejsza od redukcji wobec fosfoglikozy.

W mieszaninie zawierającej DPN, preparat enzymatyczny i G-6-P jako substrat, stwierdzono zwiększenie ilości rybozy w stosunku do próby kontrolnej odbiałczonej przed inkubacją. Ponieważ nasuwało się podejrzenie, że powstający kwas fosfoglikonowy daje reakcję na rybozę, wykonano kontrolną próbę orcyolową. Kwas fosfoglikonowy w tym stężeniu nie daje reakcji pentozowej. Zatem wzrost stężenia rybozy dowodzi, że przemiana fosfoglikozy biegnie zgodnie z cyklem pentozowym, a nie przez kwas 2-keto-3-dezoksy-6-fosfoglikonowy jak w schemacie podanym przez D o u d o r o f f a i innych [5, 12, 13, 16]. Istnienie obu tych dróg równocześnie jest jednak niewykluczone.

Dyskusja

Uzyskane wyniki wykazały jakościową zgodność przemiany R-5-P u *Myc. tbc.* z badaną uprzednio przemianą szczepu saprofitycznego [8]. Powstawanie fosfosedoheptulozy świadczy o obecności w uzyskanym preparacie izomerazy R-5-P oraz transketolazy.

Jeśli przyjąć, że substratem dla transketolazy nie jest fosforybuloza, lecz ester ksylulozo-5-fosforowy, jak to podaje S r e r e i inni [22], to należałoby założyć, że w badanych preparatach obecna jest jeszcze jedna izomeraza przekształcająca 5-fosforybulozę w 5-fosfoksylulozę. Wzrost absorpcji przy 415 m μ wskazuje na obecność heksozy, co jest dowodem czynności transaldolazy przerzucającej trójwęglowy fragment z sedoheptulozy na fosfotriozę z wytworzeniem fosfoheksozy.

Na uwagę zasługuje fakt, że chociaż na tym odcinku przemian nie stwierdzono jakościowych różnic między szczepem niechorobotwórczym i patogennym, to jednak z *M. H37Rv* otrzymano przeszło dwa razy większą objętość badanej frakcji białkowej niż ze szczepu saprofitycznego.

Redukcja kozymazy w preparacie enzymatycznym z *Mycobacterium tbc. H37Rv* wobec G-6-P i K-P-G świadczy o obecności odpowiednich dehydrogenaz. Dehydrogenaza G-6-P wyodrębniona z drożdży i materiału zwierzęcego jest specyficzna dla TPN. W doświadczeniach naszych stosowaliśmy DPN i tym można by tłumaczyć małą aktywność układu dehydrogenazowego. Należy jednak pamiętać, że niektóre drobnoustroje mają dehydrogenazę G-6-P zdolną do redukcji DPN (3,25). Inne znowu organizmy mając dehydrogenazę specyficzną związaną z TPN mogą także redukować DPN za pośrednictwem transhydrogenazy [2]. Reakcja ta może przebiegać już w obecności katalitycznych ilości TPN. W naszych doświadczeniach ewentualność ta jest raczej wykluczona, ponieważ w preparacie DPN nie stwierdziliśmy domieszki TPN. Tak więc małą aktywność dehydrogenazy G-6-P można tłumaczyć zakładając, że użyty koenzym nie jest specyficzny dla obecnej w preparacie z *Myc. tbc.* dehydrogenazy,

jak też przyjmując nieduże stężenie enzymu w tym preparacie. W każdym razie wykonane badania wskazują, że gruźliczy szczep ludzki posiada układ zdolny do przenoszenia wodorów z G-6-P i K-P-G na kozymazę.

Streszczenie

Preparat enzymatyczny z *Mycobacterium tbc.* H37Rv metabolizuje 5-fosforybozę. Produkty powstałe z R-5-P badano spektrofotometrycznie stosując cysteinową metodę Dischego. Uzyskane krzywe absorpcyjne wskazują, że preparat enzymatyczny z *M. tbc.* H37Rv zawiera izomerazę 5-fosforybozy, transketolazę i transaldolazę. Można przypuszczać, że w preparacie naszym występuje również izomeraza 5-fosforybulozy przekształcająca ją w 5-fosfoksylulozę.

W badaniach z dwufosfotaminą stwierdzono, że transketolaza z *Mycobacterium tbc.* wymaga do swego działania dwufosfotiaminy podobnie jak inne transketolazy z materiału roślinnego czy zwierzęcego. W otrzymanym preparacie enzymatycznym stwierdzono również obecność dehydrogenaz 6-fosfoglikozy i kwasu 6-fosfoglikonowego mierząc redukcję DPN w obecności odpowiednich substratów. W mieszaninie zawierającej DPN preparat enzymatyczny i G-6-P stwierdzono zwiększenie ilości rybozy w stosunku do próby kontrolnej.

Wyniki uzyskane z doświadczeń dowodzą, że u *Mycobacterium tbc.* H37Rv podobnie jak i u saprofitycznego szczepu *Myc. phlei* występują enzymy cyklu pentozowego glikozy.

LITERATURA

- [1] Axelrod B., Bandurski R. S., Greiner C. M., Jang R., *J. Biol. Chem.* **202**, 619, 1953.
- [2] Colowick S. P., Kaplan N. O., Neufeld E. F., Ciotti M. M., *J. Biol. Chem.* **195**, 95, 1952.
- [3] De Moss R. D., Gunsalus I. C., Bard R. C., *J. Bacteriol.* **66**, 10, 1953.
- [4] Dische Z., Shettles L. B., Osnos M., *Arch. Biochem.* **22**, 169, 1949.
- [5] Entner N., Doudoroff M., *J. Biol. Chem.* **196**, 853, 1952.
- [6] Glaser L., Brown D. H., *J. Biol. Chem.* **216**, 67, 1955.
- [7] Gunsalus I. C., Horecker B. L., Wood W. A., *Bact. Reviews* **19**, 79, 1955.
- [8] Heller J., Szafranski P., *Acta Biochim. Pol.* **2**, 435, 1955.
- [9] Horecker B. L., Kornberg A., *J. Biol. Chem.* **175**, 385, 1948.
- [10] King E. J., *Biochem. J.* **26**, 292, 1932.
- [11] Kornberg A., *J. Biol. Chem.* **182**, 805, 1950.
- [12] Kovachevich R., Wood W. A., *J. Biol. Chem.* **213**, 745, 1955.
- [13] Kovachevich R., Wood W. A., *J. Biol. Chem.* **213**, 757, 1955.
- [14] Lewene P. A., Jacobs W. A., *Ber.* **44**, 746, 1911.
- [15] Long C., *Biochem. J.* **59**, 322, 1955.
- [16] Mac Gee J., Doudoroff M., *J. Biol. Chem.* **210**, 617, 1954.

- [17] Mejsbaum W., *Z. physiol. Chem.* **258**, 117, 1939.
[18] Ohlmeyer P., *Biochem. Z.* **297**, 66, 1938.
[19] Ostern P., *Biochem. Z.* **254**, 65, 1932.
[20] Racker E., *J. Biol. Chem.* **184**, 313, 1950.
[21] Seegmiller J. E., Horecker B. L., *J. Biol. Chem.* **192**, 175, 1951.
[22] Srere P. A., Cooper J. R., Klybas V., Racker E., *Arch. Biochem. Biophys.* **59**, 535, 1955.
[23] Swanson M., *J. Biol. Chem.* **184**, 647, 1950.
[24] Szent-Györgyi A., *Chemistry of Muscular Contraction*, Acad. Press New York, 1947.
[25] Wood W. A., Schwerdt R. F., *J. Biol. Chem.* **206**, 625, 1954.

ЭНЗИМЫ ПЕНТОЗНОГО ЦИКЛА У *MYCOBACTERIUM TBC* H 37Rv.

Резюме

Энзиматический препарат из *Mycobacterium tbc.* H-37Rv метаболизирует 5-фосфорибозу. Образовавшиеся из Р-5-Ф продукты исследовали спектрофотометрически, применяя цистеиновый метод Дисхе. Полученные абсорбционные кривые указывают, что энзиматический препарат из *M.tbc.*H37Rv содержит изомеразу 5-фосфорибозы, транскетотлазу и трансальдоллазу. Можно предполагать, что в этом препарате выступает также изомераза 5-фосфорибулозы, превращающая ее в 5-фосфоксилозу.

В исследованиях с дифосфотиамином констатировали, что транскетотлаза из *Mycobacterium tbc.*, как и другие транскетотлазы из растительного и животного материала, как условие действия требует дифосфотиамин. В полученном энзиматическом препарате констатировали также присутствие дегидраз 6-фосфоглюкозы и 6-фосфоглюконовой кислоты, измеряя восстановление DPN в присутствии соответствующих субстратов. В смеси, содержащей DPN, энзиматический препарат и G-6-P констатировали увеличение количества рибозы в сравнении с контрольной пробой. Полученные путем опытов результаты доказывают, что у *Mycobacterium tbc.* H37Rv. подобным образом, как и у сапрофитного штамма *Myc. phlei*, выступают энзимы пентозного цикла глюкозы.

PENTOSE CYCLE ENZYMES IN *MYCOBACTERIUM TBC.* H37Rv

Summary

Enzymatic preparations of *Mycobacterium tbc.* H37Rv metabolize 5-phosphoribose. The R-5-P decomposition products were analysed by the Dische cysteine reaction. The absorption curves obtained indicated that the enzymatic preparation from *M. tbc.* H37Rv contains 5-phosphori-

bose isomerase, transketolase and transaldolase. It may be assumed that our preparation contains also isomerase of 5-phosphoribulose, transforming it into 5-phosphoxylulose.

Investigations on diphosphothiamine demonstrated that transketolase from *Mycobacterium tbc.* requires for its activity diphosphothiamine similarly to other transketolases of plant- or animal-origin. By measuring DPN reduction in the presence of suitable substrates, the enzymatic preparation was found to contain also 6-phosphoglucose and 6-phosphogluconic acid dehydrogenases. A mixture of DPN, enzymatic preparation and G-6-P was found to contain a larger amount of ribose as compared to a control.

The results obtained demonstrate that, like the saprophytic strain of *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium tbc.* H37Rv possesses pentose cycle enzymes, too.

Otrzymano 29.3.1956 r.

SPIS TREŚCI

	Str.
Z. Kasprzykówna i W. Jachymczyk, Saponiny trójterpenowe roślin rodziny <i>Compositae</i> . II. Saponina kwiatów słonecznika (<i>Helianthus annuus</i>)	299
J. Noworytko i M. Sarnecka-Keller, Chromatograficzna analiza aminokwasów wydalanych z moczem	309
M. Gumińska i M. Eckstein, Przeciwwzkrzepowe działanie naftylo- wych pochodnych indandionu-1,3	323
T. Borkowski, Chromatograficzna analiza aminokwasów w żółci	333
M. Wiewiórowski i J. Augustyniak, Elektroforeza bibułowa bia- łek nasion łubinu	345
A. B. Wojtczak, Związki fosforowe w wydalinach mola woskowego (<i>Gal- leria mellonella</i>). I. Identyfikacja	355
A. B. Wojtczak, Związki fosforowe w wydalinach mola woskowego (<i>Gal- leria mellonella</i>). II. Enzymatyczna hydroliza	369
I. Reifer i K. Toczko, Mikrometoda ilościowego oznaczania pięciu głównych alkaloidów opium	381
A. Krawczyk, W. Ostrowski, B. Skarżyński, Połączenia wita- minu B ₁₂ z białkami. V. Ciężar cząsteczkowy połączenia witamin B ₁₂ -białko z surowicy krwi bydlęcej	401
A. Krawczyk, W. Ostrowski, B. Skarżyński, Polarograficznie czynne substancje w surowicy krwi	409
P. Szafranski, Enzymy cyklu pentozowego u <i>Mycobacterium tbc</i> . H37Rv.	423

