

ANDRZEJ MANITIUS

ZAWARTOŚĆ POTASU W SUROWICY KRWI LUDZI ZDROWYCH

*Zakład Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Gdańsku**Kierownik: prof. dr Włodzimierz Mozołowski*

Zainteresowanie kliniki badaniem poziomu potasu w surowicy krwi i wiązanie go z różnymi stanami chorobowymi znajduje swój wyraz w licznych — ukazujących się w ostatnich latach — pracach (np. 4, 27, 31 i in.). Jednakże w wielu bardzo przypadkach ocena wyniku badania zawartości potasu w surowicy jest bardzo trudna, a nawet wręcz niemożliwa, ze względu na niezbyt dokładne określenie normy dla potasu. Jak wynika z zestawionych w tablicy 1 normalnych wartości poziomu potasu w surowicy krwi, podawanych przez różnych autorów oraz podręczniki biochemii klinicznej, „potas wykazuje zmienność nie spotykaną dla innych składników” (26).

Wydaje się, że głównymi przyczynami tak dużych rozbieżności jest z jednej strony niedokładność używanych metod oznaczania potasu w surowicy, a z drugiej częste niezwracanie uwagi na okres czasu upływający od chwili pobrania krwi do oddzielenia surowicy. Tymczasem stwierdzono bezspornie, że otoczka krwinek czerwonych jest przepuszczalna dla jonów potasu i że wywędrowywanie potasu z krwinek do osocza jest procesem, który *in vitro* zachodzi dość szybko.

W pracy niniejszej starano się w surowicy krwi ludzi zdrowych oznaczyć normalną zawartość potasu dwoma niezależnymi metodami; surowicę oddzielano natychmiast po pobraniu krwi.

Metody**1. MATERIAŁ DOSWIADCZALNY**

Krew w ilości od 20 do 50 ml (w zależności od ilości wykonywanych oznaczeń) pobierano od ludzi subiektywnie zdrowych, tak mężczyzn jak i kobiet, w wieku od 16 do 27 lat (jeden osobnik 34-letni). Wszyscy badani byli na czczo od około 12 godzin; przed pobraniem krwi odpoczy-

Tablica 1

Normalna zawartość potasu w surowicy krwi człowieka w mg na 100 ml, podawana przez różnych autorów

Autor	Rok	Wahania od — do
Prace oryginalne		
Pincus i Kramer (28)	1923	20,0 — 24,2
Spiro (30)	1929	17,5 — 22,5
Dulière (5)	1931	19,3 — 20,0
Leulier (19)	1933	16,0 — 19,8
Marinis, Muirhead, Jones i Hill (24)	1947	14,1 — 24,2
Wootton, King, Mac- lean, Smith (39)	1951	13,5 — 21,7
Hadorn i Riva (8)	1951	15,5 — 21,0
Podręczniki i prace poglądowe		
Tolkaczewska (36)	1940	16,0 — 24,0
Cantarow i Trum- per (3)	1945	16,0 — 22,0
Kolmer i Boerner (14)	1945	16,0 — 22,0
Sunderman i Boer- ner (34)	1949	14,8 — 16,8
Hawk, Oser i Summer- son (10)	1949	16,0 — 22,0
Krebs (15)	1950	12,1 — 25,4
Predteczenskij, Bo- rowskaja i Margo- lina (29)	1953	17,5 — 22,5
Balachowscy (1)	1953	16,0 — 22,0
Jeanneret, Rosenmund i Esselier (12)	1954	16,0 — 22,0

wali w pozycji leżącej od 15 do 60 minut. Krew pobierano od osobników leżących z żyły łokciowej, starając się unikać zastoju. Z otrzymanej krwi uzyskiwano surowicę trzema różnymi sposobami:

I s p o s ó b — krew ze strzykawki wlewano do 50-ml. próbki wirówkowej, której ścianki wewnętrzne pokryte były cienką warstwą stałej parafiny, i wirowano natychmiast przez 10 minut z szybkością około 1000 obr./min. Od chwili pobrania krwi do zakończenia wirowania upływało średnio 15 minut. Po odwirowaniu krew była jeszcze płynna; osocze znajdujące się ponad składnikami morfotycznymi lewarowano ostrożnie, aby uniknąć przypadkowego pobrania wraz z nim składników morfotycznych. Lewarowanie wykonywano przy pomocy pipety zakoń-

czonej szerokim otworem, której ścianki wewnętrzne były pokryte cienką warstwą płynnej parafiny. W ten sposób udawało się bez trudu przenieść płynne osocze do innej, czystej rurki wirówkowej. Po skrzepnięciu osocza oddzielano skrzep bagietką od ścianek probówki i wirowano, a następnie znajdującą się ponad skrzepem surowicę zlewano do czystego, suchego, szczelnie zamykanego naczynia.

II s p o s ó b — do zakończenia wirowania krwi postępowano tak, jak w sposobie pierwszym. W odwirowanej krwi nastąpiło oddzielenie osocza od składników morfotycznych, tak że powierzchnia kontaktu części płynnej z krwinkami była stosunkowo niewielka. Odwirowaną krew pozostawiano na przeciąg 2 — 4 godzin w temperaturze pokojowej, po czym skrzep oddzielano bagietką szklaną od ścianek naczynia i wirowano ponownie przez 10 minut z szybkością około 1000 obr./min. Surowicę lewarowano znad skrzepu i po przeniesieniu do czystej probówki wirówkowej wirowano ponownie przez 10 minut celem usunięcia ewentualnie pobranych przy lewarowaniu surowicy składników morfotycznych. Odwirowaną surowicę zlewano do suchego, czystego, szczelnie zamykanego naczynia.

III s p o s ó b — krew pobraną do strzykawki przelewano do 50-ml. suchej probówki wirówkowej i pozostawiano na przeciąg dwóch godzin w temperaturze 19 — 22°C. Powstały skrzep oddzielano bagietką szklaną od ścianek naczynia, po czym krew wirowano i postępowano z nią tak, jak w sposobie drugim (od chwili powtórnego odwirowania).

Otrzymane surowice używano do prób bądź to natychmiast, bądź też przechowywano w lodówce w temperaturze 0 do +4°C aż do wykonania badania. Na ogół czas upływający od chwili oddzielenia surowicy do jej użycia nie był dłuższy niż 24 godziny. Przed pobieraniem surowicy do badań doprowadzano jej temperaturę do pokojowej. Do oznaczeń używano tylko takie surowice, które nie wykazywały optycznych cech hemolizy.

2. OZNACZANIE POTASU

Potas oznaczano metodą kolorymetryczną i na fotometrze płomieniowym. Wyniki podane w tej pracy są wartościami średnimi z dwóch oznaczeń. Regularnie przeprowadzano kontrolę pomiarów na standardach.

a) M e t o d a k o l o r y m e t r y c z n a. Oparto się na metodzie podanej przez B a r r y ' e g o i R o w l a n d a (2). W metodzie tej potas wytrąca się z nieodbiałzonej surowicy krwi w postaci azotyno-kobaltanu sodowo-potasowego. Otrzymany osad przemywa się kolejno 35% i 70% alkoholem etylowym, a następnie rozpuszcza w wodzie na gorąco i dodaje chlorowodoru choliny oraz żelazocyjanku potasu. Powstaje

zabarwienie zielone, którego intensywność zależy od ilości kobaltu strąconego wraz z potasem. Intensywność zabarwienia mierzono na fotometrze Pulfricha używając filtru S61.

Dla sporządzenia wzorców do wykreślenia krzywej użyto K_2SO_4 chemicznie czystego do analizy, osuszonego do stałej wagi. Używane do analizy odczynniki były chemicznie czyste.

Kontrolę dokładności metody przeprowadzono na siedmiu próbach tej samej surowicy; otrzymano kolejno wyniki (K w mg na 100 ml): 20,0; 19,4; 19,5; 19,0; 19,6; 19,6; 18,8; średnio $19,4 \pm 0,40$.

b) **F o t o m e t r p ł o m i e n i o w y**. Używany w pracy aparat jest modelem III firmy Zeiss. Przy zestawianiu aparatu wprowadzono tylko jedną modyfikację: powietrze pobierano nie z butli, ale doprowadzono je do aparatu bezpośrednio ze sprężarki, używając dodatkowych regulatorów zapewniających utrzymywanie stałego ciśnienia. Wartość pusta („backgroundflame”) przy użyciu powietrza otrzymywanego ze sprężarki dawała wychylenia galwanometru tej samej wielkości, jak wówczas gdy powietrze pobierano z butli.

Dla oznaczenia potasu rozcieńczono nieodbiałzoną surowicę 10-krotnie wodą destylowaną. Przy sporządzaniu płynów wzorcowych do wykreślenia krzywej oparto się na powszechnie znanym i notowanym fakcie (np. 6 i 11) oraz na obserwacjach własnych, że inne składniki surowicy, a przede wszystkim kationy (w szczególności sodowy), wpływają na wartość wychyleń galwanometru przy oznaczaniu potasu. Dlatego wydawało się słuszne oparcie o płyn, którego skład jonowy byłby jak najbardziej zbliżony do składu surowicy.

Dla stwierdzenia, które jony i w jakim stopniu zmieniają uzyskiwane przy oznaczaniu potasu wychylenia galwanometru, przeprowadzono oznaczenia porównawcze na następujących płynach:

1. Roztworach chlorku potasowego.
2. Płynie Krebsa (16) rozcieńczonym w różnym stosunku wodą.
3. Rozcieńczonym 10-krotnie płynie Krebsa zawierającym potas w różnym stężeniu.
4. Roztworach zawierających chlorki: sodowy, wapniowy i potasowy, w których stężenie sodu wynosiło 33 mg%, wapnia 1 mg% i potas w różnych stężeniach.
5. Roztworach zawierających chlorki sodowy i potasowy, w których stężenie sodu wynosiło 33 mg%, a potasu było różne.

Do sporządzenia roztworów użyto substancji chemicznie czystych i chemicznie czystych do analizy.

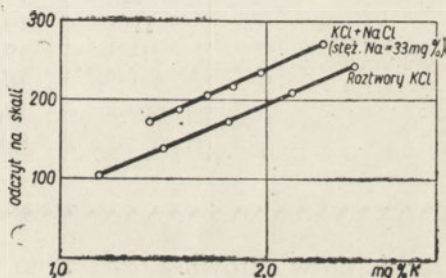
W płynach 2 i 3 użyto płynu Krebsa, ponieważ jego skład jest bardzo zbliżony do mineralnego składu surowicy krwi ludzi zdrowych. W płynach 4 i 5 stężenie sodu (a w płynach 4 również i wapnia) było w przybliżeniu równe jego stężeniu w 10-krotnie rozcieńczonej surowicy.

Oznaczenia porównawcze wykazały, że:

- 1° Wychylenia galwanometru przy użyciu płynów 1 (roztwory KCl) były znacznie niższe aniżeli w pozostałych płynach zawierających potas w takim samym stężeniu.
- 2° Wychylenia galwanometru przy użyciu płynów 3, 4 i 5, zawierających potas w takim samym stężeniu, są praktycznie biorąc identyczne.
- 3° Przy użyciu płynów 2 (rozcieńczonego w różnym stosunku wodą płynie Krebsa), zawierających sód w stężeniach od 20 do 33 mg%, uzyskano w porównaniu z płynami 3, 4 i 5, zawierającymi potas w tych samych stężeniach, wychylenia galwanometru nieznacznie tylko niższe i leżące w granicach błędów metody.

Powyższe próby wykazały, że:

- a) Spośród składników jonowych surowicy na emisję świetlną potasu wpływa praktycznie biorąc wyłącznie sód; jak istotnym jest ten wpływ, widać z rys. 1, na którym wykreślono dwie krzywe: jedną dla roztworów chlorku potasowego, a drugą dla płynów 5, tj. mieszanin chlorków potasowego i sodowego, zawierających sód w stężeniu 33 mg%. Jak wynika z rysunku, takie samo wychylenie galwanometru, odczytane z obu krzywych, daje różnicę w stężeniu potasu rzędu 5 mg%.



Rys. 1. Zależność wychyleń galwanometru na fotometrze płomieniowym od stężenia potasu w roztworach KCl oraz w roztworach KCl z dodatkiem NaCl (stężenie sodu = 33 mg%).

Ciśnienie powietrza 0,4 atm

Ciśnienie acetyleny 120 mm H₂O

Przesłona 35

Wartość pusta („backgroundflame”) 9

Wartość wodna 9

- b) Wahania w stężeniach sodu, które spotyka się w praktyce nie tylko w stanach fizjologicznych, ale i patologicznych, nie mają praktycznego znaczenia przy oznaczaniu potasu na fotometrze płomieniowym. Kontrolę dokładności metody przeprowadzono na sześciu próbach tej samej surowicy; otrzymano następujące wyniki (K w mg na 100 ml): 18,6; 18,8; 18,7; 18,6; 18,5; 18,7; średnio $18,7 \pm 0,12$.

c) Porównanie dokładności metody kolorymetrycznej z oznaczeniami wykonanymi na fotometrze płomieniowym. Celem porównania dokładności obu metod, używanych w tej pracy, wykonano na tej samej surowicy, uzyskanej sposobem II, pięć oznaczeń fotometrem płomieniowym i pięć metodą kolorymetryczną. Uzyskane wyniki zestawione zostały w tablicy 2.

Tablica 2

Zawartość potasu w tej samej surowicy oznaczona metodą kolorymetryczną i na fotometrze płomieniowym

Metoda kolorymetryczna		Fotometr płomieniowy	
Oznaczenie	mg% K	Oznaczenie	mg% K
I	18,8	I	18,5
II	19,5	II	18,5
III	19,2	III	18,4
IV	19,1	IV	18,4
V	18,3	V	18,6
średnio	19,0	średnio	18,5
	± 0,46		± 0,08

3. OZNACZENIE BIAŁKA

Białko w surowicy oznaczono refraktometrycznie, posługując się klinowym refraktometrem zanurzeniowym Pulfricha. Wartości podane są średnimi z dwóch oznaczeń. Dla utrafiltratu przyjęto według Żydowo (41) wartość refrakcji 1,33574.

Wyniki

1. PORÓWNANIE WARTOŚCI STĘŻENIA POTASU W SUROWICY KRWI OTRZYMANEJ SPOSOBAMI I I II

Celem ustalenia, czy zawartość potasu w surowicy jest taka sama, czy też różna, gdy uzyskuje się ją przez natychmiastowe oddzielenie płynnego osocza od składników morfotycznych i przez pozostawienie po odwirowaniu na przeciąg 3 do 4 godzin razem z krwinkami, wykonano równoległe oznaczenia w 10 różnych surowicach otrzymanych sposobami I i II. Oznaczenia wykonano na fotometrze płomieniowym. Wyniki zostały zestawione w tablicy 3.

Tablica 3

Zestawienie wartości porównawczych zawartości potasu w surowicy krwi otrzymanej dwoma sposobami (mg na 100 ml)

(Oznaczenia przeprowadzono na fotometrze płomieniowym)

L.p.	Sposób I	Sposób II	Różnica w wynikach spos. II — spos. I
1	16,7	16,9	+ 0,2
2	16,1	16,3	+ 0,2
3	15,1	15,2	+ 0,1
4	15,1	15,0	- 0,1
5	16,1	16,0	- 0,1
6	17,7	17,4	- 0,3
7	17,4	17,5	+ 0,1
8	14,6	14,6	0,0
9	16,6	16,8	+ 0,2
10	16,2	16,3	+ 0,1

I s p o s ó b: surowica otrzymana przez natychmiastowe oddzielenie płynnego osocza z krwi odwirowanej bezpośrednio po pobraniu.

II s p o s ó b: surowica otrzymana z krwi odwirowanej natychmiast po pobraniu, lewarowana nad skrzepu po 3 do 4 godzinach.

Jak wynika z powyższej tablicy, nie ma istotnych różnic w stężeniu potasu surowicy otrzymanej dwoma opisanymi metodami. Dlatego w doświadczeniach mających na celu ustalenie normy stosowano dla otrzymania surowicy sposób II jako łatwiejszy technicznie.

2. ZALEŻNOŚĆ STĘŻENIA POTASU W SUROWICY OD CZASU UPŁYWAJĄCEGO OD CHWILI POBRANIA KRWI AŻ DO ODDZIELENIA SUROWICY

Opierając się na badaniach innych autorów (5, 7, 19, 30, 38) wykonano badania na krwi pięciu osobników, chcąc się przekonać, czy w przypadku zwykłego, powszechnie stosowanego sposobu otrzymywania surowicy (odpowiadającego sposobowi III, opisanemu w tej pracy) poziom potasu jest wyższy aniżeli w surowicy otrzymanej przez natychmiastowe oddzielenie od składników morfotycznych. Pobrąną krew dzielono na dwie części, z pierwszej otrzymywano surowicę sposobem II (natychmiastowe wirowanie), z drugiej sposobem III (wirowanie po 2 godzinach). Otrzymane wyniki zestawiono w tablicy 4. Oznaczenia wykonano tylko na fotometrze płomieniowym.

Z załączonej tablicy wynika, że poziom potasu w surowicy jest zależny od tego, czy część płynna krwi została oddzielona od składników morfotycznych natychmiast po pobraniu krwi, czy też dopiero po 2 godzinach. W przeprowadzonych doświadczeniach wzrost potasu w surowicy krwi, otrzymanej przez 2 godziny w temperaturze 19 — 22°C, wynosił średnio 0,8 mg %.

Tablica 4

Zawartość potasu w surowicy krwi (w mg% otrzymanej przez: II — natychmiastowe odwirowanie krwi; III — oddzielenie po 2 godzinach (temp. 19 — 22°C)

(Oznaczenia wykonano na fotometrze płomieniowym)

L.p.	II	III	Różnica III — II
1	16,8	17,7	+ 0,9
2	17,5	18,1	+ 0,6
3	14,6	15,4	+ 0,8
4	16,8	17,6	+ 0,8
5	16,3	17,1	+ 0,8
			średnio + 0,8

Tablica 5

Zawartość potasu w surowicy krwi ludzi zdrowych

L.p.	Płeć	Wiek lat	Białko (refr.)	Potas w mg na 100 ml surowicy		U w a g i
				Kolorymetr. met.	Fotometr pł.	
1	K o b i e t y	22	7,85	15,3	16,1	
2		23	7,35	16,6	15,9	
3		21	7,65	15,2	15,5	
4		18	7,9	16,6	16,3	
5		19	7,15	15,6	15,2	
6		18	8,05	17,4	17,2	
7		21	7,6	15,3	15,5	
8		20	8,3	17,1	—	
9		20	7,9	15,9	15,8	
10		21	7,5	18,8	—	
11		25	7,1	16,3	15,5	
12		24	7,9	15,9	—	
13		20	7,55	15,7	—	
14		18	7,25	17,5	17,2	
15		18	7,95	16,4	16,3	
16		17	8,65	16,4	16,6	
17		17	7,35	17,1	17,1	
18		19	8,1	18,8	18,1	
19		19	8,05	—	16,0	
20		16	7,3	17,3	17,4	
21		16	7,6	—	17,4	
22		18	7,05	17,6	17,9	
23		18	7,8	—	16,9	
24		19	6,9	17,7	18,0	
25		16	8,1	16,2	16,2	
26	16	8,0	16,4	16,0		

d. c. tabl. 5

27		19	6,9	—	16,3	
28		18	7,75	—	15,2	
29		25	7,65	—	15,0	
30		26	—	16,5	—	} Krew tej samej osoby } pobr. w odst. 6 mies.
31	M ę c z y ż n i	26	7,6	—	14,6	
32		27	7,25	19,5	19,2	} Krew tej samej osoby } pobr. w odst. 6 mies.
33		27	6,65	—	17,5	
34		25	7,25	16,5	16,9	} Krew tej samej osoby } pobr. w odst. 6 mies.
35		25	7,3	—	16,8	
36		27	7,95	18,8	17,9	
37		19	8,0	15,9	16,6	
38		21	6,5	17,0	16,8	
39		19	7,6	15,9	15,5	
40		34	7,6	17,7	18,4	
41		23	7,9	—	16,3	

Średnia arytmetyczna

	Kolorymetr. met.	Fotometr płom.
Ogólnie	16,8 ± 1,1	16,6 ± 1,0
Kobiety	16,7	16,4
Mężczyźni	17,2	17,0

3. WARTOŚCI NORMALNE POZIOMU POTASU W SUROWICY KRWI LUDZI ZDROWYCH UZYSKANEJ PRZEZ WIROWANIE KRWI NATYCHMIAST PO POBRANIU (SPOSÓB II)

Łącznie zbadano 41 surowic pochodzących od 35 osób (26 kobiet i 9 mężczyzn). Oznaczenia wykonano metodą kolorymetryczną i na fotometrze płomieniowym. Otrzymane wyniki zestawiono w tabelicy 5.

Jak wynika z tabelicy, uzyskano wartości:

a) metodą kolorymetryczną: od 15,2 do 19,5 mg%; śr. 16,8 ± 1,1.

b) na fotometrze płomieniowym: od 14,6 do 19,5 mg%; śr. 16,6 ± 1,0.

Nie stwierdzono związku między poziomem potasu a stężeniem białek surowicy. Nie daje się również — w badanych granicach wieku — stwierdzić jakiegokolwiek zależności między wiekiem badanego osobnika a stężeniem potasu w surowicy. Nie ma w badanych przypadkach istotnej różnicy w poziomie potasu u mężczyzn i kobiet. Porównując wartości otrzymane metodą kolorymetryczną i na fotometrze płomieniowym znajduje się daleko idącą zgodność wyników, i to zarówno dla wartości średniej, jak i dla poszczególnych surowic. Największe różnice nie przekraczają wartości 1 mg%.

Dyskusja

W zestawionych w tablicy 1 wartościach stężenia potasu w surowicy, podawanych przez niektórych autorów, uderza przede wszystkim duża rozbieżność między poszczególnymi danymi. Rozbieżność tę można przypisać przede wszystkim dwom czynnikom:

1. niewłaściwemu otrzymaniu surowicy,
2. małej dokładności i dużej różnorodności stosowanych metod.

Badania różnych autorów, jak i własne, wskazują na to, że *in vitro* potas stosunkowo szybko przenika z krwinek do osocza. P r e d t e c z e n s k i j i współpracownicy (29) podają, że po 6 godzinach poziom potasu w surowicy nie oddzielonej od krwinek wzrasta o 5 mg na 100 ml. L e u l i e r (19) podaje, że po 22 godzinach stężenie potasu w surowicy jest dwukrotnie większe aniżeli prawidłowe. G o o d m a n i i współpracownicy (7) znajdują, że w temperaturze 25° w ciągu 24 godzin poziom potasu wzrasta średnio o 0,8 milirówn./litr (około 3,12 mg%), przy czym najszybszy wzrost — około 0,2 milirówn./litr (około 0,78 mg%) — następuje w ciągu pierwszej półtorej godziny. Badania własne potwierdzają te wyniki, wykazując w temperaturze 19 — 22°C wzrost średnio o 0,8 mg%. Na podstawie badań szeregu autorów, a w szczególności H a r r i s a (9), M a i z e l s a (21, 22, 23), a ostatnio S t r a u b a i współpracowników (32, 33, 35), którzy wykazali zależność wędrowania jonów potasowych między krwinkami a osoczem od procesu glikolizy, słusznie uważa się, że szybkość narastania poziomu potasu w surowicy pozostającej w kontakcie z krwinkami zależy od temperatury, w jakiej przechowywana jest krew, jak również od stężenia glikozy i produktów pośrednich powstających w procesie glikolizy, a także innych czynników, jak np. pH krwi. W związku z tym należy bezwzględnie dążyć do tego, aby oddzielenie surowicy odbywało się bezpośrednio po pobraniu krwi, na co już w roku 1929 wskazywał S p i r o (30). Opisany w niniejszej pracy sposób II oddzielania surowicy zapobiega uchwytnemu wzrostowi poziomu potasu w surowicy krwi kontaktującej się ze skrzepem nawet w przeciągu 4 godzin upływających od chwili pobrania krwi. Sposób ten jest bardzo prosty i może być z powodzeniem stosowany w każdym laboratorium usługowym. Sposoby inne, jak np. podawany przez P r e d t e c z e n s k i e g o i współpracowników (29), polegający na przetrzymywaniu krwi w cieplarni, wydaje się bardziej złożony technicznie. Sposób podawany przez D u l i è r e ' a (5), a polegający na wirowaniu krwi w temperaturze 0°C, wydaje się o tyle niestuszny, że jak wykazali wspomniani już H a r r i s i M a i z e l s , a ostatnio po-

twierdził to K ü s e l (18) oraz G o o d m a n i współpracownicy (7), w temperaturze 0°C następuje szybsze wywędrowywanie potasu z krwinek do osocza niż w temperaturze pokojowej.

Jeśli chodzi o dokładność powszechnie stosowanych chemicznych metod oznaczania potasu, to źródła błędów były już niejednokrotnie dyskutowane przez różnych autorów. Tak np. metody oparte na wytrącaniu potasu działaniem azotyno-kobaltanu sodowego na surowicę są obarczone bardzo poważnymi możliwościami błędu, jak np. zależnością składu wytrącanego osadu od szybkości dodawania odczynnika do surowicy oraz temperatury, w jakiej przeprowadza się próby (25). Dal- szym czynnikiem wpływającym na obniżenie dokładności metody jest konieczność płukania wytrąconego osadu, co pociąga za sobą na ogół mniejsze lub większe straty osadu, zależnie od jakości użytego do płu- kania płynu (2). Część autorów przypisuje także pewną rolę oddziały- waniu środowiska, w jakim przeprowadza się wytrącanie osadu. W sto- sowanej w tej pracy metodzie kolorymetrycznej dodatkowym poważ- nym czynnikiem wpływającym na dokładność oznaczeń była stosun- kowo mała stromość krzywej kalibracyjnej, w wyniku czego nawet nieduże różnice w pomiarze przepuszczalności dawały dość znaczne różnice w odczytywanych wartościach stężenia potasu.

Nieco więcej uwagi warto poświęcić metodzie oznaczania potasu na fotometrze płomieniowym w związku z coraz szerszym i powszechniej- szym stosowaniem tego aparatu. Oznaczanie potasu w surowicy napo- tyka tu na pewne trudności, z których bodaj że największą jest sporzą- dzenie odpowiednich standardów potrzebnych do wykreślenia krzywej, ponieważ obecność innych jonów w surowicy wzmagają znacznie emisję świetlną potasu. M o s h e r i współpracownicy (cytowane według G i l b e r t a i in. 6) stosowali standard zawierający chlorki: sodowy, potasowy, wapniowy i magnezowy, a dalej fosforan amonu, glikozę, mocznik, cholesterol, alkohol i żelatynę. Dodatek białka znajduje swoje uzasadnienie w tym, że, jak podają G i l b e r t i współpracowni- cy (6), wielkość napięcia powierzchniowego badanej cieczy wpływa na wartość odczytu. Sporządzenie jednakże tak złożonego standardowego roztworu wymaga znacznej ilości czasu, co przy równoczesnej ko- nieczności dysponowania doskonale oczyszczonymi odczynnikami or- ganicznymi znacznie zmniejsza wartość praktycznego zastosowania te- go roztworu. H i l g e r s (11) w swojej pracy, w której podaje sze- reg cennych uwag dotyczących fotometru płomieniowego i jego zasto- sowania do oznaczania sodu, potasu i wapnia w surowicy, proponuje wykreślenie kilku krzywych obrazujących zależność wartości wychyleń galwanometru od stężenia potasu przy różnych stężeniach sodu.

Proponuje on dalej, aby określać najprzód zawartość sodu, a następnie w zależności od stwierdzonego stężenia sodu odczytywać wynik badania potasu z tej czy innej krzywej.

Z przeliczeń teoretycznych opartych na pracy Hilgerta, jak i z porównawczych badań własnych wynika jednak, że wyraźnie zaznacza się wpływ wahań w stężeniu sodu na wychylenia galwanometru wówczas, gdy wahania te leżą w granicach 0 — 10 — 20 mg%, natomiast dalsze zwiększanie stężenia sodu (od 20 — 33 mg%) w płynie, w którym określa się zawartość potasu, ma już wpływ nieznaczny. Wynika stąd, że wahania stężeń sodu w surowicy krwi spotykane nie tylko w stanach fizjologicznych, ale i patologicznych, nie mają praktycznego znaczenia przy oznaczaniu stężenia potasu na fotometrze płomieniowym.

Z badań porównawczych wynika również, że najprostszymi i dającymi jednocześnie dobre wyniki płynami standardowymi dla oznaczania potasu mogą być płyny zawierające tylko chlorki sodowy i potasowy, w których stężenie potasu jest dowolnie dobrane, a sodu stałe i równe 33 mg%. O tym, że te płyny dają w praktyce dobre wyniki, świadczy daleko idąca zgodność między oznaczeniami na fotometrze płomieniowym i wykonanymi metodą kolorymetryczną.

Analizując wartość użytkową obu metod i ich dokładność na podstawie uzyskanych wyników, wydaje się, że fotometr płomieniowy daje wyniki lepsze i dokładniejsze, aniżeli stosowana w tej pracy metoda chemiczna. Większa dokładność w połączeniu z szybkością oznaczeń oraz nieskomplikowana i łatwa do opanowania w krótkim czasie technika obsługi stwarza z fotometru płomieniowego aparat nadzwyczaj cenny dla seryjnych analiz nieorganicznych składników surowicy.

Przechodząc do zagadnienia zasadniczego, a mianowicie określenia normalnej zawartości potasu w surowicy krwi, wydawałoby się słusznym uważać, że podane w tablicy 1 wartości są na ogół za wysokie, co należałoby może w odniesieniu do większości autorów przypisać otrzymaniu surowicy w sposób nieodpowiedni. W odniesieniu do autorów, którzy mówią o konieczności szybkiego oddzielania surowicy od krwinek, należałoby przypuścić, że źródło błędów leży w metodach, którymi się posługiwali. Wydaje się, że wartości prawidłowe poziomu potasu w surowicy krwi ludzi zdrowych, oddzielonej bezpośrednio po pobraniu krwi, leżą w granicach 15,0 — 19,0 mg%. Wartości wyższe należałoby uważać za podejrzane o hyperpotasemię, wartości zaś niższe o hypopotasemię. W tablicy 6 zestawiono otrzymane wyniki w ten sposób, że podzielono je na grupy w zależności od stężenia potasu.

Z tablicy 6 wynika, że największa ilość przypadków wypada na stężenie 16,1 — 17,0 mg%; z ilościowego rozmieszczenia pozostałych przypadków można wnosić, że przy odpowiednio zwiększonej ilości oznaczeń otrzymano by normalną krzywą rozkładu dla normalnych wartości stężenia potasu w surowicy krwi.

Tablica 6

Rozrzut wartości normalnych poziomu potasu w surowicy krwi ludzi zdrowych obojga płci

Zawartość potasu w mg na 100 ml	Ilość przypadków
14,1 — 15,0	2
15,1 — 16,0	11
16,1 — 17,0	14
17,1 — 18,0	10
18,1 — 19,0	3
19,1 — 20,0	1
Razem przypadków	41

Na podstawie uzyskanych w tej pracy wyników wydaje się słuszne twierdzenie M o z o ł o w s k i e g o (26), że nie jest prawdopodobna tak wielka — jak się zazwyczaj przyjmuje — normalna zmienność poziomu potasu w surowicy krwi i że raczej ma się tu do czynienia z niedostateczną ścisłością stosowanej metody lub też z systematycznym błędem. Stwierdzenie normalnej krzywej rozkładu pozwala na wyrażenie zawartości potasu w surowicy zdrowych ludzi w ścisły sposób, a mianowicie przez podanie średniej arytmetycznej i dyspersji. W oparciu o analizę 41 surowic znaleziono $16,6 \pm 1,0$ mg% potasu, czyli $4,25 \pm 0,25$ milirównoważnika/litr. Należy zaznaczyć, że M a r i n i s i współpracownicy (24) w swojej pracy opartej na zbadaniu 107 przypadków uzyskali wartości dające się również przedstawić w postaci normalnej krzywej rozkładu z wartością średnią $4,52 \pm 0,45$ milirównoważnika/litr. Średnia tych autorów, jak również wartość dyspersji, są większe niż wyznaczone w tej pracy; należy jednak zaznaczyć, że autorzy ci nie oddzielali surowicy natychmiast po pobraniu krwi, lecz dopiero po wytworzeniu się skrzepu. Nie mówią oni także nic o wieku osób badanych.

Wartości uznane na podstawie tej pracy za normalne winny być przyjęte za prawidłowe tylko w odniesieniu do ludzi w wieku 15 — 30

lat, niektórzy bowiem autorzy, jak np. K a l o ś - D e f f n e r (13) stwierdzają, że u dzieci poziom potasu w surowicy jest nieco niższy niż u dorosłych. Być może, że duża rozbieżność wyników niektórych autorów spowodowana jest również, między innymi, nieuwzględnieniem wieku osób badanych. Niejasna wydaje się kwestia wiązania kompleksowego potasu w surowicy, bo gdy W a e l s c h i K i t t e l (38) stwierdzają, że potas w surowicy krwi ludzi zdrowych wędruje w polu elektrycznym do anody, L e v y i P a c u (20) poddając surowicę i osocze ultrasączeniu stwierdzili, że praktycznie biorąc cała ilość potasu (95%) przechodzi do ultraprzesącza. W doświadczeniach opisanych w tej pracy nie udało się stwierdzić jakiegokolwiek zależności między poziomem potasu a zawartością białek w surowicy krwi.

W o o t t o n i współpracownicy (40) w pracy opublikowanej w roku 1954 mówiąc o klinicznym zastosowaniu biochemii podają, że wartości prawidłowe stężeń potasu w surowicy wahają się w granicach 3,5 — 5,6 milirówn./litr (13,7 — 21,9 mg%), przy czym autorzy ci nie uwzględniają wieku jako ewentualnego czynnika wpływającego na zawartość potasu. W świetle uzyskanych wyników wydaje się jednak, że przynajmniej w odniesieniu do osób w wieku od 15 do 30 lat słuszniejsze byłoby przyjęcie granic węższych — od 15,0 do 19,0 mg%, tj. 3,8 do 4,9 milirówn./litr.

Oznaczenia przeprowadzone na fotometrze płomieniowym były możliwe tylko dzięki uprzejmości prof. dra Mariana G ó r s k i e g o, kierownika I Kliniki Chorób Wewnętrznych AMG., który zechciał wypożyczyć na pewien okres czasu fotometr Zakładowi Chemii Fizjologicznej AMG., za co pozwalam sobie i w tym miejscu złożyć profesorowi G ó r s k i e m u podziękowanie.

Równocześnie uprzejmie dziękuję prof. dr Irenie M o c h n a c k i e j za udzielenie szeregu cennych uwag.

Streszczenie

1. Opisano sposób otrzymywania surowicy krwi dla oznaczania potasu, polegający na pobieraniu krwi do parafinowanych probówek wirowkowych i natychmiastowym jej wirowaniu. Po odwirowaniu odziedziała się surowicę od składników morfotycznych po upływie dwóch godzin.

2. Potas w surowicy oznaczano metodą chemiczną, polegającą na wytrącaniu jego z nieodbiąlczonej surowicy w postaci azotyno-kobaltanu sodowo-potasowego z następowym kolorymetrycznym oznaczaniem

wytrąconego kobaltu. Równolegle oznaczano potas na fotometrze płomieniowym; do sporządzenia krzywej użyto płynów będących mieszaniną chlorków sodowego i potasowego, zawierających sód w stężeniu stałym równym 33 mg%, a potas w stężeniu różnym.

3. Przy porównaniu wartości uzyskanych metodą kolorymetryczną i na fotometrze płomieniowym stwierdzono daleko idącą zgodność wyników, i to zarówno dla wartości średniej ze wszystkich oznaczeń, jak i dla poszczególnych surowic.

4. Stwierdzono, że wyniki uzyskane na fotometrze płomieniowym są dokładniejsze niż otrzymane przy użyciu stosowanej w tej pracy metody kolorymetrycznej.

5. Dla wartości stężenia potasu określonego w 41 surowicach uzyskano normalną krzywą rozkładu. Wartość średnia normalnego stężenia potasu w surowicy krwi ludzi w wieku od 15 do 30 lat na podstawie przeprowadzonych oznaczeń wynosi $4,25 \pm 0,25$ milirównoważnika/litr, (to jest $16,6 \pm 1,0$ mg%).

LITERATURA

1. Bałachowscy S. D. i I. S., Metody chemicznego analiza krwi, Medgiz 1953.
2. Barry J. M., Rowland S. J., *Biochem. J.* **53**, 213, 1953.
3. Cantarow A., Trumper M., *Clinical Biochemistry*, Saunders, Philadelphia-London 1945.
4. Darrow D. C., Pratt E. L., *J. Am. Med. Ass.* **143**, 365 i 432, 1950.
5. Dulière W. L., *C. r. Soc. Biol.* **107**, 261, 1931, według Rona's Ber. **62**, 775, 1931.
6. Gilbert P. T. Jr., Hawes R. C., Beckman A. O., *Anal. Chem.* **22**, 772, 1950.
7. Goodman J. R., Vincent J., Rosen I., *Am. J. Clin. Path.* **24**, 111 1954.
8. Hadorn W., Riva G., *Schw. Med. Wschr.* **81**, 761 i 792, 1951.
9. Harris E., *J. Biol. Chem.* **141**, 579, 1941.
10. Hawk P. B., Oser B. L., Summerson W. H., *Practical Physiological Chemistry*, The Blakiston Comp., Philadelphia-Toronto 1949.
11. Hilgers A., *Z. physiol. Chem.* **294**, 61, 1954.
12. Jeanneret P., Rosenmund H., Esselier A. F., *Helv. Med. Acta* **21**, 191, 1954.
13. Kalos-Deffner L., *Acta med. Scand.* **85**, 221, 1935, według Rona's Ber. **88**, 90, 1935.
14. Kolmer J. A., Boerner F., *Approved Laboratory Technic*, D. Appleton-Century Comp. Inc., New York — London 1945.
15. Krebs H. A., *Ann. Rev. Bioch.* **19**, 409, 1950.
16. Krebs H. A., Henseleit K., *Z. physiol. Chem.* **210**, 33, 1932.
17. Kühns K., Miller G., *Z. physiol. Chem.* **294**, 86, 1954.

18. Küsel H., *Biochem. Z.* **323**, 67, 1952.
19. Leulier M. A., *Bull. soc. chim. biol.* **15**, 158, 1933.
20. Levy J., Pacu M. M., *Bull. soc. chim. biol.* **15**, 1317, 1933.
21. Maizels M., *J. Physiol.* **107**, 9P, 1948.
22. Maizels M., *J. Physiol.* **108**, 247, 1949.
23. Maizels M., *J. Physiol.* **112**, 59, 1951.
24. Marinis T. P., Muirhead E. E., Jones F., Hill J. M., *J. Lab. a. Clin. Med.* **32**, 1208, 1947.
25. Milton R. F., Waters W. A., *Methods of Quantitative Microanalysis*, Edward Arnold a. Co, London 1949.
26. Mozołowski W., *Postępy Biochemii* **2**, 8, 1954.
27. Naegeli H. R., *Helv. Med. Acta, Suppl.* **31**, 20, Fasc. 2, 1953.
28. Pincus J. B., Kramer B., *J. Biol. Chem.* **57**, 463, 1923, według Rona's Ber. **28**, 265, 1924.
29. Predteczenski E. W., Borowskaja W. M., Margolina Ł. T., *Metody badań laboratoryjnych*, P. Z. W. L. 1953.
30. Spiro P., *Z. klin. Med.* **110**, 58, 1929, według Rona's Ber. **51**, 287, 1929.
31. Steiger W. A., Nadler C. S., Gares P. C., *Am. J. Med. Sci.* **219**, 542, 1950.
32. Straub F. B., *Acta Physiol. Hung.* **4**, 235, 1953.
33. Straub F. B., *Postępy Biochemii* **2**, 100, 1954.
34. Sunderman F., Boerner F., *Normal Values in Clinical Medicine*, Saunders, Philadelphia 1949.
35. Szekely M., Mányaí S., Straub F. B., *Acta Physiol. Hung.* **3**, 571, 1952.
36. Tołkaczewska N. F., *Chimiczeskij sostaw krwi, siekrietow, ekskrietow i żydkostiej normalnego czelowieczeskogo organizma*, Moskwa 1940.
37. Waelsch H., Kittel S., *Kolloid Z.* **68**, 342, 1934, według Rona's Ber. **83**, 353, 1935.
38. Waelsch H., Kittel S., Busztin A., *Z. physiol. Chem.* **234**, 27, 1935, według Rona's Ber. **89**, 372, 1936.
39. Wootton J., King E. J., Maclean Smith J. M., *Brit. Med-Bull.* **7**, 307, 1951.
40. Wootton J. D. P., Milne M. D., King E. J., *Ann. Rev. Bioch.* **23**, 307, 1954.
41. Zydowo M., *Pol. Tyg. Lek.* **7**, 697, 1952.

СОДЕРЖАНИЕ КАЛИЯ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

Резюме

1. Описан способ получения сыворотки крови для определения калия, заключающийся во взятии крови в парафинированные пробирки и немедленном её центрифуговании. Через 2 часа после центрифугования сыворотку отделяют от морфотических составных частей.

2. Путём химического метода был определен калий в сыворотке, содержащей еще белок. Калий получен в виде осадка комплексной

соли кобальтнитрата натрия и калия; после этого посредством колориметра определен выпавший кобальт. Параллельно определялся посредством пламенного фотометра калий; для нанесения кривой использованы были жидкости, являющиеся смесью хлористого натрия и хлористого калия, содержащие натрий в постоянной концентрации равной 33 мг%, а калий — в различных концентрациях.

3. Путем сравнения величин, полученных посредством колориметрического метода и пламенного фотометра, обнаружено, что полученные результаты весьма сходны, как для средней величины, так и для отдельных сывороток.

4. Обнаружено, что полученные на пламенном фотометре результаты точнее результатов, полученных путем применения в этой работе колориметрической методы.

5. Величине концентрации калия, определённого в 41 сыворотке, соответствует полученная нормальная кривая разложения. Средняя величина нормальной концентрации калия в образцах сыворотки крови людей в возрасте от 15 до 30 лет, на основании проведенных определений равняется $4,25 \pm 0,25$ миллиэквивалентов/литр (т. е. $16,6 \pm 1,0$ мг%).

POTASSIUM CONTENT IN HUMAN SERA

S u m m a r y

1. A method has been described for potassium determination in serum based on taking of blood directly into paraffin-coated centrifuge-cones and immediately centrifugation. Serum is separated from the morphological constituents after 2 hours.

2. Potassium has been determined by the chemical method, involving precipitation of potassium from non-deproteinized serum in the form of sodium-potassium-cobalt complex, followed by the colorimetric determination of the precipitated cobalt. Potassium has been determined in parallel determinations in the flame photometer using, for constructing of the standard curve, solutions of 33 mg% NaCl with varying amounts of KCl.

3. Comparison of the results obtained by the two different methods shows high agreement of the mean values from all determinations and from individual sera as well.

4. It has been proved that photometric results are more precise as compared with the colorimetric values.

5. A normal distribution curve has been obtained for the values of potassium concentration estimated in 41 specimens of serum. The mean value of the normal potassium concentration in the serum of the individuals of 15 — 30 years is $4,5 \pm 0,25$ mE/lite (e. i. $16,6 \pm 1,0$ mg%).

Otrzymano 9.XII.1954

J. SUPNIEWSKI, J. MAYER i S. KAMIŃSKI

SYNTETYCZNY D,L-TRYPTOFAN

Z Zakładu Farmakologii AM w Krakowie i z Instytutu Farmaceutycznego,
Oddział w Krakowie

Kierownik prof. dr J. Supniewski

Hopkins i Cole (13), (14) w roku 1901 wyosobnili z hydrolizatu białkowego aminokwas tryptofan, który okazał się później β -indolylo-alaniną. Aminokwas ten wchodzi w skład większości białek i jest niezbędnym składnikiem pokarmowym dla zwierząt, które nie syntetyzują go w swych tkankach.

Tryptofan jako związek indolowy jest wrażliwy na działanie kwasów i silnych alkali, ulega więc zniszczeniu przy hydrolizie białek mocnymi gorącymi kwasami lub alkaliami. Otrzymujemy go z hydrolizatów białek strawionych fermentami proteolitycznymi, na przykład trypsyną, poprzez nierozpuszczalne połączenie rtęciowe. Białka zawierają L-tryptofan. Aminokwas ten najczęściej otrzymywany jest z hydrolizatów kazeiny. Metoda ta jest kosztowna i kłopotliwa.

Obecnie hydrolizaty białek są szeroko stosowane w lecznictwie jako środki odżywcze przy ujemnym bilansie białkowym — podajemy je wówczas dożylnie, rzadziej doustnie. Zawierają one zwykle mało tryptofanu lub nie zawierają go wcale, nie są więc pełnowartościowymi odżywkami dla ludzi, ludzie bowiem powinni dostawać dziennie z pokarmami 0,25 — 0,5 g tryptofanu. Hydrolizaty te wzmacniamy dodając do nich tryptofan. Można dodawać do nich tryptofan racemiczny, który jest użytkowywany przez tkanki jak tryptofan lewoskrętny.

Acetylotryptofan służy za stabilizator roztworów białek (albumin) używanych w lecznictwie.

Ellinger i Flaman d (5) już w roku 1908 otrzymali D,L-tryptofan przez syntezę chemiczną. Kondensowali oni aldehyd- β -indolowy z kwasem hipurowym do azlaktonu, który po hydrolizie i redukcji dawał tryptofan. Wydajności tej syntezy były bardzo słabe, a produkt wyjściowy syntezy, aldehyd indolowy, był drogi (9). Ostatnio opracowano względnie tanią syntezę tego aldehydu z graminy przez

utlenianie jej fenylohydroksylaminą i nitrobenzenem. Pozwoliło to na wydajną nową syntezę tryptofanu z tego związku przez kondensację go z hydantoiną, hydrolizę i redukcję powstałego produktu kondensacji do tryptofanu.

Snyder z współpracownikami (22), (23), (24), (25), (26) zastosował metodę Sørensen'a (1), (3), (4), (10), (20), (27) syntezy aminokwasów za pośrednictwem acetoamidomalonianu dwuetylowego do syntezy tryptofanu z graminy, łatwo dostępnej dzięki metodzie syntezy Kühn'a i Stein'a (18). Gramina powstaje przez kondensację indolu z aldehydem mrówkowym i dwumetyloaminą. Z jodkiem metylowym gramina daje metylojodek, który ogrzewany z acetoamidomalonianem dwuetylowym wobec alkalicznych katalizatorów odczepia trójmetyloaminę i tworzy indolo-metylo-acetamidomalonian dwuetylowy. Hydroliza tego związku daje w końcu D,L-tryptofan z dobrą wydajnością. Metoda ta następnie była modyfikowana przez Butenandt'a i Hellmanna (2), (11), (12) i innych. Zamiast acetomidomalonowego estru stosowano ester formamidomalonowy.

Jones i Kornfeld (16) kondensowali gaminę, siarczan metylowy, szczawian dwuetylowy i acetamidomalonian dwuetylowy wobec etylanu sodowego do α -oksy- β -acetamido- β -karboetoksy-3-indolomalonianu dwuetylowego, który hydrolizowany roztworem wodorotlenku sodowego daje D,L-tryptofan z 70% wydajnością.

Racemiczny tryptofan można rozłożyć na optyczne antypody, najprościej drogą biologiczną. Wyciągi z trzustek zwierzęcych zawierają fermenty hydrolizujące do wolnego tryptofanu tylko lewoskrętny ester etylowy tryptofanu, estru prawoskrętnego nie zmieniają. Pozwala to po hydrolizie estru tryptofanu racemicznego na oddzielanie tryptofanu lewoskrętnego. W wyciągach z nerek znaleziono fermenty odczepiające grupy kwasowe tylko z L-acylo pochodnych tryptofanu.

Do syntez tych potrzebny jest acetamidomalonian dwuetylowy. Związek ten powstaje przez redukcję pyłem cynkowym izonitrozomalonianu dwuetylowego w roztworze kwasu octowego i bezwodnika octowego (1), (19). Redukcje można prowadzić też amalgamatem sodowym lub katalitycznie wodorem wobec platyny lub niklu Raneya. Zamiast estru acetamidomalonowego można używać ester formamidomalonowy (7), gdy redukujemy izonitrozomalonian dwuetylowy cynkiem w kwasie mrówkowym (8), (18), (29). Najlepsze wyniki otrzymujemy przy redukcji izonitrozomalonianu dwumetylowego. Izonitrozodwumalonian dwuetylowy lub dwumetyloowy otrzymujemy łatwo przez działanie azotynów i kwasów na estry malonowe (20).

Acetamido- i formamidomaloniany możemy też otrzymać przez redukcję nitromalonianów (17), które łatwo powstają z estrów malonowych przy działaniu na nie stężonego kwasu azotowego (31).

W roku 1950 i 1951 pod kierunkiem prof. S u p n i e w s k i e g o dr M a y e r opracował syntezę D, L-tryptofanu z indolu celem przeniesienia jej na produkcję fabryczną, aby zaopatrzyć polski rynek leków w ten ważny aminokwas. Oparto się na zasadach syntezy tryptofanu opracowanych przez S n y d e r a, rokującej najlepsze wyniki w produkcji fabrycznej.

Indol do tej syntezy otrzymywano z czystej orto-formylotoluidyny zgodnie ze wskazówkami podanymi w *Organic Syntheses* (tom XXIII, s. 44 (30)) stosując etylan potasowy, co wpływało na zmniejszenie podanej wydajności. Indol można też otrzymać metodą R e i s s e r t a (21) z orto-nitrotoluenu i szczawianu dwuetylowego.

Z indolu łatwo otrzymuje się graminę kondensując go w temperaturze pokojowej z dwuetylaminą i aldehydem mrówkowym.

Gramina ogrzewana z acetamidomalonianem dwuetylowym i bezwodnym sproszkowanym wodorotlenkiem sodowym we wrzącym toluenie odczepia dwumetylaminę i kondensuje się do indolo- β -metyloacetamidomalonianu dwuetylowego.

Koniec reakcji wskazuje koniec wydzielania się dwumetylaminę z wrzącego płynu. Ester ten hydrolizujemy gorącym roztworem wodorotlenku sodowego do odpowiedniego zacetylowanego kwasu. Wolny kwas, ogrzewany z wodą do wrzenia, odczepia dwutlenek węgla i zamienia się w acetylotryptofan, który hydrolizowany na gorąco roztworem wodorotlenku sodowego odczepia kwas octowy i w dobrej wydajności daje D, L-tryptofan. Wydajność tryptofanu z indolu wynosi 52%, metoda jest więc dobra i technicznie opłacalna.

W produkcji fabrycznej należy się liczyć ze wzrostem wydajności i lepszym wyzyskaniem półproduktów.

Acetamidomalonian dwuetylowy otrzymano z malonianu dwuetylowego nitrozując go mieszaniną azotynu sodowego i kwasu octowego. Ester nitrozowy bez dalszego oczyszczania redukowano wodorem wobec niklu Raneya do aminomalonianu dwuetylowego, który acetylowano bezwodnikiem octowym.

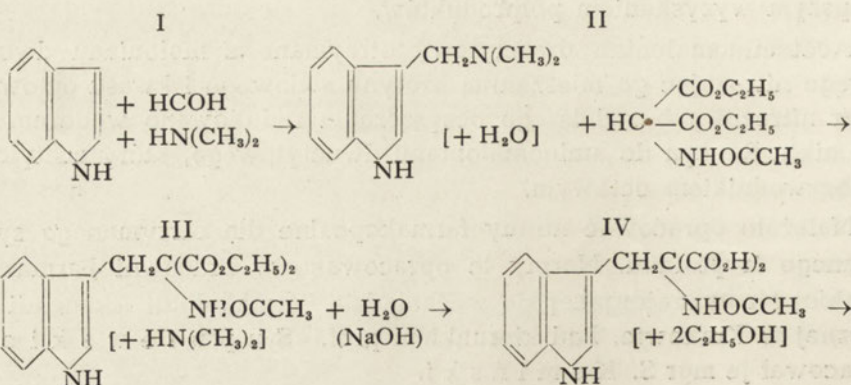
Należało opracować normy farmakopealne dla otrzymanego syntetycznego tryptofanu. Normy te opracowano w Pracowni Farmakopei Polskiej Nr 9, znajdującej się w Zakładzie Farmakologii Akademii Medycznej w Krakowie. Pod kierunkiem prof. S u p n i e w s k i e g o opracował je mgr S. K a m i ń s k i.

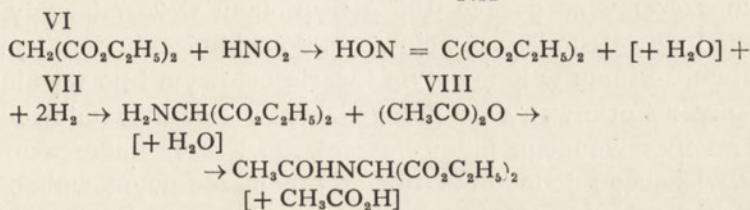
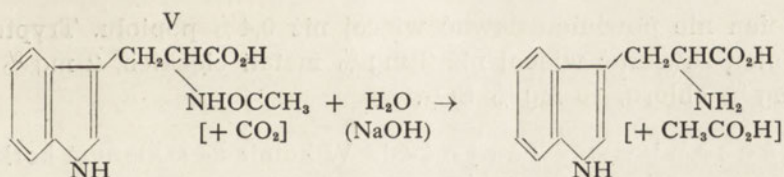
Przy opracowaniu norm spotkaliśmy się z trudnością prostego, ilościowego określenia tryptofanu. Tryptofan można określić oznaczając w nim azot metodą Dumasa lub Kjeldahla, jest to jednak kłopotliwe. Próby miareczkowania tryptofanu wodorotlenkiem sodowym wobec formolu nie dały dobrych wyników. Nie otrzymano też dobrych wyników miareczkowania wodorotlenkiem sodowym w roztworze alkoholowym i miareczkowania kwasem nadchlorowym (wobec fioletu metyloвого) w roztworze kwasu octowego nawet po dodaniu octanu rtęciowego.

Zwrócono się więc do bromometrii, bo tryptofan wiąże osiem atomów bromu. Tryptofan próbowano już oznaczyć bromometrycznie w 1907 roku (17). Nasze próby określenia go bromometrycznie w roztworze wodnym nie doprowadziły do pożądanego celu, za to bromometria w roztworze ca 70% kwasu octowego, podobnie jak to robił Ż y k a (32) z paroma środkami leczniczymi, dała wyniki równoznaczne z określaniem tryptofanu drogą oznaczenia w nim azotu metodą mikro-Dumasa.

W literaturze naukowej lat ostatnich spotykamy się wyłącznie tylko z kolorymetrycznymi metodami oznaczania tryptofanu, wolnego i w białkach, opartych na przykład na zniebieszczeniu odczynnika fosfomolibdeno-wolframowego (F o l i n, C i o c a l t a u (6)) przez ten aminokwas lub na odczynach barwnych, które daje tryptofan z aldehydami (aldehydem para-dwuetyloaminobenzoowym, aldehydami: benzoowym, mrówkowym, z kwasem glioksalowym lub waniliną). Metody te mniej nadają się do oznaczenia stopnia czystości tryptofanu drogą analizy ilościowej.

Synteza





Normy

TRYPTOFAN. (TRYPTOPHANUM)

$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_2\text{N}_2$. Ciężar cząsteczki 204,22

Postać i własności. Bezbarwne krystaliczne rombówce blaszki bez zapachu, o słodkawym smaku.

Rozpuszczalność. Tryptofan rozpuszcza się w 20°C w 190 cz. wody i w 3170 cz. alkoholu etylowego, nie rozpuszcza się w eterze dwuetylowym, chloroformie i benzenie.

Sprawdzenie tożsamości. Temperatura topności 289 — 291°C z rozkładem (przy szybkim ogrzewaniu).

0,01 g tryptofanu rozpuścić w 1 ml wody, dodać 2 — 3 kropli wody bromowej. Powstaje wiśniowe zabarwienie.

0,005 g tryptofanu zadać 3 kroplami stężonego kwasu azotowego, ogrzać do rozpuszczenia. Powstaje żółte zabarwienie, które zamienia się w czerwone po silnym zalkalizowaniu amoniakiem.

0,002 — 0,003 g tryptofanu zadać 1 ml 1% roztworu aldehydu para-dwumetyloaminobenzoowego w stężonym kwasie siarkowym. Po kilku minutach płyn przyjmuje czerwoną barwę.

0,01 g tryptofanu rozpuścić w 2 ml wody i dodać 1 ml farmakopealnego roztworu siarczanu rtęciowego. Powstaje żółty osad.

0,01 g tryptofanu rozpuścić w 1 ml wody, dodać 2 m. odczynnika Hopkins-Cole (wodny roztwór kwasu glioksalowego) i 5 ml stężonego kwasu siarkowego. Po paru minutach na granicy zetknięcia się obu płynów tworzy się fioletowe zabarwienie.

0,01 g tryptofanu rozpuszczamy w 2 ml wody, dodajemy 5 kropli 10% wodnego kwasu jodowego i ogrzewamy do wrzenia. Płyn brunatnieje i wydziela jod.

Badanie na czystość. 0,2 g tryptofanu suszone cztery godziny w 105°C powinny tracić na wadze nie więcej niż 0,001 g (0,5%).

Tryptofan nie powinien dawać więcej niż 0,4% popiołu. Tryptofan nie powinien zawierać więcej niż 2 mg % metali ciężkich, 2 mg % żelaza, 5 mg % chloru, 10 mg % SO_4 .

Oznaczenie zawartości. W kolbie ze szklanym korkiem rozpuszczamy na gorąco 0,05 g tryptofanu w 25 ml wody i 25 ml czystego lodowatego kwasu octowego. Po ochłodzeniu dodajemy 25 ml 0,1 N roztworu bromu w lodowatym kwasie octowym i po wymieszaniu odstawiamy zakorkowany na pół godziny w ciemnym miejscu. Dodajemy 10 ml 10% wodnego jodku potasowego i zaraz miareczkujemy nadmiar niezwiązanego jodu 0,1 N tiosiarczanem sodowym wobec skrobi. 1 ml związanego z tryptofanem 0,1 N bromu odpowiada 0,002553 g tego aminokwasu. Tryptofan farmakopealny powinien zawierać nie mniej niż 99% czystego tryptofanu. Miareczkowanie w 90 — 100% kwasie octowym nie daje dobrych wyników.

Wyniki analiz miareczkowaniem bromometrycznym w porównaniu z oznaczeniem azotu w tryptofanie metodą mikro-Dumasa

Oznaczenia bromometryczne

1 ml 0,1 N Br odpowiada $204,22/8000 = 0,00255275$ g tryptofanu

Waga substancji bezwodnej	Zużyte ml 0,1N Br	Znaleziona z analizy waga tryptofanu	% tryptofanu w preparacie
I. 50,33 mg	19,7	50,24	99,78
II. 49,06 mg	19,2	48,96	99,79

Oznaczenia azotometryczne

1 mg N odpowiada 7,2893 mg tryptofanu

Waga substancji bezwodnej w mg	Wydzielony azot w mm Hg 0°	Znaleziony azot w mg	Znaleziona z analizy waga tryptofanu mg	% tryptofanu w preparacie
I. 13,051	1,58 ml 721 mm Hg 20°	1,7766	12,975	99,43
II. 14,840	1,88 ml 721 mm Hg 19°	2,037	14,840	100,0

Wyniki analiz tryptofanu przeprowadzone dwoma metodami pokrywają się ze sobą.

Streszczenie

Racemiczny tryptofan otrzymano z indolu z 52% wydajnością. Przez kondensację indolu i aldehydem mrówkowym, i dwumetylaminą w roztworze kwasu octowego w ciepocie pokojowej otrzymano graminę, którą kondensowano, gotując z acetamidomalonianem dwuetylowym w toluenie wobec wodorotlenku sodowego do indolo- β -metyloacetamidomalonianu dwuetylowego. Ester ten hydrolizowano do kwasu indolo- β -metyloacetamidomalonowego, gotując z wodnym roztworem wodorotlenku sodowego. Kwas ten gotowany z wodą odczepia dwutlenek węgla i zamienia się w acetylotryptofan, który hydrolizowany gorącym roztworem wodorotlenku sodowego odczepia kwas octowy i daje tryptofan.

Podano normy farmakopealne dla racemicznego tryptofanu. Opracowano bromometryczną metodę określania tryptofanu. W roztworze 70% kwasu octowego tryptofan wiąże osiem atomów bromu z roztworu bromu w kwasie octowym. Po reakcji nadmiar nie związanego bromu określamy jodometrycznie dodając jodku potasowego i miareczkując wydzielony jod 0,1 N tiosiarczanem sodowym wobec skrobi. Metoda ta jest bardzo dokładna i szybka.

LITERATURA

1. Albertson N. F., Tullar B. F., *J. Am. Chem. Soc.*, **67**, 902, 1945.
2. Butenandt A., Hellmann H., Renz E., *Z. d. physiol. Chem.*, **284**, 168 i 175, 1949.
3. Cerchez V., Colesin C., *C. R. Acad., Sci.*, **194**, 1932, 1954.
4. Dunn M. S., Smart B. W., Redemann C. E., Brown K. E., *J. Biol. Chem.*, **94**, 595, 1931.
5. Ellinger A., Flaman d C., *Z. d. physiol. Chem.*, **55**, 15, 1908.
6. Folin O., Ciocaltau V., *J. Biol. Chem.*, **73**, 627, 1927.
7. Galat A., *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 965, 1947.
8. Hellmann H., *Z. d. physiol. Chem.*, **284**, 163 i 167, 1949.
9. Hellmann H., *Angew. Chem.*, **61**, 418, 1949.
10. Hellmann H., *Angew. Chem.*, **65**, 473, 1953.
11. Hellmann H., Lingens F., *Z. d. physiol. Chem.*, **297**, 283, 1954.
12. Hellmann H., Lingens F., *Angew. Chem.*, **66**, 201, 1954.
13. Hopkins F. G., Cole S. W., *J. Physiol.*, **27**, 418, 1901.
14. Hopkins F. G., Cole S. W., *J. Physiol.*, **29**, 451, 1903.
15. Izumi Y. S., Konishi S., *J. Biol. Chem., Jap.*, **74**, 22, 1953.
16. Jones R. G., Kornfeld E. C., *U. S. A. Pat.*, 2621187, 1952.
17. *J. Biol. Chem.*, **2**, 481, 1907.
18. Kühn H., Stein O., *Ber. Chem., Ges.*, **70**, 67, 1937.
19. Light L., Weiss H., *J. f. B. P.*, 583307, 1946.
20. Redemann C. E., Dunn M. S., *J. Biol. Chem.*, **130**, 341, 1939.
21. Reissert A., *Ber. Chem. Ges.*, **30**, 1036, 1897.

22. Snyder H. R., Katz K., *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 3140, 1947.
23. Snyder H. R., Smith C. W., Stewart J. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **66**, 200, 1944.
24. Snyder H. R., Smith C. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **66**, 350, 1944.
25. Snyder H. R., Shekleton J. F., Lewis C. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **67**, 310, 1947.
26. Snyder H. R., Weber F. Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 2964, 1950.
27. Sørensen S. P. L., *Z. d. physiol. Chem.*, **44**, 448, 1905.
28. Tatsuaka S., Kinashita T., *Jap. Pat.* 4472, 1952.
29. Tatsuaka S., Kinashita T., *Jap. Pat.* 4471, 1952.
30. Tyson F. T., *Organic Syntheses J. Wiley N. Y.* **23**, 42, 1943.
31. U. S. A. Pat. 2644838, 1953.
32. Żyka J., *Pharmazie*, **10**, 812, 1954.

СИНТЕТИЧЕСКИЙ D,L-ТРИПТОФАН

РЕЗЮМЕ

Рацемический триптофан получен был из индоля 52% мощности. Путем конденсации индоля муравьиным альдегидом и диметиламином в растворе уксусной кислоты в комнатной температуре получено грамин, который был конденсирован путем кипячения с диэтиловым ацетамидолианом в получение с наличием NaOH гидрокси натрия до диэтилового индоло-В-метилоацетамидомалониана. Этот эфир был гидролизирован до индоло-В-метилоацетамидомалоновой кислоты путем кипячения в водном растворе гидроокиси натрия. По кипячении с водой кислота отделяет двуокись углерода и превращается в ацетило-триптофан, который по гидролизировании его горячим раствором гидроокиси натрия отделяет уксусную кислоту и дает триптофан.

Приведены фармакопейные нормы для рацемического триптофана. Разработана бромометрическая методика определения триптофана. В растворе 70% уксусной кислоты триптофан соединяет 8 атомов брома из раствора брома в уксусной кислоте. По окончании реакции избыток свободного брома определяется иодометрически, причем добавляется иодистый калий и выделенный иод титруется 0,1 N-тиосульфатом при наличии крахмала. Это очень точная и быстрая методика.

SYNTHETIC D, L-TRYPTOPHANE

Summary

The racemic tryptophane has been obtained in 52% yield from indole. In the first step gramine has been made by condensing indole with formaldehyde and dimethylamine in acetic acid solution at the room tempe-

ature. Gramine boiled with diethylacetoamidomalonate in toluene yields diethyl indolo- β -methylacetoamidomalonate in the presence of sodium hydroxide. The ester is hydrolyzed to indolo- β -methylamidomalononic acid while boiled with aqueous sodium hydroxide solution.

Carbon dioxide splits off from the acid through boiling with water. The acetyltryptophane resulted in the above reaction hydrolyzes in hot sodium hydroxide solution yielding tryptophane and acetic acid.

The pharmacopoeial norms for racemic tryptophane have been given. The bromometric method of tryptophane determination was elaborated. Tryptophane dissolved in 70% acetic acid is capable of binding 8 bromine atoms, bromine solution in acetic acid being used in the reaction.

The excess of the unreacted bromine is determined iodometrically, by adding potassium iodide and titrating the liberated iodine with 0,1 N sodium thiosulphate in the presence of starch solution.

The outlined method is rapid and highly accurate.

Otrzymano 7.II.1955

pod ciśnieniem 100 atm. Temperaturę w ciągu redukcji utrzymuje się w zakresie około 50° , przy czym czas trwania redukcji wynosi około 3 godzin.

Po tym czasie zawartość autoklawu przesącza się i z przesączu oddestylowuje etanol w próżni. Ilość produktu surowego, w postaci ciemnej oleistej cieczy, wynosi około 295 g.

VIII. Acetamidomalonian dwuetylowy

Uzyskany poprzednio surowy ester etylowy kwasu aminomalonowego w ilości około 295 g oziębia się do temp. 0° , po czym silnie mieszając wkrapla się 158 ml świeżo przedestylowanego bezwodnika kwasu octowego. W ciągu wkrapiania bezwodnika utrzymuje się temperaturę mieszaniny w granicy od 0° do $+5^{\circ}$. Po wkropleniu całej ilości bezwodnika ochładza się mieszaninę w lodówce, po 12 godzinach odsącza wykrystalizowany osad, przemywa małą ilością zimnego ksylenu, a następnie suszy w próżni. Otrzymuje się 61 g estru etylowego kwasu acetaminomalonowego o temp. $95-97^{\circ}$.

Ług poreakcyjny zagęszcza się w próżni, przy czym, obok ksylenu, otrzymuje się około 45 g niezużytego estru malonowego. Do gorącej pozostałości podestylacyjnej dolewa się 85 ml ksylenu, oziębia mieszaninę w lodówce przez 12 godzin w temp. 0° , a następnie wydzielony osad odsącza, przemywa małą ilością zimnego ksylenu i suszy w próżni.

Otrzymany produkt barwy jasno-brunatnej rozpuszcza się w gorącej wodzie, oczyszcza węglem aktywnym, sączy, oziębia i odsącza wykrystalizowany związek w ilości około 32 g.

W ten sposób otrzymuje się łącznie 93 g estru etylowego kwasu acetaminomalonowego o temp. topn. $95-97^{\circ}$ (21,6% wydajności w stosunku do estru etylowego kw. malonowego). Uwzględniając ilość zregenerowanego estru malonowego (45 g) — wydajność estru acetaminomalonowego wynosi 25%.

J. PAWEŁKIEWICZ i K. NOWAKOWSKA

PREKURSORY BIOSYNTETY NUKLEOTYDOCYJANOKOBALAMIN.**II. SYNTEZA NOWYCH POCHODNYCH WITAMINU B₁₂**

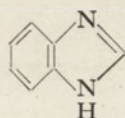
Z Zakładu Biochemii Żywności WSR w Poznaniu

Katedra Techn. Rolnej. Kierownik Katedry prof. dr J. Janicki

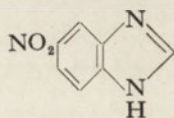
Bakterie kwasu propionowego, *Propionibacterium shermanii*, hodowane na pożywkach złożonych z hydrolizatu kazeiny lub glutenu, namoku kukurydzianego, ekstraktu drożdżowego, glikozy, fosforanów i śladów soli kobaltowych wytwarzają głównie witamin B_{12p} obok nieznacznych ilości witaminu B₁₂ (13), (14). Gdy do pożywki dodać ponadto niektórych pochodnych benzimidazolu, a mianowicie 5, 6-dwumetylo- lub 5-metylo-benzimidazolu, związki te zostają na drodze biologicznej włączone do cząsteczki kobalaminowej tworząc odpowiednio: 5,6-dwumetylobenzimidazolocyjanokobalaminę (witamin B₁₂)¹⁾ lub 5(6)-metylobenzimidazolocyjanokobalaminę. Zawartość witaminu B_{12p} spada przy tym praktycznie do zera (18), (19). Na tej drodze otrzymano po raz pierwszy większe ilości powyższych kobalamin w stanie krystalicznym. W dyskusji pracy wypowiedziano przypuszczenie, że tylko określone pochodne benzimidazolu mogą być prekursorami syntezy odpowiednich kobalamin, produkowanych przez bakterie kwasu propionowego. Celem sprawdzenia tej hipotezy przebadano dalszy szereg związków pochodnych podstawionych w pozycji 5 i 6. Badania te miały również na celu otrzymanie nowych pochodnych witaminu B₁₂, które mogłyby okazać się w dalszych badaniach biologicznych antyvitaminami i tym samym posłużyć w rozwiązaniu zagadnienia roli witaminu B₁₂ w metabolizmie ustrojów żywych. Wyrażono również przypuszczenie, że te antyvitaminy mogą posiadać własności carcinostatyczne (11).

Do badań użyto następujących związków: benzimidazol (I), 5-nitrobenzimidazol (II), 5 (lub 6)-nitro-6 (lub 5)-metylobenzimidazol (III), 5,6-dwunitrobenzimidazol (IV), 5-etoksybenzimidazol (V) i 5,6-imidazobenzimidazol (VI).

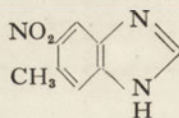
¹⁾ Otrzymany w ten sposób witamin B₁₂ przebadano w Instytucie Hematologicznym w Warszawie i stwierdzono jego kliniczną aktywność.



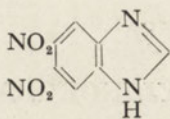
(I)



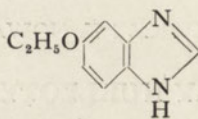
(II)



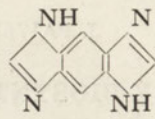
(III)



(IV)



(V)



(VI)

Wszystkie te związki udało się na drodze biosyntezy włączyć do cząsteczki kobalaminowej i odpowiednie kobalaminy otrzymać w stanie krystalicznym.

Wstępnie przebadano również benzotriazol i 2-merkaptobenzotiazol, związki o zbliżonej strukturze do benzimidazolu.

Równoległe z powyższymi pracami F o r d i współpracownicy w dwóch komunikatach donieśli o biosyntezie różnych kobalamin przeprowadzanej przez *Bact. coli mutant* 113-3 z czynnika B i odpowiedniego prekursora (8), (9). Czynnikiem B nazwali badacze z National Institute for Research in Dairying z F o r d e m na czele jedną z kobalamin wyodrębnioną przez nich z kału cieląt i kurcząt (10), (12). *Bact. coli mutant* potrzebujący dla swego wzrostu witaminu B₁₂ w pożywce rośnie również po dodaniu czynnika B do pożywki. W normalnych warunkach hodowli drobnoustrój ten przekształca czynnik B w inną kobalaminę, tzw. czynnik C znaleziony również w kale zwierząt i ptaków. Gdy do pożywki dodać prócz czynnika B, 5,6-dwumetylobenzimidazol lub 4,5-dwumetylo-o-fenylodwuaminę lub riboflawinę z czynnika B i dodanego prekursora, zostaje zsyntetyzowany witamin B₁₂ (5,6-dwumetylobenzimidazolocyjanokobalamina) (8). Podobnie z adeniną otrzymano pseudowitamin B₁₂ (8) (adenino-cyjanokobalaminę), związek, który został uprzednio wyizolowany przez P f i f f n e r a i innych z bakterii występujących w przewodzie pokarmowym cieląt (20). W następnym komunikacie (9) F o r d i inni stwierdzają powstanie nowych kobalamin przy użyciu następujących prekursorów: benzimidazolu, 5,6-dwuchlorobenzimidazolu, 5-metylobenzimidazolu, 5-aminobenzimidazolu, 5-nitrobenzimidazolu, 4-chloro-1,2-benzotriazolu, benzotiazolu, 2,8-dwuchloroadeniny i 2,6-dwuaminopuryny. W czystej formie badacze ci izolowali tylko kobalaminę zawierającą benzimidazol (benzimidazolocyjanokobalaminę (19)). Również F a n t e s i O' C a l l a g h a n (7), powtarzając pracę D u l a n e y a i W i l l i a m s a (5), donieśli w formie komunikatu o otrzymaniu kry-

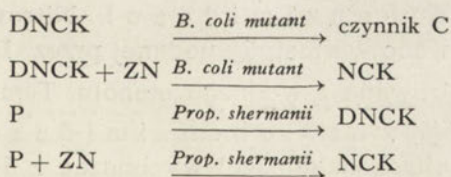
stalicznej benzimidazolocyjanokobalaminy w procesie fermentacyjnym przy użyciu szczepu *Streptomyces griseus* i o-fenylenodwuaminy jako prekursora. Próby kliniczne wykazały, że jest ona aktywna w wypadkach anemii złośliwej w tym samym stopniu, co witamin B₁₂.

W międzyczasie A r m i t a g e i i n n i (1) udowodnili, że „czynnik B” Forda jest witaminem B₁₂ pozbawionym ugrupowania nukleotydowego w cząsteczce. W myśl powyższego reakcje biosyntezy różnych kobalamin przeprowadzanych przez *Bact. coli mutant* można tłumaczyć jako przyłączenie ugrupowania nukleotydowego do deznukleotydocyjanokobalaminy²⁾.

Podobnie okazało się, że witamin B₁₂, produkowany przez badany przez nas szczep *Propionibacterium shermanii*, jest deznukleotydocyjanokobalamina, a zatem jest związkiem identycznym z „czynnikiem B” Forda (15).

W ten sposób istnieje formalne podobieństwo syntez różnych nukleotydocyjanokobalamin (NCK) przeprowadzanych przez *Bact. coli mutant* i *Propionibacterium shermanii*.

Natomiast zasadnicza różnica obu metod tkwi w tym, że *Bact. coli mutant* potrafi jedynie sprzęgać podane w pożywce komponenty, deznukleotydocyjanokobalaminę (DNCK), będącą dla tego drobnoustroju substancją wzrostową, i zasadę nukleotydową (ZN), wytwarzając nukleotydocyjanokobalaminę (NCK). Bakterie kwasu propionowego produkujące w zwykłych warunkach DNCK potrzebują jedynie ZN do biosyntezy NCK. Różnice te ilustrują schematycznie wzory podane niżej, w których P oznaczają prekursorzy DNCK zawarte w zwykłej pożywce:



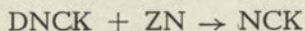
Bakterie kwasu propionowego okazały się w ten sposób wygodnym obiektem do otrzymywania większych ilości różnych nukleotydocyjanokobalamin w stanie krystalicznym.

W pracy niniejszej rozpatrywano również mechanizm tworzenia się NCK przez *Propionibacterium shermanii*. Celem stwierdzenia, czy synteza

²⁾ Wg zaproponowanej uprzednio nomenklatury (19) chodzi tu o cyjanokobalaminę (płaską część cząsteczki z atomem kobaltu + grupa cyjanowa) nazywaną jednak w dalszej części pracy deznukleotydocyjanokobalamina w celu niemylenia jej z ogólnie w literaturze przyjętą nazwą cyjanokobalaminy dla całej cząsteczki witaminu B₁₂.

NCK jest reakcją następczą po niezależnie od niej postępującej syntezie DNCK, dodawano prekursor (5,6-dwumetylobenzimidazol) pod koniec okresu hodowli szczepu, a zatem w chwili gdy komórki drobnoustroju zgromadziły już znaczne ilości witaminu B_{12p} (DNCK).

Analizy takich hodowli wykazały, że w komórkach bakterii kwasu propionowego, podobnie jak w *Bact. coli mutant*, zachodzi reakcja:



i że czas trwania tej reakcji w komórkach *Prop. shermanii* wynosi ok. 24 godzin.

Wstępne próby przeprowadzenia tej reakcji *in vitro* dały wynik negatywny.

Część doświadczalna

MATERIAŁY DO BADAŃ

1. B e n z i m i d a z o l — otrzymano z o-nitroaniliny. Redukcji o-nitroaniliny dokonano za pomocą cyny i kwasu solnego. Po rozcieńczeniu wodą mieszaniny reakcyjnej roztwór wysycano siarkowodorem do całkowitego wytrącenia się cyny. Osad siarczków odsączano, a klarowny roztwór chlorowodoru o-fenylenodwuaminy zagęszczano w próżni do zapoczątkowania krystalizacji. Po oziębieniu odsączano kryształy na lejku piankowym, po czym bezpośrednio używano ich do syntezy benzimidazolu, którą przeprowadzano metodą Philipsa (21). Temperatura topliwości czystego związku 171°.

2. 5(lub 6)-N i t r o b e n z i m i d a z o l. Nitrową pochodną benzimidazolu otrzymywano wg metody podanej przez E f r o s a (6).

Preparat krystalizowano z wodnego etanolu. Temp. topliwości 203°.

3. 5(6)-N i t r o-6(5)-m e t y l o b e n z i m i d a z o l — otrzymywano podobnie jak 5-nitrobenzimidazol wychodząc z 5-metylobenzimidazolu. Preparat krystalizowano z wody. Temp. topliwości 181°. Preparat miękł już w temp. 158°.

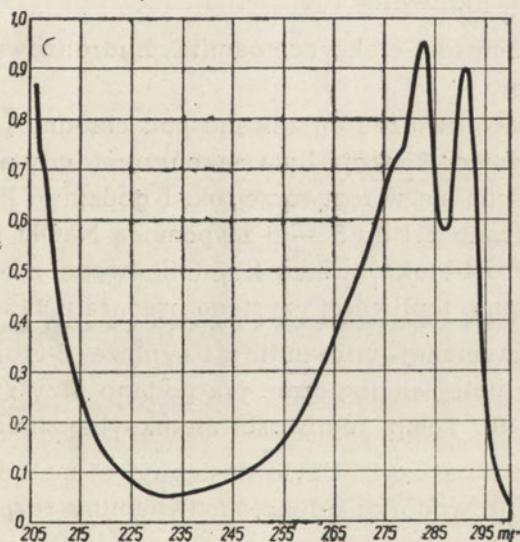
4. 5,6-D w u n i t r o b e n z i m i d a z o l. Związek ten otrzymano wg metody podanej przez E f r o s a (16), wychodząc z azotanu 5(6)-nitrobenzimidazolu lub też ogrzewając bezpośrednio 1 g benzimidazolu z mieszaniną 20 ml HNO₃(d 1,52) i 10 ml stężonego H₂SO₄ 4 godziny pod chłodnicą zwrotną. Temp. topliwości czystego produktu 187 — 189° (E f r o s a podaje 186°).

5. 5,6-I m i d a z o b e n z i m i d a z o l. Związek ten otrzymano redukując cyną i kwasem solnym 5,6-dwunitrobenzimidazol i kondensując

otrzymaną pochodną dwuaminową z kwasem mrówkowym wg metody Phillipsa (21).

E f r o s (6) syntetyzując imidazobenzimidazol ogrzewał 5,6-dwuaminobenzimidazol z kwasem mrówkowym w 15% HCl w zatopionej rurze w temp. 180° w ciągu 1 godziny.

W naszej pracy przekonaliśmy się, że nie trzeba używać tak drastycznych warunków reakcji do utworzenia drugiego pierścienia imidazolowego. Już kilkuminutowe ogrzewanie w temperaturze wrzenia chlorowodoru dwuaminobenzimidazolu z kwasem mrówkowym w roztworze HCl powoduje powstanie imidazobenzimidazolu. Po oziębieniu roztworu krystalizuje w pięknych igłach trudno rozpuszczalny chlorowodorek tego związku. Oczyszczano go dodatkowo za pomocą węgla aktywnego, a wolny imidazobenzimidazol wytrącano z roztworu amoniakiem.



Rys. 1. Widmo absorpcyjne 5,6-imidazobenzimidazolu w roztworze 0,1N HCl

Czysty związek nie topi się poniżej 330°. Posiada on bardzo charakterystyczne widmo absorpcyjne w ultrafiolecie (rys. 1), typowe dla pochodnych benzimidazolu, lecz z przesuniętymi pasmami absorpcji w kierunku fal dłuższych w porównaniu do benzimidazolu lub pochodnych 5-metylo- lub 5,6-dwumetylo-benzimidazolu. Maksima absorpcji: 282 i 290,5 mμ, w 0,1 N HCl i 292 i 295 mμ w roztworze alkalicznym.

6. 5-E t o k s y b e n z i m i d a z o l — otrzymano z p-fenacetyny na drodze następujących przemian: p-fenacetyna → 2-nitro-4-etoksyacetani-

lid \rightarrow 2-nitro-4-etoksyanilina \rightarrow 4-etoksy-1,2-dwuaminobenzen \rightarrow 5(6)-etoksybenzimidazol.

Nitrowanie p-fenacetyny przeprowadzano w bezwodnym kwasie octowym dymiącym kwasem azotowym wg następującej metody:

5 g fenacetyny rozpuszczano w 30 ml lodowatego kwasu octowego w temp. ok. 50°. Po ostudzeniu do temperatury 18° dodawano kroplami stale mieszając próbę 4 ml roztworu dymiącego kwasu azotowego (d 1,52) w bezw. kwasie octowym (1:1 v/v). Proces nitrowania przeprowadzano w ten sposób, by temperatura mieszaniny reagującej wahała się w granicach 20 — 25°. Po wkropleniu całej mieszaniny nitrującej ciecz pozostawiono na 1^{1/2} godziny w spokoju, a następnie wlewano ją do wody z lodem (ok. 200 ml). Wytrącony osad odsączano na lejku piankowym, po czym przekrystalizowywano z gorącego etanolu. Produkt suszono na powietrzu. Temp. topliwości 104 — 105°.

Utworzony 2-nitro-4-etoksyacetoanilid hydrolizowano w roztworze kwasu siarkowego.

W tym celu 5 g związku ogrzewano pod chłodnicą zwrotną z 25 ml 40% kw. siarkowego. Reakcja była zakończona, gdy wszystkie acetylo-pochodna rozpuściła się w roztworze (ok. 1 godziny). Po ostudzeniu roztworu doprowadzono pH do 5 — 6 za pomocą NaOH i wytrącony osad odsączano. 2-nitro-4-etoksyanilinę krystalizowano z etanolu i suszono na powietrzu. Temp. topliwości czystego preparatu 113°.

Redukcję otrzymanej nitroaniliny i syntezę 5-etoksybenzimidazolu przeprowadzono dalej analogicznie jak podano przy syntezie 5-metylo-benzimidazolu (19). Temp. topliwości 5-etoksybenzimidazolu 116°.

7. B e n z o t r i a z o l. Użyto następującej metody syntezy benzotriazolu: 1 g chlorowodoru o-fenylendwuaminy rozpuszczono w 5 ml 0,4 N HCl i szybko wiano do roztworu 0,4 g NaNO₂ w 5 ml wody. Mieszaninę reakcyjną ogrzano do 80° i w tej temperaturze utrzymywano 15 minut. Następnie dodano roztworu octanu sodu, by pH podniosło się do wartości ok. 5, i roztwór pozostawiono w lodówce do pełnego wytrącenia się benzotriazolu. Osad odsączano na lejku piankowym, przemyto wodą, po czym rozpuszczono w etanolu. Roztwór etanolowy odbarwiono węglem, etanol odparowywano do sucha i surowy benzotriazol 2 razy destylowano w próżni. Temp. topliwości 95,5°.

8. 2-M e r k a p t o b e n z o t i a z o l. Do badań użyto preparatu handlowego fmy Schuchardt o temp. topliwości 175° (wg literatury 177 — 179°).

HODOWLA BAKTERII KWASU PROPIONOWEGO

Do badań użyto szczepu *Propionibacterium shermanii* otrzymanego z Zakładu Mikrobiologii WSR w Olsztynie i przechowywanego w stanie zliofilizowanym, stosując technikę hodowli opisaną uprzednio (14). Hodowle przeprowadzono na pożywce o składzie: 120 ml kwasowego hydrolizatu kazeiny lub glutenu (14), 5 g ekstraktu drożdżowego ³⁾, 2,5 g namoku kukurydzianego, 4,5 g fosforanu jednopotasowego, 1 ml 1% roztworu siarczanu kobaltowego, 20 g glikozy technicznej, 880 ml wody wodociągowej. Fosforan jednopotasowy rozpuszczano najpierw w wodzie i dodawano roztworu KOH aż do uzyskania roztworu buforowego o pH 7.

METODA BADANIA PREKURSORÓW

W pracy niniejszej zastosowano analogiczną metodę badania prekursorów, jak podano w poprzedniej publikacji (19), polegającą na wyodrębnieniu utworzonych kobalaminy z 1-litrowych hodowli *Propionibacterium shermanii* i badaniu widm absorpcyjnych otrzymanych koncentratów.

Zmieniono jedynie sposób otrzymywania koncentratów kobalaminy. Stosowano następującą metodę: z 1-litrowej hodowli odwirowywano bakterie kwasu propionowego, po czym osad bakteryjny zawieszano w ca 200 ml wody. Suspensję tę zakwaszono 0,5N kwasem siarkowym do pH 3 i ogrzewano 10 minut w temperaturze 60°. Po ostudzeniu dodawano 0,5 ml 10% roztworu cyjanku sodowego i nasyconego roztworu węglanu sodowego do pH 8. Alkaliczny płyn wirowano i klarowny centryfugat (ca 200 ml) zadawano 50 g chlorku sodowego. Po rozpuszczeniu soli ekstrahowano kobalaminy 4 — 6 razy po 20 ml alkoholem benzylovym. Połączone ekstrakty wirowano celem usunięcia zemulgowanej fazy wodnej z alkoholu benzylovego i klarowny roztwór zadawano równą objętością chloroformu. Z mieszaniny ekstrahowano kobalaminy małymi porcjami wody. Połączone wyciągi wodne ekstrahowano jeden raz 1/2 obj. chloroformu celem usunięcia śladów alkoholu benzylovego i zadawano je 1 — 2 ml 1 M NaH₂PO₄, by obniżyć pH roztworu do wartości 6,0 — 6,5. Tak przygotowany wodny roztwór ekstrahowano roztworem o-krezolu w chloroformie (1:1 v/v) stosując do ekstrakcji 0,1 — 0,2 objętości mieszaniny na objętość roztworu wodnego. Ekstrakcję przeprowadzano małymi porcjami, tak by użyta objętość wystarczała do ilościowego usunięcia kobalaminy z fazy wodnej. Połączone ekstrakty krezolowe zadawano 1/2 objętości chloroformu i fazę organiczną prze-

³⁾ Ekstrakt drożdżowy otrzymano z Nadodrzańskich Zakładów Przemysłu Drożdżowego w Szczecinie. Najlepszy okazał się ekstrakt otrzymywany z drożdży browarnianych dolnej fermentacji plazmolizowanych siarczanem amonowym.

mywano małą ilością wody. Gdy w trakcie przemywania część kobalaminy przeszła do wody, ekstrahowano ją ponownie małymi porcjami mieszaniny krezolu i chloroformu. Następnie do tego wyciągu dodawano 1 objętość mieszaniny chloroformu i n-butanolu (1:1 v/v) i kobalaminy ekstrahowano kilka razy małymi porcjami wody. Wodny wyciąg kobalaminy, dostatecznie czysty do badań widmowych, ekstrahowano dodatkowo 3 razy chloroformem (po 0,5 obj. fazy wodnej) celem usunięcia śladów o-krezolu, po czym odparowywano go pod zmniejszonym ciśnieniem na łaźni wodnej do sucha. Suchą pozostałość rozpuszczano w odpowiedniej ilości wody i badano widmo absorpcyjne roztworu w zakresie 260 — 600 m μ . W próbie kontrolnej, bez dodatku prekursora lub w wypadku niewiązania prekursora, powstawał witamin B_{12p} (deznukleotydcyjanokobalamina) charakteryzujący się maksimumami absorpcji dla fal o długościach 355 i 500 m μ (i słabym maksimum dla 525 — 30 m μ). W wypadku utworzenia nukleotydcyjanokobalaminy pojawiały się maksima dla fal o długościach 360 — 62 i 550 m μ .

Sposób przygotowania koncentratu stosowany w niniejszej pracy okazał się praktyczniejszy i szybszy od stosowanego uprzednio (19). Stosowana metoda okazała się również praktyczna dla spektrofotometrycznego, ilościowego oznaczania różnych kobalaminy. W metodzie ilościowej stężenie badanej kobalaminy opierano na pomiarze wartości absorpcji dla fali o długości 550 m μ (lub 498 m μ dla DNCK).

Zastosowany tu sposób ekstrakcji krezolowo-butanolowej oparto na pracy Bachera i innych (2).

Dodatkowo kontrolowano powstawania nowych nukleotydcyjanokobalaminy metodą elektroforezy bibułowej. W tym celu na paski bibuły chromatograficznej Whatman nr 4 lub, dla rozdzielania większych ilości kobalaminy, bibuły Whatman nr 3 nanoszono zagęszczony koncentrat, po czym rozdzielano zawarte w nim kobalaminy elektroforetycznie według metody Holdswortha (12), stosując jako elektrolit 2 N kwas octowy, zawierający 0,01% cyjanku sodu. Rozdzielenie było kompletne po 6 — 8 godzinach przy gradiencie napięcia ok. 9 V/cm i poziomym ułożeniu bibuły. Witamin B_{12p} wędrował ku katodzie przesuwał się ok. 10 cm od miejsca startu. Obojętne kobalaminy przesuwały się w tym czasie ok. 2 — 3 cm wskutek zjawisk elektroosmozy.

IZOLOWANIE NUKLEOTYDCYJANOKOBALAMIN

Celem izolowania utworzonych NCK posługiwano się metodą opisaną uprzednio (19), (16).

Posługiwano się również następującymi modyfikacjami wyodrębnienia krystalicznych związków:

(a). Przygotowywano koncentrat kobalamin, jak podano wyżej przy opisie metody badania prekursorów. Wodny koncentrat ekstrahowano następnie kilka razy 20% roztworem fenolu w chloroformie. Połączone wyciągi sączono do kolbki destylacyjnej, a sączek przemywano małą ilością roztworu fenolowego. Z mieszaniny odpędzono chloroform pod zmniejszonym ciśnieniem w łaźni wodnej o temp. 80°. Roztwór fenolowy zadawano w rozdzielaczu 8 — 10 objętościami eteru i kobalaminy ekstrahowano małymi porcjami wody. Z ekstraktów wodnych usuwano ślady fenolu za pomocą eteru i wodny roztwór odparowywano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Suchą pozostałość rozpuszczano w małej objętości metanolu (1 — 2 ml) i roztwór chromatografowano na kolumnie z tlenkiem glinu. Tlenek glinu przygotowywano, jak podano uprzednio (16). Dobry okazał się również tlenek glinu wg Brockmanna, zakwaszony uprzednio do pH 6. Metanolowy eluat odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem do sucha i kobalaminy krystalizowano w zwykły sposób z wodnego acetonu. Metodą tą otrzymano 5(6)-etoksybenzimidazolocyjanokobalaminy.

(b). Zawiesinę wodną bakterii ogrzewano 10 minut w temp. 60° przy pH 3. Po ostudzeniu ciecz alkalizowano nasyc. roztworem Na_2CO_3 , po czym dodawano 0,1 ml 10% roztworu NaCN. Ciecz wirowano i klarowny cetryfugat zakwaszano 0,5 N H_2SO_4 do pH 5 — 6. Teraz dodawano 5 g kryst. octanu cynku na litr roztworu i ponownie alkalizowano NaOH do pH 8 (2). Wytrącony osad odwirowywano, przemywano małą ilością wody i klarowną ciecz zakwaszano kwasem siarkowym do pH 5 — 6. Następnie kobalaminy ekstrahowano roztworem o-krezolu w chloroformie, jak opisano wyżej. Wodny wyciąg alkalizowano roztworem NaCN do pH 8, wysycano chlorkiem sodowym 25 g/100 ml, po czym po 1 godzinie ekstrahowano 4 — 6 razy małymi porcjami alkoholu benzylowego. Połączone wyciągi alkoholowe wirowano, klarowny roztwór zadawano równą objętością chloroformu, a kobalaminy ponownie przenoszono do fazy wodnej. Wodny roztwór kobalamin ekstrahowano 20% roztworem fenolu w chloroformie i postępowano dalej jak w metodzie (a). Metody tej użyto do otrzymania 5,6-dwunitrobenzimidazolocyjanokobalaminy.

(c). Po uzyskaniu wodnego koncentratu po ekstrakcji krezolowo-butanolowej jak w metodzie (b) — roztwór odparowywano do małej objętości, po czym nanoszono w formie wąskiego paska na bibułę chromatograficzną Whatman nr 3 i poddawano elektrofotoretycznemu rozdzielaniu w 2 N CH_3COOH z 0,01% NaCN.

5,6-Imidazobenzimidazolocyjanokobalamina, którą oczyszczano w ten sposób, wędruje razem z witaminem B_{12p} pojawiającym się w małych

The first part of the paper is devoted to a general discussion of the problem of the origin of life. It is shown that the origin of life is a problem of the first order of importance, and that it is one of the most important problems of the present day. The author discusses the various theories of the origin of life, and shows that the most probable theory is that of the origin of life from non-living matter. The author also discusses the possibility of the origin of life from extraterrestrial sources, and shows that this is also a possibility. The author concludes that the origin of life is a problem of the first order of importance, and that it is one of the most important problems of the present day.

UZUPEŁNIENIE DO PRACY W TOMIE II 1955 R., STR. 252—253

J. SUPNIEWSKI, J. MAYER i S. KAMIŃSKI

SYNTEZYCZNY D, L — TRYPTOFAN

I. Gramina

W kolbce stożkowej pojemności 500 ml umieszcza się 69 ml 33,6%-owego roztworu dwumetyloaminy, ochładza do temp. + 5°, po czym dodaje w kolejności 57 ml kwasu octowego lodowatego i po 5 minutach 32,5 ml 36%-owej formaliny. Otrzymaną mieszaninę wlewa się do 50 g sproszkowanego indolu, miesza aż do całkowitego rozpuszczenia, w trakcie czego temperatura wzrasta do około 45 — 56°, po czym pozostawia mieszaninę na przeciąg 10 godzin w temp. pokojowej. Po tym czasie roztwór przyjmuje wygląd gęstego oleju barwy czerwonej. Otrzymany olej wlewa się przy równoczesnym mieszanii do roztworu przyrządzonego przez rozpuszczenie 60 g wodorotlenku sodowego w 430 ml wody, następnie chłodzi przez 2 godziny w temp. 0°, po czym sączy, osad przemywa trzy razy po 40 ml wody i suszy w temp. 50° w próżni. Ilość produktu surowego wynosi 80 g. Celem oczyszczenia produkt surowy zalewa się 570 ml wody, rozpuszcza przez dolanie 86 ml kwasu octowego lodowatego, następnie wyklóca roztwór z 10 g węgla aktywnego, odsąca od węgla i z oziębionego przesącza wytrąca graminę za pomocą roztworu ługu sodowego, otrzymanego przez rozpuszczenie 71,5 g NaOH w 286 ml wody. Mieszaninę oziębia się w lodzie, sączy, osad przemywa cztery razy po 286 ml wody, a następnie suszy w próżni nad kwasem siarkowym. Otrzymuje się 60 g czystej graminy (81% wydajności) o temp. topl. 125—127° (czysta 138—9°).

II. indolo- β -metyloacetaminomalonianian dwuetylowy

W kolbce okrągłej pojemn. 750 ml zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną, miesza się z zamknięciem rtęciowym oraz rurkę doprowadzającą azot, — umieszcza się 60 g graminy, 290 g bezwodnego toluenu, 4,2 g przetopionego i sproszkowanego wodorotlenku sodowego i 75,5 g estru etylowego kwasu acetaminomalonowego. Obecnie przepuszcza się suchy azot celem wyparcia powietrza z aparatury, po czym ogrzewa mieszaninę do wrzenia (t. łaźni 130—140°) aż do ustania wydzielania się dwumetyloaminy (około 4 godz.). Skoro to nastąpi, roztwór przesącza się na gorąco, a przesącz

oziebia przez 12 godzin w lodówce. Wydzielony po tym czasie osad krystaliczny odsącza się, przemywa na sączku trzy razy po 40 ml zimnym toluenem, następnie 40 ml eterem naftowym, po czym suszy w temp. 100°.

Otrzymuje się 99 g związku (83% wydajności) o temp. 155—158°.

III. Kwas indolo- β -metyloacetaminomalonowy

W okrągłej kolbie z 3 szyjkami pojemn. 4 l, zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną, mieszadło z zamknięciem rtęciowym oraz rurkę doprowadzającą azot, — umieszcza się 99 g estru kwasu indolo- β -metyloacetaminomalonowego, po czym dolewa roztwór ługu otrzymany przez rozpuszczenie 56,5 g wodorotlenku sodowego w 1530 ml wody i przepuszcza suchy azot celem wyparcia powietrza z aparatury. Następnie przy ciągłym mieszaniu ogrzewa się mieszaninę do wrzenia utrzymując temp. łaźni w granicy 135—140°. W trakcie ogrzewania osad rozpuszcza się, przy czym reakcja zachodzi burzliwie (pienienie).

Po 4 godzinach ogrzewania mieszaninę lekko ochładza się przy ciągłym przepływie azotu, a następnie dodaje 13 g węgla aktywnego i ogrzewa przez 15 minut do wrzenia. Po tym czasie mieszaninę ochładza się do temp. pokojowej (przy przepływie azotu), sączy, a przesącz zakwasza rozcieńcz. kwasem solnym (2 obj. HCl stęż. i 1 obj. H₂O) do reakcji kwaśnej na czerwień kongo. Po oziębieniu wypada osad, który sączy się i suszy w próżni. Otrzymuje się 58 g związku, o temp. topl. 133—135°. Związek pod wpływem powietrza lekko różowieje.

Ług pokrystaliczny lekko alkalizuje się i zagęszcza w próżni (temp. łaźni 60°) do około $\frac{1}{3}$ objętości, a następnie oziębia i ponownie zakwasza kwasem solnym. Wykryształizowany osad odsącza się i suszy. W ten sposób otrzymuje się jeszcze 23 g związku. Łącznie otrzymuje się 81 g związku (97,5% wydajności).

IV. V. Tryptofan

W kolbce kulistej pojemn. 1 litra, zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną i rurkę do doprowadzania azotu, — umieszcza się 80 g kwasu indolo- β -metyloacetaminomalonowego, dodaje 340 ml wody i ogrzewa do wrzenia przy ciągłym przepuszczaniu azotu aż do momentu, kiedy przestanie wydzielać się dwutlenek węgla (próby z wodą wapienną). Czynność ta kończy się po około $2\frac{1}{2}$ do 3 godzin. W trakcie ogrzewania substancja początkowo rozpuszcza się, a następnie wydziela się ponownie biały osad.

Po tym czasie dolewa się do mieszaniny roztwór ługu sodowego, sporządzony przez rozpuszczenie 46,7 g NaOH w 114 ml wody i ogrzewa dalej do wrzenia przy ciągłym przepływie azotu przez 20 godzin, a następnie dodaje 8 g węgla aktywnego, ogrzewa jeszcze 15 minut, ochładza

i przesącza. Przesącza zakwasza się kwasem octowym lodowatym do reakcji kwaśnej na lakmus, oziębia lodem, a wydzielony osad odsącza i przemywa trzy razy po 25 ml zimnej wody.

Wilgotny jeszcze osad rozpuszcza się w roztworze ługu sodowego, otrzymanym przez rozpuszczenie 14,5 g NaOH w 570 ml wody, dodaje 8 g węgla aktywnego, miesza przez 15 minut w temp. pokojowej, a następnie sączy. Do przesącza dolewa się 285 ml etanolu, mieszaninę podgrzewa do temp. 70° i zakwasza kwasem octowym do reakcji słabo kwaśnej na lakmus. Mieszaninę ochładza się wolno, pod koniec lodem. W tych warunkach wykrystalizowuje osad w postaci blaszek. Osad ten odsącza się, przemywa trzy razy po 60 ml zimnej wody, następnie trzy razy po 40 ml zimnego etanolu absolutnego i wreszcie dwa razy po 40 ml eteru, po czym suszy w próżni.

Otrzymuje się 44,7 g tryptofanu (79% wydajności) o temp. topn. 283—285° z rozkładem.

VI. Izonitrozomalonian dwuetylowy

W kółbce okrągłej pojemności 2 l rozpuszcza się 316 g estru etylowego kwasu malonowego w 316 ml kwasu octowego lodowatego, po czym ochładza mieszaninę do temp. około +10° i w tej temperaturze wkrapla się roztwór otrzymany przez rozpuszczenie 411 g azotynu sodowego w 560 ml wody. Roztwór azotynu wprowadza się rurką sięgającą do dna kolby, przy czym wkraplanie ma się odbywać przy silnym mieszaniu tak, aby temp. mieszaniny nie przekraczała +10°.

Po wprowadzeniu całej ilości roztworu azotynu miesza się jeszcze w tej samej temperaturze w ciągu 4 godzin, a następnie ekstrahuje mieszaninę trzy razy eterem, używając kolejno 400 ml, 300 ml i 200 ml eteru. Złączone wyciągi eterowe przemywa się 10% -owym roztworem sody, aż do uzyskania reakcji obojętnej, a następnie dwa razy po 150 ml wody. Oddzieloną warstwę eterową suszy się za pomocą 100 g bezw. chlorku wapnia, po czym oddestylowuje eter z łaźni wodnej o temp. 50°, pod koniec w słabej próżni.

Ilość pozostałości wynosi około 437 g.

VII. Aminomalonian dwuetylowy

Otrzymany poprzednio surowy związek nitrozowy w ilości około 437 g rozpuszcza się w 490 ml etanolu absolutnego, roztwór przenosi do autoklawu i dodaje zawiesinę katalizatora Raney'a (38 g Ni zawieszzonego w 100 ml etanolu). Do autoklawu dopuszcza się wodór nie przekraczając początkowo ciśnienia 20—30 atm., przy końcu zaś prowadzi się redukcję

pod ciśnieniem 100 atm. Temperaturę w ciągu redukcji utrzymuje się w zakresie około 50° , przy czym czas trwania redukcji wynosi około 3 godzin.

Po tym czasie zawartość autoklawu przesącza się i z przesączu oddestylowuje etanol w próżni. Ilość produktu surowego, w postaci ciemnej oleistej cieczy, wynosi około 295 g.

VIII. Acetamidomalonian dwuetylowy

Uzyskany poprzednio surowy ester etylowy kwasu aminomalonowego w ilości około 295 g oziębia się do temp. 0° , po czym silnie mieszając wkrapla się 158 ml świeżo przedestylowanego bezwodnika kwasu octowego. W ciągu wkrapiania bezwodnika utrzymuje się temperaturę mieszaniny w granicy od 0° do $+5^{\circ}$. Po wkropleniu całej ilości bezwodnika ochładza się mieszaninę w lodówce, po 12 godzinach odsącza wykrystalizowany osad, przemywa małą ilością zimnego ksyłenu, a następnie suszy w próżni. Otrzymuje się 61 g estru etylowego kwasu acetaminomalonowego o temp. $95-97^{\circ}$.

Ług poreakcyjny zagęszcza się w próżni, przy czym, obok ksyłenu, otrzymuje się około 45 g niezużytego estru malonowego. Do gorącej pozostałości podestylacyjnej dolewa się 85 ml ksyłenu, oziębia mieszaninę w lodówce przez 12 godzin w temp. 0° , a następnie wydzielony osad odsącza, przemywa małą ilością zimnego ksyłenu i suszy w próżni.

Otrzymany produkt barwy jasno-brunatnej rozpuszcza się w gorącej wodzie, oczyszcza węglem aktywnym, sączy, oziębia i odsącza wykrystalizowany związek w ilości około 32 g.

W ten sposób otrzymuje się łącznie 93 g estru etylowego kwasu acetaminomalonowego o temp. topn. $95-97^{\circ}$ (21,6% wydajności w stosunku do estru etylowego kw. malonowego). Uwzględniając ilość zregenerowanego estru malonowego (45 g) — wydajność estru acetaminomalonowego wynosi 25%.

J. PAWEŁKIEWICZ i K. NOWAKOWSKA

PREKURSORY BIOSYNTETY NUKLEOTYDOCYJANOKOBALAMIN.**II. SYNTEZA NOWYCH POCHODNYCH WITAMINU B₁₂**

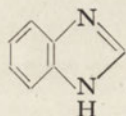
Z Zakładu Biochemii Żywności WSR w Poznaniu

Katedra Techn. Rolnej. Kierownik Katedry prof. dr J. Janicki

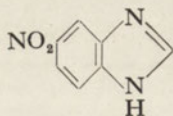
Bakterie kwasu propionowego, *Propionibacterium shermanii*, hodowane na pożywkach złożonych z hydrolizatu kazeiny lub glutenu, namoku kukurydzianego, ekstraktu drożdżowego, glikozy, fosforanów i śladów soli kobaltowych wytwarzają głównie witamin B_{12p} obok nieznacznych ilości witaminu B₁₂ (13), (14). Gdy do pożywki dodać ponadto niektórych pochodnych benzimidazolu, a mianowicie 5, 6-dwumetylo- lub 5-metylo-benzimidazolu, związki te zostają na drodze biologicznej włączone do cząsteczki kobalaminowej tworząc odpowiednio: 5,6-dwumetylobenzimidazolocyjanokobalaminę (witamin B₁₂)¹⁾ lub 5(6)-metylobenzimidazolocyjanokobalaminę. Zawartość witaminu B_{12p} spada przy tym praktycznie do zera (18), (19). Na tej drodze otrzymano po raz pierwszy większe ilości powyższych kobalamin w stanie krystalicznym. W dyskusji pracy wypowiedziano przypuszczenie, że tylko określone pochodne benzimidazolu mogą być prekursorami syntezy odpowiednich kobalamin, produkowanych przez bakterie kwasu propionowego. Celem sprawdzenia tej hipotezy przebadano dalszy szereg związków pochodnych podstawionych w pozycji 5 i 6. Badania te miały również na celu otrzymanie nowych pochodnych witaminu B₁₂, które mogłyby okazać się w dalszych badaniach biologicznych antywitaminami i tym samym posłużyć w rozwiązaniu zagadnienia roli witaminu B₁₂ w metabolizmie ustrojów żywych. Wyrażono również przypuszczenie, że te antywitamiны mogą posiadać własności carcinostatyczne (11).

Do badań użyto następujących związków: benzimidazol (I), 5-nitrobenzimidazol (II), 5 (lub 6)-nitro-6 (lub 5)-metylobenzimidazol (III), 5,6-dwunitrobenzimidazol (IV), 5-etoksybenzimidazol (V) i 5,6-imidazobenzimidazol (VI).

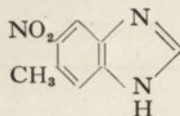
¹⁾ Otrzymany w ten sposób witamin B₁₂ przebadano w Instytucie Hematologicznym w Warszawie i stwierdzono jego kliniczną aktywność.



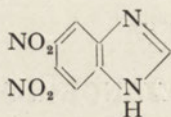
(I)



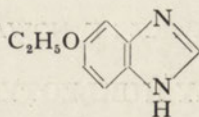
(II)



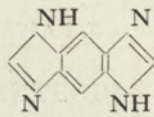
(III)



(IV)



(V)



(VI)

Wszystkie te związki udało się na drodze biosyntezy włączyć do cząsteczki kobalaminowej i odpowiednie kobalaminy otrzymać w stanie krystalicznym.

Wstępnie przebadano również benzotriazol i 2-merkaptobenzotiazol, związki o zbliżonej strukturze do benzimidazolu.

Równoległe z powyższymi pracami F o r d i współpracownicy w dwóch komunikatach donieśli o biosyntezie różnych kobalaminy przeprowadzanej przez *Bact. coli mutant* 113-3 z czynnika B i odpowiedniego prekursora (8), (9). Czynnikiem B nazwali badacze z National Institute for Research in Dairying z F o r d e m na czele jedną z kobalaminy wyodrębnioną przez nich z kału cieląt i kurcząt (10), (12). *Bact. coli mutant* potrzebujący dla swego wzrostu witaminu B₁₂ w pożywce rośnie również po dodaniu czynnika B do pożywki. W normalnych warunkach hodowli drobnoustrój ten przekształca czynnik B w inną kobalaminy, tzw. czynnik C znaleziony również w kale zwierząt i ptaków. Gdy do pożywki dodać prócz czynnika B, 5,6-dwumetylobenzimidazol lub 4,5-dwumetylo-o-fenylodwuaminę lub riboflawinę z czynnika B i dodanego prekursora, zostaje zsyntetyzowany witamin B₁₂ (5,6-dwumetylobenzimidazolocyjanokobalamina) (8). Podobnie z adeniną otrzymano pseudowitamin B₁₂ (8) (adenino-cyjanokobalaminy), związek, który został uprzednio wyizolowany przez P f i f f n e r a i innych z bakterii występujących w przewodzie pokarmowym cieląt (20). W następnym komunikacie (9) F o r d i inni stwierdzają powstanie nowych kobalaminy przy użyciu następujących prekursorów: benzimidazolu, 5,6-dwuchlorobenzimidazolu, 5-metylobenzimidazolu, 5-aminobenzimidazolu, 5-nitrobenzimidazolu, 4-chloro-1,2-benzotriazolu, benzotiazolu, 2,8-dwuchloroadeniny i 2,6-dwuaminopuryny. W czystej formie badacze ci izolowali tylko kobalaminy zawierającą benzimidazol (benzimidazolocyjanokobalaminy (19)). Również F a n t e s i O' C a l l a g h a n (7), powtarzając pracę D u l a n e y a i W i l l i a m s a (5), donieśli w formie komunikatu o otrzymaniu kry-

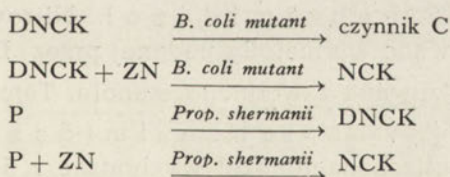
stalicznej benzimidazolocyjanokobalaminy w procesie fermentacyjnym przy użyciu szczepu *Streptomyces griseus* i o-fenylendwuaminy jako prekursora. Próby kliniczne wykazały, że jest ona aktywna w wypadkach anemii złośliwej w tym samym stopniu, co witamin B₁₂.

W międzyczasie A r m i t a g e i inni (1) udowodnili, że „czynnik B” Forda jest witaminem B₁₂ pozbawionym ugrupowania nukleotydogo w cząsteczce. W myśl powyższego reakcje biosyntezy różnych kobalamin przeprowadzanych przez *Bact. coli mutant* można tłumaczyć jako przyłączenie ugrupowania nukleotydogo do deznukleotydcyjankobalaminy²⁾.

Podobnie okazało się, że witamin B₁₂, produkowany przez badany przez nas szczep *Propionibacterium shermanii*, jest deznukleotydcyjankobalamina, a zatem jest związkiem identycznym z „czynnikiem B” Forda (15).

W ten sposób istnieje formalne podobieństwo syntez różnych nukleotydcyjankobalamin (NCK) przeprowadzanych przez *Bact. coli mutant* i *Propionibacterium shermanii*.

Natomiast zasadnicza różnica obu metod tkwi w tym, że *Bact. coli mutant* potrafi jedynie sprzęgać podane w pożywce komponenty, deznukleotydcyjankobalaminę (DNCK), będącą dla tego drobnoustroju substancją wzrostową, i zasadę nukleotydogą (ZN), wytwarzając nukleotydcyjankobalaminę (NCK). Bakterie kwasu propionowego produkujące w zwykłych warunkach DNCK potrzebują jedynie ZN do biosyntezy NCK. Różnice te ilustrują schematycznie wzory podane niżej, w których P oznacza prekursor DNCK zawarte w zwykłej pożywce:



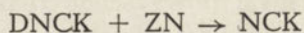
Bakterie kwasu propionowego okazały się w ten sposób wygodnym obiektem do otrzymywania większych ilości różnych nukleotydcyjankobalamin w stanie krystalicznym.

W pracy niniejszej rozpatrywano również mechanizm tworzenia się NCK przez *Propionibacterium shermanii*. Celem stwierdzenia, czy synteza

²⁾ Wg zaproponowanej uprzednio nomenklatury (19) chodzi tu o cyjanokobalaminę (płaską część cząsteczki z atomem kobaltu + grupa cyjanowa) nazywaną jednak w dalszej części pracy deznukleotydcyjankobalamina w celu niemylenia jej z ogólnie w literaturze przyjętą nazwą cyjanokobalaminy dla całej cząsteczki witaminu B₁₂.

NCK jest reakcją następczą po niezależnie od niej postępującej syntezie DNCK, dodawano prekursor (5,6-dwumetylobenzimidazol) pod koniec okresu hodowli szczepu, a zatem w chwili gdy komórki drobnoustroju zgromadziły już znaczne ilości witaminu B_{12p} (DNCK).

Analizy takich hodowli wykazały, że w komórkach bakterii kwasu propionowego, podobnie jak w *Bact. coli mutant*, zachodzi reakcja:



i że czas trwania tej reakcji w komórkach *Prop. shermanii* wynosi ok. 24 godzin.

Wstępne próby przeprowadzenia tej reakcji *in vitro* dały wynik negatywny.

Część doświadczalna

MATERIAŁY DO BADAŃ

1. B e n z i m i d a z o l — otrzymano z o-nitroaniliny. Redukcji o-nitroaniliny dokonano za pomocą cyny i kwasu solnego. Po rozcieńczeniu wodą mieszaniny reakcyjnej roztwór wysycano siarkowodorem do całkowitego wytrącenia się cyny. Osad siarczków odsączano, a klarowny roztwór chlorowodoru o-fenylendwuaminy zagęszczano w próżni do zapoczątkowania krystalizacji. Po oziębieniu odsączano kryształki na lejku piankowym, po czym bezpośrednio używano ich do syntezy benzimidazolu, którą przeprowadzano metodą Philipsa (21). Temperatura topliwości czystego związku 171°.

2. 5(lub 6)-N i t r o b e n z i m i d a z o l. Nitrową pochodną benzimidazolu otrzymywano wg metody podanej przez E f r o s a (6).

Preparat krystalizowano z wodnego etanolu. Temp. topliwości 203°.

3. 5(6)-N i t r o - 6 (5) - m e t y l o b e n z i m i d a z o l — otrzymywano podobnie jak 5-nitrobenzimidazol wychodząc z 5-metylobenzimidazolu. Preparat krystalizowano z wody. Temp. topliwości 181°. Preparat miękł już w temp. 158°.

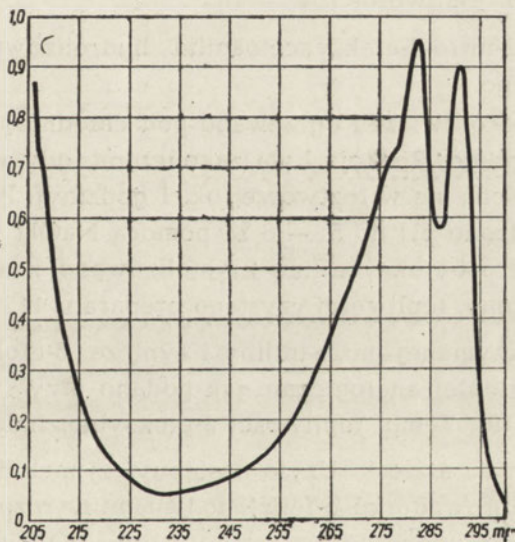
4. 5,6-D w u n i t r o b e n z i m i d a z o l. Związek ten otrzymano wg metody podanej przez E f r o s a (16), wychodząc z azotanu 5(6)-nitrobenzimidazolu lub też ogrzewając bezpośrednio 1 g benzimidazolu z mieszaniną 20 ml HNO₃ (d 1,52) i 10 ml stężonego H₂SO₄ 4 godziny pod chłodnicą zwrotną. Temp. topliwości czystego produktu 187 — 189° (E f r o s a podaje 186°).

5. 5,6-I m i d a z o b e n z i m i d a z o l. Związek ten otrzymano redukując cyną i kwasem solnym 5,6-dwunitrobenzimidazol i kondensując

otrzymaną pochodną dwuaminową z kwasem mrówkowym wg metody Phillipsa (21).

E f r o s (6) syntetyzując imidazobenzimidazol ogrzewał 5,6-dwuaminobenzimidazol z kwasem mrówkowym w 15% HCl w zatopionej rurze w temp. 180° w ciągu 1 godziny.

W naszej pracy przekonałiśmy się, że nie trzeba używać tak drastycznych warunków reakcji do utworzenia drugiego pierścienia imidazolowego. Już kilkuminutowe ogrzewanie w temperaturze wrzenia chlorowodoru dwuaminobenzimidazolu z kwasem mrówkowym w roztworze HCl powoduje powstanie imidazobenzimidazolu. Po oziębieniu roztworu krystalizuje w pięknych igłach trudno rozpuszczalny chlorowodorek tego związku. Oczyszczano go dodatkowo za pomocą węgla aktywnego, a wolny imidazobenzimidazol wytrącano z roztworu amoniakiem.



Rys. 1. Widmo absorpcyjne 5,6-imidazobenzimidazolu w roztworze 0,1 N HCl

Czysty związek nie topi się poniżej 330°. Posiada on bardzo charakterystyczne widmo absorpcyjne w ultrafiolecie (rys. 1), typowe dla pochodnych benzimidazolu, lecz z przesuniętymi pasmami absorpcji w kierunku fal dłuższych w porównaniu do benzimidazolu lub pochodnych 5-metylo- lub 5,6-dwumetylo-benzimidazolu. Maksima absorpcji: 282 i 290,5 mμ, w 0,1 N HCl i 292 i 295 mμ w roztworze alkalicznym.

6. 5-E t o k s y b e n z i m i d a z o l — otrzymano z p-fenacetyny na drodze następujących przemian: p-fenacetyna → 2-nitro-4-etoksyacetani-

lid → 2-nitro-4-etoksyanilina → 4-etoksy-1,2-dwuaminobenzen → 5(6)-etoksybenzimidazol.

Nitrowanie p-fenacetyny przeprowadzano w bezwodnym kwasie octowym dymiącym kwasem azotowym wg następującej metody:

5 g fenacetyny rozpuszczano w 30 ml lodowatego kwasu octowego w temp. ok. 50°. Po ostudzeniu do temperatury 18° dodawano kroplami stale mieszając próbę 4 ml roztworu dymiącego kwasu azotowego (d 1,52) w bezw. kwasie octowym (1:1 v/v). Proces nitrowania przeprowadzano w ten sposób, by temperatura mieszaniny reagującej wahała się w granicach 20 — 25°. Po wkropleniu całej mieszaniny nitrującej ciecz pozostawiono na 1½ godziny w spokoju, a następnie wlewano ją do wody z lodem (ok. 200 ml). Wytrącony osad odsączano na lejku piankowym, po czym przekrystalizowywano z gorącego etanolu. Produkt suszono na powietrzu. Temp. topliwości 104 — 105°.

Utworzony 2-nitro-4-etoksyacetoanilid hydrolizowano w roztworze kwasu siarkowego.

W tym celu 5 g związku ogrzewano pod chłodnicą zwrotną z 25 ml 40% kw. siarkowego. Reakcja była zakończona, gdy wszystkie acetylo-pochodna rozpuściła się w roztworze (ok. 1 godziny). Po ostudzeniu roztworu doprowadzono pH do 5 — 6 za pomocą NaOH i wytrącony osad odsączano. 2-nitro-4-etoksyanilinę krystalizowano z etanolu i suszono na powietrzu. Temp. topliwości czystego preparatu 113°.

Redukcję otrzymanej nitroaniliny i syntezę 5-etoksybenzimidazolu przeprowadzono dalej analogicznie jak podano przy syntezie 5-metylobenzimidazolu (19). Temp. topliwości 5-etoksybenzimidazolu 116°.

7. B e n z o t r i a z o l. Użyto następującej metody syntezy benzotriazolu: 1 g chlōrowodorku o-fenylendwuaminy rozpuszczono w 5 ml 0,4N HCl i szybko wiano do roztworu 0,4 g NaNO₂ w 5 ml wody. Mieszaninę reakcyjną ogrzano do 80° i w tej temperaturze utrzymywano 15 minut. Następnie dodano roztworu octanu sodu, by pH podniosło się do wartości ok. 5, i roztwór pozostawiono w lodówce do pełnego wytrącenia się benzotriazolu. Osad odsączano na lejku piankowym, przemyto wodą, po czym rozpuszczono w etanolu. Roztwór etanolowy odbarwiono węglem, etanol odparowywano do sucha i surowy benzotriazol 2 razy destylowano w próżni. Temp. topliwości 95,5°.

8. 2-M e r k a p t o b e n z o t i a z o l. Do badań użyto preparatu handlowego fmy Schuchardt o temp. topliwości 175° (wg literatury 177 — 179°).

HODOWLA BAKTERII KWASU PROPIONOWEGO

Do badań użyto szczepu *Propionibacterium shermanii* otrzymanego z Zakładu Mikrobiologii WSR w Olsztynie i przechowywanego w stanie zliofilizowanym, stosując technikę hodowli opisaną uprzednio (14). Hodowle przeprowadzono na pożywce o składzie: 120 ml kwasowego hydrolizatu kazeiny lub glutenu (14), 5 g ekstraktu drożdżowego³⁾, 2,5 g namoku kukurydzianego, 4,5 g fosforanu jednopotasowego, 1 ml 1% roztworu siarczanu kobaltowego, 20 g glikozy technicznej, 880 ml wody wodociągowej. Fosforan jednopotasowy rozpuszczano najpierw w wodzie i dodawano roztworu KOH aż do uzyskania roztworu buforowego o pH 7.

METODA BADANIA PREKURSORÓW

W pracy niniejszej zastosowano analogiczną metodę badania prekursorów, jak podano w poprzedniej publikacji (19), polegającą na wyodrębnieniu utworzonych kobalaminy z 1-litrowych hodowli *Propionibacterium shermanii* i badaniu widm absorpcyjnych otrzymanych koncentratów.

Zmieniono jedynie sposób otrzymywania koncentratów kobalaminy. Stosowano następującą metodę: z 1-litrowej hodowli odwirowywano bakterie kwasu propionowego, po czym osad bakteryjny zawieszano w ca 200 ml wody. Suspensję tę zakwaszono 0,5 N kwasem siarkowym do pH 3 i ogrzewano 10 minut w temperaturze 60°. Po ostudzeniu dodawano 0,5 ml 10% roztworu cyjanku sodowego i nasyconego roztworu węglanu sodowego do pH 8. Alkaliczny płyn wirowano i klarowny centrifugat (ca 200 ml) zadawano 50 g chlorku sodowego. Po rozpuszczeniu soli ekstrahowano kobalaminy 4 — 6 razy po 20 ml alkoholem benzylovym. Połączone ekstrakty wirowano celem usunięcia zemulgowanej fazy wodnej z alkoholu benzylovego i klarowny roztwór zadawano równą objętością chloroformu. Z mieszaniny ekstrahowano kobalaminy małymi porcjami wody. Połączone wyciągi wodne ekstrahowano jeden raz 1/2 obj. chloroformu celem usunięcia śladów alkoholu benzylovego i zadawano je 1 — 2 ml 1 M NaH₂PO₄, by obniżyć pH roztworu do wartości 6,0 — 6,5. Tak przygotowany wodny roztwór ekstrahowano roztworem o-krezolu w chloroformie (1:1 v/v) stosując do ekstrakcji 0,1 — 0,2 objętości mieszaniny na objętość roztworu wodnego. Ekstrakcję przeprowadzano małymi porcjami, tak by użyta objętość wystarczała do ilościowego usunięcia kobalaminy z fazy wodnej. Połączone ekstrakty krezolowe zadawano 1/2 objętości chloroformu i fazę organiczną prze-

³⁾ Ekstrakt drożdżowy otrzymano z Nadodrzańskich Zakładów Przemysłu Drożdżowego w Szczecinie. Najlepszy okazał się ekstrakt otrzymywany z drożdży browarnianych dolnej fermentacji plazmolizowanych siarczanem amonowym.

mywano małą ilością wody. Gdy w trakcie przemywania część kobalaminy przeszła do wody, ekstrahowano ją ponownie małymi porcjami mieszaniny krezolu i chloroformu. Następnie do tego wyciągu dodawano 1 objętość mieszaniny chloroformu i n-butanolu (1:1 v/v) i kobalaminy ekstrahowano kilka razy małymi porcjami wody. Wodny wyciąg kobalaminy, dostatecznie czysty do badań widmowych, ekstrahowano dodatkowo 3 razy chloroformem (po 0,5 obj. fazy wodnej) celem usunięcia śladów o-krezolu, po czym odparowywano go pod zmniejszonym ciśnieniem na łaźni wodnej do sucha. Suchą pozostałość rozpuszczano w odpowiedniej ilości wody i badano widmo absorpcyjne roztworu w zakresie 260 — 600 m μ . W próbie kontrolnej, bez dodatku prekursora lub w wypadku niewiązania prekursora, powstawał witamin B_{12p} (deznukleotydocyjanokobalamina) charakteryzujący się maksimumami absorpcji dla fal o długościach 355 i 500 m μ (i słabym maksimum dla 525 — 30 m μ). W wypadku utworzenia nukleotydocyjanokobalaminy pojawiały się maksima dla fal o długościach 360 — 62 i 550 m μ .

Sposób przygotowania koncentratu stosowany w niniejszej pracy okazał się praktyczniejszy i szybszy od stosowanego uprzednio (19). Stosowana metoda okazała się również praktyczna dla spektrofotometrycznego, ilościowego oznaczania różnych kobalaminy. W metodzie ilościowej stężenie badanej kobalaminy opierano na pomiarze wartości absorpcji dla fali o długości 550 m μ (lub 498 m μ dla DNCK).

Zastosowany tu sposób ekstrakcji krezolowo-butanolowej oparto na pracy Bachera i innych (2).

Dodatkowo kontrolowano powstawania nowych nukleotydocyjanokobalaminy metodą elektroforezy bibułowej. W tym celu na paski bibuły chromatograficznej Whatman nr 4 lub, dla rozdzielania większych ilości kobalaminy, bibuły Whatman nr 3 nanoszono zagęszczony koncentrat, po czym rozdzielano zawarte w nim kobalaminy elektroforetycznie według metody Holdswortha (12), stosując jako elektrolit 2 N kwas octowy, zawierający 0,01% cyjanku sodu. Rozdzielenie było kompletne po 6 — 8 godzinach przy gradience napięcia ok. 9 V/cm i poziomym ułożeniu bibuły. Witamin B_{12p} wędrował ku katodzie przesuwając się ok. 10 cm od miejsca startu. Obojętne kobalaminy przesuwały się w tym czasie ok. 2 — 3 cm wskutek zjawisk elektroosmozy.

IZOLOWANIE NUKLEOTYDOCYJANOKOBALAMIN

Celem izolowania utworzonych NCK posługiwano się metodą opisaną uprzednio (19), (16).

Posługiwano się również następującymi modyfikacjami wyodrębnienia krystalicznych związków:

(a). Przygotowywano koncentrat kobalamin, jak podano wyżej przy opisie metody badania prekursorów. Wodny koncentrat ekstrahowano następnie kilka razy 20% roztworem fenolu w chloroformie. Połączone wyciągi sączono do kolbki destylacyjnej, a sączek przemywano małą ilością roztworu fenolowego. Z mieszaniny odpędzono chloroform pod zmniejszonym ciśnieniem w łaźni wodnej o temp. 80°. Roztwór fenolowy zadawano w rozdzielaczu 8 — 10 objętościami eteru i kobalaminy ekstrahowano małymi porcjami wody. Z ekstraktów wodnych usuwano ślady fenolu za pomocą eteru i wodny roztwór odparowywano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Suchą pozostałość rozpuszczano w małej objętości metanolu (1 — 2 ml) i roztwór chromatografowano na kolumnie z tlenkiem glinu. Tlenek glinu przygotowywano, jak podano uprzednio (16). Dobry okazał się również tlenek glinu wg Brockmanna, zakwaszony uprzednio do pH 6. Metanolowy eluat odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem do sucha i kobalaminy krystalizowano w zwykły sposób z wodnego acetonu. Metodą tą otrzymano 5(6)-etoksybenzimidazolocyjanokobalaminy.

(b). Zawiesinę wodną bakterii ogrzewano 10 minut w temp. 60° przy pH 3. Po ostudzeniu ciecz alkaliczowano nasyc. roztworem Na_2CO_3 , po czym dodawano 0,1 ml 10% roztworu NaCN. Ciecz wirowano i klarowny cetryfugat zakwaszono 0,5 N H_2SO_4 do pH 5 — 6. Teraz dodawano 5 g kryst. octanu cynku na litr roztworu i ponownie alkaliczowano NaOH do pH 8 (2). Wytrącony osad odwirowywano, przemywano małą ilością wody i klarowną ciecz zakwaszono kwasem siarkowym do pH 5 — 6. Następnie kobalaminy ekstrahowano roztworem o-krezolu w chloroformie, jak opisano wyżej. Wodny wyciąg alkaliczowano roztworem NaCN do pH 8, wysycano chlorkiem sodowym 25 g/100 ml, po czym po 1 godzinie ekstrahowano 4 — 6 razy małymi porcjami alkoholu benzylowego. Połączone wyciągi alkoholowe wirowano, klarowny roztwór zadawano równą objętością chloroformu, a kobalaminy ponownie przenoszono do fazy wodnej. Wodny roztwór kobalamin ekstrahowano 20% roztworem fenolu w chloroformie i postępowano dalej jak w metodzie (a). Metody tej użyto do otrzymania 5,6-dwunitrobenzimidazolocyjanokobalaminy.

(c). Po uzyskaniu wodnego koncentratu po ekstrakcji krezolowo-butanolowej jak w metodzie (b) — roztwór odparowywano do małej objętości, po czym nanoszono w formie wąskiego paska na bibułę chromatograficzną Whatman nr 3 i poddawano elektrofotoretycznemu rozdzielaniu w 2 N CH_3COOH z 0,01% NaCN.

5,6-Imidazobenzimidazolocyjanokobalamina, którą oczyszczano w ten sposób, wędruje razem z witaminem B_{12p} , pojawiającym się w małych

ilościach w niektórych badanych fermentacjach ku katodzie, oddzielając się od innych kobalamin, występujących w mniejszych ilościach w próbie. Po wysuszeniu bibuły wycinano pasmo zawierające mieszaninę wit. B_{12p} i 5,6-imidazobenzimidazocyjanokobalaminę i ekstrahowano wodą zawierającą 0,1 ml 10% NaCN i 1 ml 2 M NaH₂PO₄ w 100 ml (pH 5 — 6). Następnie celem usunięcia soli mineralnych ponownie poddawano kobalaminę ekstrakcji krezolowo-butanolowej. Uzyskany wodny koncentrat odparowywano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. By rozdzielić obie kobalaminę od siebie, zastosowano metodę dającą dobre wyniki przy rozdzielaniu witaminu B₁₂ i B_{12p} (14). W tym celu suchą pozostałość rozpuszczano w 85% acetonie (v/v) i chromatografowano na Al₂O₃. Witamin łatwo przechodzi w tych warunkach do eluatu, a NCK zatrzymują się u góry kolumny chromatograficznej. Po wypłukaniu witaminu B_{12p} NCK można wyeluować metanolem lub 80% metanolem (dla pochodnej 5,6-imidazobenzimidazolowej). Po odpędzeniu metanolu NCK krystalizowano z wodnego acetonu.

Wszystkie otrzymane w tej pracy preparaty krystalizowano co najmniej dwa razy. Otrzymano po 5 — 15 mg krystalicznych kobalamin z 10 — 40-litrowych hodowli.

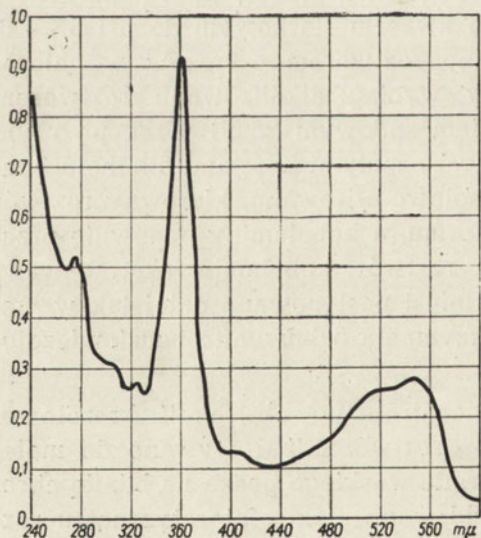
WŁASNOSCI OTRZYMANYCH POCHODNYCH WITAMINU B₁₂

W pracy niniejszej otrzymano w stanie krystalicznym następujące nukleotydocyjanokobalaminę: benzimidazolo-, 5(6)-nitrobenzimidazolo-, 5(6)-nitro-6(5)-metylobenzimidazolo-, 5,6-dwunitrobenzimidazolo-, 5-etoksybenzimidazolo- i 5,6-imidazobenzimidazolo-cyjanokobalaminę.

Nadto metodą elektroforezy bibułowej dało się wykazać, że również benzotriazol i 2-merkaptobenzotiazol są częściowo wykorzystywane przez *Propionibacterium shermanii* do syntezy odpowiednich kobalamin.

Wszystkie krystaliczne związki krystalizują w postaci ciemnoczerwonych igieł, podobnie jak witamin B₁₂.

Widma absorpcyjne wodnych roztworów tych związków są zbli-



Rys. 2. Widmo absorpcyjne benzimidazolo-cyjanokobalaminę w roztworze wodnym

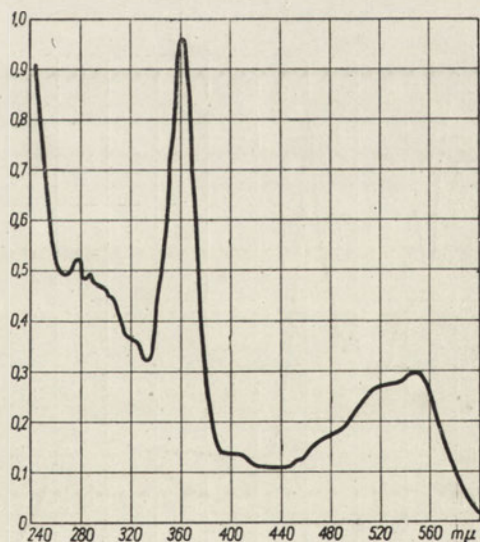
żone do widma absorpcyjnego witaminu B₁₂ i wszystkie posiadają charakterystyczne maksima absorpcji dla fal o długości 360 — 362 i 550 m μ . Jednak w widmach poszczególnych NCK wyraźnie zaznacza się wpływ podstawianej zasady nukleotydowej na kształt krzywej pochłaniania. Najbardziej zbliżone do widma absorpcyjnego witaminu B₁₂ jest widmo benzimidazolocyjanokobalaminy (rys. 2). Posiada ono nieznacznie przesunięte ku krótszym falom maksimum przy 274 m μ zamiast 278 m μ jak witamin B₁₂. Przesunięcie to jest uwarunkowane podobnym przesunięciem maksimów absorpcji benzimidazolu w porównaniu z 5,6-dwumetylobenzimidazolem, co ilustruje poniższa tabelka.

Tablica 1
Maksima pochłaniania w m μ

	pH 1	pH 13
benzimidazol	267 i 273,5	271 — 2 i 276,5
5,6-dwumetylobenzimidazol	274 — 6 i 283	280 i 285

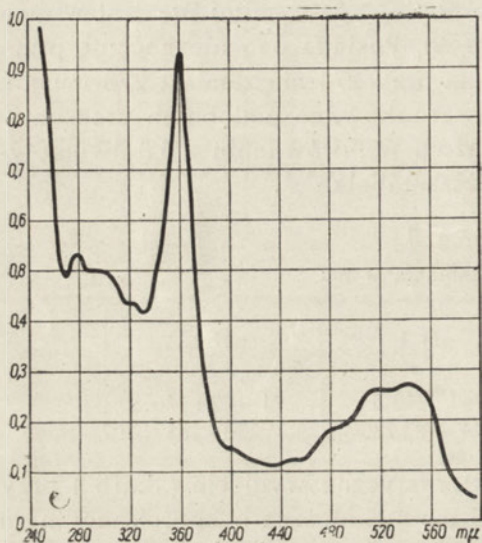
Zaznacza się w nim również charakterystyczne wygięcie („karb”) przy 280 m μ (w witaminie B₁₂ przy 288,5 m μ świadczące o koordynacyjnym wiązaniu między atomem azotu N₍₃₎ pierścienia benzimidazolowego i atomem kobaltu (3).

Widma absorpcyjne 5(6)-nitro- oraz 5(6)-nitro-6(5)-metylo-benzimidazolocyjanokobalaminy (rys. 3 i 4) są zbliżone do siebie i zmienione w porównaniu do widma witaminu B₁₂, zwłaszcza w zakresie fal między 270 i 333 m μ . Wprowadzenie nukleotydu 5,6-dwunitrobenzimidazolowego do cząsteczki DNCK zaznacza się zarówno w widzialnej, jak i ultrafioletowej części widma (rys. 5). W części widzialnej pojawia się mało charakterystyczny szeroki pas absorpcyjny między 400 i 480 m μ . Z tej przyczyny roztwór dwunitrobenzimidazolocyjanokobalaminy posiada barwę brązowawoczerwoną. W części ultrafioletowej wid-

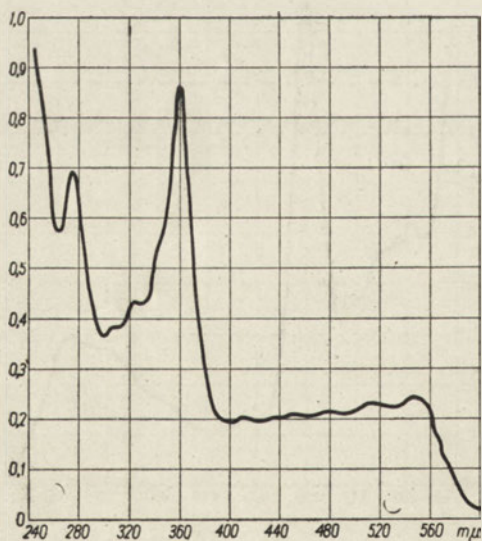


Rys. 3. Widmo absorpcyjne 5(6)-nitrobenzimidazolocyjanokobalaminy w roztworze wodnym

ma zaznacza się duże podobieństwo do widma DNCK, zwłaszcza w zakresie 290 — 340 m μ z nieznacznie przesuniętymi maksimami: 307 — 8 i 324 — 5 m μ (DNCK posiada przy 305 m μ przegięcie i przy 320 m μ maksimum (14)). Bardzo duże zmiany spostrzega się w widmach



Rys. 4. Widmo absorpcyjne 5(6)-nitro-6(5)-metylo-benzimidazocyjanokobalaminy w roztworze wodnym



Rys. 5. Widmo absorpcyjne 5,6-dwunitrobenzimidazocyjanokobalaminy w roztworze wodnym

pochodnych 5-etoksybenzimidazolu i 5,6-imidazobenzimidazolu (rys. 6 i 7), w których wprowadzony chromofor zasadniczo zmienia charakterystyczny w części ultrafioletowej obraz widma. Odnosi się to zwłaszcza do ostatniej pochodnej, w której w porównaniu do widma absorpcyjnego wit. B₁₂ pojawia się dodatkowe, bardzo silne pasmo absorpcji z maksimum przy 291 — 292 m μ , charakterystyczne dla samego 5,6-imidazobenzimidazolu (zwłaszcza w wysokich wartościach pH (rys. 1)).

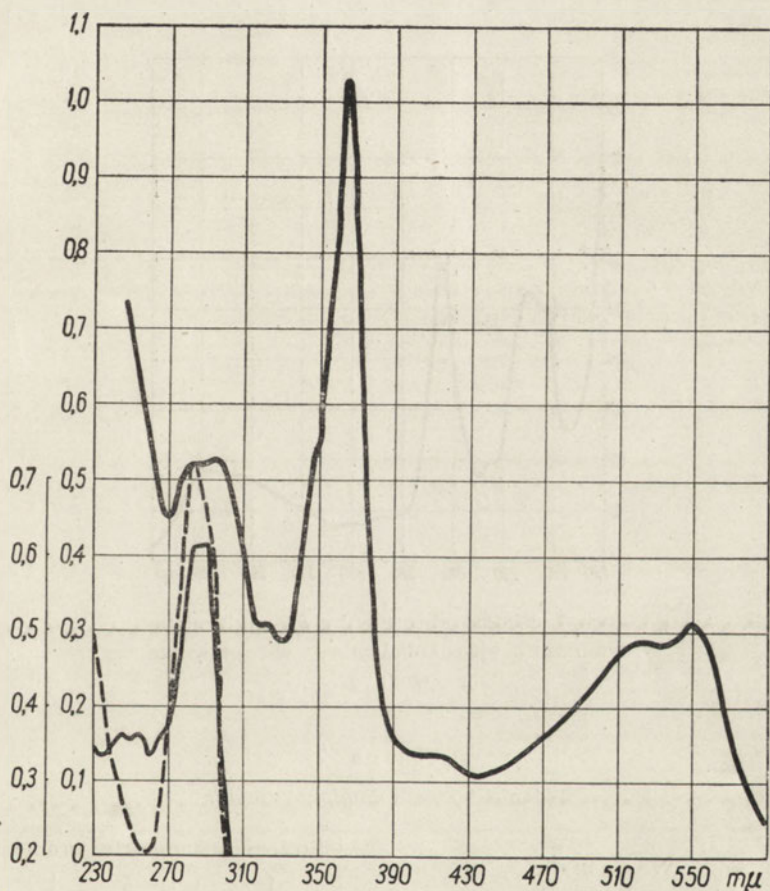
Obecność nowych pasm absorpcyjnych w widmach otrzymanych NCK jest pośrednim dowodem włączenia się omawianych zasad nukleotydowych do tych związków.

Otrzymane NCK, prócz 5,6-imidazobenzimidazolo-cyanokobalaminy, zachowywały się elektroforetycznie jak substancje obojętne (w 2 N kw. octowym). Ostatnia pochodna z racji występowania w niej zasadowego azotu posiadała charakter zasadowy i przesuwiała się w kwaśnym roztworze ku katodzie.

Wszystkie otrzymane w stanie krystalicznym NCK reagują z roztworem chloraminy T dając, podobnie jak witamin B₁₂, fioleto-

wo zabarwione chlorowe pochodne (19). Deznukleotydocyjanokobalami-
na (wit. B_{12p}) ulega w tych warunkach odbarwieniu. Pochodne zadane
roztworem NaCN przechodzą w niebiesko zabarwione związki.

Otrzymane krystaliczne pochodne witaminu B₁₂ okazały się aktywne
w badaniach mikrobiologicznych wobec *Euglena gracilis* i *Bact. coli*
mutant.

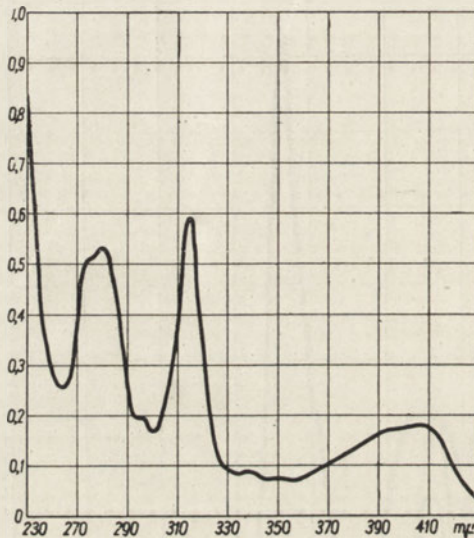


Rys. 6. Widmo absorpcyjne 5-etoksybenzimidazocyjanokobalami-
ny w roztworze wodnym

Badania z *Euglena gracilis* wykonał dr K. Z o d r o w w Zakładzie
Mikrobiologii Rolnej WSR w Poznaniu, za co składamy mu serdeczne
podziękowania.

Tablica 2 przedstawia wyniki tych badań. Liczby w tabeli podają
wartości procentowej przepuszczalności światła badanych hodowli mie-
rzone na fotoelektrycznym fotometrze Leitza przy użyciu czerwonego
filtru. Zebrane wyniki są średnimi z 3 równoległych oznaczeń.

Czynność mikrobiologiczną za pomocą szczepu *Bact. coli mutant* badano metodą płytkową (4). Miarą aktywności była powierzchnia strefy wzrostu lub proporcjonalna do niej waga wykrojonych z kalki technicznej uprzednio na niej skopiowanych plam wzrostowych. W tabelicy 3 podano wyniki oznaczeń za pomocą *Bact. coli mutant*. Wartości podają wagę krążków w mg.



Rys. 7. Widmo absorpcyjne 5,6-imidazobenzimidazolocyjanokobalaminy w roztworze wodnym

Tablica 2

Badanie wzrostu *Euglena gracilis*

Witamin	Stężenie witaminu w próbie $\mu\text{g/ml}$		
	1	5	50
Benzimidazolo-CK	92*	70	37
5(6)-Nitrobenzimidazolo-CK	92	77	35
5(6)-Nitro-6(5)-metylobenzimidazolo-CK	87	68	36
5,6-Dwunitrobenzimidazolo-CK	86	65	34
5-Etoksybenzimidazolo-CK	87	65	33
5,6-Imidazobenzimidazolo-CK	91	71	34
Witamin B ₁₂	86	65	35
Kontrola (bez witaminu) 96			

*) Liczby oznaczają wartości procentowej przepuszczalności światła badanych hodowli, mierzone na fotoelektrycznym fotometrze Leitza.

W doświadczeniach mikrobiologicznych stężenie badanych NCK określano metodą spektrofotometryczną mierząc wartości gęstości optycznych roztworów podstawowych, z których wykonywano dalsze rozcieńczenia, dla fali o długości 550 m μ . Zakładano przy tym, że dla wszystkich NCK wartość współczynnika ekstynkcji $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ jest jednako-
wa i równa 63 jak dla witaminu B₁₂ (21).

Tablica 3
Wzrost *Bact. coli mutant*

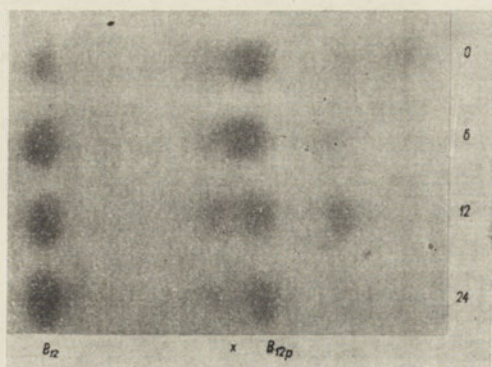
Witamin	Stężenie witaminu w $\mu\text{g/ml}$		
	0,1	0,5	1,0
Benzimidazolo-CK	4,8*	8,6	12,4
5(6)-Nitrobenzimidazolo-CK	4,2	8,8	10,0
5(6)-Nitro-6(5)-metylobenzimidazolo-CK	5,5	9,6	14,9
5,6-Dwunitrobenzimidazolo-CK	5,0	8,4	11,0
5-Etoksybenzimidazolo-CK	5,4	10,4	14,1
5,6-Imidazobenzimidazolo-CK	4,1	6,9	8,8
Witamin B ₁₂	5,5	8,0	9,5

*) Liczby oznaczają wagę w mg wykrojonych z kalki technicznej plam wzrostowych.

**BADANIE MECHANIZMU SYNTETY NCK PRZEZ
*PROPIONIBACTERIUM SHERMANII***

Do 3 jednakowych ośmiodniowych 1-litrowych hodowli bakterii kwasu propionowego dodawano na 24, 12 i 6 godzin przed przerwaniem procesu fermentacji po 5 mg 5,6-dwumetylobenzimidazolu. Czwarta hodowla stanowiła próbę zerową. Z komórek drobnoustroju wyodrębniono kobalaminy wg metody opisanej przy badaniu prekursorów, po czym rozdzielano je elektroforetycznie na bibule Whatman nr 3 w 2 N kwasie octowym zawierającym 0,01% NaCN i przy gradiencie napięcia 9 V/cm. Rozdzielone plamy witaminów B₁₂ i B_{12p} wycinano z wysuszonej bibuły i witaminy ekstrahowano 6 ml 3% roztworu NaCN. W uzyskanych koncentratkach określano stężenie kobalamin na podstawie pomiaru gęstości optycznej dla fali o długości 368 m μ . Pomiar wykonywano po pełnym przekształceniu się obu kobalamin w formy dwucyjanowe.

Rys. 8 przedstawia zdjęcie rozdzielonych na bibule kobalamin. Wszystkie próby prócz wit. B₁₂ i B_{12p} wykazują obecność innych jeszcze kobalamin występujących w mniejszych ilościach. Identyfikacja niektórych z nich będzie przedmiotem odrębnej publikacji. Liczby na zdjęciu oznaczają czas działania prekursora w godzinach. Na rysun-



Rys. 8. Elektroforogram rozdzielonych kobalaminy wyodrębnionych z bakterii kw. propionowego (wit. B₁₂, B_{12p} i X). Liczby z boku zdjęcia oznaczają czas działania prekursora w godzinach

długości 368 m μ i że ich suma równa jest 100.

ku widać również, że zawartość trzeciej kobalaminy (X) występującej we wszystkich próbach zmniejsza się również na korzyść witaminu B₁₂ proporcjonalnie do czasu działania prekursora.

Tablica 4 przedstawia wyniki stosunku zawartości witaminu B_{12p} i witaminu B₁₂ w poszczególnych próbach, obliczone na podstawie danych spektrofotometrycznych przy założeniu, że współczynniki ekstynkcji obu związków są jednakowe dla fali

Tablica 4

Stosunek zawartości wit. B_{12p} do wit. B₁₂

Czas działania prekursora w godz.	Witamin B _{12p}	Witamin B ₁₂
0	87,8	12,2
6	67,2	32,8
12	38,3	61,7
24	14,4	85,6

Z danych tablicy 4 wynika, że reakcja powstawania NCK jest reakcją następczą w stosunku do reakcji tworzenia się DNCK i że czas trwania reakcji przekształcania się witaminu B_{12p} w witamin B₁₂ wynosi co najmniej 24 godziny w końcowym stadium fermentacji.

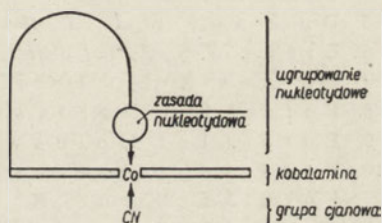
Omówienie wyników

Doświadczenia przedstawione w tej pracy potwierdzają dane uprzednie (19), że użyty do badań szczep *Propionibacterium shermanii* posiada ograniczoną zdolność syntezy pierścienia benzimidazolowego, potrzebnego do budowy ugrupowania nukleotydowego witaminu B₁₂. Natomiast posiada on zdolność wykorzystywania z pożywki szeregu pochodnych benzimidazolu, podstawionego różnymi rodnikami w pozycji 5 i 6 do syntezy odpowiednich nukleotocyjanokobalaminy. Mechanizm

tej syntezy polega na wbudowaniu ugrupowania nukleotydowego — z benzimidazolem lub jego pochodnymi jako zasadami nukleotydowymi — do deznukleotocyjanokobalaminy, związku syntetyzowanego przez bakterie kwasu propionowego w normalnych warunkach hodowli. Jest to reakcja następcza w stosunku do tworzenia się deznukleotocyjanokobalaminy.

Wszystkie otrzymane w pracy pochodne witaminu B₁₂ są mikrobiologicznie czynne zarówno wobec *Bact. coli mutant*, drobnoustroju wymagającego do wzrostu tylko DNCK (9), jak i wobec *Euglena gracilis*. Wydaje się, że większość nukleotocyjanokobalaminy typu benzimidazolowego stanowi substancje wzrostowe dla tego pierwotniaka.

W pracy niniejszej posługiwano się nomenklaturą uprzednio już zaproponowaną (19). W myśl tej nomenklatury nazywano kobalaminą tylko płaską część cząsteczki witaminu B₁₂ zawierającą atom kobaltu (rys. 9). Ogólna nazwa nukleotocyjanokobalamina oznacza połączenie kobalaminy z ugrupowaniem nukleotydowym i grupą cyjanową. W nazwie szczegółowej zamiast pełnej nazwy nukleotydu używano dla uproszczenia tylko nazwy zasady nukleotydowej.



Rys. 9. Schemat budowy nukleotocyjanokobalaminy

Streszczenie

1. Kontynuując badania nad biosyntezą pochodnych witaminu B₁₂ (nukleotocyjanokobalaminy NCK) przy użyciu *Propionibacterium shermanii*, otrzymano 6 dalszych nowych związków zawierających w miejsce 5,6-dwumetylobenzimidazolu, występującego w witaminie B₁₂, następujące zasady nukleotydowe: benzimidazol, 5-nitrobenzimidazol, 5(6)-nitro-6(5)-metylobenzimidazol, 5,6-dwunitrobenzimidazol, 5-etoksybenzimidazol i 5,6-imidazobenzimidazol. Wszystkie te pochodne otrzymano w stanie krystalicznym. Ponadto stwierdzono, że bakterie kwasu propionowego także włączają benzotriazol i 2-merkaptobenzotiazol do cząsteczki kobalaminowej.

2. Otrzymane krystaliczne nukleotocyjanokobalaminy przebadano pod względem fizyko-chemicznym oraz mikrobiologicznie. Okazały się czynne wobec *Bact. coli mutant* (metoda płytkowa) i *Euglena gracilis*.

3. Wykazano, że reakcja powstawania NCK jest reakcją następczą, przebiegającą po utworzeniu się deznukleotocyjanokobalaminy (wita-

minu B_{12p}) i że czas trwania tej reakcji wynosi co najmniej 24 godziny w końcowym stadium fermentacji w obecności 5,6-dwumetylobenzimidazolu.

LITERATURA

1. Armitage J. B., Cannon J. R., Johnson A. W., Parker L. F. J., Smith L. E., Stafford W. H. i Tood A. R., *J. Chem. Soc.*, 3849, 1953.
2. Bacher F. A., Boley A. E. i Shonk C. E., *Anál. Chem.*, **26**, 1146, 1954.
3. Beaven G. H., Holiday E. R., Johnson E. A., Ellis B. i Petrow V., *J. Pharm. Pharmacol.*, **2**, 944, 1950.
4. Bogucka J., Iwanowska J. i Kąkol H., *Przemysł Chem.*, **9**, **14**, 512, 1953.
5. Dulaney E. L. i Williams P. L., *Mycologia*, XLV, **3**, 345, 1953.
6. Efros P. S., *Żurnal obszczej chemii* **22**, 1008, 1952.
7. Fantès K. H. i O'Callaghan C. H., *Biochem. J.* **58**, XXI, 1954.
8. Ford J. E. i Holdsworth E. S., *Biochem. J.*, **56**, XXXV, 1954.
9. Ford J. E. i Holdsworth E. S., *Biochem. J.*, **58**, XXI, 1954.
10. Ford J. E. i Porter J. W. G., *Biochem. J.* **51**, V, 1952,
Ford J. E., Kon S. K. i Porter J. W. G., *Biochem. J.*, **50**, IX, 1951,
52, VIII, 1952, *Chem. and Indust.*, 495, 1952.
11. Heinrich H. C. i Laham H., *Ztschr. Vitamin. Hormon-Ferm. forsch.*, **6**, 126, 1954.
12. Holdsworth E. S., *Nature*, **171**, 148, 1953.
13. Janicki J. i Pawełkiewicz J., *Bull. Acad. Polon. Sc.*, Cl. II, **3**, 5, 1955.
14. Janicki J. i Pawełkiewicz J., *Acta Biochim. Pol.* **1**, 307, 1954.
15. Janicki J. i Pawełkiewicz J., *Acta Biochim. Pol.*, **2**, 329, 1955.
16. Janicki J., Pawełkiewicz J., Stawicki St., Szepietko K. i Zdrow K., *Przem. Chem.*, **9**, 385, 1953.
17. Kaczka E. A., Donald E. W., Kuehl F. A. i Folkers K., *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 3569, 1951.
18. Pawełkiewicz J., *Bull. Acad. Polon. Sc.*, Cl. II, **3**, 3, 1955.
19. Pawełkiewicz J., *Acta Biochim. Pol.*, **1**, 313, 1954.
20. Pfiffner J. J., Calkins D. G., Peterson R. C., Bird O. D., McGlohon V. i Stipek R. W., *Abstracts 120-th Amer. Chem. Soc. Meeting N. Y.* 23c, 1951.
Dion H. W., Calkins D. G. i Pfiffner J. J., *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 1108, 1952.
21. Phillips J., *J. Chem. Soc.*, 2393, 1928.

ПРЕДШЕСТВЕННИКИ БИОСИНТЕЗА НУКЛЕОТИДОЦИАНКОБАЛАМИНА II.

Резюме

1. В результате проводимых нами исследований над биосинтезом производных витамина B₁₂ (нуклеотидоцианкобаламина NCK) с при-

менением *Propionibacterium shermanii*, получено было в следующих новых соединениях, содержащих вместо 5,6-диметилбензимидазола, входящего в состав витамина В₁₂, следующие нуклеотидные щелочи: Бензимидазол, 5-нитробензимидазол, 5(6)-нитро-6(5)-метилбензимидазол, 5,6-двинитробензимидазол, 5-этоксibenзимидазол и 5,6-имидазобензимидазол. Все эти производные получены были в кристаллическом состоянии. Кроме того обнаружено, что бактерии пропионовой кислоты включают также в кобаламиновую частицу бензотриазол и 2-меркаптобензомидазол.

2. Исследованы были физико-химические и микробиологические свойства при полученных кристаллических нуклеотицианкобаламинов. Они оказались активными по отношению к *Bact. coli mutant* (пластичный метод) и *Euglena gracilis*.

3. Обнаружено, что реакция возникновения НСК является последующей реакцией, протекающей после образования дезнуклеотицианкобаламина (витамина В₁₂_p), и что эта реакция продолжается в конечной стадии брожения не менее 24 часов, в присутствии 5,6-диметилбензимидазола.

PRECURSORS IN THE BIOSYNTHESIS OF CYANOCOBALAMINE NUCLEOTIDES II.

THE SYNTHESIS OF THE NEW VITAMIN B₁₂ DERIVATIVES

S u m m a r y

1. Continuing studies on the biosynthesis of vitamin B₁₂ derivatives (cyanocobalamine nucleotide NCK) 6 further new compounds synthesized by *Propionibacterium shermanii* have been isolated. The compounds possess the following nucleotide bases instead of 5,6-dimethyl benzimidazole of vitamin B₁₂: benzimidazole, 5-nitrobenzimidazole, 5(6)-nitro-6(5)-methylbenzimidazole, 5,6-dinitrobenzimidazole, 5-ethoxybenzimidazole and 5,6-imidazobenzimidazole. All those derivatives have been obtained in the crystalline form. It has been proved that the propionic acid bacteria condense benzotriazole and 2-mercaptobenzomida-zole with the cobalamine molecule.

2. The crystalline cyanocobalamine nucleotides have been examined by means of physico-chemical and microbiological methods. The compounds are biologically active for *Bact. coli mutant* and *Euglena gracilis*.

3. It has been shown that the formation of NCK follows the previous synthesis of cyanocobalamin desnucleotide (vitamin B_{12p}). The synthesis of NCK takes place at least in the course of 24 hours in the final fermentation stage, in the presence of 5,6-dimethylbenzimidazole.

Otrzymano 9.II.1955

WANDA MEJBAUM-KATZENELLENBOGEN

**TURBIDYMETRYCZNA MIKROMETODA
OZNACZANIA BIAŁEK TANINĄ***

*Zakład Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej we Wrocławiu
Kierownik prof. dr Tadeusz Baranowski*

Szybkie oznaczanie ilościowe białek w drobnych ilościach materiału biologicznego napotyka ciągle jeszcze duże trudności metodyczne (4). Nawet stosowanie mikrometody Kjeldahla ma pewne ograniczenia, gdyż wymaga znajomości procentowej zawartości azotu w badanym białku i nie daje się stosować bezpośrednio w obecności innych związków azotowych.

Często w oznaczeniach ilościowych używa się odczynników strącających białka. Oznaczenia przeprowadza się wagowo lub przez mierzenie zmętnienia w fotokolorymetrach lub nefolometrach. W metodach turbidymetrycznych najczęściej stosuje się kwas sulfosalicylowy (5) lub trójchlorooctowy (2). Metody te są wprawdzie łatwe i szybkie w wykonaniu, ale odznaczają się małą dokładnością i słabo dają się reprodukcować.

Szukając metody nadającej się do oznaczania białek w mikrogramowych (μg) ilościach zajęłam się zbadaniem optymalnych warunków dla strącania różnych białek kwasem taninowym. Odczynnik ten, chociaż często stosowany w próbach jakościowych, nie był, o ile mi wiadomo, wykorzystany w metodach ilościowych.

Wiadomo, że 40% roztwory taniny, zakwaszone kwasem octowym, strącają żelatynę, albuminy i peptony jeszcze w miligram procentowych roztworach. Ponadto powstają nierozpuszczalne połączenia taniny z licznymi alkaloidami i niektórymi wielocukrami.

Znaczna czułość i mała specyficzność taniny wobec różnych białek nasunęła przypuszczenie, że może ona być odczynnikiem dającym się wykorzystać w oznaczeniach ilościowych tak mieszaniny, jak i po-

*) Praca wykonana z dotacji Komitetu Biochemicznego PAN.

szczególnych frakcji białkowych, i to w znacznie niższych stężeniach niż w dotychczasowych turbidymetrycznych metodach.

W pracy przedstawię wyniki uzyskane w czasie badania zachowania się białek surowicy, żelatyny i lizozymu wobec odczynnika taninowego, jak też warunki metody, pozwalające na zastosowanie odczynu taninowego do turbidymetrycznego oznaczania białek.

Podana turbidymetryczna mikrometoda polega na pomiarze w fotokolorymetrze zmętnienia, jakie dają nierozpuszczalne połączenia białek z taniną po stabilizowaniu ich koloidem chroniącym. W zakresie stężeń od 20 do 100 μg białka w 4 ml objętości próby i odczynników uzyskałam wprost proporcjonalną zależność pomiędzy stężeniem białek a gęstością optyczną. Otrzymałam zupełną zgodność wyników dla żelatyny, białek surowicy i lizozymu. W podanym zakresie stężeń błąd metody wynosi $\pm 3,6\%$.

I. Odczynniki i postępowanie

1. ODCZYNNIK TANINOWY: 10% TANINA W 1 N HCl i 2% FENOLU

Do 98 ml 1 N HCl ogrzanego do 80° dodać 2 ml również ogrzanego fenolu (ch. cz.). Po zupełnym rozpuszczeniu fenolu w kwasie dodać 10 g taniny. Przechowywać w ciemnej flaszce. Odczynnik jest trwały do kilku tygodni.

Do sporządzania odczynnika taninowego używałam różnych preparatów taniny. Tanina (*ac. tanicum*, Mallincrodt, U. S. P. XII) i tanina Mercka (Galläpfelgerbsäure) rozpuszczały się dobrze nawet w zimnym roztworze fenolu w kwasie solnym i dawały roztwory jasnożółte, które z czasem ciemniały. Inne preparaty kwasu taninowego nie oznaczone marką fabryczną rozpuszczały się dopiero po kilkuminutowym ogrzewaniu we wrzącej łaźni wodnej. Roztwory są ciemniejsze i niejednokrotnie zawierają drobne zanieczyszczenia, które należy odsączyć.

2. WODNY ROZTWÓR GUMY ARABSKIEJ 1%

10 g gumy arabskiej rozpuścić w litrze wody destylowanej.

Do użytku sporządzać na świeżo 0,1% roztwór, w razie potrzeby sączyć. Roztwory gumy arabskiej powinny być wodojasne i z odczynnikiem taninowym nie mogą dawać reakcji barwnych ani strąceniowych.

Używano preparatów gumy arabskiej nie oznaczonych marką fabryczną.

3. STANDARDOWE ROZTWORY BIAŁEK

a. Żelatyna: 0,1% w 0,9% NaCl: 100 mg odważonej analitycznie żelatyny rozpuścić w około 10. ml 0,9% NaCl w kolbie miarowej

na 100 ml, ogrzać w łaźni wodnej aż do zupełnego rozpuszczenia białka i po oziębieniu do temperatury pokojowej uzupełnić do znaczka 0,9% roztworem chlorku sodowego.

Do sporządzenia standardów używałam sproszkowanej żelatyny „Grübler”, suszonej do stałej wagi w eksykatorze próżniowym nad H_2SO_4 i sprawdzonej na czystość przez oznaczenie azotu metodą Kjeldahla. W przeliczeniu azotu na białko stosowałam współczynnik 5,55 (18% N). Analizowany preparat zawierał teoretyczny procent azotu.

b. L i z o z y m 0,1% w wodzie destylowanej: 25 mg lizozymu rozpuścić w kolbie miarowej na 25 ml w wodzie destylowanej i uzupełnić do znaczka.

Lizozym (globulin G_1) otrzymałam z białek jaj kurzych metodą Aldertona i Fevolda (1). Krystaliczny preparat, osuszony do stałej wagi w eksykatorze próżniowym nad H_2SO_4 , zawierał 83% azotu w stosunku do wartości teoretycznej (18,6% N) (3). Do sporządzenia standardu brano odpowiednio większą naważkę lizozymu.

c. B i a ł k a s u r o w i c y, 1% w 30% moczniku lub 0,9% NaCl. Surowicę ludzką po oznaczeniu azotu białkowego metodą Kjeldahla rozcieńczyć 30% mocznikiem tak, aby w ml znajdowało się 10 mg białka. Stosowałam współczynnik białkowy 6,25 (16% N).

Standardy macierzyste białek chroniono tymolem i przechowywano w lodówce (około 5°).

Ze standardów macierzystych po doprowadzeniu ich do temperatury pokojowej, przeciętnie po godzinie od wyjęcia z lodówki, sporządzano roztwory do użytku o stężeniach białka od 20 do 100 $\mu\text{g/ml}$. Lizozym rozcieńczano wodą destylowaną, żelatynę i białka surowicy 0,9% chlorkiem sodowym. Rozcieńczone roztwory przechowywano w temperaturze pokojowej przez kilka dni.

4. POSTĘPOWANIE

Do próbek o średnicy 1,4 cm i długości 7 cm odmierzyć po 1 ml roztworu białka o stężeniu 20 — 100 $\mu\text{g/ml}$ i wstawić do termostatu (lub łaźni wodnej) o temperaturze $30^\circ \pm 1^\circ$. Po wyrównaniu temperatur (około 10 minut) dodać 1 ml odczynnika taninowego o temperaturze 30° , mieszać pręcikiem szklanym i do k ł a d n i e po 10 minutach dodać 2 ml 0,1% roztworu gumy arabskiej, mieszać i wyjąć z termostatu. Oziębic do temperatury pokojowej (15 — 20°).

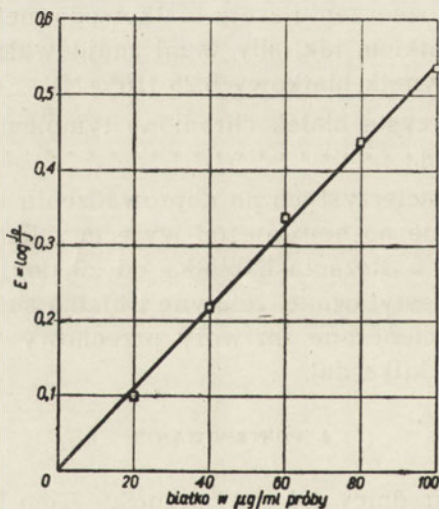
Próba kontrolna: Odmierzyć 1 ml rozpuszczalnika (woda lub roztwór soli, w którym rozpuszczono białko), dodać 1 ml odczynnika taninowego i 2 ml 0,1% roztworu gumy arabskiej.

II. Pomiar zmętnienia

Zmętnienie mierzyłam w absorpcjometrze Hilgera w optycznie jednorodnych probówkach przy filtrze czerwonym (ROR2 o maksymalnej przepuszczalności światła o długości fali $\lambda = 615 - 630 \text{ m}\mu$). Optyczną gęstość badanych standardów białkowych odczytywałam na skali galvanometru w jednostkach ekstynkcji $E = \log \frac{I_0}{I}$. Punkt zerowy skali nastawiałam na wodę destylowaną lub na próbę kontrolną. W wypadku nastawiania punktu zerowego na wodę należy od ekstynkcji otrzymanej dla próby odjąć ekstynkcję próby kontrolnej, która nie powinna przekraczać 0,08.

III. Czulość i dokładność metody

W podanej metodzie uzyskałam liniową zależność pomiędzy stężeniem białka a optyczną gęstością tylko w granicach stężeń od 20 do 100 mikrogramów (10^{-6} g) w 4 ml objętości końcowej próby i odczynników. Powyżej i poniżej tych stężeń zaznacza się odchylenie od krzy-



Rys. 1. Krzywa standardowa dla lizozymu, żelatyny i białek surowicy. Odczyty ekstynkcji w probówkach w absorpcjometrze Hilgera, $\lambda = 615 - 645 \text{ m}\mu$. Objętość próby i odczynników 4 ml

wej standardowej, przedstawionej na rysunku 1 i wykreślonej na podstawie danych zebranych w tabelicy 1.

W tabelicy 1 zestawiałam wyniki pomiarów zmętnienia, przeprowadzonych na standardowych roztworach żelatyny, lizozymu i białek surowicy w różnych stężeniach od 20 do 100 μg . W tabelicy podałam średnie arytmetyczne z 10 — 20 oznaczeń i ich średnie odchylenia (σ).

Tablica 1
 Średnie arytmetyczne z ekstynkcji i średnie odchylenia dla lizozymu, żelatyny i białek surowicy (1 ml roztworu białka + 1 ml odczynnika taninowego, po 10 minutowej inkubacji w temperaturze 30° — 2 ml 0,1% gumy arabskiej). Odczyty ekstynkcji w próbkach w absorpcjometrze Hilgera, filtr czerwony ROG2)

Stężenie białka w μg	$E = \log \frac{I_0}{I}$								
	lizozym			żelatyna			surowica		
	n	A	σ	n	A	σ	n	A	σ
100	15	0,54	$\pm 0,03$	20	0,54	$\pm 0,03$	10	0,54	$\pm 0,02$
80	20	0,44	$\pm 0,01$	19	0,44	$\pm 0,02$	15	0,44	$\pm 0,01$
60	20	0,34	$\pm 0,02$	19	0,34	$\pm 0,01$	15	0,34	$\pm 0,02$
40	20	0,22	$\pm 0,02$	20	0,22	$\pm 0,01$	15	0,22	$\pm 0,01$
20	20	0,10	$\pm 0,006$	20	0,10	$\pm 0,006$	15	0,10	$\pm 0,006$

n = ilość oznaczeń; A = średnia arytmetyczna

Średnie odchylenie = $\sqrt{\frac{\Sigma(A - a)^2}{n - 1}}$

Odczyty ekstynkcji otrzymane dla różnych stężeń standardów białkowych przeliczyłam na 100 μg białka i obliczyłam z nich średnią arytmetyczną i jej średnie odchylenie (σ). Wyniki przedstawia tablica 2.

Jak widać w tablic 1 i 2, uzyskałam taką samą czułość i dokładność metody dla tak różnych białek, jak lizozym, żelatyna i białka surowicy. Średnia ekstynkcja dla 100 μg w 4 ml objętości końcowej próby i odczynników w zakresie stężeń białka od 20 do 100 μg wynosi: $E = 0,55 \pm \pm 0,02$.

Metodą taninową oznaczałam stężenia białek we frakcjach białkowych, otrzymywanych w czasie izolowania enzymów i hormonów z tkanek zwierzęcych, jak też stężenie białka w liofilizowanej plazmie krwi. Otrzymywałam zawsze zgodność wyników z oznaczeniem azotu białkowego. Jedyny wyjątek stanowi krystaliczna insulina ¹⁾, w której metodą taninową oznacza się zaledwie 20% w stosunku do azotu.

Tablica 2
 Średnia ekstynkcja dla 100 μg w 4 ml mieszaniny próby i odczynników i średnie odchylenie dla lizozymu, żelatyny i surowicy

Rodzaj białka	$E_{100 \mu\text{g}}^{4 \text{ ml}}$		
	n	A	σ
lizozym	95	0,55	$\pm 0,02$
żelatyna	99	0,55	$\pm 0,02$
surowica	70	0,55	$\pm 0,02$

¹⁾ Preparat handlowy przekryształizowany przez T. Baranowskiego.

IV. Warunki powstawania i trwałości nierozpuszczalnych połączeń białek z taniną

1. STABILIZACJA ZMĘTNIENIA KOLOIDEM CHRONIĄCYM

Do stabilizacji nierozpuszczalnych połączeń taniny z białkiem można używać tylko takich roztworów koloidowych, które nie strącają taniny. Z przebadanych wielocukrów dobrze nadaje się do utrwalaania zmętnienia guma arabska i guma indyjska (gum ghatti), nie można natomiast stosować agaru, który — podobnie jak glikogen lub skrobia — daje nierozpuszczalne połączenia z taniną.

Obecność w próbie 0,1 — 0,2% koloidu chroniącego utrwala zmętnienie w stężeniach białka do 200 μg na okres 24 godzin w temperaturze pokojowej. Utrwalona zawiesina jest wrażliwa na większe zmiany temperatury. Tak na przykład próbki utrwalone koloidem i wstawione na parę minut do wrzącej łaźni wodnej po kilku minutach stają się zupełnie przejrzyste, a oziębione ponownie mętnieją.

W podanym zakresie stężeń białka koloid chroniący dodany do próby razem z odczynnikiem taninowym hamuje powstanie zmętnienia — dodany po odczynniku utrwala zmętnienie obecne w danym momencie. Guma indyjska hamuje powstawanie zmętnienia znacznie silniej od gumy arabskiej. Oba koloidy stabilizują zmętnienia równie dobrze.

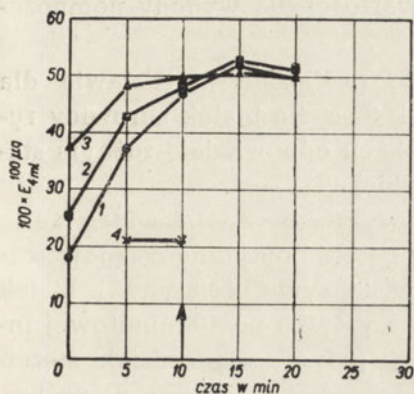
Nawet drobne ilości koloidu (1 kropla 0,1% roztworu) chronią białka przed strącaniem taniną. Z tego względu w seryjnych oznaczeniach należy szczególnie zwracać uwagę na czystość naczyń, aby nie zawierały śladów koloidu chroniącego.

2. CZAS INKUBACJI

Czas upływający od dodania odczynnika taninowego do dodania koloidu chroniącego nazwano czasem inkubacji. Przy niskich stężeniach białka wyraźnie daje się zauważyć wpływ czasu tak na powstawanie nierozpuszczalnych połączeń białka z taniną, jak i na stopień ich dyspersji. Szybkość nasilania się zmętnienia jak i kłaczkowacenia osadu zależą od stężenia białka, składu odczynnika taninowego, od temperatury i czasu inkubacji. Ekstynkcja może być miarą stężenia białka tylko w wypadku takiej samej dyspersji osadu.

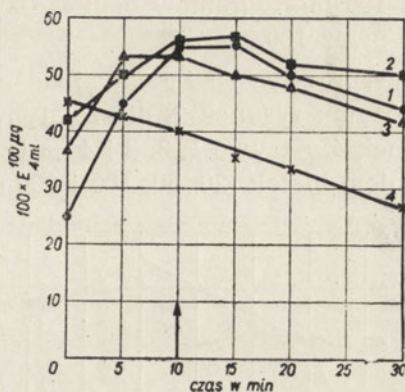
Dla wykazania wpływu czasu inkubacji na powstawanie i kłaczkowacenie zmętnienia przebadalam zależność pomiędzy optyczną gęstością a czasem inkubacji w roztworach lizozymu, żelatyny i białek surowicy stabilizowanych gumą arabską natychmiast po dodaniu odczyn-

nika taninowego (czas inkubacji = 0) i po 5, 10, 15, 20 i 30-minutowej inkubacji w stałej temperaturze (20°).



Rys. 2. Zależność pomiędzy $E_{4ml}^{100 \mu g}$ a czasem inkubacji w temperaturze 20° dla lizozymu

- 1 ● — — ● krzywa dla 20 μ g
 2 ■ — — ■ „ „ 50 μ g
 3 ▲ — — ▲ „ „ 100 μ g
 4 × — — × „ „ 200 μ g



Rys. 3. Zależność pomiędzy $E_{4ml}^{100 \mu g}$ a czasem inkubacji w temperaturze 20° dla żelatyny

- 1 ● — — ● krzywa dla 20 μ g
 2 ■ — — ■ „ „ 50 μ g
 3 ▲ — — ▲ „ „ 100 μ g
 4 × — — × „ „ 200 μ g

Tablica 3 przedstawia wyniki zebrane dla lizozymu, żelatyny i białek surowicy, badanych równoległe w stężeniach 20, 50, 100 i 200 mi-

Tablica 3

Wpływ czasu inkubacji na powstawanie nierozpuszczalnych połączeń białek z odczynnikiem taninowym

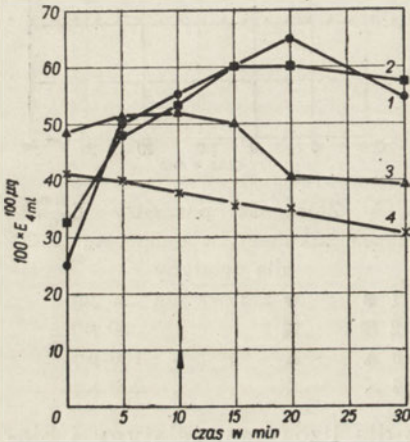
(Czas inkubacji liczony od dodania odczynnika taninowego do stabilizacji zmętnienia 2 ml 0,05% gumy indyjskiej. Temperatura inkubacji: 20°. Odczyty ekstynkcji w absorpcjometrze Hilgera przeliczone dla 100 μ g białka)

Czas inkubacji w minutach	$100 \times E_{4ml}^{100 \mu g}$											
	lizozym				surowica				żelatyna			
	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d
0	18	25	37	—	25	32	38	41	25	32	36	45
5	37	43	48	21	50	48	51	40	45	50	54	42
10	47	48	50	21	55	53	52	37	55	56	53	40
15	52	53	50	x—	60	60	50	35	55	56	50	35
20	50	53	50	x—	65	60	40	35	50	52	48	34
30					55	58	39	31	45	50	42	28

a — 20 μ g białka w próbie; b — 50 μ g białka w próbie; c — 100 μ g białka w próbie; d — 200 μ g białka w próbie; x — klaki.

krogramów w próbie (kolumny a, b, c, d). Dla porównania uzyskanych wyników optyczną gęstość wyrażono w ekstynkcji po przeliczeniu jej na 100 mikrogramów białka. Uzyskane wartości dla wygody pomnożono przez 100.

Wpływ czasu inkubacji na ekstynkcję graficznie przedstawia dla lizozymu rysunek 2, dla żelatyny rysunek 3, a dla białek surowicy rysunek 4. Krzywe 1, 2, 3 i 4 na tych rysunkach odpowiadają różnym stężeniom białek (20, 50, 100 i 200 μg w próbie).



Rys. 4. Zależność pomiędzy $E_{4ml}^{100 \mu g}$ a czasem inkubacji w temperaturze 20° dla surowicy

- 1 ● — — ● krzywa dla 20 μg
- 2 ■ — — ■ " " 50 μg
- 3 ▲ — — ▲ " " 100 μg
- 4 × — — × " " 200 μg

białkowych lizozym stanowi układ najmniej złożony, a białka surowicy najbardziej niejednorodny.

Wzrost optycznej gęstości w początkowym okresie inkubacji (od 0 do 10 minut) jest charakterystyczny tylko w stężeniach białek do 100 μg . W stężeniu białka 200 μg w próbie (krzywa 4 na rysunkach 2, 3, 4) najwyższą ekstynkcję dają próbki stabilizowane natychmiast po dodaniu odczynnika taninowego, a dalsza inkubacja prowadzi do stopniowego spadku ekstynkcji. Proces ten szczególnie ostro zaznacza się dla lizozymu, którego osad po 15-minutowej inkubacji jest już tak gruboziarnisty, że opada na dno próbki nawet w obecności koloidu chroniącego.

Dla jasności obrazu nie podaję doświadczeń przeprowadzonych z odczynnikiem taninowym o składzie odmiennym, niż podano poprzed-

Z wykresów 2 — 4 widać, że tę samą gęstość optyczną osiągają roztwory lizozymu, żelatyny i białek surowicy tylko po 10-minutowej inkubacji jedynie w przedziale stężeń od 20 do 100 μg białka w próbie.

Po 20-minutowej inkubacji występują wyraźne różnice optycznej gęstości tylko dla białek surowicy. Podczas gdy przy stężeniu 20 μg w próbie (krzywa 1 na rys. 4) zmętnienie znacznie nasila się, to dla 100 μg wyraźnie spada wskutek zmniejszenia się dyspersji osadu białkowego. Nasuwa się przypuszczenie, że wyznaczenie „krzywych czasowych” odczynu taninowego może się przyczynić do rozstrzygnięcia sprawy homogenności białek. W podanym zestawieniu standardów

nio. Wydaje się jednak, że czas potrzebny do osiągnięcia maksymalnego zmętnienia jest ściśle związany z szybkością kłaczkowacenia osadów. Odczyn taninowy przy małych stężeniach kwasu solnego wymaga znacznie dłuższej inkubacji, do paru godzin, i znacznie wolniej ulega kłaczkowaceni. Większe stężenia kwasu solnego i fenolu w odczynie taninowym skracają wprawdzie czas potrzebny do uzyskania maksymalnego zmętnienia, ale równocześnie zmniejsza się gęstość optyczna z powodu szybszego kłaczkowacenia osadów.

Z podanych doświadczeń wynika, że ściśle przestrzeganie 10-minutowej inkubacji próbek przed dodaniem czynnika stabilizującego zmętnienie jest podstawowym warunkiem dokładności metody taninowej.

3. TEMPERATURA INKUBACJI

Temperaturę, w której znajdują się próbki od chwili dodania odczynnika taninowego do dodania koloidu chroniącego, nazwano temperaturą inkubacji. Dopiero po wprowadzeniu do oznaczeń stałej i określonej temperatury inkubacji uzyskałam konieczną dla metod ilościowych powtarzalność wyników w poszczególnych seriach oznaczeń standardowych. Krzywe uzyskiwane w upalne dnię letnie nie dawały się reprodukować w dnię chłodniejsze, a szczególnie zmiennie zachowywały się standardy lizozymu.

Tablica 4

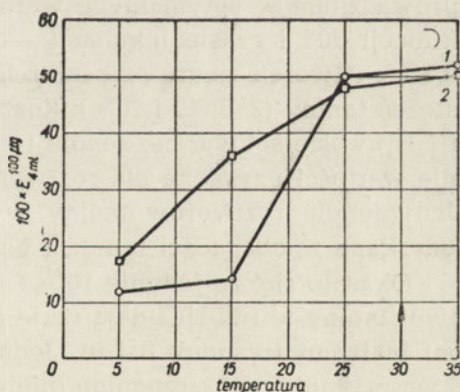
Wpływ temperatury inkubacji na powstawanie nierozpuszczalnych połączeń białek z odczynnikiem taninowym

(Temperatura inkubacji utrzymana do stabilizacji zmętnienia 2 ml 0,05% gumy indyjskiej. Czas inkubacji w danej temperaturze 10 minut)

Odczyty ekstynkcji w absorpcjometrze Hilgera, przeliczone dla $100 \frac{\mu\text{g}}{4\text{ml}}$, dla 20, 50 i 100 μg lizozymu i żelatyny

Temperatura inkubacji w stopniach	$E_{4\text{ml}}^{100 \mu\text{g}} \cdot 100$					
	lizozym			żelatyna		
	a	b	c	a	b	c
5	12	12	12	17	17	16
15	12	15	15	30	35	40
25	48	50	54	45	50	52
35	50	52	56	48	48	50

a = 20 μg , b = 50 μg , c = 100 μg białka



Rys. 5. Zależność pomiędzy $E_{4\text{ml}}^{100 \mu\text{g}}$ a temperaturą dla lizozymu i żelatyny. Czas inkubacji 10 minut

- 1 ● - - ● krzywa dla lizozymu
2 ■ - - ■ krzywa dla żelatyny

W tablicy 4 i na rysunku 5 podaję przykład jednego doświadczenia, w którym przeprowadziłam 10-minutową inkubację trzech stężeń lizozymu i żelatyny w różnych temperaturach. Jak widać z wykresu (rys. 5), dopiero powyżej 25° uzyskuje się dla żelatyny i lizozymu maksymalną i taką samą gęstość optyczną. W temperaturze 15° czułość odczynu taninowego dla żelatyny spada blisko dwukrotnie, a dla lizozymu trzykrotnie.

Zachowanie odpowiedniej i stałej temperatury inkubacji (30°) okazało się koniecznym warunkiem dla powtarzalności oznaczeń i czułości metody taninowej w stosunku do różnych białek.

4. SKŁAD ODCZYNNIKA TANINOWEGO

Jednym z najważniejszych założeń postawionych w tej pracy było uzyskanie tej samej czułości odczynu w jednakowych warunkach próby dla lizozymu, żelatyny i białek surowicy. W tym celu zajęłam się przede wszystkim dobraniem optymalnych stężeń taniny i kwasu solnego w odczynniku strącającym białko. W tablicy 5 i na rysunkach 6 — 10 zestawione są wyniki otrzymane w trzech niezależnych seriach oznaczeń. Podane w tablicy ekstynkcje ilustrują wpływ składu odczynnika taninowego na optyczną gęstość standardowych roztworów lizozymu, żelatyny i białek surowicy, o stałym stężeniu 100 µg w ml. Oznaczenia przeprowadziłam w optymalnych warunkach, to znaczy w temperaturze inkubacji 30° i czasie inkubacji — 10 minut. Zmętnienia stabilizowano 0,1% roztworem gumy arabskiej. Dane tabeli odnoszą się do zmiennych stężeń taniny (2, 5, 10 i 20%). Roztwory taniny sporządzano w 0, 0,2, 0,5 i 1 N kwasie solnym bez fenolu i z 2% fenolem. W tablicy podano średnie wartości uzyskane dla roztworów taniny z dodanym fenolem i bez. Jedynie dla roztworów taniny w 1 N HCl podano oddzielnie wyniki uzyskane w obecności fenolu i bez fenolu.

Okazało się, że jedynie 10% roztwór taniny w 0,5 N HCl i 20% roztwór taniny w 1 N HCl dają takie same zmętnienia ($E = 0,50$) z badanymi białkami (rysunek 8 i 9). Jednakże odczynniki o takich stężeniach kwasu i taniny są szczególnie nietrwałe. Pod wpływem kwasu z roztworów taniny wypadają ciemnobrunatne, bezpostaciowe, nierozpuszczalne w wodzie i kwasach, pochodne taninowe. Stosunkowo trwałe roztwory daje 10% tanina w 1 N HCl. Niestety przy tym składzie odczynnika lizozym daje o 50% słabszą ekstynkcję niż żelatyna i białka surowicy (rys. 6).

Przy dalszych badaniach stwierdziłam, że dodatek fenolu do odczynnika taninowego chroni taninę przed działaniem kwasu i utrudnia powstawanie nierozpuszczalnych pochodnych. Stwierdziłam, że 2% wodne

Tablica 5

Wpływ stężenia taniny, kwasu solnego i fenolu na powstawanie nierozpuszczalnych połączeń białek z taniną

Temperatura inkubacji 30°, czas 10 minut. Koloid chrońący — 2 ml 0,1% gumy arabskiej. Odczyty ekstynkcji pomnożone przez 100 dla 100 µg lizozymu, żelatyny i białek surowicy w próbce (4 ml)

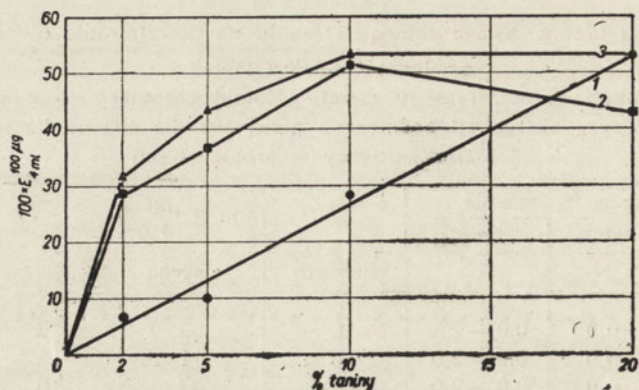
Odczynnik w % stężenie			100 · E 100 µg 4 ml			
tanina	HCl	fenol	lizozym	żelatyna	białko surowicy	
%	N	%				
2	0,0	0,0—2%	1	3	2	Rys. 6
5	0,0	0,0—2,0	1	11	5	
10	0,0	0,0—2,0	2	23	10	
2	0,2	0,0—2,0	1	31	39	Rys. 7
5	„	„ — „	1	36	37	
10	„	„ — „	1	35	36	
20	„	„ — „	2	38	30	
2	0,5	„ — „	28	32	34	Rys. 8
5	„	„ — „	44	34	42	
10	„	„ — „	43	39	49	
20	„	„ — „	6	35	47	
2	1,0	0,0	6	30	33	Rys. 9
5	„	„	10	37	45	
10	„	„	28	52	54	
20	„	„	54	44	54	
2	1,0	2,0	38	35	36	Rys. 10
5	„	„	47	43	40	
10	„	„	50	48	48	
20	„	„	50	42	49	

i kwaśne roztwory fenolu nie strącają badanych białek w warunkach opisanej metody.

Nieoczekiwanie okazało się, że dodatek fenolu do odczynnika taniowego wpływa tylko w 1 N HCl na strącanie lizozymu taniną dając tę samą ekstynkcję, jak dla żelatyny i białek surowicy (rys. 7).

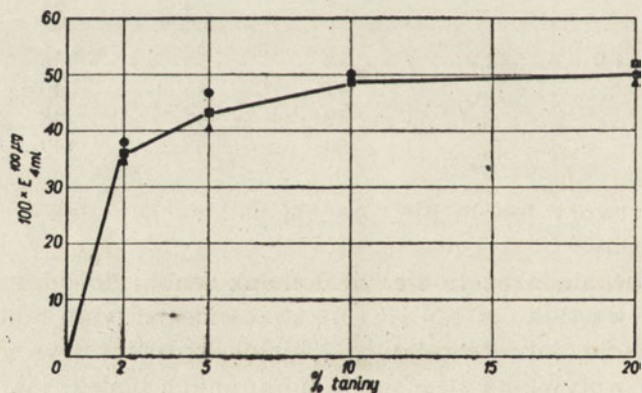
Fenol nie wpływa na strącanie taniną innych białek, jak również na strącanie lizozymu w 0,5 i 0,2 N HCl i w roztworach wodnych (rys. 8, 9, 10).

Roztwory taniny w 1 N kwasie solnym w obecności 2% fenolu w szerokim przedziale stężeń taniny (5 — 20%) nie wpływają na szybkość powstawania nierozpuszczalnych połączeń lizozymu, żelatyny i białek surowicy przy najwyższej czułości odczynu.



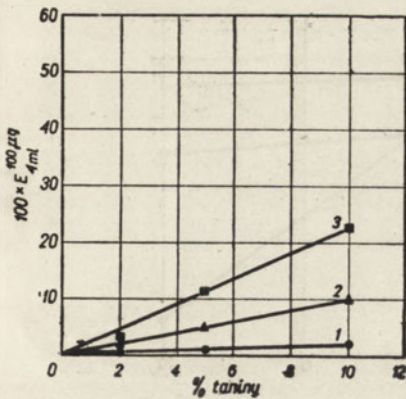
Rys. 6. Zależność pomiędzy $E_{4ml}^{100\mu g}$ żelatyny, lizozymu i surowicy a stężeniem taniny w 1N HCl bez fenolu

- 1 ● - - ● krzywa dla 100 μg lizozymu
 2 ■ - - ■ " " 100 μg żelatyny
 3 ▲ - - ▲ " " 100 μg surowicy



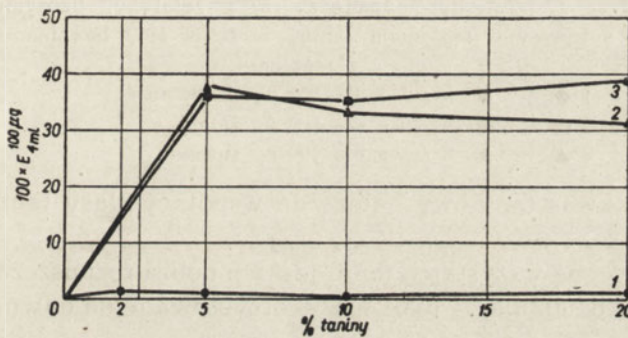
Rys. 7. Zależność pomiędzy $E_{4ml}^{100\mu g}$ żelatyny, lizozymu i surowicy a stężeniem taniny w 1N HCl i 2% fenolu

- 1 ● - - ● krzywa dla 100 μg lizozymu
 2 ■ - - ■ " " 100 μg żelatyny
 3 ▲ - - ▲ " " 100 μg surowicy



Rys. 8. Zależność pomiędzy $E_{4ml}^{100\mu g}$ żelatyny, lizozymu i surowicy a stężeniem taniny w wodzie bez fenolu i z fenolem

- 1 ● -- ● krzywa dla 100 μg lizozymu
 2 ▲ -- ▲ " " 100 μg żelatyny
 3 ■ -- ■ " " 100 μg surowicy



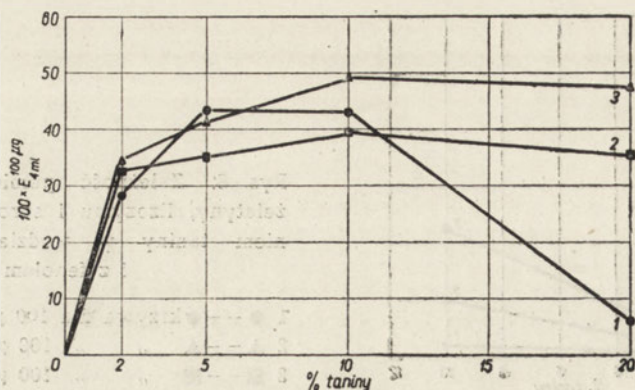
Rys. 9. Zależność pomiędzy $E_{4ml}^{100\mu g}$ żelatyny, lizozymu i surowicy a stężeniem taniny w 0,2N HCl bez fenolu i z fenolem

- 1 ● -- ● krzywa dla 100 μg lizozymu
 2 ▲ -- ▲ krzywa dla 100 μg surowicy
 3 ■ -- ■ krzywa dla 100 μg żelatyny

Na podstawie tych danych przyjęto podany skład odczynnika za najodpowiedniejszy dla ilościowego oznaczania różnych białek.

Omówienie wyników

Taniny stanowią wielką grupę organicznych garbników o bardzo różnej strukturze chemicznej. Tanina otrzymywana z dębianek dębu jest mieszaniną wielkocząsteczkowych pochodnych kwasu gallusowego lub innych polihydroksyfenoli połączonych wiązaniem estrowym pomiędzy sobą i glikozydowym z cukrowcem. Bliższa ich struktura nie została jeszcze z całą pewnością udowodniona. Taniny z dębianek i otrzy-



Rys. 10. Zależność pomiędzy $E_{4ml}^{100 \mu g}$ żelatyny, lizozymu i surowicy a stężeniem taniny w 0,5 N HCl bez fenolu i z fenolem

- 1 ● — — ● krzywa dla 100 μ g lizozymu
 2 ■ — — ■ krzywa dla 100 μ g żelatyny
 3 ▲ — — ▲ krzywa dla 100 μ g surowicy

wany z nich kwas taninowy należą do wspólnej klasy tanin hydrolizujących.

Wspólną cechą wszystkich tanin jest ich dobra rozpuszczalność w wodzie i swoiste działanie na białka, wykorzystywane od dawna w procesie garbowania skóry.

Z przedstawionych w tej pracy wyników okazuje się, że powstawanie nierozpuszczalnych połączeń taniny z białkiem można wykorzystać w oznaczeniach ilościowych.

Przystosowanie odczynu taninowego do oznaczeń turbidymetrycznych białek stało się możliwe przede wszystkim dzięki uchwyceniu dolnej granicy czułości odczynu (10 — 100 μ g białka w próbie) i uwzględnieniu tak istotnych parametrów reakcji zmętnionych, jak temperatura i czas. Przez wprowadzenie stabilizacji zmętnienia gumą arabską w dowolnym czasie reakcji można było tak dobrać warunki próby i skład odczynnika, ażeby osiągnąć zrównanie optycznej gęstości dla równo-procentowych roztworów zupełnie odmiennych standardów białkowych, o innej procentowej zawartości, azotu, masach cząsteczkowych i punktach izoelektrycznych.

Na tej podstawie można się spodziewać, że analizując mieszaninę białek otrzymana się sumę ze stężeń poszczególnych frakcji, niezależnie od indywidualnych własności poszczególnych składników białkowych. Odczyn taninowy góruje nad innymi odczynami strąceniowymi swoją małą specyficnością, która dopuszcza używania żelatyny za białko

wzorcowe. Tanina w podanych warunkach metody strąca równie dobrze aluminy i globuliny surowicy, jak chromoproteidy (hemoglobinę) (6).

Inne reakcje strąceniowe taniny nie wpływają praktycznie na zakres stosowalności metody taninowej w materiale biologicznym, w którym stężenie białek znacznie przewyższa stężenia wielocukrów, alkaloidów lub zasad azotowych strącających się taniną. Odczyn taninowy wobec glikogenu i skrobi jest znacznie mniej czuły: również obecność w próbie drobnych ilości cukrowców nie wpływa na reakcję zmętnieniową w standardach białkowych. Próby wykonane z kofeiną wykazały, że odczynnik używany przez mnie nie nadaje się do strącania związków azotowych drobnocząsteczkowych, które rozpuszczają się przy tym składzie odczynnika. Z podobnym faktem spotkałam się i przy lizozymie, który strąca się jeszcze 10% roztworami taniny w 0,5 N kwasie solnym, ale w 20% roztworach taniny połączenia lizozymu z taniną stają się rozpuszczalne (rys. 8).

Nie było zadaniem tej pracy zbadanie optymalnych warunków dla strącania się różnych białek taniną, a raczej odpowiednie dobranie koniecznych warunków dla jednakowego strącania jak największej skali białek.

Z drugiej strony przedstawiona tu metoda pracy daje możliwość ilościowego śledzenia różnic w zachowaniu się białek w czasie zmiany poszczególnych parametrów reakcji, a tym samym może przyczynić się do poznania mechanizmu reakcji białkowo-taninowej.

Wyjaśnienie działania fenolu na strącanie lizozymu taniną wykracza poza zakres zgromadzonych faktów eksperymentalnych. Stwierdziłam, że wpływ fenolu na strącanie lizozymu nie jest ograniczony jedynie do odczynu taninowego. Analogiczny efekt zaznacza się i przy strącaniu lizozymu kwasem sulfosalicylowym.

Kwas sulfosalicylowy strąca lizozym tylko w wodnych roztworach, zakwaszenie próby kwasem solnym znosi zupełnie powstawanie zmętnienia. Dodatek fenolu pozwala na strącanie lizozymu kwasem sulfosalicylowym również w oddziaływaniu silnie kwaśnym (1 N HCl).

Wpływ soli używanych do frakcjonowania białek na odczyn taninowy jest obecnie opracowywany i wymaga oddzielnego omówienia. Pewne jest, że stężenie soli, które nie wysala danej frakcji białkowej, nie wpływa na czułość i dokładność metody taninowej.

Przedstawiona w tej pracy metoda turbidymetrycznego oznaczania białek jest około 10 razy czulsza od dotąd stosowanych metod turbidymetrycznych i kolorymetrycznych (7), jest metodą bardzo szybką i daje

się stosować bezpośrednio do roztworów białek, niezależnie od stężenia soli obecnych w roztworze. W związku z faktem szybkiego spadku optycznej gęstości w stężeniach białek, przekraczających 100 μg w 4 ml objętości końcowej próby i odczynników, należy dla roztworów o nieznanym stężeniu białka przygotowywać przynajmniej dwa rozcieńczenia, których wyniki pokrywałyby się ze sobą.

Streszczenie

1. Zastosowano 10% roztwory taniny w 1 N HCl i 2% fenolu do ilościowego oznaczenia białek surowicy, lizozymu i żelatyny.

2. Podana mikrometoda oznaczania białek jest metodą turbidymetryczną. Zmętnienie mierzono w fotokolorymetrze przy filtrze czerwonym. Wprowadzono w tej metodzie, w odróżnieniu od dotychczasowych metod turbidymetrycznych, stabilizację zmętnienia koloidem chroniącym dopiero po dziesięciominutowej inkubacji roztworów białkowych z odczynnikiem taninowym w temperaturze 30°.

3. Stwierdzono, że czułość odczynu taninowego zależy od temperatury, a dokładność oznaczeń od czasu inkubacji.

4. Zakres stężenia białek odpowiedni dla seryjnych oznaczeń wynosi w podanej metodzie 10 do 100 mikrogramów w 4 ml mieszaniny próby i odczynników. Dla 100 μg żelatyny, lizozymu i białek surowicy uzyskiwana ekstynkcja wynosi: $E = 0,55 \pm 0,02$. W podanych granicach stężeń uzyskano zależność liniową pomiędzy optyczną gęstością a stężeniem białka.

5. Podana metoda jest łatwa i szybka i daje się stosować w oznaczeniach seryjnych albumin-globulin, lizozymu i żelatyny bezpośrednio w roztworach, niezależnie od obecności soli i związków azotowych.

L I T E R A T U R A

1. Alderton G., Fevold H. J., *J. Biol. Chem.* **164**, 1, 1946.
2. Büchner Th., *Bioch. et Bioph. Acta* **1**, 292, 1947.
3. Fromageot O., Garilhe M. P., *Bioch. et Bioph. Acta* **4**, 509, 1950.
4. Kirk P. L., *Adv. in Prot. Chemistry* **III**, 139, 1947.
5. Lowry O. Rosenbrough U. J., Farr A. L., Randall R. J., *J. Biol. Chem.* **193**, 265, 1951.
6. Mejbaum-Katzenellenbogen W., Klimek W., Tomaszewski W., w przygotowaniu do druku.
7. Weichselbaum T. E., *Am. J. of Clin. Pathol.* **7**, 40, 1946.

ТУРБИДИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ ПОСРЕДСТВОМ
ТАННИНА

Резюме

1. Применены были 10% растворы танина в 1 N HCl и 2% феноле для количественного определения белков сыворотки, лизоцима и желатины.

2. Описанный метод определения белков является турбидиметрическим методом. Мутность определялась в фотоколориметре с красным фильтром. В отличие от применявшихся прежде методов в этой методике стабилизация мутности посредством охранного коллоида использована была лишь после 10-минутной инкубации белковых растворов с реактивом танина при температуре 30°.

3. Обнаружено, что точность реактива танина зависит от температуры, а точность определений — от продолжительности инкубационного периода.

4. Соответственный предел для серийных определений концентрации белков бежит для описанной методики в границах от 10 до 100 микрограммов в 4 мл смеси, состоящей из образца и реактивов. Для 100 μg желатины, лизоцима и белков сыворотки получаемое прекращение составляет: $E = 0,55 \pm 0,02$. В приведенных пределах концентрации получено было линейное взаимоотношение между оптической плотностью и концентрацией белка.

5. Приведенный легкий и скорый метод можно применять при серийных определениях альбумина, глобулина, лизоцима и желатины непосредственно в растворах, независимо от наличия соли и азотных соединений.

TURBIDIMETRIC MICROMETHOD OF PROTEIN DETERMINATION BY MEANS
OF TANNIN

Summary

1. 10% tannin solution in 1 N HCl and 2% phenol have been used for the quantitative determination of serum proteins, lysozyme and gelatin.

2. The outlined method of protein determination is turbidimetric based on photocolometric measurements; the red filter being used. Turbidity has been stabilized with protective colloid after 10 minutes incubation of protein solutions with tannin reagent at 30°C. The above procedure differs as compared with the other turbidimetric methods.

3. It has been proved that the sensitivity of the tannin test depends on temperature while the accuracy of the measurements relies upon the incubation period.

4. The concentration of proteins, suitable for determinations should not exceed 10 — 100 μg in 4 ml mixture of the sample and the reagents. The extinction $E = 0,55 \pm 0,02$ for 100 μg of gelatin, lysozyme and serum proteins. In the above concentration range there exists a linear relationship between optical density and the protein concentration.

5. The given method is easy and rapid; it can be applied for serial determinations of albumins, globulins, lysozyme and gelatin directly in solutions in the presence of salts and nitrogen compounds.

Otrzymano 1.III.1955

WŁODZIMIERZ OSTROWSKI

POŁĄCZENIA WITAMINU B₁₂ Z BIAŁKAMIIII. BADANIA NAD KOMPLEKSEM CYJANOKOBALAMINA-BIAŁKO
(ERYTROGLOBULIN) W SUROWICY KRWI

Z Zakładu Chemii Fizjologicznej AM w Krakowie

Kierownik prof. dr B. Skarżyński

Przeważająca ilość witaminu B₁₂ występującego w surowicy związana jest z białkiem i daje się wykazać metodami mikrobiologicznymi (*Euglena gracilis*) dopiero po autoklawowaniu w wyższej temperaturze, czyli po denaturacji białka (17). Ponieważ zawartość witaminu B₁₂ związanego z białkiem jest szczególnie mała w surowicy osobników cierpiących na anemię megaloblastyczną, wysoce prawdopodobną jest hipoteza, w myśl której właśnie ta związana postać witaminu jest krwiotwórczo działającym czynnikiem (12). Za słusznością tej hipotezy przemawiają badania H o r r i g a n a i H e i n l e g o (10), którzy posługując się witaminem B₁₂ znakowanym promieniotwórczym Co wykazali, że chorzy na anemię wydalają znacznie mniej witaminu B₁₂ z moczem, jeżeli wraz z witaminem wprowadza się im pozajelitowo surowicę zdrowych osobników. Można więc przypuszczać, że w surowicy normalnego człowieka znajduje się jakieś białko wiążące witamin B₁₂ i że niedobór tego białka jest znamieny dla anemii. Przytoczone fakty przemawiają więc za fizjologicznym znaczeniem kompleksu witamin B₁₂-białko zawartym w surowicy krwi.

W ciągu badań nad połączeniami witaminu B₁₂ z białkami w jednej z naszych prac stwierdziliśmy, że kompleks witaminów B₁₂-białko elektroforetycznie przynależy do frakcji α-globulinów (14), co potwierdzili również inni autorowie (15). Forma związana witaminu B₁₂ z białkiem nie jest charakterystyczną cechą wyłącznie surowicy ludzkiej, gdyż tę postać witaminu można wykazać również u innych gatunków zwierzęcych, przy czym należy zwrócić uwagę na fakt, że większość związanego witaminu B₁₂ u wszystkich badanych gatunków rozmieszczona jest we frakcjach α₁- i α₂-globulinów bądź we frakcjach o podobnej ruchliwości elektroforetycznej, jak α-globuliny surowicy ludzkiej (18).

Surowica krwi nie jest jedynym źródłem związanej postaci witaminu B₁₂, gdyż podobne połączenia znaleziono i częściowo otrzymano w czystym stanie ze śluzówki żołądka (2, 21, 5), w serwatce mleka świńskiego (17), w mitochondriach komórek wątroby i nerki, w leukocytach i erytrocytach (18). W powyższych badaniach również ustalono, że połączenia witaminu B₁₂ z białkami, pochodzące z różnych źródeł, różnią się swoimi własnościami, jak stosunkiem ilości witaminu do masy białka, ciężarem cząsteczkowym, trwałością kompleksu oraz innymi własnościami fizyko-chemicznymi.

W niniejszej pracy przedstawione są badania mające na celu dokładniejsze scharakteryzowanie kompleksu witamin B₁₂-białko występującego w surowicy krwi bądź otrzymanie tego kompleksu możliwie w czystym stanie.

Metody

Zawartość witaminu B₁₂ w badanych frakcjach białkowych oznaczano metodą mikrobiologiczną za pomocą *Euglena gracilis* według techniki opisanej przez nas w pracach poprzednich (14, 18).

Frakcje surowicy ludzkiej uzyskane metodą nr 10 C o h n a (3) otrzymano z Instytutu Hematologii w Warszawie ¹⁾. Niektóre frakcje Cohna otrzymano również według metody nr 11 (11) w tut. Zakładzie. Badania elektroforetyczne przeprowadzono za pomocą metody opisanej przez nas wcześniej (13). Do ilościowego oznaczania białka stosowano metodę mikro-Kjeldahla. Wszystkie pomiary pH przeprowadzono za pomocą pH-metru z elektrodą szklaną typu Industrial & Scientific Instruments, LTD, London.

Badania nad rozmieszczeniem kompleksu we frakcjach Cohna przeprowadzono z surowicą ludzką, natomiast wszystkie inne badania przeprowadzono z surowicą bydlęcą, a to z tego względu, że surowica bydlęca nie zawiera w ogóle wolnego witaminu B₁₂ (18) i jest stosunkowo łatwym do zdobycia materiałem w większych ilościach.

Wyniki

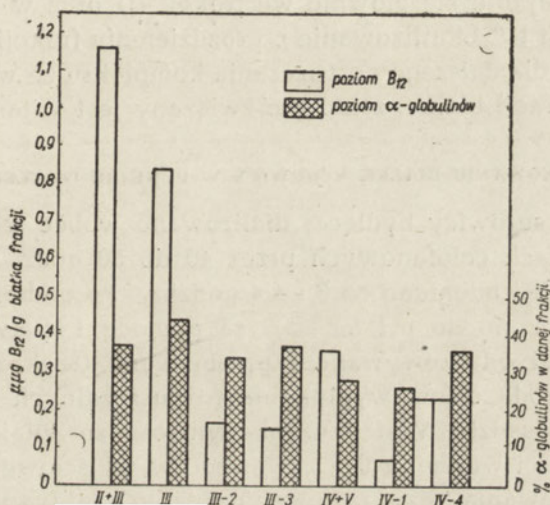
1. ROZMIESZCZENIE KOMPLEKSU WE FRAKCJACH COHNA

Preparaty poszczególnych frakcji rozpuszczano w 0,15 M NaCl przygotowując roztwory ok. 4%. Po wymieszaniu część nierozpuszczalną bia-

¹⁾ Doc. drowi K. Z a k r z e w s k i e m u za użyczenie mi preparatów frakcji Cohna składam serdeczne podziękowanie.

łek usuwano przez wirowanie i w roztworze oznaczano witamin B₁₂ po autoklawowaniu w 105° przez 60 min. Frakcje uzyskane za pomocą metody nr 11, tj. II + III, IV + V oraz VI, nie liofilizowano po wydzieleniu, przez co rozpuszczalność tych frakcji była znacznie większa niż rozpuszczalność pozostałych frakcji liofilizowanych.

Rys. 1 przedstawia rozmieszczenie formy związanej witaminu B₁₂ w poszczególnych frakcjach Cohna oraz stosunek stężenia witaminu do procentowej zawartości α-globulinów oznaczonej za pomocą elektrofo-



Rys. 1. Rozmieszczenie związanej postaci witaminu B₁₂ we frakcjach Cohna surowicy ludzkiej

rezy bibułowej w odpowiednich frakcjach. Na rysunku uwzględnione są tylko te frakcje, które zawierają witamin B₁₂; frakcje I (fibrynogen), II (γ-globuliny), III-1, V (albuminy) oraz VI nie zawierają w ogóle witaminu B₁₂, czyli białka tych frakcji nie zawierają fizjologicznego kompleksu cyjanokobalamina-białko. Z rysunku widać, że największą aktywność witaminu B₁₂ wykazują frakcje II + III, III oraz IV + V. Stosunek ilości witaminu przypadający na gram białka do procentowej zawartości α-globulinów, który nazywam wskaźnikiem witaminu B₁₂, jest w tych frakcjach szczególnie wysoki w odróżnieniu od pozostałych frakcji. Należy przy tym zwrócić uwagę na fakt, że w czasie dalszego rozdzielania poszczególnych frakcji, jak np. frakcji II + III na frakcje II i III, frakcji III na III-1, III-2 i III-3 oraz frakcji IV + V na frakcje IV i V, następuje znaczny spadek zawartości witaminu B₁₂ we frakcjach bardziej jednorodnych. Jest to spowodowane dwoma czynnikami: 1° w czasie

samego frakcjonowania pod wpływem takich zabiegów, jak doprowadzanie do odpowiedniego pH, duże stężenia alkoholu i obecność różnych jonów, następuje odszczepienie części najbardziej luźno związanego witaminu, co zostało potwierdzone w czasie dalszych badań, 2° liofilizowanie preparatów powoduje denaturację białka i stosunkowo małą rozpuszczalność frakcji III i IV. Tak np. stwierdzono, że prawie 60% ogólnej zawartości witaminu B₁₂ we frakcji III znajduje się w części białek nierozpuszczalnych w 0,15 M NaCl.

Z powyższych danych wynika, że związana postać witaminu B₁₂ w surowicy znajduje się głównie we frakcji III oraz w mniejszym stężeniu we frakcji IV. Liofilizowanie po rozdzieleniu frakcji jest zabiegiem niekorzystnym dla dalszego oczyszczania kompleksu ze względu na duży stopień denaturacji białka, z którym związany jest witamin B₁₂.

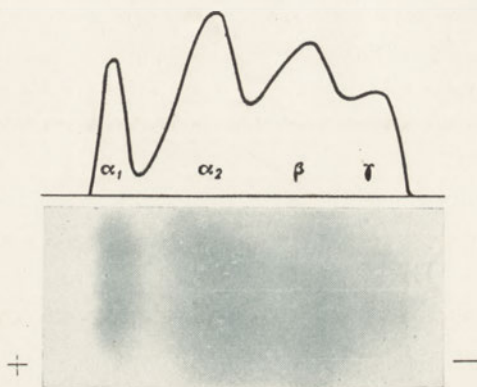
2. FRAKCJONOWANIE BIAŁEK SUROWICY W PUNKCIE IZOELEKTRYCZNYM

Ok. 150 ml surowicy bydlęcej dializowano wobec wody destylowanej w woreczkach celofanowych przez 40 do 50 godz. wśród ciągłego mieszania. Wodę zmieniano co 3 — 4 godziny. Po oddializowaniu surowicę doprowadzono do pH 5,2—5,3 za pomocą 1 N kwasu octowego, wytrącony osad odwirowywano i przemywano trzykrotnie podwójnie destylowaną wodą celem wypłukania rozpuszczalnych białek zaadsorbowanych na osadzie. W tak uzyskanym osadzie znajdowano prawie 100% aktywności witaminu B₁₂ zawartego w wyjściowej surowicy. Ten sposób postępowania przy izolowaniu różnych aktywnych białek surowicy stosowali inni autorowie (16) zwracając uwagę na zależność między siłą jonową a jakościowym składem nierozpuszczalnej frakcji białek surowicy. W toku tych badań okazało się, że odsolenie surowicy musi być znaczne, i badany kompleks wypadł dopiero wówczas, kiedy siła jonowa elektrolitów surowicy wahała się ok. 0,001. W czasie frakcjonowania osadu przy zastosowaniu roztworów soli o stężeniu od 0,001 do 0,2 M NaCl stwierdzono, że cała aktywność witaminu B₁₂ znajduje się we frakcji osadu rozpuszczalnej w 0,01 M NaCl. Wyniki tych doświadczeń zawarte są w tablicy 1.

Po oddzieleniu osadu białek nierozpuszczalnych w H₂O, czyli euglobulinów, surowica praktycznie nie zawiera już witaminu.

Stwierdzona w kilku przypadkach pewna aktywność witaminu B₁₂ w surowicy pozbawionej euglobulinów jest spowodowana wolnym witaminem, który zostaje odszczepiony od białka w czasie dializy i doprowadzania do punktu izoelektrycznego.

Przez wytrącenie euglobulinów z surowicy i ekstrakcję osadu 0,01 M NaCl otrzymuje się ok. 5-krotne zagęszczenie kompleksu, na co



Rys. 2. Elektroferogram oraz krzywa elektroforezy białek frakcji euglobulinowej surowicy bydłowej rozpuszczalnej w 0,01 M NaCl. Pasek barwiono czernią amidową 10 B

Tablica 1

Wytrącanie kompleksu witaminów B₁₂-białko z surowicy w punkcie izoelektrycznym

L.p.	μg witaminu B ₁₂ na 1 mg N				Stopień oczyszczenia
	surowica przed wytrąceniem frakcji euglobu- linów	surowica po wytrąceniu eu- globulinów	osad euglobu- linów rozpusz- czalny w 0,01 M NaCl	osad euglobu- linów rozpusz- czalny w 0,15 M NaCl	
1	5,7	0	19,5	0	3,4
2	6,4	0	35,3	0	5,5
3	23,8	nieznaczny wzrost glonu	85,5	0	3,6
4	4,8	0	24,2	0	5,0
5	7,6	0	19,7	0	2,6
6	23,5	nieznaczny wzrost	120,0	0	5,1
7	6,4	1,2	47,2	0	7,4
8	30,0	0	133,5	0	4,5
		średnia			4,6

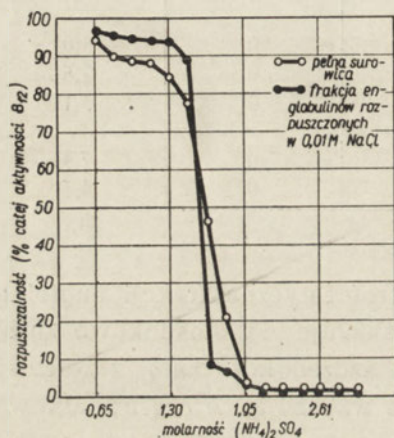
wskazują cyfry w tablicy. Analiza elektroforetyczna frakcji euglobulinów rozpuszczalnej w 0,01 M NaCl wskazuje na stosunkowo dużą zawartość frakcji α₁- i α₂-globulinów, a szczególnie małą zawartość γ-globulinów (por. rys. 2). Powyższe dane wskazują, że część białkowa kompleksu z witaminem B₁₂ należy do tzw. frakcji euglobulinów, nierozpuszczalnej w wodzie, a rozpuszczalnej przy stosunkowo niskim stężeniu soli, przy czym frakcja euglobulinów rozpuszczalna w 0,01 M NaCl reprezentuje głównie te frakcje globulinów białek surowicy, które specyficznie wiążą witamin B₁₂ (14).

3. FRAKJONOWANIE SUROWICY SIARCZANEM AMONU

Krzywe rozpuszczalności białek surowicy w (Am)₂SO₄ uzyskano przez zastosowanie metody podanej przez D e r r i e n (4), odpowiednio zmodyfikowanej. Roztwory soli w granicach stężeń od 0,65 do 2,90 M (20 do 90%) przygotowywano z nasyconego roztworu siarczanu amonu w temperaturze pokojowej. Wzrost stężenia soli w każdej następnej frakcji wynosił 0,16 M (5%). Do 9 ml roztworu soli o danym stężeniu dodawano 1 ml surowicy, czyli końcowe rozcieńczenie surowicy wynosiło 1:10, i po zamieszaniu próbki pozostawiano na 16 godz. w temp. pokojowej. Następnie zawartość każdej próbki sączono przez twardy sączek; w wypadku kiedy przesącz wykazywał

zmętnienie, sączono go powtórnie przez ten sam sączek. Poszczególne frakcje klarownego przesączu umieszczano w woreczkach celofanowych i dializowano wobec bieżącej wody wodociągowej przez 24 godz. Zawartość woreczków przenoszono do probówek i autoklawowano w 105° przez 60 min. Następnie 2 ml próbki roztworu autoklawowanego i bezbiałkowego brano do oznaczenia witaminu B_{12} .

Rys. 3 przedstawia krzywe rozpuszczalności kompleksu uzyskane dla surowicy bydłowej (kółka jasne) oraz dla frakcji euglobulinów rozpuszczalnej w 0,01 M NaCl, otrzymanej z surowicy bydłowej (kółka ciemne).



Rys. 3. Krzywe rozpuszczalności kompleksu witamin B_{12} -białko w $(NH_4)_2SO_4$ uzyskane przy badaniu surowicy bydłowej oraz frakcji euglobulinowej

Każda krzywa reprezentuje wyniki trzech serii oznaczeń. Krzywa wysalania kompleksu z pełnej surowicy wskazuje, że większa część całej aktywności witaminu B_{12} wypada przy stężeniu od 1,46 do 1,95 M $(NH_4)_2SO_4$. Odpowiada to mniej więcej rozpuszczalności α -globulinów w siarczanie amonu przy frakcjonowaniu białek surowicy (9).

Rozpuszczalność kompleksu we frakcji euglobulinowej przedstawia krzywa druga (kółka ciemne). Zakres stężenia siarczanu amonu, przy którym kompleks wypada całkowicie, jest w tym wypadku tylko nieco węższy. Pewna aktywność witaminu B_{12} , stwierdzana w przesączu nawet przy 90% nasycenia siarczanem amonu, jest

spowodowana obecnością wolnego witaminu, który pod wpływem dużego stężenia soli odszczepia się od białka.

4. PRÓBY ADSORPCJI KOMPLEKSU NA RÓŻNYCH ADSORBENTACH

Badania nad adsorpcją przeprowadzono z roztworami frakcji Cohna z roztworem frakcji euglobulinowej oraz z surowicą niefrakcjonowaną. Próbie poddano następujące adsorbenty: ziemia okrzemkowa, ziemia folsznicza, siarczan baru, wodorotlenek glinu, węgiel wapnia, tlenek glinu, bentonit, kaolin, żel krzemionkowy oraz celit nr 535.

Przebieg doświadczenia był następujący: mieszaninę frakcji Cohna zawierających witamin B_{12} rozpuszczano w 0,15 M NaCl, tak aby stę-

żenie białek rozpuszczalnych w roztworze wynosiło ok. 5%. Osad euglobulinów uzyskany przez dializę surowicy i wytrącenie w punkcie izoelektrycznym, rozpuszczano w 0,01 M NaCl i taki roztwór używano do badania. Surowicę niefrakcjonowaną rozcieńczano przed adsorpcją 5-krotnie wodą destylowaną. Na każde 10 ml danego roztworu dodawano 0,25 g adsorbentu, adsorbowano przez 1 godz. w temp. pokojowej ciągle mieszając, następnie po odwirowaniu adsorbentu w roztworze oznaczano witamin B₁₂ po uprzednim autoklawowaniu.

Wyniki zawarte w tabl. 2 dotyczą tych adsorbentów, które częściowo lub całkowicie adsorbują w powyższych warunkach kompleks białkowy z witaminem B₁₂. Pozostałe adsorbenty nie adsorbują w ogóle w tych warunkach bądź tylko w nieznacznym stopniu. Stwierdzono również, że kiedy adsorpcja z roztworu frakcji Cohna lub roztworu euglobulinów jest całkowita, to adsorbowanie wprost z surowicy zachodzi tylko w pewnym odsetku; prawdopodobnie jest to spowodowane obecnością w surowicy takich białek, które posiadają większe powinowactwo do adsorbentu niż badany czynnik.

Tablica 2

Adsorbowanie kompleksu z roztworu frakcji III i z roztworu frakcji euglobulinowej otrzymanej z surowicy bydlęcej

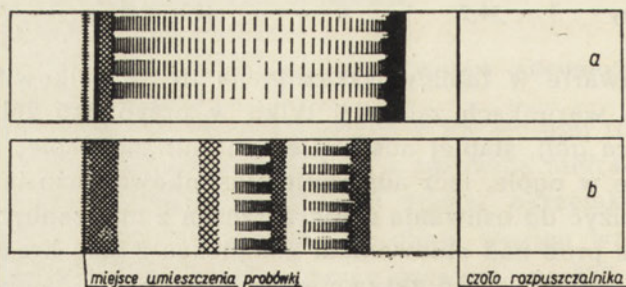
Adsorbent	Roztwór frakcji III(1)		Roztwór euglobulinów (2)		% zaadsorbowanej aktywności witaminu B ₁₂
	przed adsorpcją	po adsorpcji	przed adsorpcją	po adsorpcji	
	μg witaminu B ₁₂ na 1 ml roztworu				(1) (2)
celit 535	54,2	61,5	40,6	—	0 —
kaolin oczyszczony	54,2	47,0	40,6	31,5	13,3 22,0
bentonit	54,2	5,5	40,6	15,5	50,0 62,0
żel krzemionkowy sproszkowany	54,2	0	40,6	0	100,0 100,0

Liczby zawarte w tabelicy wskazują na to, że całkowita adsorpcja w opisanych warunkach zachodzi tylko w przypadku żelu krzemionkowego (*silica gel*), słabiej adsorbuje bentonit, naj słabiej kaolin. Celit nie adsorbuje w ogóle, lecz adsorbuje stosunkowo dużo innych białek, stąd może służyć do usuwania zanieczyszczeń z mieszaniny innych białek. W czasie prób nad eluowaniem kompleksu z żelu krzemionkowego ustalono, że znaczna ilość aktywności witaminu B₁₂ zaadsorbowanego daje się z żelu krzemionkowego wypłukać 0,1 M buforem fosforanowym z dodatkiem 0,075 M NaCl o pH 7,6. Następnie należało rozstrzy-

gnąć, czy adsorpcja oraz eluowanie dotyczy całego kompleksu, czy też tylko komponenty witaminowej. Za pomocą metody chromatografii bibułowej (patrz niżej) ustalono, że w eluacie znajdujący się witamin występuje w postaci związanej z białkiem.

Inne własności fizyko-chemiczne kompleksu

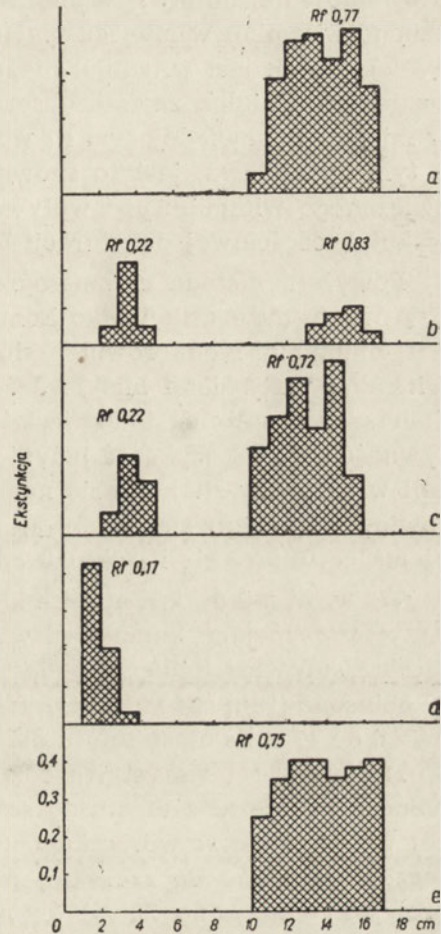
Rozdzielanie za pomocą chromatografii bibułowej. Dla dokładniejszego scharakteryzowania kompleksu zastosowano metodę chromatografii bibułowej. Posługiwano się techniką wstępującą (bibuła Whatman nr 4 o rozmiarach 6×32 cm). W czasie prób nad wyborem odpowiedniego składu fazy ruchomej ustalono, że najlepsze wyniki daje mieszanina 0,1M roztworu sacharozy z alkoholem izopropylowym w stosunku 1,5 : 1 (40% alkoholu). Badany roztwór (0,1 ml) umieszczano w postaci wąskiej smugi 4 cm powyżej dolnego końca paska i nie czekając na wyschnięcie umieszczano go w cylindrze wysyconym parami 40% alkoholu izopropylowego. Zapobiega to denaturacji oraz dużej adsorpcji białek na bibule w miejscu umieszczenia próbki. Chromatogram rozwijano do chwili, gdy front rozpuszczalnika osiągnął wysokość 18 cm licząc od miejsca umieszczenia próbki; czas rozwinięcia chromatogramu w temperaturze pokojowej wynosił ok. 12 do 15 godz. Po rozwinięciu chromatogram suszono na powietrzu, cięto na 1-cm. poprzeczne skrawki (18 skrawków z jednego chromatogramu), umieszczano je w ponumerowanych probówkach i dodawano po 3 ml 0,9% NaCl. Po kilku godzinach eluowania zawartość probówek autoklawowano i po 2 ml roztworu z każdej probówki brano do oznaczenia witaminu B₁₂. Równolegle rozwijano analogiczny chromatogram, który po wysuszeniu barwiono na obecność białek przy pomocy roztworu czerni amidowej 10 B (13).



Rys. 4. Chromatogram białek surowicy bydlęcej (a) oraz frakcji euglobulinowej (b); objaśnienie w tekście

Schemat chromatogramu z wykazanymi frakcjami białkowymi przedstawiony jest na rys. 4. Rys. 4a przedstawia chromatogram pełnej surowicy bydlęcej, rys. 4b przedstawia chromatogram roztworu frakcji euglobulinów rozpuszczalnej w 0,01 M NaCl. Oba chromatogramy otrzymano w identyczny sposób. Chromatogram białek surowicy wykazuje zasadniczo dwie intensywne plamy, jedną o niskim R_f , drugą o R_f ok. 0,8. Pomiedzy tymi dwoma plamami znajduje się rozwleczone długa plama białek o nierównomiernej intensywności zabarwienia. Wyraźne, pojedyncze frakcje przedstawia chromatogram roztworu euglobulinów (rys. 4b), który wykazuje kilka frakcji zupełnie dobrze od siebie oddzielonych.

Rys. 5 przedstawia diagramy rozmieszczenia aktywności witaminu B₁₂ po chromatograficznym rozdzielaniu: a) witamin B₁₂ krystaliczny, firmy Richter, 3 μ l roztworu zawierającego 1000 μ g B₁₂/ml, b) surowica bydlęca, c) surowica bydlęca z dodatkiem 1000 μ g krystalicznego B₁₂/ml, d) roztwór frakcji euglobulinów, e) 4% roztwór albuminów surowicy ludzkiej z dodatkiem 1000 μ g krystalicznego B₁₂/ml. Jak widać z diagramów, krystaliczny witamin B₁₂ oraz wolny witamin dodany w nadmiarze do surowicy (c) lub w obecności roztworu albuminów (e) wykazuje R_f ok. 0,8 i wędruje w postaci dość szerokiej plamy. Witamin B₁₂ w postaci kompleksu z białkiem w odróżnieniu od wolnego witaminu posiada bardzo niską wartość współczynnika R_f , w surowicy ok. 0,20, w roztworze frakcji euglo-



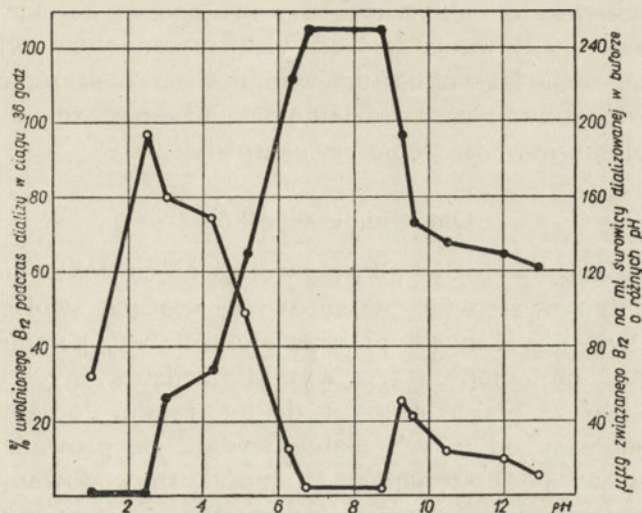
Rys. 5. Diagramy chromatogramów z rozmieszczeniem różnych form witaminu B₁₂: a) witamin B₁₂ krystaliczny, b) surowica bydlęca, c) surowica bydlęca po dodaniu krystalicznego witaminu, d) frakcja euglobulinów rozpuszczalna w 0,01 M NaCl, e) witamin B₁₂ krystaliczny w obecności albuminów surowicy ludzkiej (omówienie w tekście). Wartości E chlorofilu są miarą stężenia wit. B₁₂

bulinów tej samej surowicy ok. 0,17. Należy zaznaczyć, że różnice wartości R_f otrzymanej dla danej próbki w identycznie tych samych warunkach sięgają 10%. Jest to ogólna cecha wszystkich białek rozdzielanych za pomocą chromatografii bibułowej (8). W warunkach powyższego doświadczenia nie stwierdzono nigdy pozostawania wolnego lub związanego witaminu w miejscu umieszczenia próbki. Mimo że w surowicy bydlęcej brak jest witaminu niezwiązanego, to po chromatograficznym rozdzielaniu białek zawsze obserwuje się pewną aktywność witaminu w miejscu odpowiadającym R_f wolnego witaminu B_{12} (rys. 5b). Jak już o tym była mowa, jest to spowodowane odszczepieniem części luźno związanego witaminu pod wpływem działania stężonego alkoholu oraz wskutek częściowej denaturacji białka.

Powyzsza metoda chromatograficznego badania połączeń witaminu B_{12} oddaje duże usługi jako kontrola obecności wolnego i związanego witaminu, może ona również służyć do określania ilości związanego witaminu przez dane białko. Jeżeli zawartość B_{12} w surowicy jest mniejsza od stężenia białka wiążącego witamin, mikrobiologiczna aktywność daje się wykazać jedynie w plamie o R_f ok. 0,2. Natomiast jeżeli w surowicy znajduje się nadmiar witaminu, np. po dodaniu do surowicy większego stężenia B_{12} , wówczas aktywność okazuje również plama cechująca się R_f ok. 0,8 odpowiadająca wolnemu witaminowi.

T r w a ł o ś ć k o m p l e k s u w z a l e ż n o ś c i o d p H. Krzywą dysocjacji kompleksu w zależności od pH otrzymano posługując się surowicą bydlęcą, poddając ją dializie wobec buforu Britton i Robinsona (19) ($0,04\text{ M H}_3\text{PO}_4$, H_3BO_3 , $\text{CH}_3\text{COOH} + 0,2\text{ N NaOH}$) o pH od 2,0 do 12,0. Zamiast buforu dla pH 1,0 użyto $0,1\text{ N HCl}$, dla pH 13,0 — $0,1\text{ N NaOH}$. pH wszystkich roztworów buforowych kontrolowano za pomocą pH-metru z elektrodą szklaną. 10 ml świeżej surowicy bydlęcej umieszczano w woreczku celofanowym i szczelnie zawiązany woreczek wkładano do szerokiej probówki wirówkowej. Następnie do probówki dodawano 20 ml buforu o odpowiednim pH i zamykano szczelnie korkiem gumowym. Wszystkie probówki przytwierdzano na obwodzie kołowej tarczy drewnianej, która za pomocą motorka elektrycznego była wprawiana w ruch w płaszczyźnie pionowej, przez co zapewniono dokładne mieszanie zawartości probówek. Czas dializy wynosił 36 do 48 godz. Po ukończeniu dializy surowicę brano do badania na obecność wolnego witaminu B_{12} (0,2 ml) oraz na obecność związanego witaminu (po rozcieńczeniu 1 : 10,2 ml) po uprzednim autoklawowaniu. Wyniki tych doświadczeń przedstawiono na rys. 6.

Krzywa oznaczona kółkami jasnymi przedstawia procent uwolnionego witaminu B_{12} w czasie dializy przy danym pH, obliczony w stosun-



Rys. 6. Krzywa dysocjacji kompleksu w zależności od pH (o—o) oraz poziom związanego witaminy w surowicy bydlęcej (●—●) po dializie przy różnych pH

ku do całkowitej zawartości związanego witaminy w surowicy z uwzględnieniem poprawki na ilość przedializowanego witaminy do buforu. Krzywa oznaczona kółkami ciemnymi przedstawia poziom związanego witaminy w ml surowicy, oznaczony w próbkach surowicy dializowanej przy różnych pH. Krzywa dysocjacji wykazuje, że połączenie witaminy B₁₂ z białkiem, występujące w surowicy, jest połączeniem trwałym w zakresie pH od ok. 6,5 do 8,7 w buforze Brittona i Robinsona. Z krzywej dalej wynika, że maksymalna ilość (ok. 97%) związanego witaminy zostaje odszczepiona w tych warunkach przy ok. pH 2,4. Przy pH 1,0 następuje duży spadek aktywności witaminy, spowodowany zniszczeniem struktury cząsteczki działaniem dużego stężenia jonów wodorowych. Po stronie zasadowej skali pH maksymalna aktywność wolnego witaminy dochodzi zaledwie do 26% i w miarę wzrostu pH aktywność w dalszym ciągu spada. Jak to wykazali Brink i Folkers (1), krystaliczny witamin B₁₂ w środowisku 0,01 N HCl w temp. pokojowej po 23 godz. traci ok. 75% pierwotnej aktywności, natomiast w 0,015 N NaOH po tym samym okresie czasu pozostaje zaledwie 10% pierwotnej aktywności witaminy B₁₂. Krzywa poziomu związanego witaminy w tej samej surowicy jest zgodna z powyższymi wywodami, tzn. maksymalną ilość witaminy znajduje się między pH 2,4 — 8,7. Przy pH 1,0 związanego witaminy nie stwierdza się, natomiast w części zasadowej skali pH po autoklawowaniu surowicy

obserwuje się większą aktywność B_{12} niż przed autoklawowaniem. Prawdopodobnie inaktywacja w środowisku zasadowym związanej postaci witaminu zachodzi wolniej niż witaminu już odszczepionego, przy czym, mimo denaturacji białka działaniem dużego stężenia jonów OH , witamin od białka nie odszczepia się całkowicie.

Omówienie wyników

Przedstawione powyżej wyniki pozwalają nieco dokładniej scharakteryzować białko występujące w surowicy, wiążące swoiście witamin B_{12} . Jak już była o tym mowa, podczas elektroforezy kompleks ten wędruje z frakcją α -globulinów (14), a wyniki przedstawionych badań przemawiają również za przynależnością do tej frakcji. Podjęte próby oddzielenia kompleksu od innych białek wydają się prowadzić do celu, jakkolwiek wiążą się z szeregiem trudności spowodowanych przede wszystkim bardzo małym stężeniem tego białka w surowicy oraz bardzo żmudną i zabierającą dużo czasu metodą kontroli procesu oczyszczania, jaką jest metoda mikrobiologiczna.

Fracjonowanie surowicy alkoholem według Cohna nie daje zadowalających wyników z tego względu, że kompleks nie wypada w jednej frakcji, lecz rozdziela się między frakcje III i IV. W czasie frakcjonowania alkoholem oraz w czasie liofilizacji zachodzi znaczna denaturacja białek, przy czym — jak zostało stwierdzone — denaturuje również białko kompleksu, co uniemożliwia dalsze oczyszczanie oraz powoduje duże straty w wydajności. W miarę dalszego rozdzielania na podfrakcje uzyskuje się coraz to mniej korzystny stosunek stężenia witaminu do jednostki masy białka, co jest spowodowane zarówno odszczepieniem części witaminu od białka, jak i denaturacją białka kompleksu.

Przez wytrącenie z surowicy białek nierozpuszczalnych w wodzie wykazano, że kompleks należy do tzw. frakcji euglobulinów, rozpuszczalnej w 0,01 M NaCl. Analiza elektroforetyczna oraz mikrobiologiczna na obecność witaminu B_{12} wykazała, że kompleks jest α -euglobulinem dającym się prawie ilościowo wytrącić z surowicy po jej dostatecznym odsoleniu. Zabieg ten pozwala na ok. 5-krotne zagęszczenie kompleksu. Rozpuszczalność kompleksu w siarczanie amonu odpowiada w zasadzie rozpuszczalności α -globulinów i większa część związanego witaminu B_{12} wydziela się między stężeniami 1,46 do 1,95M (45—60%). Jakkolwiek frakcja otrzymana między 1,46 do 1,95M $(Am_2)SO_4$ wykazuje jeszcze obecność β -globulinów, to głównie jednak zawiera α_1 - i α_2 -globuliny. Dalsze więc oczyszczanie musi polegać na oddzieleniu reszty β -globulinów oraz ewentualnie α_2 -globulinów, które zawierają znacznie mniej witaminu B_{12} niż α_1 -globuliny.

Badania nad adsorbowaniem na różnych adsorbentach wykazały możliwość zastosowania tej metody do oczyszczania kompleksu zarówno przez adsorbowanie właściwego białka, jak i przez usuwanie zanieczyszczeń. Jakkolwiek żel krzemionkowy adsorbuje bardzo małe ilości innych białek, po adsorpcji kompleksu z roztworu frakcji euglobulinów rozpuszczalnej w 0,01 M NaCl stwierdza się w eluacie elektroforetycznie obecność nie tylko α -globulinów, ale również β - i γ - — co wskazuje na to, że żel krzemionkowy nie jest swoistym adsorbentem dla kompleksu.

W poprzednich naszych pracach (14, 18) wykazaliśmy, że witamin B₁₂ uwalnia się z połączeń z białkami po godzinnym autoklawowaniu w 105°, co wskazywałoby na dość silne wiązanie między witaminem i białkiem. Wykazano jednak, że część witaminu odszczepia się już przy pH poniżej 6,5 oraz powyżej pH 8,7, czyli wiązanie tej części witaminu nie może być tak silne, aby wymagało aż godzinowego autoklawowania. Prawdopodobnie pewna część witaminu jest związana zupełnie luźno i ulega łatwo odszczepieniu pod działaniem stosunkowo łagodnych czynników, jak nieznaczne zmiany pH, duże stężenie soli, alkoholu lub ogrzewania. Poza tym na trwałość kompleksu wpływają różne czynniki, jak skład jakościowy elektrolitów oraz ich siła jonowa. Stwierdzono np., że w czasie autoklawowania surowicy w 105° po 10 min. uwalnia się zaledwie 10% tej ilości witaminu, jaka uwalnia się po godzinnym autoklawowaniu. Natomiast przy autoklawowaniu roztworu frakcji euglobulinów rozpuszczalnej w 0,01 M NaCl uwalnia się już ok. 80% ogólnej ilości związanego witaminu po 10-min. autoklawowaniu w tych samych warunkach. Fakt ten obserwowano również w czasie badania innych połączeń witaminu B₁₂ z białkami, występujących w erytrocytach, leukocytach oraz mitochondriach komórek wątroby (18). Wynika stąd, że przez zmianę fizjologicznego środowiska, w którym występuje kompleks, następuje rozluźnienie i rozszczepienie wiązania między witaminem i danym białkiem. Technika chromatograficzna opisaną w tej pracy również wykazano obecność luźnego połączenia witaminu z białkiem w surowicy, które ulega rozszczepieniu w warunkach doświadczenia.

Na podstawie prac naszych oraz innych autorów można scharakteryzować w dość znacznym stopniu własności proteidu występującego w surowicy, specyficznie wiążącego cyjanokobalaminę. Podobne połączenia wyizolowane z innych materiałów (2, 5, 7, 21), w których połączenia te, występując w znacznie większych stężeniach niż w surowicy krwi, mogły być przebadane dokładniej pod względem fizyko-chemicznym. Połączeniom tym nadano odpowiednie nazwy, jak np. erytrotyna

i eryteina — połączenia cyjanokobalaminy z czynnikiem wewnątrzpochodnym C a s t l e' a (20), „pink protein” — kompleks otrzymany z serwatki mleka świńskiego (7). Dla analogicznego połączenia, występującego w surowicy krwi, zaproponowaliśmy w jednej z poprzednich naszych prac nazwę erytroglobulin (18), która ma charakteryzować jego własności, a nie funkcję biologiczną, dotychczas nie znaną. Ostatnio G l a s s i współprac. (6) dla tegoż połączenia zaproponowali nazwę B₁₂-transferyna, analogicznie do nazwy Fe-transferyna, przy czym autorowie zakładają, że rola tego białka sprowadza się tylko do transportu cyjanokobalaminy w organizmie. Termin wprowadzony przez nas wydaje się mieć bardziej obiektywne znaczenie, nie sugerując z góry fizjologicznej roli kompleksu.

Kierownikowi Zakładu, prof. doktorowi B. S k a r ż y ń s k i e m u, za pomoc przy wykonywaniu tej pracy składam na tym miejscu serdeczne podziękowanie. Również czuję się w obowiązku podziękować magistrów A. N i e w i a r o w s k i e j i Z. Ż a k o w i za pomoc przy oznaczeniach mikrobiologicznych.

Streszczenie

Badano własności kompleksu cyjanokobalamina-białko, występującego w surowicy krwi, i ustalono następujące fakty:

1. Kompleks cyjanokobalamina-białko podczas frakcjonowania surowicy ludzkiej etanolem wg metody Cohna wypada we frakcji III i w ok. 3 razy mniejszym stężeniu we frakcji IV, biorąc za podstawę stężenie cyjanokobalaminy oznaczonej mikrobiologicznie za pomocą *Euglena gracilis*.

2. Przez wytrącenie białek surowicy bydłłej nierozpuszczalnych w wodzie wykazano, że kompleks należy do frakcji α -euglobulinów rozpuszczalnej w 0,01 M NaCl.

3. Stwierdzono, że przy frakcjonowaniu surowicy siarczanem amonu wg metody Derrien, kompleks wypada przy stężeniu od 1,46 do 1,95 M roztworu siarczanu amonu, co w przybliżeniu odpowiada rozpuszczalności α -globulinów surowicy.

4. Kompleks adsorbowany jest przez sproszkowany żel krzemionkowy oraz w mniejszym stopniu przez bentonit i kaolin. Nie jest adsorbowany przez celit oraz inne adsorbenty tej grupy.

5. W 0,04 M buforze Britton i Robinsona kompleks jest trwały tylko w zakresie pH od ok. 6,5 do 8,7; powyżej i poniżej tych wartości pH następuje odszczepienie wolnego witaminu.

6. Opisano technikę chromatograficznego badania wolnego i związanego witaminu B₁₂ w różnych materiałach biologicznych. Przedyskutowano możliwość zagęszczenia kompleksu na podstawie uzyskanych wyników.

LITERATURA

1. Brink N. G. i Folkers B., *Science*, **112**, 354, 1950.
2. Chow B. F. i Yamamoto R., *Feder. Proc.* **12**, 189, 1953.
3. Cohn E. J., Gurd F. R. N., Surgenot D. M., Barnes B. A., Brown R. K., Deronaux G., Gilbespie J. M., Kahut F. W., Lever W. F., Liu C. H., Mittelman D., Monton-R. F., Schmidt K. i Uroma E., *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 465, 1950.
4. Derrien Y., *Biochim. Biophys. Acta*, **8**, 631, 1952.
5. Glass G. B. J., Boyd L. J., Rubinstein M. A. i Svirgall Ch. S., *Science*, **115**, 101, 1952; *Gastroenterology*, **23**, 219, 1953.
6. Glass G. B. J., Boyd L. J. i Stephanson L., *Science*, **120**, 74, 1954.
7. Gregory M. E. i Holdsworth E. S., *Nature*, **173**, 830, 1954.
8. Hais I. M. i Macek K., *Papírová Chromatografie*, Praha 1954. Nakladelství Československé Akademie Ved. str. 259.
9. Haurowitz F., *Chemistry and Biology of Proteins*, 1950, wyd. ros. Moskwa 1953, str. 172.
10. Horrigan D. L. i Heinle R. W., *J. Lab. Clin. Med.*, **40**, 811, 1952.
11. Lever W. F., Gurd F. R. N., Uroma E., Brown R. K., Barnes B. A., Schmidt K. i Shultz E. J., *J. Clin. Invest.* **30**, 99, 1951.
12. Mollin D. L. i Ross G. I. M., *J. Clin. Pathol.*, **5**, 129, 1952.
13. Ostrowski W. i Mikucki A., *Acta Physiol. Pol.* **3**, 277, 1952.
14. Ostrowski W., Skarżyński B. i Zak Z., *Bull. Acad. Pol. Sci.* **2**, 9, 1954; *Acta Biochim. Pol.* **1**, 13, 1954.
15. Pitney W. R., Board M. F. i van Loon E. J., *J. Biol. Chem.* **207**, 143, 1954.
16. Reid A. F. i Jones F., *Ind. Eng. Chem.*, **43**, 1074, 1951.
17. Ross G. I. M., *J. Clin. Pathol.* **5**, 250, 1952.
18. Skarżyński B., Ostrowski W., Niewiarowska A. i Zak Z., *Acta Biochim. Pol.* **2**, 115, 1955.
19. Struszyński M., *Analiza ilościowa i techniczna*, T. I. Warszawa 1954, PWN, str. 210.
20. Termberg J. L. i Eakin R. E., *J. Am. Chem. Soc.* **71**, 3858, 1949.
21. Wijmenga H. G. i Thompson K. W., *Biochim. Biophys. Acta.* **13**, 144, 1954.

СОЕДИНЕНИЯ ВИТАМИНА В₁₂ С БЕЛКАМИ.

III. ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИАНОКОВАЛАМИНО-БЕЛКОВОГО КОМПЛЕКСА (ЭРИТРОГЛОБУЛИНА) В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Резюме

Были исследованы свойства цианокобаламино-белкового комплекса, входящего в состав сыворотки, причем обнаружено было следующее:

1. При фракционировании человеческой сыворотки этанолом, согласно методу Кона № 10 цианокобаламино-белковый комплекс выпадает в осадок в III фракции, тогда как в IV фракции осадок почти втрое меньше, если примем за исходную точку концентрацию цианокобаламина, определяемого микробиологически посредством *Euglena gracilis*.

2. Путем осаждения белков сыворотки скота, не растворимых в воде, было обнаружено, что исследуемый комплекс принадлежит к фракции α -эуглобулинов, растворимой в 0,01 M NaCl.

3. Обнаружено, что при фракционировании сыворотки посредством сернокислого аммония по методу Дерриэна, комплекс выпадает в осадок при концентрации от 1,46 до 1,95 M раствора сернокислого аммония, что приблизительно соответствует растворимости α -глобулинов сыворотки.

4. Комплекс этот поглощается мелко раздробленным кремнеземным гелем и в меньшей степени — бентонитом и каолином; он не поглощается ни целитом, ни другими поглотителями этой группы.

5. В 0,04 M буфере Бриттона и Робинсона комплекс устойчив только при pH от 6,5 до 8,7; свободный витамин отщепляется при высшем и низшем pH.

PROTEIN-VITAMIN B₁₂ COMPLEXES

III. STUDIES ON THE CYANOCOBALAMINE-PROTEIN COMPLEX (ERYTHROGLOBULIN) IN BLOOD SERUM

Summary

Properties of cyanocobalamine-protein complex have been investigated and the following facts have been established:

1. Cyanocobalamine-protein complex precipitates out from the III fraction of human serum fractionated by Cohn's ethanol method. The concentration of the complex in the IV fraction is approximately three times smaller, the concentration measurement of cyanocobalamine being based on the microbiological determinations with *Euglena gracilis*.

2. It has been proved while precipitating bovine serum proteins, insoluble in water, that the investigated complex belongs to α -euglobulin fraction, soluble in 0,01 M NaCl.

3. The complex separates out from serum, fractionated by the method of Derrien, in 1,46 — 1,96 M ammonium sulfate solution. Thus the solubility of the complex resembles that of α -globulin group.

4. The complex is adsorbed on pulverized silica gel and to a smaller extent on bentonit and kaolin. It is not adsorbed on celite and the related adsorbents.

5. The complex is stable in 0,04 M Britton-Robinson buffer in the 6,5 — 8,7 pH range. The vitamin splits off in lower and higher pH values.

6. The chromatographic technique has been described suitable for investigating both free and the bound form of vitamin B₁₂ in different biological materials. Possibilities of purification the complex have been discussed.

Otrzymano 3.III.1955

IGNACY REIFER, ANTONINA RUMIŃSKA i JERZY KĄCZKOWSKI

WSTĘPNE BADANIA NAD WPŁYWEM ŻELAZICYJANKU POTASU NA PLON I ZAWARTOŚĆ ALKALOIDÓW

W *DATURA STRAMONIUM L*

Zakład Biochemii SGGW i Zakład Szczegółowej Uprawy Roślin SGGW

Kierownik Zakładu
Prof. dr I. Reifer

Kierownik Zakładu
Prof. dr A. Listowski

Datura stramonium Linne (bieluń dziedzierzawa) jest rośliną wprowadzoną do uprawy w 1950 roku. Zawiera we wszystkich swych częściach hyoscyaminę oraz inne alkaloidy tropowe i dzięki temu ma zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym do produkcji mieszanek przeciwastmatycznych i do otrzymywania powyższych alkaloidów. Głównym surowcem leczniczym są liście, szczególnie młode, ze względu na najwyższą zawartość alkaloidów.

W roku 1954 na poletkach doświadczalnych SGGW przeprowadzono wstępne badania nad wpływem na plon oraz zawartość alkaloidów w poszczególnych częściach rośliny, moczenia nasion i podlewania roślin roztworem żelazicyjanku potasu. Doświadczenia przeprowadzono na powierzchni około 75 m² na glebie typu bielicy pyłowej.

Przed wysiewem moczone nasiona w 0,1%-owym roztworze żelazicyjanku potasu aż do ukazania się kiełków. Równocześnie nasiona kontrolne moczone w wodzie. Kiełki w obu wypadkach ukazywały się po 6 dniach.

Wysiewu w pole dokonano dnia 24.V.54 r. w odstępach 50 × 50 cm. Wschody roślin, zarówno traktowanych, jak i kontrolnych ukazały się prawie równocześnie około 4.VI.54 r.

Dnia 6.VII.54 r. rośliny moczone w żelazicyjanku potasu, podlano 0,1%-owym roztworem tego związku w ilości 250 ml roztworu na roślinę. Rośliny kontrolne podlano równocześnie taką samą ilością wody.

W czasie wzrostu roślin dokonano trzykrotnie pomiarów długości części nadziemnej i części podziemnej roślin, nie stwierdzając istotnych różnic we wzroście między roślinami traktowanymi i kontrolnymi, co ilustruje tablica 1.

Tablica 1

Średnie długości części nadziemnych i podziemnych roślin

Data pomiaru	Ilość roślin		Długość części nadziemnej w cm		Długość części podziemnej	
	ż	k	ż	k	ż	k
6.VII.54	22	25	27,27	29,28	16,40	17,17
29.VII.54	5	5	76,20	71,00	25,00	27,00
10.IX.54	5	5	84,20	88,20	29,00	35,00

ż — oznacza rośliny traktowane żelazicyjankiem potasu,

k — oznacza rośliny kontrolne.

W okresie wegetacji dokonano dwóch zbiorów, a mianowicie podczas pełnego kwitnienia oraz w czasie dojrzewania owoców.

Na materiale uzyskanym z obu zbiorów dokonano oznaczenia masy poszczególnych części roślin, ilości poszczególnych organów (liści, pączków i owoców) oraz transpiracji liści metodą Arlanda. Równocześnie oznaczono zawartość alkaloidów w poszczególnych częściach rośliny kolorymetryczną metodą Reifera i Buchowicza (1).

Z pomiarów masy i ilości sztuk poszczególnych części roślin wynika, że traktowanie żelazicyjankiem potasu wpływa na przedłużenie okresu kwitnienia (tabl. 2).

Tablica 2

Waga poszczególnych części rośliny w gramach (średnio na 1 roślinę)

Zbiór	Korzenie		Łodygi		Liście		Pączki				Owoce			
	g		g		g		g		sztuk		g		sztuk	
	ż	k	ż	k	ż	k	ż	k	ż	k	ż	k	ż	k
I	28	30	136	136	144	125	5,1	3,5	—	—	27	37	4,4	4,4
II	49	35	186	202	55	60	1,1	0,5	5,6	2,2	198	228	30	28

Zawartość alkaloidów w poszczególnych częściach rośliny (z wyjątkiem liści) u roślin traktowanych układa się w stosunku do kontrolnych w sposób różnorodny. W pierwszym zbiorze stwierdzono brak istotnych różnic bądź nawet mniejsze ilości alkaloidów, w drugim zbiorze natomiast otrzymano wyższe wyniki w przypadku nasion i owocni roślin traktowanych. Uzyskane wyniki podaje tablica 3.

Wyniki uzyskane na liściach w obu zbiorach wskazują na wyraźny wpływ żelazicyjanku potasu na masę i ilość liści, szczególnie młodych, oraz na zawartość w nich alkaloidów. Załączona tablica 4 zestawia uzyskane wyniki odnośnie do liści oraz masę alkaloidów w miligra-

Tablica 3

Zawartość alkaloidów w poszczególnych częściach roślin oraz %-owy przyrost w stosunku do roślin kontrolnych

	I zbiór			II zbiór		
	% alkaloidów		Przyrost w %	% alkaloidów		Przyrost w %
	k	ż		k	ż	
pączki	0,142	0,127	- 10,5	—	—	—
kwiaty	0,040	0,035	- 12,5	—	—	—
łodygi	0,045	0,053	+ 17,7	0,006	0,009	
korzenie	0,006	0,005	- 16,6	0,039	0,039	± 0
owoce niewykształcone	0,045	0,046	+ 2,2	0,166	0,166	± 0
owocnie niedojrzałe	0,015	0,015	± 0	0,014	0,015	+ 7,1
owocnie dojrzałe	—	—	—	0,054	0,059	+ 9,2
nasiona niedojrzałe	—	—	—	0,190	0,196	+ 3,1
nasiona dojrzałe	—	—	—	0,230	0,260	+ 13,0

Uwaga: w przypadku łodyg w drugim zbiorze nie podano %-owego przyrostu alkaloidów, gdyż ze względu na niską ich zawartość w próbach błąd oznaczenia był wysoki.

Tablica 4

Ilość i masa liści oraz zawartość alkaloidów w ‰ i masa alkaloidów w przeliczeniu na 1 roślinę

Rodzaj liści	Ilość liści		Masa liści w gramach		% -owa zawartość alkaloidów		Masa alkaloidów na 1 roślinę		% -owy przyr. wagi liś.	% -owy przyr. alkal.
	k	ż	k	ż	k	ż	k	ż		
I zbiór 29.VIII										
liście dojrzałe	7,0	6,7	53,6	53,9	0,085	0,092	45,6	49,6	11,75	8,80
liście młodsze	31,4	39,7	56,6	86,3	0,167	0,167	94,5	144,1	52,47	63,05
liście najmlod.	27,0	39,5	5,0	6,4	0,199	0,201	9,9	12,9	28,20	29,45
razem I zbiór	65,4	85,9	115,2	146,6			150,0	206,6	28,13	37,70
II zbiór 10.IX										
liście dojrzałe	6,5	12,0	17,0	17,7	0,169	0,186	28,7	32,9	4,11	14,58
liście młodsze	4,2	36,3	21,5	26,1	0,225	0,226	48,4	59,0	16,74	21,95
liście najmlod.	31,7	134,0	16,0	21,8	0,206	0,225	32,9	49,0	36,25	48,75
razem II zbiór	42,4	182,0	54,5	65,6			110,1	141,0	20,36	27,35
obydwa zbiory	207,8	268,0	169,7	212,2			260,1	347,5	25,05	36,62

mach, zawartą w liściach jednej rośliny. Uzyskany %owy wzrost średniego plonu liści z jednej rośliny — 25% oraz wzrost ogólnej masy alkaloidów w jednej roślinie o 36,6% wskazuje na celowość prowadzenia dalszych doświadczeń na ten temat.

W tablicy 5 podano wyniki transpiracji liści, oznaczonej metodą Arlanda. Uzyskane wartości nie wykazują istotnych różnic.

Tablica 5
Transpiracja liści w ‰‰

Rodzaj liści	I zbiór		II zbiór	
	ż	k	ż	k
liście dojrzałe	5,96	6,78	2,75	
liście młodsze	5,40	6,52	5,46	3,92
liście najmłodsze	3,92	2,20	5,38	5,09

Dyskusja

Wyniki niniejszej pracy co do zawartości alkaloidów w poszczególnych częściach roślin nie są całkowicie zgodne z danymi literatury, opartymi na oznaczaniu alkaloidów metodami bądź grawimetrycznymi, bądź alkacymetrycznymi, a podającymi zawartość tych związków średnio od 0,2 do 0,48% (2). W przypadku nasion i liści mieszczą się one wprawdzie w podanych granicach, ale są bliskie wartości minimalnych. Pozostałe wartości są na ogół niższe od podawanych w literaturze. „Farmakopea Polska” III (3) podaje wymaganą zawartość alkaloidów w liściach *Datura stramonium* jako nie mniejszą niż 0,2%, co jest zgodne z wynikami uzyskanymi w niniejszej pracy. Powyższe różnice wynikają z zastosowania do oznaczenia alkaloidów metody kolorymetrycznej Reifera i Buchowicza (1), będącej w danych warunkach metodą specyficzną, charakterystyczną wyłącznie dla alkaloidów pochodnych tropanu.

Porównanie wyników zawartości alkaloidów w roślinach kontrolnych i traktowanych żelacyjankiem potasu w większości wypadków wskazuje na dodatni kierunek działania tego związku. Wprawdzie w I zbiorze przyrost alkaloidów w roślinach traktowanych stwierdzono jedynie u liści, łodyg i owoców niewykształconych, a w pozostałych przypadkach stwierdzono spadek lub brak różnic, jednak II zbiór w prawie wszystkich przypadkach wykazuje wzrost zawartości alkaloidów w roślinach traktowanych. Jedynie w korzeniach i owocach niewykształconych tego zbioru nie stwierdzono żadnych różnic.

W przypadku liści natomiast zaobserwowano w obu zbiorach wyraźny wzrost zawartości alkaloidów. Jedynie liście młodsze obu zbiorów nie wykazały istotnych różnic. Wyniki te wspólnie z uzyskanym wyraźnym przyrostem masy liści o 25% dają znaczny wzrost bezwzględnej ilości uzyskanych alkaloidów w przeliczeniu na jedną roślinę, mianowicie o 36,6%. Ponieważ liście, jak wiadomo, są głównym surowcem farmaceutycznym, wyniki powyższe wskazują na praktyczne znaczenie dalszego prowadzenia niniejszych doświadczeń.

Również duże znaczenie z punktu widzenia selekcji w hodowli tej cennej rośliny może posiadać wzrost zawartości alkaloidów w traktowanych nasionach o 13%.

Jakkolwiek wyniki, uzyskane na podstawie uboższego materiału doświadczalnego oraz jednorocznej obserwacji, nie upoważniają do wyciągnięcia konkretnych wniosków, jednakże otrzymane dane pozwalają na stwierdzenie kierunku działania żelazicyjanku potasu na *Datura stramonium* L. Stwierdzony wpływ na przedłużenie okresu kwitnienia i zwiększenia plonu liści oraz zawartości w nich alkaloidów może mieć znaczenie zarówno teoretyczne, jak i praktyczne.

Streszczenie

Przeprowadzono wstępne obserwacje nad wpływem moczenia nasion i podlewania roślin żelazicyjankiem potasu na plon i zawartość alkaloidów w poszczególnych częściach rośliny *Datura stramonium* Linne.

W wyniku badań stwierdzono:

1. Przyrost plonu liści u roślin traktowanych średnio o 25%.
2. Przyrost masy pączków w obydwu zbiorach, co wskazuje na przedłużenie okresu kwitnienia w roślinach traktowanych.
3. Wzrost zawartości alkaloidów w liściach, co łącznie z przyrostem plonu daje wzrost masy alkaloidów na jedną roślinę o 36,6%.
4. Wzrost zawartości alkaloidów w nasionach roślin traktowanych o 13%.

LITERATURA

1. J. Reifer, J. Buchowicz. *Acta Biochim. Pol.* 2, 187, 1955.
2. G. Klein — *Handbuch der Pflanzenanalyse*, Springer Wiedeń, 1933, t. III, s. 528-9.
3. *Farmakopea Polska III* — 1954 s. 263.

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ОПЫТЫ НАД ВЛИЯНИЕМ ЖЕЛЕЗОСИНЕРОДИСТОГО КАЛИЯ НА УРОЖАЙ *DATURA STRAMONIUM L.* И НА СОДЕРЖАНИЕ АЛКАЛОИДОВ

Резюме

Проведены были предварительные наблюдения над влиянием обработки семян и цоливки растений раствором железосинеродистого калия на урожай и содержание алкалоидов в отдельных частях растения *Datura stramonium Linne*. В результате установлено следующее:

1. Урожай листьев опытных растений сравнительно с контролем повысился на 25%.

2. Количество бутонов в двух сборах возросло, что свидетельствует об увеличении продолжительности периода цветения опытных растений.

3. Повысилось содержание алкалоидов в листьях опытных растений, что в связи с увеличением урожая дает прирост массы алкалоидов в 36,6% на 1 растение.

4. Количество алкалоидов в семенах опытных растений возросло на 13%.

PRELIMINARY INVESTIGATION ON THE INFLUENCE OF FERRICYANIDE ON THE YIELD AND AMOUNT OF TROPINE ALKALOIDS IN *DATURA STRAMONIUM L.*

Summary

Seeds of *Datura stramonium Linné* were soaked and the young plants „watered” with a 0,1% solution of potassium ferricyanide. On the basis of preliminary observations the following conclusions were arrived at:

1. The yield of leaves of the treated plants increased on the average by 25% when compared with untreated control plants.

2. The total weight of the blossoms increased considerably, suggesting a lengthened period of flowering.

3. The total alkaloid content of the leaves was consistently higher in the treated plants, which together with the increased yield of leaves amounts to a 36,6% rise in the total alkaloids per plant.

4. The alkaloid content of the seeds from treated plants was 13% higher than in the untreated control plants.

Otrzymano 16.III.1955

JERZY PAWEŁKIEWICZ

PREKURSORY BIOSYNTETY NUKLEOTYDOCYJANOKOBALAMIN

III. WPLYW DZIAŁANIA AUREOMYCYNY NA SYNTEZĘ WITAMINÓW GRUPY B₁₂
PRZEZ BAKTERIE KWASU PROPIONOWEGO

Z Zakładu Biochemii Żywności WSR w Poznaniu
Kierownik Zakładu: Prof. dr J. Janicki

Już od dawna wiadano, że normalny wzrost kurcząt jak i dobra nośność kur uwarunkowane są obecnością pewnych substancji w ich pożywieniu. Karmienie ptaków pożywieniem zawierającym tylko białko roślinne daje typowe objawy niedoborowe. Czynnikiem ochronny, tak zwany „czynnikiem białka zwierzęcego” (*Animal Protein Factor — A. P. F.*), znajdowano w pożywieniu białkowym pochodzenia zwierzęcego. Znalaziono go w mączce rybnej sardynek, mączce wątrobowej, dalej w kale krów i w treści pokarmowej przeżuwaczy (3), (8), (7), (15), (21).

Stwierdzono również, że ekstrakty wątrobowe, czynne przeciw anemii złośliwej, okazały się bogatym źródłem „czynnika białka zwierzęcego” (13). Po wykryciu witaminu B₁₂ jeszcze w tym samym roku wykazano w badaniach żywieniowych, przeprowadzanych na kurczętach karmionych wyłącznie pożywieniem roślinnym, że witamin ten posiada własności tegoż czynnika (14).

Gdy wreszcie S t o k s t a d i inni (19) stosując preparat „czynnika białka zwierzęcego”, otrzymanego z kultur bakteryjnych wyizolowanych z kału kur i zestandaryzowanego w badaniu na kurczętach, otrzymali pozytywne wyniki kliniczne w leczeniu anemii złośliwej, identyczność „czynnika białka zwierzęcego” i witaminu B₁₂ stała się oczywista.

Do analogicznych wniosków doprowadziły badania żywieniowe, przeprowadzone z innymi zwierzętami domowymi i doświadczalnymi. Witamin B₁₂ okazał się substancją potrzebną do normalnego rozwoju zwierząt.

W roku 1949 S t o k s t a d i inni (20) stwierdzają, że produkty pofermentacyjne, otrzymywane przy fabrykacji aureomycyny, działają silniej wzrostowo w doświadczeniach na kurczętach, niżliby to wynikało

z zawartości witaminu B₁₂ obecnego w tych produktach. Ten nowy czynnik zidentyfikowano jako aureomycynę (18). Później stwierdzono, że i inne antybiotyki wywierają podobny wpływ (1), jednak dla aureomycyny i terramycyny jest on szczególnie wyraźny.

Ze względu na doniosłe znaczenie praktyczne tych badań liczba prac dotycząca tego zagadnienia wzrosła bardzo szybko. Sposób działania antybiotyków w doświadczeniach żywieniowych wydaje się bardzo złożony i brak jest do dziś prostego objaśnienia mechanizmu tego działania.

Stwierdzono znaczny wpływ antybiotyków na mikroflorę przewodu pokarmowego.

Sieburth i inni (17) przypisują wzrostowe działanie antybiotyków eliminowaniu patogennych drobnoustrojów wytwarzających toksyny, jak *Clostridium perfringens*. Elami i Jacobs (5) wykazali, że antybiotyki zmniejszają liczbę drobnoustrojów beztlenowych w kale kurcząt karmionych tymi antybiotykami.

Johansson, Peterson i Dick (12) stwierdzają, że aureomycyna wywołuje zmiany w równowadze form coli, enterokoków i bakterii kwasu mlekowego w przewodzie pokarmowym szczurów, a szereg bakterii coli staje się odporny na aureomycynę. Jednocześnie badacze ci nie stwierdzają znacznego wzrostu witaminu B₁₂ w treści jelit oraz w kale zwierząt. Natomiast Chaw i inni (4) wykazują w doświadczeniu na myszkach, że aureomycyna silnie stymuluje biosyntezę witaminu B₁₂ przy jednoczesnym wprowadzeniu Co⁶⁰Cl₂ do diety badanych myszek. Zawartość witaminu B₁₂ mierzono tu ilością radioaktywnego kobaltu, przechodzącego do fazy butanolu z kału zwierząt.

Zagadnienie wpływu antybiotyków na wzmożoną biosyntezę witaminu B₁₂ jest o tyle ciekawe, że antybiotyki działając na florę jelitową zwierząt mogą działać wzrostowo również na tej pośredniej drodze.

Jednakże ilościowe określenie wszystkich kobalamin biosyntetyzowanych przez bakterie, bez szczegółowego określenia rodzaju utworzonych kobalamin, nie daje właściwej podstawy interpretacyjnej dla tych badań.

W kale i w treści przewodu pokarmowego zwierząt stwierdzono występowanie szeregu kobalamin, z których co najmniej 70% stanowi związku nieczynne dla zwierząt (2), (6). Są one natomiast substancjami wzrostowymi dla drobnoustrojów.

Zmiany w ilościowym składzie związków kobalaminowych nic nie mówią o zmianach ilości związków czynnych. Antybiotyki mogą oddziaływać na bakterie syntetyzując również w ten sposób, że mogą

zmieniać stosunek stężeń poszczególnych kobalamin przy niewielkich zmianach ich ogólnej zawartości.

W pracy niniejszej przebadano, czy istotnie tego rodzaju zmiany mogą wystąpić pod działaniem antybiotyków.

Celem uproszczenia zagadnienia przebadano tylko, jaki wpływ wywiera aureomycyna na „obraz kobalaminowy” czystej kultury bakterii kwasu propionowego.

Bakterie kwasu propionowego syntetyzują w warunkach względnie beztlenowych kilka kobalamin (witamin B_{12} , B_{12p} , czyli deznukleotocyjanokobalaminę, i dotąd nieokreśloną bliżej kobalaminę X) z przewagą witaminu B_{12p} (10), (11), (16).

Do młodych hodowli tych drobnoustrojów dodawano aureomycynę, a po skończonej fermentacji wydobyte z komórek kobalaminę rozdzielano metodą elektroforezy bibułowej, po czym określano stosunek ich stężeń.

Część doświadczalna

Hodowlę szczepu oraz wyodrębnienie koncentratu kobalamin syntetyzowanych przez bakterie kwasu propionowego przeprowadzano według metod uprzednio już opisanych (10), (16).

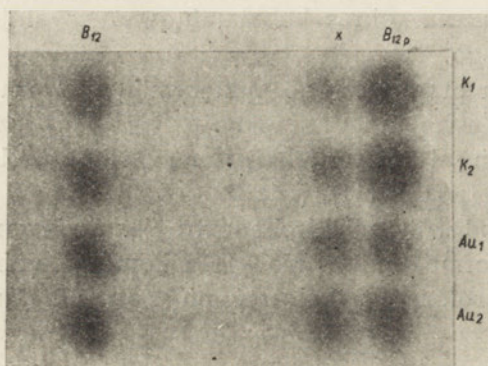
Aureomycynę dodawano do trzydniowej, już dobrze rozwiniętej hodowli bakterii w postaci wodnego roztworu chlorowodoru aureomycyny (Lederle Laboratories Division Am. Cyanamid Co) w ilościach od 8 do 24 mg/l. Stężenia te odpowiadają stężeniom, w jakich podaje się aureomycynę zwierzętom w pożywieniu (1).

Obok prób właściwych przeprowadzano zawsze doświadczenia kontrolne (bez dodatku aureomycyny).

Otrzymane kobalaminy rozdzielano metodą elektroforezy bibułowej na bibule Whatman nr 3 w 2 N CH_3COOH z 0,01% NaCN (9), przy gradencie napięcia ok. 9 V/cm według techniki opisanej w innym miejscu (16). Próby roztworów kobalamin nanoszono na bibułę w postaci kropli. Rozdzielone plamy witaminów B_{12} , B_{12p} i kobalaminę oznaczoną jako X wycinano następnie z wysuszonej bibuły i witaminy ekstrahowano określonymi (zwykle 4 — 6 ml) objętościami 2% roztworu NaCN. W uzyskanych koncentratkach określano stężenie kobalamin na podstawie pomiaru pochłaniania dla fali o długości 368 m μ . Pomiar wykonywano po 2 godzinach od chwili zadania skrawków bibuły roztworem cyjanku sodowego. Określano również całkowitą zawartość kobalamin (sumę kobalamin) po przeprowadzeniu uzyskanego koncentratu w formę dwucyjanową i mierząc spektrofotometrycznie pochłanianie

dla fali o długości 580 m μ . Próby te przeprowadzono przed rozdzielaniem elektroforetycznym.

Rysunek nr 1 przedstawia zdjęcie rozdzielonych na bibule kobalaminy. Na rysunku widać wyraźnie, że w próbach kontrolnych (K₁ i K₂)



Rys. 1.

Elektroforogram kobalaminy wydrebnionych z bakterii kw. propionowego.

K₁, K₂ — hodowle kontrolne

Au₁, Au₂ — hodowle z aureomycyną (24 mg chlorowodoru aureomycyny na litr hodowli)

znacznie więcej znajduje się wit. B_{12p} w porównaniu do wit. B₁₂ i substancji X niż w próbach z aureomycyną (Au₁ i Au₂).

Dane liczbowe powyższych badań podaje tablica 1. W tablicy podano wartości średnie z 2 — 3 pomiarów kontrolnych i właściwych.

Omówienie wyników

Z danych doświadczalnych wynika wyraźnie, że aureomycyna wywiera wybitny wpływ na zmianę stosunku stężeń poszczególnych kobalaminy syntetyzowanych przez bakterie kwasu propionowego. Zwiększa się znacznie zawartość witaminu B₁₂ i kobalaminy X na niekorzyść witaminu B_{12p} (deznukleotydocyjanokobalaminy). Zmiany te są bardzo charakterystyczne, ponieważ witamin B_{12p} okazał się związkami nieczynnym w doświadczeniach żywieniowych dla zwierząt.

Małe dawki aureomycyny (8 mg/l) wydają się zwiększać ogólną syntezę kobalaminy. Duże dawki (25 mg/l) działają bakteriostatycznie. W tym wypadku zahamowanie wzrostu tłumaczy zmniejszenie ogólnej ilości wytworzonych witaminów.

Streszczenie

Wykazano, że dodatek aureomycyny do hodowli bakterii kwasu propionowego powoduje zmianę stosunku stężeń syntetyzowanych przez ten drobnoustrój kobalaminy.

Tablica 1

Wpływ aureomycyny na biosyntezę witaminów grupy B₁₂ przez bakterie kw. propionowego

Względne stężenia witaminu B₁₂ i kobalaminy X

Wit. B_{12p} = 1,00

I. 8 mg chlorowodoru aureomycyny/l		
Witamin	Próba kontrolna	Próba z antybiot.
B ₁₂	0,15	0,34
X	0,23	0,46
B _{12p}	1,00	1,00
Suma kobalaminy (wartości względne)	1,00	1,20
II. 12,9 mg chlorowodoru aureomycyny/l		
Witamin	Próba kontrolna	Próba z antybiot.
B ₁₂	0,22	0,71
X	0,71	2,22
B _{12p}	1,00	1,00
Suma kobalaminy (wartości względne)	1,00	1,02
III. 24 mg chlorowodoru aureomycyny/l		
Witamin	Próba kontrolna	Próba z antybiot.
B ₁₂	0,18	0,51
X	0,24	0,72
B _{12p}	1,00	1,00
Suma kobalaminy (wartości względne)	1,00	0,42

Zwiększa się zawartość witaminu B₁₂ oraz niezidentyfikowanej do-
tąd kobalaminy (X) na niekorzyść nieczynnego dla zwierząt witami-
nu B_{12p} (deznukleotocyjanokobalaminy).

LITERATURA

1. Brande R., Kon S. i Porter J., *Nutrition Abstr. and Rev.*, **23**, 473, 1953.
2. Brown F. B., Cain J. C., Gant D. E., Parker L. F. J. i Smith L. E., *Biochem. J.*, **59**, 82, 1955.
3. Byerly T. C., Titus H. W., Ellis N. R. i Nestler R. B., *Poultry Sci.*, **16**, 332, 1937.
4. Chow B. F., Daris R. L. i Daris S., *J. Nutrition*, **49**, 657, 1953.
5. Elam J. i Jacobs R., *J. Nutrition*, **49**, 307, 1953.
6. Ford J. E., Holdsworth E. S. i Kon S. K., *Biochem. J.*, **59**, 86, 1955.
7. Hammond J. C., *Poultry Sci.*, **21**, 554, 1942, **23**, 358, 1944, **23**, 471, 1944.
8. Hammond J. C. i Titus H. W., *Poultry Sci.*, **23**, 49, 1944.
9. Holdsworth E. S., *Nature*, **171**, 148, 1953.
10. Janicki J., Pawełkiewicz J., *Acta Biochim. Pol.* **1**, 307, 1954.
11. Janicki J., Pawełkiewicz J., *Acta Biochim. Pol.*, **2**, 329, 1955.
12. Johansson K. R., Peterson G. E. i Dick E. C., *J. Nutrition*, **49**, 135, 1953.
13. Nichol C. A., Robblee A. R., Cravens W. W. i Elvehjem C. A., *J. Biol. Chem.*, **170**, 41, 9, 1947.
14. Ott W. H., Rickes E. L. i Wood T. R., *J. Biol. Chem.*, **174**, 1047, 1948.
15. McParlane W. D., Fulmer H. L., i Jukes T. H., *Biochem. J.*, **24**, 1611, 1930.
16. Pawełkiewicz J., i Nowakowska K., *Acta Biochim. Pol.* **2**, 259, 1955.
17. Sieburth J. M., Gutierrez J., Mc Ginuis J., Stern J. R. i Schneider B. H., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **76**, 15, 1951.
18. Stokstad E. L. R. i Jukes T. H., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **73**, 523, 1950.
19. Stokstad E. L. R., Page A. C. jr, Pirce J. V., Franklin A. L., Jukes T. H., Heinle R. W., Epstein M. i Welch A. D., *J. Lab. Clin. Med.* **33**, 860, 1948.
20. Stokstad E. L. R., Jukes T. H., Pirce J. V., Page A. C. jr i Franklin A. L., *J. Biol. Chem.*, **180**, 647, 1949.
21. Whiston D., Hammond J. C., Titus H. W. i Bird H. R., *Poultry Sci.*, **24**, 408, 1945.

ПРЕДШЕСТВЕННИКИ В БИОСИНТЕЗЕ НУКЛЕОТИДОВ ЦИАНОКОБАЛАМИНА. III. ВЛИЯНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ АУРЕОМИЦИНА НА СИНТЕЗ ВИТАМИНОВ ГРУППЫ В₁₂ ПОСРЕДСТВОМ БАКТЕРИЙ ПРОПИОНОВОЙ КИСЛОТЫ

Резюме

Обнаружено, что прибавка ауреомицина в культуре бактерий пропионовой кислоты вызывает изменение соотношений концентраций кобаламинов, синтезируемых этим микроорганизмом.

Повышается количество витамина B_{12} и неидентифицированного (неопознанного) до настоящего времени кобаламина X за счет неактивного для организмов животных витамина B_{12} (дезнуклеотидоцианокобаламина).

PRECURSORS IN THE BIOSYNTHESIS OF CYANOCOBALAMINE NUCLEOTIDES.
III. THE EFFECT OF AUREOMYCIN ON THE SYNTHESIS OF B_{12} VITAMINS BY THE
PROPIONIC ACID BACTERIA

Summary

It has been proved, that the addition of aureomycin to the culture of the propionic acid bacteria changes the concentration ratio of cobalamines, synthesized by these microorganisms; namely the concentration of vitamin B_{12} and the unidentified cobalamine x increases with simultaneous decrease of vitamin B_{12p} — the non-active form for the animal organisms.

Otrzymano 17.III.1955

19
The following is a list of the names of the persons who have been elected to the office of the President of the Association for the Study of Alcoholism for the year 1954.

1954

It has been proved that the addition of nutrients to the culture of the protists will increase the concentration of cobalt-60 in the culture. This is due to the fact that the concentration of cobalt-60 in the culture is directly proportional to the concentration of the nutrient. The concentration of cobalt-60 in the culture is also directly proportional to the concentration of the nutrient. The concentration of cobalt-60 in the culture is also directly proportional to the concentration of the nutrient.

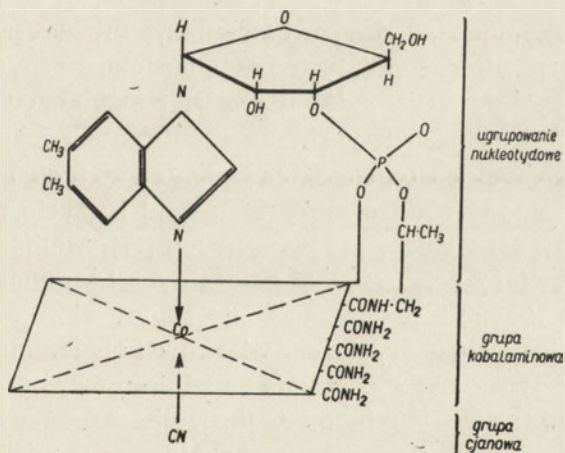
J. JANICKI i J. PAWEŁKIEWICZ

WITAMIN B₁₂P

Zakład Biochemii Żywności i Wyższej Szkoły Rolniczej — Katedra Technologii Rolnej
Kierownik Katedry prof. dr J. Janicki

W komunikacie tymczasowym donieśliśmy o wyodrębnieniu nowej kobalaminy z bakterii kwasu propionowego — *Propionibacterium shermanii* (19), (20). Związek ten, posiadający wiele wspólnych cech z witaminem B₁₂, nazwano witaminem B₁₂P.

W pracy niniejszej przedstawiono wyniki badań identyfikujących witamin B₁₂P jako deznukleotocyjanokobalaminę (DNCK)¹⁾.



Rys. 1. Schemat budowy cząsteczki witaminu B₁₂

¹⁾ Według nomenklatury zaproponowanej przez jednego z nas (J. P.) (25) dla witaminów grupy B₁₂, chodzi tu o cjanokobalaminę, tj. związek zawierający grupę kobalaminową (płaską część cząsteczki z atomem Co) i grupę cjanową, a pozbawiony ugrupowania nukleotydowego. W dotychczasowej literaturze nazwa cjanokobalamina oznaczała całą cząsteczkę witaminu B₁₂ (z ugrupowaniem nukleotydowym). Celem uniknięcia nieporozumień dla witaminu pozbawionego części nukleotydowej używano dalej nazwy: deznukleotocyjanokobalamina. Bernhauer i Friedrich (3) zaproponowali dla tego związku nazwę etiokobalaminy.

Dotychczasowe badania nad strukturą witaminu B_{12} pozwoliły ustalić jej częściową budowę, którą przedstawia wzór 1 (1), (3).

Cząsteczka witaminu B_{12} składa się:

- a) z ugrupowania nukleotydowego, a mianowicie fosforanu 2' (lub 3') 5,6-dwumetylo-1-(α -D-ribofuranozydo)-benzimidazolu,
- b) ze sferycznie płaszczyźnianego ugrupowania kobalaminowego, zawierającego kompleksowo związany atom trójwartościowego kobaltu. Ten najmniej poznany dotąd fragment witaminu B_{12} posiada 4 pierwszorzędowe grupy amidowe oraz peptydowo związaną cząsteczkę (lub 2 cząsteczki) D_g -1-aminopropanolu-2. Aminopropanol jest prawdopodobnie połączony ostrowo z kwasem fosforowym nukleotydu, jak podano we wzorze 1.

Dyskutuje się możliwość istnienia układu porfiryнового lub układów pokrewnych w kobalaminie (1),

- c) z grupy cyjanowej koordynacyjnie związanej z atomem kobaltu.

Od czasu wykrycia witaminu B_{12} w wątrobie zwierzęcej oraz w różnych drobnoustrojach wyodrębniono ze źródeł naturalnych (mikroorganizmy, treść pokarmowa przeżuwaczy, kał zwierzęcy, szlamy pofermentacyjne) lub otrzymano na drodze biosyntezy, lub wreszcie otrzymano z witaminu B_{12} na drodze prostych przemian chemicznych cały szereg związków spokrewnionych z witaminem B_{12} , różniących się jednak od niego szeregiem własności fizycznych, chemicznych i biochemicznych.

Bardzo poważnym postępowaniem metodycznym w tych badaniach było wprowadzenie metody elektroforezy bibułowej i użycie roztworów słabych elektrolitów jako cieczy przewodzących (17). Metodą tą wykazano, że szereg wyodrębnionych ze źródeł naturalnych i otrzymanych w stanie krystalicznym kobalamin przedstawia mieszaniny kilku substancji. Kryształizacja jako kryterium czystości związków kobalaminowych okazała się w tej grupie związków warunkiem zupełnie niewystarczającym. Jednak metoda elektroforezy bibułowej pozwoliła zredukować liczbę nowych pochodnych, gdy stwierdzono, że niektóre z nich (np. witamin B_{12f} i B_{12m}) stanowią mieszaniny poznanych już kobalamin.

Po uzyskaniu analitycznie czystych preparatów możliwe było bliższe porównanie nowych kobalamin z witaminem B_{12} . Badania te dotyczyły głównie identyfikacji kobalamin wyodrębnionych z kału zwierząt przez grupę badawczą z National Institute for Research in Dairying z *Fordem* na czele oraz grupę *Lestere Smith'a*, jednego z odkrywców witaminu B_{12} . *Ford i Porter* (14) pierwsi wyizolowali z kału cieląt cztery kobalaminy, z których jedną utożsamiono z witaminem B_{12} . Trzy pozostałe nazwano „czynnikami A, B i C”. Grupa *Smith'a*

(5), (6) uzupełniła liczbę kobalamin wydobytych z kału cieląt i świń o „czynniki D — J”.

W zakresie badań struktury witaminu B₁₂ bardzo cenną okazała się praca ośrodka badawczego z Cambridge (1), gdzie Armitage i inni opracowali metodę selektywnego usuwania części nukleotydowej z cząsteczki witaminu B₁₂. Polega ona na krótkotrwałym ogrzewaniu witaminu w stężonym kwasie solnym. Według Ganta, Smitha i Parkera (16) jeszcze lepsze wydajności daje zastosowanie 72% kwasu nadchlorowego w miejsce kwasu solnego. Zastosowanie powyższej metody do badania niektórych z „czynników” kobalaminowych pozwoliło stwierdzić, że różnią się one tylko obecnością różnych zasad nukleotydowych w miejsce 5,6-dwumetylobenzimidazolu występującego w witaminie B₁₂. Pozostała część cząsteczki po usunięciu nukleotydu była ta sama dla szeregu badanych kobalamin i równocześnie była identyczna z występującym w naturze „czynnikiem B” Forda (16).

Jako zasadę nukleotydową „czynnik A” zawierał 2-metyloadeninę „czynnik G” — hipoksantynę, a „czynnik H” 2-metylohipoksantynę.

Niezależnie od powyższych badań już wcześniej Piffner, Dion i inni (27) wykazali, że wyizolowany przez nich z bakterii przewodu pokarmowego cieląt tzw. pseudowitamin B₁₂ zawiera adeninę, a pseudowitamin B_{12d} (7), wydzielony elektroforetycznie z pierwszych nieczystych, krystalicznych preparatów pseudowitaminu B₁₂, 2-metyloadeninę.

Pseudowitamin B_{12d} okazał się identyczny z „czynnikiem A” Forda.

W tablicy 1 zestawiono szereg niektórych poznanych kobalamin, przy czym podano ich racjonalne nazwy.

Porównanie własności fizykochemicznych i mikrobiologicznych wyodrębnionego przez nas z bakterii kwasu propionowego witaminu B_{12p} deznukleotydocyjanokobalaminy („czynnika B”) wskazywało na bliskie pokrewieństwo obu substancji.

W tablicy 2 zestawiono własności witaminu B_{12p} i deznukleotydocyjanokobalaminy.

Należało przypuszczać, że witamin B_{12p} jest, podobnie jak „czynnik B” Forda, deznukleotydocyjanokobalamina. Hipoteza ta była tym bardziej prawdopodobna, że udało się w naszej pracowni otrzymać na drodze biosyntezy witamin B₁₂ i szereg „sztucznych” nukleotydocyjanokobalamin, gdy hodowlę *Propionibacterium shermanii* prowadzono na pożywce zawierającej 5,6-dwumetylobenzimidazol lub inne pochodne benzimidazolu (25), (26). W hodowlach bakterii kwasu propionowego, prowadzonych w warunkach względnie beztlenowych na pożywkach bez

T a b l i c a 1
Witaminy grupy B₁₂

L. p.	Nazwa witaminu	Nomenklatura racjonalna	Źródło wydobycia lub sposobu otrzymania	Uwagi	Literatura
1.	Witamin B ₁₂ α-kobalamina , B ₁₂ — czynnik II''	5,6-dwumetylobenzimidazolocyjanokobalamina	wątrobą zwierzęcą drobnoustroje szlamy poferment. biosynteza	(28), (30) (29) (3), (5) (3), (9), (11), (25)	
2.	Witamin B _{12b} (B _{12a} , B _{12d})	5,6-dwumetylobenzimidazolohydroksykobalamina	na drodze chemicznej z wit. B ₁₂ promieniowce	w równowadze z wodorotlen- kiem 5,6-dwumetylo- benzimidazolo- aquokobalaminy	(22) (18)
3.	Witamin B _{12c}	5,6-dwumetylobenzimidazolo- azotynokobalamina	promieniowce i na dro- dze chemicznej z wit. B _{12b}	(31)	
4.	a) Pseudowitamin B ₁₂ b) B ₁₂ — czynnik IV	adeninocyjanokobalamina	z bakterii przewodzą po- karmowego cieląt, z ka- łu zwierząt, szlamy ściekowe przefermen- towane i biosynteza	(17), (27) (3), (5), (9), (11)	
5.	a) Pseudowitamin B _{12d} b) Czynnik A	2-metyloadeninocyjanokobalamina	z nieczystych krystal- icznych preparatów pseudowit. B ₁₂ z kanału zwierząt biosynteza	(7), (12) (9), (11)	
6.	a) Witamin B _{12ap} b) Czynnik B c) B ₁₂ — czynnik I	cyjanokobalamina (deznukleotydcyanokobalamina)	<i>propionibact. shermanii</i> kał zwierząt przefermentowane szla- my ściekowe	(19), (20) (14) (3), (5)	
7.	Czynnik C		kał zwierząt biosynteza	(14) (9), (11)	

8.	Witamin B _{12f}			kał szczurów,	mieszanina złożo- na głównie z ade- nino-CK i mniej- szych ilości 2-me- tyloadenino-CK	(24)
9.	Witamin B _{12m}			kał świń	mieszanina złożo- na głównie z 2-me- tyloadenino-CK	(32)
10.	Czynnik G		hipoksantynocyjanokobalamina	kał zwierzęcy i na dro- dze dezaminacji adeni- no-CK		(5), (6)
11.	Czynnik H		2-metylohipoksantynocyjanokoba- mina	kał zwierzęcy i na dro- dze dezaminacji 2-me- tyloadenino-CK		(5), (6)
12.			5(6)-metylobenzimidazolocyjanokoba- lamina	biosynteza	czynna klinicznie	(3), (10), (25)
13.			benzimidazolocyjanokobalamina	biosynteza	czynna klinicznie	(3), (8), (10) (11), (25)
14.			5(6)-nitrobenzimidazolocyjanokoba- mina	biosynteza		(10), (11), (26)
15.			5(6)-nitro-6(5)-metylobenzimidazo- cyjanokobalamina	biosynteza		(26)
16.			4,6-dwumetylobenzimidazolocyjano- kobalamina	biosynteza		(3)
17.			5,6-dwuetylobenzimidazolocyjano- lamina	biosynteza		(3)
18.			5(6)-aminobenzimidazolocyjanokoba- lamina	biosynteza		(10), (11)
19.			5(6)-etoksybenzimidazolocyjanokoba- lamina	biosynteza		(26)

d. c. tablicy 1

20.		5,6-dwuchlorobenzimidazolocyjanokobalamina	biosynteza	(10), (11)
21.		5,6-dwunitrobenzimidazolocyjanokobalamina	biosynteza	(26)
22.		5,6-imidazobenzimidazolocyjanokobalamina	biosynteza	(26)
23.	Chlorokobalamina	chlorok 5,6-dwumetylobenzimidazolocyjanokobalaminy	na drodze chemicznej z HCl i wit. B _{12b}	(22a)
24.	Siarczanokobalamina	siarczan 5,6-dwumetylobenzimidazolocyjanokobalaminy	na drodze chemicznej z H ₂ SO ₄ i wit. B _{12b}	(22a)

Tablica 2

Porównanie własności deznukleotydocyjakobalaminy („czynnik B'') (1), (16)
i witaminu B₁₂_p

		Witamin B ₁₂ _p	DNCK
1.	Widmo absorpcyjne-maksima	354-5, 500 i 530 m μ	355, 500 i 350 m μ
2.	Widmo absorpcyjne w roztworze NaCN maksima	276, 310, 368 540-42, 580 m μ	277, 309, 367 540 i 580 m μ
3.	Trwałość pochodnej dwucyjanowej	trwała przy pH 6	trwała przy pH 6
4.	Charakter substancji w badaniu elektroforetycznym	zasadowa	zasadowa
5.	Zdolność krystalizacji	nie krystalizuje	nie krystalizuje
6.	Czynność mikrobiologiczna witamin B ₁₂ = 1		
	a) <i>Bact. coli mutant</i> metoda płyt-kowa	2 - 4 0	ok. 3 0
	b) <i>Euglena gracilis</i>		

wspomnianych prekursorów, znajdowano głównie witamin B₁₂_p obok tylko nieznacznych ilości witaminu B₁₂. W obecności prekursorów tworzyły się nukleotydocyjanokobalaminy, a zawartość witaminu B₁₂_p spadała praktycznie do zera (25). Z drugiej strony Ford i Holdsworth (9), (10) oraz Ford, Holdsworth i Kon (11), a niezależnie od nich Bernhauer i Friedrich (3) wykazali, że *Bact. coli mutant*, szczep używany do ilościowego oznaczania aktywności witaminu B₁₂, potrafi z deznukleotydocyjanokobalaminy i odpowiedniego prekursora zsyntetyzować nukleotydocyjanokobalaminy (np. z 5,6-dwumetylobenzimidazolu i DNCK syntezuje witamin B₁₂). Celem definitywnego ustalenia, czy witamin B₁₂_p jest deznukleotydocyjanokobalamina, zhydrolizowano 5 (6)-metylobenzimidazocyjanokobalamina według metody Armita'ge'a i innych (1) i otrzymaną DNCK bezpośrednio porównano z witaminem B₁₂_p. Badania te potwierdziły naszą hipotezę o identyczności obydwu związków.

Część doświadczalna

Hodowlę szczepu oraz wyodrębnianie koncentratu witaminu B₁₂_p przeprowadzono wg metod poprzednio już opisanych (19), (20).

OCZYSZCZANIE WITAMINU B₁₂

- Stwierdzenie obecności witaminu B₁₂ w surowych koncentratkach witaminu B₁₂_p.

Surowy koncentrat witaminu B_{12p} nanoszono w formie wąskiego paska na arkusz bibuły Whatman nr 1, po czym chromatografowano przy użyciu rozpuszczalnika: n-butanol-kwas octowy-woda (4:1:5, v/v/v) metodą wstępującą w komorze wysyczonej HCN. Po rozdzielaniu kobalamin wycinano pasek bibuły zawierający związek barwy fioletowoczerwonej, eluowano go wodą, po czym po dodatkowym oczyszczeniu roztworu fenolem krystalizowano go z wodnego acetonu. Krystaliczny preparat posiadał charakterystyczne dla witaminu B_{12} widmo absorpcyjne i był w równym stopniu mikrobiologicznie czynny, jak witamin B_{12} wobec *Euglena gracilis*. W surowych koncentratkach witaminu B_{12p} stwierdzono do 10 — 15% witaminu B_{12} .

b. Chromatograficzne oddzielenie nukleotydocyjanokobalamin od witaminu B_{12p} .

Gdy stwierdzono, że witamin B_{12p} znacznie lepiej rozpuszcza się w 85% acetonie niż witamin B_{12} , opracowano prosty sposób rozdzielania nukleotydocyjanokobalamin od witaminu B_{12p} . Metoda rozdzielania polega na przepuszczeniu przez kolumnę Al_2O_3 roztworu kobalamin w 85% acetonie i wyeluowaniu tym samym rozpuszczalnikiem witaminu B_{12p} .

Nukleotydocyjanokobalaminy zatrzymują się u góry kolumny i można je stąd następnie wyeluować metanolem lub wodą (por. 26). Do chromatografii używano tlenku glinu wg Brockmanna i przygotowanego jak do analizy witaminu B_{12} według Lensa i innych (23). Metoda ta okazała się pożyteczna przy rozdzielaniu większych ilości koncentratów kobalaminowych i pod względem sprawności rozdzielania nie ustępowała metodzie elektroforezy bibułowej.

c. Rozdzielanie metodą elektroforezy bibułowej dokonywano według metody Holdswortha (17). Szczegóły opisano w innym miejscu (26).

OTRZYMYWANIE DEZNUKLEOTYDOCYJANOKOBALAMINY

Celem otrzymania witaminu pozbawionego ugrupowania nukleotydowego hydrolizowano ca 5 mg 5(6)-metylobenzimidazolocyjanokobalaminy (25) stężonym kwasem solnym wg metody Armittage'a i innych (1), stosując podwójną ilość kwasu solnego niż w metodzie oryginalnej.

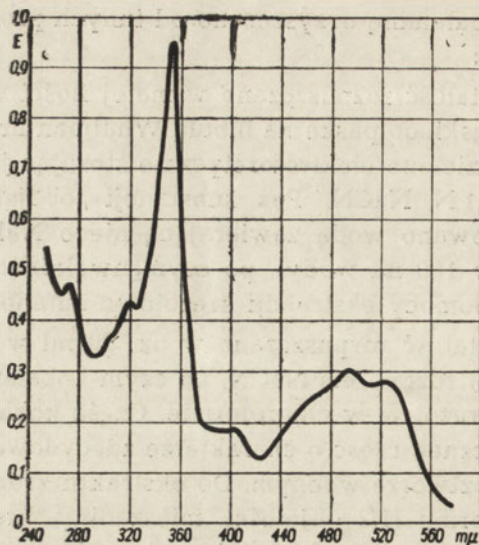
5 mg NCK rozpuszczano w kolbce próżniowej o pojem. 25 ml w 1 ml stęż. HCl i ogrzewano 5 minut na łaźni wodnej o temperaturze 65°. Następnie roztwór odparowywano w próżni do sucha. Utworzoną dezn-

kleotydocyjanokobalaminę oczyszczano od innych produktów hydrolizy w dwojaki sposób:

- a) suchą pozostałość rozpuszczano w małej ilości wody i nanoszono w formie wąskiego paska na bibułę Whatman nr 3, po czym kobalaminy rozdzielano elektroforetycznie stosując jako roztwór przewodzący 0,1 N NaCN. Pas substancji „obojętnych” wycinano, DNCK eluowano wodą zawierającą nieco NaH₂PO₄ (3 ml 2 M NaH₂PO₄ w 100 ml wody), po czym uwalniano od soli mineralnych przy pomocy ekstrakcji krezolowo-butanolowej (26),
- b) suchą pozostałość rozpuszczano w ok. 20 ml wody, alkalizowano do pH 8,10% roztworem NaCN, po czym kobalaminy ekstrahowano 50% o-krezolem w chloroformie. Część kobalaminy przeszła do fazy organicznej, część o charakterze zdecydowanie kwaśnym pozostała w roztworze wodnym. Do ekstraktu krezolowego dodawano chloroformu (1/2 objętości mieszaniny krezolowej) i próbę wytrząsano 1 raz 1/4 objętości wody zalkalizowanej roztworem NaCN (0,4 ml 10% NaCN na 100 ml wody), po czym taką samą objętością wody zakwaszonej roztworem NaH₂PO₄ (1 ml 2 M NaH₂PO₄/100 ml). Wodne roztwory odrzucano, a do roztworu kobalaminy w mieszaninie krezolowo-chloroformowej dodawano 1 objętość mieszaniny n-butanolu i chloroformu (1:1, v/v (2), (26)) i kobalaminy ekstrahowano wodą. Wodny roztwór ekstrahowano 3 razy małymi porcjami chloroformu celem usunięcia śladów krezolu, po czym odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem do sucha. Suchą pozostałość rozpuszczano w 2 ml 85% acetonu i oczyszczano chromatograficznie na Al₂O₃, jak opisano wyżej. Otrzymana na tej drodze deznukleotydocyjanokobalamina była elektroforetycznie jednorodna.

BADANIE WŁASNOŚCI WITAMINU B_{12p} I OTRZYMANEJ DEZNUKLEOTYDOCYJANOKOBALAMINY

Otrzymana DNCK i witamin B_{12p} posiadają identyczne widma absorpcyjne (rys. 2). Maksima absorpcji: 274, 320, 354, 405, 498, 525 — 30 m μ . Również identyczne są widma absorpcyjne pochodnych dwucyjanowych. Zakwaszenie roztworu DNCK do pH 2 bardzo słabo zmienia widmo, przesuwając tylko maksimum 498 m μ do 492 m μ . Natomiast zalkalizowanie do pH 10,7 (bufor glicyna i NaOH) przesuwa maksimum ku dłuższym falom upodabniając widmo do widma witaminu B₁₂. Maksima pojawiają się dla fal długości 276, 305, 321, 362—3, 405, 516—20 i 552 m μ . Analogicznie zachowuje się roztwór witaminu B_{12p}. Elektroforetycznie oba związki zachowują się jednakowo przesuując się ku



Rys. 2. Widmo absorpcyjne witaminu B_{12p} w roztworze wodnym

katodzie w roztworze 2 N kwasu octowego. Zasadowy charakter witaminu B_{12p} wynika również z pomiarów współczynnika podziału między fazę alkoholu benzylowego i fazę wodną. Współczynnik podziału wynosi 0,24 dla pH 1,0 i 1,0 dla pH 12. Wartości liczbowe współczynników podziału obliczono na podstawie pomiaru spektrofotometrycznego stężeń witaminu B_{12p} w obu fazach po wytrząśnięciu równych objętości alkoholu benzylowego z roztworu witaminu B_{12p} w odpowiednim roztworze buforowym i po odwirowaniu próby. Do badania użyto 0,1 N roztwory buforowe wg C. l a r k a. Próbę porównawczą w pomiarze spektrofotometrycznym stanowił bądź alkohol benzylowy, bądź odpowiedni roztwór buforowy.

Również oba związki odbarwiały się pod działaniem roztworu chloraminy T, co odróżnia je od nukleotydocyjanokobalamin, które dają fioletowo zabarwione pochodne (25), (26).

Badania mikrobiologiczne wykazały, że zarówno witamin B_{12p}, jak i otrzymana DNCK są nieczynne w metodzie z *Euglena gracilis* (21), a 2 — 4 razy aktywniejsze od witaminu B₁₂ wobec *Bact. coli mutant* (metoda płytkowa) (4). (Por. tablica 3).

Badania na obecność pochodnych benzimidazolu lub purynowych dały dla witaminu B_{12p} wynik negatywny. Badania te przeprowadzono wg metody D i o n a i innych (27) (wykrycie puryn) i metody uprzed-

Tablica 3

Badania mikrobiologicznej aktywności witaminu B_{12p} i deznukleotydocyjanokobalaminy wobec *Bact. Coli mutant* (met. płytkowa) (4). Liczby oznaczają proporcjonalną do powierzchni wagę wyciętych z kalki technicznej plam wzrostowych w miligramach. Na bibułę wkróplono po 3 μl badanego roztworu

Stężenie μg/ml	Witamin B _{12p}	Stężenie μg/ml	Witamin B _{12p}	DNCK
0,2	8,6	0,1	10,0	10,4
0,4	10,1	0,2	11,5	11,7
0,6	12,5	0,3	13,9	14,2

nią opisaną przez jednego z nas dla wykrycia pochodnych benzimidazolu (25).

Powyższe badania potwierdzają identyczność witaminu B_{12p} biosyntetyzowanej przez *Propionibacterium shermanii* z deznukleotydocyjanokobalamina.

Streszczenie

1. Wykazano, że wyodrębniony z bakterii kwasu propionowego — *Propionibacterium shermanii* i nazwany przez nas witamin B_{12p} jest deznukleotydocyjanokobalamina (DNCK). Witamin B_{12p} jest identyczny z „czynnikiem B” F o r d a.
2. Opracowano metodę chromatograficznego rozdzielania DNCK i nukleotydocyjanokobalaminy na tlenku glinu w 85% acetonie.
3. Z surowych koncentratów kobalaminowych otrzymanych z bakterii kwasu propionowego wyodrębniono również witamin B₁₂ w ilości do 10 — 15% wszystkich kobalamin.

LITERATURA

1. Armitage J. B., Cannon J. R., Johnson A. W., Parker L. F. J., Smith E. L., Stafford W. H. i Todd A. R., *J. Chem. Soc.* 3849, 1953.
2. Bacher F. A., Boley A. E., i Shonk C. E., *Anal. Chem.* 26, 1146, 1954.
3. Bernhauer K., Friedrich W., *Angew. Chem.* 66, 776, 1954.
4. Bogucka J., Iwanowska J., i Kąkol H., *Przem. Chem.* 9, 14, 512, 1953.
5. Brown F. B., Cain J. J., Gant D. E., Parker L. F. J. i Smith L. E., *Biochem. J.* 59, 82, 1955.
6. Brown F. B., Smith E. L., *Biochem. J.* 56, XXXIV, 1954.
7. Dion H. W., Calkins D. G., Pfiffner J. J., *J. Am. Chem. Soc.* 76, 948, 1954.

8. Fantès K. H., O'Callaghan C. H., *Biochem. J.* **58**, XXI, 1954, 59, 79, 1955.
9. Ford J. E., Holdsworth E. S., *Biochem. J.* **56**, XXXV, 1954.
10. Ford J. E., Holdsworth E. S., *Biochem. J.* **58**, XXIV, 1954.
11. Ford J. E., Holdsworth E. S., Kon S. K., *Biochem. J.* **59**, 86, 1955.
12. Ford J. E., Holdsworth E. S., Kon S. K., i Porter J. W. G., *Nature* **171**, 149, 1953.
13. Ford J. E., Kon S. K., Porter J. W. G., *Biochem. J.* **50**, IX, 1951, **52**, VIII, 1952, *Chem. and Industr.* 495, 1952.
14. Ford J. E., Porter J. W. G., *Biochem. J.* **51**, V, 1952.
15. Friedrich W., Bernhauer K., *Angew. Chem.* **65**, 627, 1953.
16. Gant D. E., Smith L. E., Parker L. F. J., *Biochem. J.* **56**, XXXIV, 1954.
17. Holdsworth E. S., *Nature* **171**, 148, 1953.
18. Jackson W. G., Whitfield G. B., de Vries W. H., Nelson H. A., Evans J. S., *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 337, 1951.
19. Janicki J., Pawełkiewicz J., *Acta Biochim. Pol.* **1**, 307, 1954.
20. Janicki J., Pawełkiewicz J., *Bull. Acad. Polon. Sc. Cl. II* **3**, 5, 1955.
21. Janicki J., Pawełkiewicz J., Stawicki St., i Zdrorow K., *Przem. Chem.* **9**, 614, 1953.
22. Kaczka E. A., Wolf D. E., Folkers K., *J. Am. Chem. Soc.* **71**, 1514, 1949.
- 22a. Kaczka E. A., Wolf D. E., Kuehl F. A. jr, Folkers K., *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 3569, 1951.
23. Lens J., Wijmenga H. G., Wolf R., Karlin R., Winkler K. C., De Haan P. G., *Biochem. Biophys. Acta* **8**, 56, 1952.
24. Lewis U. J., Tappan D. V., Elvehjem C. A., *J. Biol. Chem.* **194**, 539, 1952; **199**, 517, 1952.
25. Pawełkiewicz J., *Acta Biochim. Pol.* **1**, 313, 1954; *Bull. Acad. Polon. Sc. Cl. II* **3**, 3, 1955.
26. Pawełkiewicz J., Nowakowska K., *Acta Biochim. Pol.* **2**, 259, 1955.
27. Pfiffner J. J., Calkins D. G., Peterson R. C., Bird O. D., Mc. Glohon V., Stipek R. W., Abstracts 120 th. *Amer. Chem. Soc. Meeting* N. Y., 23, 1951.
Dion H. W., Calkins O. G., Pfiffner J. J., *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 1108, 1952.
28. Rickes E. L., Brink N. G., Koniuszy F. R., Wood F. R., Folkers K., *Science* **107**, 396, 1948.
29. Rickes F. L., Brink N. G., Koniuszy F. R., Wood F. R., Folkers K., *Science* **108**, 634, 1948.
30. Smith E. L., *Nature* **161**, 638, 1948; **162**, 144, 1948.
31. Smith E. L., *Biochem. J.* **52**, 389, 395, 1953.
32. Wijmenga H. G., Veer W. L., *Chem. Weekblad.* **48**, 33, 1952.

ВИТАМИН B_{12p}

Резюме

1. Установлено, что кобаламин, названный нами витамином B_{12p}, выделенный нами из пропионовой кислоты — *Propionibacterium shermanii* — является деснуклеотодицианокобаламином (DNCK). Витамин B_{12p} тождествен с „фактором В” Форда.

2. Разработана методика хроматографического разделения DNCK и нуклеотидоцианокобаламина на окиси алюминия в 85% ацетона.

3. Из сырых кобаламиновых концентратов, полученных из бактерий пропионовой кислоты, выделен был также витамин B₁₂ в количестве до 10 — 15% всех кобаламинов.

VITAMIN B_{12p}

Summary

1. It has been found, that the cobalamine, named vitamin B_{12p}, isolated by us from the propionic acid bacteria is the cyanocobalamine desnucleotide (DNCK). Vitamin B_{12p} is identical with Ford's „B factor”.

2. The chromatographic method has been developed for resolving DNCK and cyanocobalamines dissolved in 85% acetone on aluminium oxide.

3. Vitamin B₁₂ isolated from the crude cobalamine concentrates of the propionic bacteria, consists 10 — 15% of the total amount of cobalamines.

Otrzymano 17.III.1955

T. W. SZCZEPKOWSKI

DZIAŁANIE TLENKU AZOTU NA POŁĄCZENIA HEMATYNOWE

*Z Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Krakowie
Kierownik profesor dr Bolesław Skarżyński*

Reakcję między tlenkiem azotu a hemoglobina opisał po raz pierwszy w 1865 r. L. H e r m a n n (16), zajmując się opisanym siedem lat wcześniej przez Claude B e r n a r d a połączeniem hemoglobiny z tlenkiem węgla. H e r m a n n zwrócił uwagę na zmiany widma hemoglobiny w obecności NO i zaobserwował wypieranie CO z połączenia z hemoglobina przez tlenek azotu. Jakkolwiek więc reakcje hemoglobiny z CO i z NO znane są od bardzo dawna, to jednak uwaga badaczy przez wiele dziesiątków lat skierowana była przede wszystkim na hemoglobina tlenowęglową i połączenia tlenku węgla z innymi związkami hematynowymi, podczas gdy analogiczne połączenia NO były raczej zaniedbywane. Przyczyn tego stanu rzeczy należy szukać w częstym występowaniu zatruc tlenkiem węgla, a więc w praktycznym znaczeniu tej reakcji, jak również w tym, że badania nad działaniem CO są metodycznie o wiele łatwiejsze od badań przeprowadzanych z tlenkiem azotu. W zetknięciu z tlenem NO utlenia się bardzo szybko do NO₂, co powoduje konieczność usuwania nawet śladów tlenu ze środowiska reakcji, w której bierze udział tlenek azotu. Ten brak szerszego zainteresowania oraz trudności metodyczne są powodem, dla którego stan naszych wiadomości o połączeniach NO ze związkami hematynowymi przedstawia się skromnie i ogranicza się do niewielu faktów, skądinąd niejednokrotnie kwestionowanych. Dotychczasowe dane piśmiennictwa z tego zakresu dają się streścić następująco:

Tlenek azotu łączy się z hemoglobina wytwarzając hemoglobina tlenkoazotową, którą można przeprowadzić w postać krystaliczną. Kryształy hemoglobiny tlenkoazotowej wykazują krystalograficzne cechy kryształów oksyhemoglobiny (H a u r o w i t z, 12, 11). Według A n s o n a i M i r k s y e g o (1) tlenek azotu łączy się nie z hemoglobina, lecz tylko z hemiglobina. Według K e i l i n a i H a r t t e e g o (18) połączenie z NO daje zarówno hemoglobina, jak i hemi-

globina, przy czym jednak połączenie z hemoglobina ma być nietrwałe. *Drabkin i Austin* (7) wyznaczyli współczynniki ekstynkcji dla widzialnego zakresu widma hemoglobiny tlenkoazotowej, a *Coryell, Pauling i Dodson* (6) wyznaczyli podatność magnetyczną tego połączenia. *Keilin i Hartree* (17) opisali reakcję NO z cytochromem c, podając przy tym rozkład ekstynkcji powstałego związku w widzialnym zakresie widma. Ci sami badacze opisali również połączenia tlenu azotu z katalazą (19) i peroksydazą (20), podając położenie smug absorpcyjnych w zakresie widzialnym.

W toku prac przeprowadzanych uprzednio w Zakładzie Chemii Fizjologicznej AM w Krakowie, mających na celu identyfikację cytochromu c, wynurzyła się konieczność dokładniejszego zaznajomienia się z połączeniami NO z cytochromami. Gdy okazało się, że zagadnienie to jest dotychczas opracowane niedostatecznie, zdecydowaliśmy się zbadać je bardziej wyczerpująco. Szczególnie interesujący okazał się fakt, pomijany przez dotychczasowych badaczy, wyrażający się tym, że NO reaguje z pewnymi połączeniami hematynowymi tylko wówczas, gdy zawierają żelazo na +3 stopniu utlenienia, z innymi natomiast w postaci zredukowanej. Fakt ten nasuwał przypuszczenie, że o zdolności łączenia się tlenu azotu ze związkami hematynowymi decyduje nie stopień utlenienia żelaza, tak jak to ma miejsce w przypadku CO, lecz inne czynniki, prawdopodobnie podstawniki połączone z żelazem hematynowym. Jeżeliby przypuszczenie to okazało się słuszne, dokładniejsza charakteryzacja połączeń z NO mogłaby rzucić światło na rodzaj podstawników w pochodnych hemu lub hematyny.

Już pierwsze doświadczenia przekonały nas o słuszności tego przypuszczenia. Okazało się, że — w przeciwieństwie do CO — tlenek azotu działając na hem lub hematynę nie powoduje zmian w widmie widzialnym tych związków, co przemawia przeciw powstawaniu odpowiedniego połączenia, natomiast widmo to zmienia się w sposób charakterystyczny wtedy, gdy układy te są związane z pewnymi podstawnikami, a więc w hemo- i hemichromach, w hemo- i hemoglobinie oraz w cytochromach. Postawiliśmy sobie więc jako zadanie dokładniejszą charakteryzację połączeń NO z różnymi związkami hematynowymi w celu stworzenia podstawy dla wniosków dotyczących budowy tych związków.

Terminologia

Zgodnie z dążeniami piśmiennictwa światowego w pracy niniejszej zastosowano zraccjonalizowaną terminologię. Zamiast dawniej przyjętej nazwy hemochromogen i parahematyna użyto za przykładem *Le m-*

berg a nazw hemochrom i hemichrom. Zamiast methemoglobina użyto nazwę hemiglobina. Terminem — połączenia hematinowe — oznaczamy ogólnie kompleksowe połączenia żelaza z porfiryną, niezależnie od rodzaju porfiryny, stopnia utlenienia żelaza i rodzaju substancji związanej z tym kompleksem (L e m b e r g i L e g g e (23)).

Zastosowano następujące skróty: Hi = hemiglobina, Hb = hemoglobina, HbO₂ = oksyhemoglobina, HbCO = hemoglobina tlenkową, HbNO = hemoglobina tlenkoazotowa, DTN = dwutionin sodu, zwany również dawniej hydrosulfitem.

Metodyka badań

Tlenek azotu otrzymano działaniem roztworu siarczanu żelazawego w kwasie siarkowym na azotyn sodu. Wydzielające się gazy przepuszczono przez płuczki z 1% roztworem NaOH i alkalicznym roztworem pyrogallolu. Tlenek azotu zbierano w gazometrze szklanym, wypełnionym zalkalizowaną wodą.

Azot otrzymano działając roztworem chlorku amonu na ogrzany roztwór azotynu sodu. Wydzielające się gazy przepuszczano przez płuczki z alkalicznym roztworem pyrogallolu, po czym zbierano w gazometrze szklanym.

Dwutionin sodu-DTN-; do doświadczeń stosowano odczynnik proanalysi firmy Merck.

Roztwór badanej substancji umieszczano w rurce Thunberga połączonej za pomocą kurka trójdrożnego z gazometrami z azotem, tlenkiem azotu i pompą próżniową. Po ewakuowaniu powietrza rurkę przepłukiwano 3× azotem i napełniano tlenkiem azotu.

Położenie smug absorpcyjnych w zakresie widzialnym ustalano za pomocą spektrometru rewersyjnego Hartridge'a.

Wykresy zależności ekstynkcji od długości fali sporządzono za pomocą spektrofotometru fotoelektrycznego „Uvispec” firmy Hilger. Do pomiarów ekstynkcji w zakresie widzialnym stosowano spektrofotometr fotoelektryczny Colemana i spektrofotometr Königa-Mertensa. Oprócz tych ogólnych metod poszczególne sposoby postępowania zostaną podane w dalszym tekście.

Część doświadczalna

I. HEMOGLOBINA I HEMIGLOBINA

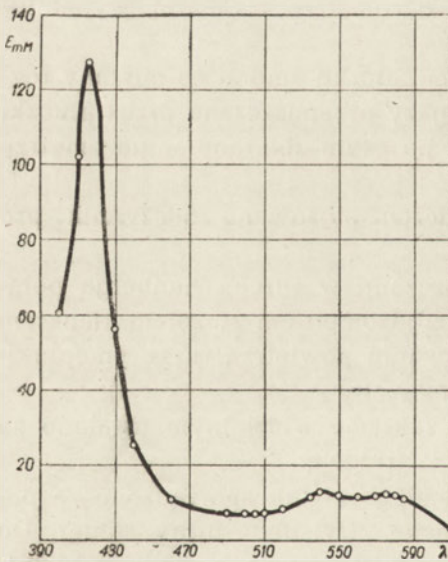
Jak o tym poprzednio była mowa, połączenie hemoglobiny z tlenkiem azotu opisywano wielokrotnie. Sporne pozostawało jednak zagadnienie,

czy NO łączy się z hemoglobina, czy też z hemiglobina. Pomijając dawniejsze poglądy na tę sprawę przytoczone w rozdziale wstępnym, należy podkreślić, że wg Keilina i Hartree (18) NO łączy się zarówno z Hb, jak i z Hi, przy czym jednak połączenie z hemoglobina ma być według tych autorów nietrwałe. HiNO zdaniem Keilina i Hartree ulega samoredukcji do HbNO. Moje doświadczenia potwierdzają doniesienie Keilina i Hartree tylko częściowo.

Do doświadczeń używałem dwukrotnie przekrystalizowanej oksyhemoglobiny z krwinek końskich, otrzymanej metodą Heidelbergera (15) lub metodą Haurowitza (12). Oksyhemoglobina otrzymana obiema metodami nie wykazywała różnic w cechach spektralnych. Przeprowadzone doświadczenia dały następujące wyniki:

a) Roztwór hemoglobiny (smuga absorp. 555 m μ), otrzymany przez dodanie DTN do roztworu HbO₂ w buforze fosforanowym o pH 6,0 — 7,0,

wytwarza z NO połączenie cechujące się dwoma smugami, których środki odpowiadają długościom fal: I-576 m μ , II-541 m μ . Określone przez mnie położenie tych smug nie pokrywa się w szczegółach z wartościami liczbowymi podanymi przez Keilina. Rozkład ekstynkcji w widmie HbNO przedstawia rys. 1.



Rys. 1. Rozkład ekstynkcji w widmie HbNO, pH = 7 (bufor fosforanowy). Ekstynkcję wyrażono jako ekstynkcję milimolarną na litr roztworu

Połączenie tlenu azotu z hemoglobina w odczynie obojętnym jest bardzo trwałe, ekstynkcja roztworu dla długości fali 576 m μ nie zmienia się po półgodzinnym wytrząsaniu z powietrzem i następnym dodawaniu DTN. Tlenek węgla wytrząsany w ciągu kilkunastu minut z roztworem HbNO doprowadza do wytworzenia się pewnej ilości HbCO, o czym świadczy spadek ekstynkcji dla długości fali 576 m μ . Mamy w tym wypadku do czynienia z opi-

sanym już przed dziewięćdziesięciu laty przez Hermana zjawiskiem współzawodnictwa między CO i NO o grupę prostetyczną Hb.

Bezpośrednie oznaczenie HbCO powstającej skutkiem częściowego wyparcia NO przez CO z połączenia z Hb, oparte tylko na pomiarze wielkości ekstynkcji przy 576 m μ , okazało się w naszych warunkach trudne

do przeprowadzenia. Postępowałem więc w sposób następujący. Mieszaninę HbNO i HbCO wytrząsano przez czas dłuższy z powietrzem, co powodowało zamianę HbCO na HbO₂ bez zmiany HbNO. Następnie użytą w ten sposób mieszaninę HbNO i HbO₂ poddawano działaniu DTN i z ekstynkcji przy 576 m μ oznaczano zawartość Hb, odpowiadającą uprzedniej zawartości HbCO w roztworze. Postępując w ten sposób stwierdziłem, że reakcja między CO a HbNO przebiega powoli; po 5 minutach wytrząsania roztworu HbNO z CO powstaje około 17% HbCO. Wartości te zbliżone są do liczb uzyskanych przez Brooks a (3), który zresztą oznaczenia przeprowadzał w sposób odmienny.

Podczas otrzymywania HbNO należy unikać większego nadmiaru DTN, gdyż w tych warunkach powstaje z HbNO hemoglobina, zapewne wskutek reakcji DTN z tlenkiem azotu.

b) Hemoglobina, otrzymana działaniem żelazicyjanku potasu na HbO₂ (smugi przy 630 i 500 m μ), wytwarza z NO w zakresie pH od 6,0 wzwyż związek cechujący się dwoma smugami absorpcyjnymi. Długość fali odpowiadająca środkom tych smug wynosi: I-568 m μ , II-532 m μ . Smugi są ostre i intensywne.

Jak to już zauważyli Keilin i Hartree (18), w roztworze pozostawionym w spokoju po pewnym czasie (2 — 10 minut) smugi tlenkoazotowej hemoglobiny rozmazują się nieco, a ich środki przesuwają się w kierunku czerwieni zajmując położenia: I-572 m μ , II-536 m μ . Keilin i Hartree wnioskowali na podstawie tego przesunięcia smug, że hemoglobina tlenkoazotowa ulega redukcji do hemoglobiny tlenkoazotowej. Przeciwno takiemu wnioskowi przemawia odmienne położenie smug, gdyż smugi absorpcyjne HbNO odpowiadają długościom fal 576 i 542 m μ . Poza tym roztwór hemoglobiny tlenkoazotowej pozostawiony w spokoju, cechujący się wyżej opisanym przesunięciem smug, po ponownym wytrząśnięciu z NO okazuje pierwotne widmo o smugach I-568 m μ , II-532 m μ .

Jeżeli po zadziałaniu NO na hemoglobinę zmniejszymy ciśnienie gazu, opisane powyżej przesunięcie smug nastąpi szybciej. Nigdy jednak nie otrzymujemy widma analogicznego do widma HbNO, lecz smugi są zawsze przesunięte w kierunku fioletowej części widma.

Jeżeli do roztworu hemoglobiny tlenkoazotowej dodamy roztworu DTN zawartego uprzednio w bocznym ramieniu rurki Thunberga, otrzymujemy widmo identyczne z widmem HbNO, tzn. o smugach przy 576 i 542 m μ .

Hemoglobina w roztworze zasadowym (pH 8,3, fosforan dwusodowy) zachowuje się wobec NO w ten sam sposób, jaki cechują hemoglobinę

w roztworze obojętnym. Natomiast odmienne własności wykazuje połączenie hemiglobiny z NO w roztworze kwaśnym. W roztworze o pH poniżej 5,6 hemiglobina po wytrząśnięciu z NO wykazuje w widmie dwie smugi absorpcyjne I-568 m μ , II-532 m μ , a więc identyczne ze smugami hemiglobiny tlenkoazotowej w roztworze obojętnym, nie ulegające jednak powyżej opisanemu przesunięciu. Powyższe doświadczenia dowodzą, że hemiglobina wytwarza z NO dwa połączenia, jedno (a) cechujące się smugami absorpcyjnymi I-568 m μ i II-532 m μ oraz drugie (b) cechujące się smugami absorpcyjnymi I-572 m μ i II-536 m μ . Połączenie (a) powstaje podczas wytrząsania roztworu hemiglobiny z NO pod ciśnieniem 76 cm Hg, związek (b) powstaje natomiast po pozostawieniu roztworu związku (a) przez pewien czas w spokoju.

Na podstawie powyżej opisanych doświadczeń dochodzimy do wniosku, że zmiana widma hemiglobiny tlenkoazotowej nie daje się interpretować w sposób proponowany przez Keilina i Hartreego, lecz że bardziej prawdopodobnym tłumaczeniem jest egzystencja dwojakiego rodzaju połączeń NO z hemiglobiną. Nie możemy z całą pewnością wyjaśnić, na czym polega różnica między tymi dwoma połączeniami, wysuwając na razie tylko hipotezę, w myśl której połączenie (a) cechujące się smugami przy 568 i 532 m μ byłoby połączeniem dwóch cząsteczek NO z jednym układem hematynowym, natomiast w połączeniu (b), (smugi 572 i 536 m μ) przypadająby na jeden układ hematynowy jedna cząsteczka NO. Za tą koncepcją przemawia fakt polegający na tym, że połączenie (a) powstaje przy wytrząsaniu roztworu hemiglobiny z atmosferą NO w warunkach ułatwiających wytwarzanie się nadmiaru NO w roztworze. Przejście połączenia (a) w związek (b) zachodzi natomiast w warunkach ułatwiających dysocjację połączenia (a). W myśl tej hipotezy połączeniu (a) należałoby przypisać wzór $\text{Hi}(\text{NO})_2$, połączeniu (b) HiNO .

Przy formułowaniu tej hipotezy opierałem się w pewnej mierze na poglądach Clarka (4, 5) przyjmujących możliwość heptakoordynacji atomów żelaza oraz na faktach dotyczących reakcji jonu CN^- z hemoi hemichromami (24), z których wynika możliwość powstawania jedno- i dwucyjankowych kompleksów układu hematynowego. Sprawę tę pragnę poruszyć bardziej wyczerpująco w łączności z innymi, moimi badaniami.

II. CYTOCHROM c

Roztwór cytochromu c zawierającego 0,43% żelaza otrzymano metodą własną (29). Stężenie cytochromu c w roztworze oznaczano na podstawie zawartości Fe w suchej pozostałości, otrzymanej po odparowaniu

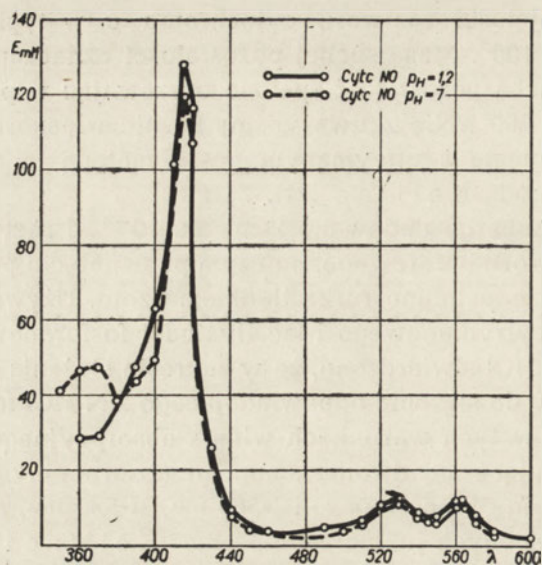
odmierzonej objętości roztworu cytochromu *c* w tyglu platynowym w temperaturze 100°. Masę suchej pozostałości oznaczano na mikrowadze, po czym suchą pozostałość spalano ogrzewając w piecu muflowym w temperaturze 600°. Nie zauważyliśmy różnic własności spektralnych między cytochromem *c* otrzymanym naszą metodą, a cytochromem *c* otrzymanym metodą Keilina (21).

Do rurki Thunberga dodawano 2 ml ok. 10^{-4} M roztworu cytochromu *c* i 8 ml roztworu buforowego, po czym po usunięciu powietrza i przepłukaniu azotem napełniano rurkę tlenkiem azotu. Używając roztworów buforowych — cytrynianowego Mac Ilvaina i fosforanowego Soerönsena lub roztworu HCl stwierdzono, że w zakresie stężenia jonów wodorowych o $\text{pH} = 8,0$ do stężenia odpowiadającego 2 N HCl ferricytochrom *c* nie wykazujący w tych warunkach widma absorpcyjnego tworzy z NO połączenia cechujące się dwoma smugami absorpcyjnymi. Środki tych smug odpowiadają długościom fal: I-563 m μ , II-530 m μ , a więc zbliżone do wartości określonych już uprzednio przez Keilina i Hartreego. Położenie smug określone za pomocą spektrometru Hartridge'a nie zależy od pH roztworu w powyżej podanym zakresie.

Jeżeli do roztworu tlenkoazotowego ferricytochromu *c* otrzymanego w sposób opisany dodamy DTN, wówczas widmo ferricytochromu *c* NO ulega zmianie. Smugi absorpcyjne, które przypadają dla długości fal 563 i 530 m μ , przesuwają się w kierunku czerwieni i zajmują położenie I-572 m μ i II 536 m μ . Tak powstające widmo ulega dalszym zmianom; wymienione powyżej smugi tracą stopniowo intensywność, a jednocześnie pojawia się smuga ferrocycyochromu *c*, o charakterystycznym położeniu odpowiadającym 550 m μ . Po paru minutach otrzymujemy więc tylko typowe widmo ferrocycyochromu *c*. Keilin i Hartree (17), którzy pierwsi zaobserwowali opisany powyżej sposób reagowania ferricytochromu *c* NO z DTN, tłumaczą tę reakcję nietrwałością połączenia ferrocycyochromu *c* z NO; połączenie takie przejściowo wytworzone ulega szybko rozkładowi na ferrocycyochrom *c* i tlenek azotu. Faktem jest, że nawet długotrwałe wytrząsanie ferrocycyochromu *c* z NO pod ciśnieniem 76 cm Hg nie prowadzi do wytworzenia uchwytnej ilości odpowiedniego połączenia z NO.

Rozkład ekstynkcji w widmie ferricytochromu *c* NO w roztworze o $\text{pH} = 1,2$ i o $\text{pH} = 7,0$ zbadano za pomocą spektrofotometru „Uvispec” Hilgera. Przedstawia to rys. 2.

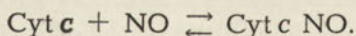
Zależnie od pH roztworu ekstynkcja ferricytochromu *c* NO zmienia się i pod tym względem związek ten przypomina wolny ferricytochrom *c*, którego ekstynkcję badał Theorell (30). Wartości ekstynkcji milimolarnych w środowisku kwaśnym ($\text{pH} = 1,2$) wynoszą: $E_{\text{mM } 415} =$



Rys. 2. Rozkład ekstynkcji w widmie ferricytochromu *c* NO, w zależności od pH roztworu. Ekstynkcję wyrażono jako ekstynkcję milimolarną na litr roztworu

= 128, $E_{mM\ 530} = 12,3$, $E_{mM\ 563} = 11,9$. W środowisku obojętnym wartości ekstynkcji milimolarnych są nieco niższe, przy czym pojawia się ponadto nowe maksimum dla długości fali 365 m μ .

Reakcja tlenu azotu z ferricytochromem *c* jest reakcją odwracalną i można ją sformułować:



Stałą równowagi napiszemy więc:

$$K = \frac{[\text{Cyt } c \text{ NO}]}{[\text{Cyt } c] [\text{NO}]}$$

Stałą *K* wyznaczono dodając do odpowietrzonego roztworu ferricytochromu *c*, znajdującego się pod warstwą oleju parafinowego, wodny roztwór tlenu azotu o znanym stężeniu NO. Roztwór NO dodawano kalibrowaną strzykawką z podziałką 0,01 ml. Otwór igły zabezpieczono nasadką gumową. Mierzono ekstynkcję dla długości fali 562 m μ . Różnica ekstynkcji między roztworem pierwotnym, roztworem, do którego dodano określoną ilość NO i roztworem nasyconym NO, pozwala obliczyć % utworzonego ferricytochromu *c* NO. Wykres zależności % utworzonego Cyt *c* NO od stosunku molarnego NO/Cyt *c* przedstawia rys. 3.

Jedno z typowych doświadczeń przedstawia poniższe zestawienie. W probówce dostosowanej do spektrofotometru Colemana umieszczono 3 ml roztworu Cyt *c* o stężeniu $1,6 \cdot 10^{-4}$ M i dodano 2 ml HCl ok. 0,1 N, uzyskując roztwór o pH = 1,8 (oznaczone za pomocą elektrody szklanej). Roztwór przykryto warstwą oleju parafinowego i powietrze wyciągnięto pompą próżniową. Po zmierzeniu ekstynkcji $E_{0,562}$, dodawano NO. Procent utworzonego Cyt *c* NO obliczono wyznaczając ekstynkcję E_n , roztworu nasyconego tlenkiem azotu i ekstynkcję E roztworu, do którego dodano określoną ilość NO, stosując wzór

$$\% \text{ Cyt } c \text{ NO} = \frac{E - E_0}{E_n - E_0} \times 100.$$

Oznaczenie przeprowadzono w temperaturze 15°.

Znając stężenie molarne Cyt *c* = *a*, molarne stężenie NO = *b* oraz oznaczywszy stężenie molarne Cyt *c* NO = *n* można wyznaczyć stałą *K* z równania:

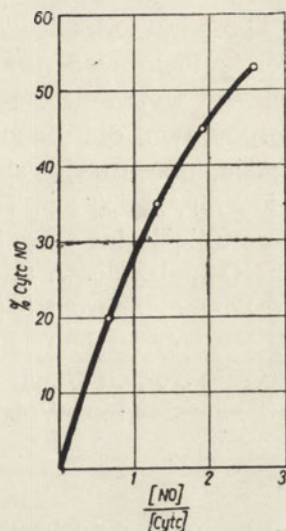
$$K = \frac{n}{(a-n)(b-n)}$$

Wyznaczenie *K* obrazuje poniższe zestawienie:

% Cyt <i>c</i> NO	<i>a</i> · 10 ⁻⁴	<i>b</i> · 10 ⁻⁴	<i>n</i> · 10 ⁻⁴	<i>K</i> · 10 ³
20	0,94	0,61	0,19	6,3
35	0,92	1,2	0,32	6,0
45	0,91	1,75	0,41	6,1
53	0,89	2,31	0,47	6,0

Różnice między wartościami uzyskanymi dla *K* z dziesięciu oznaczeń nie przekraczały 5%. Znając stałą równowagi *K* można ze wzoru $F = -RT \ln K$ obliczyć zmianę energii swobodnej w czasie łączenia się ferricytochromu *c* z NO, zmiana ta wynosi — 5 Kcal.

Wartość liczbowa stałej równowagi reakcji ferricytochromu *c* z NO doprowadza do wniosku, że zdolność ferricytochromu *c* do wiązania NO jest duża. Wartość ta zbliżona jest do wartości *K* reakcji myoglobiny z CO, która wynosi $9,5 \cdot 10^3$ (Millikan, 25), jest zaś ok. 10-krotnie



Rys. 3. Wykres zależności utworzonego Cyt *c* NO od stosunku molarnego NO/Cyt *c*

większa od stałej równowagi dla reakcji myoglobiny z tlenem, która wynosi $4,95 \cdot 10^2$.

III. CYTOCHROM *b*

Preparat cytochromu *b* otrzymano wg Euler a i Helströ ma (10). Ferricytochrom *b* (brak smug absorpcyjnych) w odczynie bliskim obojętnego wytwarza z NO połączenie cechujące się dwoma smugami absorpcyjnymi dla długości fal: I-568 m μ , II-561 m μ . Smugi te po pewnym czasie przesuwają się w kierunku czerwieni i zajmują położenia: I-572 m μ , II-536 m μ . Te własności spektralne, tzn. położenie smug i ich przesunięcie ku czerwieni, wykazują całkowitą analogię z własnościami HiNO (patrz dośw. I).

Ferrocycyochrom *b* (smuga przy 560 m μ), otrzymany działaniem DTN na roztwór ferricytochromu *b*, wytwarza z NO połączenie o dwóch słabych szerokich smugach, których środki przypadają na długości fal ok. 581 m μ i 547 m μ . Widmo to różni się zdecydowanie od widma HbNO.

IV. CYTOCHROM *a*

Preparat cytochromu *a* sporządzono wg Straub a (28). W widmie ferricytochromu *a*, nie wykazującym smug absorpcyjnych, po wytrząśnięciu z NO nie pojawiają się dostrzegalne smugi. Ferrocycyochrom *a* poddany działaniu NO wykazuje obok charakterystycznej smugi wolnego ferrocycyochromu (605 m μ) słabo widoczne zaciemnienie ok. 590 m μ .

V. HEMATYNA I HEM

Do badań używano heminy firmy Merck, sporządzonej wg M o e r n e r a. Dla przeprowadzenia w hematynę rozpuszczano heminę w NaOH 0,1 N. Widmo zasadowego roztworu hematyny w zakresie widzialnym (smuga 612 m μ) nie ulega zmianom po wytrząśnięciu tego roztworu z NO. Tlenek azotu nie powoduje również zmian widma hematyny w roztworze o odczynie obojętnym.

Hem otrzymywano działając DTN na roztwór hematyny. Wytrząsanie z NO nie powoduje zmian w widmie widzialnym hemu (słaba smuga 579 m μ i bardzo słaba 541 m μ), zarówno wtedy gdy znajduje się hem w roztworze obojętnym, jak i w zasadowym.

Z doświadczeń powyższych wynika, że NO tworzy połączenia cechujące się charakterystycznym widmem wtedy, gdy reagujące z nim żelazo - i żelaziporfiry związane są równocześnie z komponentą białkową, jak np. w hemo- i hemiglobinie oraz w cytochromach, natomiast z wolnym hemem lub hematyną nie wytwarza połączeń dających się wykazać

spektroskopowo. Z faktu tego wynikała konieczność zbadania przebiegu reakcji między NO a hemem i hematyną związanymi z podstawnikami odmiennymi od białka.

VI. HEMO- I HEMICHROMY HISTYDYNOWE

W celu otrzymania hemichromu histydynowego dodawano 80 mg chlorowodoru histydyny do 10 ml $1,7 \cdot 10^{-4}$ M roztworu hematyny w NaOH 0,1 N. Hemichrom histydynowy był już kilkakrotnie badany w innych pracowniach (2), i to z rozbieżnymi wynikami, doprowadzającymi nawet do wniosku negującego egzystencję tego hemichromu (H a u r o w i t z 13). Istotnie, widmo zasadowej hematyny w obecności histydyny nie zmienia się wyraźnie, jakkolwiek zmienia się barwa roztworu. Niemniej posiadamy dziś dowody istnienia hemichromu histydynowego (2), a i nasze badania wskazują na egzystencję tego związku.

Po wytrząśnięciu roztworu hematyny i histydyny z NO pojawiają się bardzo wyraźne ostre smugi absorpcyjne dla długości fal I-568 m μ , II-532 m μ . Po kilku minutach krawędzie smug ulegają zatarciu, a środki smug przesuwają się w kierunku czerwieni. Po ponownym wytrząśnięciu z NO smugi znowu stają się ostre i zajmują pierwotne położenie. Powstaje więc związek okazujący cechy widmowe (położenie smug i ich przesuwanie się ku czerwieni) identyczne z tymi, jakie charakteryzują połączenia NO z hemoglobina i ferrytochromem b.

Hemochrom histydynowy uzyskano dodając DTN do roztworu hematyny i histydyny. Hemochrom ten cechuje się w środowisku zasadowym dwoma smugami — wyraźną smugą o długości fali 556 m μ i słabszą przy 524 m μ . Po wytrząśnięciu z NO smugi hemochromu histydynowego giną, zamiast nich pojawia się rozmazane zaciemnienie, którego środek przypada ok. 577 m μ oraz słabo widoczna smuga przy 543 m μ . Położenie zaciemnienia przy 577 m μ mogłoby nasuwać analogię do widma HbNO, natężenie smug i ich charakter jest jednak odmienny i nie pozwala na porównywanie tych dwóch widm ze sobą.

Zdolność histydyny do wytwarzania z hematyną i z NO połączeń cechujących się wyżej opisanymi smugami absorpcyjnymi wydaje się swoista, ponieważ z szeregu przebadanych przeze mnie związków jedynie pilokarpina — a więc związek posiadający układ imidazolowy — dodana do zasadowego roztworu hematyny i wytrząśnięta z NO powoduje powstawanie połączenia o własnościach takich samych, jakie cechują hemichrom histydynowy. Kofeina, arginina, tryptofan, kwas asparaginy, kwas glutaminowy, asparagina, tyrozyna i walina, stosowane w ten sam sposób jak histydyna, tj. dodawane w odpowiednich ilościach do roztworu hematyny w NaOH 0,1 N i wytrząsane z NO, nie powodują wi-

docznych zmian w widmie. Widmo alkalicznej hematyny nie ulega w ich obecności zmianom, nie pojawiają się żadne charakterystyczne smugi absorpcyjne. Należałoby na tej podstawie wnioskować, że o ile nawet hematyna zasadowa wytwarza z wyżej wymienionymi związkami odpowiedni hemichrom, to połączenie takie nie reaguje z NO.

VII. HEMO- I HEMICHROMY GLOBINOWE

Hemochrom globinowy otrzymano dodając do 5 ml 1% roztworu HbO_2 5 ml NaOH 0,2 N oraz nieco DTN. W tak przygotowanym roztworze pojawia się po chwili charakterystyczne widmo hemochromu globinowego cechujące się bardzo wyraźną smugą dla 558 $\text{m}\mu$ i słabszą dla 527 $\text{m}\mu$. Po wytrząsaniu świeżo otrzymanego roztworu hemochromu globinowego (smugi przy 558 i 527 $\text{m}\mu$) z NO otrzymujemy połączenie o widmie analogicznym do widma HbNO , a więc cechujące się smugami przy 576 i 542 $\text{m}\mu$. Natomiast jeżeli roztwór hemochromu globinowego pozostaje w spokoju przez czas ok. 80', tzn. gdy wg *Drabkina* (8) następuje całkowita zamiana Hb na hemochrom globinowy — reakcja z NO doprowadza do powstania połączenia o widmie niecharakterystycznym — smuga I jest rozmazana, a smuga II słabo zaznaczona.

Hemichrom globinowy otrzymywano dodając do roztworu hemoglobiny roztwór NaOH 0,1 N i następnie doprowadzając mieszaninę do pH 8,0. Roztwór uzyskany w ten sposób cechuje się widmem złożonym ze smug przy 528 i 557 $\text{m}\mu$, a więc widmem podobnym do widma hemochromu globinowego, lecz o odmiennym charakterze — smuga przy 528 jest intensywniejsza niż przy 558 $\text{m}\mu$. Po wytrząsaniu z NO powstaje związek cechujący się smugami przy 568 i 534 $\text{m}\mu$, a więc okazujący widmo absorpcyjne identyczne z widmem $\text{Hi}(\text{NO})_2$.

VIII. MYOHEMOGLOBINA I MYOHEMIGLOBINA

Krystaliczną myohemoglobinę otrzymano wg własnej modyfikacji metody *Theorella* (31) z uwzględnieniem wyników *Morgana* (26). Przemyty mięsień sercowy konia zmielono w maszynce do mięsa i do otrzymanej miazgi dodano wodę destylowaną w stosunku 1 : 2. Ekstrakcję przeprowadzano w 0° przez 12 godzin, po czym całość umieszczono na dużym sączku karbowanym i pozostawiono w 0° do odsączenia. Po zubożeniu przesączu dodano nasyconego roztworu zasadowego octanu ołowianego (1 : 0,25) w temperaturze 12°, odsączono od powstałego osadu, przesącz zubożniono i wytrącono MyoHbO_2 siarczanem amonu, utrzymując pH = 7,0 i t = 0°. Osad myohemoglobiny rozpuszczono w 50 ml wody i dodano mieszaninę fosforanów potasu (I- i II-rzędowego)

do uzyskania $pH = 6,8$ i stężenia jonu fosforanowego $3 M$, po czym przesączono. Przesącz uwolniono od drobnej domieszki MyoHi dodając DTN i nieco roztworu katalazy. Roztwór zostawiono do krystalizacji w temperaturze -2° . Uzyskane w ten sposób kryształy $MyoHbO_2$ poddano rekrystalizacji posługując się wyżej opisaną metodą.

a) MyoHb uzyskana przez dodanie DTN do roztworu $MyoHbO_2$, po wytrząsaniu z NO daje produkt o wyraźnych smugach I-581 i II-546 μ .

b) Myohemiglobina badana w podobny sposób wytwarza związek o smugach przy 575 i 536 μ .

Omówienie wyników

Wyniki badań nad położeniem w widzialnej części widma smug absorpcyjnych charakterystycznych dla produktów działania NO na połączenia hematinowe przedstawia załączone zestawienie.

Z danych dotyczących cech spektroskopowych poszczególnych produktów działania NO na połączenia hematinowe dają się wyprowadzić pewne ogólne wnioski:

1) Wolny hem i wolna hematina nie wytwarzają z NO połączeń cechujących się charakterystycznym widmem. Prawdopodobnie powstawanie tego typu produktów uwarunkowane jest obecnością jakiegoś podstawnika skoordynowanego z żelazem hemu lub hematyny. Zaznacza się w tym wypadku znamienna różnica między zachowaniem się NO i CO wobec hemu, z którym CO daje połączenie cechujące się charakterystycznym widmem.

2) NO daje połączenia z hemem lub hematiną wówczas, jeżeli te układy związane są koordynacyjnie z pewnymi podstawnikami. (Hb, Hi, MyoHb, MyoHi, hemo- i hemichromy globinowe i histydynowe, katalaza itd.).

3) W odróżnieniu od połączeń z CO połączenia związków hematinowych z NO powstają niezależnie od stopnia utlenienia Fe.

4) Niektóre związki hematinowe, różniące się zdecydowanie swym widmem absorpcyjnym (hemiglobina, ferricytochrom *b*, hemichrom histydynowy i globinowy), dają z NO połączenia cechujące się widmem identycznym lub bardzo podobnym.

Od czasu ukazania się pracy Haurowitza i Waelscha (14) przyjął się w nauce poparty licznymi dowodami pogląd, że w hemo- i hemiproteidach oraz w hemo- i hemichromach z żelazem związanym w porfirynie połączone są koordynacyjnie dodatkowe podstawniki. Przeprowadzono szereg badań dążących do wyjaśnienia charakteru tych specjal-

Zestawienie

Reakcja	Proponowany wzór	Położenie smug w m μ		Oznaczenia innych autorów	
		I	II	I	II
Hb + NO	HbNO	576	542	575	537 (18)
Hi + 2NO	Hi(NO) ₂	568	532	574	536 (3)
Hi + NO	HiNO	572	536	575	543 (7)
Cyt c ⁺ + NO	Cyt c ⁺ NO	563	530	568	531 (18)
Cyt c ⁺ NO + DTN	Cyt c ⁺ NO	572	532 (nietrwały)	572	532 (17)
Cyt b ⁺ + 2NO	Cytb ⁺ (NO) ₂	568	532	—	—
Cyt b ⁺ + NO	Cyt b ⁺ NO	572	536	—	—
Cyt b ⁺ + NO	Cyt b ⁺ NO	ok. 580	ok. 541 smugi rozmyte	—	—
Cyt a ⁺ + NO	Cyta ⁺ NO	590	— b. słabo widocz.	—	—
MyoHb + NO	MyoHbNO	581	546	—	—
MyoHi + NO	MyoHiNO	575	536	—	—
Katalaza ⁺ + NO	—	—	—	577	538 (19)
Peroksydaza ⁺ + NO	—	—	—	570	539 (20)
Hem + NO	nie zmienia widma	—	—	—	—
Hematyna + NO	” ”	568	532	—	—
Hemichrom histydynowy + 2NO	572	536	—	—	—
Hemichrom histydynowy + NO	smugi rozmyte	—	—	—	—
Hemochrom histydynowy + NO	576	542	—	—	—
Hemochrom globinowy zaraz po dodaniu NaOH	smugi rozmyte	—	—	—	—
Hemochrom globinowy 80' po dodaniu NaOH	smugi rozmyte	—	—	—	—
Hemichrom globinowy	568	531	—	—	—
Hemichrom pilokarpinowy	567	531	—	—	—
Hemochrom pilokarpinowy	smugi rozmyte	—	smuga II mocniejsza	—	—

nych układów atomów w cząsteczce białka hemoproteidu, zwanych grupami hemafilnymi, które zostają skoordynowane wokół żelaza protoporfiryny. Podstawową metodą w tych badaniach było potencjometryczne, spektrometryczne i magnetochemiczne miareczkowanie komponenty białkowej hemoproteidu oraz całego hemoproteidu i jego pochodnych, np. HbO_2 . W ten sposób można było oznaczyć pK grup, które nie ujawniają się w hemoproteidach będąc związane z żelazem hematynowym, pojawiają się natomiast w wolnej komponentce białkowej lub po wyparciu tych grup z połączenia z żelazem przez jakiś nowy podstawnik, np. tlen w HbO_2 . Oznaczone w ten sposób pK grup związanych koordynacyjnie można porównać z pK odpowiednich aminokwasów wchodzących w skład komponenty białkowej i na tej podstawie wnioskować o ich charakterze.

Wynikiem tych badań był wniosek, że w hemoglobinie oboma grupami koordynacyjnie związanymi z żelazem są pierścienie imidazolowe histydyny, należącej do globiny (35). Podobny wniosek wysunięto w związku z badaniami nad cytochromem c (32), nowsze badania wskazują jednak, że w tym związku tylko jeden układ imidazolowy zostaje skoordynowany (24a). W myohemoglobinie na podstawie kinetyki jej reakcji (25a, 22) przyjmuje się egzystencję tylko jednego koordynacyjnie połączonego pierścienia imidazolowego, natomiast odmienne od imidazolu podstawniki upatrywane są w peroksydazie (33, 34). Cytochrom b i katalaza nie mogły być badane dotychczasowymi metodami.

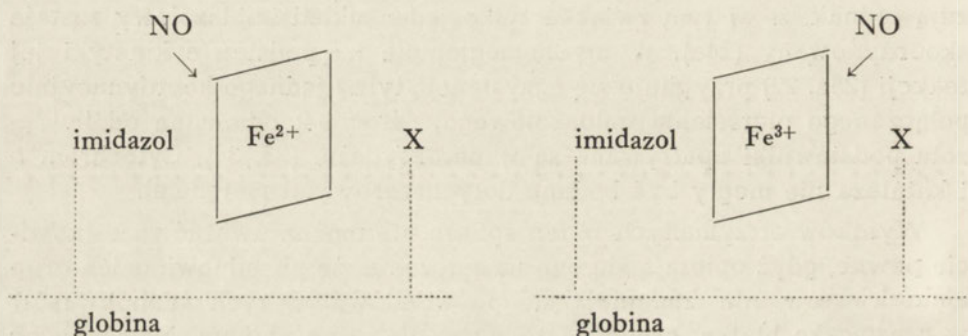
Wyników otrzymanych w ten sposób nie można uważać za całkowicie pewne, gdyż opierają się one na założeniu, że pK odpowiednich grup aminokwasów nie zmieniają się po wbudowaniu tych aminokwasów w cząsteczkę białka, czego do tej pory nie udowodniono. Należy więc stwierdzić, że o ile koordynacyjne wiązanie podstawników przez żelazo wbudowane w porfiryne jest w tej chwili niemal pewnikiem, o tyle sprawa rodzaju tych podstawników, czyli fragmentów cząsteczki białkowej hemoproteidu ulegających koordynacji, pozostaje stale otwarta. Np. wątpliwości co do hipotezy podstawników imidazolowych w hemoglobinie podnoszą *H a u r o w i t z* (13) i *R o u g h t o n* (27).

Badania opisane w części doświadczalnej oraz podane w zestawieniu wyniki pozostają w zgodności z przypuszczeniem, że co najmniej jeden z podstawników koordynacyjnie związanych z Fe hemoglobiny jest reprezentowany przez układ imidazolowy. Wnioskujemy o tym na tej podstawie, że spośród wielu badanych hemichromów tylko hemichrom histydynowy i pilokarpinowy daje z NO połączenie cechujące się widmem identycznym z cechami spektroskopowymi połączenia hemoglobiny z NO. Co więcej, z faktu tego możemy wysnuć dalej idący wniosek, że widmo

absorpcyjne połączenia hematynowego nie zależy od tego, czy skoordynowana grupa stanowi część wolnego aminokwasu, czy też aminokwasu wbudowanego w cząsteczkę białka.

Przyjmując hipotezę koordynacji dwóch grup imidazolowych z żelazem w hemoglobinie, za którą przemawiają powyżej przytoczone fakty, należałoby spodziewać się, że widmo HbNO powinno być również identyczne z widmem absorpcyjnym hemochromu histydynowego lub pilokarpinowego poddanego działaniu NO. W rzeczywistości widma te różnią się wyraźnie od siebie. Dla rozwiązania tej sprzeczności wysuwamy hipotezę, w myśl której układ imidazolowy histydyny w cząsteczce globiny reprezentuje tylko jedną grupę hemafilną. Drugie ugrupowanie koordynacyjnie związane z żelazem protoporfiryny należy do jakiegoś odmiennego od histydyny układu, dotychczas nie zidentyfikowanego, który określamy jako grupę X.

W myśl wysuniętej przez nas hipotezy, sposób reagowania hemii hemoglobiny z NO przedstawimy schematycznie następująco:



Jak z powyższego schematu wynika przyjmujemy, że w hemoglobinie tlenek azotu zajmuje miejsce koordynacyjne podstawnika X, wytwarzając połączenie, w którym żelazo znajdujące się na +3 stopniu utlenienia związane jest z układem imidazolu i z NO. Połączenie to cechuje się smugami absorpcyjnymi przy 568 m μ i 532 m μ , przesuwanymi się w odpowiednich warunkach w kierunku fioletu i zajmujących położenia 572 m μ i 536 m μ . Analogiczne połączenie powstaje w toku reakcji hemichromu histydynowego z NO, a bardzo podobne połączenie z NO wytwarza również hemichrom pilokarpinowy. Natomiast tlenek azotu reagując z hemoglobiną zajmuje miejsce koordynacyjne układu imidazolowego wytwarzając połączenie hemu, którego żelazo na +2 stopniu utlenienia jest związane koordynacyjnie z podstawnikiem X oraz NO, cechujące się smugami absorpcyjnymi 576 i 542 m μ . Oczywiście połącze-

nie to musi być odmienne od produktu reakcji hemochromu histydynowego lub pilokarpinowego z NO.

Jeżeli nasz pogląd na przypuszczalną strukturę powyżej omawianych połączeń jest słuszny, to na jego podstawie można by wyciągać wnioski dotyczące podstawników związanych koordynacyjnie z żelazem w innych hemoproteidach. Z badań naszych wynika, że ferricytochrom *b* reaguje z NO dając produkt cechujący się widmem identycznym z widmem połączeń NO z hemoglobina i hemichromem histydynowym. Na tej podstawie można twierdzić, że w cytochromie *b* jedną z grup hemafilnych jest układ imidazolowy histydyny. Druga grupa hemafilna cytochromu *b* nie jest prawdopodobnie układem imidazolowym, ale nie jest również identyczna z podstawnikiem X hemoglobiny. Wniosek opieramy na podstawie charakteru widma połączenia ferrocycyochromu *b* z NO, odmiennego od widma HbNO.

Z badań nad cytochromem *c* nie dadzą się na razie wyciągnąć żadne wnioski, ponieważ w związku tym występuje inna porfiryne, nie posiadająca wolnych grup winylowych. Wiadomo z badań *Drabkina* (9), że różnica w budowie porfiryne wpływa na położenie smug w widmie.

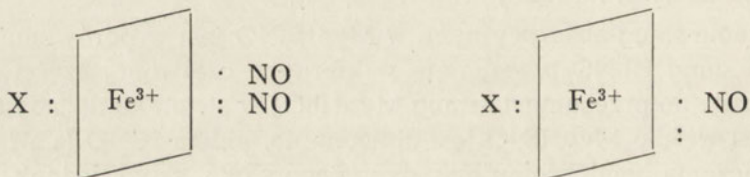
Katalaza i peroksydaza w postaci połączenia z NO wykazują właściwe tylko sobie położenie smug absorpcyjnych. Na tej podstawie można przewidywać, że inne niż w hemoglobinie grupy skoordynowane są z układem hematynowym. Przewidywanie takie zgodne jest z badaniami przeprowadzonymi na innej drodze (33, 34).

Położenie smug absorpcyjnych w MyoHbNO jest w porównaniu z położeniem smug HbNO przesunięte w kierunku czerwonej części widma, analogicznie do przesunięcia smug MyoHbO₂ w stosunku do smug HbO₂. Natomiast widmo MyoHiNO jest zbliżone do widma HiNO (a więc również połączenia hemichromu histydynowego z NO) z tym jednak, że jedna ze smug posiada nieco odmienne położenie. Fakty te mogłyby być również wykorzystane dla poparcia koncepcji upatrującej w MyoHb tylko jedną grupę hemafilną w postaci układu imidazolowego (25a, 22). W przypadku myohemoglobiny sytuacja nie jest jednak tak przejrzysta jak w przypadku poprzednio omawianych hemoproteidów.

Jak z powyższych rozważań wynika, badania widm połączeń NO ze związkami hematynowymi mogą służyć do określenia niektórych grup hemafilnych. Dotychczas nie potrafimy jednak posunąć się poza stwierdzenie obecności lub nieobecności układu imidazolowego w koordynacji z Fe. Pewne wnioski dotyczące niektórych podstawników możemy wyciągnąć na drodze pośredniej. Z badań nad hemochromem globinowym wynika, że podstawnik X nie jest w środowisku alkalicznym trwały i że ulega stopniowo przemianom. Przemiany te związane są z powsta-

waniem widma hemochromu globinowego, o którym wiadomo z prac Drabkina (8), że całkowicie zostaje wytworzony dopiero po upływie ok. 80 minut. Równoległe z powstawaniem hemochromu zmienia się sposób reakcji z NO. Świeżo przygotowany roztwór hemochromu wykazuje po zadziałaniu NO widmo zbliżone do widma HbNO, w miarę upływu czasu widmo staje się coraz mniej charakterystyczne.

Należałoby jeszcze zastanowić się nad wykazaną w tej pracy zdolnością NO do wytwarzania połączeń ze związkami ferro- i ferrihematynowymi, szczególnie gdy uwzględnimy fakt, że CO zbliżony własnościami do NO łączy się tylko z połączeniami ferroporfirynowymi. Tłumaczymy ten fakt przypuszczeniem, że NO może dostarczyć do wytworzenia wiązania 1 elektron nieparzysty albo 2 lub 3 elektrony, podczas gdy CO może dostarczyć jedynie jedną parę elektronów. W ferroporfirynach atom Fe wymaga 5 elektronów dla uzyskania pełnej konfiguracji kryptonu, przy czym 2 e. dostarcza jeden z podstawników, natomiast 3 e. może dostarczyć jedna lub dwie cząsteczki NO, co jest niemożliwe, jeżeli zamiast NO zareaguje z żelazem CO. Powstawanie połączeń z NO da się więc uzasadnić w oparciu o teorię elektronową związków kompleksowych. Stwierdzone przez nas powstawanie dwóch połączeń Hi z NO (dośw. I), które nie mogąc znaleźć innego wytłumaczenie określiliśmy jako $Hi(NO)_2$ i $Hi(NO)$, można uzasadnić w oparciu o teorię elektronową:



Kończąc omawianie wyników badań nad związkami tlenkoazotowymi połączeń hematynowych wydaje mi się, że zasługuje na uwagę zarysowująca się możliwość wykorzystania pomiarów widm absorpcyjnych do wyjaśnienia charakteru grup skoordynowanych z układem hematynowym. Ten sposób postępowania może stanowić nową metodę badań nad grupami hemafilnymi hemoproteidów.

Kierownictwu Instytutu Ekspertyz Sądowych w Krakowie dziękuję za umożliwienie dokonania oznaczeń na spektrofotometrze „Uvispec”.

Specjalnie gorące słowa podziękowania składam prof. doktorowi B. Skarżyńskiemu za czas poświęcony na przedyskutowanie ze mną tej pracy i nadanie jej odpowiedniej formy.

Streszczenie

Przedstawiono badania nad produktami działania tlenu azotu na szereg połączeń hematynowych. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono:

1) NO wytwarza połączenia o charakterystycznym dwusmugowym widmie zarówno z hemo-, jak i hemiproteidami, oraz z hemo- i hemichromami, natomiast nie powoduje zmian w widmach roztworów wolnego hemu i wolnej hematyny.

2) NO wytwarza połączenie o identycznych cechach widmowych z hemiglobiną, hemichromem histydynowym i globinowym oraz ferricytochromem *b*. Związek o bardzo podobnym widmie powstaje skutkiem działania NO na hemichrom pilokarpinowy. Identyczność widm produktów działania NO na rozmaite połączenia prowadzi do wniosku, że w związkach tych są skoordynowane obok NO te same ugrupowania atomów.

3) Z wniosku pod punktem 2 wynika, że na charakter widma w zakresie widzialnym wpływają tylko grupy bezpośrednio skoordynowane z żelazem danego układu hematynowego, nie wpływają natomiast cechy białka, do którego należy grupa skoordynowana z żelazem.

4) Przedyskutowano możliwość zastosowania badań spektroskopowych dla wyjaśnienia rodzaju grupy hemafilnej w cząsteczce białka hemoproteidów, dochodząc przy tym do wniosku, że w hemoglobinie i w ferricytochromie *b* tylko jedna grupa hemafilna jest reprezentowana przez układ imidazolowy histydyny.

5) Oznaczono stałą równowagi dla reakcji cytochromu *c* z NO. Stwierdzono, że stała ta leży w rzędzie wielkości stałej równowagi dla reakcji myohemoglobiny z CO.

LITERATURA

1. Anson M. L., Mirsky A. E., *J. Physiol.* **60**, 100, 1925.
2. Barron E. S. G., *J. Biol. Chem.* **97**, 287, 1932.
3. Brooks J., *Proc. Roy. Soc.* **1238**, 368, 1937.
4. Clark W. M., Perkins M. E., *J. Biol. Chem.* **135**, 643, 1939.
5. Clark W. M., *J. Biol. Chem.* **135**, 543, 1940.
6. Coryell C. D., Pauling L., Dodson R. W., *J. Phys. Chem.* **43**, 825, 1939.
7. Drabkin D. L., Austin J. H., *J. Biol. Chem.* **112**, 51, 1935/36.
8. Drabkin D. L., Austin J. H., *J. Biol. Chem.* **112**, 89, 1935/36.
9. Drabkin D. L., *J. Biol. Chem.* **146**, 605, 1942.
10. Euler H., Hellström H., *Z. physiol. Chem.* **260**, 163, 1939.
11. H a u r o w i t z F., *Z. physiol. Chem.*, **138**, 68, 1924.
12. H a u r o w i t z F., *Z. physiol. Chem.* **136**, 149, 1924.

13. Haurowitz F., Kraus F., Winkler A., *Z. physiol. Chem.* **232**, 146, 1935.
14. Haurowitz F., Waelsch H., *Z. physiol. Chem.* **182**, 82, 1929.
15. Heidelberger M., *J. Biol. Chem.* **53**, 31, 1922.
16. Hermann L., *Arch. Anat. Physiol. u. wiss. Med.* 469, 1865.
17. Keilin D., Hartree E. F., *Proc. Roy. Soc.* **122B**, 303, 1937.
18. Keilin D., Hartree E. F., *Nature* **139**, 548, 1937.
19. Keilin D., Hartree E. F., *Proc. Roy. Soc.* **121B**, 181, 1936—37.
20. Keilin D., Mann T., *Proc. Roy. Soc.* **122B**, 124, 1937.
21. Keilin D., Hartree E. F., *Biochem. J.* **39**, 148, 1945.
22. Kiese M., Kaeske H., *Biochem. Z.* **312**, 121, 1942.
23. Lemberg R., Legge J. W., *Hematin Compounds and Bile Pigments*, N. Y. 1949, s. 163.
24. Lemberg R., Legge J. W., l. c., s. 190.
- 24a. Margoliash E., *Nature*, **175**, 293, 1955.
25. Millikan G. A., *Proc. Roy. Soc.* **120B**, 366, 1936.
- 25a. Millikan G. A., *Proc. Roy. Soc.* **155A**, 277, 1936.
26. Morgan V. E., *J. Biol. Chem.*, **112**, 557, 1935—36.
27. Roughton F. J. W., *Harvey Lectures* **39**, 96, 1944.
28. Straub B. M., *Z. physiol. Chem.* **268**, 228, 1941.
29. Szczepkowski T. W., *Acta Biochim. Pol.* **2**, 169, 1955.
30. Theorell H., *Ergebnisse d. Enzymforschung* **9**, 231, 1943.
31. Theorell H., *Biochem. Z.* **252**, 1932.
32. Theorell H., Akesson A., *J. Am. Chem. Soc.* **63**, 1820, 1941.
33. Theorell H., *Arkiv Kemi Mineral. Geol.* **16A**, Nr 14, 1942.
34. Theorell H., Paul K. G., *Arkiv Kemi Mineral. Geol.* **18A**, Nr 12, 1935.
35. Wyman J. *J. Biol. Chem.* **127**, 581, 1939.

ВОЗДЕЙСТВИЕ ОКИСИ АЗОТА НА ГЕМАТИНОВЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

Резюме

Представление исследования продуктов воздействия окиси азота на ряд соединений гемамина. На основании полученных результатов доказано, что:

1) образует соединения, которым соответствует спектр с характерными двумя полосами, как с гемо- так и с гемипротеидами, а также с гемо- и гемихронами, но он не вызывает изменений в спектрах растворов свободного гема и свободного гематина.

2) образует соединения, которым соответствуют тождественные свойства спектра, с гемиглобином, гемихромом гистидина и глобина, а также желез-цитохром *b*. Соединение, которому соответствует очень похожий спектр, образуется вследствие действия NO на гемихром пилокарпина. На основании тождества спектров продуктов воздействия NO на различные соединения мы заключили, что в этих соединениях вместе с NO координируются те-же группы атомов.

3) Из вывода № 2 следует, что на характер спектра в пределах видимости влияют лишь группы, непосредственно координированные с железом данной системы гематина, но не влияют свойства белка, к которому относится координированная с железом группа.

4) Обсуждалась возможность применения спектроскопических исследований для выяснения вида гемафильной группы в частице белка гемопротеидов, причем был сделан вывод, что в гемоглобине и в желези-цитопроме *b* одна лишь гемафильная группа представлена системой имидазолового гистидина.

5) Определена была постоянная равновесия для реакции цитохрома с с NO. Установлено, что эта постоянная находится в ряду величин постоянной равновесия для реакции миохемоглобина с CO.

THE EFFECT OF NITROGEN OXIDE ON HEMATIN COMPOUNDS

Summary

Studies on the reaction products of nitrogen oxide on several hematin compounds have been presented. The following conclusions have been made:

1. NO forms with hemo and hemiproteins as well as with hemo and hemichromes complexes, showing characteristic two bands in the spectrum. This phenomenon is not observed when NO acts on the solutions of free hemo and hematin.
2. NO complexes with hemoglobin, histidine hemichrome, globin hemichrome and ferricytochrome *b* possess identical spectra. The reaction product of NO with pilocarpine hemichrome shows also a very similar spectrum. The identity of the spectra suggests the participation of the same atom groupings.
3. It can be concluded from the above results, that groups directly coordinated with the iron atom of a given hematin system are responsible for the observed characteristics of the visible part of the spectrum. Protein to which belongs the group coordinated with the iron shows no effect whatever on the spectrum.
4. Possibilities have been discussed of applying spectroscopic investigations for elucidating the character of hemaphilic group in the protein moiety of hemoproteins. It has been shown that only one hemophilic group in hemoglobin and ferricytochrome *b* is represented by the imidazole grouping of histidine.
5. Equilibrium constant for the reaction of cytochrome *c* with NO has been estimated: the value being of the same order as the one characteristic for the reaction of myohemoglobin with CO.

Otrzymano 21.III.1955

SPIS TREŚCI

A. Manitius — Zawartość potasu w surowicy krwi ludzi zdrowych	231
J. Súpniowski, J. Mayer i S. Kamiński — Syntetyczny D, L-tryptofan : :	249
J. Pawełkiewicz i K. Nowakowska — Prekursory biosyntezy nukleotydocyjanokobalamin. II. Synteza nowych pochodnych witaminu B ₁₂	259
W. Mejbaum-Katzenellenbogen — Turbidymetryczna mikrometoda oznaczania białek tanią	279
W. Ostrowski — Połączenia witaminu B ₁₂ z białkami. III. Badania nad kompleksem cyjanokobalamina-białko (erytroglobulin) w surowicy krwi	297
I. Reifer, A. Ruminska i J. Kączkowski — Wstępne badania nad wpływem żelazicyjanku potasu na plon i zawartość alkaloidów w <i>Datura stramonium</i> L : :	315
J. Pawełkiewicz — Prekursory biosyntezy nukleotydocyjanokobalamin. III. Wpływ działania aureomycyny na syntezę witaminów grupy B ₁₂ przez bakterie kwasu propionowego	321
J. Janicki i J. Pawełkiewicz — Witamin B _{12p}	329
T. W. Szczepkowski — Działanie tlenu azotu na połączenie hematy- nowe	343