POLSKA AKADEMIA NAUK
KOMITET BIOCHEMICZNY

# ACTA BIOCHIMICA POLONICA

KWARTALNIK

TOM I
Zeszyt 1-2

Eva Ostrowska

WARSZAWA 1954
PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

http://rcin.org.pl

*KOMITET REDAKCYJNY*

Machnacka Irena, Mozołowski Włodzimierz,
Reifer Ignacy

*RADA REDAKCYJNA*

Baranowski Tadeusz, Chmielewska Irena, Heller Józef, Mikulaszek Edmund, Niemierko Włodzimierz, Skarżyński Bolesław, Supniewski Janusz, Wierzchowski Mieczysław.

ADRES REDAKCJI:

Warszawa, Krakowskie Przedmieście 72 (Pałac Staszyca).

Inst. Biol. Dośw. PAN w Warszawie Biblioteka

P. 1015

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1954

| | |
|---|---|
| Nakład 775 + 40 nadb. | Oddano do składu 3.II.54 |
| Ark. wyd. 11, ark. druk. 10 | Podpisano do druku 26.IV.54 |
| Pap. bezdrzew. III kl, 80 gr, 70 x 100 | Druk ukończono 30.IV.54 |
| Cena zł. 15.— | Zam. 138-c/54. 5-B-11497 |

Druk. im. Rewolucji Październikowej — Warszawa.

K 2/65

http://rcin.org.pl

http://rcin.org.pl

ACTA BIOCHIMICA POLONICA
VOL. I 1954 NO 1

DAWID SHUGAR

# ŚWIATŁOCZUŁE UTLENIANIE NIEKTÓRYCH 3-PODSTAWIONYCH POCHODNYCH INDOLU W OBECNOŚCI RIBOFLAWINY

*Oddział Biochemii Fizycznej Działu Biochemii Państw. Zakł. Higieny.*
*Kier. Działu: Prof J. Heller. Kier. Oddziału: D. Shugar.*

Fotoutlenianie szeregu substancji takich, jak: aminokwasy, enzymy, witaminy, sterydy zachodzące w świetle widzialnym w obecności uczulacza, było z uwagi na biologiczną i kliniczną ważność tych reakcji przedmiotem znacznego zainteresowania. Jednak zarówno identyfikacja produktów tych reakcji, jak i poznanie ich mechanizmu natrafiało na szereg trudności. Większość dotychczasowych badań dotyczyła głównie jakościowej strony zjawiska (Shugar, 1951).

Rola riboflawiny jako uczulacza takich reakcji tak *in vitro*, jak i *in vivo* jest szczególnie interesująca zarówno z uwagi na szerokie rozprzestrzenienie riboflawiny w przyrodzie, jak i z tego względu, że wchodzi ona w skład grupy prostetycznej flawoprotein. Wystarczy przytoczyć tu jako przykład, że początkowe prace Eulera i Adlera (1934) i Theorella (1935) stały się punktem wyjściowym dla szeregu dalszych badań nad rolą riboflawiny w mechanizmie widzenia u różnych organizmów i w leczeniu zaburzeń wzrokowych (Heiman, 1942; patrz również Blum, 1941; Heyroth, 1941).

Wydaje się, że szczególne znaczenie ma fotoutlenienie pochodnych indolu wobec riboflawiny jako uczulacza (1) z uwagi na zależność między riboflawiną a metabolizmem tryptofanu (Harding, Dagleish i Neuberger, 1953), (2) ze względu na rolę kwasu indolooctowego (IAA) i niektórych jego analogów jako substancji wzrostowych dla roślin oraz (3), że istnieją pewne dane, wskazujące na udział riboflawiny w zjawisku fototropizmu (Galston 1950) w drodze reakcji z kwasem indolooctowym, aktywowanej przez światło.

Prawdopodobnie fotoutlenianie kwasu indolooctowego *in vitro* w obecności różnych uczulaczy (Galston, 1950; Shugar, 1951; Ferri, 1951 a) przebiega różnymi drogami i jest związane z przenoszeniem wodoru na jakiś akceptor (Galston, 1950; Brauner, 1952).



http://rcin.org.pl

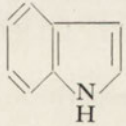
W przypadku gdy uczulaczem jest riboflawina, konieczna jest obecność tlenu (Ferri, 1951 b; Galston, 1950), a riboflawina, jak się wydaje, odgrywa rolę przenośnika wodoru między kwasem indolooctowym a tlenem (Galston, 1950) wg następującego ogólnego mechanizmu:

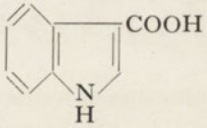
$$Rbf + hv \rightarrow Rbf^*$$
$$IAA + Rbf^* \rightarrow \text{produkt utlenienia} + Rbf.H_2,$$
$$Rbf.H_2 + {}^1/_2O_2 \rightarrow Rbf + H_2O,$$

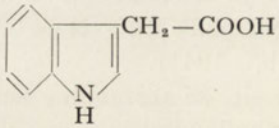
gdzie Rbf* oznacza riboflawinę aktywowaną światłem.

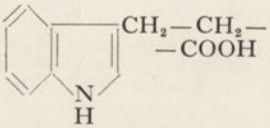
Ostatnio Brauner (1952) dostarczył dowodów, że reakcja ta jest związana z dekarboksylacją łańcucha bocznego, zaś Denffer i Fischer (1952) podali, że pod działaniem promieni ultrafioletowych jako produkt reakcji powstaje 3-indolokarboksyaldehyd. Zwykłe światło dzienne powoduje powstanie innego rodzaju produktu rozpadu, być może o charakterze keto-kwasu.

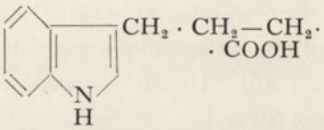
W czasie badań nad inaktywacją enzymów, uczuloną przez riboflawinę (Shugar, 1951), stwierdzono znaczne różnice w ilościowej wydajności fotoutleniania tryptofanu i kwasu indolooctowego. Rozpatrzenie możliwych przyczyn tych różnic oraz rozważenie niektórych danych jakościowych zawartych w pracy Galstona (1949) zwróciło uwagę na pewną regularność w wydajności utlenienia poszczególnych pochodnych indolu, przy czym wydaje się, że regularność ta jest wynikiem rodzaju podstawnika w pozycji 3 pierścienia indolowego. Jako jedno z możliwych tłumaczeń różnic w wydajności fotoutlenienia nasuwa się wpływ polarności w oparciu o założenie, że miejscem reakcji jest grupa NH pierścienia pirolowego.

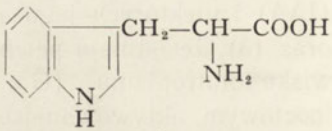

Indol


Kwas indolokarboksylowco


Kwas indolooctowy


Kwas indolopropionowy


Kwas indolomasłowy


Tryptofan

Wydawały się celowymi dalsze badania nad rolą podstawnika w pierścieniu indolowym, a w szczególności ustalenie wydajności fotoutlenienia

http://rcin.org.pl

poszczególnych członów szeregu homologicznego pochodnych indolu z indolem i tryptofanem włącznie.

Przypuszczano, że stopniowo rosnące oddalenie grupy karboksylowej od rdzenia indolowego, jak to ma miejsce w kolejnych członach wyżej przytoczonego szeregu, pozwoli na pewną interpretację wpływu podstawnika. Również interesujące wydawało się przebadanie, w jakim stopniu reakcja zachodzi przy kilku różnych wartościach pH środowiska, aby ustalić wpływ, jaki wywiera zmiana polarności grupy karboksylowej, ponieważ w środowisku kwaśnym grupa ta zachowuje się jako akceptor wodoru, natomiast w środowisku wystarczająco zasadowym przekształca się ona w anion $COO^-$ i ma wyraźną tendencję do odpychania elektronów.

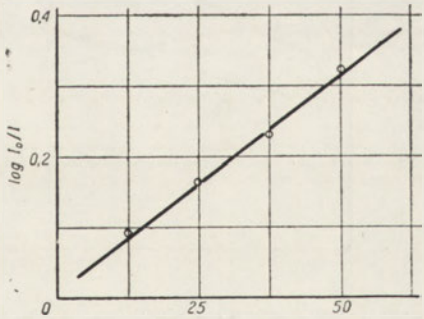
## Metodyka

Jako źródło światła służyła lampa rtęciowa Phillipsa HP-125, z której usunięto zewnętrzną osłonę szklaną. Za pomocą filtru Eastmana 7-37, a w pewnych przypadkach również filtru Wooda, izolowano emisję energii w zakresie około 3650 Å, ponieważ w tym właśnie zakresie zachodzi absorpcja światła wyłącznie przez riboflawinę. Pewne doświadczenie wreszcie przeprowadzano stosując zwykłe, rozproszone światło dzienne.

Użyte do doświadczeń: indol, tryptofan, kwas indolooctowy, indolomasłowy i kwas indolopropionowy były produktami handlowymi, których czystość sprawdzono na podstawie temperatury topnienia i widma absorpcyjnego w świetle ultrafioletowym (Ward, 1923). Kwas indolokarboksylowy sporządzono działaniem bezwodnika kwasu węglowego na jodek indolomagnezowy (Majima i Shigematsu, 1924); produkt wykazywał temp. topn. 212—213°. Riboflawina pochodziła z firmy Hoffman — La Roche, przy czym jej widmo absorpcyjne było zgodne z tym, które podali Warburg i Christian (1938).

Wszystkie naświetlania przeprowadzano w środowisku zawierającym M/60 bufor fosforanowy o wartości pH = 5,3, 7,2 i 8,7. Roztwory przyrządzano tak, aby zawierały 50/ml pochodnej indolu i 10/ml riboflawiny. Każdorazowo sporządzano świeże roztwory riboflawiny.

Około 3,5 ml badanego roztworu umieszczano w kiuwecie Beckmanna o grubości warstwy 10 mm i poddawano naświetlaniu. W czasie trwania

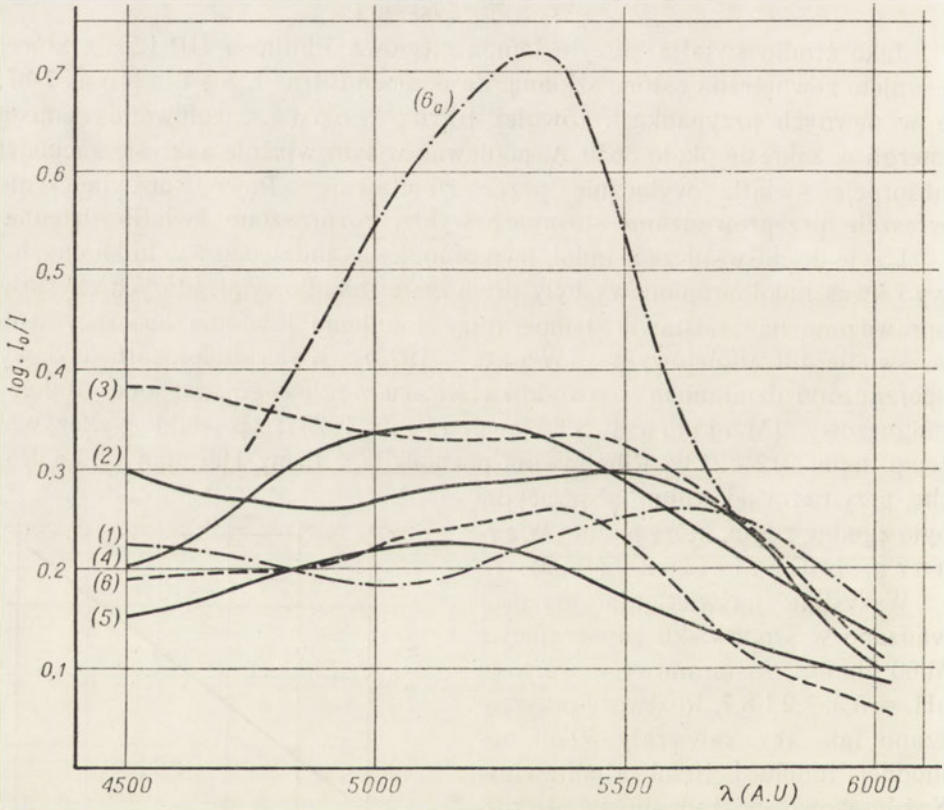



Rys. 1 — Krzywa wzorcowa dla indolu przy zastosowaniu metody oznaczania kwasu glioksalowego w modyfikacji Bric'ea.

http://rcin.org.pl

naświetlania trzykrotnie w odpowiednio dobranych odstępach czasu pobierano 0,5 ml próbki celem oznaczenia ilości pochodnej indolowej, która nie uległa zmianie pod wpływem naświetlania. Reakcje z każdą z pochodnych przeprowadzano przy 3 różnych wartościach pH, jak podano wyżej. Stężenie pochodnej indolowej, która nie uległa reakcji, oznaczano kolorymetrycznie, równocześnie z serią prób kontrolnych o zmiennych stężeniach, które służyły do ustalenia krzywej wzorcowej. Chociaż riboflawina ma niewielki wpływ na kolorymetryczne oznaczanie indolu, niemniej jednak dodawano ją do wszystkich prób kontrolnych. Wszystkie operacje przeprowadzano w ciemni, używając słabego czerwonego światła.

Typową krzywą wzorcową dla samego indolu przedstawiono na rys. 1, przy czym do oznaczania użyto zmodyfikowanej przez B r i c e'a (1933-




Rys. 2 — Widmo absorpcyjne barwy wytwarzanej przez różne pochodne indolowe przy zastosowaniu metody B r i c e'a dla kwasu glioksalowego:
(1) tryptofan, (2) kwas indolomasłowy, (3) kwas indolopropionowy, (4) indol), (5) kwas indolokarboksylowy, (6) kwas indolooctowy.
Krzywa 6a) dot. oznaczeń kwasu indolooctowego przy zastosowaniu odczynnika S a l k o w s k i e g o. Końcowe stężenie pochodnych indolu w roztworze wynosi 11 y/ml.

http://rcin.org.pl

34) metody oznaczania kwasu glioksalowego. Wszystkie inne pochodne indolowe, z wyjątkiem kwasu indolokarboksylowego, dają również krzywe wzorcowe o zależności w przybliżeniu liniowej; jednak natężenie barwy jest różne dla różnych pochodnych, jak to widać z rys. 2. Na tym samym rysunku przedstawiono linię absorpcyjną dla barwy, jaką otrzymano, oznaczając kwas indolooctowy odczynnikiem Salkowskiego (Tang i Bonner, 1947); metodę tę stosowano też następnie przy oznaczaniu utlenienia IAA. Oznaczenie kolorymetryczne we wszystkich przypadkach prowadzono przy długości fali 5400 A. W kilku doświadczeniach celem jakościowego sprawdzenia niektórych wyników zastosowano metodę chromatografii bibułowej.

## Wyniki i dyskusja

Na rys. 3 przedstawiono wydajność utleniania poszczególnych badanych pochodnych indolowych. (Odnośnie kwasu indolokarboksylowego patrz niżej). Z rys. 3 (d) wynika, że wydajność utlenienia samego indolu zmienia się ze zmianą wartości pH, co najprawdopodobniej związane jest z jego zdolnością do tworzenia postaci tautomerycznej z aktywną grupą metylenową w położeniu 3 pierścienia pirolowego (Karrer, 1950).

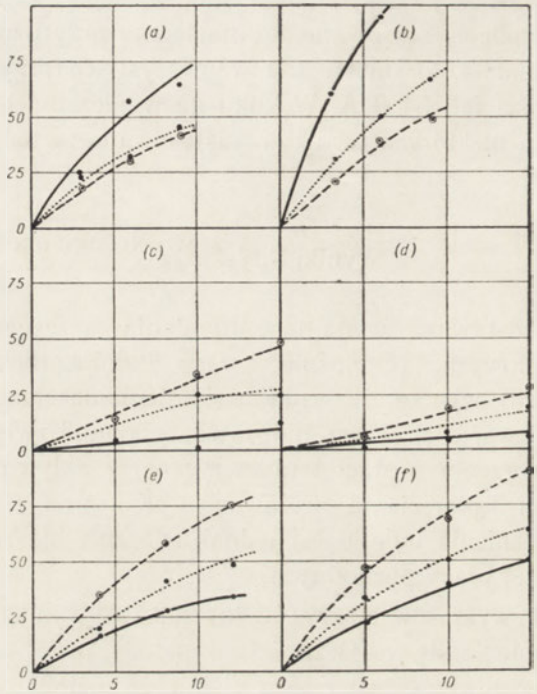
Wydajność utlenienia indolu jest jednak znacznie niższa aniżeli innych przebadanych w tej pracy pochodnych.

Z porównania wykresów na rys. 3 (a) i 3 (b) wynika, że wydajność utlenienia IAA zmienia się w zależności od metody, jakiej użyto do oznaczania kwasu indolooctowego. Jest rzeczą znaną, że metoda Brice'a (1933-34) oznaczania kwasu glioksalowego jest specyficzna dla pierścienia indolowego. Natomiast metoda Tanga i Bonnera (1947) zastosowana w doświadczeniach, których wyniki przedstawiono na rys. 3 (b), wg szeregu autorów nie jest specyficzną dla układu indolu (Frieber, 1922; Happold, 1950) — i rzeczywiście w przypadku innych pochodnych indolu, badanych w tej pracy, daje bardzo słabe lub nawet wcale nie daje zabarwienia. Zatem wydaje się prawdopodobne, że albo pierścień indolowy jest atakowany w więcej niż jednym miejscu, albo sam łańcuch boczny w pozycji 3 bierze udział w reakcji. Jednak ta ostatnia możliwość wydaje się wątpliwa wobec wyników przedstawionych przez Weila i współpracowników (1951), które wykazują, że przy użyciu błękitu metylenowego jako uczulacza łańcuch boczny w pozycji 3 pozostaje nienaruszony.

Wyłączając IAA, wydajność utlenienia różnych pochodnych indolu rośnie ze wzrostem wartości pH, co jest do pewnego stopnia analogiczne do wyników, które otrzymali Weil i współpracownicy (1951) na tryptofa-

http://rcin.org.pl

nie przy zastosowaniu błękitu metylenowego jako uczulacza. Ci sami autorzy podają, iż otrzymali identyczną wydajność utlenienia dla indolu i tryptofanu przy wartości pH = 8,5 (mierzone na podstawie wydzielania się $CO_2$ w aparacie Warburga), a wyniki te odbiegają od danych, jakie uzy-




Rys. 3 — Wydajność fotoutlenienia poszczególnych pochodnych indolu wobec ryboflawiny: (a) kwas indolooctowy, (c) tryptofan, (d) indol, (e) kwas indolopropionowy, (f) kwas indolomasłowy. Krzywa (b) zmierzona, zmodyfikowaną według Brice'a metodą oznaczania kwasu gliksalowego, przedstawia stopień fotoutlenienia kwasu indolooctowego, oznaczonego przy zastosowaniu odczynnika Salkowskiego.

skuje się z porównania rys. 3 (a) i 3 (d) niniejszej pracy. Jednak autorzy ci zwracają uwagę, że reakcja barwna na tryptofan jest ujemna na długo przedtem, zanim ustanie wydzielanie się $CO_2$, tak że ograniczenie pomiaru tylko do tego ostatniego nie jest odpowiednie jako wskaźnik zniszczenia pierścienia indolowego.

Raczej zaskakujący jest odwrotny przebieg zależności stopnia utlenienia IAA od zmiany wartości pH w porównaniu z innymi badanymi pochodnymi, i to niezależnie od metody kolorymetrycznej, jaką zastosowano do oznaczenia kwasu indolooctowego w czasie reakcji. Zjawisko to tłumaczy fakt, dlacze-

http://rcin.org.pl

go uprzednio zaobserwowano tak znaczne różnice wydajności utlenienia IAA i tryptofanu (S h u g a r, 1951), jak również staje się jasne, że w przeciwieństwie do innych pochodnych kwas indolooctowy bierze udział w reakcji głównie jako drobina niezdysocjowana. Z tego punktu widzenia interesująca jest obserwacja v a n S a n t e n a (1935), wg której krzywa wzrostu *Avena coleoptile* zależy od krzywej dysocjacji kwasu indolooctowego, przy czym najszybszy wzrost zachodzi w przypadku drobin niezdysocjowanych.

Z tego, co wyżej podano, wynika, że chociaż rodzaj podstawnika w pozycji 3 pierścienia indolowego odgrywa w przebiegu reakcji ważną rolę (co widać poza tym z porównania wydajności utlenienia tryptofanu i kwasu indolopropionowego), to jednak wysunięta uprzednio sugestia o wpływie polarności nie nadaje się do wyjaśnienia zjawiska odrębności w przypadku kwasu indolooctowego.

Można było się spodziewać, że wyniki przebiegu reakcji z kwasem indolokarboksylowym mogą się stać pomocne w interpretacji tego zjawiska. Wbrew oczekiwaniom jednak pochodna ta wykazuje bardzo małą aktywność nawet przy bardzo długich okresach naświetlania i niezależnie od zastosowanego pH środowiska. W pewnych przypadkach zanotowano nawet niewielkie zwiększenie się pozornego stężenia w wyniku naświetlania, co jest do pewnego stopnia analogiczne do wyników, które otrzymali A l l s o p p i W i l s o n (1951) przy naświetlaniu wodnych roztworów indolu promieniami $X$ i $\gamma$.

Celem sprawdzenia obserwowanego braku aktywności kwasu indolokarboksylowego badano próbki naświetlanych roztworów w drodze chromatografii bibułowej, używając różnych rozpuszczalników. Najbardziej przydatnymi okazały się mieszaniny metanol-butanol-benzen-woda (4:2:2:2) oraz metyloetyloketon-pirydyna-woda (70:5:15). Kwas indolooctowy i tryptofan przebadano w ten sam sposób. Plamy wywoływano p-dwumetylobenzoaldehydem lub chlorkiem żelazowym. W tej drodze otrzymano zupełnie dobre wyniki co do zmniejszania się stężenia IAA i tryptofanu w czasie naświetlania, natomiast plama kwasu indolokarboksylowego pozostała niezmieniona nawet po bardzo długim naświetlaniu. Ani IAA, ani tryptofan nie dawały produktów rozkładu, które można by wykryć przy użyciu wyżej wspomnianych wywoływaczy plam. F e r r i (1951 c) sugeruje, że pod wpływem naświetlania promieniami nadfiołkowymi wobec siarczanu chininy jako uczulacza; jednym z produktów rozkładu może być skatol. Gdyby tak było, wówczas obecność skatolu dałaby się łatwo stwierdzić za pomocą chlorku żelazowego. Oczywiście jest rzeczą możliwą, że mechanizm reakcji zachodzącej pod wpływem promieni nadfiołkowych może być inny, niż to ma miejsce w naszym przypadku. Jak już wspomniano wyżej, D e n f f e r

http://rcin.org.pl

i Fischer (1952) znaleźli, że reakcja zachodząca w świetle widzialnym dostarcza innych produktów aniżeli reakcja przebiegająca w nadfiolecie. Ponieważ ilościowa wydajność reakcji praktycznie nie zależy od długości fali użytego światła (Shugar, 1951), wydaje się zatem, że biorą tu udział reakcje wtórne, związane z produktami rozpadu.

Ferri (1951 c) podaje również, że skatol może być produktem degradacji łańcucha bocznego w drobinie IAA. Gdyby tak było rzeczywiście, nie należałoby oczekiwać stałego wzrostu pozornego stężenia IAA, jak to ma miejsce przy oznaczaniu metodą stosowaną dla kwasu glioksalowego (rys.3 a), która jest specyficzna dla pierścienia indolowego. Ten sam argument odnosi się też do wyników, jakie otrzymali Brauner (1952) i Denffer i Fischer (1952), o których wspominano już wyżej. Dane, jakie otrzymali Weil i współpracownicy (1951) dla tryptofanu, które omówiono już poprzednio, są zgodne z twierdzeniami, że główny bieg reakcji zachodzi przy udziale pierścienia indolowego.

Mogłyby się nasunąć pewne wątpliwości co do rozbieżności w wynikach z poprzednią pracą, w której wykazano, że uczulonej światłem inaktywacji enzymów towarzyszy zniszczenie tryptofanu, występującego jako składowe drobiny enzymu (Shugar 1951, 1952). Wyniki tej pracy zostały przez Mc. Larena i współpracowników (1953) użyte do porównania z wpływem promieni nadfiołkowych na inaktywację enzymów. Należy zwrócić uwagę, że takie porównanie nie jest dopuszczalne, ponieważ pierwotna reakcja w obu przypadkach jest zupełnie różna, jak to wynika z porównania wydajności ilościowej obu tych procesów (Shugar, 1951). Jest rzeczą zupełnie możliwą, że naświetlanie białek jest związane z jakimś zjawiskiem uczulania, dodatkowym w stosunku do inaktywacji wynikającej z bezpośredniej absorpcji światła. Fakt, że w czasie naświetlania promieniami ultrafiołkowymi zachodzi utlenianie pierścienia aromatycznego, przemawia na korzyść tej hipotezy. Należałoby jednak wykazać, czy jest to zjawisko pierwotne, czy też jest ono wynikiem reakcji wtórnych, związanych z produktami rozpadu, powstającymi w czasie reakcji pierwotnej.

## LITERATURA

1. Allsopp C. B., & Wilson J., J. *Chim. Physique*, **48**, 195 (1951).
2. Blum H., Photodynamic Action & Diseases Caused by Light, Reinhold, N. Y. (1941).
3. Brauner, *Naturwissenschaften*, **39**, 288 (1952).
4. Brice A. T., J. *Lab. Clin. Med.*, **19**, 1113 (1933-34).
5. Dennfer D., & Fischer A., *Naturwissenschaften*, **39**, 549 (1952).
6. Euler H., & Adler E., *Z. physiol. Chem.*, **228**, 1 (1934).

http://rcin.org.pl

7. Ferri M. G., *Arch. Biochem. Biophys.*, **31**, 127 (1951 a), *Botanica* (Brazilia) nr 9 (1951 b), *Nature*, **168**, 334 (1951 c).
8. Fieber W., *Centralbl. f. Bakt.*, I Abt., Orig., **87**, 254 (1922).
9. Galston A., W., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **35**, 10 (1949).
10. Galston A. W., *Science*, **111**, 61 (1950).
11. Happold F. C., *Ad. Enzymology*, **10**, 51 (1950).
12. Harding F., C., Dagleish D. E., & Neuberger A., *Biochem. J.*, **53**, 513 (1953).
13. Heiman M., *Arch. Ophthalmol.*, **28**, 493 (1942).
14. Heyroth F. F., Chemical Action of Ultraviolet Rays, Reinhold, N. Y. (1941).
15. Karrer P., Lehrbuch der Organischen Chemie, Rascher Verlag, Zurich (1950).
16. Majima R., & Shigamatsu T. *Ber.*, **57**, 1450 (1924).
17. McLaren A. D., Gentile P., Kirk D. C. & Levin N. A., J. *Polymer Sci.* **10**, 33 (1953).
18. Shugar D., *Bull Soc. Chim. Biol.*, **33**. 710 (1951). *Biochim. Biophys., Acta*, **8**, 302 (1952).
19. Tang Y. W., & Bonner J., *Arch. Biochem.*, **13**, 11 (1947).
20. Theorell H.,*Biochem. Z.*, **279**, 186 (1935).
21. Van Santen A M A. *Proc. Acad. Sci.*, Amsterdam, **41**, 513 (1938).
22. Warburg O., & Christian H., *Biochem. Z.*, **298**, 150 (1938).
23. Ward F. W., *Biochem. J.*, **17**, 891 (1923).
24. Weil L., Gordon W. G. & Buchert A. R., *Arch. Biochem. Biophys.*, **33**, 90 (1951).

## СВЕТОЧУВСТВИТЕЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ 3-ЗАМЕЩЕННЫХ ИНДОЛА В ПРИСУТСТВИИ РИБОФЛОВИНЫ

### Резюме

Было проведено исследование, сенеибилизированного рибофлавином фотоокисления в идентичных условиях ряда 3-замещенных индола и самого индола, а именно: индолилиропионовой к-ты, индолилмасляной к-ты, триптофана, индолилуксусной к-ты и индолилкарбоксиловой к-ты.

Выход реакции зависит в большой степени от характера боковой цепи в позиции 3. Сравнение выходов реакции при pH 5,3; 7,2 и 8,7 показано, что самой реакционноспособной является недиссоциированная молекула индолилуксусной к-ты. Для других производных индола дела обстоят совсем наоборот. Индолилкарбоксиловая к-та не реагирует вовсе в такой системе. Дано короткое обсуждение полученных результатов.

http://rcin.org.pl

## THE RIBOFLAVIN PHOTO-SENSITIZED OXIDATION OF SOME 3-SUBSTITUTED INDOLE DERIVATIVES


### Summary

A study has been made of the riboflavin sensitized photo-oxidation of a number of 3-substituted indole derivatives, including indole, indolepropionic acid, indolebutyric acid, tryptophane, indoleacetic acid and indolecarboxylic acid, all under identical conditions. The nature of the side-chain in the 3-position has an appreciable influence on the relative reaction rate. A comparison of rates at pH values of 5.3, 7.2 and 8.7 showed that, while the undissociated indoleacetic acid molecule reacts preferentially, the reverse holds for the other derivatives. Indolecarboxylic acid does not appear to react at all in this system. The results are briefly discussed.


http://rcin.org.pl

ACTA BIOCHIMICA POLONICA
VOL. I 1954 NO 1

WŁODZIMIERZ OSTROWSKI, BOLESŁAW SKARŻYŃSKI I ZDZISŁAW ŻAK

# WITAMIN $B_{12}$ WE FRAKCJACH BIAŁKOWYCH SUROWICY KRWI LUDZKIEJ

*Z Zakładu Chemii Fizjologicznej A. M. Kraków*
*Kierownik: prof. dr B. Skarżyński*

Hipoteza o szczególnie aktywnej postaci witaminu $B_{12}$, obdarzonej swoistymi biologicznymi własnościami, różnej od czystego krystalicznego związku otrzymanego z wątrób lub z hodowli pleśni, uzyskuje w latach ostatnich coraz szerszą podbudowę doświadczalną. Punktem wyjścia dla tej hipotezy był nie ulegający wątpliwości fakt, że wchłanianie witaminu $B_{12}$ i jego wykorzystanie przez ustrój zwierzęcy uwarunkowane jest łączeniem się z tzw. czynnikiem wewnątrzpochodnym Castle'a. Wielokrotnie potwierdzone obserwacje wskazują na to, że czysty witamin $B_{12}$ w wielu przypadkach działa *in vitro* odmiennie od wyciągów z tkanek zawierających ten witamin. Okoliczności te muszą nasuwać przypuszczenie, że biologicznie czynna w ustroju zwierzęcym postać witaminu $B_{12}$ jest jego połączeniem z białkami.

Wychodząc z tych założeń podjęto już w kilku pracowniach dosyć rozległe badania nad zdolnością łączenia się witaminu $B_{12}$ z białkami. Bird i Hoevet (1) badali zdolność wiązania witaminu $B_{12}$ przez wyosobniony wewnątrzpochodny czynnik Castle'a i przez lizozym stwierdzając, że trwałe połączenia z witaminem $B_{12}$ daje czynnik wewnątrzpochodny, natomiast mieszanina lizozymu z kobalaminą daje się rozdzielić za pomocą dializy. Roland, Millman i Giffee (2) badali zdolność wiązania czystej kobalaminy przez białka wyosobnione z dwunastnicy, żołądka świńskiego oraz osocza. Stwierdzili oni przy tym, że frakcja białka dwunastnicy, cechująca się punktem izoelektrycznym przy pH 4,6, wiąże znacznie więcej witaminu $B_{12}$ niż białka żołądka i białka osocza. Również Glass i współpracownicy (3) stwierdzili powinowactwo witaminu $B_{12}$ do jednej z frakcji mukoproteidów soku żołądkowego ludzkiego i zwierzęcego. O pewnej wybiórczości wiązania witaminu $B_{12}$ przez różne składniki komórki świadczą wyniki badań Swendseida i współpracowników



http://rcin.org.pl

(4), którzy stwierdzili, że w komórkach wątroby myszy witamin $B_{12}$ znajduje się tylko w mitochondriach; brak go natomiast w bezpostaciowej części cytoplazmy i jądrach. Ross i współpracownicy (5, 6) oznaczali zawartość kobalaminy lub jej analogonów w surowicy krwi ludzkiej dochodząc do wniosku, że większość witaminu $B_{12}$ w surowicy występuje w postaci związanej z białkiem, nie próbując jednak udzielić odpowiedzi na pytanie, czy kobalamina jest związana równomiernie ze wszystkimi białkami surowicy, czy też tylko z pewnymi frakcjami białek. Ze względu na doniosłość tego problemu w łączności ze sprawą biologicznie aktywnych połączeń wiwitaminu $B_{12}$ z białkami, postawiliśmy sobie za zadanie wyjaśnienie tego zagadnienia.

Celem naszych badań było ustalenie zawartości witaminu $B_{12}$ w poszczególnych frakcjach surowicy krwi ludzkiej oraz oznaczenie stosunku witaminu wolnego do witaminu u osobników zdrowych.

## Metodyka

Białka surowicy krwi rozdzielano za pomocą elektroforezy bibułowej na szerokim pasku bibuły. Po odcięciu wąskiego skrawka i wybarwieniu odpowiednim barwnikiem ustalono położenie frakcji białkowych na bibule, a następnie odcinano poprzeczne skrawki z poszczególnymi frakcjami i wypłukiwano białko. Stężenie witaminu $B_{12}$ w rozdzielonych frakcjach oznaczano mikrobiologicznie przy użyciu szczepu glonu *Euglena gracilis*.

## Przebieg doświadczeń

Rozdział elektroforetyczny. Elektroforetyczne rozdzielanie przeprowadzano za pomocą aparatury opisanej przez Ostrowskiego i Mikuckiego (7), a zmodyfikowanej w ten sposób, że zamiast elektrod węglowych zastosowano elektrody platynowe, przy czym naczynia z elektrodami zostały połączone z wannami zawierającymi bufor za pomocą kluczy agarowych z 1,5 M roztworem KCl. Postępowanie takie zabezpiecza przed wpływem produktów elektrolizy na rozdział elektroforetyczny oraz zapobiega zanieczyszczeniu buforu węglem. Pasek bibuły Whatmana nr 4 o rozmiarach 10 × 35 cm umieszczano w komorze wilgotnej i wysycano roztworem buforu weronalowego o pH = 8,6, $\mu$ 0,05. Na środku paska za pomocą odpowiedniej długości płytki szklanej umieszczano 0,2 ml surowicy i włączano prąd. Czas rozdziału wynosił ok. 15 godzin, napięcie 175 V, natężenie prądu 4—5 mA w temperaturze 21°. Następnie pasek bibuły suszono na powietrzu oraz spryskiwano 1/15 M roztworem $KH_2PO_4$ w celu zobojętnienia zasadowego buforu weronalowego. Po po-

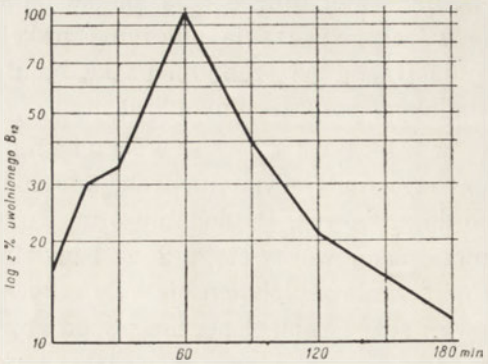
http://rcin.org.pl

wtórnym wysuszeniu na powietrzu wzdłuż całej długości paska odcinano skrawek szerokości 1 cm i barwiono w celu wykazania położenia frakcji białkowych. Po ustaleniu rozmieszczenia frakcji na szerokim pasku bibuły odcinano poprzeczne skrawki, odpowiadające poszczególnym frakcjom.

Wypłukiwanie białka z bibuły i uwalnianie witaminu $B_{12}$. Skrawki bibuły z odpowiadającymi im frakcjami białek cięto na drobne kawałki i zbierano do probówek. Po dodaniu 4 ml wody destylowanej wytrząsano w temperaturze pokojowej w ciągu 2 — 4 godzin. Warunki uwalniania witaminu $B_{12}$ z połączenia z białkiem nie były dotychczas ustalone i liczni autorowie stosowali różne zabiegi począwszy od zwykłego ogrzewania (5) poprzez ogrzewanie w autoklawie w wyższej temperaturze (2) do enzymatycznej hydrolizy włącznie (8). Dlatego też przed rozpoczęciem zasadniczych oznaczeń przebadano około 40 surowic osobników zdrowych i ustalono warunki, w których bez większych zmian aktywności witaminu zostaje osiągnięte całkowite uwolnienie witaminu $B_{12}$ od połączenia z białkiem. Rys. 1 przedstawia krzywą, gdzie na osi odciętej jest zaznaczony czas ogrzewania w autoklawie w temp. 110°, na osi rzędnych log z procentu uwolnionego witaminu $B_{12}$. Jak wynika z wykresu, maksymalna ilość uwolnionego witaminu $B_{12}$ przypada na czas 60 min. przy pH = 7,0, a po 90 min. występuje już wyraźna inaktywacja, sięgająca ok. 60% pierwotnej aktywności. Stosownie do powyższych wyników próbki z wypłukanymi frakcjami były przed mikrobiologicznym oznaczeniem witaminu $B_{12}$ ogrzewane w autoklawie w temp. 110° przy pH = 7,0 w ciągu 60 min. Do mikrobiologicznego oznaczenia brano 2 ml klarownego roztworu z zachowaniem aseptyki.

W piśmiennictwie wciąż jest żywo dyskutowane zagadnienie ewentualnej ochrony witaminu $B_{12}$ w czasie ogrzewania w autoklawie przez dodatek substancji redukujących. Obserwacjom przemawiającym za takim ochronnym działaniem cysteiny, kwasu askorbinowego i kwasu tioglikolowego przeciwstawiają się wyniki badań świadczących o zmniejszaniu się aktywności ogrzewanych w autoklawie preparatów witaminu $B_{12}$ w obecności tych substancji (9). Nie uważamy za wskazane dyskutować o tych sprawach na tym miejscu, tym więcej, że wszystkie dotychczasowe badania nad wpływem czynników redukujących na trwałość witaminu $B_{12}$ w wyższej temperaturze związane są z odmienną techniką mikrobiologicznego oznaczenia witaminu $B_{12}$, a mianowicie z zastosowaniem pałeczek fermentacji kwasu mlekowego i hydrolizatu kazeinu w pożywkach dla tych drobnoustrojów. Posługując się pożywką całkowicie syntetyczną oraz glonem *Euglena gracilis*, nie potrzebowaliśmy się obawiać tych powikłań, z jakimi mieli do czynienia wymienieni powyżej autorzy. Dlatego poprzestaliśmy na ogrze-

http://rcin.org.pl




Rys. 1. Krzywa uwalniania witaminu $B_{12}$ przez ogrzewanie w autoklawie w temp. 110°.

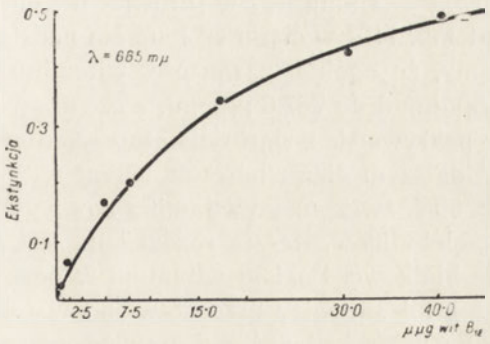
waniu w autoklawie badanego materiału bez żadnych dodatków, biorąc również pod uwagę i to, że dla nas nie miały decydującego znaczenia wartości absolutne. Nadmienić musimy, że próby zastosowania czynników redukujących przy ogrzewaniu w autoklawie materiału badanego były z góry skazane na niepowodzenie, gdyż okazało się, że zarówno cysteina, kwas askorbinowy, jak i kwas tioglikolowy w mniejszym lub w większym stopniu hamowały wzrost glonu.

Mikrobiologiczne oznaczanie witaminu $B_{12}$. Do mikrobiologicznego oznaczania witaminu $B_{12}$ zastosowano metodę Hutnera (10) przy użyciu *Euglena gracilis var. bacillaris,* posługując się pożywką syntetyczną używaną w modyfikacji Rossa (5). Wzrost *E. gracilis* jako wskaźnika zawartości witaminu $B_{12}$ w badanym materiale jest najczulszym z dotychczas znanych odczynem biologicznym, pozwalającym wykrywać kobalaminę w stężeniu $10^{-12}$ g. Wg Heinricha i Lahanna (11) dla podziału komórki *E. gracilis* wystarcza zaledwie 7400 cząsteczek witaminu $B_{12}$. Ponadto szczególną cechę tego glonu jest jego daleko posunięta swoistość w odróżnieniu od najczęściej stosowanych szczepów bakterii mlekowych *Lactobacillus lactis Dorner* (12) i *Lactobacillus leichmanii* (13). *E. gracilis* nie reaguje na te związki chemiczne, które nie będąc witaminami $B_{12}$ zastępują te witaminy w pożywkach innych drobnoustrojów. *E. gracilis* reaguje jednak na różne pochodne kobalaminy, które nie mają czynności witaminu $B_{12}$, jak wykazał Robbins i współpracownicy (14).

Metoda oznaczania witaminu $B_{12}$ za pomocą *E. gracilis,* opisana przez Hutnera (10) została przez nas zmodyfikowana w ten sposób, że zamiast oznaczenia w kolorymetrze zawiesiny komórek glonu po okresie wzrostu — zastosowano ekstrakcję chlorofilu metanolem i oznaczono ekstynkcję wyciągu przy $\lambda = 665$ mμ. Otrzymana w ten sposób krzywa wzorcowa jest znacznie dokładniejsza i nie wykazuje dużych rozrzutów (por. rys. 2), a poza tym ekstrakcja chlorofilu ma tę zaletę, że badana próbka może być zanieczyszczona białkiem i innymi składnikami zwiększającymi absorpcję, nie wpływając zupełnie na ekstynkcję ekstraktu. Glon hodowany był w fototermostacie w temp. 28—30°, oświetlonym dwiema żarówkami jarzeniowymi o mocy 25 W ze względu na to, że promienie podczerwo-

http://rcin.org.pl

ne, które wysyła zwykłe światło żarowe, hamują rozwój szczepu (15). Odległość źródła światła od hodowanej kultury wynosiła 35 cm. Hodowlę zapasową przeszczepiano w odstępach 7 dniowych na pożywkę syntetyczną z dodatkiem 160 μμg krystalicznego witaminu $B_{12}$ na 4 ml pożywki. Przed szczepieniem zawiesinę komórek odwirowywano w warunkach aseptycznych i trzykrotnie przemywano fizjologicznym roztworem NaCl. Czas inkubacji wynosił 7 dni. Chlorofil ekstrahowano 5 ml metanolu w dwóch porcjach, odwirowywano resztki komórek i ekstrakt brano do badania ekstynkcji. Ekstynkcję mierzono za pomocą spektrofotometru fotoelektrycznego typu Coleman. Jeśli natężenie zielonego koloru było zbyt duże, ekstrakt rozcieńczano metanolem do zakresu krzywej wzorcowej.




Rys. 2. Krzywa wzorcowa dla witaminu $B_{12}$ szczep *E. gracilis* — czas inkubacji 7 dni; na osi rzędnych ekstynkcja wyekstrahowanego chlorofilu.

Przeliczanie stężenia witaminu $B_{12}$ na 1 g białka. Równocześnie z rozdzielaniem 0,2 ml surowicy na szerokim pasku bibuły, przeprowadzanym w celu oznaczenia zawartości witaminu $B_{12}$, rozdzielano na wąskim pasku bibuły o rozm. 3 × 35 cm 0,006 ml tej samej surowicy w celu ilościowego oznaczenia stężenia frakcji białkowych. Po elektroforetycznym rozdzieleniu i wysuszeniu w temp. 105°, pasek barwiono za pomocą nasyconego roztworu czerni amidowej 10 B w metanolu z dodatkiem 10% obj. kwasu octowego lodowatego. Czas barwienia wynosił 10 min. Odbarwianie paska przeprowadzano w roztworze 4% fenolu w 20% obj. kwasu octowego w ciągu 20 min. (16). Krzywą elektroforezy wykreślano za pomocą aparatury opisanej przez nas wcześniej (7). Z procentowego składu poszczególnych frakcji i ogólnego poziomu białka w surowicy obliczano stężenie danej frakcji w g/100 ml. Z wartości otrzymanych w toku mikrobiologicznego oznaczenia witaminu $B_{12}$ obliczano ilość witaminu przypadającą na 1 g białka odpowiedniej frakcji. Poziom białka w surowicy oznaczano mikrometodą Kjeldahla.

## Omówienie wyników

Z rys. 1 wynika, że w surowicy krwi osobników zdrowych zaledwie ok. 7% ogólnej ilości witaminu $B_{12}$ znajduje się w postaci niezwiązanej, reszta natomiast występuje w postaci połączeń z białkami. Wartość tę uzyskano po przebadaniu 40 surowic, w których prowadzono równoległe ozna-



http://rcin.org.pl

czenia witaminu $B_{12}$ w surowicy nie ogrzewanej i ogrzewanej w autoklawie w temp. 110° w ciągu 60 min. Na podstawie analizy tych surowic stwierdziliśmy, że ogólna zawartość witaminu $B_{12}$ waha się w granicach od 3,5 μμg/ml do 787,0 μμg/ml, z czego średnia wynosi 230,0 μμg/ml surowicy, co pokrywa się z wartościami uzyskanymi przez Mollina i Rossa (18). W dalszym ciągu naszych badań wyżej opisanę techniką stwierdzono, że ok. 50% związanego witaminu $B_{12}$ występuje w postaci połączenia z frakcją $\alpha_1$-globulinów. Reszta rozdzielona jest nierównomiernie na pozostałe frakcje białkowe. Poziom witaminu w poszczególnych frakcjach w przeliczeniu na 1 ml surowicy przedstawiono w tablicy 1. Stosunkowo wysoki poziom w $\alpha_2$ — frakcji w kilku przypadkach prawdopodobnie spowodowany jest niedokładnym rozdziałem frakcji $\alpha_1$ od $\alpha_2$, gdyż w przeważającej ilości przypadków najwyższy poziom witaminu $B_{12}$ obserwuje się tylko we frakcji $\alpha_1$, która reprezentuje stężenie zaledwie 0,5% ogólnej ilości białka surowicy w warunkach prawidłowych. Również w przypadku albuminów duży rozrzut

Tablica 1

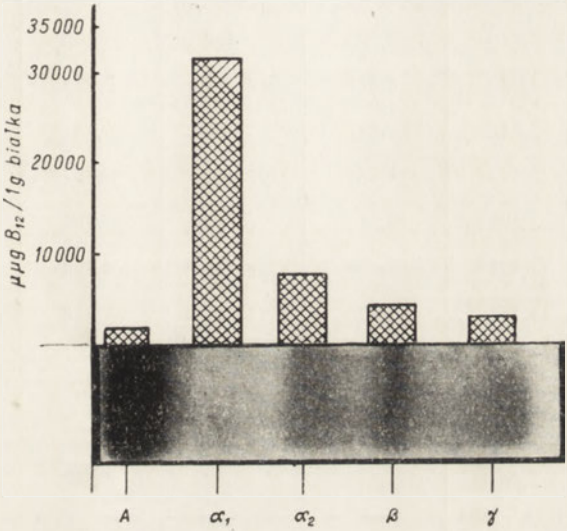
Poziom witaminu $B_{12}$ w poszczególnych frakcjach w przeliczeniu na 1 ml surowicy

| L. p. | μμg witaminu $B_{12}$ na 1 ml surowicy | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | A | $\alpha_1$ | $\alpha_2$ | β | γ | Suma |
| 1 | 57,75 | 100,90 | 70,10 | 72,20 | 65,60 | 368,6 |
| 2 | 73,00 | 106,40 | 4,10 | 1,90 | 0 | 199,1 |
| 3 | 27,50 | 122,50 | 37,50 | 31,20 | 37,50 | 256,2 |
| 4 | 56,20 | 195,00 | 68,70 | 60,00 | 41,20 | 421,1 |
| 5 | 60,00 | 195,00 | 111,20 | 68,60 | 101,00 | 535,8 |
| 6 | 55,00 | 135,00 | 75,00 | 72,50 | 100,00 | 437,8 |
| 7 | 70,00 | 148,00 | 145,00 | 53,71 | 76,50 | 493,2 |
| 8 | 75,00 | 257,50 | 145,00 | 46,23 | 31,32 | 605,1 |
| 9 | 27,50 | 115,00 | 12,20 | 0 | 0 | 153,7 |
| 10 | 0 | 75,00 | 42,50 | 0 | 0 | 117,5 |

wyników, bo od 0 do 75 μμg na 1 ml surowicy, jest spowodowany tym, że frakcja $\alpha_1$ nie zawsze oddziela się od albuminów i najprawdopodobniej obecność witaminu $B_{12}$ we frakcji albuminowej jest wynikiem domieszki $\alpha_1$-globulinów. W przypadku $\beta_1$- i γ-globulinów w 1/3 przypadków witaminu $B_{12}$ nie znaleziono w ogóle lub też znaleziono bardzo małą ilość. W 2/3

http://rcin.org.pl

badanych przypadków zakres stężenia na 1 ml surowicy waha się od 31,2 do 72,5 μμg w β-globulinach oraz od 31,32 do 101,00 μμg w γ-globulinach. Rys. 3 przedstawia stosunek zawartości witaminu $B_{12}$ w poszczególnych frakcjach, gdzie stężenie witaminu w albuminach przyjęto za 1. Stosunek ten wyraża się liczbami 1 : 10,2 : 5,4 : 0,7 : 0,8 licząc od albuminów do γ-globulinów. Wartości wyrażone są w μμg na 1 ml surowicy.




Rys. 3. Poziom witaminu $B_{12}$ w poszczególnych frakcjach białkowych. Poziom w albuminach przyjęto za 1.

Swoiste powiązanie witaminu $B_{12}$ z $\alpha_1$-globulinami surowicy występuje szczególnie wyraźnie, jeżeli zawartość witaminu $B_{12}$ w poszczególnych frakcjach przeliczymy na tę samą ilość białka danej frakcji. Tablica 2 przedstawia poziom witaminu $B_{12}$ przeliczony na 1 g białka poszczególnych frakcji. Liczby wskazują na to, że białko frakcji $\alpha_1$-globulinów wiąże ok. 15 razy więcej witaminu $B_{12}$ niż albuminy, 4 razy więcej niż $\alpha_2$-globuliny, 7 razy więcej niż β-globuliny i ok. 9 razy więcej niż γ-globuliny. Stosunek ten przedstawiono na rys. 4.

W związku z tymi faktami nasuwa się zasadnicze pytanie: czy różnorodne rozmieszczenie witaminu $B_{12}$ w poszczególnych frakcjach surowicy jest wyrazem różnorodnego, wyłącznie fizyko-chemicznego powinowactwa tych białek z witaminem $B_{12}$ — albo czy szczególnie duża zawartość witaminu $B_{12}$ we frakcji $\alpha_1$-globulinów jest spowodowana obecnością swoistego białka, w którym witamin $B_{12}$ jest grupą prostetyczną. W tym celu do surowicy krwi dodawano 400 μμg krystalicznego witaminu $B_{12}$ na 1 ml i po elek-

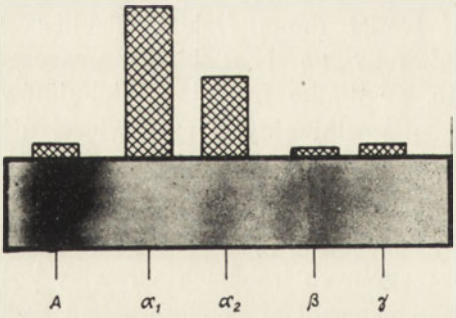


http://rcin.org.pl

Tablica 2

Poziom witaminu $B_{12}$ w poszczególnych frakcjach surowicy w przeliczeniu na 1 g białka

| L. p. | μμg witaminu $B_{12}$ na 1 g białka | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | A | $\alpha_1$ | $\alpha_2$ | β | γ |
| 1 | 1,927 | 24,225 | 9,873 | 8,022 | 4,370 |
| 2 | 3,230 | 19,703 | 418 | 172 | 0 |
| 3 | 1,045 | 28,488 | 4,032 | 2,971 | 2,419 |
| 4 | 2,248 | 27,857 | 7,231 | 6,741 | 5,421 |
| 5 | 2,142 | 34,881 | 12,460 | 9,397 | 6,644 |
| 6 | 2,195 | 19,285 | 6,756 | 6,904 | 7,142 |
| 7 | 3,431 | 33,636 | 16,476 | 4,794 | 5,932 |
| 8 | 3,135 | 88,620 | 15,261 | 6,328 | 1,944 |
| 9 | 1,108 | 23,958 | 1,066 | 0 | 0 |
| 10 | 0 | 11,538 | 6,538 | 0 | 0 |
| Średnia | 2,046 | 31,313 | 8,014 | 4,532 | 3,387 |
| Rozpiętość wyników | 0 — 3,431 | 11,538 — 88,620 | 418 — 16,476 | 0 — 9,397 | 0 — 7,142 |




Rys. 4. Stężenie witaminu $B_{12}$ po przeliczeniu na 1 g białka danej frakcji.

troforetycznym rozdzieleniu badano rozmieszczenie witaminu w porównaniu z uprzednio rozdzieloną tą samą surowicą, do której nie dodano witaminu $B_{12}$. Otrzymane w ten sposób wyniki przedstawiono w tablicy 3. Z liczb podanych w tej tablicy wynika, że witamin $B_{12}$, dodany do surowicy *in vitro*, nie wiąże się w całości tylko z jedną frakcją, lecz rozmieszcza się we wszystkich frakcjach bez szczególnie zaznaczonego powinowactwa do jednej z nich.

Większa część dodanego witaminu umiejscawia się we frakcjach $\alpha_2$-,

http://rcin.org.pl

β i γ-globulinów, a więc w tych, które *in vivo* zawierają witaminu $B_{12}$ najmniej.

Tablica 3

Rozmieszczenie witaminu $B_{12}$ w poszczególnych frakcjach surowicy po dodaniu witaminu *in vitro*.

| L. p. | Ilość dodanego witaminu $B_{12}$ w μμg | μμg witaminu $B_{12}$ na 1 ml surowicy | | | | | | Znaleziono dodanego witaminu $B_{12}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | A | $\alpha_1$ | $\alpha_2$ | β | γ | Suma | |
| 1 | 0 | 70,0 | 148,0 | 145,0 | 53,7 | 76,5 | 493,2 | |
| | 400 | 250,0 | 157,5 | 262,5 | 180,0 | 170,0 | 1020,0 | 526,8 |
| 2 | 0 | 0 | 75,0 | 42,5 | 0 | 0 | 117,5 | |
| | 400 | 91,0 | — | 205,0 | 175,0 | 12,5 | 483,5 | 366,0 |
| 3 | 0 | 27,5 | 115,0 | 11,2 | 0 | 0 | 153,7 | |
| | 400 | 47,5 | 245,0 | 180,0 | 185,50 | 37,5 | 595,0 | 441,3 |

## Dyskusja

Dotychczasowe badania nad występowaniem witaminu $B_{12}$ w surowicy krwi ludzkiej wskazują na to, że zaledwie kilka procent ogólnej ilości witaminu pozostaje w stanie wolnym, reszta natomiast jest związana z białkami. Dowodzą tego badania Rossa (5), Mollina i Rossa (6) oraz nasze (por. rys. 1), gdzie na 40 surowicach osobników zdrowych stwierdzono, że ilość wolnego witaminu $B_{12}$ odpowiada zaledwie 7% ogólnej ilości witaminu zawartego w surowicy. Ross (5) jak również Barrows i współpracownicy (17) stwierdzili, że po podaniu witaminu $B_{12}$ pozajelitowo zostaje on całkowicie związany z białkiem już w kilka godzin po podaniu, przy czym z moczem zupełnie się wtedy nie wydziela, w odróżnieniu od sytuacji zachodzącej wówczas, kiedy zostanie podany drogą doustną. Ogólna zawartość witaminu $B_{12}$ w surowicy waha się w bardzo szerokich granicach, jak to wynika z liczb uzyskanych w toku naszych badań. W przeciwieństwie do klasycznych witaminów grupy B, jak tiamina, riboflawina, niacyna, w przypadku witaminu $B_{12}$ nie można mówić o jakimś stałym poziomie tej substancji w surowicy krwi. Zwracali na to uwagę już Ross (5) oraz Mollin (6) przyjmując, że tak znaczne różnice spowodowane są różnym stanem odżywiania poszczególnych osobników. W ostatniej swej pracy Mollin i Ross (18) przyjmują dolną granicą prawidłowej zawartości witaminu $B_{12}$ w surowicy ok. 100 μμg/ml

http://rcin.org.pl

u osobników prawidłowych, natomiast u chorych na niedokrwistość złośliwą średnie stężenie witaminu $B_{12}$ w surowicy wynosi wg tych autorów ok. 40 μμg/ml.

Jak już o tym była mowa, wiele danych wskazuje na to, że witamin $B_{12}$ okazuje swoiste powinowactwo do pewnych białek dając z nimi szczególne połączenia. Wyniki badań Birda i Hoeveta (1) przemawiają za szczególnym powinowactwem do wewnątrzpochodnego czynnika Castle'a (19); badania Rolanda i współprac. wskazują na swoiste powinowactwo do pewnej frakcji białka dwunastnicy świńskiej (2). Znamienny jest fakt, że owo białko dwunastnicy cechuje się punktem izoelektrycznym równym pH 4,6, gdyż globuliny — $\alpha_1$, z którymi związana jest większość witaminu $B_{12}$ zawartego w surowicy, charakteryzują się punktem izoelektrycznym bardzo zbliżonym, bo równym pH 4,8 (20). Według Scheida (21) i współpracowników wątroba wołu zawiera ok. 20—50 razy więcej witaminu $B_{12}$ niż mięśnie, a nerki zawierają ok. 10 razy więcej. Fakt ten przemawiałby również za nierównomiernym wiązaniem się witaminu $B_{12}$ z różnymi białkami różnych tkanek.

Niewątpliwie połączenia witaminu $B_{12}$ z wieloma białkami są wyrazem jedynie słabiej lub silniej zaznaczonego powinowactwa fizykochemicznego, wynikiem którego będzie powstanie luźnego połączenia, ilekroć dane białko zetknie się z witaminem $B_{12}$. Niemniej jednak połączenie takie, jak witaminu $B_{12}$ z czynnikiem wewnątrzpochodnym lub pewną frakcją białka dwunastnicy, zdają się być uwarunkowane swoistymi własnościami strukturalnymi obu partnerów wchodzących w reakcję. Można z największym prawdopodobieństwem przypuścić, że jeden z $\alpha_1$-globulinów cechuje się również taką swoistą zdolnością wytwarzania połączeń z witaminem $B_{12}$ lub co więcej — że reprezentuje on swoisty kompleks biologicznie czynny witaminu $B_{12}$, który w odpowiednich komórkach bierze bezpośredni udział w procesach związanych z współdziałaniem cyjanokobalaminy (22).

Znamy już kilka reakcji zachodzących w ustroju zwierzęcym, uwarunkowanych udziałem witaminu $B_{12}$, na przykład proces transmetylacji lub syntezy desoksyrybonukleozydów. Wnioskując przez analogię z wieloma innymi egzogennymi związkami chemicznymi o charakterze witaminów, które biorą udział w reakcjach chemicznych ustroju zwierzęcego w postaci katalitycznie działających połączeń z białkiem, możemy się spodziewać, że i cyjanokobalamina w tej postaci wkracza w tok reakcji chemicznych w ustroju. Jest rzeczą możliwą, że kompleks białkowy, zawierający witamin $B_{12}$, opisany przez nas jako składnik frakcji $\alpha_1$-globulinów, jest właśnie tym biologicznie czynnym połączeniem. Już Mollin i Ross (6) wyrazili przypuszczenie, że właśnie w surowicy znajduje się krwiotwórczo aktywna postać witaminu $B_{12}$. Nasze badania pozwalają związać tę postać ze ściśle określoną frakcją białka surowicy.

http://rcin.org.pl

Wiadomo, że oprócz cyjanokobalaminy i jej analogonów w przyrodzie występują jeszcze inne substancje, które cechują się własnościami witaminu $B_{12}$ przy zastosowaniu metod mikrobiologicznych lub też badań posługujących się zwierzętami. Zagadnienie to jest jeszcze dalekie od ujęcia w konkretne sformułowanie, niemniej jednak wiąże się ono już teraz ze sprawą występowania witaminu $B_{12}$ w surowicy. Według Forda i współpracowników (23) owe różne odmiany witaminu $B_{12}$ dają się oddzielić za pomocą elektroforezy bibułowej, a według Robbinsa i współpracowników (14) stosowany przez nas *E. gracilis* reaguje nie tylko na cyjanokobalaminę, lecz i na inne substancje, cechujące się biologicznymi własnościami witaminu $B_{12}$. Być może, że stwierdzony przez nas nierównomierny rozdział witaminu $B_{12}$ na różne frakcje białkowe surowicy jest wyrazem występowania kilku różnych odmian witaminu $B_{12}$, swoiście związanych z różnymi białkami. Próby wyjaśnienia tego problemu są w toku.

Czujemy się w obowiązku wyrazić naszą szczerą wdzięczność prof. drowi J. Janickiemu w Poznaniu za użyczenie szczepu *Euglena gracilis* oraz za wskazówki dotyczące hodowli szczepu oraz mgrowi J. Cholewińskiemu w Krakowie za wykonanie fotografii ilustrujących tę pracę.

## LITERATURA

1. O. D. Bird i Hoevert, *J. Biol. Chem.*, 190, 181, 1951.
2. J. F. Roland, I. Millman i J. W. Giffee, *J. Biol. Chem.*, 202, 857, 1953.
3. G. B. J. Glass et al.. *Science*, 115, 101, 1952; *Gastroenterology*, 23, 219 1953.
4. M. E., Swendseid, F. H. Bettel i W. W. Ackermann, *J. Biol. Chem.*, 190, 791, 1951.
5. G. I. M. Ross, *Nature*, 166, 270, 1950.
6. D. L. Mollin i G. I. M. Ross, *J. Clin. Pathol.*, 5, 129, 1952.
7. W. Ostrowski i A. Mikucki, *Acta Physiol. Pol.*, III, 277, 1952.
8. J. L. Ternberg i R. E. Eakin, *J. Am. Chem. Soc.*, 71, 3858, 1949.
9. A. C. Lang i B. F. Chow, *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 75, 39, 1950.
10. S. H. Hutner et al.,ibid. 70, 118, 1949.
11. H. Heinrich i Z. Lahann, *Naturforsch.*, 7b, 417, 1952, cytat z *Angew. Chem.*, 65, 88, 1953.
12. V. Kocher i O. Schindler, *Intern. Rev. Vit. Res.*, 20, 441, 1949.
13. E. E. Snell, E. Kitay i W. S. Mc Nutt, *J. Biol. Chem.*, 175, 473, 1948.
14. W. J. Robbins, A. Hervey i M. E. Stebbins, *Nature*, 170, 845, 1952.
15. E. G. Pringsheim, Pure cultures of algae, rozdz. VII, Cambridge Univer. Press, 1946, str. 81.
16. W. Grassmann i K. Hanning, H.-S. *Z. Physiol. Chem.*, 290, 1, 1952.
17. Ch H. Barrows, E. B. Mc Collum i B. F. Chow, *J. Nutrit.*, 47, 525, 1952.

http://rcin.org.pl

18. D.L. Mollin i G. I. M. Ross, *Brit. Med. J.*, II, 640, 1953.
19. Hoff - Jorgensen i E. Landbroe - Christensen, *Arch. Biochem. Bioph.*, 42, 474, 1953.
20. Stenhagen E., *Biochem. J.*, 32, 714, 1938.
21. Scheid H. E., Andrews H. H. i Schweigert B. S., *J. Nutrit.*, 47, 601, 1952.
22. R. Wolf, R. Karlin i P. Royer, II-e Congrès International de Biochimie, Paris 1952, str. 23.
23. J. E. Ford, E. S. Holdsworth, S. K. Kon i J. W. G. Porter, *Nature*, 171, 148—150, 1953.

## ВИТАМИН $Б_{12}$ В БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЯХ СЫВОРОТКИ ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ КРОВИ

### Резюме

1. Было исследовано распределение витамина $Б_{12}$ во фракциях сыворотки человеческой крови с помощью электрофореза на бумаге и микробиологических определений.

2. Были установлены условия получения витамина $Б_{12}$ из соединений с белками. Самая большая часть витамина получается путем обогревания в автоклаве при $110^0$ в течение 60 мин. Из анализов сывороток следует, что общее содержание витамина $B_{12}$ колеблется в пределах 3,5 μμ/мл — 787,0 μμг/мл, в среднем 230 μμг/мл.

3. Было найдено, что ок. 50% связанного витамина $Б_{12}$ находится в виде комплекса витамин $Б_{12}$-$\alpha_1$ — глобулин, остальная часть его находится во фракциях $\alpha_2$, $\beta$, $\gamma$ — глобулинов, а также в альбуминах. Лишь только 7% от общего количества витамина $Б_{12}$ выступает в сыворотке в свободном виде.

4. Если прибавить витамин $Б_{12}$ к сыворотке in vitro, образует он соединения не только $\alpha_1$ — глобулином, но распределяется равномерно по всем белковым фракциям.

5. Комплекс витамин $Б_{12}$-$\alpha_1$ — глобулин участвует вероятно в живом организме в энзиматических процессах, которые связаны с функцией витамина $Б_{12}$.

Кафедра Физиологической Химии И. А. в Кракове. Руководитель проф. др Б. Скаржински.

http://rcin.org.pl

## VITAMIN $B_{12}$ IN THE PROTEIN FRACTIONS OF HUMAN BLOOD SERUM


### Summary

1. The authors investigated the distribution of vitamin $B_{12}$ in fractions of human blood serum by means of paper electrophoresis and microbiological determinations.

2. The conditions for the liberation of vitamin $B_{12}$ from combinations with proteins were established; the maximum quantity of the vitamin is liberated by autoclaving at 110°C. for 60 minutes. It was ascertained by analysing serums that, the total content of vitamin $B_{12}$ varies within the limits of 3,5 μμg/ml to 787 μμg/ml; the mean value is 230.0 μμg/ml.

3. The authors have found that c. 50 per cent of the combined vitamin $B_{12}$ appears in the form of a complex of vitamin $B_{12}$ and $\alpha_1$-globulin; the remainder, however, is distributed among the $\alpha_2$, $\beta$, and $\gamma$ globulin fractions and the albumins. Scarcely 7 per cent of the total amount of vitamin $B_{12}$ is found in the serum in the uncombined form.

4. Vitamin $B_{12}$ added to serum in vitro does not combine with the $\alpha_1$-globulin fraction only, but is distributed between all the fractions more or less equally.

5. The complex of vitamin $B_{12}$ and $\alpha_1$-globulin probably plays a part in the enzymatic processes in the organizm connected with the function of vitamin $B_{12}$.


*Department of Biochemistry, Academy of Medicine, Cracow.*

*Director: Professor B. Skarżyński, M. D.*

http://rcin.org.pl

http://rcin.org.pl

ACTA BIOCHIMICA POLONICA
VOL. I 1954 NO 1

K. ZAKRZEWSKI, J. KRYSIAK, K. MURAWSKI, Z. MAY, J. MALEC

# STRUKTURA MOLEKULARNA PRODUKTOW HYDROLIZY DEKSTRANU

*Z Działu Biochemii Instytutu Hematologii*
*Kierownik Działu: K. Zakrzewski*

Dekstran jest wielocukrem, zbudowanym z cząsteczek glikozy połączonych wiązaniami 1:6 ze zmienną, na ogół niewielką, ilością wiązań 1:4, za pomocą których przyczepione są do łańcucha głównego łańcuchy boczne (1,2). Tej swojej strukturze zawdzięcza dekstran szerokie zastosowanie jako środek zastępczy osocza (3,4). Praktycznie niemetabolizowany-dekstran wstrzyknięty dożylnie pozostaje przez wiele godzin w krążeniu, utrzymując prawidłowe ciśnienie osmotyczne w stanach pourazowych, pooparzeniowych itp.

Dekstran jednak w postaci, w jakiej jest wytwarzany przez odpowiednie drobnoustroje, nie nadaje się do celów leczniczych: jego zbyt wielka cząsteczka (rzędu dziesiątków milionów) powoduje silne zlepianie się krwinek, prowadzące do groźnych dla życia zatorów. Otrzymanie leku wymaga zhydrolizowania dekstranu naturalnego (surowego) do mieszaniny odpowiednich wielocukrów o ciężarze cząsteczkowym rzędu 40 — 100 000. Najbardziej efektywne w działaniu leczniczym są cząsteczki większe, cząsteczki zaś mniejsze, z konieczności znajdujące się w wyniku hydrolizy w preparacie leczniczym, są szybko usuwane z krążenia przez nerki (5, 6).

Opracowany w roku ubiegłym przez Instytut Hematologii preparat Poliglukan był przedmiotem badań biologicznych, klinicznych i niektórych chemicznych, co podano w pracy poprzedniej (7). Bardziej szczegółowe badania fizykochemiczne, które są przedstawione w niniejszej pracy, pozwalają na dokładne zobrazowanie charakteru molekularnego polidyspersoidu oraz na wyciągnięcie pewnych wniosków co do przebiegu procesu hydrolizy wielocukru o wiązaniach w łańcuchu głównym typu $\alpha$ — 1:6.

## Materiały

Do badań używano wyłącznie preparatu Poliglukan z serii doświadczeń półtechnicznych, wykonanych w tut. pracowni i oznaczonych nr 109—130.



http://rcin.org.pl

Poszczególne frakcje izolowano przez wytrącenie etanolem w stałej temperaturze. Do wyjściowego 6% roztworu dekstranu-leku (Poliglukan) dodawano kroplami 96% etanol w temperaturze pokojowej aż do osiągnięcia pożądanego stężenia. Całość pozostawiano w temp. +18° lub +4°C (w zależności od frakcji) na przeciąg 24 godz., po czym osad zbierano przez wirowanie. Osad rozpuszczano w wodzie, dializowano wobec wody wodociągowej i powtórnie wytrącano w identycznych warunkach. Osad ostatecznie rozpuszczano w wodzie, dializowano wobec wody wodociągowej i destylowanej, a następnie liofilizowano. Zebrane w ten sposób suche preparaty dosuszano do stałego ciężaru w wysokiej próżni w temperaturze +50°C nad $P_2O_5$. Stężenie etanolu i temperaturę potrzebną do uzyskania podziału polidysperoidu na możliwie dużą ilość frakcji ustalono w doświadczeniach wstępnych (por. 7) i do wszystkich preparatów stosowano tę metodę bez zmian.

## Metody

1. Cząstkową objętość właściwą oznaczano z pomiaru ciężaru właściwego szeregu rozcieńczeń danego preparatu. Gęstość oznaczano w piknometrze o pojemności 10 ml, ważąc go z dokładnością do 0,00005 g, po wyrównaniu temperatury do 25 ± 0,02°C. Cząstkową objętość właściwą znajdowano wg równania (8, 9):

$$\overline{V} = V - W_{sól}\left(\frac{dV}{dW_{sól}}\right) \quad . \; . \; . \; . \; . \; . \; . \quad (I)$$

w którym $\overline{V}$ oznacza cząstkową objętość właściwą koloidu, $W_{sól}$ — ułamek wagowy rozpuszczalnika w roztworze, V — objętość właściwą roztworu, równą odwrotności jego ciężaru właściwego. Rozpuszczalnikiem był zawsze wodny roztwór 0,155 M NaCl. Dokładność metody postępowania sprawdzono przez pomiar cząstkowej objętości właściwej glikokolu, dla którego znaleziono wartość d = 1,63 wobec 1,61, podanej w tablicach (10, 11).

2. Lepkość oznaczano w wiskozymetrze Höpplera, typu BH [1]). Stosowano kulkę o stałej 0,01031 spadającą na przestrzeni 100 mm. Czas spadku kulki nie był nigdy krótszy niż 60 sekund ani też dłuższy niż 300 sek. Pomiary wykonywano w temp. 25 ± 0,02°C. W pracy zastosowano następujące definicje:

$\eta$ — lepkość bezwzględna w cP,

$\eta_r$ — lepkość względna w stosunku do 0,155 M NaCl,

---

[1]) Wypożyczonym dzięki uprzejmości prof. dra J. Hellera z Zakładu Chemii Fizjologicznej AM.

http://rcin.org.pl

$\eta_0$ — lepkość bezwzględna rozpuszczalnika (0,155 M NaCl),

$\eta_{sp}$ — lepkość właściwa $= \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0}$,

$[\eta]$ — lepkość wewnętrzna (stężenie wyrażane w g na 100 ml roztworu) $= \lim_{c \to 0} (\eta_{sp/c})$,

$[\eta]_\Phi$ — lepkość wewnętrzna objętościowa (stężenie wyrażane w procentach objętości, którą zajmuje ciało rozpuszczone w roztworze) $(\eta_{sp})_\Phi$, lim $\Phi = 0$; $\Phi$ = ułamek objętościowy koloidu w roztworze.

3. Dyfuzja. Stałą dyfuzji oznaczano w kiuwecie typu Tiseliusa — w części doświadczeń w komórce jednoramiennej o drodze optycznej 25 mm, w innych zaś — w zwykłej kiuwecie elektroforetycznej trzyczęściowej o drodze optycznej 20 mm lub 25 mm. Pomiary wykonywano w temperaturze + 25 ± 0,2°C, gradient dn/dx fotografowano w świetle monochromatycznym ($\lambda$ = 5893 Å) na kliszy o wymiarach 24×36 mm; do obliczenia wyników powiększano obraz około 15-krotnie i obrys wykonywano według dolnej granicy krzywej gradientu na papierze milimetrowym. Stosowano system optyczny Philpota-Svenssona. Wyniki obliczano metodą momentów (14). Pomiar prowadzono w ciągu przynajmniej 40 godzin i przyjmowano jako podstawę obliczeń wartość stałej dyfuzji w najpóźniejszym czasie, gdy poprawka $\Delta t$ (15) nie wprowadzała istotnego błędu, jak to można było stwierdzić, odkładając na wykresie wartość D wobec 1/t sek.

4. Ilość wiązań glikozydowych 1:6 i innych. Celem ustalenia stosunku wiązań: 1:6, występujących w wielocukrze, do innych wiązań, posługiwano się metodą utleniania nadjodanem, wprowadzoną przez Malapardego (16).

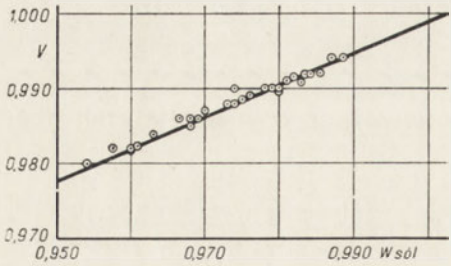
Zasadą metody jest rozbicie wiązania C-C w razie obecności wolnych grup OH przy sąsiadujących atomach węgla, przy czym na rozbicie jednego wiązania zużywa się jeden mol nadjodanu. Utlenianie nadjodanem przeprowadzano według techniki podanej dla dekstranu przez Jeanesa i Wilhama (17) w modyfikacji Hehrego (18). Odważkę 105—110 mg dekstranu + 0,00165 mola $KJO_4$ dopełniano w kolbie miarowej do 250 ml; po 88—95 godz. utleniania w ciemności w temp. 25 ± 2°C, do próbek 50 ml dodawano 6 ml 10% $NaHCO_3$, 10 ml 0,1 n $Na_2HAsO_3$ oraz 0,4 ml 20% KJ i odmiareczkowywano w obecności skrobi nadmiar $Na_2HAsO_3$ 0,1 n roztworem jodu.

## Wyniki

### 1. CZĄSTKOWA OBJĘTOŚĆ WŁAŚCIWA PRODUKTÓW HYDROLIZY DEKSTRANU

Obliczenie wyników dokonywano graficznie po odłożeniu na papierze milimetrowym W wobec V (por. wzór (I). Przykład takiego wykresu dla

http://rcin.org.pl




Rys. 1

frakcji dekstranu przedstawia rys. 1. Zestawienie wyników dla wszystkich przebadanych preparatów podano w tablicy 1 kolumnie 1.

2. LEPKOŚĆ WEWNĘTRZNA

Obliczenie lepkości wewnętrznej wykonywano z graficznego rozwiązania równania Martina (19):

$$\eta_{sp/c} = [\eta]\, e^{k[\eta]c} \quad \ldots\ldots\ldots \quad \text{(II)}$$

$$\ln(\eta_{sp/c}) = \ln[\eta] + k[\eta]c \quad \ldots\ldots\ldots \quad \text{(IIa)}$$

Wzór ten wybrano z tego względu, iż lepiej odpowiada on danym doświadczalnym, uzyskanym z pomiaru lepkości w stężeniach koloidu od 1 do 5%. Klasyczny wzór Kraemera (20) na obliczanie lepkości wewnętrznej $[\eta] = \lim_{c \to o} (\eta_{sp/c})$ daje najlepsze wyniki przy pomiarach stężeń około i poniżej 1%, co jednak w przypadku badania roztworów dekstranu wprowadzałoby znaczny błąd doświadczalny wobec stosunkowo niskiej lepkości takich roztworów. Wzór Martina spośród wszystkich opracowanych dotychczas empirycznych wzorów na ustalenie zależności pomiędzy stężeniem a lepkością i na oznaczenie wartości $[\eta]$ jest teoretyczniej najbardziej uzasadniony: rozwinięcie wyrażenia $e^{k[\eta]c}$ w szereg potęgowy nadaje prawej stronie równania charakter $[\eta] + k[\eta]^2c + \ldots$ (wyższe potęgi c i $[\eta]$), zgodnie zatem z teoretycznie wyznaczoną przez Ensteina zależnością pomiędzy lepkością a stężeniem (9).

Zagadnienie zastosowania różnych funkcji lepkości do analizy dekstranu jest przedmiotem innej pracy tychże autorów (21).

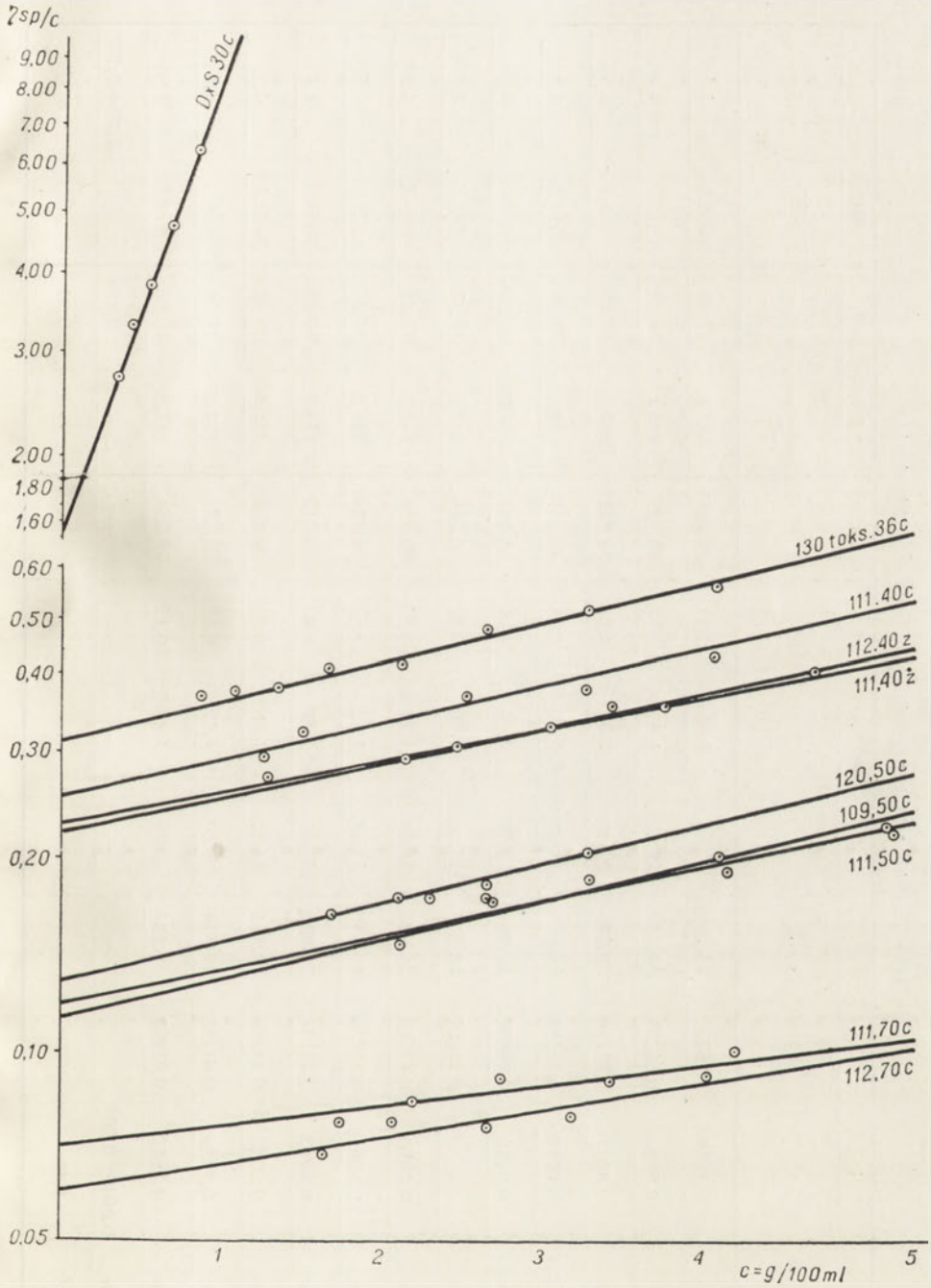
Na rys. 2 przedstawiono typową grupę wykresów $\ln(\eta_{sp}/_c)$ wobec c. Przecięcie tych prostych z osią y daje zgodnie z równaniem (IIa) wartość $\ln[\eta]$, skos zaś prostej — wartość parametru $k[\eta]$.

Proste, przedstawione na rys. 2, wykreślono za pomocą metody najmniejszych kwadratów. Zestawienie wartości $[\eta]$ dla wszystkich przebadanych frakcji dekstranu podano w tablicy 1 kolumnie 2; wartości te zostały również obliczone za pomocą metody najmniejszych kwadratów.

Z oznaczonej w powyższy sposób wartości lepkości wewnętrznej obliczano wartość lepkości wewnętrznej objętościowej $[\eta]_{\varnothing}$ za pomocą wzoru (III):

$$[\eta]_{\varnothing} = \frac{[\eta] \cdot 100}{V} \quad \ldots\ldots\ldots \quad \text{(III)}$$

http://rcin.org.pl




Rys. 2

w którym $\overline{V}$ oznacza cząstkową objętość właściwą. Wyniki zestawiono w tablicy 1 kolumnie 3.

http://rcin.org.pl

Tablica 1

Cechy fizykochemiczne produktów hydrolizy dekstranu

| Nazwa frakcji | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $\overline{V}$ | $[\eta]$ | $[\eta]\phi$ | $\frac{l}{d}$ | $\frac{f}{f_0}$ | $D^{25°}_{H_2O}$ $(\times 10^{-7})$ | M | wymiary (Å) | | $l_{max}$ Å | liczba glikoz w 1 zwoju |
| | | | | | | | | l | d | | |
| 111.40c | 0,5980 | 0,26727 | 44,206 | 21,60 | 2,06 | 4,87 | 59.725 | 375,8 | 17,40 | 1663,5 | 4,4 |
| 109.40z | 0,5983 | 0,20223 | 33,449 | 18,25 | 1,91 | 5,56 | 48.723 | 294,8 | 16,38 | 1344,2 | 4,6 |
| 111.40z | 0,6047 | 0,27746 | 45,891 | 22,10 | 2,07 | 4,84 | 57.942 | 377,9 | 17,10 | 1694,4 | 4,5 |
| 112.40z | 0,6050 | 0,22354 | 36,973 | 19,25 | 1,90 | 5,55 | 49.641 | 328,0 | 17,00 | 1359,6 | 4,1 |
| 120.40z | 0,6288 | 0,25978 | 42,967 | 21,20 | 2,04 | 4,90 | 58.052 | 366,8 | 17,30 | 1452,0 | 4,0 |
| 109.50c | — | 0,11208 | 18,538 | 13,30 | 1,66 | 7,22 | 30.344 | 217,9 | 16,38 | 875,5 | 4,0 |
| 110.50c | 0,5980 | 0,13706 | 22,669 | 14,00 | 1,71 | 6,73 | 36.652 | 235,8 | 17,40 | 1076,4 | 4,6 |
| 111.50c | 0,6062 | 0,11776 | 19,456 | 13,65 | 1,72 | 7,62 | 29.187 | 218,0 | 15,97 | 829,2 | 3,8 |
| 112.50c | 0,5995 | 0,13111 | 21,685 | 13,60 | 1,72 | 6,82 | 36.015 | 233,2 | 17,15 | 1060,9 | 4,5 |
| 120.50c | 0,6082 | 0,14590 | 24,132 | 14,55 | 1,76 | 6,56 | 37.898 | 255,8 | 17,58 | 1102,1 | 4,3 |
| 111.70c | 0,5990 | 0,07155 | 11,834 | 9,00 | 1,49 | 9,17 | 23.287 | 154,8 | 17,20 | 674,7 | 4,4 |
| 112.70c | 0,5982 | 0,05978 | 9,887 | 7,95 | 1.43 | 10,12 | 19.294 | 132,5 | 16,66 | 530,5 | 4,0 |
| Średnia | 0,6040±0,009 | — | — | — | — | — | — | — | 16,96±0,159 | | 4,27±0,272 |
| Współcz. zmien. | 1,49 | — | — | — | — | — | — | — | 0,94 | — | 6,37 |

http://rcin.org.pl

Tablica 2

Utlenianie dekstranu za pomocą $KJO_4$

| Nazwa frakcji | mg dekstranu w 50 ml analizy | ml 0,1 n jodu (minus ślepa) | liczba moli $KJO_4$ zużytego na 1 mol bezwodnika glikozy w dekstranie | | % wiązań 1:6 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | wynik | średnio |
| DxS 38c | 21,850 | 4,5059 | 1,6720 | | 83,60 | 83,60 |
| 130 toks. 36c | 21,360 | 5,0194 | 1,9053 | | 95,27 | 95,27 |
| 111.40c | 21,248 | 4,9133 | 1,7565 | | 87,83 | |
| 120.40c | 21,604 | 4,5280 | 1,5884 | | 79,42 | |
| 109.40z | 21,022 | 4,5003 | 1,7358 | 1,7370 | 86,79 | 86,85 |
| 111.40z | 21,976 | 4,9903 | 1,8412 | | 92,06 | |
| 112.40z | 21,426 | 4,8652 | 1,7244 | | 86,22 | |
| 120.40z | 22,166 | 5,1735 | 1,7754 | | 88,77 | |
| 109.50c | 20,862 | 4,6847 | 1,8207 | | 91,04 | |
| 110.50c | 20,896 | 4,7675 | 1,8499 | | 92,49 | |
| 111.50c | 21,664 | 4,7719 | 1,7876 | 1,8230 | 89,38 | 91,35 |
| 112.50c | 21,238 | 4,8495 | 1,8514 | | 92,57 | |
| 120.50c | 21,582 | 4,8592 | 1,8256 | | 91,28 | |
| 109.70c | 21,270 | 4,6943 | 1,7895 | | 89,48 | |
| 110.70c | 22,196 | 5,3586 | 1,9574 | 1,8294 | 97,87 | 91,47 |
| 111.70c | 21,388 | 4,8398 | 1,8348 | | 91,74 | |
| 112.70c | 20,976 | 4,4906 | 1,7359 | | 86,80 | |



http://rcin.org.pl

Stosunek osiowy, tj. stosunek osi długiej do krótkiej badanej cząsteczki (przy przyjęciu, zgodnie z konwencją, że cząsteczka ta ma kształt wydłużonego, sztywnego elipsoidu obrotowego) — oznaczano z wzoru Simhy (22).

$$[\eta]_{\emptyset} = \frac{(l/d)^2}{15\,(\ln 2l/d - 3/2)} + \frac{(l/d)^2}{5\,(\ln 2l/d - 1/2)} + \frac{14}{15} \quad . \quad . \quad \text{(IV)}$$

w którym l jest osią długą, d jest osią krótką. Wyniki zestawiono w tablicy 1 kolumnie 4.

Z wyznaczonego w powyższy sposób stosunku osiowego przez zastosowanie wzoru Perrina (23):

$$f/f_0 = \frac{\sqrt{1-(l/d)^2}}{(l/d)^{2/3} \ln \dfrac{1+\sqrt{1-(l/d)^2}}{l/d}} \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad \text{(V)}$$

obliczano stosunek tarciowy $f/f_0$. Obliczone dane podano w tablicy 1 kolumnie 5.

### 3. STAŁA DYFUZJI

Typowe gradienty dn/dx dla trzech zasadniczych frakcji dekstranu przedstawiono na rys. 3.

Zestawienie stałych dyfuzji w przeliczeniu na temp. 25°C i wodę jako rozpuszczalnik podano w tablicy 1 kolumnie 6.

### 4. STOSUNEK LICZBY WIĄZAŃ 1:6 DO INNYCH WIĄZAŃ

Wyniki analiz zestawiono w tablicy 2.

## Omówienie wyników

Dane doświadczalne przedstawione powyżej pozwalają na obliczanie ciężaru cząsteczkowego dla poszczególnych frakcji. Stała dyfuzji zgodnie z wzorem Einsteina-Stokesa (24) jest funkcją promienia tej cząsteczki:

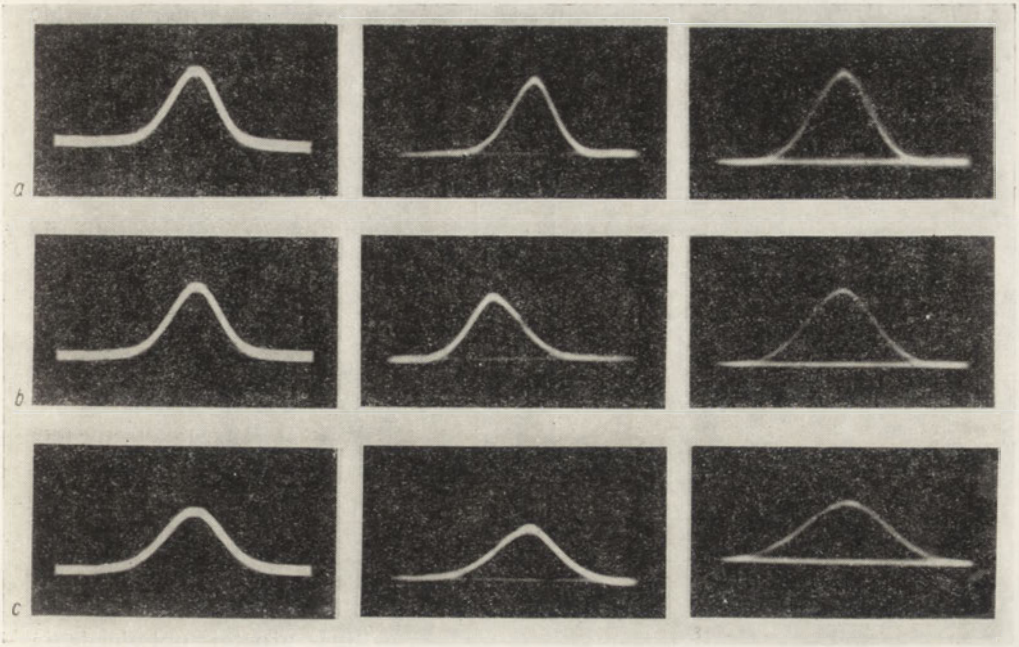
$$D = \frac{RT}{N} \cdot \frac{1}{6\pi\eta r} \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad \text{(VI)}$$

gdzie: D — oznacza stałą dyfuzji, R — stałą gazową, T — temp. absolutną, $\eta$ — lepkość rozpuszczalnika w poisach, N — liczbę Avogadro, r — promień cząsteczki.

Dla cząsteczki asymetrycznej Svedberg (25) wprowadził poprawkę $f/f_0$ (współczynnik tarciowy), w wyniku czego wzór na stałą dyfuzji (VI) przyjmuje postać:

$$D = \frac{RT}{N} \cdot \frac{1}{6\pi\eta r} \cdot \frac{f_0}{f} \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad \text{(VII)}$$

http://rcin.org.pl




Rys. 3. Na rys. 3a przedstawiono dyfuzję frakcji dekstranu 112.40 z po czasie a = 80.220 sek., b = 99.300 sek. i c = 165.240 sek.;
na rys. 3b — dyfuzję frakcji 112.70 c po czasie a = 64.260 sek., b = 93.060 sek. i c = i c = 159.480 sek.;
na rys. 3c — dyfuzję frakcji 112.70 c po czasie a = 64.260 sek., b = 93.060 sek. i c = = 148.860 sek. Wykresy d przedstawiają porównanie gradientów uzyskanych w czasie c (linia ciągła) z odpowiadającymi im idealnymi krzywymi gausowskimi (linia punktowana).

Promień hipotetycznej cząsteczki kulistej (por. wzór VI i VII) można obliczyć, znając jej objętość $V = \frac{4}{3}\pi r^3$, która z kolei jest funkcją cząstkowej objętości właściwej i ciężaru cząsteczkowego:

$$V = \frac{\overline{V} M}{N} \quad . \; . \; . \; . \; . \; . \; . \; . \; . \; . \quad \text{(VIII)}$$

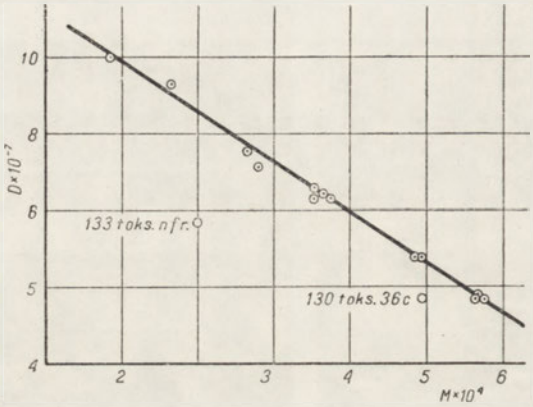
Podstawiając te wartości do wzoru (VII) otrzymujemy wyrażenie na ciężar cząsteczkowy cząsteczki elipsoidalnej:

$$M = \frac{4\pi}{3\overline{V}N^2}\left\{\frac{RT}{6\pi\eta D} \cdot \frac{f_0}{f}\right\}^3 \quad . \; . \; . \; . \; . \quad \text{(IX)}$$



http://rcin.org.pl

We wzorze (IX) wartości dla $\overline{V}$, $\eta$ i D otrzymano doświadczalnie, pozostałe zaś oprócz M (ciężar cząsteczkowy) stanowią stałe. Tak więc z powyżej przytoczonych wyników doświadczalnych można wyliczyć ciężary cząsteczkowe poszczególnych analizowanych produktów hydrolizy dekstranu.




Rys. 4

Otrzymane w ten sposób wyniki zestawiono w tablicy 1 kolumnie 7. Odkładając na wykresie logarytmicznym stałą dyfuzji wobec ciężaru cząsteczkowego otrzymujemy zależność liniową przedstawioną na rys. 4.

Wykres ten, wykonany metodą najmniejszych kwadratów, opisuje się równaniem: $D = 1{,}6 \cdot 10^3 M^{-0{,}65}$. Prawidłowy przebieg i ułożenie punktów doświadczalnych wzdłuż prostej potwierdzają przypuszczenie, że produkty hydrolizy dekstranu obecne w badanym roztworze leczniczym stanowią szereg homologicznych wielocukrów. Sprawa ta zostanie omówiona poniżej, podobnie jak zagadnienie dwóch frakcji (130 toks 36c i 133 toks nfr.) odbiegających wyraźnie od prostej, która została wykreślona bez ich uwzględnienia.

W badaniach nad związkami wielkocząsteczkowymi znaczną wagę przywiązuje się do zagadnienia zależności pomiędzy lepkością a ciężarem cząsteczkowym. Wynika to zarówno ze względów teoretycznych, jak i praktycznych. Zrozumienie tej zależności jest ważnym elementem w teorii zachowania się makrocząsteczek w roztworze; praktyczne zaś zastosowanie tej zależności polega na umożliwieniu określenia z dużą dokładnością ciężaru cząsteczkowego badanego koloidu za pomocą stosunkowo prostych, a jednocześnie dokładnych metod analitycznych. Znaczenie tego ostatniego, zwłaszcza w produkcji dekstranu, jest oczywiste. W zasadzie istnieją dwa podstawowe wyrażenia, wiążące lepkość z ciężarem cząsteczkowym. Jedno, według Staudingera (26):

$$\eta_{sp/c} = K_1 M \quad . \; . \; . \; . \; . \; . \; . \; . \; . \; . \quad (X)$$

i zmodyfikowane dla związków o większym ciężarze cząsteczkowym:

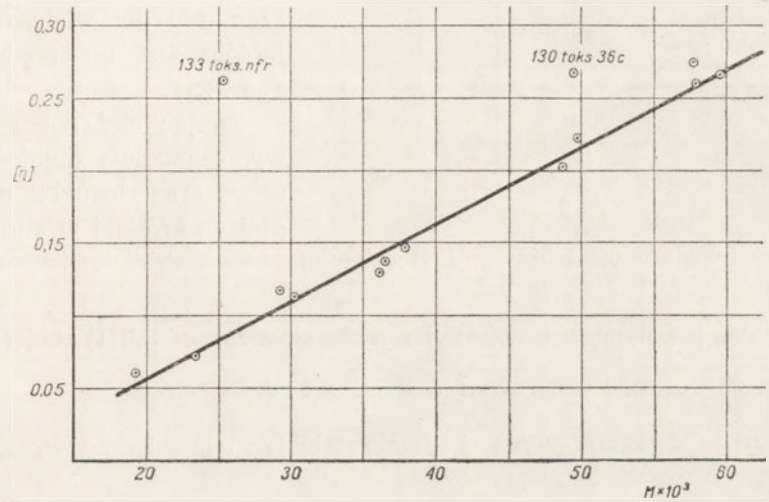
$$\eta_{sp/c} = KM + b \quad . \; . \; . \; . \; . \; . \; . \; . \; . \; . \quad (XI)$$

http://rcin.org.pl

oraz drugie wyrażenie, o bardziej uniwersalnym charakterze:

$$[\eta] = k M^a \quad \ldots\ldots\ldots\ldots \quad (XII)$$

Jest rzeczą jasną, że wzór (X) Staudingera stanowi szczególny przypadek wzoru (XII), tj. przypadek, gdy wykładnik potęgowy a jest równy jedności. Na rys. 5. przedstawiono wykres M względem [η] według wzoru (XI):




Rys. 5

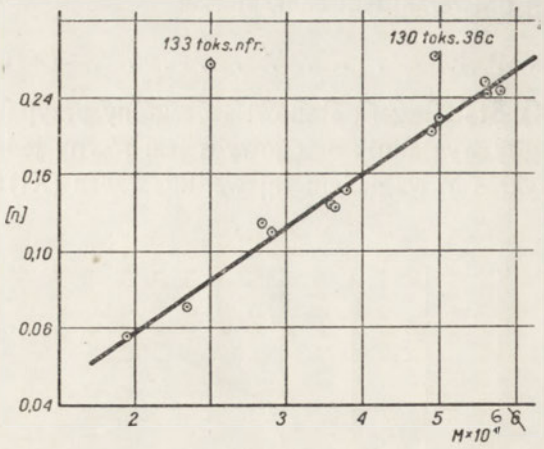
Na rys. 6 przedstawiono wykres M względem [η] według wzoru (XII) w postaci logarytmicznej.

Prosta przedstawiona na rys. 5 opisuje się wzorem $[\eta] = 5{,}4 \cdot 10^{-6} M + 0{,}053$, prosta zaś przedstawiona na rys. 6 — wzorem $[\eta] = 9{,}87 \cdot 10^{-8} M^{1{,}35}$.

Obydwa wykresy wykonano metodą najmniejszych kwadratów.

Analogiczną analizę produktów hydrolizy dekstranu przeprowadzili Ingelman i Halling (27). W zależności pierwszej (według wzoru XI) parametry dla badanego przez nich dekstranu wynosiły: $k = 8{,}2 \cdot 10^{-7}$ i $b = 0{,}18$. W zależności typu $[\eta] = kM^a$ wykładnik potęgowy $a$ równał się 0,34. Niska wartość dla parametru $a$ w pracy Ingelmana i Hallinga była niezrozumiała (por. 28); w badanym przez nas preparacie leży ona w granicach spotykanych wśród innych koloidów. Zestawiając uzyskaną wartość $a = 1{,}35$ z danymi z literatury, zwraca uwagę podobieństwo jej z danymi dla asymetrycznej amylozy ($a = 1{,}5$ w etylendwuaminie) oraz

http://rcin.org.pl




Rys. 6

z wartością dla kwasu pektynowego w 0,155 M NaCl (a = 1,34). Współczynnik K w badanym przez nas dekstranie ma bardzo niską wartość— rzędu $10^{-7}$, dla kwasu pektynowego analogiczny współczynnik jest rzędu $10^{-6}$, podczas gdy dla większości koloidów jest on rzędu $10^{-4}$ (por. 29).

Znając ciężar cząsteczkowy, cząstkową objętość właściwą oraz stosunek osi długiej do krótkiej w elipsoidzie, jaki miałaby stanowić badana cząsteczka, można wyliczyć jej bezwzględne wymiary przestrzenne.

Objętość pojedynczej cząsteczki wyraża się wzorem (VIII), objętość zaś elipsoidu obrotowego jest równa $V = \frac{4}{3} \pi l^2 d$.

Łącząc te dwa wyrażenia i przekształcając odpowiednio wzór, otrzymujemy:

$$l^2 d = \frac{3 \overline{V} M}{4 \pi N} \quad \ldots\ldots\ldots\ldots \quad \text{(XIII)}$$

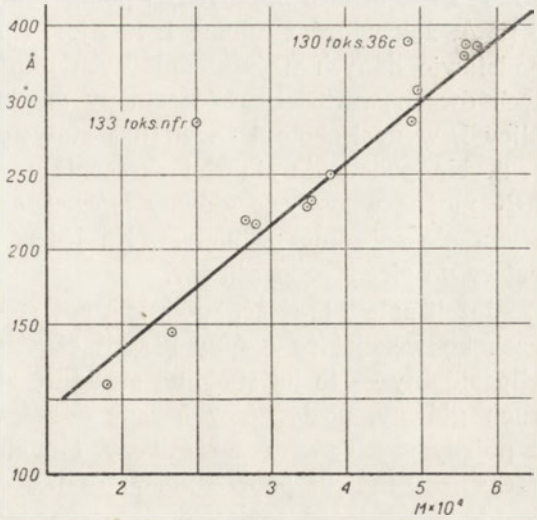
W równaniu tym są dwie niewiadome: l i d. Związek pomiędzy nimi jest znany z pomiaru lepkości (por. kolumna 4 tablicy 1). Otrzymane z takiego obliczenia wyniki zestawiono w tablicy 1 kolumny 8 i 9. Zwraca tutaj uwagę fakt, że wymiar osi krótkiej dla poszczególnych ciężarów cząsteczkowych nie ulega istotnym zmianom: wydaje się, że oś krótka jest zawsze taka sama, zarówno dla cząsteczek o ciężarze rzędu 20 000, jak i dla cząsteczek o ciężarze rzędu 60 000. Fakt ten potwierdza również analiza statystyczna, podana w tablicy I w odpowiedniej kolumnie. Wyraźnie natomiast zmienia się długość cząsteczki l wraz z ciężarem cząsteczkowym. Fakt ten zilustrowano na wykresie (w skali logarytmicznej) przedstawionym na rys. 7, sporządzonym metodą najmniejszych kwadratów.

Uwidoczniona prosta może być opisana równaniem $l = 0{,}02\, M^{0{,}9}$, a więc równaniem, które z dosyć dużą dokładnością określa zależność pomiędzy długością cząsteczki a jej ciężarem jako zależność wprost proporcjonalną. Mamy zatem niewątpliwie do czynienia z szeregiem homologicznym: zmiana ciężaru cząsteczkowego jest wynikiem odszczepienia od łań-

http://rcin.org.pl

cucha głównego mniejszej lub większej liczby jednakowych podstawowych jednostek jego budowy.

Dalsze ciekawe światło na budowę wewnętrzną cząsteczek dekstranu w leczniczym preparacie rzucają wyniki analizy liczby wiązań 1 : 6 i innych, dokonane za pomocą utleniania nadjodanem. Z tablicy 2 wynika, że w surowym dekstranie liczba wiązań innych niż 1 : 6, a więc wiązań utrzymujących łańcuchy boczne, jest większa niż w którymkolwiek produkcie jego hydrolizy. Liczba łańcuchów bocznych maleje w miarę zmniejszania się ciężaru cząsteczkowego, przy ciężarze rzędu 50—60 tysięcy wiązania inne niż 1:6 stanowią 13%, przy ciężarze rzędu 20—35 tysięcy — 9% ogólnej liczby wiązań. Dowodzi to, że w czasie hydrolizy szczególnie podatnymi na działanie kwasów są wiązania, utrzymujące łańcuchy boczne.



Rys. 7

Stosunek osiowy, jak wyliczono powyżej, jest dla większości frakcji w granicach 1:13 do 1:20. Tak więc na około 15 cząsteczek glikozy w łańcuchu głównym powinna by przypadać zaledwie jedna glikoza w łańcuchu bocznym. Liczby te są tego samego rzędu, jak wyliczone z utleniania nadjodanem liczby wiązań 1:4 w stosunku do liczby wiązań 1:6 łańcucha głównego. Wydaje się zatem uzasadnione przypuszczenie, że łańcuchy boczne stanowią w większości przypadków pojedyncze cząsteczki glikozy.

Krótka oś cząsteczki, jak przedstawiono powyżej, wynosi około 17 Å, który to wymiar jest nieco większy, niż stanowiłaby długość połączonych z sobą trzech cząsteczek glikozy. W przybliżeniu odpowiadałoby to szerokości cząsteczki zbudowanej z prostego łańcucha głównego oraz z łańcuchów bocznych, złożonych z jednej lub dwóch glikoz (w zależności od typu ich rozmieszczenia symetrycznego lub niesymetrycznego w stosunku do osi długiej cząsteczki).

Gdyby jednak łańcuch główny był prosty, to jego długość powinna by być taka, jak podano w tablicy I kolumnie 10 jako $l_{max}$. Wartość $l_{max}$ otrzymano przez obliczenie liczby glikoz w łańcuchu głównym (jako różnicy pomiędzy całkowitą liczbą glikoz w cząsteczce a liczbą glikoz w jednogliko-

http://rcin.org.pl

zowych łańcuchach bocznych) i pomnożeniu jej przez długość 1 glikozy, tj. 5,15 Å. Jak widać z tablicy I, $l_{max}$ jest znacznie większe, niż obliczona na podstawie danych fizykochemicznych długa oś danej cząsteczki. Stosunek tych dwóch wartości, uwidoczniony dla każdej frakcji w kolumnie 11 tablicy I, wynosi około 4 — analiza statystyczna wskazuje na niewielki rozrzut. Na podstawie stałości skrócenia maksymalnej długości (hipotetycznej) można wnosić, że główny łańcuch cząsteczki nie jest łańcuchem prostym, ale spiralnie zwiniętym. Na jeden zwój takiej spirali przypadałoby cztery do pięciu reszt glikozy.

Jeżeli zatem przyjąć, zgodnie z powszechnie stosowaną do makrocząsteczek konwencją, że ogólny kształt cząsteczki dekstranu w roztworze jest elipsoidalny — to jej subtelną strukturę stanowiłby spiralnie zwinięty łańcuch główny, posiadający boczne odgałęzienia przeciętnie złożone tylko z pojedynczych cząsteczek glikozy. Model cząsteczki cukrowca o charakterze spirali był już poprzednio przedstawiony np. odnośnie do skrobi (30), w której na jeden zwój spirali przypadało — podobnie jak w opisanym w niniejszej pracy dekstranie — około 5 reszt glikozy.

Pozostaje do omówienia sprawa frakcji, oznaczonych na wykresach jako 130 toks. 36c i 133 toks. nfr. Frakcje te odbiegają w swojej charakterystyce od składników szeregu homologicznego, jak to wykazują wszystkie powyższe wykresy. Liczba wiązań innych niż 1:6 jest znikomo mała — rzędu 5%. W tych warunkach nie można prawdopodobnie stosować do cząsteczki modelu elipsoidu obrotowego, zachowywać się ona będzie w roztworze jak swobodnie zwijający się łańcuch.

Tablica 3

0,6 ml świeżych krwinek czerwonych, przemytych trzykrotnie solą fizjologiczną, zawieszano w 0,9 ml 5% roztworu frakcji dekstranu w 0,9% NaCl i napełniano zawiesiną rurki Westergrena. W tablicy podano wartości opadu w mm po upływie 120 min.

| Nazwa frakcji | Ciężar cząsteczkowy | Opad w mm po 120 min. | Uwagi |
|---|---|---|---|
| 112.50.c | 36 000 | 1 | |
| 110.40.z | 58 000 | 2 | |
| 133 toks.nfr. | 25 000 | 80 | makroskopowo i mikroskopowo widoczna agregacja krwinek |
| 130 toks.36c | 50 000 | 85 | |
| NaCl 0,9% | | 1 | |

Należy tutaj zaznaczyć, że cząsteczki typu dwóch frakcji są nieobecne w preparacie leczniczym dekstranu (Poliglukanie I. H.). Są one natomiast

http://rcin.org.pl

Tablica 4

| Nazwa frakcji | $\frac{l}{d}$ | | | $\frac{f}{f_0}$ | | | d Å | | | l Å | | | Ciężar cząsteczkowy | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | W=0.1 | W=0.3 | W=0.5 | W=0.1 | W=0.3 | W=0.5 | W=0.1 | W=0.3 | W=0.5 | W=0.1 | W=0.3 | W=0.5 | W = 0,1 | W = 0,3 | W = 0,5 |
| 111.40c | 20,8 | 19,8 | 19,1 | 2,03 | 1,99 | 1,95 | 17,7 | 18,4 | 19,2 | 368,2 | 363,4 | 364,8 | 57.450 | 56.160 | 56.300 |
| 109.40z | 17,4 | 16,5 | 15,9 | 1,89 | 1,85 | 1,83 | 17,6 | 18,5 | 18,9 | 305,4 | 303,5 | 299,6 | 48.140 | 47.120 | 46.020 |
| 111.40z | 21,3 | 20,3 | 19,5 | 2,05 | 2,02 | 1,98 | 17,5 | 18,1 | 18,7 | 372,8 | 378,7 | 364,7 | 56.730 | 54.490 | 54.660 |
| 112.40z | 18,5 | 17,5 | 16,9 | 1,93 | 1,89 | 1,87 | 17,00 | 17,6 | 18,1 | 313,9 | 308,0 | 305,9 | 44.780 | 43.900 | 43.150 |
| 120.40z | 20,5 | 19,4 | 18,7 | 2,02 | 1,97 | 1,93 | 17,8 | 18,4 | 19,2 | 364,9 | 356,0 | 357,3 | 57.030 | 56.390 | 56.490 |
| 109.50c | 11,9 | 11,3 | 10,9 | 1,64 | 1,61 | 1,59 | 17,1 | 17,7 | 18,2 | 203,5 | 200,0 | 198,4 | 29.740 | 28.890 | 28.360 |
| 110.50c | 13,5 | 12,8 | 12,3 | 1,72 | 1,69 | 1,66 | 17,4 | 18,4 | 18,6 | 234,0 | 235,5 | 228,8 | 35.210 | 34.640 | 34.240 |
| 111.50c | 12,2 | 11,6 | 11,3 | 1,66 | 1,63 | 1,61 | 17,3 | 17,9 | 18,2 | 211,1 | 207,1 | 204,8 | 30.960 | 30.080 | 29.260 |
| 112.50c | 13,1 | 12,4 | 12,0 | 1,70 | 1,66 | 1,65 | 17,6 | 18,3 | 18,7 | 230,6 | 226,9 | 224,4 | 35.600 | 34.810 | 33.890 |
| 120.50c | 14,0 | 13,3 | 12,9 | 1,74 | 1,71 | 1,69 | 17,5 | 18,1 | 18,5 | 245,0 | 240,7 | 238,7 | 37.270 | 35.940 | 35.370 |
| 111.70c | 8,7 | 8,1 | 7,8 | 1,47 | 1,45 | 1,42 | 17,4 | 18,1 | 18,6 | 150,3 | 146,4 | 144,2 | 22.470 | 21.790 | 21.680 |
| 112.70c | 7,5 | 7,1 | 6,2 | 1,41 | 1,38 | 1,33 | 17,3 | 18,1 | 20,0 | 129,8 | 127,3 | 123,4 | 19.240 | 18.900 | 19.960 |
| Wartość średnia | — | — | — | — | — | — | 17,4 | 18,1 | 18,7 | — | — | — | — | — | — |

W = woda hydratacyjna z założenia, w g na 1 g dekstranu.

http://rcin.org.pl

obecne w hydrolizacie surowego dekstranu i w toku dalszego frakcjonowania dokonywanego celem usunięcia frakcji szkodliwych farmakologicznie i klinicznie (por. 7) są usuwane. Charakterystyczną cechą tych frakcji jest ich wybitny wpływ na opadanie krwinek czerwonych ludzkich.

W doświadczeniach przedstawionych w tablicy 3 zawieszano krwinki w roztworach o jednakowych stężeniach frakcji zhydrolizowanego dekstranu, zarówno z opisywanego szeregu homologicznego, jak i typu „toks", przy czym dobrano preparaty o zbliżonych ciężarach cząsteczkowych. Z tablicy 3 widoczna jest wyraźnie różnica w działaniu na opad krwinek tych dwóch typów cząsteczek zhydrolizowanego dekstranu.

Powyższa analiza strukturalna została przeprowadzona bez uwzględnienia hydratacji cząsteczki w roztworze. Aczkolwiek zarówno pomiar lepkości, jak i stałej dyfuzji odnosi się do uwodnionej cząsteczki jako jednostki kinetycznej, to jednak ostateczne przeliczenie jest wykonane przy zastosowaniu właściwej objętości cząstkowej, a więc objętości ciała bezwodnego. Wielkość zmiany cząstkowej objętości właściwej w wyniku uwodnienia została wyliczona przez Lansinga i Kraemera (31):

$$V_H = \frac{V_1 + sV_2}{1 + s}.$$

Wzór ten podaje objętość właściwą ciała uwodnionego ($V_H$) w przypadku, gdy 1 g ciała rozpuszczonego o cząstkowej objętości właściwej $V_1$ łączy się z s g rozpuszczalnika o objętości właściwej $V_2$. Zakładając, że uwodnienie badanych cząsteczek dekstranu wynosi 0,1 — 0,3 — 0,5 g rozpuszczalnika (0,155 M wodnego NaCl) na 1 g dekstranu bezwodnego, można do podanych poniżej wyników wprowadzić odpowiednie poprawki. Poprawki te zmieniając wartość $[\eta]_{\emptyset}$ i wynikające z niej dane ($f/f_0$, d/l oraz d i l) oraz wpływają bezpośrednio na obliczenie ciężaru cząsteczkowego, gdyż we wzorze (IX) występuje cząstkowa objętość właściwa. Odpowiednie poprawione wyniki przedstawiono w tablicy 4. Widoczne jest, że wpływ błędu wynikającego z nieznanego stopnia uwodnienia nie przekracza ± 10% dla ciężaru cząsteczkowego.

Autorzy pragną wyrazić podziękowanie ob. mgr Koźniewskiej z Instytutu Matematycznego za jej życzliwą współpracę.

## LITERATURA

1. W. Z. Hassid, H. A. Barker, *J. Biol. Chem.*, **134**, 163 (1940).
2. S. Peat, E. Schlüchterer, M. Stacey, *J. Chem. Soc.*, **1**, 581 (1939).
3. B. Ingelman, Uppsala Läkareförenings Förhandlingar, **54**, 107 (1949).
4. K. Murawski, J. Krysiak, *Pol. Tyg. Lek.*, **8** 1188, 1211 (1953).
5. G. Thorsén, H. Hint, *Acta chir. Scand.*, *Suppl.* 154 (1950).

http://rcin.org.pl

6. C. R. Ricketts, L. Lorenz, W. d'A. Maycock, *Nature,* **165**, 770 (1950).
7. Z. Czechowska i in.*Pol. Arch. Med. Wewn.,* **24**, 1 (1954).
8. A. E. Alexander, P. Jonhson, *Colloid Science,* Oxford, 1950.
9. G. B. Bull, *Fiziczeskaja biochimija,* Moskwa 1949.
10. Ch. D. Hodgman, Handbook of Chemistry and Physics, Cleveland 1951.
11. W. Utermark, Schmelzpunkt-Tabellen organischer Verbindungen, Berlin 1951.
12. H. Svensson, Kolloid Z., **90**, 141 (1940).
13. L. G. Longsworth, *J. Am. Chem. Soc.,* **61**, 524 (1934).
14. H. Neurath, *Chem. Rev.,* **30**, 357 (1942).
15. A. L. Geddes, w A., Weissberger, Physical Methods of Organic Chemistry t. I, cz. 1, New York 1949.
16. R. F. Jackson, Organic Reactions t. II, s. 361, New York 1944.
17. A. Jeanes, C. A. Wilham, *J. Am. Chem. Soc.,* **72**, 2655 (1950).
18. E. J. Hehre, *J. Biol. Chem.,* **129**, 161 (1951).
19. A. F. Martin, M. L. Huggins, *J. Am. Chem. Soc.,* **64**, 2716 (1942).
20. E. O. Kraemer, *Ind. Eng. Chem.,* **30**, 1200 (1938).
21. K. Zakrzewski i in. Przem. Chem., w druku.
22. R. R. Simha, *Ž. Prikl. Chimji,* **13**, 147 (1942).
23. F. Perrin, *J. de Phys. et de Radium,* **7**, 1 (1936).
24. A. Einstein, *Ann. Phys.,* **17**, 549 (1905).
25. T. Svedberg, *Proc. roy. Soc.,* B **127**, 1 (1936).
26. H. Staudinger, Hochmolekulare Substanzen, Berlin 1930.
27. B. Ingelman, M. S. Halling, *Arkiv Kemi,* **1**, 61 (1949).
28. C. T. Greenwood, *Adv. Carb. Chem.,* **7**. 289 (1952).
29. T. E. McGowry, W. Marle, w A. Weissberger, Physical Methods of Organic Chemistry t. I, cz. 1, New York 1949.
30. E. Mikulaszek, Podstawy Immunochemii, Warszawa 1948.
31. W. D. Lansing, E. O. Kraemer, *J. Am. Chem. Soc.,* **58**, 1471 (1936).

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ СТРУКТУРА ПРОДУКТОВ ГИДРОЛИЗА ДЕКСТРАНА

### Резюме

Лечебное действие продуктов гидролиза декстрана тесно зависит от молекулярной характеристики этого полидисперсоида. Авторы подвергли анализу Полиглюкан (лечебный продукт гидролиза декстрана полученный Институтом Гематологии), путем определения вязкости, коэффициента диффузии, партиального удельного объема и путем окисления полисахарида периодатом. Вязкость была определена с помощью вискозиметра Геплера, коэффициент диффузии в кюветах типа Тиселиуса в монохрома-

http://rcin.org.pl

тическом свете в оптической системе Филипот-Свенсона. На основании так полученных данных были определены молекулярные константы для 12 изолированных фракций декстрана с молекулярным весом от 20 — 60 тысяч. Результаты собраны в Таблице I.

Зависимость между молекулярным весом и коэфф. диффузии (Рис. 1) дается уравнением $D = 1{,}6 \cdot 10^3 M^{-0{,}65}$. Зависимость между молекулярным весом и вязкостью дает уравнение $[\eta] = 5{,}4 \cdot 10^{-6} M + 0{,}053$ или $[\eta] = 9{,}89 \cdot 10^{-8} M^{1{,}35}$

Показатель степени а того же ряда что для пектиновой кислоты и значительно различается от соответственного показателя описанного для шведского декстрана.

Найденные по этим данным абсолютные размеры молекул показывают, что короткая их ось не меняется с изменением молекулярного веса, длинная же ось уменьшается почти пропорционально с уменьшением молекулярного веса.

По мере гидролиза уменьшается число глюкозных связей других, чем 1 : 6, что указывает на особую восприимчивость к гидролистическому действию минеральных кислот связей 1 : 4. Количество связей других чем 1 : 4 в сопоставлении с короткой осью поодиночных молекул дает основание допускать, что боковые цепи в продуктах гидролиза декстрана состоят из отдельных молекул глюкозы.

Из сравнения общей длины всех молекул глюкозы в главной цепи с перед этим вычисленной длиной оси следует, что главная цепь всех исследованных фракций декстрана имеет форму спирали, в которой один виток состоит из 4 ÷ 5 глюкоз.

В неочищенном продукте гидролиза естественного декстрана кроме выше описанных полисахаридов гомологического ряда найдены фракции с относительно большой вязкостью и низким молекулярным весом вычисления методами как выше. У этих фракций очень небольшое количество связей других чем 1 : 6. Как показано на графиках эти фракции не принадлежат к тому гомологическому ряду, к которому принадлежат фракции лечебного препарата. Найдено, что эти фракции сильно влияют на ускорение оседания еритроцитов человеческой крови (Таблица III).

Как влияет гидратация на молекулярный вес продуктов гидролиза декстрана показано на типовом примере.

http://rcin.org.pl

## MOLECULAR STRUCTURE OF DEXTRAN HYDROLYSIS PRODUCTS


### Summary

The therapeutic effect of hydrolysed dextran is closely related to the molecular structure of this polydyspersoid. The paper gives molecular constants (Table I) of partially hydrolysed and purified dextran fractions (derived from „Poliglukan" prepared in this laboratory). The constants have been obtained from viscosity (falling ball viscosimeter), diffusion (free boundary cuvette, Philpot-Svensson optical system) and partial specific volume data. In all, there were analysed 12 fractions obtained by repeated precipitation with various concentrations of ethanol at various temperatures. The fractions covered the molecular range from 20 000 to 60 000.

The molecular weight-diffusion constant relationship is $D = 1{,}6 \cdot 10^3 M^{-0{,}65}$. The molecular weight-intrinsic viscosity relationship may be exprened a) in linear form $[\eta] = 5{,}4 \cdot 10^{-6} M + 0{,}053$ and b) in exponential form $[\eta] = 9{,}87 \cdot 10^{-8} M^{1{,}35}$; in the latter the exponent $a$ is similar to that obtained by other authors for pectinic acids and widely different from unexplicably low constant published for swedish dextran.

Calculation of molecular dimensions from the data given shows that the length of short axis of molecules is constant throughout the molecular range investigated. The length of long axis is almost lineary proportional to molecular weight.

The number of glycosidic bonds other than 1:6 diminishes with increased degradation of dextran. The data on the number of bonds other than 1:6 together with calculated length of short axis of a molecule show that branchings are on the average no longer than single glucose unit. The main chain of each molecule investigated appears to be in the form of a helix, 4 to 5 glucose units per turn, as may be judged from the calculated length of long axis and that of a maximally extended main chain.

In the unfractionated hydrolysis product of native dextran there were found fractions of comparatively high intrinsic viscosity and low molecular weight (as calculated by the above methods). The number of branchings is very low. These fractions do not belong to homologous series of polysaccharides present in therapeutical preparation as evident from the graphs. They probably form randomly coiled chains in solution. These fractions possess the rather marked property of increasing the erytrocyte sedimentation rate (Table 3).

The influence of hydratation on molecular weight calculation of hydrolysed dextran fractions is briefly discussed.


*Department of Biochemistry, Institute of Hematology, Warsaw*

http://rcin.org.pl

http://rcin.org.pl

ACTA BIOCHIMICA POLONICA
VOL. I 1954 NO 1

ANDRZEJ MORAWIECKI

# WPŁYW ADENOZYNOTRÓJFOSFORANU NA DENATURACJĘ CIEPLNĄ BIAŁEK

*Zakład Chemii Fizjologicznej Akademii Med. we Wrocławiu*
*Kierownik Zakładu: prof. dr T. Baranowski*

Od dawna znany był fakt, że białka po dodaniu pewnych substancji, jak formaldehyd (1) lub po acetylacji (2), nie koagulują podczas ogrzewania. Zjawisko to tłumaczono blokowaniem grup aminowych i podwyższaniem ujemnego ładunku elektrycznego drobiny. W r. 1949 Huggins i Jensen (3) opisali podobne działanie jodooctanu. Poprzednio jeszcze w r. 1944 Ballou, Boyer, Luck i Lum (4) stwierdzili, że szereg anionów organicznych, przede wszystkim kwasów tłuszczowych, wywiera na albuminę surowicy działanie chroniące przed denaturacją termiczną. Działanie to objawia się zmniejszeniem szybkości denaturacji i podwyższeniem temperatury, w której denaturacja przebiega z określoną prędkością. Najsilniejszy wpływ wywiera kaprylan sodowy, którego działanie można zauważyć już w obecności 1 drobiny kaprylanu na drobinę białka. Później zaobserwowano działanie chroniące kaprylanu przy denaturacji albuminy surowicy mocznikiem, chlorowodorkiem gwanidyny (5) oraz promieniowaniem ultrafioletowym (6). Stwierdzono, że mamy tu do czynienia istotnie z ochroną przed denaturacją, a nie tylko przed koagulacją zdenaturowanego białka (5, 7).

W r. 1951 zwrócił moją uwagę fakt, że adenozynotrójfosforan (ATP) chroni białka przed koagulacją w czasie ogrzewania (8). Fakt ten jest interesujący ze względu na występowanie ATP w każdej komórce ustrojów żywych i na jego rolę w przemianach ustrojowych.

Badanie chroniącego działania ATP w procesie termicznej denaturacji białek jest tematem niniejszej pracy.

Przede wszystkim obrano i opracowano odpowiednią metodę pozwalającą na ilościowe porównywanie działania chroniącego. Zdecydowano się



http://rcin.org.pl

mierzyć stopień zmętnienia rozcieńczonych roztworów białka ogrzewanych w odpowiednio ustalonych warunkach.

Pomiary zmętnienia były już niejednokrotnie stosowane przez różnych autorów do oznaczania stopnia denaturacji. M. in. stosowali je Tongur i Kasatoszkin w swoich pracach nad odwracalnością denaturacji (9) oraz Boyer i współpracownicy podczas badania chroniącego działania kaprylanu (10).

Opracowana przeze mnie metoda różni się od poprzednich m. in. tym, że zmętnienie oznacza się na podstawie pomiarów natężenia światła przechodzącego (turbidymetrycznie). Metoda ta jest stosunkowo prosta, pozwala na wykonywanie pomiarów seryjnych i wymaga niewielkich ilości materiału.

Posługując się tą metodą zbadano działanie ATP w różnych stężeniach jonów wodorowych i elektrolitów. Działanie to badano na albuminie jaja bezpostaciowej i krystalicznej, krystalicznej albuminie surowicy końskiej oraz na globulinach surowicy końskiej.

## Część doświadczalna

### A. ODCZYNNIKI I METODYKA

1. Krystaliczną albuminę jaja i krystaliczną albuminę surowicy końskiej otrzymano metodą Baranowskiego [1]) przez ostrożne wysolenie uprzednio oczyszczonego białka w okolicy punktu izoelektrycznego. Używano preparaty krystalizowane 4-krotnie.

2. Bezpostaciowa albumina jaja. Używano handlowy preparat albuminy jaja kurzego.

Preparaty albumin rozpuszczano przed użyciem w 15—20 ml wody destylowanej i dializowano wobec 2 l wody destylowanej w ciągu 36 godzin, zmieniając wodę w dializatorze 3-krotnie. Następnie roztwory wirowano celem usunięcia drobnych ilości zdenaturowanego białka, po czym oznaczano stężenie białka (patrz p. 5), a całość rozcieńczano odpowiednio wodą destylowaną.

3. Globuliny surowicy końskiej otrzymywano ze świeżej surowicy przez wysolenie siarczanem amonowym do nasycenia 0,4 [2]). Surowy preparat rozpuszczano w niewielkiej ilości 0,85% NaCl i wytrącano przez dodanie 20-krotnej objętości wody. Tak otrzymany preparat rozpuszczano przed użyciem w 0,1 M NaCl i oznaczano stężenie białka kolorymetrycznie (p. 5).

---

[1]) Prywatne doniesienie.

[2]) Nasycenie 1,0 osiąga się dodając 0,72 g stałego siarczanu amonowego do 1 ml cieczy.

http://rcin.org.pl

4. Adenozynotrójfosforan (ATP) otrzymano z mięśni królika w postaci soli wapiennej metodą Szent-Györgyiego (11). Analiza preparatu dała następujące wyniki (por. p. 6):

| | oznaczony | wyliczony dla $C_{10}H_{14}O_{13}N_5P_3Ca$ |
|---|---|---|
| $P_0$ | 0,41% | 0,00% |
| $P_7$ | 10,8% | 11,4% |
| $P_t$ | 17,7% | 17,1% |

W przeliczeniu na zawartość łatwo hydrolizującego fosforu czystość preparatu wynosiła 94,5%.

Bezpośrednio przed użyciem odważone próbki ATP rozpuszczano w wodzie i przeprowadzano w sól sodową przez zadanie odpowiednią ilością szczawianu sodowego, po czym doprowadzano do żądanej wartości pH rozcieńczonym wodorotlenkiem sodowym. W tak przygotowanych roztworach oznaczano ATP kolorymetrycznie (p. 6).

5. Ilościowe oznaczenie białka wykonywano metodą kolorymetryczną Weichselbauma opartą na reakcji biuretowej (12). Pomiary wykonywano za pomocą absorpcjometru Hilgera stosując filtr ROGI (540—580 mμ).

6. Oznaczenia fosforu i związków fosforowych wykonywano kolorymetrycznie metodą Fiskego-Subarrowa (13) w modyfikacji Kinga (14). Do pomiarów używano absorpcjometr Hilgera z filtrem ROR2 (615—635 mμ).

ATP oznaczano przez przyrost nieorganicznego fosforanu po 7-minutowej hydrolizie w 1 n HCl w temp. 100° ($P_7$). W tych warunkach z jednej cząsteczki ATP odszczepiają się dwie reszty kwasu fosforowego.

Fosfor całkowity ($P_t$) oznaczano po spaleniu substancji z kwasem nadchlorowym.

7. Pomiary pH wykonywano potencjometrycznie stosując elektrodę szklaną.

### B. POMIARY ZMĘTNIENIA

Ponieważ działanie ATP objawia się tym, że w jego obecności rozcieńczone roztwory białka podczas ogrzewania nie mętnieją, nasunął się wniosek, że na tej podstawie można opracować metodę pozwalającą na porównywanie tego efektu w różnych warunkach. Zmętnienie można mierzyć turbidymetrycznie wówczas, gdy po denaturacji białka nie wytrąca się osad, a tylko wzrasta opalescencja roztworu. Zależy to od szeregu czynników takich jak: temperatura, czas ogrzewania, stężenie elektrolitów, wartość pH, rodzaj białka, stężenie białka.



http://rcin.org.pl

Ustalono następujące warunki doświadczeń:

Temperatura. Jako temperaturę denaturacji obrano 75°. Denaturacja zachodzi wówczas dostatecznie szybko. W temperaturach wyższych zbyt łatwo tworzą się kłaczkowate osady. Warunkiem odtwarzalności wyników jest stałość temperatury; wahania nie powinny przekraczać ± 0,2°.

Czas ogrzewania. Zmętnienie roztworów białkowych zależy od czasu ogrzewania. Początkowo wzrasta ono dość szybko i po 15 min. osiąga stałą wartość.

We wszystkich dalszych doświadczeniach ogrzewano roztwory w ciągu 20 min.

Stężenie elektrolitów. Zbyt duże stężenia elektrolitów ułatwiają tworzenie się osadów. W stosowanych granicach stężeń białka, stężenie NaCl w granicach 0,02 — 0,002 M. Dodawanie pewnych ilości elektrolitów uznano za wskazane, ponieważ badano wpływ ATP, który również jest elektrolitem. Chodzi o to, by dodatek ATP tylko nieznacznie zmieniał względną siłę jonową roztworu.

Stężenie jonów wodorowych. Pomiary zmętnienia wykonywano przy różnych wartościach pH, zarówno powyżej, jak i poniżej punktu izoelektrycznego badanych białek.

Zmętnienie roztworu zdenaturowanego białka zależy w dużym stopniu od wartości pH. Zmiany pH o 0,05 powodują już dostrzegalne różnice ekstynkcji.

Pomiary pH wykonywano z dokładnością 0,03.

Stężenie białka. Zależnie od rodzaju białka, stężenia elektrolitów i od wartości pH, dobierano takie stężenia białka, aby ekstynkcja roztworu po zdenaturowaniu (bez dodatku czynnika chroniącego) leżała w granicach 0,6 — 1,5.

Na ogół stężenia białek były w granicach 0,02% — 0,4%.

## Technika pomiarów

Odpowiednie roztwory (białko, NaCl, ATP) odmierzano do probówek (średnica wewn. 14 mm, grubość ścianek 0,5 mm), po czym dodawano wody destylowanej do objętości 5 ml. Kolejność dodawania odczynników oraz czas między zmieszaniem roztworów a denaturacją nie wpływają w sposób widoczny na wyniki.

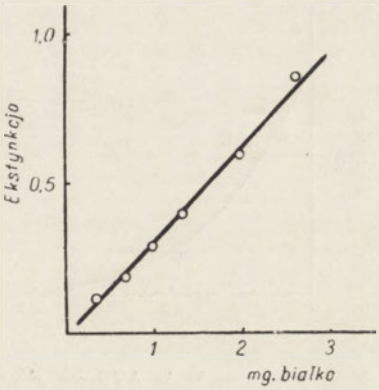
Po zmieszaniu zawartości, probówki umieszczano w łaźni wodnej o temperaturze 75°, utrzymywanej z dokładnością ± 0,2°. Po 20 minutach od chwili wstawienia do łaźni probówki wyjmowano i oziębiano zanurzając w wodzie o temperaturze nieco niższej od pokojowej. Po kilkunastu minutach

http://rcin.org.pl

mierzono ekstynkcję roztworu za pomocą absorpcjometru Hilgera w kiuwetach cylindrycznych o średnicy 15 mm, stosując filtr o przepuszczalności poniżej 510 mμ.

W tych warunkach, gdy nie tworzyła się widoczna zawiesina, ekstynkcja roztworu była proporcjonalna do stężenia zdenaturowanego białka (rys. 1).

Precyzja tej metody nie jest duża. Pomiędzy różnymi seriami pomiarów odchylenia mogą wynosić od kilku do kilkunastu procent. Możliwe, że jedną z przyczyn błędów są nieznaczne różnice w stężeniu jonów wodorowych trudne do wyeliminowania. Mimo to jednak metoda ta okazała się przydatna do opracowania podjętego tematu.




Rys. 1 — Albumina jaja ogrzewana w ciągu 20 min. w temp. 75°. pH = 6,80, stęż. NaCl: 0,02 M.

## Wyniki pomiarów

Jeżeli roztwór białka ogrzewać w obecności ATP, to zmętnienie jego po zdenaturowaniu jest mniejsze niż w nieobecności ATP. Zmętnienie zmniejsza się ze wzrostem stężenia ATP w sposób regularny i może spaść do zera.

Efekt ten badano na albuminie jaja kurzego (krystalicznej i bezpostaciowej), krystalicznej albuminie surowicy końskiej i na globulinach surowicy końskiej. Na wszystkie badane białka ATP działa w sposób podobny. Widać to z wykresów na rys. 2, 3 i 4. Stosunek molarny ATP do białka obliczono przyjmując ciężary drobinowe białek:

| | |
|---|---|
| albumina jaja kurzego | 44 000 |
| albumina surowicy konia | 70 000 |
| globuliny surowicy konia (średnio) | 160 000 |

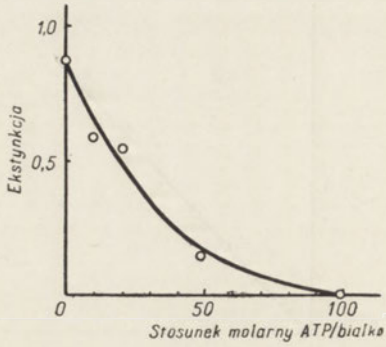
Jeżeli ekstynkcja roztworu białka ogrzewanego z ATP wynosi zero, wówczas mówimy o całkowitym chronieniu białka przez ATP. W przeciwnym przypadku mówimy o częściowym chronieniu białka. W pewnych przypadkach ekstynkcja utrzymuje się powyżej zera, jednak nie zmniejsza się w obecności większych ilości ATP (lub zmniejsza się nieznacznie); stan taki nazwano stanem nasycenia. Przykład podano na rys. 5.

Ilość ATP potrzebna do uzyskania całkowitego chronienia lub stanu nasycenia zależy w wielkim stopniu od wartości pH. Widać to z porównania

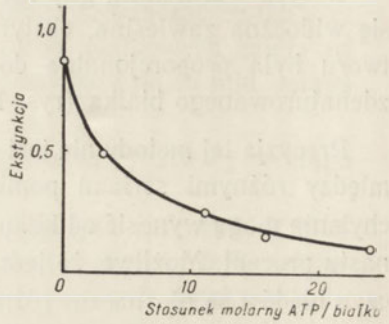


http://rcin.org.pl

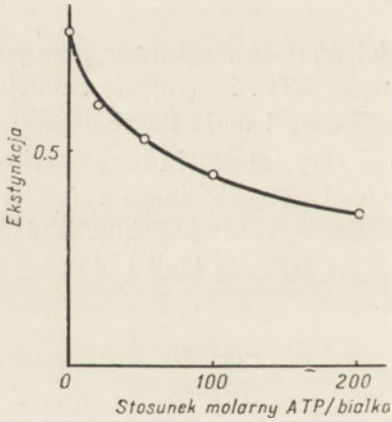
wykresów 2 i 5. Dla albuminy surowicy potrzebna ilość ATP wynosi przy wartości pH = 7,10 ok. 7 drobin ATP na jedną drobinę białka; przy pH = 6,55 ilość ta wzrasta do około 100 drobin.



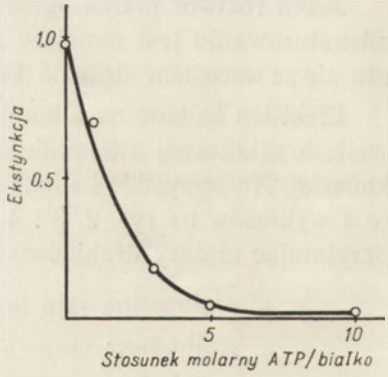

Rys. 2 — Działanie ATP na albuminę surowicy końskiej. Roztwór ogrzewany w ciągu 20 min. w temp. 75°; stężenie białka: 0,02%, stężenie NaCl: 0,002 M, pH = 6,55.




Rys. 3 — Działanie ATP na krystal. albuminę jaja. Roztwór ogrzewany w ciągu 20 min. w temp. 75°; stężenie białka: 0,4%, stężenie NaCl: 0,002M, pH = 6,70.




Rys. 4 — Działanie ATP na globuliny surowicy końskiej. Roztwór ogrzewany w ciągu 20 min. w temp. 75°; stężenie białka: 0,22%, stężenie NaCl: 0,002 M, pH = 6,90.




Rys. 5 — Działanie ATP na albuminę surowicy końskiej. Roztwór ogrzewany w ciągu 20 min. w temp. 75°; stężenie białka: 0,1%, stężenie NaCl: 0,002 M.

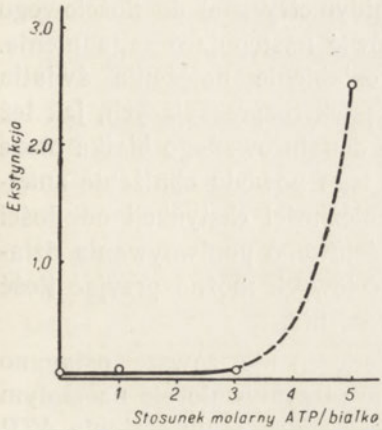
W punkcie izoelektrycznym oraz przy wartościach pH nieco wyższych (do pH = 6) pomiary ilościowe były niemożliwe ze względu na ścinanie się białka, nawet przy niskich jego stężeniach. Jednak i w tych przypadkach wytrącający się osad był w obecności ATP mniej obfity.

http://rcin.org.pl

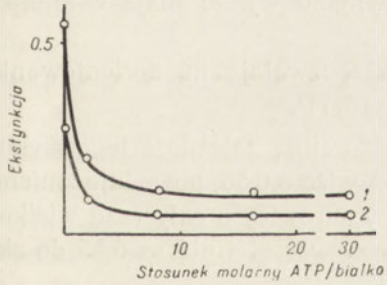
Poniżej punktu izoelektrycznego ATP działa w sposób wręcz przeciwny. Roztwory białka ogrzewane w obecności ATP wykazują znacznie silniejsze zmętnienie (rys. 6).

Działanie ATP przy różnych stężeniach białka, lecz przy tym samym stosunku ATP/białko przedstawiono na rys. 7. Widać z tego, że w przypadku 2-krotnie większych stężeń białka ekstynkcja roztworów jest również dwukrotnie większa.

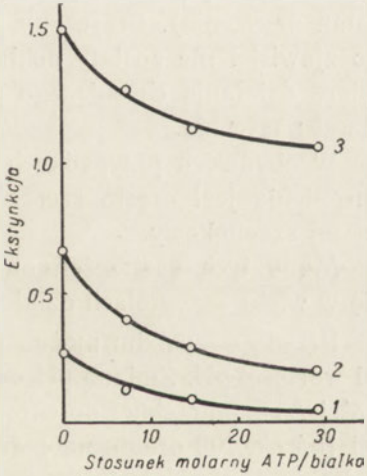
Wpływ stężenia elektrolitów na działanie chroniące ATP badano na przykładzie chlorku sodowego. Wyniki przedstawiono na rys. 8. Z wykresu tego widać, że działanie ATP jest słabsze w obecności elektrolitów. Przy większych stężeniach elektrolitów, nawet w obecności ATP, otrzymujemy po ogrzaniu silne zmętnienia.




Rys. 6 — Działanie ATP na albuminę surowicy poniżej punktu izoelektr. Roztwór ogrzewany w ciągu 20 min. w temp. 75°; stężenie białka: 0,1%, stężenie NaCl: 0,002 M, pH = 4,18.




Rys. 8 — Wpływ stężenia NaCl na od stężenia białka (bezpostaciowa albumina jaja). Roztwór ogrzewany w ciągu 20 min. w temp. 75°; stężenie NaCl: 0,002 M, Ph = 6,90. Krzywa 1 — Białko 0,4%, krzywa 2 — białko 0,2%.




Rys. 8 — Wpływ stęzenia NaCl na działanie chroniące ATP. Białko: bezpostaciowa albumina jaja; stęż. 0,4%, pH = 6,75. Krzywa 1 — stęż. NaCl 0,00 M, krzywa 2 — stęż. NaCl 0,004 M, krzywa 3 — stęż. NaCl 0,02 M.

Czas upływający pomiędzy dodaniem ATP do roztworu białka a denaturacją nie ma widocznego wpływu na zmętnienie. Próbki odpowiednio denaturowane po upływie 5 min. i 2 godz. po dodaniu ATP dały wyniki zgodne.

http://rcin.org.pl

## Dyskusja wyników

Przytoczone wyniki pozwalają stwierdzić, że ATP chroni białka przed koagulacją w czasie ogrzewania. Działanie to wywiera ATP na białka zarówno typu albumin, jak i globulin.

W związku z zastosowaniem metody turbidymetrycznej do ilościowego porównywania chronienia białka, należy omówić następujące zagadnienia. Natężenie światła rozproszonego, a więc i osłabienie natężenia światła przepuszczonego, zależy zarówno od ilości cząstek rozpraszających, jak też i od kwadratu ich objętości. Dodatek ATP do denaturowanego białka może wywołać zmianę obydwóch tych wielkości. Z tego powodu obniżenie zmętnienia lub kształt otrzymanych krzywych (zależności ekstynkcji od ilości dodanego ATP) mogą służyć jedynie do jakościowego porównywania działania chroniącego. Za podstawę oznaczeń ilościowych można przyjąć ilość ATP potrzebną do uzyskania całkowitego chronienia.

Sprawę komplikuje fakt, że w toku doświadczeń nie zawsze osiągano stan całkowitego chronienia; często zmętnienie utrzymywało się na stałym (bliskim zera) poziomie, nie zmieniając się przy zwiększaniu stężenia ATP (stan nasycenia). Przyczyny powodujące powstawanie jednego lub drugiego zjawiska nie zostały dokładnie ustalone. W tym drugim przypadku za miarę działania chroniącego przyjęto ilość ATP potrzebną do osiągnięcia stanu nasycenia.

W obydwóch przypadkach dokładne ustalenie ilości ATP potrzebnej do chronienia jest często rzeczą trudną i otrzymane wyniki mają charakter raczej szacunkowy.

Mimo tych zastrzeżeń otrzymane wyniki pozwalają na zorientowanie się w wielu szczegółach działania chroniącego ATP.

Przede wszystkim można stwierdzić bardzo silną zależność tego efektu od wartości pH. Zmiana pH od 6,55 do 7,10, a więc o 0,55, powoduje zmianę ilości ATP potrzebnej do chronienia albuminy surowicy o cały rząd wielkości (od ok. 100 drobin na 1 drobinę białka przy wartości pH = 6,55 do ok. 7 drobin przy pH = 7,10).

W roztworach o wartości pH zbliżonej do 7 do chronienia wystarcza kilka drobin ATP na 1 drobinę białka.

Ciekawe jest działanie ATP poniżej punktu izoelektrycznego białek. Dodatek ATP ułatwia w tych warunkach koagulację. Wzrost zmętnienia występuje tu gwałtownie i już w obecności niewielkich ilości ATP.

Drugim czynnikiem wpływającym na działanie ATP jest stężanie elektrolitów, badane tutaj na przykładzie NaCl. Działanie chroniące zostaje silnie osłabione w miarę zwiększania stężenia soli. Przy większych stężeniach elektrolitów otrzymujemy stany nasycenia dalekie od chronienia całkowite-

http://rcin.org.pl

go. Tym prawdopodobnie tłumaczy się stosunkowo słabe działanie ATP na globuliny surowicy końskiej. Pomiary z tym białkiem mogły być wykonywane jedynie przy większych stężeniach NaCl ze względu na jego nierozpuszczalność w wodzie.

Należy zaznaczyć, że obydwa czynniki osłabiające działanie ATP, a więc obniżenie wartości pH i zwiększenie stężenia elektrolitów, wpływają także silnie na zmętnienie roztworów nie chronionych białek po denaturacji.

Jeżeli chodzi o porównanie działania ATP z działaniem innych związków, a więc przede wszystkim kaprylanu i jodooctanu, to należy zaznaczyć, że porównuje się tu tylko chronienie przed koagulacją białka, nie wchodząc w to, czy związki te chronią także przed właściwą denaturacją, czy nie.

Działanie kaprylanu, które badali Boyer, Ballou, Luck i Lum (4), polegało na tym, że temperatura, w której koagulacja zachodziła po 30 sekundach ulegała podwyższeniu z 65° na 80°. Jest to więc raczej działanie opóźniające koagulację. Próby wykonywane przeze mnie z kaprylanem przy użyciu metody stosowanej w tej pracy wykazały jedynie słabe działanie chroniące tego związku. ATP wywiera działanie znacznie silniejsze.

Wpływ jodooctanu na koagulację był badany przez Hugginsa i Jensena również metodą odmienną (3). Z przeliczenia danych opublikowanych przez autorów wynika, że jodooctan chroni białko o stężeniu 7% podczas ogrzewania do temp. 100° w ciągu 20 min. przy wartości pH = 7,4 w ilości 12 drobin jodooctanu na 1 drobinę białka. Ponieważ stwierdzono, że ATP chroni białko także i w temperaturze 100°, jakkolwiek w zwiększonych ilościach, można więc twierdzić, że działanie ATP jest co najmniej tego samego rzędu jak działanie jodooctanu.

Tak więc ATP można zaliczyć do najsilniej działających ze znanych środków, chroniących białka przed koagulacją termiczną.

Pozostaje jeszcze otwartym zagadnienie, czy działanie ATP ogranicza się tylko do chronienia przed koagulacją, czy też chroni on białka także i przed denaturacją. Próbne doświadczenia (badanie rozpuszczalności, oznaczanie grup —SH) wskazują na to, że białka chronione przez ATP ulegają przy ogrzewaniu denaturacji. Należy jednak pamiętać, że denaturacja przeprowadzana była tutaj w sposób stosunkowo energiczny. Działanie ATP w niższych temperaturach nie było badane.

Jak wynika z danych Boyera i współpracowników (10), ATP mogłoby przeciwdziałać denaturacji dzięki obecności silnie elektroujemnej reszty pirofosforanowej oraz niepolarnego rdzenia purynowego. Autorzy ci nie badali jednak związków z tej grupy.

O mechanizmie działania ATP trudno jest na razie powiedzieć coś pewnego ze względu na zbyt mały materiał doświadczalny.

http://rcin.org.pl

Ułatwianie przez ATP koagulacji białka poniżej punktu izoelektrycznego można wytłumaczyć adsorpcją anionów ATP na powierzchni drobin białka. W ten sposób białko występujące w postaci kationu zmniejsza swój ładunek elektryczny, co ułatwia łączenie się poszczególnych drobin.

Być może, że i powyżej punktu izoelektrycznego mechanizm działania ATP jest taki sam. Łącząc się z drobinami białka (o sposobie łączenia nie zakładamy na razie nic) ATP powiększa ich ujemny ładunek i może w ten sposób utrudniać koagulację.

## Uzupełnienie

Praca niniejsza była wykonana w r. 1951 jako praca magisterska i w lutym 1952 r. została złożona na Wydziale Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego.

Po jej zakończeniu w maju 1952 r. ukazała się praca Mandla, Grauera i Neubergera [3]), w której wykazano, że ATP zwiększa rozpuszczalność całego szeregu trudno rozpuszczalnych substancji, zarówno nieorganicznych, jak i organicznych. Między innymi autorzy stwierdzili, że ATP hamuje wytrącanie osadów białek rodzimych i zdenaturowanych.

## LITERATURA

1. F. Blum, *Z. Physiol. Chem.*, **22**, 127 (1896).
2. E. V. Jensen, V. D. Hospelhorn, D. F. Tapley, H. Huggins, *J. Biol. Chem.*, **185**, 411 (1950).
3. Ch. Huggins, E. V. Jensen, *J. Biol. Chem.*, **179**, 645 (1949).
4. S. A. Ballou, P. D. Boyer, J. M. Luck, *J. Biol. Chem.*, **159**, 111 (1945).
5. P. D. Boyer, S. A. Ballou, J. M. Luck, *J. Biol. Chem.*, **162**, 199 (1946).
6. E. L. Duggan, A. C. Giese, J. M. Luck, *Arch. of. Biochem.*, **28**, 174 (1950).
7. R. G. Rice, S. A. Ballou, P. D. Boyer, J. M. Luck, F. G. Lum, *J. Biol. Chem.*, **158**, 609 (1945)
8. T. Baranowski, A. Morawiecki, *Acta Physiol. Polon.*, suppl. vol. III, fasc. 3, 159 (1952).
9. W. S. Tongur, W. J. Kasatoszkin, *Dokł. Akad. Nauk SSSR*, **74**, 533 (1950).
10. P. D. Boyer, F. G. Lum, S. A. Ballou, J. M. Luck, *J. Biol. Chem.* **162**, 181 (1946).
11. A. Szent-Györgyi, Chemistry of Muscular Contraction, *Acad. Press*, N. York 1947.
12. T. E. Weichselbaum, *Am. J. Clin. Path.*, **7**, 40 (1946).
13. C. H. Fiske, Y. Subbarow, *J. Biol. Chem.*, **66**, 375 (1925).
14. J. King, *Biochem. J.*, **26**, 292 (1932).

---

[3]) I. Mandl, A. Grauer, C. Neuberger: *Biochim. Biophys. Acta* 8, 654 (1952).

http://rcin.org.pl

## ВЛИЯНИЕ АДЕНОЗИНТРИФОСФАТА НА ТЕРМИЧЕСКОЕ СВЕРТЫВАНИЕ БЕЛКОВ


### Резюме

1. Найдено, что АТФ предупреждает коагуляцию растворов белков во время нагревания.

2. Разработан метод основанный на измерениях помутнения, который дает возможность исследовать предохранящее действие АТФ в разных условиях.

3. По этому методу было исследовано действие АТФ на

яичный альбумин
альбумин лошадиной сыворотки
глобулин лошадиной сыворотки

при различных pH и разных концентрациях элекролитов.

4. При pH = 7,1 предохраняющее действие выступает уже в присутствии нескольких молекул АТФ на одну молекулу белка.

5. Предохранительное действие в большой степени зависит от pH. С понижением pH падает действие АТФ.

6. Ниже изоэлектрической точки АТФ облегчает коагуляцию свернутых белков.

7. Увеличение концентрации электролитов ослабляет действие АТФ.

8. На основании сравнения действия АТФ с описанным в литературе действием каприлата и подацетсата можно считать, что АТФ лучше других веществ предупреждает термическую коагуляцию белка.


## INFLUENCE OF ADENOSINE TRIPHOSPHATE ON THE THERMODENATURATION OF ALBUMINS


### Summary

1. It has been stated that ATP inhibits the coagulation of heated albumin solution.
2. A method based on measurements of turbidity which permits to study the protecting action of ATP in various conditions has been elaborated.
3. By this method the action of ATP on:

egg albumin
horse blood serum albumin
horse serum globulin


http://rcin.org.pl

was studied in various pH conditions and different concentrations of electrolytes.

4. At pH = 7.1 the inhibiting action appears already if several molecules of ATP to one molecule of albumin are present.
5. The protective action depends greatly on the pH. Its decrease weakens the ATP activity.
6. Below the isoelectric point ATP facilitates the coagulation of denaturated albumins.
7. The increase of concentration of the electrolytes weakens the ATP activity.
8. The activity of ATP when compared with that of caprilate and iodoacetate described in literature, classifies ATP as one of the most efficient agents against albumin thermocoagulation.

*Department of Physiological Chemistry, Medical Academy — Wrocław.*
*Chief: prof. dr T. Baranowski.*

http://rcin.org.pl

ACTA BIOCHIMICA POLONICA
VOL. I 1954 NO 1

WŁODZIMIERZ MOZOŁOWSKI

# CHARAKTERYSTYKA BIAŁEK SUROWICY KRWI CZŁOWIEKA PRZY POMOCY ZAWARTOŚCI AZOTU I NIEKTÓRYCH WŁAŚCIWOŚCI FIZYCZNYCH

*Zakład Chemii Fizjologicznej A. M. w Gdańsku*

Poszczególne frakcje białkowe osocza krwi różnią się składem chemicznym; jedne z nich mają charakter białek prostych, zbudowanych niemal wyłącznie z aminokwasów, inne zawierają w swych cząsteczkach niekiedy znaczne ilości węglowodanów lub lipidów. Ta różnorodność składu wyrazi się w zawartości azotu; im więcej składnika węglowodanowego lub lipidowego, tym mniejszy będzie odsetek azotu. Natomiast wskaźnik refraktometryczny, obliczony na 1 g białka, jest wielkością stosunkowo mało zależną od składu białka. Liczbowe dane tego twierdzenia zawarte są w tablicy 1 zestawionej z prac Cohna i współpracowników (1), (2). W tablicy tej podano zawartości azotu, węglowodanów i cholesterolu oraz wskaźnik refraktometryczny białek, uzyskanych metodą stosowaną do technicznego otrzymywania frakcji białkowych osocza krwi człowieka. Metodą tą, oznaczoną przez autorów liczbą 6, wydziela się frakcje, które wprawdzie nie przedstawiają chemicznych jednostek białkowych, ale stanowią etap na drodze do ich wydzielania w stanie czystym; analizą elektroforetyczną stwierdzono, że frakcja I składa się głównie z fibrynogenu, frakcja II + III z beta i gamma globulin, frakcja IV-1 z alfa globulin z dużą ilością lipidów, frakcja IV-4 z alfa i beta globulin oraz niewielkiej ilości albumin, a frakcja V z albumin.

Procentowa zawartość azotu poszczególnych frakcji wyraża się liczbami od 11,9 do 16,9 — pozostają one do siebie w stosunku jak 7:10; natomiast wskaźnik refraktometryczny wyraża się liczbami 1,80 do 1,88, a więc będącymi w stosunku do siebie jak 9,6:10. Wskaźnik refraktometryczny, obliczany na 1 g białka, jest wielkością ulegającą znacznie mniejszym wahaniom aniżeli zawartość azotu poszczególnych frakcji białkowych.



http://rcin.org.pl

Tablica 1

Zawartość azotu, cholesterolu i węglowodanów oraz wskaźnik refraktometryczny frakcji białkowych ludzkiego osocza otrzymywanych metodą 6.

Dane zestawione z prac Cohna i współpracowników (1), (2)

| Frakcja | Azotu % | Cholesterolu % | Węglowodanów % | Wskaźnik refraktometryczny na 1 g białka w 1 litrze |
|---|---|---|---|---|
| I | 16,4 | 0,26 | 1,2 | $1,88 \cdot 10^{-4}$ |
| II + III | 13,0 | 6,0 | 1,3 | 1,80 |
| IV — 1 | 11,9 | 7,0 | 2,2 | 1,80 |
| IV — 4 | 14,0 | 1,7 | 2,9 | 1,84 |
| V | 16,9 | 0,04 | 0,16 | 1,86 |

Zawartość węglowodanów lub cholesterolu w różnych frakcjach białkowych znajduje swój wyraz w ciężarze właściwym białek. Białka proste, złożone z samych aminokwasów, mają ciężar właściwy około 1,33, węglowodany około 1,5, cholesterol około 1,0. Objętość właściwa, tj. objętość zajmowana przez 1 g, wynosi więc dla białek prostych około 1/1,33, tj. 0,75, dla węglowodanów — 1/1,5, tj. około 0,67, a dla cholesterolu i lipidów około 1,0. Im większy będzie udział cięższego składnika (węglowodanu) w budowie białka, tym mniejsza będzie jego objętość właściwa; wzrost ilości lżejszego składnika (np. cholesterolu) wyrazi się większą właściwą objętością białka. Jest więc zrozumiałe, że ciężar właściwy białek (lub ich objętość właściwa) dostarcza wskazówek o ich składzie ((3) str. 371). Potwierdzają to dane z tablicy 2, dotyczące frakcji białkowych, scharakteryzowanych elektroforezą oraz stałą sedymentacji w ultracentryfudze (4).

Właściwością fizyczną, której można użyć dla scharakteryzowania różnych białek osocza, jest lepkość. Lepkość białek jest wyrazem asymetrii ich cząsteczek; bardzo wydłużone cząsteczki fibrynogenu powodują, że jego roztwory są bardzo lepkie, tak więc 2% roztwór fibrynogenu ma taką samą lepkość, jak 25% roztwór albuminy surowiczej (5). Różnic lepkości roztworów różnych białek nie możemy tłumaczyć wyłącznie kształtem ich cząsteczek, w interpretacji tego zjawiska musimy się liczyć i z tym, że hydratacja cząsteczek może wywierać tutaj wpływ bardzo istotny. Dla liczbowego zużytkowania lepkości jako cechy charakteryzującej białka osocza i surowicy, jest rzeczą istotną znalezienie zależności lepkości od stężenia białka. Daje się to uzyskać w oparciu o ujęcie Treffersa (6), że płynność

http://rcin.org.pl

Tablica 2

Objętość właściwa niektórych białek osocza krwi człowieka
Dane zestawione z prac Edsalla (4)

| Składnik elektroforetyczny | Stała sedymentacji $S_{20}$ | Objętość właściwa |
|---|---|---|
| Albumina | 4,6 | 0,733 |
| $\gamma$ — Globulin | 7,2 | 0,739 |
| $\alpha_1$ — Globulin | 5,0 | 0,841 |
| $\beta_1$ — Globulin | 5,5 | 0,725 |
| $\beta_1$ — Globulin | 2,9 | 0,950 |

roztworów białka (tj. stosunek lepkości rozpuszczalnika do lepkości roztworu) jest wprost proporcjonalna do stężenia białka.

Z powyższych rozważań wynika, że każda z czterech omawianych właściwości białek osocza lub surowicy jest wyrazem innej cechy białek; wskaźnik refrakcji jest w dużym przybliżeniu wprost proporcjonalny do stężenia białka bez względu na to, czy jest to białko proste czy złożone; zawartość procentowa azotu jest wyrazem tego, czy składniki bezazotowe biorą większy czy mniejszy udział w strukturze białka; ciężarem właściwym będą się odróżniały białka zawierające więcej składników cięższych (węglowodanowych) od takich, które mają więcej składników lżejszych (lipidów, cholesterolu); wreszcie lepkość jest wyrazem stopnia asymetrii cząsteczek. Toteż poszczególne wydzielone frakcje białkowe różnią się od siebie zawartością azotu, ciężarem właściwym i lepkością. Jeżeli jednak będziemy rozważali całość białek osocza lub surowicy zdrowego człowieka w określonych warunkach fizjologicznych, to skłonni jesteśmy przyjąć, że wzajemny ilościowy stosunek poszczególnych frakcji jest stały, chociaż całkowite stężenie białek w osoczu ulega zmianie w zależności od wielu czynników. Jednym z takich czynników, wpływających istotnie na stężenie białka w osoczu jest np. postawa człowieka (7); mimo znacznych różnic w stężeniu białek w surowicach ludzi, pozostających w różnych postawach, stosunek frakcji białkowych uzyskanych przez wysolenie nie ulega zmianie (8). Stały wzajemny stosunek ilościowy poszczególnych frakcji białkowych surowicy krwi zdrowego człowieka powinien znaleźć swój wyraz w stałym liczbowym stosunku czterech omawianych właściwości białek bez względu na ich stężenie w osoczu lub surowicy. Nie można jednak pominąć tego, że ciała drobnocząsteczkowe osocza lub surowicy zaznaczają swój udział we właściwościach będących przedmiotem naszych rozważań; przecież wodny roztwór

http://rcin.org.pl

drobnocząsteczkowych składników surowicy będzie się różnił od wody wskaźnikiem refrakcji, ciężarem właściwym i lepkością, a także będzie zawierał azotowe substancje niebiałkowe. Jeżeli zatem chcemy scharakteryzować za pomocą omawianych właściwości białka surowicy bez ich wydzielania, to musimy uwzględnić zawartość azotu, wskaźnik refrakcji, ciężar właściwy i lepkość wodnego roztworu ciał drobnocząsteczkowych, w których są rozpuszczone białka surowicy; wtedy będzie można złączyć ze sobą omawiane właściwości za pomocą następujących równań:

$$\text{A)} \quad \frac{\text{n sur.} - \text{n ultr.}}{\text{N całk.} - \text{N niebiałk.}} = K_1$$

$$\text{B)} \quad \frac{\text{C sur.} - \text{C ultr.}}{\text{N całk.} - \text{N niebiałk.}} = K_2$$

$$\text{C)} \quad \left(\frac{\eta_0}{\eta} - 1\right) : (\text{N całk.} - \text{N niebiałk.}) = K_3,$$

gdzie:

n sur. — wskaźnik refrakcji surowicy w temp. 20°,

n ultr. — wskaźnik refrakcji roztworu ciał drobnocząsteczkowych surowicy w temp. 20°,

N całk. — całkowity azot surowicy w gramach w 100 ml,

N niebiałk. — niebiałkowy azot surowicy w gramach w 100 ml,

C sur. — ciężar właściwy surowicy,

C ultr. — ciężar właściwy roztworu ciał drobnocząsteczkowych surowicy,

$\eta$ — lepkość surowicy w temp. 20° w centipoisach,

$\eta_0$ — lepkość roztworu ciał drobnocząsteczkowych surowicy w temp. 20° w centipoisach,

$K_1$, $K_2$, $K_3$ — wielkości stałe.

Jeżeli zawartość azotu, wskaźnik refrakcji, ciężar właściwy i lepkość surowicy krwi są ze sobą ściśle związane, to z jednej z tych wielkości oznaczonej dowiadczalnie powinniśmy mieć możliwość obliczenia trzech innych. Sprawdzenie tego przypuszczenia jest przedmiotem obecnej pracy. Oczywiście będziemy mogli to uzyskać jedynie wtedy, gdy wielkości charakteryzujące wodny roztwór ciał drobnocząsteczkowych surowicy będą ulegały tylko tak nieznacznym zmianom, że można je będzie przyjąć jako stałe. Pierwszym zatem zadaniem jest wyznaczenie tych wielkości; po wprowadzeniu ich do wyżej podanych równań można doświadczalnie oznaczyć średnie wartości $K_1$, $K_2$, $K_3$ oraz ich zmienność. Opierając się na uzyskanych równaniach można pokusić się o to, by na osobnej serii doświadczalnej,

http://rcin.org.pl

która nie służyła dla wyznaczenia stałych, a która dotyczyłaby surowic o możliwie różnym stężeniu białek, sprawdzić, z jaką dokładnością dają się z jednej właściwości obliczyć trzy inne. W ten sposób oceniłoby się wartość podanych równań dla charakterystyki białek surowicy, a także uzyskałoby się miernik zmienności ich jakościowego składu u ludzi zdrowych.

## Materiał doświadczalny

Dla obliczenia stałych w stosowanych przeze mnie równaniach oparłem się na materiale doświadczalnym Armstronga i współpr. (2), Van Slyke'a i współpr. (9) oraz na oznaczeniach wykonanych w Zakładzie Chemii Fizjologicznej AM w Gdańsku, a ogłoszonych w pracach Mozołowskiego i współpr. (10), Żydowy (7) i Byczkowskiego (8). Dla kontroli zgodności stosowanych równań posłużyły wyniki 9 analiz surowic trzech zdrowych mężczyzn [1]). Sposób przeprowadzania oznaczeń był w naszych doświadczeniach następujący.

Krew pobierano na czczo z żyły łokciowej, unikając większego zastoju (z wyjątkiem tych oznaczeń serii sprawdzającej, w których chcieliśmy uzyskać zagęszczenie białek). Pozycja, w której pobierano krew, była ściśle określona. Po skrzepnięciu krew wirowano. Wszystkie doświadczenia wykonywano w surowicy, pragnąc uniknąć dodawania jakichkolwiek środków powstrzymujących krzepnięcie. Azot całkowity oznaczano sposobem Kjeldahla w 0,2 ml surowicy: po trzygodzinnym spalaniu z kwasem siarkowym, siarczanem sodowym i siarczanem miedziowym, destylowano w aparacie Parnasa i Wagnera do odbieralnika z kwasem borowym, miareczkowano 0,02 n kwasem siarkowym. Azot niebiałkowy w pracy Mozołowskiego i współpr. (10) oznaczano w przesączu wolframianowym. Wskaźnik refrakcji oznaczano zanurzeniowym refraktometrem Pulfricha używając dodatkowego pryzmatu w temp. 20°. Dla oznaczenia ciężaru właściwego surowicy posługiwano się metodą Phillipsa, Van Slyke'a i współpr. (11); w pracy (10) ciężary właściwe oznaczano metodą opracowaną przez tych autorów, ogłoszoną w r. 1945 (11a); dlatego też ciężary właściwe tej serii użyte do obecnych obliczeń powiększono o 0,0005 (por. (11), str. 310). Lepkość oznaczano wiskozymetrem Kalinowskiego (12) w temp. 20°. Stosowane przeze mnie metody pozwalają wyrażać wyniki z następującą dokładnością: azot całkowity w setnych częściach grama w 100 ml, wskaźnik refrakcji do czwartego miejsca dziesiętnego z zaznaczeniem na piątym liczby 5, ciężar właściwy do trzeciego miejsca dziesiętnego z zaznaczeniem na czwartym liczby 5, lepkość z dokładnością jednej setnej centipoisa.

---

[1]) Analizy te wykonał dr Stefan Byczkowski, za co mu i w tym miejscu dziękuję.

http://rcin.org.pl

**Oznaczenie stałych w równaniach łączących ze sobą zawartość azotu, wskaźnik refrakcji, ciężar właściwy i lepkość surowic ludzi zdrowych**

Zależność wskaźnika refrakcji białek osocza od stężenia białka oznaczyli Armstrong i współpr. (2) na zbieranym osoczu zdrowych ludzi. Przeszkadzający wpływ ciał drobnocząsteczkowych usunęli, poddając osocze pięciodniowej dializie wobec chlorku sodowego o sile jonowej 0,3. Oznaczenia wykonano w 19 porcjach zbieranego osocza pochodzącego od 150 osób. Stężenie białka oznaczano wagowo, zwracając szczególną uwagę na to, by suszenie nie powodowało utraty lipidów. Wzajemną zależność białka, oznaczonego wagowo, wskaźnika refrakcji w temp. 20° oraz zawartości azotu autorzy wyrażali w następujących liczbach:

a) przyrost wskaźnika refrakcji w temp. 20° na jeden gram białka w litrze wynosi $1{,}83 \cdot 10^{-4}$ ze średnim odchyleniem $0{,}012 \cdot 10^{-4}$;

b) przyrost wskaźnika refrakcji w temp. 20° na gram azotu białkowego w litrze wynosi $1{,}23 \cdot 10^{-3}$ ze średnim odchyleniem $0{,}014 \cdot 10^{-3}$;

c) stosunek stężenia białka wyrażonego w gramach w litrze do zawartości azotu białkowego wyrażonego w gramach w litrze wynosi 6,73 ze średnim odchyleniem 0,10.

Te dane liczbowe były dla mnie punktem wyjścia dla obliczenia wskaźnika refrakcji niebiałkowych składników surowicy zdrowych ludzi. Jeżeli pomnożymy zawartość azotu białkowego w 100 ml surowicy przez liczbę 0,0123 — otrzymamy wskaźnik refrakcji białek; przez odjęcie tej wielkości od zmierzonego wskaźnika refrakcji surowicy — otrzymamy wskaźnik refrakcji wodnego roztworu ciał niebiałkowych surowicy; odjęcie wskaźnika refrakcji wody, wynoszącego w temp. 20° — 1,3330, da nam wielkość przypadającą na składniki niebiałkowe. W ten sposób przeliczono wartości doświadczalne 55 surowic, a mianowicie 25 surowic z pracy (7), 20 surowic z pracy (8) oraz 10 surowic z pracy (10). Otrzymana średnia wynosi 0,0025 ze średnim odchyleniem 0,0002. Wskaźnik refrakcji wodnego roztworu niebiałkowych związków surowicy obliczono więc na 1,3330 + + 0,0025 = 1,3355. Średnie odchylenie tej wartości wynosi 0,0002. Podany w równaniu A symbol n ultr. przedstawia dla zdrowych ludzi liczbę 1,3355 ± 0,0002. Z obliczeń przy zmianie pozycji Żydowo (7) uzyskał liczbę 1,3357, która pozostaje w dużej zgodności z wyżej podaną, mimo że postać równania, którą musiał się on posługiwać, jest bardzo wrażliwa na nieznaczne różnice w oznaczeniu azotu; najważniejsze dane piśmiennictwa, dotyczące oznaczenia tej wielkości, są podane w pracy Żydowy (7).

Występującą we wszystkich trzech równaniach wielkość N niebiałk., tj. zawartość azotu niebiałkowego, można łatwo oznaczyć doświadczalnie; dla surowic ludzi zdrowych można uprościć postępowanie, przyjmując zawartość

http://rcin.org.pl

azotu niebiałkowego jako stałą i wynoszącą 0,02 g w 100 ml. Takie uproszczenie byłoby oczywiście niedopuszczalne dla surowic krwi patologicznych.

Stała wielkość $K_1$ w równaniu A wynosi 0,0123 w oparciu o wyżej omówione dane Armstronga; wielkość ta służyła mi w obliczeniu wskaźnika refrakcji wodnego roztworu ciał niebiałkowych. Średnie odchylenie tej wielkości jest oczywiście większe niż otrzymał to Armstrong, dołącza się bowiem rozrzut wartości wyrażającej wskaźnik refrakcji ciał niebiałkowych. Obliczenie tego średniego odchylenia dla 55 surowic zdrowych ludzi dało liczbę 0,00025, tak że równanie A przybierze następującą postać:

$$\frac{\text{n sur.} - 1{,}3355}{\text{N całk.} - 0{,}02} = 0{,}0123 \pm 0{,}00025.$$

Równanie B, łączące ciężar właściwy surowicy i zawartość azotu, wymaga ustalenia dwóch wielkości: ciężaru właściwego wodnego roztworu ciał niebiałkowych surowicy, oraz stałej $K_2$. Van Slyke i współpr. ((9) str. 338) przyjmują dla ciężaru właściwego wodnego roztworu ciał niebiałkowych liczbę 1,007; tę też liczbę wprowadzam do równania B. Obliczona przez Żydowę (7) ze zmiany pozycji liczba 1,009 wykazuje duże średnie odchylenie, związane z postacią równania, którym autor musiał się posługiwać. Stała $K_2$, obliczona z 54 surowic wynosi 0,0175 ze średnim odchyleniem 0,0004. Postać równania, którym posługują się Van Slyke i współpr. (9) jest odmienna od stosowanego przeze mnie; stała *a* tych autorów pozostaje do naszej stałej $K_2$ w następującym stosunku: $a = \frac{6{,}25}{K_2}$ Zatem wartości $K_2$ równej 0,0175 odpowiada wartość *a* równa 357; taką wielkość (a mianowicie 358) znaleźli Moore i Van Slyke (cytowane z pracy (9) z tablicy I na str. 332) z pomiarów u ludzi zdrowych. W równaniach obecnie stosowanych przez Van Slyke'a i współpr. występują jako wartości *a*: 365, 373 lub 369 zależnie od tego, czy bada się osocze normalne czy patologiczne; odpowiednikami tych liczb w naszym równaniu B byłoby $K_2$ równe 171, 167 lub 169. Po podstawieniu stałych równanie B otrzymuje następującą postać:

$$\frac{\text{C sur.} - 1{,}007}{\text{N całk.} - 0{,}02} = 0{,}0175 \pm 0{,}0004.$$

Zależność lepkości od zawartości azotu białek wyrażamy równaniem C opierając się na wywodzie Treffersa (6) i nie ogłoszonych drukiem badaniach Kalinowskiego. Brak mi jeszcze danych, pozwalających na wprowadzenie do równania wielkości odpowiadającej lepkości roztworu ciał niebiałkowych surowicy. Obecnie muszę się zadowolić wartością na lepkość wody w temp. 20°, tj. 1,00 centipoisa; we wzorze C przyjmuję więc



http://rcin.org.pl

1,00 jako wartość $\eta_0$. Wartość $K_3$ obliczona z 53 surowic wynosi: średnia — 0,35 ze średnim odchyleniem 0,013.

Równanie C wyrażające zależność płynności i azotu białkowego otrzymuje następującą postać:

$$\left(\frac{1{,}00}{\eta} - 1\right) : (\text{N całk.} - 0{,}02) = -0{,}35 \pm 0{,}013.$$

## Sprawdzenie równań na serii oznaczeń, która nie służyła dla wyznaczenia stałych

Dla sprawdzenia równań posłużono się oznaczeniem 9 surowic trzech zdrowych mężczyzn. Wyniki doświadczalne podano w tablicy 3, a wartości obliczone z zawartości całkowitego azotu w tablicy 4. Wartości te obliczono z równań:

$$\text{n sur.} = 1{,}3355 + (\text{N całk.} - 0{,}02) \cdot 0{,}0123$$

$$\text{C sur} = 1{,}007 + (\text{N całk.} - 0{,}02) \cdot 0{,}0175$$

$$\frac{1}{\eta} = 1 - 0{,}35 \cdot (\text{N całk.} - 0{,}02)$$

Tablica 3

Zawartość azotu, wskaźnik refrakcji, ciężar właściwy i lepkość surowicy krwi trzech zdrowych mężczyzn

| Badany | Warunki pobierania krwi | N całk. g/100 ml | n sur. | C sur. | $\eta$ |
|---|---|---|---|---|---|
| S. B. | po 30′ w poziomej pozycji | 1,14 | 1,3494 | 1,0265 | 1,71 |
| | po 5′ zacisku ramienia | 1,53 | 1,35415 | 1,0335 | 2,11 |
| | po 10′ od usunięcia zacisku | 1,16 | 1,3495 | 1,027 | 1,71 |
| A. M. | po 30′ w poziomej pozycji | 1,06 | 1,3480 | 1,025 | 1,55 |
| | po 5′ zacisku ramienia | 1,28 | 1,35085 | 1,029 | 1,75 |
| | po 15′ od usunięcia zacisku | 1,09 | 1,3482 | 1,0255 | 1,57 |
| A. K. | po 30′ w poziomej pozycji | 1,13 | 1,34895 | 1,0265 | 1,65 |
| | po 5′ zacisku ramienia | 1,53 | 1,35[illegible]8 | 1,033 | 2,00 |
| | po 30′ od usunięcia zacisku | 1,19 | 1,34925 | 1,027 | 1,67 |

Porównanie danych z tablicy 3 z wartościami z tablicy 4 wykazuje, że dla zdrowych ludzi udaje się związać cztery badane przez nas własności surowic tak, że z jednej (w wyżej podanym przykładzie z azotu całkowitego)

http://rcin.org.pl

Tablica 4

Wskaźnik refrakcji, ciężar właściwy i lepkość, obliczone z równań A, B i C dla takich zawartości azotu, jakie znajdowały się w surowicach krwi podanych w tablicy 3

| N całk. g/100 ml | n sur. | C sur. | $\eta$ |
|---|---|---|---|
| 1,14 | 1,3493 | 1,0265 | 1,64 |
| 1,53 | 1,3541 | 1,0335 | 2,13 |
| 1,16 | 1,3495 | 1,027 | 1,67 |
| 1,06 | 1,3483 | 1,0255 | 1,56 |
| 1,28 | 1,3510 | 1,029 | 1,78 |
| 1,09 | 1,3487 | 1,026 | 1,59 |
| 1,13 | 1,3492 | 1,0265 | 1,64 |
| 1,53 | 1,3541 | 1,0335 | 2,13 |
| 1,19 | 1,3499 | 1,0275 | 1,69 |

można obliczyć trzy inne z dużym przybliżeniem. Dokładniejsze porównanie tablic wskazuje, że jedna z surowic (S · B) wykazuje wartości wskaźnika refrakcji prawie takie same, jak wartości obliczone, natomiast dwie inne surowice nie przedstawiają już tak wielkiej zgodności wartości doświadczalnych i obliczonych; stwierdzane różnice są wyraźnie jednokierunkowe. Narzuca się przypuszczenie, że u podstawy tego leżą różnice we właściwościach roztworów niebiałkowych surowicy i że te właściwości są indywidualnie stałe. Zmienność wskaźnika refrakcji wodnego roztworu niebiałkowych substancji surowicy krwi ludzi zdrowych ujęliśmy liczbowo, a mianowicie 1,3355 $\pm$ 0,0002. Stwierdzane doświadczalnie różnice nie przekraczają granic podanej zmienności. Wartości ciężarów właściwych uzyskanych z doświadczenia i z obliczenia wykazują zadowalającą zgodność. Wartości obliczone dla lepkości leżą w zakresie zmienności wyrażonej średnim odchyleniem stałej $K_3$, wynoszącej — 0,35 $\pm$ 0,013.

Jako dalszej ilustracji stosowanych równań użyję zestawienia analiz surowicy młodej zdrowej kobiety. Tablica 5 obejmuje właściwości czterech surowic krwi pobieranych w różnym czasie i rozmaitych pozycjach. Z czterech analiz podanych w tablicy 5 dwie pochodzą z pracy Byczkowskiego (8), jedna z pracy Mozołowskiego i współprac. (10), a więc były one użyte dla wyznaczenia stałych zawartych w równaniach. jedynie czwartą wykonano jako kontrolę. Liczby zawarte w nawiasach po



http://rcin.org.pl

dają wartości obliczone ze wskaźnika refrakcji, a mianowicie azot całkowity z równania:

$$N \text{ całk.} = \frac{n \text{ sur.} - 1{,}3355}{0{,}0123} + 0{,}02$$

Wartość C sur. i $\eta$ obliczono z azotu całkowitego jak dla wyżej omówionych 9 surowic.

Tablica 5

Wskaźnik refrakcji, zawartość azotu, ciężar właściwy i lepkość surowic krwi W. S. W nawiasach podano wartości obliczone ze wskaźnika refrakcji

| Pozycja | n sur | N całk. | C sur. | $\eta$ |
|---|---|---|---|---|
| pozioma | 1,34825 | 1,05 (1,05) | 1,0255 (1,025) | 1,58 (1,56) |
| skośna | 1,3500 | 1,22 (1,20) | 1,028 (1,0275) | 1,72 (1,70) |
| siedząca | 1,34985 | 1,18 (1,18) | 1,0275 (1,0275) | 1,68 (1,68) |
| pozioma | 1,3491 | 1,15 (1,12) | 1,027 (1,0265) | 1,63 (1,62) |

Omówione przykłady zdają nam sprawę z dokładności, z jaką możemy wiązać ze sobą cztery omawiane właściwości fizykochemiczne surowicy krwi ludzi zdrowych.

## Wartość stałych w równaniach charakteryzujących surowice w różnych stanach fizjologicznych

Za pomocą omówionych wyżej trzech równań otrzymujemy wygodny sposób porównywania ze sobą surowic osób znajdujących się w różnych stanach fizjologicznych. W poprzednio ogłoszonej pracy (10) oznaczaliśmy omawiane cztery właściwości fizykochemiczne w surowicy krwi pępowinowej oraz krwi kobiet rodzących, ale wtedy nie ujmowaliśmy wyników w postać równań taką, jak podawana obecnie. Doszliśmy wtedy do wniosku, że zarówno surowica rodzących kobiet, jak i surowica krwi pępowinowej różnią się od surowicy kobiet nie będących w ciąży. Przeliczenie tamtych danych doświadczalnych według równań stosowanych w obecnej pracy potwierdziło w pełni ten wniosek w odniesieniu do surowicy krwi kobiet rodzących; natomiast dla krwi pępowinowej wykazało brak różnic w porównaniu z surowicą krwi normalnych zdrowych ludzi. Dane te przedstawia tablica 6; dla surowicy noworodków podano tylko 9 wyników, dane doświadczalne surowicy znaczonej 8D nie zostały użyte dla obliczenia średniej, gdyż odbiegają

http://rcin.org.pl

tak znacznie od wszystkich innych, że nie można zaliczyć jej do tej samej populacji.

Tablica 6

Stałe charakteryzujące surowice krwi ludzi w różnych stanach fizjologicznych

| | Liczba badanych surowic | $K_1$ | $K_2$ | $K_3$ |
|---|---|---|---|---|
| Normalni zdrowi | 55 | 0,0123 ± 0,00025 | 0,0175 ± 0,0004 | —0,35 ± 0,013 |
| Kobiety rodzące | 10 | 0,0133 ± 0,00016 | 0,0180 ± 0,00035 | —0,40 ± 0,012 |
| Noworodki | 9 | 0,0121 ± 0,00025 | 0,0176 ± 0,0004 | —0,34 ± 0,024 |

Wyniki liczbowe tablicy 6 stwierdzają wyraźną różnicę między surowicą kobiet rodzących a surowicą krwi ludzi dorosłych; surowica krwi noworodków nie wykazuje w badanych właściwościach różnicy w porównaniu z surowicą ludzi dorosłych. Zmiany właściwości surowicy krwi kobiet w różnych okresach ciąży omówił Kaliciński (13).

Wartości liczbowe, które są wyrażone w równaniach, zasługują na bliższe omówienie, dotyczy to zwłaszcza równania A. Wiemy z omówionych wyżej badań Armstronga i współpr., że wzrostowi stężenia białka o 1 gram w 100 ml odpowiada wzrost wskaźnika refrakcji o 0,00183, można więc ze stosunku stężenia azotu białkowego do stężenia białka, wyrachowanego ze wskaźnika refrakcji, obliczyć procentową zawartość azotu, a mianowicie

$$P = \frac{100 \cdot 0{,}00183}{K_1},$$

gdzie P oznacza zawartość procentową azotu w białkach, $K_1$ — stałą równania A. Dla liczby 0,0123, odpowiadającej surowicy normalnych zdrowych ludzi, P wynosi 14,9%, dla liczby zaś 0,0133 surowic kobiet rodzących — 13,75%. Widocznie w białkach surowic kobiet w czasie porodu składnik nieaminokwasowy bierze większy udział niż u innych ludzi. Tym nieaminokwasowym składnikiem mogą być węglowodany oraz lipidy i cholesterol. Stała $K_2$ jest wyrazem ciężaru właściwego białek; fakt, że jest ona większa dla kobiet rodzących niż dla innych zdrowych, sugeruje myśl o przyroście składnika cięższego, tj. węglowodanowego; różnica jednak nie jest duża, a średnie odchylenie dość wielkie i dlatego wnioskowanie musi być tutaj ostrożne. Powyższa interpretacja uzyskanych wyników liczbowych za pomocą różnicy składu chemicznego białek wymaga założenia, iż

http://rcin.org.pl

właściwości roztworów ciał niebiałkowych obydwóch rodzajów surowic nie różnią się od siebie. Ponieważ kontrolowano jedynie azot niebiałkowy, przyjęcie takiej samej wartości dla refrakcji składników niebiałkowych jest dowolnością, z której należy zdawać sobie sprawę. Zastrzeżenie to w niczym nie zmienia wniosku, że omawiane właściwości fizykochemiczne pozwalają scharakteryzować obydwa rodzaje surowic i odróżnić je od siebie. Analogiczne badania, uzupełnione frakcyjnym wysalaniem białek, przeprowadzili Żydowo i Górski (14) na surowicach krwi ludzi w różnych stanach patologicznych. Wyniki ich pracy wskazują na to, że omówiony sposób charakteryzowania surowic może i w klinice oddać usługi.

## LITERATURA


1. E. J. Cohn, L. E. Strong, W. L. Hughes jr., D. J. Mulford. J. N. Ashworth, M. Melin a. H. L. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.* **68**, 459, 1946.
2. S. H. Armstrong jr., M. J. E. Budka, K. C. Morrison a. M. Hasson; *J. Am. Chem. Soc.* **69**, 1747, 1947.
3. E. J. Cohn a. J. T. Edsall, Proteins, amino acids a. peptides. Reinhold. New York 1943.
4. J. T. Edsall, *Adv. Prot. Chem.* **3**, 460, 1947.
5. E. J. Cohn, L. E. Strong, W. L. Hughes jr., a. S. H. Armstrong jr., *J. Clin. Invest.* **23**, 417, 1944
6. H. P. Treffers, *J. Am. Chem. Soc.* **62**, 1405, 1940.
7. M. Żydowo. *Pol. Tyg. Lek.* 7, nr 22, 1952.
8. St. Byczkowski, *Pol. Tyg. Lek.* 7, nr 29/30, 1952.
9. D. D. Van Slyke, A. Hiller, R. A. Phillips, P. B. Hamilton, V. P. Dole, R. M. Archibald a. H. A. Eder, *J. Biol. Chem.* **183**, 331, 1950.
10. W. Mozołowski, M. Żydowo, J. Kalinowski i Z. Moszczyńska, *Bull. Acad. Pol. d. Sc. et Lettr. Cl. d. Medec.*, 1950, 65.
11. R. A. Phillips, D. D. Van Slyke, P. B. Hamilton, V. P. Dole, R. M. Archibald a. H. A. Eder, *J. Biol. Chem.* **183**, 305, 1950.

11a. R. A. Phillips, D. D. Van Slyke, P. B. Hamilton, V. P. Dole, R. M. Archibald a. H. A. Eder, J. Macy Foundation, New York 1945.

12. J. Kalinowski, *Bull. Acad. Pol. Sc. et. Lettr. Cl. d. Medec.*, 1950, 79.
13. A. Kaliciński, *Pol. Tyg. Lek.* 7, nr 46, 1952.
14. M. Żydowo i M. Górski, *Pol. Tyg. Lek.* 8, nr 44, 1953.


http://rcin.org.pl

## ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ КРОВИ С ПОМОЩЬЮ СОДЕРЖАНИЯ АЗОТА И НЕКОТОРЫХ ФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

### Резюме

Для характеристики белков сыворотки здоровых людей были применены четыре свойства, а именно: содержание азота, коэффициент рефракции, удельный вес и вязкость. Принято, что эти свойства имеют постоянное значение для водных растворов не белковых веществ сыворотки здоровых людей и это позволило так составить уравнения из этих величин, что зная одну из них можно вычислить три остальные. Это было проверено на серии девяти сывороток с различной концентрацией белка.

В дискуссии сравнены числовые результаты дающие характеристику крови в разных физиологических состояниях.

## CHARACTERIZATION OF SERUM PROTEINS IN HUMAN BLOOD BY NITROGEN CONTENT AND CERTAIN PHYSICAL PROPERTIES

### Summary

For characterizing proteins in the serum of healthy humans four properties were utilized, namely: its nitrogen content, refractive index, specific gravity and viscosity. The assumption that these properties are constant for aqueous solutions of nonprotein substances of healthy human serum, made it possible to establish equations linking these properties so, that from one of them the remaining three may be calculated. This assumption was tested on a series of 9 serums with varying protein concentration. The calculated results characterizing the blood serums in various physiological conditions are compared and discussed.

http://rcin.org.pl

http://rcin.org.pl

ACTA BIOCHIMICA POLONICA
VOL. I 1954 NO 1

A. DMOCHOWSKI I HALINA PADZIK

# ILOŚCIOWE OZNACZANIE ADENINY I GUANINY W ŁUSKACH ŁUSZCZYCY *(PSORIASIS VULGARIS)*

*Z Zakładu Biochemii Uniwersytetu Łódzkiego*
*Kierownik: prof. dr A. Dmochowski*

## Wstęp

Zakład Biochemii UŁ od dłuższego czasu prowadzi prace mające na celu podanie chemicznych dowodów wirusowej etiologii łuszczycy.

Niezwykle szybki rozwój wykwitów skórnych w postaci ogromnej ilości łusek od dawna wzbudzał zainteresowanie nie tylko dermatologów, ale i biochemików. Większość dotychczasowych prac dotyczyła jednak przeważnie metabolizmu azotowego, węglowodanowego, lipidowego i sterydowego, ze szczególnym uwzględnieniem zmian w poziomie tych składników we krwi chorych na łuszczycę.

Liczne są prace nad składem chemicznym łusek, dotyczące oznaczania najpospolitszych składników organicznych i nieorganicznych; wyczerpujące piśmiennictwo zostało podane w najnowszej monografii Zorna (1).

Wszystkie te prace nie dały, niestety, prawie żadnych wskazówek co do etiologii i patogenezy schorzenia, zaliczanego do jednego z najstarszych chorób świata, a wykazującego wyraźny związek z drugim, niemniej tajemniczym schorzeniem — przewlekłym gośćcem stawowym (Zorn).

Fakt utraty bardzo znacznych ilości białka (do 30 g i więcej na dobę), bez żadnych oznak odbiałczenia organizmu przez całe lata, nasuwał przypuszczenie ingerencji czynników niezwykle silnie wzmagających produkcję ciał białkowych. Czynnikiem takim mogłaby być bezpośrednia lub pośrednia produkcja białek wirusowych, a analogii można by szukać w masowej produkcji (również dziesiątków gramów na dobę) tzw. białka Bence'a-Jonesa chorych z objawami szpiczaka mnogiego *(Myeloma multiplex)*. Wielu badaczy skłania się do wirusowej hipotezy etiologii tego charakterystycznego nowotworu szpiku kostnego.



http://rcin.org.pl

Wirusowa etiologia łuszczycy ma również licznych zwolenników (np. Krawczenko (2) jest zdania, że nie ma ani jednego dowodu przeczącego tej hipotezie). Należy jednak dodać, że poza obserwacjami ciałek wtrętowych, jak np. ostatnio prace Higoumenakisa (3), Kryczewskiego (4) — żadnych dowodów na korzyść tej hipotezy nie dostarczono. Bardzo przekonywające obserwacje ciałek wtrętowych w naskórku wykwitów łuszczycy podał ostatnio Łoza (5).

Wobec znanego udziału nukleoprotein w budowie wirusów roślinnych i zwierzęcych nasunęła się myśl stwierdzenia i oznaczenia ilości nukleoprotein w łuskach łuszczycy i we krwi chorych na łuszczycę lub gościec stawowy.

Tego rodzaju badania są prowadzone obecnie w Zakładzie Biochemii UŁ, a zapoczątkowały je obserwacje Łozy (5), stwierdzające obecność w łuskach łuszczycy u chorych nie leczonych znacznych ilości fosforu całkowitego — średnio 270 mg% P, z tego nierozpuszczalnego w kwasach nukleoproteinowego 120 mg% P. Równoległe oznaczenia azotu purynowego łusek dały wartość średnią 165 mg% $N_p$, z tego we frakcji nukleoproteinowej, wynoszącej trzydzieści kilka procent ciężaru łusek — 120—130 mg% $N_p$.

W całej dostępnej nam literaturze nie znaleźliśmy żadnej wzmianki dotyczącej obecności tzw. ciał nukleinowych w łuskach; jedynie Zorn (1) znalazł nieprawdopodobne ilości kwasu moczowego, bo aż 306 mg%, nie oznaczając przy tym żadnych innych puryn.

Podobnie zawartość tzw. fosforu całkowitego aż do ostatnich czasów była podawana błędnie na 16 mg% $P_c$ (Zorn (6)); dopiero w 1951 r. została poprawiona przez tegoż autora na 259 mg% $P_c$ (1).

Ta luka w badaniach biochemicznych łusek skłoniła nas do podjęcia prac mających na celu dokładne oznaczenie ilości i jakości nukleoprotein łusek. Na wstępie należało uzupełnić stwierdzoną przez Łozę (5) obecność adeniny i guaniny w łuskach, dokładnym oznaczeniem ilości tych aminopuryn w celu skoordynowania danych na fosfor nukleinowy, azot purynowy nukleoprotein i wreszcie poszczególne puryny nukleoprotein łusek. Następnym etapem byłoby izolowanie i zbadanie poszczególnych nukleoprotein i ich komponentów — kwasów rybo- i dezoksyrybonukleinowych.

Niniejsza praca jest wstępem do dalszych ilościowych badań składu chemicznego łusek łuszczycy oraz krwi chorych na łuszczycę i gościec stawowy, a rezultatem jej jest pierwsze oznaczenie ilości obu aminopuryn, występujących w kwasach nukleinowych.

Z licznych metod oznaczania puryn obrano, licząc się z realnymi możliwościami, dawną makrometodę Krügera — Schittenhelma,

http://rcin.org.pl

Steudela (7) z modyfikacjami Dmochowskiego (8), opartą na kombinacji wytrącania puryn z hydrolizatorów w postaci związków miedziawych i srebrowych. Metoda ta jest uważana obecnie za przestarzałą wobec nowych, precyzyjnych mikrometod chromato-spektrofotometrycznych Chargaffa (9), Loringa (10), Smitha-Markhama (11) i innych, wreszcie enzymatycznej Kalckara (12); ma ona jednak pewne zalety, gdyż pozwala na preparatywne otrzymanie obu aminopuryn w znacznych ilościach i w stanie dostatecznej czystości, jak to wykazał Dmochowski (8) w badaniach nad purynami mięśni.

Wyniki otrzymane powyższą metodą wykazują błędy *in minus*, spowodowane stratami guaniny strącanej amoniakiem, prawdopodobnie nieco większymi niż adeniny, które jednak można skontrolować przez jednoczesne oznaczenie ilości całkowitego azotu purynowego w kolejnych etapach pracy.

Następne, ilościowe oznaczenia guaniny łusek zostały wykonane metodą mikrojodometryczną (Dmochowski, Panusz (13)), a częściowo spektrofotometryczną, adeniny zaś polarograficzną i spektrofotometryczną. Należy zaznaczyć, że wyniki oznaczenia zawartości adeniny były dość zgodne, natomiast guaniny bardzo wysokie, wysuwające konieczność dalszych badań metodą chromato-spektrofotometryczną, które to badania są w toku.

## Część doświadczalna i wyniki

Łuski chorych na łuszczycę, po dokładnym rozdrobnieniu i wysuszeniu w temperaturze 105°, w ilości $\approx$ 100 g poddano hydrolizie z 10—15-krotną ilością 5% $H_2SO_4$ w ciągu 8 godzin w temperaturze 100°. Dłuższy niż zwykle czas hydrolizy stosowano z powodu trudności rozgotowania materiału bogatego w lipidy. Po hydrolizie pozostawało $\approx$ 35% osadu; osad ten odsączano i przemywano, a z zobojętnionego i lekko zakwaszonego przesączu wytrącano puryny w postaci związków miedziawych, metodą Steudela-Dmochowskiego (8) dodając nadmiar $NaHSO_3$ i powoli na gorąco 1% $CuSO_4$. Osady po przemyciu gorącą wodą rozkładano drobną ilością $Na_2S$, zakwaszano $H_2SO_4$, gotowano do usunięcia $H_2S$ i odsączano siarczki miedzi (kontrola na zawartość azotu). Następnie roztwory siarczanów puryn i ewentualne oksypuryny celem zupełnego oczyszczenia wytrącano jeszcze dwukrotnie i rozkładano siarkowodorem; ostatni przesącz użyto do oznaczania guaniny i adeniny lub raz jeszcze wytrącano puryny zawiesiną $Ag_2O$ albo nasyconym roztworem $Ag_2SO_4$. Sole srebra amino- i oksypuryn rozkładano na gorąco ln HCl; po kilku godzinach odsączano, a w przesączu zawierającym chlorowodorki puryn oznaczano ilościowo adeninę i guaninę. W tym celu roztwór, po oznaczeniu całkowitego $N_p$ metodą

http://rcin.org.pl

Kjeldahla w modyfikacji Markhama (14), zagęszczano i zadawano stężonym roztworem amoniaku w celu wytrącenia guaniny; po kilkunastu (kilkudziesięciu) godzinach wypadał biały, watowaty osad guaniny, przy czym początkowo opadał często galaretowaty osad o nikłej zawartości azotu (1,77 mg% N), w którym stwierdzono obecność magnezu (Panusz nieopublikowane).

Osad guaniny przemyto rozcieńczonym roztworem $NH_3$ i oziębioną wodą, wreszcie rozpuszczono w 0,1 n NaOH, przy czym rozpuszczeniu uległa tylko guanina i ewentualnie moczan sodowy. Zagęszczony alkaliczny roztwór zakwaszano 2% $CH_3COOH$ — wytrącała się powoli guanina, a w przesączu pozostawało nieco kwasu moczowego, jak to wskazywała dodatnia reakcja Folina.

Wytrąconą guaninę ważono i analizowano na zawartość azotu; otrzymana guanina była zupełnie czysta i zawierała 47% azotu (teoretycznie 46,36% N), a dodatkowe oznaczenie jodometryczne dało w wyniku 10,03 mg zamiast odważonej ilości 10,37 mg. Otrzymaną guaninę przeprowadzano

Tablica 1

Zawartość guaniny i adeniny w poddanych hydrolizie łuskach łuszczycy różnego pochodzenia. Hydroliza 5% kwasem siarkowym w ciągu 8 godzin. Guanina wytrącona roztworem amoniaku, rozpuszczona w 0,1 n NaOH i strącona rozcieńczonym $CH_3COOH$, następnie adenina wytrącona w postaci pikrynianu.

| Nr | Typ łusek | Ilość łusek użyta do hydroliny w g | Ilość pikrynianu adeniny w mg% | Azot adeniny w mg% | Ilość guaniny w mg% | Azot guaniny w mg% | Stosunek molowy aden.: guan. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | łuski świeże różne | 90 | 336,6 | 64,15 | 158,1 | 73,2 | 1 : 1,14 |
| 2 | łuski 2-tygodniowe „różne" | 100 | 217,4 | 41,82 | 108,0 | 50,0 | 1 : 1,20 |
| 3 | łuski świeże seria JJ/52 | 70 | 299 | 57,7 | 153 | 71 | 1 : 1,22 |
| 4 | seria JJ/52 | 80 | 269 | 51,7 | 146 | 68 | 1 : 1,3 |
| 5 | łuski kilkuletnie mieszane | 50 | 204 | 39,2 | 102,6 | 47,5 | 1 : 1,21 |

http://rcin.org.pl

jeszcze w charakterystyczny siarczan i chlorowodorek guaniny o wyglądzie kryształów. Przesącze, po wytrąceniu guaniny i usunięciu nadmiaru amoniaku, doprowadzano do wartości pH = 4 i strącano nasyconym roztworem pikrynianu sodowego. Osad pikrynianiu adeniny przekrystalizowano z wody, zważono i oznaczono temperaturę topnienia, która wyniosła 274—276° zamiast 280—281°. Ze wzoru $C_5H_5N_5 \cdot C_6H_3N_3O_7$ wyliczono zawartość adeniny i azot adeniny.

Otrzymane ilości guaniny i adeniny z różnych łusek zebrano w tablicy 1; — pierwsze dwa oznaczenia wykonano przez trzykrotne wytrącanie solą miedzi, trzy następne zaś przez dwukrotne solą miedzi, a następnie jednokrotne tlenkiem lub siarczanem srebra.

## Dyskusja nad wynikami

Zawartości adeniny i guaniny w łuskach łuszczycy, podane w niniejszej pracy, są pierwszymi oznaczeniami tego rodzaju w całym piśmiennictwie tego przedmiotu.

W doświadczeniu 1 ogólna ilość azotu w roztworze siarczanów puryn przed wytrąceniem guaniny wyniosła 170 mg% $N_p$; ilość azotu wydzielonej guaniny 73,2 mg% N, adeniny 64,15 mg% N — razem 137,35 mg% $N_p$. Wydajność wyniosła więc ponad 80%. Biorąc pod uwagę ewentualną obecność drobnych ilości kwasu moczowego oraz stwierdzonych śladów hipoksantyny, straty w oznaczeniu obu aminopuryn nie mogą być znaczne, a dotyczą raczej guaniny niż adeniny.

Należy zaznaczyć, że pomimo dodatniej reakcji mureksydowej i Folina w rozłożonych osadach miedziawych nigdy nie znaleziono nawet w przybliżeniu tak wielkich ilości kwasu moczowego, jakie podaje Zorn (1), a mianowicie 306 mg% — 102 mg% $N_p$. Żorn nie zanalizowawszy dokładnie osadu puryn, otrzymanych po hydrolizie łusek i strąceniu w postaci soli srebra, uznał ten osad na zasadzie dodatniej reakcji mureksydowej za kwas moczowy, nie sprawdzając go na obecność innych puryn. W rezultacie ogromne ilości kwasu moczowego w łuskach były dla niego zupełnie niezrozumiałe. Ostatnie wyniki otrzymane w Zakładzie Biochemii UŁ wykazują w różnych łuskach ilości kwasu moczowego nie przekraczające 20 mg%.

Znaczne ilości obu aminopuryn, szczególnie guaniny, rozstrzygają definitywnie o obecności nukleoprotein w łuskach łuszczycy, i to w dużych ilościach. Wyniki otrzymane obecnie potwierdzają poprzednie prace Łozy (5), oparte na oznaczeniach tzw. frakcji nukleoproteinowej, wyciąganej z łusek ługiem i strącanej kwasem, następnie fosforu, frakcji nierozpuszczalnej w kwasach, i azotu purynowego łusek całkowitych oraz nukleoprotein z tychże łusek.

http://rcin.org.pl

Okazało się, że znaleziona przez nas suma azotu obu aminopuryn (137 mg% $N_p$) jest dość zgodna z ilościami azotu purynowego frakcji nukleoprotein (130 mg% $N_p$) i fosforu nukleoproteinowego (125 mg% $P_n$), gdyż, jak wiadomo, stosunek $N_p$ : P w większości kwasów nukleinowych nie odbiega od stosunku 10 N : 4 P czyli 140 : 124. W dalszych pracach planowane jest oddzielne oznaczenie aminopuryn frakcji nukleoproteinowej łusek i pozostałości. Prawdopodobnie nie przyniosą one jednak zasadniczej zmiany w powyższych obliczeniach.

Azot adeniny w różnych łuskach wynosił 39 — 69 mg% N, guaniny — odpowiednio 47,5 — 73 mg% N, stosunek molarny adeniny do guaniny ($N_{ad}$ : $N_g$) wyniósł więc 1,15 — 1,3, wykazując wyraźną przewagę guaniny.

Znaczny nadmiar ilości guaniny skonstatowano od dawna w kwasie rybonukleinowym, w tzw. beta-nukleoproteidzie z trzustki zwierzęcej. Niektórzy autorzy, jak Jorpes (15), Dmochowski i Leszczyńska (nieopublikowane), znaleźli 2 mole guaniny na jeden mol adeniny, inni, jak np. Steudel (16), nawet 4 mole guaniny, a ostatnio Chargaff (17)) — 2,5 mola. Dopiero jednak Chargaff i jego szkoła stwierdził stały nadmiar guaniny we wszystkich kwasach rybonukleinowych tkanek zwierzęcych. Ostatnio Davidson (19) podaje liczbę 1,7 jako stosunek guaniny do adeniny kwasów rybonukleinowych różnych frakcji cytoplazmy wątroby szczura.

Znaleziona przez nas przewaga guaniny nad adeniną przemawia przeciw przypuszczeniu Łozy występowania w łuskach wyłącznie nukleoprotein dezoksyrybozowych. Kwasy dezoksyrybonukleinowe tkanek zwierzęcych wykazują w zasadzie przewagę adeniny nad guaniną (tzw. typ AT Chargaffa (18), odwrotnie jest u mikroorganizmów, natomiast np. równe ilości aminopuryn występują w bakteriofagach, a przewaga guaniny w wirusach owadzich (Smith i Wyatt (20)). W innych wirusach zwierzęcych stosunku guaniny do adeniny dotychczas nie oznaczono, ale z przytoczonych danych wynika, że w dalszych naszych pracach obie hipotezy, tj. przewagi rybonukleoprotein lub też obecności dezoksyrybonukleoprotein wirusowych w łuskach łuszczycy, muszą być brane pod uwagę.

Całe zagadnienie guaniny w łuskach nie jest jednak w zupełności wyjaśnione, gdyż dalsze oznaczenie jej metodą mikrojodometryczną i spektrofotometryczną wykazały znacznie większe ilości, a mianowicie 260 — 280 mg% zamiast znalezionej przez nas metodą wagową — 158 mg%. Nadmienić należy, że ilość adeniny oznaczonej spektrofotometrycznie i polarograficznie w Zakładzie Biochemii UŁ (Panusz — nie opublikowane) są dość zgodne z oznaczeniami wagowymi. Wysokie ilości guaniny mogą być jednak interpretowane odmiennie, jako możliwość występowania w nieoczyszczonej frakcji guaninowej innych związków wykazujących po-

http://rcin.org.pl

dobną absorpcję w nadfiolecie. Dla wyjaśnienia tych sprzeczności rozpoczęto już badania chromatograficzne, przemawiające, jak dotychczas, za tym ostatnim przypuszczeniem.

## LITERATURA


1. B. Zorn, Die Pathogenese des rheumatischen Syndroms im Lichte der Nebennierenrindenhormone, Jena 1951.
2. A. T. Krawczenko, *Mikrobiologja,* 19 (6), 516 (1950).
3. G. H. Higoumenakis, *Dermatol. Wchschr.,* 110 (15), 297 (1940).
4. A. Kryczewski i wsp., *Wiestnik Dermat. i Wener.,* 4, (1951).
5. E. Łoza, *Pol. Tyg. Lek.,* R. VIII nr 17 i 18 (1953).
6. B. Zorn, *Dermatol. Wchschr.,* 96(24), 821 (1953).
7. H. Steudel, Hoppe-Seyler, Thierfelder, Physiologische u. Pathologische Chemische Analyse, Berlin 1924, st. 875.
8. A. Dmochowski, *Acta Biol. Exptl.* IV (3), 51 (1929).
9. E. Chargaff, E. Vischer, *J. Biol. Chem.,* 176, 703 (1948).
10. H. S. Loring i wsp., *J. Biol. Chem.,* 197, 809 (1952).
11. J. D. Smith, D. Markham, *Biochem. J.,* 46, 50 (1950).
12. H. M. Kalckar, *J. Biol. Chem.,* 167, 429 (1947).
13. A. Dmochowski, H. Panusz, *Acta Biochimica Polonica,* 1 (1954).
14. R. Markham, *Biochem. J.,* 36, 790 (1942).
15. E. Jorpes, *Biochem. Z.,* 151, 529 (1924).
16. H. Steudel, *Z. Physiol. Chem.,* 241, 84 (1936).
17. E. Chargaff, *J. Biol. Chem.,* 176, 715 (1948).
18. E. Chargaff, *Experientia,* 6, 201 (1950).
19. J. N. Davidson, *Biochem. J.,* 54, (1953).
20. J. D. Smith, G. R. Wyatt, *Biochem. J.,* 49, 144 (1951).


## КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АДЕНИНА И ГУАНИНА В ЧЕШУЯХ ЧЕШУЙЧАТОГО ЛИШАЯ (*PSORIASIS VULGARIS*)

### Резюме


1. В первые были определены количества гуанина и аденина в чешуях чешуйчатого лишая при помощи макрометода Стеуделя разделения и определения аминопуринов тканей; найдены довольно большие колебания в чешуях разного происхождения.

2. Количество азота гуанина составляло 47,5 — 73,2 мг %, аденина же соответственно 40 — 64,15 мг %. Мольное отношение гуанина к аденину в чешуях составляло 1,15 — 1,3, притом так гуанин, как пикрат аденина были достаточно чистыми.

3. Вопреки данным Зорна в чешуях было найдено в 10 — 20 раз меньшее количество мочевой кислоты.


http://rcin.org.pl

4. Из разных количеств гуанина определенных весовым, падометрическим и́ спектрофотометрическим путем следует необходимость дальнейших хроматографических исследований.

5. Значительные количества гуанина и аденина подтверждают гипотез о наличии нуклеопротеидов в чешуях чешуйчатого лишая; найденные же количества аминопуринов довольно хорошо согласуются с количествами фосфора нуклеопротеидов и азота пуринов изолированных нуклеопротеидов.

## QUANTITATIVE DETERMINATION OF ADENINE AND GUANINE IN THE SCALES OF *PSORIASIS VULGARIS*


### Summary

1. The quantities of guanine and adenine in the scales of *Psoriasis vulgaris* have been determined for the first time by Steudel's macromethod of dividing and determining tissue aminopurine; the quantities varied in scales of different origin.
2. Nitrogen in guanine amounted to 47,5 — 73,2 mg%, in adenine 40 — 64,15 mg% respectively. In the scales the molar ratio of guanine to adenine was 1,15—1,3 and the guanine as well as the adenine picrate were sufficiently pure.
3. The quantity of uric acid found in the scales was 10 — 20 times lower than in Zorn's statement.
4. Different quantities of guanine found by weight determination, the iodometric method or spectrophotometrically necessitate further chromatographic studies.
5. Considerable quantities of guanine and adenine corroborate the hypothesis assuming the presence of nucleoproteins in *Psoriaris scales* and the quantities of aminopurines formed are almost in agreement with the quantities of nucleoprotein phosphorus and purine nitrogen obtained from isolated nucleoproteins.


*Department of Biochemistry, Łódź University, Chief: prof. dr A. Dmochowski.*

http://rcin.org.pl

ACTA BIOCHIMICA POLONICA
VOL. I 1954 NO 1

A. DMOCHOWSKI, H. PANUSZ

# MIKROJODOMETRYCZNA METODA OZNACZANIA GUANINY

*Z Zakładu Biochemii Uniwersytetu Łódzkiego*

*Kierownik: prof. dr A. Dmochowski*

Zagadnienie ilościowego oznaczania dwóch purynowych składników kwasów nukleinowych — adeniny i guaniny — ma duże praktyczne znaczenie w badaniach ilościowych nad składem i chemizmem kwasów nukleinowych i ich pochodnych. Zbliżony charakter chemiczny powodował od początku duże trudności i dopiero w ciągu ostatnich kilku lat opracowano metody rozwiązujące w sposób zadowalający ten problem. Przez długi czas rozdzielano adeninę od guaniny dzięki znacznie mniejszej rozpuszczalności guaniny w amoniaku według metody opracowanej ostatecznie przez Steudela (1). Po strąceniu guaniny roztworem amoniaku w przesączu oznaczano azot purynowy adeniny. W latach trzydziestych ukazało się kilka prac, w których wykorzystano większą podatność guaniny na utlenianie (2, 3, 4). Pewne usługi oddała również w tym czasie metoda enzymatyczna Schmidta (5), polegająca na selektywnej dezaminacji guaniny, nie dająca jednak gwarancji zupełnej selektywności.

Rzeczywiste rozwiązanie zagadnienia nastąpiło z chwilą zastosowania przez Vischera i Chargaffa chromatografii bibułowej do rozdzielania składników kwasów nukleinowych (6). W metodzie tej znaleziono również po raz pierwszy względnie prosty sposób rozdzielania składników pirymidynowych. Umiejętny dobór rozpuszczalników i wartości pH pozwolił na izolowanie poszczególnych zasad purynowych i pirymidynowych (7). Chromatogramy bibułowe miały jednak zbyt małą wydajność rozdzielczą, by rozdzielone składniki móc oznaczyć metodami klasycznymi. Autorzy uciekli się tu do oznaczeń spektrofotometrycznych, wykorzystując znaną od dawna (8, 9) charakterystyczną absorpcję związków purynowych w nadfiolecie (240 — 270 μ m). Spektrofotometria pozwoliła również na oznaczenie dwóch składników purynowych lub pirymidynowych obok siebie bez ich uprzedniego rozdzielania (10). Zmiany absorpcji w nadfiolecie po selektyw-



http://rcin.org.pl

nej dezaminacji enzymatycznej wykorzystał również Kalckar w swej metodzie z r. 1946 (11). Ostatnio chromatografię bibułową wypiera powszechnie chromatografia kolumnowa. Kompletny przegląd literatury z tego zakresu znajduje się w artykule Moor'a i Steina w *Annual Review of Biochemistry* z r. 1952. Uzupełnieniem metod analitycznych puryn i pirymidyn jest polarograficzna metoda oznaczania adeniny (12, 13).

Wszystkie wymienione wyżej metody wymagają jednakże nowoczesnej aparatury, niedostępnej dla większości pracowni biochemicznych. Jedyną klasyczną metodą analityczną, której czułość dorównywałaby badaniom spektrofotometrycznym i polarograficznym — jest jodometria.

Zjawisko selektywnej zdolności utleniania guaniny i ksantyny jodem, w odróżnieniu od niewrażliwych na jego działanie adeniny i hipoksantyny, zaobserwował po raz pierwszy Grynberg (4), pracując nad oznaczaniem nukleotydów purynowych. Wyzyskał on klasyczną metodę oznaczania cukrów Willstaettera i Schudela (14), oznaczając nią uwolnioną przez hydrolizę nukleozydów rybozę. Wyniki oznaczeń adenozyny otrzymał zupełnie prawidłowe, natomiast zużycie jodu przez guanozynę było znacznie wyższe od przewidywanego. Nasunęło to przypuszczenie, że jod zużywany jest — poza rybozą — przez uwolnioną w trakcie hydrolizy guaninę. Badania Grynberga przeprowadzone na czystych zasadach purynowych dowiodły, że istotnie guanina i ksantyna zużywają jod w stosunku 2 mole jodu / 1 mol puryny, natomiast adenina i hipoksantyna są w tych warunkach niewrażliwe na utlenianie. Kwas moczowy zużywał jod w stosunku niższym: 1 mol/1 mol. Klein (15) stwierdził, że hipoksantyna jest jednak zdolna do wiązania jodu, ale w ilości 8 razy mniejszej od guaniny. Dmochowski po sprawdzeniu przeliczeń Kleina ocenia tę zdolność na 12 razy mniejszą od guaniny. Z badań Grynberga wynikało, że jeden ml 0,1 n jodu odpowiada: 3,78 mg guaniny, 3,805 mg ksantyny i 8,41 mg kwasu moczowego. Stwierdził on ponadto, że guanina i ksantyna w postaci związanej (nukleotydy itp.), nie dają się utleniać podjodynem. Metoda jodometryczna pozwala więc na oznaczenie wolnej i związanej guaniny w mieszaninie.

Widoczna z danych Grynberga czułość metody zachęciła Dmochowskiego i współpracowników (6) do zastosowania jej przy oznaczaniu guaniny mięśni. Strącali oni puryny kilkakrotnie tlenkiem miedziowym wg Krügera i Schmidta (17) lub raz tlenkiem miedziowym i raz tlenkiem srebra (18) i po rozłożeniu osadu oznaczali guaninę jodometrycznie. Wyniki sprawdzali, dodając do tkanek określone ilości guaniny. Otrzymano wyniki prawidłowe. Metoda jodometryczna nadawała się więc do oznaczania guaniny w tkankach i pozwoliła na oznaczanie jej w próbkach o zawartości od 0,5 do 1 mg guaniny.

http://rcin.org.pl

Dokładność metody rokowała nadzieję możliwości opracowania mikrometody. W pracy obecnej podaje się tok postępowania, pozwalający na oznaczanie guaniny w ilościach 30 — 60 μ g, wymaganych również do normalnych oznaczeń spektrofotometrycznych. Zasadniczy schemat, podany przez Grynberga, stosowany również przez Dmochowskiego i współpracowników oraz Rabanowską (19), przedstawiał się następująco: do roztworu zawierającego guaninę dodawano dwukrotny — w stosunku do przewidywanego zużycia — nadmiar jodu, całość alkalizowano, odstawiano na kilkanaście minut, zakwaszano $H_2SO_4$ i miareczkowano nadmiar jodu tiosiarczanem sodowym. Równocześnie miareczkowano ślepą próbę nie zawierającą guaniny. Z różnicy zużycia jodu w próbie badanej i ślepej wnioskowano o zawartości guaniny.

Zestawienie warunków doświadczenia stosowanych w dotychczasowych oznaczeniach jodometrycznych

| Warunki reakcji | Grynberg (4) | Dmochowski, Zajdenman, Rabanowska (16) | Rabanowska (19) |
|---|---|---|---|
| Ilość guaniny użyta w doświadczeniu w mg | 10 — 40 | 3 — 10 | 0,5 — 1 |
| Normalność dodawanego roztworu jodu n | 0,1 | 0,1 | 0,01 |
| Normalność dodawanego roztworu jodu na początku reakcji n | 0,252 | 0,05 | 0,005 |
| Normalność roztworu jodu w końcu reakcji n | 0,012 | 0,025 | 0,0025 |
| Sposób alkalizacji | 0,1 n NaOH 2 razy tyle co J | 20% NaOH kroplami do słomkowego zabarwienia | |
| Czas reakcji w min. | 10 — 15 | 15 | 15 |
| Normalność roztworu tiosiarczanu sodowego | 0,1 | 0,1 | 0,01 |

## Część doświadczalna

Przy opracowywaniu mikrometody należało przed ustaleniem warunków reakcji guaniny z jodem sprawdzić, w jaki sposób alkalizacja, zakwaszenie i czas wpływają na wyniki miareczkowania ślepej próby.

### A. WPŁYW WARUNKÓW REAKCJI NA OZNACZANIE ŚLEPEJ PRÓBY

Celem doświadczeń było stwierdzenie, czy rozmaite sposoby alkalizacji, zakwaszenia i zmienny czas odstawienia nie powodują — np. przez zwiększenie ulatniania się jodu — błędów w oznaczaniu ślepej próby.



http://rcin.org.pl

*a) Wpływ alkalizacji środowiska*

Do 0,2 ml ≈ 0,02 n jodu dodawano zmienne ilości wodorotlenku sodowego, odstawiano na czas 2 min — 60 godz., zakwaszano 1 n $H_2SO_4$ (≈ 0,1 ml nadmiaru) i miareczkowano 0,005 n tiosiarczanem sodowym wobec ≈ 0,05 ml 1% skrobi.

| L. p. | Sposób alkalizacji | Czas do chwili zakwaszenia | O, ml zużytego tiosiarczanu sodowego | Wnioski |
|---|---|---|---|---|
| 1 | O, ln NaOH do barwy słomkowej | 2 min. | ,899 — ,920 — ,920 | Już przy słomkowym zabarwieniu straty jodu, nawet po 60 godzinach są niedostrzegalne |
| 2 | ,, | 20 min. | ,922 — ,928 — ,920 | |
| 3 | ,, | 1 godz. | ,920 — ,923 — ,930 | |
| 4 | ,, | 60 godz. | ,918 — ,924 — ,920 | |
| 5 | 0,5 ml 2n NaOH | 1 godz. | ,913 — ,920 — ,921 | Nadmiar NaOH pozostaje bez wpływu |
| 6 | ,, ,, ,, ,, | 60 godz. | ,913 — ,904 — ,908 | |

*b) Wpływ zakwaszania*

| L. p. | Sposób alkalizacji | Czas min. | Sposób zakwaszania | O, ml zużytego tiosiarczanu sodowego | Po dodaniu nadmiaru kwasu zuż. Na |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 0,5 n NaOH do odbarwienia | 2 | niedomiar kwasu | ,675 — ,379 — ,385 | ,234 — ,517 — ,528 |
| 2 | ,, | 20 | ,, | ,881 — ,832 — ,561 | ,044 — ,085 — ,346 |
| 3 | ,, | 10 | 2 ml ln kwasu | ,900 — ,912 — ,918 | — |
| 4 | ,, | 10 | 2 ml 2 n ,, | ,908 — ,905 — ,918 | — |
| 5 | 0,1 ml 40% NaOH | 10 | nadmiar stęż. $H_2SO_4$ | ,912 — ,922 — ,897 | — |

Wnioski: niedomiar kwasu powoduje wydzielanie się jedynie części jodu z podjodynu (1). Po dodaniu nadmiaru kwasu reszta jodu wydziela się bez strat. Nadmiar kwasu nie wpływa na wyniki miareczkowania. Zakwaszanie stężonym $H_2SO_4$ jest jednak nie wskazane, gdyż ogrzanie roztworu może spowodować straty jodu.

*c) Wpływ temperatury*

0,2 ml 0,02 n jodu alkalizowano 0,1 ml 0,5 n NaOH. Połowę próbek wstawiano do termostatu o temp. 50°, resztę pozostawiano w temperaturze pokojowej. Wyniki miareczkowania:

http://rcin.org.pl

| Temperatura °C | Czas do chwili zakwaszenia | O, ml tiosiarczanu sodowego | Wnioski |
|---|---|---|---|
| 20 | 5 min. | ,920 — ,913 — ,912 | Krótkie utrzymywanie wyższej temperatury powoduje b. nieznaczne straty jodu, po 4 godz. straty te są jednak b. wyraźne. |
| 20 | 20 min. | ,908 — ,916 — ,921 | |
| 20 | 4 godz. | ,917 — ,916 — ,905 | |
| 50 | 5 min. | ,895 — ,908 — ,905 | |
| 50 | 20 min. | ,907 — ,907 — ,910 | |
| 50 | 4 godz. | ,872 — ,871 — ,868 | |

### *d) Moment dodania wskaźnika*

Ponieważ dodany wskaźnik stanowił bardzo znaczny procent składu roztworu, sprawdzono, czy moment jego dodania ma wpływ na miareczkowanie. Dodając do używanej w a — d ilości jodu kroplę 1% roztworu skrobi:

na początku miareczkowania zużyto 0,921 —, 920 —, 915 ml $Na_2S_2O_3$;

pod koniec miareczkowania zużyto 0,905, 927 —, 920 ml $Na_2S_2O_3$.

Moment dodania skrobi pozostaje więc bez widocznego wpływu.

### *e) Czułość metody*

Miareczkowanie ślepych prób wykazało jednocześnie granice czułości wskaźnika i dokładności naczyń miarowych. Okazało się, że całkowity zanik barwy następuje pod wpływem ostatnich 0,002 ml roztworu tiosiarczanu sodowego, co pozwala na ograniczenie błędu miareczkowania do 1%. Odmierzając roztwór guaniny Schelbachowską pipetą kapilarną poj. 0,1 ml, pozwalającą na dokładność ± 0,0003 ml i roztwór jodu — mikropipetą poj. 0,250 ml z zakończeniem kapilarnym, można błędy popełniane przy odmierzaniu roztworów sprowadzić również poniżej 1%.

## B. WPŁYW ŚRODOWISKA, CZASU I TEMPERATURY NA REAKCJE UTLENIANIA GUANINY PODJODYNEM

### *a) Wpływ stężenia jodu*

Używano do oznaczeń: 0,1 ml roztworu wzorcowego guaniny [1]) zawierające 46,1 μg, 0,2 ml 0,02 n jodu i 0,1 ml 0,5 n NaOH. Całość rozcieńczano wodą uzyskując odpowiednie stężenie jodu.

---

[1]) $C_5H_5ON_5.HCl.2H_2O$ Eastman, Kodak. Zawartość guaniny we wzorze sprawdzono oznaczając azot mikrometodą Kieldahla.

http://rcin.org.pl

| Czas reakcji | Znaleziono μg guaniny przy stężeniu początkowym jodu | | |
|---|---|---|---|
| | 0,007 — n | 0,0035 — n | 0,00175 — n |
| 10 min. | 46,8 — 45,1 — 46,6 | 31,5 — 35,2 — 35,0 | 20,8 — 17,0 — 21,3 |
| 15 min. | 48,1 — 46,6 — 48,4 | | |
| 20 min. | 52,0 — 47,7 — 47,3 | | |
| 30 min. | 47,8 — 48,9 — 48,3 | | |
| 1 godz. | 50,1 — 49,9 — 49,1 | | |
| 2 godz. | | 44,4 — 40,4 — 45,3 | 38,1 — 40,7 — 38,8 |
| 48 godz. | | 46,1 — 47,3 — 46,8 | 44,8 — 46,0 — 46,6 |

Jak wynika z tablicy, rozcieńczanie roztworu poważnie zwalnia reakcję. Początkowe stężenie jodu nie powinno być słabsze od 0,007 n.

*b) Wpływ alkalizacji środowiska*

Do oznaczeń użyto: 0,1 ml roztworu guaniny (= 50,5 μg), 0,2 ml 0,02 n jodu i 0,1 ml NaOH o zmiennym stężeniu. Próbki odstawiano na 15 godzin w temperaturze pokojowej, następnie zakwaszano niewielkim nadmiarem 2 n $H_2SO_4$ i miareczkowano 0,005 n tiosiarczanem sodowym wobec skrobi. Wyniki były zupełnie nieoczekiwane. W miarę wzrostu stężenia wodorotlenku sodowego reakcja zachodziła dalej, przebiegając przy dodawaniu 40% NaOH w stosunku stechiometrycznym 3 mole jodu / 1 mol guaniny. Użyty w doświadczeniach 0,5 n wodorotlenek sodowy stwarzał silniej alkaliczne środowisko od stosowanego przez Grynberga, Dmochowskiego i współpracowników czy Rabanowską, co — jak wynika z poniższej tablicy — umożliwiało dalszy przebieg reakcji.

| Stężenie dodanego NaOH % | Stęż. NaOH w czasie reakcji % | Znaleziono μg guaniny, zakładając stosunek molowy jodu do guaniny | |
|---|---|---|---|
| | | 2 : 1 | 3 : 1 |
| 2,5 | 0,6 | 56,6 — 56,1 — 57,0 | 37,8 — 38,0 — 37,4 |
| 5 | 1,25 | 66,8 — 65,8 — 66,3 | 44,6 — 43,9 — 44,2 |
| 10 | 2,5 | 70,1 — 69,1 — 66,4 | 46,7 — 46,1 — 44,3 |
| 20 | 5 | 72,6 — 71,0 — 71,9 | 48,4 — 47,3 — 48,0 |
| 30 | 7,5 | 73,3 — 72,4 — 73,6 | 48,8 — 48,3 — 49,0 |
| 40 | 10 | 74,1 — 75,1 — 75,6 | 49,4 — 50,0 — 50,4 |

Wyniki dalszych badań nad wpływem alkalizacji środowiska na przebieg reakcji utlenienia guaniny ujęto orientacyjnie w postaci wykresu (wy-

http://rcin.org.pl

kres 1). Wynika zeń jasno, że reakcja utleniania guaniny podjodynem przebiega w dwóch odrębnych fazach: pierwsza połączona jest z redukcją dwóch cząsteczek jodu i zachodzi ilościowo w krótkim czasie 15 — 30 min., nawet w bardzo słabo alkalicznym środowisku. Druga, odpowiadająca zużyciu trzeciej cząsteczki jodu, jest ściśle zależna od stężenia wodorotlenku sodowego. W środowisku 10% NaOH zachodzi ilościowo już po 1,5 godz., w mniejszych stężeniach NaOH nie przebiega ilościowo nawet po upływie 15 godzin. Prawidłowe wyniki oznaczeń guaniny można więc otrzymać bądź stosując 0,1 n NaOH (lub słabszy), zakwaszając po upływie 15 — 60 min. i wyliczając według stosunku 2 : 1, bądź stosując 40% NaOH, czas reakcji dłuższy niż 60 min. i wyliczając wg stosunku 3 : 1. W celu potwierdzenia tych wniosków przeprowadzono dalsze doświadczenia.

*c) Wpływ podwyższonej temperatury*

Celem sprawdzenia, czy reakcja nie zachodzi w jeszcze wyższym niż 3 : 1 stosunku molowym, jeśli umieścimy roztwór o stężeniu NaOH 10% w temp. 50°, wykonano doświadczenie, w którym do 0,1 ml wzorca guaniny (50,5 μ g) dodawano 0,20 ml 0,02 n jodu, 0,1 ml 40% NaOH (stężenie w czasie reakcji 10%) i wstawiano próbkę do termostatu o temp. 50° na czas zmienny, po czym zakwaszano roztwór 2 n $H_2SO_4$ i miareczkowano 0,005 n tiosiarczanem sodowym. Wyniki miareczkowania zestawiono w poniższej tablicy:

| μg guaniny w próbce | Czas reakcji | Zużyto 0, ml tiosiarczanu sodowego | $\Delta_2$ 0, n | Znaleziono μg guaniny wg stos. molowego | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 2 : 1 | 3 : 1 |
| śl. próba | 4 godz. | 863 | | | |
| 50,5 | 4 „ | 466 | 391 | 75,0 | 50,0 |
| śl. próba | 8 „ | 865 | | | |
| 50,5 | 8 „ | 471 | 394 | 75,5 | 50,3 |
| śl. próba | 15 „ | 835 | | | |
| 50,5 | 15 „ | 463 | 372 | 71,4 | 47,7 |

Sprawdzono ponadto przebieg reakcji w środowisku jeszcze silniej alkalicznym — 16% NaOH, dodając: 0,1 ml wzorca guaniny (50,5 μg) 0,2 ml jodu i 0,2 ml 40% NaOH w temp. 50° i czasie reakcji 26 godzin. Stwierdzono: 46,1 — 44,1 — 43,0 μg guaniny.

Doświadczenia te wykazały, że nawet w warunkach skrajnych reakcja nie zachodzi dalej niż w stosunku molowym 3:1.

http://rcin.org.pl

*d) Ustalenie najkrótszego czasu reakcji*

Używano 0,1 ml wzorca (50,5 μg), 0,2 ml jodu i 0,1 ml 40% NaOH w temperaturze pokojowej.

| Czas reakcji w min. | Stwierdzono μg guaniny wg stos. mol. 3 : 1*) | Czas reakcji w min. | Stwierdzono μg guaniny wg stos. mol. 3 : 1*) |
|---|---|---|---|
| 12 | 43,5 | 40 | 50,1 |
| 15 | 47,5 | 100 | 50,4 |
| 20 | 46,1 | 120 | 50,2 |
| 25 | 46,9 | 300 | 50,3 |

*) Podane wyniki są średnimi z 3—4 oznaczeń.

Reakcja przebiega ilościowo w temperaturze pokojowej już po 40 min. Celem uzyskania pewnych i dokładnych wyników należy ją jednak prowadzić w ciągu 1,5 — 2 godz.

C. DZIAŁANIE PODJODYNU NA ADENINĘ

Nowe ujęcie metody i zastosowanie silnie alkalicznego środowiska wymagało sprawdzenia, jak się w tych warunkach zachowuje adenina. W tym celu do 0,1 ml roztworu wzorcowego adeniny (= 98,0 μg) dodawano 0,2 ml 0,02 n jodu i 0,1 ml 40% NaOH. Po zmiennym czasie roztwór zakwaszano 1 n $H_2SO_4$ i wydzielony jod miareczkowano 0,005 n tiosiarczanem sodowym.

| t° | Czas reakcji | Użyto μg adeninv | Zużyto ml tiosiarczanu sodowego | $\Delta_2$ ml |
|---|---|---|---|---|
| 20 | 10 min. | śl. próba | 0,885 | |
| 20 | 10 ,, | 98,0 | 0,883 | + 0,002 |
| 20 | 15 godz. | śl. próba | 0,873 | |
| 20 | 15 ,, | 98,0 | 0,880 | — 0,007 |
| 50 | 15 ,, | śl. próba | 0,827 | |
| 50 | 15 ,, | 98,0 | 0,815 | + 0,012 |

Z podanego wyżej zestawienia wynika, że ani w temperaturze pokojowej, ani w temp. 50° adenina nie ulega praktycznie działaniu utleniającemu podjodynu. Nowe ujęcie warunków reakcji pozwala więc również na selektywne oznaczanie guaniny obok adeniny.

http://rcin.org.pl

D. TECHNIKA OZNACZANIA

0,1 ml badanego roztworu o zawartości 30—60 μg guaniny zadajemy w 5 ml naczyńku z korkiem (najlepiej doszlifowanym) 0,2 ml 0,02 n jodu i 0,1 ml 40% NaOH. Po dokładnym zmieszaniu naczyńko zamykamy i odstawiamy na przeciąg 1,5 — 2 godzin. Równocześnie nastawiamy próbę ślepą (jod + NaOH). Po upływie przewidzianego czasu obie próby zakwaszamy nieznacznym nadmiarem 2 n $H_2SO_4$ (ok. 0,8 ml) i miareczkujemy 0,005 n tiosiarczanem sodowym z mikrobiurety poj. 1 ml. Przy słomkowym zabarwieniu roztworu dodajemy kroplę 1% roztworu skrobi. Zawartość guaniny obliczamy z różnicy zużycia tiosiarczanu na próbę ślepą i właściwą 1 ml 0,005 n tiosiarczanu sodowego odpowiada 126 μg guaniny.

E. PRZYKŁAD OZNACZANIA GUANINY W TKANKACH

Metodę powyższą zastosowano do analizy składników purynowych, zawartych w łuskach łuszczycy.

Świeże łuski o znanym procencie wilgoci poddawano hydrolizie 1 n $H_2SO_4$ w temp. 100° w ciągu 4 — 8 godz. Roztwór przesączano (niezhydrolizowane resztki łusek nie dają się odwirować), resztki poddawano hydrolizie świeżym 1 n $H_2SO_4$ w ciągu 1 godz. Połączone przesącze doprowadzano do 0,5 n kwasu siarkowego i strącano puryny wg Kerra i współpracowników (10) jednomolarną zawiesiną $Ag_2O$ w wodzie. Osad puryn ekstrahowano 1 n HCl w temp. 100°. W ekstrakcie oznaczano azot purynowy metodą Markhama (20) oraz guaninę — jodometrycznie. W celu sprawdzenia dokładności metody przeprowadzono równocześnie podobne oznaczenia w hydrolizatach łusek z dodatkiem znanej ilości wzorca guaniny. Wyniki tych oznaczeń podano w poniższej tablicy:

| L. p. | Odważka analizowana g | Stwierdzono $N_p$ mg % | Stwierdzono guaniny z łusek mg % | Dodano μg wz. guaniny | Stwierdz. μg wz. guaniny | Średnia z ozn. |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 0,4 | 169,5 | 282,0 | 505 | 479 | 4 |
| 2 | 0,4 | 206,5 | 288,5 | 505 | 486 | 5 |
| 3 | 0,4 | 174,3 | 268,6 | 505 | 501 | 6 |
| 4 | 0,2 | 192,4 | 322,0 | — | — | 3 |
| 5 | 0,2 | 184,5 | 309,0 | 505 | 492 | 5 |

Nie ustalono, w jakim stopniu otrzymane ekstrakty były zanieczyszczone substancjami zawierającymi azot i wiążącymi jod. Kwas moczowy mógł występować najwyżej w bardzo małych ilościach, gdyż — co sprawdzono na roztworach wzorcowych — nie ulega on strąceniu w zastosowanej metodzie.

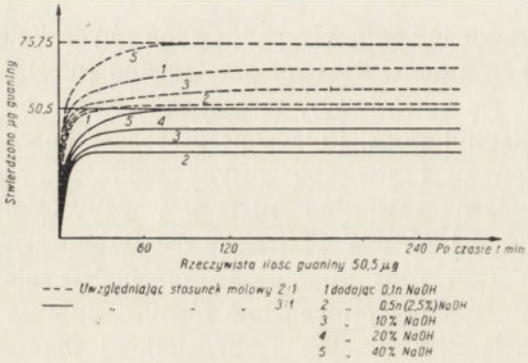
http://rcin.org.pl

Wyniki oznaczeń jodometrycznych zostały potwierdzone w drodze polarograficznego oznaczania adeniny i spektrofotometrycznego oznaczenia obu puryn w ekstrakcie. Wyniki tych oznaczeń zostaną podane w oddzielnej pracy.

## Dyskusja

Mechanizm utleniania guaniny podjodynem jest dziś jeszcze nie znany, mimo że prace Grynberga dostarczyły licznych przyczynków do jego poznania:

1) podjodyn nie działa na N-metylopochodne ksantyny — teofilinę, teobrominę i kofeinę; 2) również guanina związana z rybozą jest niewrażliwa na utlenianie; 3) podatność na utlenianie jest uzależniona od obecności grupy OH w położeniu 6 pierścienia purynowego; 4) kwas moczowy zużywa w środowisku słabo alkalicznym 1 zamiast 2 moli jodu. Również dotychczas opublikowane prace nad chemizmem utleniania i działania chlorowców na pochodne purynowe nie wystarczają do rozwiązania tego zagadnienia. Znamy produkty utlenienia guaniny nadmanganianem potasowym w środowisku alkalicznym i chloranem potasowym wobec stężonego kwasu solnego. Są nimi w pierwszym przypadku mocznik (21), kwas szczawiowy, $CO_2$ i $NH_3$ (22), w drugim kwas parabanowy, guanidyna, nieco ksantyny i mocznika (23). Pod wpływem bromu powstaje w temp. 150° 8-bromoguanina (24).




Wyniki naszych doświadczeń wykazały ponadto, że 1 mol guaniny ma ogólnie zdolność redukowania 3 moli jodu (w postaci podjodynu). Przebieg krzywych (wykres 1) wskazuje, że proces redukcji jodu składa się z dwóch zasadniczo odmiennych reakcji: pierwsza, zachodząca szybko już w słabo alkalicznym środowisku, pociąga za soba redukcję dwóch moli jodu. Druga, ściśle, zależna od stężenia jonów $OH^-$, w roztworach słabo alkalicznych przebiega nieskończenie wolno, zwiększając szybkość ze wzrostem stężenia wodorotlenku sodowego. Wykonane doświadczenia nie mogły wyjaśnić mechanizmu drugiej reakcji, jednak można przypuszczać, że jony $OH^-$ mają dwojaki wpływ na reakcję utlenienia 1) wpływają na potencjał utleniający podjodynu (na przejście podjodynu w jodan (25)); 2) przesuwają równowagę postaci tautomerycznych guaniny w kierunku postaci bar-

http://rcin.org.pl

dziej podatnej na utlenianie. Prawdopodobnie to drugie działanie jest decydujące przy redukcji trzeciego mola jodu. Fakt, że guanina jest zupełnie niewrażliwa na utleniające działanie jodu w środowisku kwaśnym, można by tłumaczyć całkowitym przesunięciem równowagi postaci tautomerycznych na korzyść odmiany niewrażliwej na utlenianie. W środowisku alkalicznym dwa stopnie reakcji przebiegają łatwo. Trzeci stopień utlenienia jest zależny od stężenia odpowiedniej postaci tautomerycznej, jednak przesunięcie równowagi ma miejsce dopiero w silnie alkalicznym środowisku. Stosunek stężeń obu postaci tautomerycznych jest ściśle zależny od stężenia jonów $OH^-$ i tym można sobie tłumaczyć jego decydujący wpływ na szybkość reakcji utlenienia. Ostateczne wyjaśnienie mechanizmu reakcji mogłoby nastąpić dopiero po zbadaniu produktów utlenienia.

Opisane doświadczenia nie podważają wyników poprzednich prac jodometrycznych (4, 16, 19). Jednak potencjalna zdolność guaniny do dalszego utleniania stwarza niebezpieczeństwo błędów, którego unika się stosując silnie alkaliczne środowisko.

## LITERATURA


1. H. Steudel, w *Hoppe Seyler*, Thierfelder, Physiologische u. Path.-Chemische Analyse, Berlin 1924, str. 875.
2. E. Jorpes, *Biochem. J.*, 28, 2097 (1934).
3. B. Robertson, *Austral. J. Exp. Biol. & Med. Sci.*, 6, 33 (1929).
4. M. Z. Grynberg, *Biochem. Z.*, 253, 143 (1932).
5. G. Schmidt, *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, 179, 243 (1947).
6. E. Vischer, E. Chargaff, *J. Biol. Chem.* 168, 781 (1947).
7. R. D. Hotchkiss, *J. Biol. Chem.*, 175, 315 (1948).
8. W. N. Hartley, *J. of. Chem. Soc.*, 87, 1796 (1905).
9. C. Dhéré, Recherches spectrographiques sur l'absorption des rayons ultra-violets par les albuminoides, les proteides et leurs dérivés, Fribourg 1909.
10. S. E. Kerr, K. Seraidarian, M. Wargon, *J. Biol. Chem.*, 181, 761 (1949).
11. H. M. Kalckar, *J. Biol. Chem.*, 167, 429, 445, 461 (1947).
12. J. C. Heath, *Nature* 4001, 23 (1946).
13. B. Filipowicz, W. Leyko, *Acta Physiol. Pol.*, Prace III Zjazdu, 264 (1952).
14. R. Willstaetter, G. Schudel, *Ber. d. D. Chem. Ges.*, 51, 780 (1918).
15. W. Klein, *Z. f. Physiol. Chem.*, 231, 125 (1935).
16. A. Dmochowski, A. Zajdenman, A. Rabanowska, *Biochem. Z.*, 279, 289 (1935), oraz w E. Bamann, K. Myrbäck, Meth. d. Fermentforschung t. 1, Leipzig 1941, str. 451.
17. M. Krüger, J. Schmidt, *Z. f. Physiol. Chem.*, 45, 1 (1905).
18. E. Salkowski, *Arch. Ges. Physiol.*, 69, 268 (1897-98).
19. A. Rabanowska, praca nieopublikowana (1939).
20. R. Markham, *Biochem. J.*, 36, 790 (1942).
21. Jolles, *J. für Prakt. Chem.*, (2) 62, 68 (1900).


http://rcin.org.pl

22. Kerner, *Lieb. Ann.*, 103, 251 (1857).
23. Strecker, *Lieb. Ann.*, 118, 155 (1861).
24. E. Ficher, Rease, *Lieb. Ann.*, 221, 342 (1883).
25. P. Pascal, Traitè de Chimie Minérale t. 1, Paris 1931, str. 720.

## МИКРОЙОДОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГУАНИНА

### Резюме

1. Был разработан микройодометрический метод определения гуанина в присутствии аденина, который дает возможность определения 30 — 60 μг гуанина в пробе.

2. Был исследован ход окисления гуанина с помощью гипоиодита и найдено, что в сильно основной среде реакция эта идет стехиометрически — 3 моля иода на 1 моль гуанина, в слабо же основной среде — 2 моля иода на 1 моль гуанина. Потому этот метод очень хорошо годится для определения гуанина в присутствии аденина.

3. Найдено, что аденин не чуствителен к окислительному действию гипоиодита даже в сильно основной среде.

4. Разработанный метод был применен к определению гуанина в чешуях чешуйчатого лишая. Результат составлял в среднем ок. 290% гуанина.

## METHOD OF MICRODETERMINATION OF GUANINE

### Summary

1. A micromethod for iodometric determination of guanine has been elaborated. It permits the determination 30 — 60μ g guanine beside adenine in a sample.
2. The process of oxydation of guanine by hypoiodine was studied. It was stated that in a strongly alkaline medium the reaction occurs at the stechiometric ratio: 3 mols iodine/1 mol guanine and in very lightly alkaline medium the ratio is 2 mols iodine/1 mol guanine. Therefore this method is well adapted to the determination of guanine in presence of adenine.
3. Adenine was found to be unsusceptible to oxydating influences of hypoiodine even in a strongly alkaline medium.
4. This method was applied to the determination of guanine in the sceles of *Psoriasis vulgaris* giving an average result of about 290 mg% guanine.

*Department of Biochemistry, Łódź University, Chief: prof. dr A. Dmochowski.*

http://rcin.org.pl

ACTA BIOCHIMICA POLONICA
VOL. I 1954 NO 1

I. REIFER, D. WOLSZLEGIER I ZB. KANIUGA

# NOWA METODA MIKROOZNACZANIA SKROBI W MATERIALE ROŚLINNYM

*Zakład Biochemii SGGW i Laboratorium Biochemiczne IUNG*
*Kierownik Zakładu: I. Reifer*

Wszystkie chemiczne metody ilościowej analizy skrobi polegają na jej rozkładzie przez hydrolizę kwasową lub enzymatyczną do cukrów redukujących w postaci glikozy lub maltozy.

W wyniku hydrolizy w środowisku kwaśnym obok skrobi rozkładowi ulegają również i inne związki, które następnie reagują z odczynnikami utleniającymi cukry proste. Z tego powodu wyniki analizy skrobi są na ogół o 3 — 4% wyższe od otrzymanych po hydrolizie enzymatycznej. Jeżeli analizowany materiał roślinny zawiera mało skrobi i dużo pentozanów, jak np. łupina ziarna kakaowego albo łuszczyna gorczycy, wtedy na skutek rozkładu pentozanów wyniki uzyskane dla skrobi po hydrolizie kwasowej mogą być 10- a nawet 20-krotnie wyższe (1).

Hydroliza enzymatyczna również nie zawsze daje jednoznaczne wyniki, ponieważ preparaty diastatyczne różnią się między sobą w zależności od surowca, z którego są przygotowane. Sullivan (2) wykazał, że handlowe preparaty diastazy nie są specyficzne i że tylko krystaliczna, chemicznie czysta amylaza może być stosowana bez zastrzeżeń do celów ilościowej analizy skrobi. Collin (3) udowodnił, że diastatyczna hydroliza skrobi w zasadzie nigdy nie przebiega ilościowo, w związku z czym proponuje on połączenie hydrolizy enzymatycznej z hydrolizą kwasową jako końcowy etap hydrolizy nierozszczepionej enzymatycznie skrobi. Handlowe preparaty diastazy zawierają ponadto znaczne ilości cukrów redukujących, które muszą być od preparatu enzymatycznego oddzielone przez strącenie czynnego białka alkoholem metylowym.

Reifer i Tarnowska (4) opracowali metodę ilościowego oznaczania skrobi rozpuszczalnej polegającą na jej utlenieniu nadjodanem potasowym w obecności dwuzasadowego fosforanu sodowego. W toku badań nasunęła się myśl opracowania oznaczenia skrobi w materiale roślinnym na



http://rcin.org.pl

zasadzie przekształcenia skrobi nierozpuszczalnej w skrobię rozpuszczalną w warunkach, w których inne substancje, ulegające rozkładowi wskutek hydrolizy kwasowej, pozostałyby nierozłożone. W ten sposób można by wyeliminować niedokładności wynikające z hydrolizy kwasowej i wydatnie skrócić czas hydrolizy skrobi do cukrów redukujących, która trwa od 2 — 3 godzin. Natomiast w metodzie nadjodanowej hydroliza i utlenianie skrobi rozpuszczalnej przebiegają równocześnie, a czas trwania całej analizy nie przekracza 30 minut.

W tym celu niezbędne było przebadanie i ustalenie następujących czynników: 1) znalezienie metody przekształcenia ilościowego skrobi nierozpuszczalnej w skrobię rozpuszczalną bez jej dalszego rozkładu na mniejsze fragmenty, jak dekstryny i cukry redukujące; 2) opracowanie metody odbiałczania materiału roślinnego bez adsorpcji skrobi rozpuszczalnej w osadzie; 3) opracowanie metody ilościowego strącania skrobi rozpuszczalnej. Z różnic oznaczeń nadjodanem w roztworach zawierających skrobię i w roztworach, w których skrobię oddzielono, można otrzymać liczbę redukcyjną, odpowiadającą ilości skrobi rozpuszczalnej w badanej próbie.

## Część doświadczalna

Wstępne analizy wykonano stosując skrobię rozpuszczalną, oczyszczoną przez dwukrotne strącenie z alkoholu i acetonu, którą następnie oznaczano metodą Reifera i Tarnowskiej (4). Współczynnik redukcji nadjodanowej obliczono na podstawie kontrolnych oznaczeń metodą żelazicyjankową Akiji i Iwatake (5) po uprzedniej hydrolizie skrobi kwasem solnym w ciągu 3 godzin (metoda Lintnera (10) ).

Z tablicy 1 wynika, że współczynnik dla skrobi rozpuszczalnej oznaczony metodą nadjodanową wynosi 58 [1]) i że przy stosowaniu tego współczynnika największa różnica między metodą kontrolną i nadjodanową nie przekracza ± 2,2% w ilościach do około 0,300 mg skrobi (patrz tabl. 1, lp. 9, gdzie w 360 mg materiału znajduje się około 0,300 mg skrobi). Ilość ml zużytego 0,005 n tiosiarczanu sodowego w próbie ślepej mniej ilość 0,005 n tiosiarczanu w próbie pełnej pomnożona przez 58 odpowiada ilości mikrogramów skrobi wyrażonej w glikozie. Nadjodan w alkalicznym roztworze dwuzasadowego fosforanu sodowego utlenia obok skrobi wiele innych związków, jak pentozany, cukry proste, aminokwasy, glikozaminy i inne. W celu oznaczenia skrobi rozpuszczalnej należy przeto oznaczyć całkowitą liczbę redukcyjną wszystkich substancji redukujących w badanej próbie łącznie ze skrobią, a jako ślepą próbę zastosować równoznaczną ilość tego samego roztworu, z którego skrobia rozpuszczalna została usunięta.

[1]) Reifer i Tarnowska podali współczynnik F = 70, ponieważ omyłkowo obliczyli wyniki dla skrobi powietrznie suchej, która zawierała 20% wody.

http://rcin.org.pl

Tablica 1

| L. p. | Metoda żelazicyjankowa po hydrolizie kwasowej | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | mg skrobi rozp. powietrznie suchej w próbie | użyto 0,005 n $Na_2S_2O_3$ w ml | Średnia | Współczynnik | Oblicz. mg skrobi | Wykryto % skrobi jako glikoza | Różnica w %% |
| 1 | 0,200 | 0,93 0,95 0,97 | 0,95 | 174 | 0,1653 | 82,6 | |
| | Metoda nadjodanowa | | | | | | |
| 2 | 0,100 | 1,44 1,43 1,47 | 1,44 | 58 | 0,0835 | 83,5 | + 0,9 |
| 3 | 0,150 | 2,15 2,15 2,15 | 2,15 | 58 | 0,1247 | 83,1 | + 0,5 |
| 4 | 0,200 | 2,89 2,88 2,93 | 2,90 | 58 | 0,1682 | 84,1 | + 1,5 |
| 5 | 0,200 | 2,88 2,82 2,82 | 2,84 | 58 | 0,1648 | 82,4 | — 0,2 |
| 6 | 0,200 | 2,84 2,82 2,84 | 2,84 | 58 | 0,1648 | 82,4 | — 0,2 |
| 7 | 0,240 | 3,39 3,40 3,39 | 3,39 | 58 | 0,1966 | 81,9 | — 0,7 |
| 8 | 0,250 | 3,63 3,63 3,57 | 3,61 | 58 | 0,2093 | 83,7 | + 1,1 |
| 9 | 0,360 | 5,02 4,98 4,96 | 4,99 | 58 | 0,2895 | 80,4 | — 2,2 |

Wodorotlenek kadmowy w obecności roztworu chlorku potasowego wytrąca ilościowo skrobię rozpuszczalną z roztworu, pozostawiając w przesączu wszystkie inne substancje redukujące. Najwygodniej można skrobię rozpuszczalną wytrącić w następujący sposób: do suchej probówki wirówkowej o poj. 50 ml odmierzyć pipetą 10 ml badanego roztworu, 10 ml siarczanu kadmowego (odczynnik 3a), 10 ml 0,25 n NaOH z chlorkiem potasowym. Po dokładnym wymieszaniu umieścić probówkę na przeciąg 3 minut we wrzącej łaźni wodnej, wstrząsnąć 2—3 razy, ochłodzić i wirować. Próbę ślepą przygotować w sposób identyczny z tą różnicą, że w miejsce roztworu skrobi należy odmierzyć 10 ml wody destylowanej. Klarowne roztwory pozbawione skrobi można również otrzymać przez sączenie na twardym ilościowym sączku. Do analizy pobiera się 5 ml roztworu, który odpowiada 1,667 ml próby.

Jak wynika z tablicy 2, skrobia ulega ilościowemu strąceniu w obecności wodorotlenku kadmowego, ponieważ liczba ml 0,005 n tiosiarczanu sodowego użyta w próbie ślepej i badanej jest identyczna i niezależna od ilości skrobi (w granicach od 0,500 mg do 5,000 mg) w roztworze przed strąceniem wodorotlenkiem kadmowym.

Następnie przebadano warunki „odbiałczania" roztworów zawierających skrobię rozpuszczalną za pomocą soli kadmu, w których skrobia nie zostaje

http://rcin.org.pl

strącona i przechodzi ilościowo do przesączu. Stwierdzono, że fosforan kadmowy przy wartości pH między 7,8 i 8,2 nie strąca skrobi rozpuszczalnej, a jednocześnie odbiałcza ilościowo roztwory koloidalne białek z materiałów roślinnych i zwierzęcych, jak np. ekstraktów traw, mleka i krwi.

Do 10 ml badanego roztworu odmierzono pipetą 10 ml siarczanu kadmowego i 10 ml odczynnika złożonego z mieszaniny fosforanów, chlorku sodo-

Tablica 2

Strącenie skrobi rozpuszczalnej wodorotlenkiem kadmowym

| L. p. | mg skrobi rozp. | | ml 0,005 n $Na_2S_2O_3$ w próbie ślepej | ml 0,005 n $Na_2S_2O_3$ w badanej próbie | Różnica w ml $Na_2S_2O_3$ |
|---|---|---|---|---|---|
| | strącanej w obj. 30 ml | pobranej do analizy w 5 ml | | | |
| 1 | 5,000 | 0,833 | 4,00 3,97 | 4,02 4,01 4,02 | 0,03 |
| 2 | 5,000 | 0,833 | 4,41 4,38 4,48 | 4,37 4,38 4,38 | 0,01 |
| 3 | 5,000 | 0,833 | 4,36 4,34 4,36 | 4,36 4,36 4,37 | 0,01 |
| 4 | 5,000 | 0,833 | 4,77 4,76 4,75 | 4,79 4,76 4,75 | 0,01 |
| 5 | 3,615 | 0,602 | 4,83 4,83 4,85 | 4,80 4,81 4,79 | 0,03 |
| 6 | 1,670 | 0,278 | 4,66 4,65 4,63 | 4,66 4,64 4,61 | 0,01 |
| 7 | 0,735 | 0,122 | 8,21 8,17 8,21 | 8,22 8,22 8,21 | 0,02 |
| 8 | 0,500 | 0,083 | 3,17 3,17 3,19 | 3,18 3,17 3,23 | 0,01 |

wego i wodorotlenku sodowego. Po dokładnym wymieszaniu odwirowano lub przesączono i do analizy pobierano 5 ml klarownego roztworu. Ślepą próbę odczynnikową przygotowano w identyczny sposób, przy czym w miejsce badanego roztworu odmierzano 10 ml wody destylowanej.

Porównanie wyników w tablicy 3 wykazuje, że w opisanych warunkach skrobia rozpuszczalna przechodzi ilościowo do przesączu, ponieważ procentowa zawartość wykrytej skrobi w kontroli, tj. w próbie bez odbiałczania (patrz tablica 1), jest identyczna z procentową zawartością skrobi w próbie „odbiałczonej" fosforanem kadmowym.

Skrobia w materiale roślinnym występuje w postaci nierozpuszczalnej. Hassid, Cready i Rosenfels (6) przeprowadzają skrobię nierozpuszczalną w skrobię rozpuszczalną działaniem 80% alkoholu i stężonego kwasu solnego w stosunku 100 : 1 w temperaturze 100°. Chinoy, Edwards i Nanji (7) poddają skrobię działaniu 0,7% wodorotlenku potasowego w ciągu 30 minut w temp. 60 — 70° na łaźni wodnej.

Metody powyższe zostały w naszym laboratorium wielokrotnie przebadane, przy czym okazało się, że żadna z nich nie odpowiada stawianym wy-

http://rcin.org.pl

maganiom. Hydroliza skrobi, opisana przez Hassida i współpracowników, nie zatrzymuje się na stadium skrobi rozpuszczalnej, lecz częściowo powoduje rozkład do mniejszych łańcuchów dekstrynowych. Działanie zaś 0,7% wodorotlenku potasowego w temperaturze 60—70° nie przebiega ilościowo, otrzymane bowiem wyniki metodą nadjodanową okazały się za niskie.

Tablica 3

Oznaczenie skrobi rozpuszczalnej w roztworach „odbiałczanych" fosforanem kadmowym

| L.p. | mg skrobi odbiałczanej (powietrznie suchej) | mg skrobi w próbie (powietrznie suchej) | Zużyto 0.005 n $Na_2S_2O_3$ ml | | Średnia | Wykryto | | Powinno być skrobi % | Różnica % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | mg skrobi | % skrobi | | |
| 1 | 0,500 | 0,083 | 1,19 | 1,14 | 1,17 | 0,0678 | 81,7 | 82,6 | — 0,9 |
| 2 | 0,700 | 0,117 | 1,69 | 1,65 | 1,67 | 0,0968 | 82,7 | | + 0,1 |
| 3 | 1,000 | 0,167 | 2,42 | 2,44 | 2,43 | 0,1409 | 84,4 | | + 1,8 |
| 4 | 1,000 | 0,167 | 2,37 | 2,34 | 2,36 | 0,1368 | 81,9 | | — 0,7 |
| 5 | 1,200 | 0,200 | 2,88 | 2,88 | 2,88 | 0,1670 | 83,5 | | + 0,9 |
| 6 | 1,200 | 0,200 | 2,82 | 2,83 | 2,83 | 0,1625 | 82,0 | | — 0,6 |
| 7 | 1,400 | 0,233 | 3,36 | 3,38 | 3,37 | 0,1954 | 83,8 | | + 1,2 |
| 8 | 2,240 | 0,373 | 5,24 | 5,19 | 5,22 | 0,3027 | 81,1 | | — 1,6 |

W celu przeprowadzenia skrobi nierozpuszczalnej w skrobię rozpuszczalną opracowano w naszym laboratorium nową metodę, polegającą na zastosowaniu rozcieńczonego kwasu mrówkowego w pewnych dokładnie określonych warunkach.

Badaną, dobrze zmieloną próbkę przenosi się za pomocą 20 ml wody destylowanej do kolbki Erlenmeyera. Dodaje się dokładnie 1 ml 2 n kwasu mrówkowego i zamyka kolbkę korkiem z nałożoną chłodnicą zwrotną. Kolbkę umieszcza się na elektrycznej płytce grzejnej na siatce azbestowej i utrzymuje się próbę w ciągu co najmniej 6,5 minut w temperaturze 100° (10 minut od chwili rozpoczęcia ogrzewania). Po ostudzeniu zobojętnia się 2 ml 1 n wodorotlenku sodowego.

W tablicy 4 podano wpływ czasu i stężenia kwasu mrówkowego na stopień przemiany skrobi nierozpuszczalnej w rozpuszczalną. Z tablicy tej wynika, że przeprowadzając hydrolizę 0,1 n kwasem mrówkowym w ciągu co najmniej 6,5 minut w temperaturze 100° ilość wykrytej skrobi dokładnie pokrywa się z ilością glikozy metodą klasyczną po hydrolizie kwasowej. Dłuższe ogrzewanie hydrolizatu, od 6,5 — 15 minut, nie wpływa ujemnie na wyniki analiz.



http://rcin.org.pl

Tablica 4

Wpływ czasu i stężenia kwasu mrówkowego na ilościową przemianę skrobi nierozpuszczalnej w skrobię rozpuszczalną

| L. p. | Dodano 1 ml HCOOH o stężeniu n | Czas hydrol. w min. od chwili wrzenia | mg skrobi w próbie | Wykryto | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | met. nadjodanową | | met. klasyczną po hydr. kwasowej | |
| | | | | mg skrobi | % skrobi | mg skrobi | % skrobi |
| 1 | 0,5 | 7,5 | 0,167 | 0,1183 | 70,8 | 0,1471 | 88,0 |
| 2 | 1 | 5 | 0,167 | 0,1293 | 77,4 | | |
| 3 | 2 | 3 | 0,167 | 0,1346 | 80,6 | | |
| 4 | 2 | 5 | 0,167 | 0,1416 | 84,7 | | |
| 5 | 2 | 5 | 0,167 | 0,1473 | 88,2 | | |
| 6 | 2 | 6,5 | 0,167 | 0,1470 | 88,0 | | |
| 7 | 2 | 6,5 | 0,167 | 0,1498 | 89,6 | | |
| 8 | 2 | 6,5 | 0,167 | 0,1478 | 88,6 | | |
| 9 | 2 | 6,5 | 0,167 | 0,1475 | 88,3 | | |
| 10 | 2 | 6,5 | 0,167 | 0,1493 | 89,3 | | |
| 11 | 2 | 15 | 0,167 | 0,1497 | 89,5 | | |

Wyniki ujęte w tablicach 1 — 4 wykazują, że: 1) Oznaczenie skrobi rozpuszczalnej metodą nadjodanową w ilościach od 0,080 mg do 0,300 mg pokrywa się z wynikami otrzymanymi po kwaśnej hydrolizie i oznaczeniami skrobi metodami klasycznymi. Współczynnik w metodzie nadjodanowej dla skrobi rozpuszczalnej wyrażonej w glikozie równa się 58. 2) Opracowano metody „odbiałczania", które nie zatrzymują skrobi rozpuszczalnej lub które pozwalają na ilościowe strącenie skrobi, umożliwiając w ten sposób oznaczenie skrobi rozpuszczalnej w obecności innych rozpuszczalnych substancji redukujących. 3) Opracowano metodę przeprowadzenia skrobi nierozpuszczalnej w skrobię rozpuszczalną w bardzo łagodnych warunkach, a mianowicie w obecności — 0,1 n kwasu mrówkowego.

Odczynniki

1) 2 n kwas mrówkowy.

2) 1 n wodorotlenek sodowy.

3) Odczynniki do odbiałczania wodorotlenkiem kadmowym (próby ślepej):

a) siarczan kadmowy: 20,96 g $CdSO_4 \cdot 8 H_2O$ + 105,5 ml 1 n HCl dopełnić wodą destylowaną do litra,

http://rcin.org.pl

b) 0,25 n wodorotlenek sodowy, zawierający 240 g chlorku potasowego w 1000 ml roztworu.

4) Odczynniki do „odbiałczania" fosforanem kadmowym (próby badanej):

a) siarczan kadmowy: 26,2 g $CdSO_4 \cdot 8 H_2O$ + 132 ml 1 n HCl dopełnić wodą destylowaną do 1 litra,

bI) 12,5 g $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$
3 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ } w 100 ml
5 g NaCl

bII) 0,55 n NaOH.

Odczynniki bI i bII zmieszać w stosunku 1:1.

5) Nadjodan potasu — około 1,1 g $KJO_4$ rozpuścić w 200 ml wrzącej wody destylowanej i na zimno dopełnić wodą w cylindrze do objętości 1 litra. Nadjodan potasowy otrzymać można bardzo łatwo z jodu i wodorotlenku potasowego metodą opisaną przez Vanino (8) dla otrzymania nadjodanu sodowego.

6) 6% roztwór $K_2HPO_4$.

7) 5% kwas octowy lodowaty.

8) Bufor fosforanowy: 42 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ + 10 g $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$ rozpuścić w wodzie i dopełnić wodą w cylindrze do 1 litra.

9) Jodek potasowy *in substantia.*

10) 0,005 n tiosiarczan sodowy. Na litr roztworu dodać 6 ml 1 n NaOH; przechowywać w ciemnej butelce.

11) 0,25% roztwór skrobi rozpuszczalnej.

## Metoda

Około 100 mg dokładnie zważonej próbki przenosi się za pomocą 20 ml wody destylowanej do kolbki Erlenmeyera poj. 100 ml. Przed analizą próbka powinna być uprzednio dokładnie zmielona i przesiana przez sito o otworach średnicy 0,075 mm. Odmierza się dokładnie 1 ml 2 n kwasu mrówkowego i zamyka kolbkę korkiem z rurką szklaną długości 50 cm i przekroju 0,4 cm, która służy jako chłodnica i chroni przed nadmiernym parowaniem roztworu w kolbce. Kolbkę umieszcza się na elektrycznej płytce grzejnej, na siatce azbestowej i ogrzewa w ciągu 6,5 min. od chwili wrzenia (10 minut od rozpoczęcia ogrzewania). Następnie chłodzi się w zimnej wodzie, zobojętnia 2 ml 1 n NaOH i przenosi ilościowo do kolby miarowej o pojemności od 100 ml do 1000 ml, w zależności od ilości skrobi w badanej próbie.

Do suchej probówki wirówkowej pojemności 50 ml odmierza się pipetą dokładnie 10 ml badanego roztworu, 10 ml siarczanu kadmowego (odczynnik 3a) i 10 ml 0,25 n wodorotlenku sodowego. Po dokładnym wymieszaniu umieszcza się probówkę na 3 minuty we wrzącej łaźni wodnej, chłodzi i następnie wiruje w ciągu 3 minut przy 2500 obr/min. W ten sposób otrzymany



http://rcin.org.pl

klarowny roztwór nie zawiera skrobi rozpuszczalnej i służy przy obliczaniu jako próba ślepa.

Do drugiej probówki wirówkowej o pojemności 50 ml odmierza się pipetą również 10 ml badanego roztworu, 10 ml siarczanu kadmowego (odczynnik 4a) i 10 ml odczynnika, złożonego z mieszaniny fosforanów, chlorku sodowego i wodorotlenku sodowego (odczynnik 4b). Po dokładnym wymieszaniu wiruje się w ciągu 3 minut.

Do probówek Hagedorna-Jensena (przekrój 40 mm, wysokość 200 mm) odmierza się w 2 — 3 powtórzeniach 5 ml odbiałczonych roztworów próby badanej i ślepej i 10 ml mieszaniny zawierającej 6% dwuzasadowy fosforan potasowy i nadjodan potasowy w stosunku 1 : 1. Po wymieszaniu prób probówki umieszcza się w odpowiednim statywie na łaźni z wrzącą wodą na przeciąg 20 minut. Po ostudzeniu w zimnej wodzie dodaje się 2,5 ml 5% kwasu octowego, wstrząsa, dodaje 5 ml buforu fosforanowego i wstrząsa ponownie. Po dodaniu kilku kryształków jodku potasowego (około 10 mg) miesza się ponownie i po upływie około minuty miareczkuje się wydzielony jod roztworem 0,005 n tiosiarczanu sodowego. Koniec miareczkowania poznaje się po zaniku niebieskiej barwy, która powstaje po dodaniu kilku kropli skrobi do próby zawierającej wolny jod. Skrobię należy dodać tuż przed końcem miareczkowania.

## Zastosowanie metody nadjodanowej do analizy materiału roślinnego

W tablicy 5 podano wyniki analiz skrobi w materiale roślinnym, uzyskane metodą nadjodanową i metodą żelazicyjankową.

Obliczenie

Ilość mikrogramów skrobi w badanych 5 ml próby = (A—B) . 58

$$\% \text{ skrobi} = \frac{(A - B) . 58}{I} \cdot 100$$

gdzie:

A — ml 0,005 n $Na_2S_2O_3$ próby ślepej,

B — ml 0,005 n $Na_2S_2O_3$ próby badanej,

I — ilość mikrogramów materiału w 5 ml badanej próby.

## Dyskusja

Jak wynika z tablicy 5, w mące ziemniaczanej, w nasionach zbóż, w ziarnach kawy i liściach rajgrasu wyniki uzyskane metodą nadjodanową i żelazicyjankową są identyczne, a to ze względu na to, że nie zawierają nierozpuszczalnych pentozanów, które podczas kwaśnej hydrolizy ulegają

http://rcin.org.pl

Tablica 5

Oznaczenie skrobi w materiale roślinnym

| L. p. | Materiał | metoda żelazicyjankowa | | | metoda nadjodanowa | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | % glikozy po hydrolizie kwasowej | % glikozy po hydrolizie inwertazą | % skrobi (3—4) | mg materiału w próbie | ml $Na_2S_2O_3$ w próbie ślepej | ml $Na_2S_2O_3$ w próbie pełnej | Różnica (7—8) | mg skrobi | % skrobi |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| 1 | Mączka ziemniaczana | 88,7 | 0 | 88,7 | 0,167 | 4,55 4,55 4,55 | 2,00 2,01 | 2,54 | 0,1473 | 88,4 |
| 2 | Pszenica (mąka) | 78,1 | 0 | 78,1 | 0,167 | 4,13 4,11 4,15 | 1,86 1,87 1,86 | 2,27 | 0,1316 | 78,9 |
| 3 | Owies bez łuski | 73,9 | 0 | 73,9 | 0,333 | 7,13 7,11 7,08 | 2,89 2,86 2,91 | 4,22 | 0,2459 | 73,8 |
| 4 | Ryż | 76,9 | 0 | 76,9 | 0,167 | 4,37 4,40 4,42 | 2,19 2,19 2,20 | 2,21 | 0,1293 | 77,4 |
| 5 | Groch (nasiona) | 61,2 | 4,5 | 56,7 | 0,333 | 3,90 3.88 3.94 | 0,99 1,00 1,01 | 2,90 | 0,1684 | 50,5 |
| 6 | Fasola (nasiona | 52,9 | 3,8 | 49,1 | 0,167 | 6,44 6.45 6.43 | 5,58 5,56 5,58 | 0,89 | 0,0498 | 30,0 |
| 7 | Łubin (nasiona) | 24,0 | 2,4 | 21,6 | 0,667 | 2,84 2.87 2.82 | 1,01 1,02 1,04 | 1,81 | 0,1049 | 15,7 |
| 8 | Kawa | 29,7 | 6,7 | 23 ,0 | 0,800 | 4,54 4.56 4.51 | 1,30 1,30 1,31 | 3,24 | 0,1879 | 23,4 |
| 9 | Jęczmień (słoma) | 25,2 | 3,2 | 22,0 | 0,667 | 5,27 5.28 5,21 | 3,85 3,92 3,89 | 1,36 | 0,0788 | 11,8 |
| 10 | Owies (słoma) | 22,9 | 3,6 | 19,3 | 0,667 | 3,77 3.75 3,79 | 2,54 2,57 2,55 | 1,22 | 0,0707 | 10,6 |
| 11 | Pszenica (słoma) | 29,0 | — | — | 0,667 | 5,34 5.34 5,39 | 4,07 4,08 4,06 | 1,29 | 0,0748 | 11,2 |
| 12 | Rajgras (liście suszone) | 26,6 | 3,3 | 23,3 | 0,667 | 5,39 5.41 5,37 | 2,77 2,84 2,78 | 2,59 | 0,1502 | 22,5 |
| 13 | Groszek zielony (konserwa) | 7,9 | 3,5 | 4,5 | 2,992 | 3,58 3.57 3,64 | 1,46 1,44 1,46 | 2,12 | 0,1229 | 4,1 |

http://rcin.org.pl

rozkładowi do pentoz i utlenieniu żelazicyjankiem. Nasiona roślin motylkowych, jak groch, fasola i słomy roślin zbożowych zawierają nierozpuszczalne pentozany, które po kwaśnej hydrolizie utleniają się żelazicyjankiem w metodzie klasycznej, natomiast w metodzie nadjodanowej ulegają strąceniu w odbiałczaniu, tak wodorotlenkiem kadmowym, jak i fosforanem kadmowym. Z różnic oznaczeń nadjodanem w roztworach, w których skrobia została strącona, i w roztworach zawierających skrobię otrzymuje się rzeczywisty wynik na zawartość skrobi w badanym materiale. Jak wynika z tablicy 5, ilość skrobi oznaczona metodą nadjodanową jest zawsze niższa od wyników otrzymanych metodą klasyczną we wszystkich materiałach, które zawierają pentozany.

Słomy roślin zbożowych zawierają duże ilości pentozanów, przeto bez ich oznaczenia metoda hydrolizy kwasowej nie może być stosowana. Według Bustona (9) słoma owsa zawiera 9,3% pentozanów. Wynik uzyskany metodą nadjodanową (tablica 5, l. p. 10) jest o 8,7% niższy od wyniku otrzymanego metodą żelazicyjankową po hydrolizie kwasowej. Różnica w obu metodach odpowiada dokładnie ilości pentozanów podanej w literaturze. Tym samym w metodzie oznaczania skrobi nadjodanem wydaje się zbędne dodatkowe oznaczanie nierozpuszczalnych pentozanów; natomiast przy zastosowaniu metody hydrolizy kwasowej jest ono konieczne w wielu materiałach roślinnych, zawierających duże ilości pentozanów. W metodzie nadjodanowej, w warunkach przekształcania skrobi nierozpuszczalnej w skrobię rozpuszczalną, nierozpuszczalne pentozany nie ulegają rozkładowi i zostają wytrącone przed utlenieniem wodorotlenkiem i fosforanem kadmowym.

Dalszą charakterystyczną cechą nowoopracowanej metody jest fakt, że w celu oznaczenia skrobi w odróżnieniu od metod klasycznych dodatkowe oznaczenie cukrów prostych jest zbędne. W tych bowiem metodach od sumy całkowitej glikozy, otrzymanej po kwasowej hydrolizie, należy odjąć sumę jedno- i dwucukrowców po hydrolizie inwertazą. Fakt ten wpływa bardzo znacznie na szybkość oznaczenia skrobi we wszystkich materiałach roślinnych z wyjątkiem nasion zbóż, szczególnie jeżeli uwzględni się, że w metodzie nadjodanowej hydroliza i utlenienia skrobi przebiegają równocześnie i czas trwania obu czynności nie przekracza 20 minut.

Wreszcie nowo opracowana metoda ma bardzo korzystny współczynnik dla skrobi: F = 58, który jest trzykrotnie niższy od współczynnika żelazicyjankowego dla glikozy po hydrolizie: F = 174. Niski współczynnik przyczynia się do zwiększenia dokładności i umożliwia otrzymanie wyników w granicach około ±2% błędu.

W porównaniu z metodą klasyczną, której czas trwania kompletnej analizy całkowitej glikozy, po hydrolizie kwasowej, i cukrów prostych wynosi

http://rcin.org.pl

około 7 godzin — metoda nadjodanowa umożliwia wykonanie analizy w czasie nieprzekraczającym 2 godzin.

Nieco odmiennie przedstawia się analiza skrobi w obecności rozpuszczalnych pentozanów, jak np. w przypadku arabanu gum roślinnych. Związki te muszą być oddzielone od skrobi przed zadaniem rozcieńczonym kwasem mrówkowym, ponieważ zostają one strącone wodorotlenkiem kadmowym wraz ze skrobią rozpuszczalną i w ten sposób przyczyniają się do otrzymania wysokich wyników na zawartość skrobi, w zależności od ilości rozpuszczalnych arabanów występujących w badanej próbie.

Poniżej podana metoda umożliwia oddzielenie rozpuszczalnych pentozanów od skrobi.

Doświadczenia przeprowadzono na mieszaninie skrobi ziemniaczanej z gumą arabską w stosunku 1 : 1. Badaną próbkę przeniesiono do kolbki Erlenmeyera, dodano 20 ml wody i umieszczono na wrzącej łaźni wodnej na przeciąg 5 minut. Następnie sączono przez miękki sączek (Schleicher-Schüll, nr 589 [1]) używając pompy próżniowej. Po przemyciu osadu przeniesiono sączek ze skrobią do kolby Erlenmeyera, użytej poprzednio, i poddano hydrolizie kwasem mrówkowym jak wyżej.

Przy zastosowaniu metody usuwania pentozanów rozpuszczalnych w wodzie uzyskano wyniki na zawartość skrobi zgodne z wynikami oznaczania skrobi w roztworach nie zawierających pentozanów. Zawartość skrobi w mączce ziemniaczanej wynosiła 88,4%; w mieszaninie wykryto 91,6%.

## Streszczenie

1) Opisano nową mikrometodę oznaczania skrobi w materiale roślinnym.

2) Według tej metody oznacza się skrobię w ilościach od 0,070 do 0,300 mg z dokładnością ±2,5%.

3) Metoda opracowana jest na zasadzie przekształcenia skrobi nierozpuszczalnej w skrobię rozpuszczalną za pomocą rozcieńczonego kwasu mrówkowego. Skrobię rozpuszczalną utlenia się nadjodanem w roztworze dwuzasadowego fosforanu potasowego w temperaturze 100° w ciągu 20 minut.

4) Wodorotlenek kadmowy strąca ilościowo skrobię (A), a fosforan kadmowy odbiałcza materiał roślinny bez śladu adsorpcji skrobi rozpuszczalnej (B). Odejmując ilość ml tiosiarczanu sodowego (A—B) otrzymuje się ilość ml 0,005 n $Na_2S_2O_3$ odpowiadających zawartości skrobi w próbie.

5) W odróżnieniu od metod hydrolizy kwasowej metoda nadjodanowa

http://rcin.org.pl

umożliwia bezpośrednie oznaczenie skrobi bez konieczności oznaczenia cukrów prostych i pentozanów.

6) Współczynnik metody nadjodanowej jest trzykrotnie niższy od współczynnika metody żelazicyjankowej.

## LITERATURA


1. A. G. Woodman, Food Analysis, s. 302 (1941).
2. J. T Sullivan, *Ind. Eng. Chem. Analyt. Edit.* 7, 311 (1935).
3. H. Colin, *Bull. Assoc. Chimistes Sucrc. Bistill,* 46, 177-79 (1936).
4. I. Reifer, K. Tarnowska, *Przemysł Chem.* 8, 58—65 (1952).
5. F. Akiji, D. Iwatake, *Bioch. Z.,* 242, 43 (1932).
6. W. Z. Hassid, R. M. Mc Cready, R. S. Rosenfels, *Ind. Eng. Chem. analyt. Ed.,* 12, 142—44 (1940).
7. J. J. Chinoy, F. W. Edwards, H. R. Nanji, *Analyst,* 59, 671 (1934).
8. L. Vanino, Handbuch der praep. Chemie I, 332 (1925).
9. H. W. Buston, — *Biochem. J.,* 28, 1028 (1934).
10. J. C. Lintner-J. Konig, Untersuch. v. Nahr., Genussm. u. Gebrauchsgeg. III t., cz. 1, IV wyd., Berlin 1910, s. 441.


## НОВЫЙ МЕТОД МИКРООПРЕДЕЛЕНИЯ КРАХМАЛА В РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ

### Резюме


1. Описан новый микрометод определения крахмала в растительном материале.

2. По этому методу крахмал определяется в количестве от 0,070 + + 0,300 мг, с точностью ± 2,5%.

3. Метод основан на переобразовании нерастворимого крахмала в растворимый с помощью муравьиной кислоты. Растворимый крахмал окисляется иодатом в растворе однозамещенного фосфорнокислого калия, при темп. 100° C в течение 20 минут.

4. Гидрат окиси кадмия осаждает количественно крахмал (A), фосфорнокислый же кадмий лишает растительный материал белков не адсорбируя даже следов растворимого крахмала (B). Вычитывая количество мл тиосульфата (A—B) получается количество мл N/200 $Na_2S_2O_3$, которое соответствует содержанию крахмала в пробе.

5. В различие от кислотного гидролиза податный метод дает возможность непосредственного определения крахмала без необходимости определять простые сахары и пентозаны.

6. Коэффициент податного метода три раза ниже коэффициента метода железосинеродистого.


http://rcin.org.pl

NEW METHOD OF MICRODETERMINATION OF STARCH IN VEGETABLE MATERIAL


## Summary

1. A new method of microdetermination of starch in plant material is described.

2. By this method starch may be determined in quantities from 0,070 to 0,300 mg with an accuracy of ±2,5%.

3. The method is based on converting insoluble to soluble starch by the action of diluted formic acid. Soluble starch is oxydated by periodate in a solution of dibasic potassium phosphate at a temperature of 100°C in 20 minutes.

4. Cadmium hydroxyde precipitates starch quantitatively (A), and cadmium phosphate deproteinises the plant material without trace of adsorption of soluble starch (B). By subtracting the number of ml of thiosulphate (A—B), the amount of 0,005 n $Na_2S_2O_3$ ml is obtained, corresponding to the starch content in the sample.

5. The periodate method differs from the method of acid hydrolysis in this that it allows a direct determination of the starch without necessity of determining the mono- and di-saccharides and pentosans.

6. The coefficient of the periodate method is three times lower than that of the ferricyanide method.


*Department of Biochemistry*
*Academy of Agriculture — Warsaw and Biochemical Laboratory IUNG*

http://rcin.org.pl

http://rcin.org.pl

ACTA BIOCHIMICA POLONICA
VOL. I 1954 NO 1

W. NIEMIERKO

# MODYFIKACJA FOTOKOLORYMETRU „ERSZA"

*Zakład Biochemii Instytutu im. M. Nenckiego*

W ostatnich latach znalazły szerokie zastosowanie w kraju dwukomórkowe fotokolorymetry „Ersza" węgierskiej firmy „Laboratorium Felszevelesek Gyara" Budapest, wzorowane na modelu skonstruowanym przez B. Langego (1). Aparaty węgierskie mają sprawnie działające fotokomórki i dość czuły galwanometr. Stosowanie ich jednak w praktyce laboratoryjnej biochemicznej i klinicznej napotyka na poważne trudności. Po pierwsze, urządzenie pomiarowe przy diafragmie kompensacyjnej (rys. 1D) używane w tzw. metodzie zerowej jest zbyt mało precyzyjne, aby można było nim się posługiwać w bardziej dokładnych badaniach. Po drugie, aparaty są zaopatrzone w bardzo niewygodne w użyciu okrągłe kiuwety, wymagające dość znacznych ilości cieczy, co jest przeszkodą przy oznaczaniu drobnych ilości substancji.

Powyższe okoliczności skłoniły nas do zmodyfikowania omawianego aparatu przez wprowadzenie stosunkowo prostych urządzeń dodatkowych, które, jak się okazało, pozwalają uzyskać znaczny stopień dokładności w pomiarach i umożliwiają wykonywanie analiz w mikroskali.

## Opis modyfikacji aparatu

Pierwsze i najważniejsze z wprowadzonych urządzeń stanowi kompensator (rys. 3 A), który służy do precyzyjnego zaciemniania lewej fotokomórki i w którym do celów pomiarowych zastosowany został łatwo dostępny w handlu tzw. czujnik [1]). Konstrukcja kompensatora jest przedstawiona na rys. 4. Istotną częścią jest tu przesłona (10) posuwana pokrętłem (1) połączonym z czujnikiem (3). Za pomocą tej przesłony szerokość szczeliny okienka (11), przez które przechodzi światło, może być zmieniana w gra-

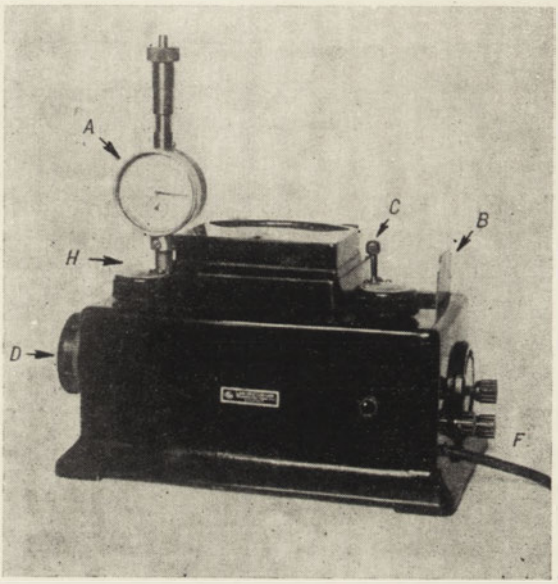
[1]) W naszym pierwotnym modelu był zastosowany do tego celu mikromierz, który jednak okazał się znacznie mniej dogodny w użyciu.



http://rcin.org.pl

nicach od 0 do 10 mm, posuw zaś przesłony jest bezpośrednio odczytywany na skali czujnika z dokładnością do 0,01 mm.

Opisany kompensator powinien być skalibrowany (patrz następny rozdział) w ten sposób, aby każdej podziałce skali czujnika odpowiadał określony procent absorpcji światła, a tym samym określona ekstynkcja (E) badanego roztworu.



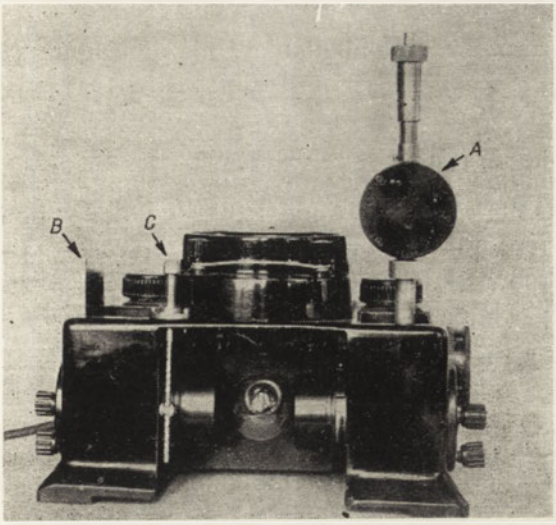

Rys. 1. Fotokolorymetr z dodatkowymi urządzeniami. Widok od przodu.

Drugim wprowadzonym urządzeniem jest adapter, przedstawiony na rys. 1, 2 i 3B i na rys. 5, który pozwala na zastosowanie zamiast kiuwet probówek o średnicy zewnętrznej około 17 mm, w których ilość cieczy wystarczająca do pomiaru fotometrycznego wynosi około 4 ml.

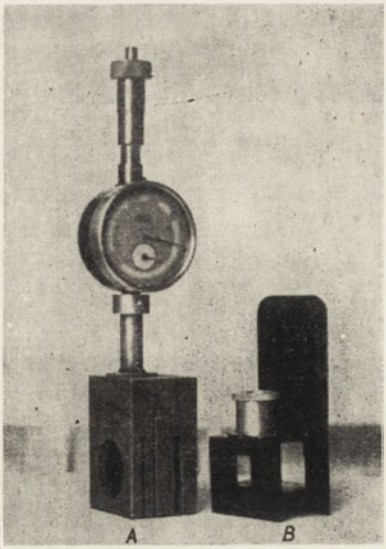
Do wykonywania analiz potrzebne są dwie probówki, z których jedna służy do ślepej próby, druga zaś do roztworu wzorcowego i do roztworów badanych. Jak wykazało doświadczenie, nie jest rzeczą trudną dobranie takiej pary probówek o jednakowych średnicach, w których badane roztwory wykazują praktycznie biorąc jednakową ekstynkcję. Jest jednak przy tym rzeczą ważną umieszczanie probówek w adapterze zawsze w jednym i tym samym kierunku, który na probówkach należy zaznaczyć.

Trzecim wreszcie urządzeniem jest zastosowanie śruby (rys. 1 i 2C) do poruszania prawej diafragmy, co jest potrzebne przy kalibrowaniu kompensatora (patrz niżej). Wprowadzenie tego dodatkowego urządzenia wydawa-

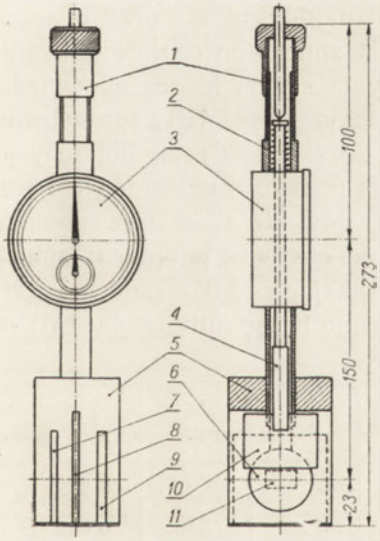
http://rcin.org.pl



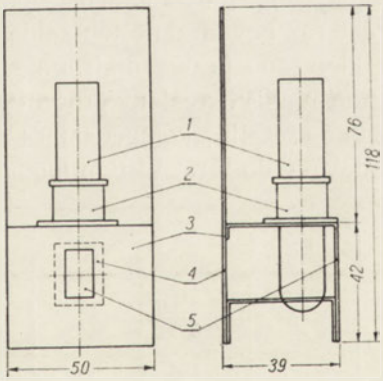

Rys. 2. Fotokolorymetr z dodatkowymi urządzeniami. Widok od tyłu.




Rys. 3. Kompensator z czujnikiem (A) i adapter do probówek (B).




Rys. 4. Schemat budowy kompensatora: 1. Pokrętło do posuwania przesłony; 2. Sprężyna odciągająca; 3. Czujnik; 4. Trzpień; 5. Podstawa; 6. Otwór w podstawie do przechodzenia światła; 7. Szczelina w podstawie dla okienka; 8. Szczelina dla przesłony; 9. Szczelina dla szkła ciepłochłonnego; 10. Przesłona; 11. Okienko.




Rys. 5. Adapter do probówek: 1. Probówka; 2. Kominek; 3. Podstawa z blachy grub. 1 mm; 4. Otwór dla światła wychodzącego; 5. Otwór dla światła wchodzącego.

http://rcin.org.pl

ło się celowe ze względu na to, że precyzyjne manipulowanie diafragmą za pomocą dołączonej do fotometru dźwigienki było bardzo kłopotliwe.

### Kalibrowanie kompensatora i skali czujnika

Celem skalibrowania kompensatora wykorzystano istniejącą skalę przy galwanometrze. Na skali tej przy odpowiednim nastawieniu czułości galwanometru wychylenie strzałki odpowiada określonemu procentowi absorpcji światła padającego na prawą fotokomórkę w porównaniu z lewą. Przesuwając przesłonę kompensatora zaciemnia się następnie lewą fotokomórkę i w momencie, gdy strzałka galwanometru dochodzi do zera, odczytuje się wskazanie czujnika. Tego rodzaju postępowanie pozwala w rezultacie obliczyć procent absorpcji światła odpowiadający każdej podziałce czujnika. Cała procedura kalibrowania kompensatora wyglądała zatem w sposób następujący:

Za pomocą pokrętła (rys. 4—1) nastawiano skalę czujnika na zero. Wkładano do adaptera probówkę napełnioną wodą, włączano prąd i śrubą C (rys. 1 i 2) doprowadzano strzałkę galwanometru do zera. Całkowicie zaciemniano prawą fotokomórkę za pomocą znajdującej się przy aparacie zasłony (rys. 1F) i obracając gałką (rys. 1H) zmieniano czułość galwanometru aż do momentu, kiedy strzałka zatrzyma się na kresce odpowiadającej 100% absorpcji światła. Otwierano zasłonę (rys. 1F), sprawdzano, czy strzałka galwanometru dokładnie wraca do zera i w razie potrzeby jeszcze raz powtarzano ten zabieg. Następnie za pomocą śruby C (rys. 1 i 2) zmniejszano prawą diafragmę aż do chwili, gdy strzałka galwanometru wskaże jakiś określony procent absorpcji. Z kolei obracano pokrętłem zmniejszając szczelinę kompensatora (A) i doprowadzając strzałkę galwanometru ponownie do zera. W tym momencie odczytywano liczbę milimetrów (M) na

| M mm | E | M mm | E | M mm | E | M mm | E |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2,45 | 0,099 | 3,45 | 0,154 | 4,45 | 0,223 | 7,45 | 0,595 |
| 2,50 | 0,101 | 3,50 | 0,157 | 4,50 | 0,227 | 7,50 | 0,605 |
| 2,55 | 0,104 | 3,55 | 0,160 | 4,55 | 0,230 | 7,55 | 0,616 |
| 2,60 | 0,107 | 3,60 | 0,163 | 4,60 | 0,234 | 7,60 | 0,627 |
| 2,65 | 0,110 | 3,65 | 0,167 | 4,65 | 0,238 | 7,65 | 0,638 |
| .... | .... | .... | .... | .... | .... | .... | .... |
| .... | .... | .... | .... | .... | .... | .... | .... |

skali czujnika, odpowiadającą danemu procentowi absorpcji światła. W ten sam sposób postępowano dalej uzyskując kolejne dane dla 5%, 10%, 20%

http://rcin.org.pl

itd. do 90% absorpcji światła. Uzyskane z trzech serii pomiarów średnie wartości pozwoliły na sporządzenie tablicy, z której w drodze interpolacji obliczony został procent absorpcji, a z niego z kolei ekstynkcja (E) odpowiadająca podziałkom skali czujnika w przedziałach co 0,05 mm. Ekstynkcja dla poszczególnych setnych części milimetra bardzo łatwo może być obliczona z tablicy „na oko".

Ze względu na to, że kalibrowanie daje dla każdego aparatu nieco inne wartości, obliczona tablica nie zostaje tu podana w całości, lecz jedynie przykładowo przytacza się z niej kilka danych.

## Wykonywanie pomiaru fotometrycznego

Zgodnie z przepisami dla stosowanej metody kolorymetrycznej wywołuje się zabarwienie w roztworze wzorcowym i w roztworach badanych oraz przygotowuje się odpowiednią ślepą próbę. W przypadku bardzo małych ilości oznaczanej substancji zabarwienie może być wywołane w kolbkach miarowych o poj. 5 ml. Ta objętość roztworu całkowicie wystarcza do przepłukania probówki po poprzedniej analizie i do napełnienia jej do wymaganego poziomu.

Przystępując do wykonania pomiaru nastawia się pokrętłem (rys. 4—1) skalę czujnika na zero, umieszcza się w adapterze (rys. 1B) ślepą próbę w przeznaczonej dla niej probówce, włącza się prąd elektryczny i po upływie około 2 minut za pomocą śruby C (rys. 1 i 2) koryguje się ustawienie strzałki galwanometru na zero. Nie wyłączając prądu wyjmuje się z adaptera probówkę ze ślepą próbą, natychmiast wstawia się na jej miejsce probówkę z próbą badaną i za pomocą pokrętła przesuwa się przesłonę kompensatora aż do momentu, w którym strzałka galwanometru wróci do zera. Wyłącza się prąd, zanotowuje się liczbę mm na skali czujnika i z tablicy (patrz wyżej) odczytuje się ekstynkcję badanego roztworu lub roztworu wzorcowego. Za pomocą pokrętła nastawia się następnie skalę czujnika ponownie na zero, wkłada do adaptera probówkę ze ślepą próbą i w sposób analogiczny przeprowadza się dalsze pomiary.

Obliczenie ilości substancji w badanej próbie dokonywuje się wg ogólnie przyjętych w fotometrii sposobów. Ilustruje to następujący przykład. Roztwór wzorcowy zawierał *a* mg substancji w 10 ml. Pomiar dla niego na czujniku wynosił M mm, czemu odpowiada wg tablicy ekstynkcja E = e. Dla próby badanej, zawierającej x mg substancji w 5 ml, odczytano na czujniku M′ mm, czemu wg tablicy odpowiada ekstynkcja E′ = e′. Ilość substancji w 5 ml próby badanej wynosi

$$x = \frac{a \cdot 5 \cdot e'}{10 \cdot e} = \frac{a \cdot e'}{2 \cdot e} \text{ mg}$$

http://rcin.org.pl

## Sprawdzenie czułości i dokładności zmodyfikowanej aparatury

Celem sprawdzenia czułości, dokładności i zakresu stosowalności zmodyfikowanej aparatury, wykonano oznaczenie fosforu wg metody Fiskego i Subbarowa (1925) na roztworach wzorcowych ortofosforanów. Ilość fosforu w poszczególnych próbkach wynosiła od 1 do 40 μg w obliczeniu na 5 ml ostatecznej objętości zabarwionego roztworu.

Wykonano cztery serie oznaczeń, których wyniki są zestawione w tabl. 1. W tablicy tej jest podana zawartość P w badanej próbie, wartość oznaczonej dla niej ekstynkcji (E) oraz obliczona z tych danych wartość ekstynkcji, przypadająca na 10 μg P ($E/10_{\mu g}$ P). Liczby tabl. I wskazują, że $E/10_{\mu g}$ P dla ilości fosforu od 3 do 16 μg waha się zaledwie w nieznacznych granicach od 0,133 do 0,137, średnio zaś wynosi 0,135. Wynika z tego, że w granicach od 3 do 16 μg P w 5 ml roztworu wartość ekstynkcji jest ściśle proporcjonalna do zawartości P. Dla ilości fosforu poniżej 3 μg oraz powyżej 16 μg w 5 ml odchylenia od podanych wartości są znaczniejsze. Możemy na podstawie tych danych wyprowadzić wniosek, że trzy μg P w próbie badanej stanowią dolną granicę stosowalności metody. Natomiast górna granica metody może być w razie potrzeby dowolnie podniesiona bądź przez pobranie mniejszej części próby do analizy, bądź też za pomocą doprowadzenia ostatecznej objętości roztworu nie do 5 ml, lecz do 10 ml itd., z dodaniem oczywiście odpowiednich ilości potrzebnych odczynników.

Aby móc zorientować się w wielkości średniego błędu oznaczenia, obliczono ilość fosforu znalezionego w każdej próbie na podstawie ekstynkcji w danym pomiarze i przeciętnej wartości $E/10_{\mu g}$ P = 0,135. Uzyskane wyniki są przedstawione w tabl. 2. W tablicy tej są zestawione: teoretyczna zawartość fosforu w próbie, ilość fosforu znaleziona oraz różnica wyrażona w procentach. Z danych tablicy obliczono, że średni błąd oznaczenia dla ilości fosforu od 3 do 16 μg wynosi ±1%.

Rozwiązanie konstrukcyjne i techniczne opisanych w tekście urządzeń zawdzięczam inż. mgrowi W. Siwińskiemu, któremu również w tym miejscu składam swoje serdeczne podziękowanie. Pod jego kierunkiem wymienione części aparatu zostały wykonane w warsztacie mechanicznym Instytutu im. M. Nenckiego przez mechanika precyzyjnego W. Frąckiewicza i laboranta J. Dzierana.

Mgrowi Cz. Kurowskiemu pragnę podziękować za wydatną pomoc w żmudnej pracy obliczania tablicy ekstynkcji.

### LITERATURA

1. C. H. Fiske and Y. Subbarow, *J. Biol. Chem.*, 66, 375 1925.
2. B. Lange, Kolorimetrische Analyse, Berlin 1944.

http://rcin.org.pl

Tablica 1

| Seria I | | | Seria II | | | Seria III | | | Seria IV | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| P μg w 5 ml | E | E/10μg P | P μg w 5 ml | E | E/10μg P | P μg w 5 ml | E | E/10μg P | P μg w 5 ml | E | E/10μg P |
| 2,0 | 0,055 | 0,137 | 1,0 | 0,029 | 0,145 | 1,0 | 0,028 | 0,140 | 10,0 | 0,275 | 0,137 |
| 2,5 | 0,068 | 0,136 | 1,5 | 0,040 | 0,133 | 2,0 | 0,057 | 0,142 | 12,0 | 0,324 | 0,135 |
| 3,0 | 0,081 | 0,135 | 2,0 | 0,056 | 0,140 | 3,0 | 0,081 | 0,135 | 14,0 | 0,374 | 0,134 |
| 6,0 | 0,162 | 0,135 | 2,5 | 0,065 | 0,130 | 4,0 | 0,110 | 0,137 | 16,0 | 0,425 | 0,133 |
| 8,0 | 0,215 | 0,134 | 3,0 | 0,082 | 0,137 | 5,0 | 0,137 | 0,137 | 18,0 | 0,470 | 0,131 |
| 10,0 | 0,272 | 0,136 | 3,5 | 0,096 | 0,137 | 6,0 | 0,163 | 0,136 | 20,0 | 0,528 | 0,132 |
| 12,0 | 0,321 | 0,134 | 4,0 | 0,108 | 0,135 | 7,0 | 0,188 | 0,134 | 22,0 | 0,578 | 0,132 |
| 14,0 | 0,377 | 0,135 | 6,0 | 0,159 | 0,133 | 8,0 | 0,216 | 0,135 | 24,0 | 0,622 | 0,130 |
| 16,0 | 0,426 | 0,133 | 8,0 | 0,213 | 0,133 | 10,0 | 0,270 | 0,135 | 26,0 | 0,679 | 0,130 |
| 18,0 | 0,481 | 0,134 | 10,0 | 0,270 | 0,135 | 12,0 | 0,324 | 0,135 | 28,0 | 0,723 | 0,129 |
| 20,0 | 0,540 | 0,135 | | | | | | | | | |
| 32,0 | 0,855 | 0,134 | | | | | | | | | |
| 40,0 | 1,10 | 0,137 | | | | | | | | | |



http://rcin.org.pl

Tablica 2

| Seri I | | | Seria II | | | Seria III | | | Seria IV | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Teoret. zawart. P μg | Znaleziona zawartość P μg | Różnica % | Teoret. zawart. P μg | Znaleziona zawartość P μg | Różnica % | Teoret. zawart. P μg | Znaleziona zawartość P μg | Różnica % | Teoret. zawart. P μg | Znaleziona zawartość P μg | Różnica % |
| 2,0 | 2,04 | +1,5 | 1,0 | 1,07 | +7,4 | 1,0 | 1,04 | +3,7 | 10,0 | 10,2 | +1,5 |
| 2,5 | 2,52 | +0,7 | 1,5 | 1,48 | —1,5 | 2,0 | 2,11 | +5,2 | 12,0 | 12,0 | 0 |
| 3,0 | 3,00 | 0 | 2,0 | 2,08 | +3,7 | 3,0 | 3,00 | 0 | 14,0 | 13,9 | —0,7 |
| 6,0 | 6,00 | 0 | 2,5 | 2,41 | —3,7 | 4,0 | 4,08 | +1,5 | 16,0 | 15,8 | —1'5 |
| 8,0 | 7,95 | —0,7 | 3,0 | 3,04 | +1,5 | 5,0 | 5,07 | +1,5 | 18,0 | 17,4 | —3,0 |
| 10,0 | 10,1 | +0,7 | 3,5 | 3,56 | +1,5 | 6,0 | 6,04 | +0,7 | 20,0 | 19,6 | —2,2 |
| 12,0 | 11,9 | —0,7 | 4,0 | 4,00 | 0 | 7,0 | 6,95 | —0,7 | 22,0 | 21,4 | —2,2 |
| 14,0 | 14,0 | 0 | 6,0 | 5,88 | —1,5 | 8,0 | 8,00 | 0 | 24,0 | 23,1 | —3,7 |
| 16,0 | 15,8 | —1,5 | 8,0 | 7,90 | —1,5 | 10,0 | 10,0 | 0 | 26,0 | 25,5 | —3,7 |
| 18,0 | 17,8 | —0,7 | 10,0 | 10,0 | 0 | 12,0 | 12,0 | 0 | 28,0 | 26,9 | —4,5 |
| 20,0 | 20,0 | 0 | | | | | | | | | |
| 32,0 | 31,7 | —0,7 | | | | | | | | | |
| 40,0 | 40,8 | +1,5 | | | | | | | | | |

http://rcin.org.pl

## МОДИФИКАЦИЯ ФОТОКОЛОРИМЕТРА „ЕРСА"


### Резюме

Описаны дополнительные приспособления к фотоколориметру „Ерса", которые состоят из измерительного компенсатора соединенного с микрометром с циферблатом, из адаптера для пробирок объема 4 мл и из винта для точной установки диафрагмы.

С помощью этих приспособлений в приборе было произведено определение фосфора в количествие от 3 до 16 микрограмм. Средняя ошибка анализа ± 1%.


## A MODIFICATION OF THE „ERSZA" PHOTOCOLORIMETER


### Summary

A device improving the „Ersza" photocolorimeter is described. The device consists of a measuring compensator with a dial gauge, of an adaptor for 4 ml tubes and a screen for a precise setting of the diaphragm. With the modified apparatus the determination of phosphorus in the range from 3 to 16 microgram with a standard deviation ± 1% is possible.




http://rcin.org.pl

ACTA BIOCHIMICA POLONICA
VOL. I 1954 NO 1

PRZEMYSŁAW SZAFRAŃSKI

# METODA WYOSABNIANIA METABOLITÓW NA DRODZE PRZYŻYCIOWEJ EKSTRAKCJI CIĄGŁEJ ORAZ ZASTOSOWANIE JEJ DO BADANIA METABOLIZMU *MYCOBACTERIUM 279*

*Z Działu Biochemii Państwowego Zakładu Higieny i Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Warszawie*

*Kierownik: Prof. dr Józef Heller*

Dotychczasowe dane z dziedziny pośredniej przemiany *Mycobacterium* rzucają niewiele światła na zrozumienie procesów życiowych tych drobnoustrojów.

W przeciwieństwie do dobrze poznanego składu chemicznego *Mycobacterium* i opracowanych metod analizy metabolizmu ogólnego badanie pośrednich dróg przemiany materii prątka napotyka na duże trudności. Zwiększa je fakt, że produkty dysymilacji występują w ilościach śladowych, co było powodem, że do niedawna prątki gruźlicy zaliczano do doskonałych utleniaczy, tzn. do takich drobnoustrojów, które pobrane substraty organiczne przetwarzają aż do końcowych produktów utlenienia, a więc do dwutlenku węgla i wody, pozostawiając azot zawarty w metabolizowanych podłożach w postaci amoniaku. Zidentyfikowane dotychczas produkty dysymilacji oraz dalsze badania nad tym zagadnieniem przemawiają coraz bardziej na niekorzyść tego poglądu.

Szerokie występowanie cyklu Krebsa, zasadniczego mechanizmu spalania komórkowego zwierząt oraz jego rozpowszechnienie u roślin i drobnoustrojów stworzyło trwały punkt porównawczy w stosunku do organizmów, których fizjologia pośredniej przemiany materii jest jeszcze nie znana.

Do takich organizmów należą prątki gruźlicy, u których od szeregu lat w wielu laboratoriach starano się wykazać istnienie cyklu kwasów trójkarboksylowych. Wśród metabolitów różnych szczepów *Mycobacterium* zidentyfikowano już wiele ogniw tego cyklu, jak kwas pirogronowy (N. L. Edson i G. J. E. Hunter 1947, M. Szymona i O. Sakławska-Szymonowa 1952), kwas octowy (E. Lobstein 1922, M. Lindsay, T. V. O'Donnell i N. L. Edson 1950; P. Szafrański i E. A. Sym 1950),



http://rcin.org.pl

kwas cytrynowy (R. L. Blakley 1951; Z. Lassota 1954), kwas bursztynowy (J. Debiesse 1939; L. Szarkowska 1953), kwas jabłkowy (P. Szafrański i E. A. Sym 1950) i kwas szczawiowo-octowy (N. L. Edson 1951). Stwierdzono również występowanie w ciele *Mycobacterium* szeregu enzymów katalizujących powstawanie wymienionych wyżej kwasów (N. L. Edson 1951). Dane powyższe wskazują na możliwość występowania cyklu Krebsa w przemianie materii prątka, jakkolwiek synteza tych związków może zachodzić w organizmie również w wyniku odmiennych przebiegów reakcji chemicznych.

Z drugiej strony badania i rozważania Krebsa (H. A. Krebs 1952) nad ilościową rolą cyklu u różnych drobnoustrojów pozwalają przypuszczać, że cykl kwasów trójkarboksylowych w metabolizmie prątka nie odgrywa tak poważnej roli, jak w mechanizmie spalania komórkowego zwierząt. Niemniej jednak poszukiwanie kwaśnych produktów dysymilacji u *Mycobacterium* dopomóc może w rozwiązaniu zasadniczych problemów przemiany materii i energii tych drobnoustrojów.

Śladowe ilości kwasów organicznych jako metabolitów prątka oraz stosunkowo mała czułość metod analitycznych opracowanych dla tej grupy związków, nawet takich, jak chromatografia, sprawia, że pierwszy etap badania musi polegać na ich gromadzeniu. Klasyczny sposób nagromadzania w podłożu kwasów organicznych w postaci ich trudno rozpuszczalnych soli (C. G. Anderson 1946) nie znajduje tu zastosowania z uwagi na minimalne ilości występujących w podłożu produktów dysymilacji. Stosowanie inhibitorów stwarza niebezpieczeństwo uruchomienia nietypowych dróg metabolicznych na skutek olbrzymich możliwości adaptacyjnych drobnoustrojów (M. Stephenson 1949). Nie rozwiązuje również całkowicie zagadnienia technika przemytych zawiesin (R. O. Loebel, E. Shorr i H. B. Richardson 1933) i preparatów enzymatycznych. W tym ostatnim przypadku praca w całkowitym oderwaniu od żywej komórki oraz możliwości występowania enzymów adaptywnych i konstytucyjnych może dać obraz znacznie odbiegający od rzeczywistego przebiegu metabolizmu w komórce. W poszukiwaniu odpowiedniej metody udało się opracować sposób, który pozwala gromadzić produkty dysymilacji żywej kultury drobnoustrojów, rozpuszczalne w organicznych rozpuszczalnikach. Zaletą tej metody jest możność gromadzenia metabolitów przy małym niebezpieczeństwie uszkodzenia normalnych łańcuchów reakcji komórkowych. Metoda ta pozwala również na izolację tych substancji od podłoża, na którym rozwijają się badane drobnoustroje. Obiektem badań był szczep *Mycobacterium* 279. Do wyboru tego szczepu skłoniło nas podobieństwo metabolizmu do chorobotwórczego szczepu ludzkiego *H37 Rv*, który stanowi właściwy przedmiot badań naszego zespołu, a nad którym szczep *Mycobacterium 279* góruje szybkością wzrostu.

http://rcin.org.pl

## Zasada metody

Metoda polega na ciągłej ekstrakcji metabolitów z podłoża, na którym żyją drobnoustroje. Opracowano dwa typy aparatury do ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi, lżejszymi i cięższymi od wody. Działanie obu urządzeń opiera się na tej samej zasadzie.

Podstawą metody jest ciągłe krążenie rozpuszczalnika, który przepływając przez pożywkę wypłukuje produkty dysymilacji i przenosi je do bocznego naczyńka. Z naczyńka tego destyluje się czysty rozpuszczalnik, który się skrapla w chłodnicy zwrotnej i spływa do pożywki powtarzając ten sam cykl. Urządzenie jest skonstruowane w ten sposób, że rozpuszczalnik przepływając przez podłoże nie styka się bezpośrednio z kożuchem drobnoustrojów. Kultura kontaktuje się tylko z tą częścią rozpuszczalnika, która jest rozpuszczalna w pożywce. W celu uniknięcia nadmiernego nagromadzenia par rozpuszczalnika w fazie gazowej, z którą stykają się bezpośrednio drobnoustroje, zastosowano ciągłe przewietrzanie aparatury. Do ekstrakcji można użyć rozpuszczalników organicznych nie mieszających się z wodą, lżejszych lub cięższych od niej pod warunkiem, że ilości, które rozpuszczają się w pożywce, nie będą oddziaływały szkodliwie na badane drobnoustroje. O wyborze rozpuszczalnika decyduje również jego temperatura wrzenia. Temperatura ta nie powinna przekraczać temperatury rozkładu substancji, których poszukujemy wśród metabolitów. Spośród rozpuszczalników, które można by zastosować w tej metodzie, przebadano eter i chloroform.

Należy zaznaczyć, że po wprowadzeniu odpowiedniej modyfikacji aparatury opisywana metoda może służyć także do badania kultur rosnących głębinowo.

## Opis aparatury

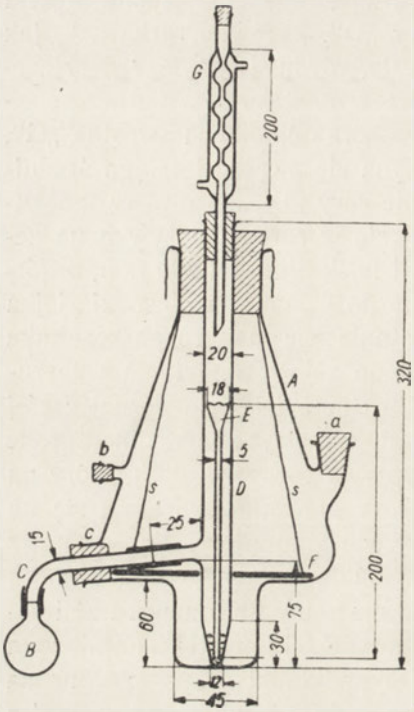
Przedstawione na rys. 1 urządzenie służy do przyżyciowej ekstrakcji metabolitów rozpuszczalnikami organicznymi lżejszymi od wody. Urządzenie to składa się z następujących części: kolby Erlenmeyera „A", okrągłodennej kolby „B", rurki „C", szerokiej rury „D", lejka „E", podkładki „F" oraz chłodnicy „G". Cała aparatura wykonana jest ze szkła jenajskiego. Kolba Erlenmeyera „A" o pojemności 1,5 l jest naczyniem hodowlanym. Ma ona trzy dodatkowe otwory, z których otwór „a" służy do posiewów, „b" do przewietrzania aparatury; przez otwór „c" natomiast kontaktuje się wewnętrzna część urządzenia z kolbą okrągłodenną „B", umieszczoną na zewnątrz. Kolba Erlenmeyera ma również u dołu tubus długości 60 mm i średnicy 45 mm, który ma na celu zaoszczędzenie pożywki oraz przedłużenie drogi styczności rozpuszczalnika z podłożem. Okrągłodenna kolba „B" z krótką szyjką, o pojemności 100 ml, łączy się za pomocą węża gumowego z rurką „C", zgiętą pod kątem 120°, która poprzez gumowy korek osadzony w otworze „c" do-

http://rcin.org.pl

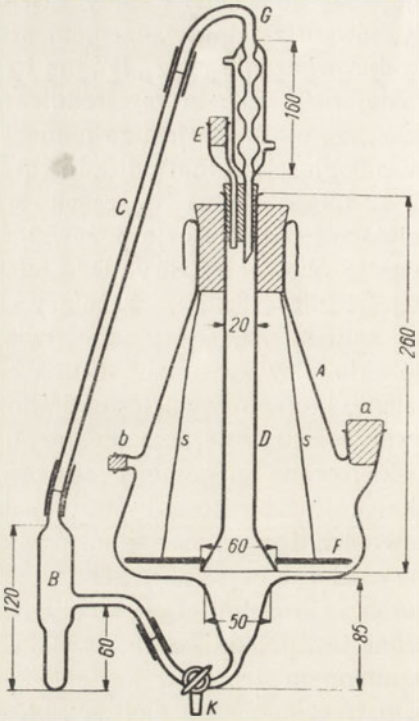
staje się do wnętrza kolby Erlenmeyera. Rurka „c" jest połączona wężem gumowym z odprowadzeniem szerokiej rury „D". Zarówno rurka „c", jak i odprowadzenie rury „D" ma to samo światło, równe 15 mm. U góry szerokiej rury „D", której średnica wewnętrzna wynosi 20 mm i długość — 320 mm, osadzona jest za pomocą drzewnego korka chłodnica zwrotna „G". W odległości 30 mm od dołu rura „D" zaczyna się zwężać i osiąga średnicę 12 mm na dole. Zwężające się zakończenie rury „D" ma otwory umożliwiające lepszą dyfuzję pożywki, znajdującej się w rurze z pożywką na zewnątrz. Wewnątrz rury „D" umieszczony jest lejek długości 200 mm, o górnej średnicy 18 mm, zwężający się następnie do 5 mm. Na obwodzie lejka są zagłębienia, które umożliwiają przedostanie się par rozpuszczalnika do chłodnicy zwrotnej. Dolna część jest ślepo zakończona i ma wybrzuszenie, którego zewnętrzna średnica wynosi 10 mm. Dookoła górnej części wybrzuszenia znajdują się trzy małe otworki, symetrycznie rozmieszczone i skierowane ku górze. Przez otworki te wypływa rozpuszczalnik, który na skutek stożkowatego kształtu zakończenia rury „D" nie wydostaje się na zewnątrz, lecz unosi się na powierzchni pożywki znajdującej się wewnątrz rury. Górna część rury „D" osadzona jest w kolbie Erlenmeyera za pomocą korka z silnie ugniecionej waty. Na szerokim dnie kolby Erlenmeyera umieszczona jest podkładka „F", wykonana z gazy młyńskiej napiętej na stalowym ogumionym drucie w kształcie podkowy. Do podkładki przymocowane są symetrycznie cztery nici „s", których końce wyprowadzone są na zewnątrz poprzez górną część kolby Erlenmeyera. Umożliwiają one dowolne podnoszenie podkładki „F", która służy do podtrzymywania kożucha bakteryjnego w momencie rozpoczęcia ekstrakcji. Zarówno górny koniec chłodnicy „G", jak i otwór do posiewów „a" oraz otwór do przewietrzania aparatury „b" są odizolowane od zewnątrz za pomocą korka z waty. Przewietrzanie aparatury odbywa się przez połączenie odprowadzenia „b" z pompą wodną. Między otworem „b" i pompą ustawia się płuczkę, która umożliwia lepszą kontrolę ilości powietrza przeciąganego przez aparaturę. Dokładne wymiary opisywanego urządzenia podaje rys. 1. Wielkości te mogą oczywiście ulec zmianie. W celu utrzymania jednak prawidłowej czynności aparatury należy zwrócić specjalną uwagę na zachowanie proporcji między wymiarami lejka „E", rury „D" i rurki „C".

Rys. 2 przedstawia urządzenie do ekstrakcji metabolitów rozpuszczalnikami organicznymi cięższymi od wody. Jest ono również wykonane ze szkła jenajskiego i ma części, których działanie jest zbliżone do części poprzedniego urządzenia. Kolba Erlenmeyera „A" o pojemności 1,5 l jest tu także naczyniem hodowlanym. Otwór „a" w tej kolbie służy do posiewów, „b" zaś do przewietrzania aparatury. U dołu kolby znajduje się wybrzuszenie o pojemności 100 ml, służące jako zbiornik rozpuszczalnika i zakończone trójdzielnym kranem „K". Pionowa rurka tego kranu służy

http://rcin.org.pl




Rys. 1




Rys. 2

do wypuszczania pożywki pobakteryjnej po skończonej ekstrakcji. Pozioma rurka, zgięta pod kątem 45°, jest połączona wężem gumowym z bocznym odprowadzeniem naczyńka destylacyjnego „B". Naczyńko to o pojemności 80 ml łączy się za pomocą węża gumowego z rurką „C", owiniętą sznurem azbestowym. W swej górnej części rurka „C" jest połączona wężem gumowym z chłodnicą „G", której drugi koniec jest osadzony za pośrednictwem drzewnego korka w szerokiej rurze „D". U dołu rury „D" jest rozszerzenie w kształcie lejka o średnicy nieco większej niż wybrzuszenie dolnej części kolby Erlenmeyera. Rozszerzenie to zabezpiecza drobnoustroje żyjące na powierzchni pożywki przed bezpośrednim zetknięciem z ewentualnie unoszącymi się kropelkami rozpuszczalnika znajdującego się w wybrzuszeniu kolby „A". Obok chłodnicy „G" w rurze „D" umieszczony jest lejek „E", który służy do wlewania rozpuszczalnika przed rozpoczęciem ekstrakcji. Na dnie kolby Erlenmeyera znajduje się podkładka „F" w kształcie koła z otworem w środku, wykonana podobnie jak w poprzednim urządzeniu i spełniająca to samo zadanie. Wymiary podane na rys. 2 mogą ulegać zmianie z zachowaniem jednak odpowiedniego stosunku objętości dolnego wybrzuszenia kolby Erlenmeyera i naczyńka

http://rcin.org.pl

destylacyjnego „B". Ważne jest również światło rurki łączącej obie te części, ponieważ od niej w dużej mierze zależy wysokość umiejscowienia naczyńka destylacyjnego. Prawidłowe działanie urządzenia można również regulować poziomem pożywki w kolbie Erlenmeyera.

## Zastosowanie opisywanej metody do gromadzenia metabolitów *Mycobacterium 279*

W celu zbadania przydatności metody wykonano szereg doświadczeń używając *Mycobacterium 279* (Muzeum PZH w Warszawie) z zastosowaniem eteru etylowego jako rozpuszczalnika. W pierwszym etapie chodziło o skontrolowanie, czy gromadzenie metabolitów istotnie ma miejsce. Zmontowany ekstraktor umieszczano w statywie i w ciągu pół godziny jałowiono w autoklawie w temp. 120°. Do hodowli używano pożywki DGK E. A. Sym. 1949), zmodyfikowanej w ten sposób, że pominięto kwas cytrynowy i cytrynian żelazowoamonowy, a włączono siarczan żelazowy. Glikozę do pożywki sterylizowano osobno w małej ilości wody, co pozwalało uniknąć karmelizacji. Przygotowaną w ten sposób pożywkę przelewano do jałowego ekstraktora tak, aby poziom pożywki sięgał bocznego odprowadzenia szerokiej rury „D" (rys. 1). Objętość pożywki wynosiła 350 ml. Wysiewano następnie szczep *Mycobacterium 279,* po czym aparaturę umieszczano w kabinie termostatowej. Po otrzymaniu dobrze rozwiniętego kożucha, co trwało 4—5 dni, podnoszono za pomocą nici podkładkę „F" aż do zetknięcia się z powierzchnią kożucha bakteryjnego. Do chłodnicy zwrotnej doprowadzano wodę, łączono otwór „b" poprzez płuczkę z pompą wodną i rozpoczynano przewietrzanie urządzenia. Przez górny otwór chłodnicy zwrotnej wlewano 30 ml jałowego 40% kwasu fosforowego. Cała pożywka zakwaszała się w ten sposób do wartości pH 1,8 — 2,0, co umożliwiało ekstrakcję kwaśnych produktów dysymilacji rozpuszczalnych w eterze. Następnie wlewano 80 ml eteru etylowego, który poprzez lejek „E" i pożywkę w rurze „D" przedostawał się do okrągłodennej kolby „B". W kolbie tej znajdowały się okruchy porcelany (przeciw przegrzaniu), wrzucone przed jałowieniem ekstraktora. Przyrząd ustawiano w ten sposób przy ultratermostacie Hoepplera, że okrągłodenna kolba „B" zanurzała się w wodzie o temp. 50°. W czasie ekstrakcji ma miejsce lekkie falowanie pożywki, co z jednej strony umożliwia lepsze wymieszanie podłoża, z drugiej zaś mogłoby być powodem zatopienia kożucha bakteryjnego. Temu ostatniemu przeciwdziała podkładka z gazy młyńskiej. W ten sposób wykonano trzy doświadczenia ekstrahując podłoże pod żywą kulturą w ciągu 40, 50 i 60 godzin. Ponieważ ekstrakcję prowadzono z przerwami nocnymi, *Mycobacterium* wystawione było na działanie rozpuszczonego w pożywce eteru przez 78, 104 i 126 godzin.

http://rcin.org.pl

We wszystkich trzech przypadkach przesiane po zakończeniu ekstrakcji drobnoustroje rozwijały się nie wykazując żadnego zahamowania wzrostu. Po zakończonym ługowaniu wykonano analizy na zawartość kwasu jabłkowego w pożywce pobakteryjnej i ekstrakcie w kolbie „B". Oznaczenie kwasu jabłkowego przeprowadzano według metody Puchera, Vickeryego i Wakemana, odpowiednio zmodyfikowanej (P. Szafrański 1952). W celu sprawdzenia, czy ekstrakt eterowy nie zawierał glikozy, która przeszkadza w analizie kwasu jabłkowego, używano metody ilościowej do oznaczeń cukrów, opartej na powstawaniu furfuralu lub jego pochodnych (M. Mendel i P. L. Hoogland 1950). Oprócz wymienionych analiz wykonywano w ekstrakcie eterowym oznaczenia całkowitej zawartości węgla. Oznaczenia węgla i kwasu jabłkowego przeprowadzono w tych samych próbkach, przy czym wyciąg eterowy przygotowywano w następujący sposób: po odłączeniu od aparatury kolbki destylacyjnej z ekstraktem oddestylowywano eter, po czym pozostałość rozpuszczano w wodzie, sączono, przelewano do 100 ml kolby miarowej i uzupełniano wodą. Z kolby tej pobierano 1 ml do oznaczenia glikozy. Wykonywane próby nie wykazywały obecności cukru. Do analizy na oznaczenie kwasu jabłkowego pobierano z kolby miarowej dalszych 25 ml, które odparowywano na łaźni wodnej, dodawano 1,5 ml stężonego kwasu siarkowego i ogrzewano na łaźni 5 minut. Ogrzewanie prowadzono w celu rozłożenia substancji, które mogłyby przeszkadzać w oznaczaniu kwasu jabłkowego. Następnie rozcieńczano próbkę wodą do 25 ml i gotowano 10 min. usuwając w ten sposób przeszkadzające, lotne substancje. Pozostały roztwór sączono, uzupełniano wodą do 25 ml i oznaczano kwas jabłkowy. Z pozostałej w kolbie miarowej cieczy brano dalszych 50 ml do analizy na węgiel. Do badań używano wygodnej i szybkiej metody Sarnströma-Corleisa (M. Struszyński 1950), przystosowanej do analizy cieczy. Metoda ta daje do 2% błędu. W końcowym momencie analizy zamiast oznaczeń wagowych stosowano miareczkowanie, przy czym absorbentem dwutlenku węgla był 0,02 n roztwór wodorotlenku barowego. Oznaczenie węgla pozwalało ustalić, jaka część całkowitej ilości węgla ekstraktu przypada na węgiel kwasu jabłkowego. Przed wykonaniem właściwych analiz przeprowadzono w identyczny sposób ślepe próby związane z oznaczeniem kwasu jabłkowego i węgla. W badaniach zawartości kwasu jabłkowego w pożywce pobakteryjnej oparto się na ślepej próbie podanej w poprzedniej pracy, dotyczącej metodyki oznaczania kwasu jabłkowego (P. Szafrański 1952). Wynosiła ona dla pożywki DGK 150 γ kwasu. Przy badaniu wyciągu eterowego wykonano dwie ślepe próby na kwas jabłkowy stosując 50 i 60-godzinną ekstrakcję wyjściowej pożywki DGK. W pierwszym przypadku otrzymano ślepą próbę równą 480 γ, w drugim — 500 γ kwasu jabłkowego. Przyjęto średni wynik 490 γ. W tych samych próbkach wykonano

http://rcin.org.pl

ślepą próbę oznaczenia węgla. Przy 50-godzinnej ekstrakcji ślepa próba wynosiła 28,32 mg węgla, przy 60 godzinach 27,36 mg węgla. Przyjęty średni wynik wynosi 27,84 mg C. Wobec wysokich wartości ślepej próby nie należałoby stosować tej metody jako bieżącej. W doświadczeniach tych wykonanym analizom węgla przypisywano tylko wartości orientacyjne. Otrzymane rezultaty zebrane są w tabl. 1.

W kolumnie 7 zestawione są wyniki oznaczeń kwasu jabłkowego w wyciągu eterowym. Wielkości te, przeliczone na 1 g suchej masy bakteryjnej, zebrane są w kolumnie 9. Następna kolumna podaje wartości kwasu jabłkowego na 1 g suchej masy drobnoustrojów w pożywce po ekstrakcji. Kolumna 11 zawiera całkowite ilości kwasu jabłkowego, wytworzonego przez *Mycobacterium* w warunkach doświadczeń. Wielkości te są przeliczone na 1 g suchej masy bakteryjnej i stanowią sumę liczb z rubryki 9 i 10.

Przeciętna produkcja kwasu jabłkowego przez szczep *Mycobacterium 279,* rozwijający się na pożywce DGK w warunkach normalnych, wynosi 3,02 mg na 1 g suchej masy drobnoustrojów (L. Szarkowska P. Szafrański 1954). Porównanie tej wielkości z wartościami zebranymi w kolumnie 11 wyraźnie wskazuje na nagromadzenie się kwasu jabłkowego. Przy 40-godz. ekstrakcji gromadzenie to wynosi 167%, przy 50-godz. — 237% i przy 60-godz. ekstrakcji sięga 280%. Otrzymane wyniki przemawiają za istnieniem równowagi między stężeniem kwasu jabłkowego, występującym w ciele drobnoustroju i w podłożu. Dzięki takiej równowadze obniżenie stężenia kwasu jabłkowego w pożywce przyśpiesza jego syntezę wewnątrzkomórkową i umożliwia dalszą dyfuzję tego produktu pośredniego z ciała bakteryjnego do podłoża. Kolumny 8 i 12 podają ilości kwasu jabłkowego w mg i mg %, pozostające w pożywce po ekstrakcji. Wielkości te wskazują, że w miarę przedłużania okresu ługowania zawartość kwasu jabłkowego w pożywce ulega nieznacznemu zmniejszeniu. Dowodzi to osiągnięcia granicznego stężenia uwarunkowanego współczynnikiem podziału, które praktycznie bardzo ciężko przekroczyć. Liczby podane w rubryce 10 pozornie wskazują na zwiększenie zawartości kwasu jabłkowego w pożywce w miarę przedłużania okresu ekstrakcji. Wartości te odnoszą się do 1 g suchych drobnoustrojów, a więc są uzależnione od ilości mas bakteryjnych podanych w kolumnie 6. Opierając się na danych z kolumny 11 oraz znając średnią ilość kwasu jabłkowego, wytwarzanego przez *Mycobacterium 279* w normalnych warunkach rozwoju, wyliczono przeciętną szybkość dyfuzji tego intermediatu z ciała bakteryjnego do pożywki. Otrzymane wartości są zebrane w kolumnie 15 i odnoszą się do okresu obejmującego rozpoczęcie ekstrakcji do jej zakończenia (kolumna 5). Osiągnięte rezultaty wskazują na zwiększenie szybkości dyfuzji w miarę obniżenia stężenia kwasu jabłkowego w pożywce. Szybkość ta rośnie w przypadku zmniejszenia masy żyjących bakterii. Wielkości dotyczące szybkości dyfuzji są prawdopo-

http://rcin.org.pl

Tablica 1

| Nr doświadczenia | Szczep | Ilość pożywki DGK (bez kw. cytryn w ml) | Czas wzrostu do rozpoczęcia ekstr. w dn. | Ekstr. eterem etylowym wg godz. | Czas działania rozpuszczalnego w pożywce eteru na drobnoustroje w godz. | Ilość drobnoustrojów w g suchej masy | Kw. jabłkowy w ekstrakcie w mg | Kw. jabłkowy w pożywce po ekstrakcji w mg | Ilość mg kw. jabłkowego na 1 g suchej masy drobnoustrojów w ekstrakcie | Ilość mg kw. jabłkowego w pożywce po ekstrak. na 1 g suchej masy drobnoustrojów | Całkowita ilość kw. jabłkowego w mg. na 1 g suchej masy drobnoustroj. w ekstr. i w pożywce | Kw. jabłkowy w pożywce po ekstrakcji w mg % | Całkowity węgiel w ekstrakcie w mg | C kw. jabłkowego: C całkow. w ekstr. x 100 | Przeciętna szybkość dyfuzji kw. jabłkowego z ciała drobnoustroj. do podłoża w mg. na 1 g. suchej masy drobnoustrojów w ciągu 1 godz. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Mycobacterium 279 | 350 | 4 | 40 | 78 | 2,5 | 8,01 | 4,65 | 3,20 | 1,86 | 5,06 | 1,32 | — | — | 0,023 |
| 2 | Mycobacterium 279 | 350 | 4 | 50 | 104 | 2,10 | 10,51 | 4,47 | 5,04 | 2,12 | 7,16 | 1,27 | 8,16 | 46,0 | 0,039 |
| 3 | Mycobacterium 279 | 350 | 5 | 60 | 126 | 1,40 | 7,51 | 4,35 | 5,36 | 3,10 | 8,46 | 1,24 | 7,68 | 35,0 | 0,043 |
| Nr rubr. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |

http://rcin.org.pl

dobnie w rzeczywistości mniejsze, ponieważ w przeliczeniach nie brano pod uwagę przybytku masy bakteryjnej w czasie ekstrakcji. Dane z dwóch pierwszych doświadczeń w kolumnie 10 wykazują, że ilości kwasu jabłkowego, pozostające w pożywce po ekstracji, są mniejsze od przeciętnej ilości tego kwasu wytwarzanego przez badany szczep bez stosowania ekstrakcji. Dowodzi to, że szybkość dyfuzji kwasu jabłkowego z ciała bakteryjnego do podłoża jest przy tej ilości masy bakteryjnej mniejsza od szybkości ekstrakcji wspomnianego kwasu. W doświadczeniu 3 przy zawartości 1,40 g suchej masy drobnoustrojów dyfuzja nadążała już za szybkością ekstrakcji. Wynika to z ilości kwasu jabłkowego w pożywce pobakteryjnej, które dzięki istnieniu wspomnianej równowagi pozostawały niezmienione mimo ciągłego usuwania tego produktu pośredniego z podłoża. W kolumnie 13 jest podany całkowity węgiel wyekstrahowanych substancji. Otrzymane liczby wskazują na bardzo nieznaczne wytwarzanie metabolitów rozpuszczalnych w eterze etylowym, przy czym 35,0% bądź 46,0% węgla ekstraktu przypadało w 2 analizach na węgiel kwasu jabłkowego.

### Identyfikacja kwasów organicznych jako metabolitów *Mycobacterium 279* z zastosowaniem wyżej opisanej metody

W poszukiwaniach produktów przemiany materii *Mycobacterium 279* ograniczono się do kwasów organicznych, stosując do ich identyfikacji metodę chromatograficzną i spektrofotometryczną. W celu nagromadzenia kwasów wykonano 3 ekstrakcje używając jako rozpuszczalników eteru etylowego oraz chloroformu. Tego rodzaju rozpuszczalniki pozwalają wyeliminować aminokwasy, dodawane do pożywek w postaci substratu oraz występujące w podłożu jako metabolity *Mycobacterium* (C. Pouletta i A. Deferanceschi 1952). Oddzielenie ich jest ważne, ponieważ mogłyby interferować w późniejszym toku analizy. W jednej z ekstrakcji eterem zastosowano do pożywki dodatek taurocholanu sodowego. Spełniał on tu rolę detergenta, którego działanie na drobnoustroje może być wielorakie w zależności od stężenia (G. Weitzel 1952). Koncentracje taurocholanu sodowego, obniżające napięcie powierzchniowe do 42 dyn/cm, wpływa zabójczo na prątki gruźlicy typu ludzkiego. Saprofity są bardzej odporne — np. *Mycobacterium phlei* wytrzymuje poniżej 30 dyn/cm (L. M. Model 1952). Mniejsze jednak stężenia detergentów nie działają bakteriobójczo, powodują natomiast zwiększoną dyfuzję produktów przemiany materii z ciała bakteryjnego do podłoża. Wychodząc z tego założenia dodawano do pożywki roztworu detergentu przygotowanego w następujący sposób: rozpuszczano 0,9 g taurocholanu sodowego w 25 ml wody, sączono przez filtr Seitza, po czym przez ten sam filtr sączono 15 ml 80% kwasu fosforowego. Wyjałowiony roztwór wlewano przez otwór w chłodnicy

http://rcin.org.pl

do 350 ml pożywki DGK na 24 godziny przed rozpoczęciem ługowania. W ten sposób pożywkę zakwaszano do wartości pH 1,8 — 2,0 i obniżano napięcie powierzchniowe roztworu, które mierzone w tych warunkach wynosiło 47 dyn/cm. Dalsze czynności dotyczące ekstrakcji były identyczne z opisanymi poprzednio. Po zakończeniu ekstrakcji, która w trzech przypadkach trwała 80 godzin, odłączano od aparatury naczyńka destylacyjne, a wyciągi eterowe i chloroformowy odparowywano na łaźni wodnej. Pozostałość rozpuszczano w 50 ml wody, sączono i miareczkowano $\approx$ 0,2 KOH wobec błękitu bromofenolowego. Ciecz odparowywano następnie w strumieniu ciepłego powietrza. Suchą pozostałość natomiast rozcierano na proszek i kilkakrotnie ługowano eterem etylowym bądź chloroformem, w zależności, od tego, który z rozpuszczalników był użyty do początkowej ekstrakcji pożywki. Rozpuszczalniki odparowywano na łaźni wodnej, a pozostałość rozpuszczano w 3 ml wody i poddawano zstępującej chromatografii.

W trakcie zobojętniania badanego roztworu do wartości pH 3,7 powstawał pierwszorzędowy fosforan potasowy, nierozpuszczalny w eterze etylowym. Umożliwiało to oddzielenie kwasu fosforowego od badanych substancji. Nie oddzielony kwas fosforowy uniemożliwiał chromatograficzną analizę zasłaniając plamy identyfikowanych substancji. Podczas miareczkowania jednak wszystkie kwasy organiczne o stałej dysocjacji, zbliżonej do I-stopniowej dysocjacji kwasu fosforowego, ulegały również zobojętnieniu i stawały się nieroztwarzalne w stosowanych rozpuszczalnikach. Ujemną cechą tej metody jest jednoczesne usunięcie części metabolitów, ponieważ do eteru czy też chloroformu przechodziły tylko słabe kwasy organiczne o stałej dysocjacji, znacznie mniejszej od kwasu fosforowego. Z drugiej jednak strony wyeliminowanie pewnych kwasów stwarza większe możliwości chromatograficznego oznaczenia pozostałych substancji. W badaniach chromatograficznych jako kamery używano naczynia Dewara o dł. 450 mm i świetle 100 mm, przykrytego u góry szklanym kapturem nieco większym od zewnętrznej średnicy naczynia. Między kapturem i naczyniem Dewara znajdował się gumowy pierścień uszczelniający. U góry kaptura pozostawiono otwór, przez który przechodziła szklana rurka o średnicy 10 mm, osadzona w gumowym korku. Dolny koniec rurki, znajdujący się w kamerze, miał zakończenie w kształcie lejka o średnicy 6,5 mm. W ten sposób przez górny otwór w rurce poza kamerą można było wlewać ciecz do lejka znajdującego się wewnątrz naczynia. Badania przeprowadzano w temperaturze pokojowej, przy czym wahania wewnątrz kamery nie przekraczały $2^0$. Fazę ruchomą stanowił w tych doświadczeniach fenol nasycony wodą, fazę zaś nieruchomą — woda nasycona fenolem. Atmosferę w kamerze nasycano parami kwasu mrówkowego. W badaniach używano bibuły Whatmana nr 1, pociętej na paski o wymiarach 31 $\times$ 1 cm. Paski te zawieszano w kamerze na lejku, przy czym do przytrzymywania ich stoso-

http://rcin.org.pl

wano szklane kulki, którymi napełniano lejek. Wywoływanie plam przeprowadzano przez zwilżenie paska bibuły innym kawałkiem bibuły, nasyconym 0,04% alkoholowym roztworem błękitu bromofenolowego. Poza tym metoda naszych chromatograficznych oznaczeń nie odbiegała zasadniczo od powszechnie przyjętej w tego rodzaju analizach (R. Consden, A. H. Gordon i A. J. P. Martin 1944; J. W. H. Lugg i B. T. Overell 1947; J. Opieńska-Blauth, O. Sakławska-Szymonowa i M. Kański 1950). Wyniki badań chromatograficznych zebrano w tablicy 2.

Przed rozpoczęciem właściwych doświadczeń wykonano trzy 80-godzinne ekstrakcje z pożywkami wyjściowymi. W dwóch pierwszych rozpuszczalnikiem był eter etylowy, przy czym w doświadczeniu drugim stosowano pożywkę z dodatkiem taurocholanu sodowego. Trzecia ślepa próba polegała na ekstrakcji podłoża wyjściowego chloroformem. Postępowanie z otrzymanymi wyciągami było identyczne jak z próbami właściwymi opisanymi wyżej. We wszystkich trzech ślepych oznaczeniach wywołane chromatogramy nie wykazywały obecności kwaśnych substancji. Analiza chromatograficzna wyciągu otrzymanego w pierwszym właściwym doświadczeniu wykazała obecność czterech kwasów, z których dwa przy porównaniu $R_F$ z próbkami wzorcowymi wskazywały na kwasy p-aminobenzoesowy i nikotynowy. Chromatografia ekstraktu z drugiego doświadczenia potwierdziła poprzedni wynik, przy czym dodatek detergentu do pożywki znacznie zwiększył ilości występujących kwasów. Z intensywności plam można było wnosić, że dodatek taurocholanu sodowego zwiększał nagromadzenie kwasów około 10-ciokrotnie. W doświadczeniu trzecim z chloroformem nie otrzymano tak wyraźnych wyników, jak w dwóch poprzednich. Wpłynął na to przede wszystkim bardzo niekorzystny współczynnik podziału kwasów organicznych między pożywką i chloroformem oraz poważny wpływ tego rozpuszczalnika na drobnoustroje. Przesiane po 10-godzinnej ekstrakcji chloroformem *Mycobacterium 279* dało znacznie osłabiony wzrost, po 80-godzinnym ługowaniu nie otrzymano już wzrostu. Niewątpliwie statyczne działanie chloroformu miało tu poważny wpływ; przeprowadzone jednak w aparacie Syma (E. A. Sym 1950) badania ze szczepem *H37 Rv* wykazały, że 48-godzinny wpływ rozpuszczonego w pożywce chloroformu zmniejszał wykorzystanie glikozy tylko do 59% w stosunku do kontroli, a więc nie hamował całkowicie czynności metabolicznych. W doświadczeniu trzecim stwierdzono obecność trzech słabych plam, przy czym trzeciej plamy, składającej się prawdopodobnie z kwasów p-aminobenzoesowego i nikotynowego, nie udało się rozdzielić przy tak niskim stężeniu. Występowanie wielu związków o zbliżonych $R_F$ stwarza w analizie chromatograficznej możliwość pomyłek, tak że określenie plamy nie zawsze daje pewność identyfikacji. W celu kontroli te same próbki poddano zatem

http://rcin.org.pl

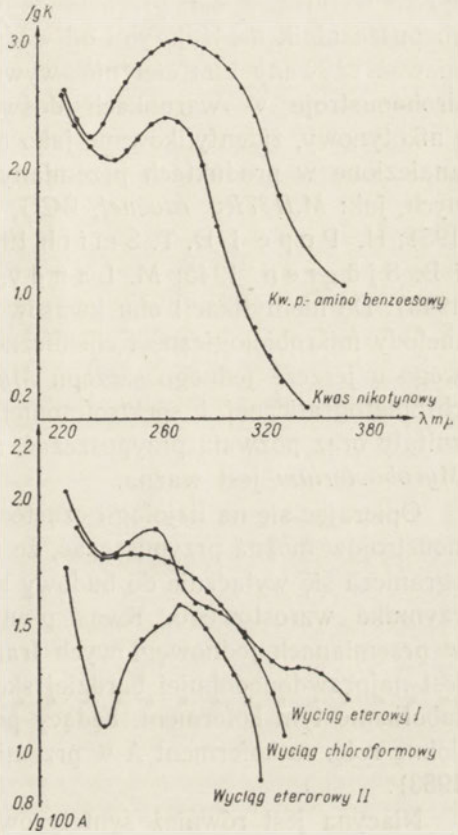
Tablica 2

| Nr doświadczeń | Szczep | Rodzaj pożywki | Czas wzrostu drobnoustr. do rozpocz. ekstrak. w dn. | Ekstrakcja ciągła w godz. | Rozpuszczalnik | Chromatografia bibułowa wyekstrahowanych kwasów organicznych | | | | | | | | Uwagi |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | układ | wskaźnik | kolejny nr plam | Dane dotyczące poszczeg. plam | | | $R_F$ kw. p-aminobenzoesowego | $R_F$ kw. nikotynowego | |
| | | | | | | | | | x | y | x/y = $R_F$ | | | |
| 1 | Mycobact. 279 | DGK (bez kwasu cytrynowego) | 6 | 80 | eter etylowy | fenol-woda kw. mrówkowy | błękit bromofenolowy | 1 | 3,3; 2,5<br>2,9 | 25,6<br>25,0<br>25,0 | 0,12; 0,10<br>0,11 | | | 1 plama b. wyraźna |
| | | | | | | | | 2 | 4,7; 5,4<br>4,7 | 25,7<br>25,5<br>25,5 | 0,18; 0,21<br>0,18 | | | 2 plama mniej wyr. |
| | | | | | | | | 3 | 22,0<br>21,9<br>22,0 | 26,3<br>26,3<br>25,9 | 0,83; 0,83<br>0,85 | 0,84<br>0,83<br>0,86 | | 3 plama wyraźna |
| | | | | | | | | 4 | 24,2<br>24,7<br>24,0 | 26,3<br>26,3<br>25,9 | 0,92<br>0,93<br>0,92 | | 0,89<br>0,91<br>0,90 | 4 plama wyraźna |
| 2 | Mycobact. 279 | DGK (bez kw. cytrynowego + 0,9 g. taurochol sod.) | 10 | 80 | eter etylowy | fenol-woda kw. mrówkowy | błękit bromofenolowy | 1 | 2,6; 1,5<br>3,5 | 25,6; 25,3<br>25,0 | 0,10; 0,06<br>0,14 | | | Wszystkie plamy bardzo wyraźne |
| | | | | | | | | 2 | 4,1; 3,0<br>4,8 | 25,6; 25,3<br>25,0 | 0,15; 0,11<br>0,19 | | | |
| | | | | | | | | 3 | 21,0; 20,1<br>20,2 | 25,6; 25,3<br>25,0 | 0 82; 0,79<br>0,80 | 0,81; 0,82<br>0,85 | | |
| | | | | | | | | 4 | 21,7; 22,2<br>24,0 | 25,3; 25,0<br>26,5 | 0,85; 0,83<br>0,90 | | 0 87; 0,93<br>0,88 | |
| 3 | Mycobact. 279 | DGK (bez kwasu cytrynowego) | 7 | 80 | chloroform | fenol-woda kw. mrówkowy | błękit bromofenolowy | 1 | 2,6; 3,1<br>3,7 | 25,7; 26,0<br>25,4 | 0,10; 0,11<br>0,14 | | | Wszystkie plamy mało wyraźne |
| | | | | | | | | 2 | 5,5; 4,7<br>4,9 | 25,6; 26,0<br>25,4 | 0,21; 0,18<br>0,19 | | | |
| | | | | | | | | 3 | 21,0; 21,9<br>21,6 | 25,5; 25,6<br>25,6 | 0,82; 0,85<br>0,84 | 0,83; 0,84<br>0,88 | 0 89; 0,88<br>0,90 | |

http://rcin.org.pl

badaniom spektrofotometrycznym. Analizy wykonywano przy użyciu spektrofotometru Bekmana, rozcieńczając dziesięciokrotnie stosowane do chromatografii ciecze. Jako odnośników używano rozcieńczonych w ten sam sposób ślepych prób, branych poprzednio również do chromatografii.

Załączone wykresy w pełni potwierdzają wyniki analizy chromatograficznej. Minimum absorpcji trzech badanych cieczy wynosi 235 mμ i znajduje się w środku minimów absorpcji PAB-u i kwasu nikotynowego. Wskazywałoby to na obecność obu związków. Maksimum absorpcji pierwszego wyciągu eterowego i chloroformowego są nieco przesunięte w stosunku do wzorców. Przesunięcie to jest najprawdopodobniej spowodowane obecnością domieszek innych związków. Występuje to wyraźnie przy pierwszym wyciągu eterowym, gdzie krzywa ma kilka maksimów i minimów absorpcji. Widmo ekstraktu chloroformowego wskazuje na nieznaczną obecność związków absorbujących, przy czym kształt krzywej dowodzi raczej większej zawartości kwasu p-aminobenzoesowego. Wyciąg eterowy drugi (pożywka z dodatkiem detergentu) swoim minimum absorpcji potwierdza również obecność obu kwasów; maksimum natomiast leży w granicach PAB. W kierunku widzialnej części widma absorpcja badanych cieczy wyraźnie maleje, co dowodzi nieobecności związków nienasyconych z większą ilością sprzężonych podwójnych wiązań.




Rys. 3

## Wnioski

Opisana metoda pozwala izolować metabolity ze środowiska, w którym żyją drobnoustroje. Umożliwia ona przeprowadzenie analizy jakościowej produktów przemiany materii oraz może być pomocna przy zaklasyfikowaniu danego związku do pośrednich lub końcowych produktów meta-



http://rcin.org.pl

bolizmu. Otrzymane wyniki potwierdzają, że kwas jabłkowy w metabolizmie *Mycobacterium* spełnia rolę produktu pośredniego. Równowaga między stężeniem kwasu jabłkowego, występującym w ciele drobnoustroju i w pożywce, pozwala przypuszczać, że podobny stan istnieje w odniesieniu do innych produktów pośrednich dyfundujących z ciała bakteryjnego do podłoża. Z obu przedstawionych urządzeń aparatura do ekstrakcji rozpuszczalnikami lżejszymi od wody może mieć większe zastosowanie, ponieważ używany tam eter nie wywiera szkodliwego wpływu na badane drobnoustroje w warunkach doświadczenia. Kwasy p-aminobenzoesowy i nikotynowy, zidentyfikowane jako metabolity *Mycobacterium 279,* były już znalezione w produktach przemiany materii innych szczepów kwasoopornych, jak: *M.H37Rv. ravenel,* BCG, *smegmatis, stercoris* (F. Bernheim 1951; H. Pope i D. T. Smith 1946; O. D. Bird 1947; E. Ekstrand i B. Sjögren 1945; M. Landy, N. W. Larkum i E. J. Oswald 1943). Do identyfikacji obu kwasów wyżej wymienieni autorzy zastosowali metody mikrobiologiczne i chemiczne. Znalezienie PAB i kwasu nikotynowego u jeszcze jednego szczepu *Mycobacterium* z zastosowaniem techniki chromatograficznej i spektrofotometrycznej potwierdza dotychczasowe rezultaty oraz pozwala przypuszczać, że rola tych związków w metabolizmie *Mycobacterium* jest ważna.

Opierając się na fizjologii cząsteczkowej przemiany materii innych drobnoustrojów, można przypuszczać, że i w tym przypadku zadanie PAB-u nie ogranicza się wyłącznie do budowy kwasu pteroiloglutaminowego, ważnego czynnika wzrostowego. Kwas p-aminobenzoesowy ma ważne znaczenie w przemianach jednowęglowych fragmentów i rola jego w metabolizmie jest najprawdopodobniej bardziej skomplikowana. Przyjmuje się, że w metabolizmie tym koferment, będący pochodną kwasu foliowego, spełnia podobną rolę, co koferment A w przemianach dwuwęglowych (D. D. Woods 1953).

Niacyna jest również syntetyzowana przez większość drobnoustrojów i fizjologiczna jej rola w tym przypadku najwidoczniej polega na udziale w syntezie kodehydrogenaz I i II.

Zastosowanie chromatografii i spektrofotometrii stwarza olbrzymie możliwości analityczne, szczególnie przy badaniach w podczerwieni, gdzie charakterystyczne ostre widma pozwalają osiągnąć znaczną dokładność oznaczeń.

W tym miejscu składam serdeczne podziękowanie panu profesorowi drowi J. Hellerowi za wskazówki i opiekę nad wykonaną pracą.

## LITERATURA

1. Anderson C. G., Bacteriological Chemistry, 1946.
2. Bernheim F., Adv. in Tuber. Research, 1951, 4.

http://rcin.org.pl

3. Blakley R. L., *Proceeding of the University of Otago Medical School Research Society,* 1951, 29, 3, 27—28.
4. Bird O. D., *Nature,* 1947, 159, 33.
5. Cattaneo C., *Biochem.,* 1934, 270, 282—385.
6. Comsden R., Gordon A. H., i Martin A. J. P., *Biochem. J.,* 1944, 38, 224.
7. Edson N. L., *Bacteriological Reviews,* 1951, 15, 3.
8. Edson N. L. i Hunter G. J. E., *Biochem. J.,* 1947, 41, 2.
9. Ekstrand E. i Sjögren B., *Nature,* 1945, 156, 476.
10. Krebs H. A., II-e Congrès Int. de Biochimie, Paris, Symposium sur le Cycle Tricarboxylique, 1952, 42.
11. Landy M., Larkum N. W. i Oswald E. J., *Proceedings Soc. Exper. Biol. and Med.,* 1943, 52, 338.
12. Lassota Z., *Acta Biochem. Polonica,* 1954 w druku.
13. Lindsay M., Donnell T. V. i Edson N. L., *Biochem. J.,* 1950, 46, 2, 248—257.
14. Lobstein E., *Recherches biochemiques sur le bacille tuberculeux,* 1922, 64.
15. Leobel R. O., Shorr E. i Richardson H. B., *J. of. Bact.,* 1933, 26, 167—200.
16. Lugg J. W. H. i Overell B. T., *Nature,* 1947, 87, 160.
17. Mendel B. i Hoogland P. L., *Lancet* 1950, 6618, 6—18.
18. Model L. M., Biologia i biochimja tubierkuloznych Mykobakterierij, 1952.
19. Opieńska-Blauth J., Sakławska-Szymonowa O. i Kańska M. *Anhales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska,* 1950, 9, 221.
20. Poulletta C. i Deferanceschi A., *Biochimica et Biophisica Acta,* 1952, 9, 3.
21. Pope H. i Smith D. T., *American Rev. of. Tuberc.,* 1946, 54, 559.
22. Pucher G. W., Vickery H. B. i Wakeman A. J., *Ind. and Engineering Chemistry Analyt. Edition* 1934, 6.
23. Sym E. A. *Przegląd Epidemiologiczny,* 1949, 3, 205.
24. Sym E. A., *Acta Physiologica Polonica,* 1950, 1, 164.
25. Struszyński M., Analiza Techniczna t. III, 1950.
26. Szafrański P. i Sym E. A., *Gruźlica,* 1950, 3—4 427.
27. Szafrański P., *Gruźlica,* 1952, 6, 769.
28. Szarkowska L., Szafrański P., *Acta Biochim. Pol.* 1954 w druku.
29. Szarkowska L. — *Acta Biochim. Pol.* 1954 w druku.
30. Szymona M. i Sakławska-Szymonowa O., doniesienie referatowe, 1952
31. Stephenson M., Bacterial Metabolism, 1949.
32. Weitzel G., *Hoppe-Seylers Zeitschrift f. Physiol. Chemie,* 1952, 230, 3—6.
33. Woods D. D., *British Medical Bull.,* 1953, 9, 122.

## МЕТОД ИЗОЛИРОВАНИЯ МЕТАБОЛИТОВ (ПРИ ЖИЗНИ) НЕПРЕРЫВНОЙ ЭКСТРАКЦИИ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ К ИССЛЕДОВАНИЮ МЕТАБОЛИЗМА *MYCOBACTERIUM 279*

### Резюме

В виду очень небольших количеств продуктов диссимиляции в культурах Mycobakterium первая стадия исследования этих продуктов должна состоять в их накоплении. Были разработаны два типа аппаратур для не-



http://rcin.org.pl

прерывной экстракции метаболитов растворителями легче и тяжелее воды. Предметом исследования являлось Mycobacterium 279. Найдено, что существует равновесие между концентрацией яблочной кислоты в теле микроба и в питательной среде благодаря этому равновесию понижение концентрации яблочной кислоты в питательной среде вследствие непрерывной экстракции ускоряет ее внутриклеточное образование и дает возможным дальнейшую диффузию этого метаболита из тела бактерии в питательную среду. Наполнение яблочной кислоты при условиях экстракции питательной среды достигает трехкратного количества этого вещества, образующегося при нормальных условиях развития штама Mycobacterium 279.

Поиски других метаболитов были ограничены к органическим кислотам. Идентифицирование велось хроматографическим и спектрофотометрическим методами.

В накопленных продуктах обмена веществ M. 279 были найдены парааминобензойная и никотиновая кислоты.

## METHOD OF ISOLATING METABOLITES BY CONTINUOUS EXTRACTION IN VITA AND APPLICATION OF THIS METHOD TO STUDIES ON METABOLISM OF *MYCOBACTERIUM 279*

### Summary

Because of minimal quantities of dissimilation products formed in Mycobacterium cultures, the first step in these investigations is the preparation of a sufficient supply. Two types of apparatus were devised for the continuous extraction of metabolites: by solvents lighter and heavier than water. The strain 279 of Mycobacterium was studied. An equilibrium between the concentration of malic acid present in the body of the microbe and in the nutrient medium was stated. Owing to this equilibrium the decrease of concentration of malic acid in the nutrient by continuous extraction accelerates its formation in the bacterial cells and renders possible further diffusion of this metabolite from the bacterial cells into the substrate. The accumulation of malic acid by the strain M 279 under the extraction conditions attains three times higher amounts than in normal conditions of development. The investigation of other metabolites was limited to organic acids. The chromatographic and spectrophotometric method was used for their identification. In the accumulated metabolism products of M 279 para-aminobenzoic and nicotinic acids were found.

http://rcin.org.pl

ACTA BIOCHIMICA POLONICA
VOL. I 1954 NO 1

I. MAŁACHOWSKA, A. LINDE i J. MEDUSKI

# PRZYSTOSOWANIE *ESCHERICHIA COLI* DO WYKORZYSTYWANIA CYTRYNIANÓW W STANACH NIEDOBORU AZOTOWEGO

*Z Oddziału Przemiany Pośredniej Działu Biochemii i Działu Bakteriologii Państwowego Zakładu Higieny*
*Kierownicy działów: Prof. J. Heller i dr E. Wojciechowski*

*Escherichia coli* nie posiadająca, jak wiadomo, właściwości wykorzystywania cytrynianów jako jedynego źródła węgla (Koser, 1923) może w pewnych warunkach właściwość tę nabywać (Łomiński i wsp., 1947), a także ją utrzymywać (Szulmajster i wsp., 1952). W niniejszej pracy wykazano istnienie związku między przystosowaniem się *Escherichia coli* do wykorzystywania cytrynianów jako jedynego źródła węgla a zawartością azotu białkowego w komórkach populacji tych drobnoustrojów.

## Część doświadczalna

Materiał. Do doświadczeń użyto szczepu przysłanego przez Kauffmanna *E. coli* O 1 1 1 B4H. (Stoke). Przed użyciem do doświadczeń sprawdzono właściwości tego szczepu [1]).

Podłoża. Do hodowli szczepu używano podłóż syntetycznych z różnymi zawartościami azotu (w postaci siarczanu amonowego). Po szeregu prób wstępnych ustalono ostateczny skład podłóż: na 1 l wody destylowanej dodawano 5 g $K_2HPO_4$, 2 g NaCl, 5 g sacharozy, 0,02 g $MgSO_4$ i następujące ilości siarczanu amonowego:

w pożywce oznaczanej „A":2,37 g, co odpowiada 500 mg N w 1 l
w pożywce „ „B":0,47 g, co odpowiada 100 mg N w 1 l
w pożywce „ „C":0,235 g, co odpowiada 50 mg N w 1 l
w pożywce „ „D":28 mg, co odpowiada 6 mg N w 1 l.

[1]) Szczep rozkładał z wytworzeniem kwasu i gazu laktozę, glikozę, mannitol, maltozę; rozkładał sacharozę z wytwarzaniem samego kwasu; wytwarzał indol; rozkładał dulcytol z opóźnieniem 24-godzinnym z wytwarzaniem kwasu i gazu; dawał odczyn dodatni z czerwienią metylową; odczyn ujemny Vogesa-Proskauera; nie rósł na podłożu Kosera i nie upłynniał żelatyny; pod względem serologicznym odpowiadał typowi alfa.



http://rcin.org.pl

Do doświadczeń używano również podłoża Kosera [2]), (które oznaczano w niniejszej pracy jako $K_1$) i zmodyfikowanego podłoża Kosera ($K_3$) o składzie: 1 g $NH_4H_2PO_4$, 1 g $K_2HPO_4$,0,2 g $MgSO_4$, 5 g NaCl, 1 g glikozy i 2 g cytrynianu sodowego w 1 l $H_2O$.

Postępowanie i metody. 24-godzinną hodowlę badanego szczepu *Escherichia coli* na skośnym agarze zmywano 10 ml roztworu fizjologicznego chlorku sodowego. Do 1 l płynnych pożywek A, B, C i D dodawano po 2 ml otrzymanej zawiesiny drobnoustrojów i hodowano na tych podłożach w temperaturze 37° w ciągu 48 godz. Po upływie tego czasu oznaczano wzrost hodowli posiewając ją po 0,1 ml w rozcieńczeniu $10^{-6}$ na płytki Petriego z podłożem Endo (swoistym dla różnicowania *Escherichia coli* i innych drobnoustrojów z rodziny *Enterobacteriaceae)*. Na płytkach tych po 24 godz. wzrostu w temperaturze 37° liczono kolonie. Otrzymano zgodność tak uzyskanych wyników z pomiarami nefelometrycznymi na elektrofotometrze Kletta-Summersona.

Oznaczano azot białkowy drobnoustrojów (frakcję nierozpuszczalną w 5% kwasie trójchlorooctowym) z 48-godzinnej hodowli A, B, C i D mikrometodą Kjeldahla, w modyfikacji Ma i Zuazaga (1942) na aparacie typu Markhama (1942).

Ponadto z 48-godzinnych hodowli na podłożach A, B, C i D posiewano po 0,6 ml na 50 mililitrowe objętości podłóż $K_1$ lub $K_3$ otrzymując hodowle oznaczane: $AK_1$, $AK_3$, $BK_1$, $BK_3$ itd.

Po 24 godzinach hodowli w temperaturze 37° z $AK_3$, $BK_3$, $CK_3$ i $DK_3$ przesiewano po 0,6 ml na $K_1$.

(Nowe hodowle oznaczano: $AK_3K_1$ itd.).

Po następnych 24 godzinach hodowli w temperaturze 37° oznaczano wzrost $AK_3K_1$, $BK_3K_1$, $CK_3K_1$ i $DK_3K_1$ w sposób wyżej podany. W tym samym czasie oznaczono zawartość kwasu cytrynowego tych hodowli. Oznaczeń dokonywano metodą pentabromoacetonową w modyfikacji własnej (Meduski, 1952). W niniejszych badaniach wskaźnikiem zużycia kwasu cytrynowego było zmniejszenie się zawartości tego związku w hodowli, w porównaniu z zawartością jego w wyjałowionej pożywce (patrz również: Łomiński i wsp., 1947).

Wyniki. Ustalony w doświadczeniach wstępnych zakres zawartości N w 1 l pożywki daje wyraźne różnice wzrostu drobnoustrojów. Ilości azotu mniejsze od 50 mg i większe od 500 mg dają wyniki, które już nie wykazują różnic: odpowiednie wartości leżą na poziomych odcinkach otrzymywanych krzywych wzrostu.

---

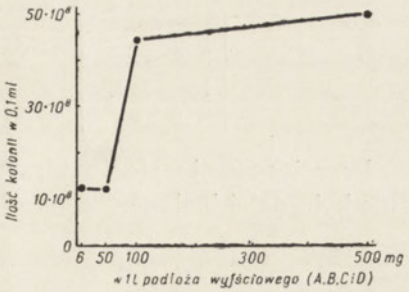
[2]) Podłoże Kosera w 1 l $H_2O$ zawiera: 1 g $NH_4H_2PO_4$, 1 g $K_2HPO_4$, 0,2 g $MgSO_4$, 5,0 g NaCl i 5,0 g cytrynianu sodu.

http://rcin.org.pl

Przykładem stwierdzonej zależności rozmnażania się *Escherichia coli* na podłożach A, B, C i D po 48 godz. hodowli, od zawartości azotu w pożywce przedstawiono tabl. 1 i na rys. 1.

Tablica 1

| Rodzaj podłoża | mg N w 1 l podłoża | Ilość kolonii w 0,1 ml |
|---|---|---|
| A | 500 | $5061 \cdot 10^6$ |
| B | 100 | $4424 \cdot 10^6$ |
| C | 50 | $1337 \cdot 10^6$ |
| D | 6 | $1392 \cdot 10^6$ |

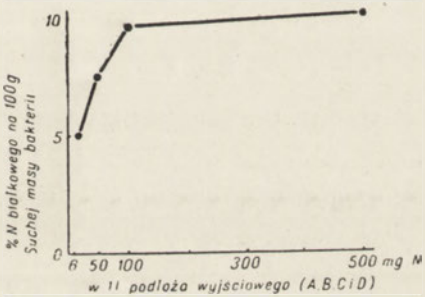



Rys. 1

Przykładem stwierdzonych różnic zawartości azotu białkowego (w przeliczeniu na suchą masę bakterii) w hodowlach drobnoustrojów na podłożach A, B, C i D są wyniki podane w tabl. 2 i na rys. 2.

Tablica 2

| Rodzaj podłoża | A | B | C | D |
|---|---|---|---|---|
| % N białkowego w przel. na suchą masę bakt. | 10,3 | 9,7 | 7,6 | 4,75 |




Rys. 2

Powyższe doświadczenia ustaliły przydatność hodowli z podłóż A, B, C i D do dalszych badań nad wpływem różnej zawartości białka w komórkach bakteryjnych na zdolność bakterii metabolizowania kwasu cytrynowego.

Próby posiewu hodowli z podłóż A, B, C i D na $K_1$ ustaliły, że badany szczep — niezależnie od zawartości białka w komórkach bakteryjnych — nie rośnie na $K_1$. Posiewy na $K_3$ dawały niezmiennie we wszystkich doświadczeniach obfity wzrost. W czasie tego wzrostu następowało przystosowanie się drobnoustrojów do wykorzystywania cytrynianu.

Ujawniało się to wzrostem drobnoustrojów w hodowlach $AK_3K_1$, $BK_3K_1$, $CK_3K_1$ i $DK_3K_1$. Okazało się przy tym, że wzrost ten w różnych hodowlach

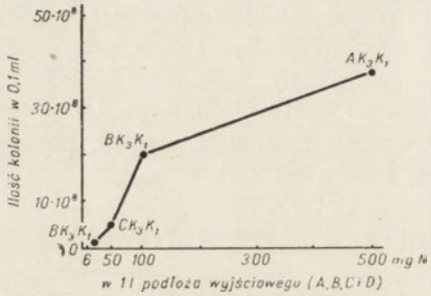
http://rcin.org.pl

był różny, zależnie od zawartości białka w komórkach bakteryjnych. Zależność tę wykazuje np. doświadczenie przytoczone w tabl. 3 i na rys. 3.

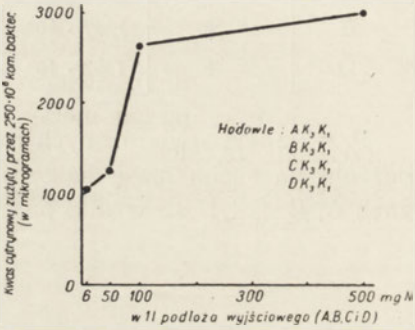
Tablica 3

| Rodzaj hodowli | $AK_3K_1$ | $BK_3K_1$ | $CK_3K_1$ | $DK_3K_1$ |
|---|---|---|---|---|
| Ilość kol. w 0,1 ml | $3790 \cdot 10^6$ | $2010 \cdot 10^7$ | $590 \cdot 10^6$ | $20 \cdot 10^6$ |

Przystosowanie się to utrzymywało się przez cztery kolejne pasaże i nie było dalej badane.




Rys. 3




Rys. 4

Na różnice w przystosowaniu się hodowli $AK_3K_1$ i równoległych do wykorzystywania cytrynianu jako jedynego źródła węgla wskazują różne ilości kwasu cytrynowego zużytego przez hodowle te w ciągu 24 godzin wzrostu. Przykłady otrzymanych wyników podano w tabl. 4 i na rys. 4.

Tablica 4

| Rodzaj hodowli | $AK_3K_1$ | $BK_3K_1$ | $CK_3K_1$ | $DK_3K_1$ |
|---|---|---|---|---|
| Ilość kwasu cytrynowego w mikrogramach zużyta przez $250 \cdot 10^6$ komórek bakteryjnych | 3004 | 2690 | 1250 | 1050 |

Omówienie wyników. Virtanen w 1942 roku założył, że wszystkie białka młodych, aktywnych komórek bakteryjnych wykazują czynności enzymatyczne. Opierając się na tej hipotezie, Virtanen i jego szkoła wykonali szereg badań zmian zachodzących w czynnościach enzymatycznych komórek bakteryjnych o zawartości białek, obniżonej przez odżywianie ubogie w azot [3]). Wynikiem tych badań nad *Escherichia coli*

[3]) Virtanen, 1947, Virtanen i De Ley, 1948, Virtanen, 1949.

http://rcin.org.pl

było stwierdzenie faktu obniżania się wielu funkcji enzymatycznych tego drobnoustroju w miarę zmniejszania się zawartości azotu białkowego komórek bakteryjnych. (Zestawienia: Virtanen, 1949 i 1952, De Ley, 1949). Powstało pytanie, jak odbije się zawartość białek w komórce bakteryjnej na jej zdolności do wytwarzania nowej czynności enzymatycznej.

Postanowiliśmy zająć się czynnością enzymatyczną normalnie przez *Escherichia coli* nie wykonywaną, a mianowicie zużywaniem przezeń cytrynianów jako jedynego źródła węgla (Koser, 1923). Łomiński i współpracownicy (1947) stwierdzili po raz pierwszy, że w określonych warunkach *E. coli* może rosnąć na podłożu Kosera. Vaughn i współpracownicy (1950) opracowali dokładniej to zagadnienie. W wyniku tych badań okazało się, że dodatek glikozy, fruktozy, peptonu i in. do pożywki Kosera umożliwia zużycie cytrynianów i wzrost *E. coli*. Szulmajster i towarzysze (1952) stwierdzili następnie, że hodowanie *E. coli* w warunkach umożliwiających metabolizowanie cytrynianu prowadzi do uzyskania przez ten drobnoustrój właściwości późniejszego zużywania cytrynianu w czystym podłożu Kosera już bez innych źródeł węgla. Zagadnienie było tym ciekawsze, że badania uczonych francuskich zdają się ponadto przemawiać za poglądem, iż przyzwyczajone do cytrynianu drobnoustroje nie rozkładają związku tego poprzez cykl kwasów trójkarboksylowych.

Metodycznie oparliśmy się głównie na pracy De Leya (1951) — skład podłóż wyjściowych — i na pracy poprzednio cytowanej Szulmajstra i towarzyszy (1952): podłoże $K_3$.

Otrzymane wyniki: fakt uzależnienia nabycia zdolności do zużywania cytrynianu przez *E. coli* od ilości białka w komórce bakteryjnej, prócz pewnej wartości konkretnej, stanowią — jak się wydaje — jeszcze jeden argument przemawiający za obecnością ścisłego współdziałania całości białek komórki w dowolnej czynności metabolicznej.

Serdecznie dziękujemy ob. Elżbiecie Komorowskiej za pomoc w wykonywaniu oznaczeń i ob. Teisseyre Teresie za przygotowanie podłóż.

## LITERATURA

J. De Ley, Over de Fermenten van Stikstof — Arme Bacterium coli. Diss. 1949.
J. De Ley, Enzymologia, 14, fasc. 5, 296, 1951.
S. A. Koser, *J. Bacteriol*, 8, 493, 1923.
I. Łomiński, N. S. Conway, E. M. Harper, J. Rennie Basil, *Nature* 160, 273, 1947.
T. S. Ma i G. Zuazaga, *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 14, 280, 1942.
R. Markham, *Biochem J.* 36, 790, 1942.
J. Szulmajster, Grunberg-Manago M., Delavier C. Experientia, 8/1, 26, 1952.
J. Szulmajster, Grunberg-Manago M., Delavier C. Experientia, 8/1, 26, 1952.
R. H. Vaughn, J. T. Osborne, G. T., Wedding, J. Tabachnick, C. G. Beisel i T. Braxton, *J. Bacteriol.* 60, 119, 1950.

http://rcin.org.pl

A. I. Virtanen, Suomen Kemistilehti B. XV, 1942.
„ Fourth Intern. Congr. Microbiol. Copenhagen, Report of Proc. 379, 1947.
„ (wraz z J. De Ley) *Arch. Biochem.* 16, 169, 1948.
„ *Ann. Academ. Scientiar. Fennicae,* seria A, II, Chemica 36, 1949.
„ *Annales Med. Experim. et Biol. Fenniae,* 30, fasc. 3—4, 234, 1952.

## ПРИСПОСОБЛЕНИЕ *Escherichia Coli* К УПОТРЕБЛЕНИЮ СОЛИ ЛИМОННОЙ К-ТЫ В СОСТОЯНИИ НЕДОБОРА АЗОТА

### Резюме

1. Были получены *E. Coli* 0111B4H с разным содержанием азота белков в клетках бактерий.

2. Было проведено приспособление полученных бактерий к употреблению лимонно-кислых солей в качестве единственного источника углерода и была доказана зависимость приобретания этого приспособления от степени насыщения белком клеток бактерий.

## ADAPTATION OF *ESCHERICHIA COLI* TO THE UTILIZATION OF CITRATE IN CASES OF NITROGEN DEFICIENCY

### Summary

1. Populations of the strain *E. Coli* 0111B4H: contaning various quantities of protein nitrogen in the bacterial cells were obtained.
2. The adaptation of the obtained populations to the use of citrate as the only source of carbon has been achieved and it has been demonstrated that the observed adaptation depends on the protein content of the bacterial cells.

*Division of Intermediary Metabolism of the Department of Biochemistry and Department of Bacteriology — State Institute of Hygiene*

http://rcin.org.pl

ACTA BIOCHIMICA POLONICA
VOL. I 1954 NO 1

MARIUSZ ŻYDOWO

# NIEKTÓRE ZMIANY BIOCHEMICZNE KRWI ZDROWEGO CZŁOWIEKA POD WPŁYWEM ADRENALINY

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

## Wpływ na białka surowicy

Zmiany biochemiczne krwi, zachodzące po podaniu adrenaliny, można by ogólnie podzielić na trzy grupy:

1) spowodowane wpływem adrenaliny na krążenie,

2) uwarunkowane jej działaniem na przemianę węglowodanową,

3) inne, np. spowodowane wpływem innych hormonów, których wydzielanie adrenalina pobudza lub hamuje.

Podział ten — jak każdy inny — ma dużo braków, jednakże ze względu na wielką rozmaitość zmian zachodzących we krwi pod działaniem adrenaliny próba pewnego ich uporządkowania, jak się zdaje, jest uzasadniona. Do pierwszej grupy zaliczymy wzrost stężenia białka oraz substancji z nim związanych (1), (2), (3); druga obejmuje zmiany stężenia cukru we krwi (4), (5), kwasu mlekowego (4), (6), kwasu cytrynowego (7), (8), a można by tutaj zaliczyć także obniżenie się poziomu fosforu nieorganicznego i potasu surowicy pod wpływem adrenaliny (5), (8—16). Ciekawe, aczkolwiek mało wyjaśnione, jest działanie adrenaliny na skład chemiczny krwi za pośrednictwem innych hormonów. Jako przykład może służyć obniżenie poziomu cholesterolu w osoczu świnki morskiej (17), którego nie stwierdzono po podaniu adrenaliny zwierzęciu z usuniętą tarczycą. Podawanie równoczesne tyroksyny powoduje powrót do poprzedniego odczynu. Także obniżenie stężenia fosforu nieorganicznego osocza pod wpływem adrenaliny można traktować jako „reflektoryczne" jej działanie, ponieważ u psów z usuniętą trzustką obniżenie to nie występuje (16).

Działanie adrenaliny zależy od dawki (22), (23), w jakiej została ona podana, od sposobu i drogi wprowadzenia (19) i całego szeregu innych czynników zewnętrznych. Należy być także bardzo ostrożnym przy wycią-



http://rcin.org.pl

ganiu wniosków z doświadczeń na zwierzętach odnośnie do fizjologii człowieka, jak wiadomo bowiem, istnieje znaczna różnica wrażliwości na działanie jadu u różnych gatunków. Jako przykład niech posłuży brak zmian w reakcji na adrenalinę po splenektomii u człowieka w porównaniu np. z kotem (18), (22).

Zadaniem obecnej pracy jest oznaczenie zmian w koloidach surowicy krwi człowieka, spowodowanych domięśniowym wstrzyknięciem adrenaliny, oraz ewentualne ustalenie mechanizmu tych zmian. W tym celu przeprowadzono trzy serie doświadczeń na zdrowych mężczyznach w wieku 20—32 lat. W pierwszej serii, obejmującej 20 doświadczeń z adrenaliną oraz cztery kontrolne, stwierdzono zwiększenie się stężenia białka surowicy po domięśniowym podaniu adrenaliny; druga seria wykazała brak zmian jakościowych w białkach osocza i trzecia wreszcie, która obejmowała oznaczania objętości krążącego osocza, nie dała zdecydowanego wyniku, świadczy jednak o pewnej tendencji do zmniejszania objętości osocza po adrenalinie.

## Przebieg doświadczeń

Jako materiał doświadczalny służyli subiektywnie zdrowi mężczyźni w wieku od 20 do 32 lat (studenci i pracownicy Zakładu). Krew pobierano rano na czczo, pierwszy raz po półgodzinnym pozostawaniu badanego w pozycji leżącej, następnie wstrzykiwano domięśniowo 1 mg (1 ml roztworu 1 : 1000) chlorowodorku adrenaliny (preparat handlowy produkcji Z. Z. F.), a po maksymalnym wzroście ciśnienia i szybkości tętna pobierano krew po raz drugi. Wypadało to po upływie 50—70 min. po podaniu adrenaliny. Krew pobierano bez ucisku lub z uciskiem możliwie najmniejszym z żyły łokciowej; wlewano ją do probówki wirówkowej i po skrzepnięciu dwukrotnie wirowano. W badaniach kontrolnych postępowano analogicznie, jedynie zamiast adrenaliny wstrzykiwano 1 ml roztworu soli fizjologicznej. W niezhemolizowanej surowicy oznaczano w pierwszej serii stężenie białka refraktometrycznie, w drugiej — współczynnik załamania światła w temp. 20° refraktometrem zanurzeniowym Pulfricha, ciężar właściwy — metodą siarczanu miedziowego Philipsa, van Slyke'a i innych (20), lepkość — wiskozymetrem Kalinowskiego (21) w temperaturze 20° oraz azot całkowity sposobem Kjeldahla (biorąc do spalania 0,2 ml surowicy, około 1 g $Na_2SO_4$, 0,2 ml 30% $CuSO_4$, 1 ml stęż. $H_2SO_4$ i destylując do kwasu borowego) Wszystkie oznaczenia wykonywano podwójnie.

W trzeciej serii doświadczeń oznaczano objętość osocza metodą rozcieńczaniu błękitu Evansa (T-1824). Badanemu pobierano na czczo 10 ml krwi z żyły łokciowej bez zastoju po półgodzinnym pozostawaniu w pozycji leżącej (próba Ia). Przez tę samą igłę wstrzykiwano 10 ml 0,15% roztworu

http://rcin.org.pl

błękitu Ewansa w 0,9% NaCl wyważoną uprzednio strzykawką i w dwie minuty po zakończeniu wstrzykiwania pobierano krew z żyły łokciowej drugiej ręki (próba Ib). Następnie wstrzykiwano domięśniowo 1 mg chlorowodorku adrenaliny, a na szczycie wzrostu ciśnienia i szybkości tętna (50—70 min. po adrenalinie) pobierano krew uzyskując próbę IIa; przez tę samą igłę wstrzykiwano znów 10 ml barwika i po upływie 2 min. od zakończenia wstrzykiwania pobierano próbkę krwi oznaczoną IIb. U żadnego z badanych nie występowały objawy, które mogłyby świadczyć o szkodliwym wpływie podanego barwika, jedynie w kilku przypadkach następnego dnia po doświadczeniu wystąpiło lekkie niebieskawozielone zabarwienie twardówek i skóry. Także i ci z badanych nie mieli żadnych subiektywnie przykrych objawów. Dawka barwika, którą otrzymywał każdy badany, wynosiła 30 mg. Badania kontrolne tej grupy wykonano podobnie, tylko zamiast adrenaliny podano 1 ml soli fizjologicznej.

Czas pobierania krwi po wstrzyknięciu barwika człowiekowi, polecany przez większość autorów, wynosi 10—15 min. (24); Hahn i współpracownicy (25) stwierdzili, używając techniki rozcieńczania izotopu $P^{32}$, że czas wystarczający do wymieszania substancji rozpuszczalnej w osoczu wynosi u psa 2,5 min. Były wreszcie próby oznaczania stężenia barwnika w czasie t = 0 (licząc od wstrzyknięcia) przez ekstrapolację (26), (27). Wyznaczona w naszych warunkach krzywa znikania barwnika wykazywała prawie takie samo stężenie barwika po 2 i po 5 min. W dwóch kolejnych oznaczeniach na tym samym osobniku, wykonanych jedno w godzinę po drugim, stwierdzono, że pobieranie krwi po upływie dwóch minut od zakończenia wstrzykiwania barwnika daje wyniki zgodne. Kontrolę taką powtórzono dwa razy. Ustalono zatem czas pobierania na 2 minuty od zakończenia wstrzykiwania. Wydaje mi się, że u zdrowych ludzi z wydolnym krążeniem, a zwłaszcza po przyśpieszeniu krążenia spowodowanym adrenaliną, jest to czas wystarczający na wymieszanie się barwika z osoczem, a unika się w ten sposób utraty błękitu, który — jak wiadomo (25) — już po 15 min. daje się stwierdzić w *ductus thoracicus*.

Pobrane próbki krwi wirowano po skrzepnięciu, a w otrzymanej surowicy oznaczano ekstynkcję w fotometrze Pulfricha próby Ib w stosunku do Ia oraz IIb w stosunku do IIa. Używano filtru S61, naczyniek grubości 0,5 cm. Z ekstynkcji obliczano stężenie barwnika za pomocą wykresu; wykres ten sporządzano przez zmieszanie 6 porcji surowicy po 3 ml z porcjami po 1 ml barwika o różnym stężeniu i oznaczano je kolorymetrycznie w stosunku do roztworu 3 ml tej samej surowicy z 1 ml soli fizjologicznej. Użycie surowicy do rozcieńczania jest konieczne z tego względu, że ekstynkcja błękitu Ewansa w wodzie jest zawsze nieco większa od ekstynkcji barwika o tym samym stężeniu w surowicy bądź osoczu (24). Dla barwika użytego

http://rcin.org.pl

w niniejszej pracy wykres zależności ekstyncji od stężenia w roztworze 0,9% NaCl wyraził się równaniem y = 0,413 x, natomiast w roztworze surowicy — y = 0,400 x.

Z wyliczonego stężenia błękitu T-1824 i wstrzykniętej ilości (15 mg) można obliczyć objętość osocza.

## Wyniki doświadczeń

Zmiany stężenia białka surowicy krwi, spowodowane domięśniowym wstrzyknięciem jednego miligrama chlorowodorku adrenaliny, przedstawione są w tablicy 1.

Tablica 1

| Nr próby | g białka w 100 ml przed | po | Różnica % |
|---|---|---|---|
| 1 | 7,85 | 8,15 | + 4 |
| 2 | 7,35 | 7,60 | + 3 |
| 3 | 7,60 | 7,90 | + 4 |
| 4 | 7,90 | 8,20 | + 4 |
| 5 | 7,30 | 7,70 | + 5 |
| 6 | 6,50 | 7,50 | +15 |
| 7 | 7,05 | 7,50 | + 6 |
| 8 | 7,30 | 7,60 | + 4 |
| 9 | 7,20 | 8,00 | +11 |
| 10 | 7,05 | 7,75 | +10 |
| 11 | 7,50 | 8,10 | + 8 |
| 12 | 7,60 | 7,90 | + 4 |
| 13 | 7,05 | 7,30 | + 3 |
| 14 | 6,70 | 7,05 | + 5 |
| 15 | 7,05 | 7,40 | + 5 |
| 16 | 6,70 | 6,90 | + 3 |
| 17 | 5,90 | 6,45 | + 9 |
| 18 | 7,15 | 7,50 | + 5 |
| 19 | 6,40 | 6,60 | + 3 |
| 20 | 6,25 | 6,50 | + 4 |
| średnio | 7,05 | 7,50 | + 6 |

Kontrole

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1 | 7,20 | 7,20 | 0 |
| 2 | 6,60 | 6,65 | +0,8 |
| 3 | 6,20 | 6,20 | 0 |
| 4 | 6,40 | 6,40 | 0 |

We wszystkich dwudziestu badanych przypadkach stwierdza się wzrost stężenia białka o wielkość znacznie przewyższającą granicę błędu doświad-

http://rcin.org.pl

czalnego, próby kontrolne nie wykazują zaś żadnej zmiany w stężeniu białka. U tych osobników, u których poprzednio wykonywano próbę z adrenaliną, a następnie przeprowadzano kontrolę, wyłączano także wpływ czynnika psychicznego przez to, że sądzili oni, iż otrzymują zastrzyk adrenaliny, a nie soli fizjologicznej. Zagęszczenie białka surowicy pod wpływem adrenaliny u człowieka stwierdzał także Duncan i współpracownicy (1). Czubalski (2) we wnioskach do doświadczeń nad drażnieniem nerwu sympatycznego u królika podaje, że działanie adrenaliny jest przeciwstawne działaniu nerwu błędnego, jeżeli chodzi o wpływ na stężenie białka, to znaczy, że osocze ulega zgęszczeniu; jednakże liczby podane w jego pracy zdają się świadczyć o czymś wręcz przeciwnym.

Nasuwa się przypuszczenie, że ogólna ilość białek osocza nie zmieniła się, a jedynie pewna ilość niebiałkowej części osocza (woda i substancje drobnocząsteczkowe w niej rozpuszczone) uległa przesączeniu poprzez ściany naczyń krwionośnych na skutek zwiększonego ciśnienia. Jeżeli do krwioobiegu przedostawałoby się jakieś białko spoza krwi, nie jest wykluczone, że zmieniłby się wówczas jakościowy skład koloidów osocza. Dla wyjaśnienia tego zagadnienia przeprowadzono serię 10 doświadczeń, która obejmowała oznaczenia niektórych własności fizycznych surowicy, pozwalających wg Mozołowskiego (28) na dość dokładne scharakteryzowanie zmian w koloidach surowicy (29), (30), (31). Dane doświadczalne tej serii podane są w tabl. 2.

Tablica 2

| Nr | przed podaniem | | | | po podaniu | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Współcz. refrakcji | Ciężar właściwy | Lepkość Cp | N-całkowity g/100 ml | Współcz. refrakcji | Ciężar właściwy | Lepkość Cp | N-całkowity g/100 ml |
| 1 | 1,34995 | 1,0270 | 1,59 | 1,14 | 1,35045 | 1,0285 | | 1,20 |
| 2 | 1,34910 | 1,0265 | 1,59 | 1,07 | 1,34950 | 1,0265 | 1,64 | 1,12 |
| 3 | 1,34950 | 1,0265 | 1,69 | 1,14 | 1,35000 | 1,0275 | 1,74 | 1,18 |
| 4 | 1,35005 | 1,0275 | 1,69 | 1,20 | 1,35060 | 1,0280 | 1,74 | 1,22 |
| 5 | 1,34890 | 1,0265 | 1,60 | 1,07 | 1,34965 | 1,0270 | 1,67 | 1,16 |
| 6 | 1,34755 | 1,0245 | 1,49 | 1,01 | 1,34930 | 1,0265 | 1,60 | 1,14 |
| 7 | 1,34850 | 1,0255 | 1,53 | 1,10 | 1,34925 | 1,0265 | 1,59 | 1,12 |
| 8 | 1,34890 | 1,0255 | 1,52 | 1,08 | 1,34945 | 1,0265 | 1,58 | 1,12 |
| 9 | 1,34875 | 1,0260 | 1,70 | 1,09 | 1,35020 | 1,0280 | 1,80 | 1,20 |
| 10 | 1,34850 | 1,0260 | 1,58 | 1,10 | 1,34975 | 1,0275 | 1,65 | 1,21 |

Z liczb tabl. 2 obliczono wg Mozołowskiego (28) stosunek współczynnika refrakcji do azotu, ciężaru właściwego do azotu oraz płynności do azotu białkowego, które to wielkości charakteryzują koloidy surowicy

http://rcin.org.pl

w sposób czulszy aniżeli frakcje wysoleniowe. Tę właśnie charakterystykę koloidów surowicy przed i po podaniu adrenaliny przedstawia tabl. 3.

Tablica 3

| Nr | Przed podaniem | | | Po podaniu | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | R/N | C/N | $(1/\eta - 1) : N$ | R/N | C/N | $(1/\eta - 1) : N$ |
| 1 | $129.10^{-4}$ | $178.10^{-4}$ | $330.10^{-3}$ | $127.10^{-4}$ | $186.10^{-4}$ | |
| 2 | 129 | 186 | 352 | 127 | 177 | $352.10^{-3}$ |
| 3 | 125 | 174 | 363 | 125 | 173 | 365 |
| 4 | 123 | 170 | 345 | 126 | 175 | 352 |
| 5 | 128 | 186 | 355 | 124 | 176 | 351 |
| 6 | 122 | 177 | 332 | 123 | 174 | 332 |
| 7 | 120 | 171 | 318 | 125 | 177 | 335 |
| 8 | 126 | 174 | 320 | 127 | 177 | 332 |
| 9 | 124 | 178 | 384 | 124 | 178 | 376 |
| 10 | 120 | 176 | 337 | 120 | 169 | 330 |
| średnio | 125±2,4 | 177±3,8 | 344±20 | 125±1,5 | 176±3,0 | 349±15 |

Jak widać z zestawienia, zarówno stosunek współczynnika refrakcji do azotu, jak i stosunek ciężaru właściwego oraz płynności do azotu jest taki sam przed i po adrenalinie; wynika stąd, że jakościowy skład białek w surowicy nie zmienia się pod wpływem adrenaliny. Mało jest zatem prawdopodobne, ażeby jakieś inne białko przedostawało się do krwiobiegu, powodując wzrost stężenia.

Tablica 4

| Nr dośw. | Litrów osocza | |
|---|---|---|
| | przed | po |
| 1 | 3,75 | 3,75 |
| 2 | 3,12 | 2,94 |
| 3 | 3,06 | 2,94 |
| 4 | 2,24 | 2,24 |
| 5 | 2,74 | 2,63 |
| 6 | 3,00 | 2,63 |
| 7 | 2,50 | 2,50 |

Kontrola

| | | |
|---|---|---|
| 1 | 3,12 | 3,06 |
| 2 | 3,00 | 3,00 |

Istnieją bowiem dwie możliwości tłumaczenia mechanizmu powstawania wyżej opisanych zmian:

1) bezbiałkowa ciecz przesącza się poprzez ściany naczyń krwionośnych do cieczy tkankowych na skutek zwiększonego ciśnienia wewnątrznaczyniowego; 2) zostają zmobilizowane i wyrzucone do krwioobiegu rezerwy zgęszczonego osocza. Dla rozstrzygnięcia tego problemu przeprowadzono serię oznaczeń objętości osocza przed i po domięśniowym podaniu adrenaliny. Jeżeli bowiem zachodziłaby pierwsza ewentualność, objętość osocza powinna się zmniejszyć, natomiast w razie przybytku pewnej ilości białka, osocze musiałoby zwiększyć swoją objętość. Otrzymane wyniki przedstawiają się w sposób następujący:

http://rcin.org.pl

Liczby otrzymane w tej serii nie dają jasnej i zdecydowanej odpowiedzi na postawione pytanie, głównie zapewne ze względu na zbyt małą dokładność metody w stosunku do niewielkich zmian, jednakże zaznacza się pewna tendencja do obniżenia objętości osocza u człowieka po podaniu adrenaliny.

Spadek objętości krwi i jej zagęszczenie pod wpływem adrenaliny było stwierdzane przez wielu autorów (18), (24) zarówno metodami barwnikowymi, jak też innymi. Dlatego sądzę, że nie ma powodu przyjmować, jakoby adrenalina (bądź też drażnienie nerwów sympatycznych) powodowała przechodzenie do krwi jakichś białek (32), nie znajdujących się w niej przedtem; należy pozostać przy tłumaczeniu zagęszczenia osocza naturalną ultrafiltracją. Zgodne byłoby to z poglądem Nylina (33), który za pomocą promieniotwórczych krwinek czerwonych stwierdził, że nie istnieją u człowieka rezerwaury krwi, mogące w istotny sposób zagęszczać krew. Także brak wpływu splenektomii u człowieka na poadrenalinową reakcję krwi (18), (22) zdaje się przemawiać za takim ujęciem.

Kierownikowi Zakładu Chemii Fizjologicznej prof. drowi Włodzimierzowi Mozołowskiemu dziękuję za krytyczne uwagi w czasie wykonywania pracy.

## LITERATURA

1. L. E. Duncan, D. H. Solomon, M. P. Nicols, E. Rosenberg, *J. Clin Invest.*, **30**, 908, 1951.
2. F. Czubalski, *Med. Dośw. i Spol.*, **11**, 45, 1930.
3. M. Żydowo, Doniesienie na II Zjeździe Hematologów w Gdańsku, dn. 2.VI.1952
4. J. P. Peters, D. D. Van Slyke, *Quantitative clinical chemistry.* Vol. I, Baltimore 1946.
5. A. Dury, J. W. Holler, C. Smith, *J. Clin. Invest.*, **31**, 440, 1952.
6. L. Lundholm, *Acta Physiol. Scand.*, **19**, suppl. 67, 1949.
7. J. B. Pincus, S. Natelson, J. K. Lugovoy, *J. Clin. Invest.*, **28**, 741, 1949.
8. J. B. Pincus, S. Natelson, J. K. Lugovoy, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **78**, 24, 1951.
9. W. O. Fenn, *J. Biol. Chem.*, **128**, 297, 1939.
10. J. M. Rogoff, J. M. Quashnack, E. Mixon Nola, A. W. Rosenberg, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **73**, 163, 1950.
11. A. Dury, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **77**, 199, 1951.
12. A. Dury, T. N. Johnston, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **78**, 425, 1951.
13. A. Dury, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **79**, 315, 1952.
14. A. Dury J., *Endocrin.*, **49**, 663, 1952.
15. A. Dury, L. D. Moss, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **80**, 199, 1952.
16. L. H. Weissberger, *J. Biol. Chem.*, **160**, 481, 1945.
17. J. Comsa, *Compt. rend. Soc. Biol.*, **140**, 614, 1946.
18. F. N. Ghadially, *J. Endocrin.*, **8**, 138, 1952.
19. A. Leimdorfer, R. Arano, M. H. Hack, *Am. J. Physiol.*, **150**, 588, 1947.



http://rcin.org.pl

20. R. A. Philips, D. D. Van Slyke, F. B. Hamilton, V. P. Dole, K. Emerson Jr, and R. M. Archibald, *J. Biol. Chem.*, **183**, 305, 1950.
21. J. Kalinowski, *Bull. d. L. Acad. Pol. d. Sc. et d. Lett. Classe d. Med.*, 79, 1950.
22. E. M. Landis, *Ann. Rev. Physiol.*, **7**, 201, 1945.
23. E. Ogden, C. E. Hall, *Ann. Rev. Physiol.*, **11**, 443, 1949.
24. T. D. Burtil Von Porat, *Acta Med. Scand.*, **140**, suppl. 256, 1951.
25. H. C. Lowson, D. T. Overbey, J. C. Moore, O. W. Shadle, *Am. J Physiol.*, **151**, 282, 1947.
26. D. T. Overbey, J. C. Moore, O. W. Shadle, H. C. Lowson, *Am. J. Physiol.*, **151**, 290, 1947.
27. A. T. Miller, Jr, *Am. J. Physiol.*, **151**, 234, 1947.
28. W. Mozołowski, *Acta Bioch. Pol.*, w druku.
29. W. Mozołowski, M. Żydowo, J. Kalinowski, Z. Moszczyńska, *Bull. d. L'Acad. Pol. d. Sc. et d. Lett. Classe d. Med.*, 65, 1950.
30. A. Kalliciński, *Pol. Tyg. Lek.*, **7**, nr 46, 1952.
31. M. Żydowo, M. Gorski, *Pol. Tyg. Lek.*, **8**, nr 44, 1953.
32. J. Oszacki, i W. Chabinka, *Przegl. Lek.*, **8**, 348, 1952.
33. G. Nylin, *Am. J. Physiol.*, **149**, 180, 1947.

## НЕКОТОРЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ КРОВИ ЗДОРОВОГО ЧЕЛОВЕКА ПОД ДЕЙСТВИЕМ АДРЕНАЛИНА

### Резюме

I. Влияние на белки сыворотки.

1. Исследовано влияние внутримышечного введения 1 мг хлористоводородного адреналина у здоровых мужчин:

а) концентрация белков в сыворотке,

б) отношение коэффициента рефракции к азоту, удельного веса к азоту и текучести к азоту белков сыворотки,

в) объем циркулирующей плазмы.

2. У всех исследованных (20 опытов) было найдено увеличение концентрации белков в среднем на 6% (колебания от + 3 до + 15%) под действием адреналина. Притом отношения физических свойств сыворотки остались без изменения, что свидетельствует о отсутствии изменений в качественном составе белков. Исследование изменений объема плазмы не дало ясных результатов, но наблюдается тенденция к уменьшению объема после введения адреналина.

3. На основании полученных результатов а также литературных данных сделано предположение, что рост концентрации белка сыворотки вызывается естественной ультрафильтрацией крови человека под действием адреналина.

http://rcin.org.pl

## SOME BIOCHEMICAL CHANGES IN THE BLOOD OF HEALTHY HUMANS OCCASIONED BY ADRENALIN

### I. INFLUENCE ON SERUM-PROTEINS


### Summary

1. 1 mg of adrenalin hydrochloride was injected intramuscularly to healthy men and its influence was studied:
   a) on the protein concentration of the blood serum;
   b) on the relation of the refractive index to nitrogen, the relation of specific gravity to nitrogen and the relation of fluidity to protein nitrogen of the serum;
   c) on the volume of the circulating serum.
2. It was established that the concentration of proteins increased by 6% in average (varying from 3% to 13%) in all the examined cases (20 tests) under the action of adrenalin, the physical properties of the serum remaining unchanged. The latter proved that no alteration occured in the qualitative composition of the proteins. Investigation of changes in volume of the serum did not give any definite result. Nevertheless there is a marked tendency to a diminution of volume after the injection of adrenalin.
3. Considering the obtained results and the information from litterature it would appear that the increase of concentration of serum protein is due to a natural ultrafiltration of human blood caused by adrenalin.


*Department of Physiological Chemistry Medical Academy — Gdańsk*
*Chief: prof. dr W. Mozołowski.*



http://rcin.org.pl

http://rcin.org.pl

ACTA BIOCHIMICA POLONICA
VOL. I 1954 NO 1

MARIA JEŻEWSKA

# OZNACZANIE GLUTAMINY W MATERIALE ROŚLINNYM

*Zakład Biochemii SGGW*

*Kierownik Zakładu J. Reifer*

Nieenzymatyczna hydroliza glutaminy przy wartości pH = 6,5, opisana przez Reifera i Tarnowską (1), nie jest specyficzna dla glutaminy, nieznaczna część mocznika i asparaginy rozkłada się wraz z glutaminą wytwarzając amoniak, co powoduje błąd do 4,5% przy zawartości 0,4 mg glutaminy obok 0,1 mg mocznika i 1 mg asparaginy. Ponadto nie wiadomo, czy w materiale roślinnym nie ma innych związków, które mogłyby odszczepiać amoniak w warunkach podanych w wymienionej wyżej pracy (1) dla hydrolizy glutaminy i czy wobec tego amoniak oznaczony tą metodą odpowiada samej glutaminie. Aby przekonać się o tym, zastosowano hydrolizę enzymatyczną za pomocą szczepu *Cl. Welchii SR 12,* zawierającego glutaminazę, i porównano uzyskane w ten sposób wyniki z wynikami otrzymanymi metodą hydrolizy przy wartości pH = 6,5 w obecności buforu fosforanowo-boranowego. Metodę rozkładu glutaminy i kwasu glutaminowego za pomocą *Cl Welchii SR 12* stosował Krebs w tkankach zwierzęcych (2), przy czym $CO_2$ z rozkładu kwasu glutaminowego oznaczał manometrycznie, zaś amoniak destylował z parą wodną w aparacie Parnasa-Heilera. W pracy niniejszej stosowano destylację amoniaku pod zmniejszonym ciśnieniem (1) z zachowaniem warunków rozkładu enzymatycznego glutaminy podanych przez Krebsa.

## Zasada metody

Glutaminę poddawano hydrolizie nieenzymatycznej i enzymatycznej w próbkach pobranych z jednego homogenizatu roślinnego. Wytworzony amoniak oddestylowywano w tych samych warunkach, tzn. w temp. 40° i pod zmniejszonym ciśnieniem (pompa wodna), i oznaczano metodą podbrominową (1).



http://rcin.org.pl

## Hodowla bakterii

Szczep *Cl. Welchii SR 12,* otrzymany z laboratorium prof. Strauba, hodowano w środowisku opisanym przez Krebsa (3) i Mc Ilwaina i Hughesa (4).

Skład pożywki był następujący:

a) 90 ml hydrolizatu kazeiny,

b) 50 ml bulionu z serca wołowego,

c) 40 g siekaniny serca wołowego,

d) 280 ml wody,

e) 25 ml roztworu wyjałowionej glikozy.

Składniki pożywki przygotowywano w sposób następujący:

a) Hydrolizat kazeiny: mieszaninę 170 ml stężonego HCl i 80 ml technicznego chlorku tytanu dodaje się do 200 ml kazeiny w stożkowej kolbie. Zawartość kolby miesza się tak długo, aż cała ciecz zostanie wchłonięta przez kazeinę, i następnie ogrzewa się autoklawie w ciągu 45 min. w temp. 120°. Otrzymany roztwór oziębia się i doprowadza do wartości pH = 6,0 — 6,5 za pomocą 4% NaOH (około 240 ml). Przy zobojętnianiu wypada ciężki, ciemno zabarwiony osad, zawierający sole tytanu. Zawartość kolby gotuje się w ciągu 10 min., następnie odstawia na przeciąg 3 godzin w celu oziębienia i odsącza się na lejku Büchnera. Do przesączu dodaje się 45 g I-rzędowego fosforanu potasowego i 1 g kwasu szczawiowego, doprowadzając wartość pH do 7,6 za pomocą NaOH, i dopełnia się roztwór wodą do objętości 1000 ml. Następnie roztwór gotuje się 5 min., odstawia do oziębienia na przeciąg 2 godzin i sączy przez bibułę filtracyjną. Roztwór przechowuje się w ciemni z dodatkiem chloroformu; przed użyciem rozcieńcza się siedmiokrotnie.

b) Bulion z serca wołowego: świeże serce wołowe, pozbawione tłuszczu, miele się na kuchennej maszynce. 500 g zmielonego serca, 10 g peptonu (*oxo* lub *bacto*) i 5 g NaCl wrzuca się do 500 ml wrzącej wody i gotuje w ciągu 20 min. Bulion sączy się przez gazę, a następnie przez sączek i zobojętnia 1 n NaOH do niebieskiego zabarwienia błękitu tymolowego. Ogrzewa się do temp. 90°, przy czym strącają się fosforany; następnie sączy się na gorąco i po doprowadzeniu wartości pH do 7,6 za pomocą 1 n HCl bulion przechowuje się w lodówce z dodatkiem chloroformu.

c) Siekanina serca wołowego: po wygotowaniu serca i wyżęciu go przez gazę siekaninę suszy się na bibule filtracyjnej w ciągu 24 godz. W celu przechowania 80-gramowe porcje siekaniny miesza się z 50 ml bulionu i 50 ml wody w kolbie stożkowej i sterylizuje w autoklawie.

d) Roztwór glikozy zawiera 20 g glikozy i 1 kroplę stężonego kwasu fosforowego w 100 ml roztworu. Sterylizuje się w autoklawie.

Pożywka dla przechowywania i szczepienia bakterii: 3 ml bulionu, 3 ml siekaniny serca wołowego i 3 ml wody w probówkach wstawia się do wrzą-

http://rcin.org.pl

cej łaźni wodnej na 30 min., w celu usunięcia powietrza dodaje się następnie parafiny i sterylizuje.

Jałową pożywkę (ilości podane wyżej) do hodowli bakterii zaszczepiano dodając zawartość 24-godz. hodowli probówkowej. Kolba z zaszczepioną pożywką była przechowywana w ciągu 16 godz. w temp. 37° w warunkach tlenowych (jeśli wzrost był zadowalający, pH pożywki spadało z wartości od 7,6 do 4,0 — 4,5). Następnie roztwór sączono przez szklaną watę. Pozostałość na lejku przemywano dwukrotnie roztworem soli fizjologicznej. Przesącz odwirowywano, bakterie przemywano 2 razy roztworem soli fizjologicznej i zawieszano w 0,2 M buforze octanowym o wartości pH 4,9 (16 ml, 3 M octanu sodowego z 10 ml 3 M kwasu octowego rozcieńczano do stężenia nie przekraczającego 0,2 M), tak, aby na 10 ml przetworu przypadał 1 g mokrych bakterii. Tak przygotowana zawiesina, przechowywana w lodówce, nie zmieniała swej aktywności w czasie około 1 miesiąca. Każda partia bakterii była sprawdzana na czystych roztworach glutaminy i w podanym stężeniu 1 ml zawiesiny był zdolny do rozkładu znacznie większych ilości glutaminy niż wykrywano za pomocą hydrolizy nieenzymatycznej w badanych materiałach roślinnych.

## Odczynniki

A) do rozkładu enzymatycznego:

1) 3 M kwas octowy,
2) 3 M octan sodu,
3) 2% roztwór cetawlonu (bromek trójmetylocetyloamoniowy) [1];
4) bufory do alkalizacji:
   a) 10 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ i 4,77 g $Na_2B_4O_7 \cdot 10\ H_2O$ rozpuścić w 1 l wody destylowanej,
   b) 50 g $Na_2B_4O_7 \cdot 10\ H_2O$ rozpuścić w 1 l; 0,5 n NaOH

B) do rozkładu nieenzymatycznego:

5) bufor do hydrolizy: 51,76 g $KH_2PO_4$ i 30,5 g $Na_4B_2O_7 \cdot 10\ H_2O$ rozpuścić w 1 l wody destylowanej,
6) bufor do alkalizacji: 70 g $Na_2B_4O_7 \cdot 10\ H_2O$ i 28 g NaOH rozpuścić w 800 ml wody destylowanej, gotować 30 min., ochłodzić i dopełnić wodą destylowaną do objętości 1 l.

C) do miareczkowania:

7a) 42,23 g $H_3BO_3$ i 7,8 g NaOH rozpuścić w 800 ml wody destylowanej i gotować 20 min., ochłodzić i dopełnić wodą destylowaną do objętości 1 l ,

---

[1]) Synteza cetawlonu została wykonana w Zakładzie Chemii Organicznej UW przez mgra J Beera i mgra S. Lewaka.

http://rcin.org.pl

7b) 20 g KBr rozpuścić w kilkunastu ml wody destylowanej, dodać 2,5 ml bromu i dopełnić wodą destylowaną do objęości 1 l. Przed oznaczeniem dodać do 45 ml roztworu 7a — 5 ml roztworu 7b, w przypadku miereczkowania tiosiarczanem 0,005 n albo do 45 ml roztworu 7a — 2 ml roztworu 7b — w przypadku miareczkowania tiosiarczanem 0,002 n,

8) krystaliczny KJ,

9) roztwór wodny stężonego kwasu solnego 1:1,

10) 0,005 n lub 0,002 n roztwór tiosiarczanu (miano, 0,02 n tiosiarczanu należy sprawdzać codziennie),

11) 0,25% roztwór skrobi rozpuszczalnej,

12) kwas siarkowy 0,02 n do pochłaniania amoniaku podczas destylacji.

## Przebieg oznaczeń

10 g świeżego materiału roślinnego homogenizowano w homogenizatorze „Waring-Blendor" w ciągu 3 min. (6 razy po 30 sek.) w wodzie destylowanej z dodatkiem 5,0 ml 3 M kwasu octowego. Homogenizat przenoszono ilościowo do cylindra ze szlifem, dopełniano wodą destylowaną do objętości 100 ml i sączono przez sączek (przesącz był prawie bezbarwny). Przesącz ten służył do oznaczania glutaminy metodą zarówno enzymatyczną, jak i nieenzymatyczną. Oznaczenia jedną i drugą metodą wykonywano równolegle tego samego dnia.

Do hydrolizy nieenzymatycznej pobierano 25 ml przesączu i dopełniano wodą destylowaną do objętości 50 ml. W 5 ml tego roztworu oznaczano glutaminę metodą I. Reifera i Tarnowskiej, poddając ją hydrolizie w specjalnych probówkach z 10 ml odczynnika nr 5 (pH = 6,5) w ciągu 30 min. na łaźni wodnej o temperaturze 100°. Następnie roztwór przenoszono do kolbki destylacyjnej zmodyfikowanego aparatu Puchera-Vickery, alkalizowano 5 ml buforu nr 6 i oddestylowano wytworzony amoniak do odbieralnika zawierającego 12 ml 0,02 n kwasu siarkowego. Jako próba ślepa służyło 5 ml roztworu, w którym oznaczano amoniak identycznie jak w próbie badanej, dodając także buforu nr 5, ale nie ogrzewając w temp. 100°. Ilość amoniaku otrzymana w próbie ślepej odpowiada wolnemu amoniakowi, zawartemu w materiale roślinnym.

Do hydrolizy enzymatycznej 25 ml homogenizatu wyjściowego rozcieńczano do 50 ml wodą destylowaną, dodając 2 ml 3 M octanu sodowego (1,25 ml 3 M kwasu octowego z 2 ml 3 M octanu sodu dają 3,25 ml buforu octanowego 3 M, co przy rozcieńczeniu do 50 ml daje bufor o stężeniu około 0,2 M o wartości pH 4,9. Według Krebsa stężenie buforu może się wahać od 0,05 do 0,2 M). Przebieg hydrolizy enzymatycznej był następujący:

http://rcin.org.pl

Do kolbki Erlenmeyera nalewano 3 ml wody destylowanej, 1 ml zawiesiny bakteryjnej i 1 kroplę cetawlonu, do drugiej — 3 ml roztworu analizowanego i 1 kroplę cetawlonu. Te dwie kolbki razem stanowiły próbę ślepą. W tej ślepej próbie uwzględniono dodatkowe źródła pochodzenia amoniaku, a mianowicie amoniak z bakterii i amoniak materiału roślinnego nie pochodzący z rozkładu glutaminy. Do trzeciej kolbki nalewano 3 ml roztworu analizowanego, 1 ml zawiesiny bakteryjnej i 2 krople cetalonu. Wszystkie trzy kolbki wstawiano do termostatu o temperaturze 40° na 30 min. Po wyjęciu z termostatu ciecz z dwóch kolbek, należących do próby ślepej, zlewano razem do kolbki destylacyjnej, alkalizowano 10 ml odczynnika 4a, przy czym enzym stawał się nieczynny, i 3 ml odczynnika 4b i natychmiast oddestylowano amoniak tak, jak podczas hydrolizy nieenzymatycznej. Analogicznie postępowano z próbą badaną. Różnica w zawartości amoniaku pomiędzy obiema próbami odpowiada zawartości glutaminy.

Amoniak oznaczano metodą podbrominową podczas jednej i drugiej hydrolizy, po skończonej destylacji (15 min.) do odbieralnika zawierającego 12 ml 0,02 n kwasu siarkowego dodawano 5 ml odczynnika otrzymanego przez zmieszanie odczynnika 7a i 7 b, jak podano wyżej, i po 3 do 5 min. dodawano parę kryształków jodku potasowego, 2 ml kwasu solnego (1 : 1) i miareczkowano tiosiarczanem sodowym wobec skrobi.

## Część doświadczalna

W czasie doświadczeń okazało się, że cetawlon jest niezbędny przy rozkładzie enzymatycznym glutaminy w materiale roślinnym. Dla przykładu podano niżej wyniki otrzymane z cetawlonem i bez cetawlonu w kilku analogicznych próbach na czystym roztworze glutaminy:

Tablica 1

| 0,707 mg glutaminy w 3 ml analizy odpowiada 0,067 mg azotu amidowego glutaminy | | | |
|---|---|---|---|
| Próbki bez cetawlonu | | Próbki z cetawlonem | |
| Ilość zużytych ml $Na_2S_2O_3$ 0,0005 n | Wykryto mg N-amidowego | Ilość zużytych ml $Na_2S_2O_3$ 0,005 n | Wykryto mg n-amidowego |
| 2,50 | 0,058 | 2,88 | 0,067 |
| 2,18 | 0,050 | 2,91 | 0,067 |

Poza tym zbadano, czy glutamina, asparagina i mocznik rozkładają się w warunkach hydrolizy enzymatycznej, tzn. przy wartości pH = 4,9 w temperaturze 40° w ciągu 30 min. bez działania bakterii. Wyniki przedstawiono w tablicy 2:

http://rcin.org.pl

Tablica 2

| mg w 3 ml buforu octanowego 0,2 M | Wyniki miareczkowania $Na_2S_2O_3$ 0,005 n | | Różnica między próbą ślepą i badaną w ml $Na_2S_2O_3$ 0,005 |
|---|---|---|---|
| | Próba ślepa | Próba badana | |
| Glutamina 0,3 mg | 3,46<br>3,50 | 3,50<br>3,46 | 0,00 ml |
| Glutamina 2,28 mg | 5,60<br>5,56 | 5,58<br>5,58 | 0,00 ml |
| Asparagina 0,3 mg | 3,46<br>3,50 | 3,24<br>3,22 | 0,25 ml |
| Asparagina 8 mg | 7,40<br>7,40 | 6,60<br>6,54 | 0,93 ml |
| Mocznik 8 mg | 6,72<br>6,66 | 6,72<br>6,65 | 0,00 ml |

Jak widać z danych tablicy 2, glutamina i mocznik nie rozkładają się w tych warunkach, zaś asparagina ulega rozkładowi w pewnym stopniu, ponieważ jednak przy enzymatycznym oznaczaniu ślepa próba znajduje się w tych samych warunkach, co badana, więc rozkład asparaginy nie przeszkadza w oznaczaniu glutaminy, lecz tylko obniża ślepą.

Zbadano również, czy bakterie nie rozkładają asparaginy i mocznika (tablica 3). Ślepa próba przy oznaczaniu asparaginy i mocznika składała się z dwóch kolbek, z których jedna zawierała zawiesinę bakterii, a druga — asparaginę lub mocznik w buforze octanowym.

Tablica 3

| mg w 3 ml buforu octanowego 0,2 M | Wyniki miareczkowania w ml $Na_2S_2O_3$ 0,005 n | | Różnica między próbą ślepą i badaną w ml $Na_2S_2O_3$ 0,005 n |
|---|---|---|---|
| | Próba ślepa | Próba badana | |
| Asparagina 8 mg | 6,53<br>6,54 | 6,56<br>6,50 | 0,00 ml |
| Mocznik 8 mg | 7,36<br>7,35 | 7,38<br>7,32 | 0,00 ml |

W celu przekonania się, czy cała glutamina w materiale roślinnym ulega rozkładowi w warunkach hydrolizy enzymatycznej, wykonano oznaczenie w 3 i 5 ml homogenizatu roślinnego przy tej samej ilości bakterii. Wyniki przedstawiono w tablicy 4.

Ponadto wykonano doświadczenie, w którym dodawano do homogenizatu dodatkowe ilości glutaminy i oznaczano glutaminę w roztworze pier-

http://rcin.org.pl

wotnym i w roztworze z dodatkiem glutaminy. Ilość dodanej glutaminy odpowiadała 2,18 ml 0,002 n $Na_2S_2O_3$ (tablica 5).

Tablica 4

| L. p. | Roślina | ml $Na_2S_2O_3$ 0,002 n na 1 ml analizy w 3 ml próbie | ml $Na_2S_2O_3$ 0,002 n na 1 ml analizy w 5 ml próbie | Różnica w ml $Na_2S_2O_3$ 0,002 n |
|---|---|---|---|---|
| 1 | pszenica | 0,150 | 0,155 | + 0,005 |
| 2 | pszenica | 0,125 | 0,120 | — 0,005 |
| 3 | pszenica etiolowana | 0,186 | 0,190 | + 0,004 |
| 4 | pszenica | 0,170 | 0,180 | + 0,010 |
| 5 | rajgras | 0,142 | 0,140 | — 0,002 |
| 6 | koniczyna | 0,060 | 0,060 | 0,000 |
| 7 | owies | 0,135 | 0,136 | + 0,001 |

Tablica 5

| L. p. | Roślina | Rozkład enzymat. homogenizat ml $Na_2S_2O_3$ 0,002 n | Rozkład enzymat. homogenizat + glutamina 0,002 n ml $Na_2S_2O_3$ 0,002 n | Różnica odpow. glutaminie materiału roślin. |
|---|---|---|---|---|
| 1 | groch | 0,76 | 2,94 | 2,94 — 2,18 = 0,76 |
| 2 | groch | 1,12 | 3,31 | 3,31 — 2,18 = 1,13 |
| 3 | łubin | 0,35 | 2,50 | 2,50 — 2,18 = 0,32 |

Tablica 6

| L. p. | Roślina | Wiek w dniach | Miesiąc | mg % N-amidowego na świeżą masę | | Różnica w mg % | Wykryto hydrol. nie enzymat. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | hydrol. nie-enzymat. | hydrol. enzymat. | | |
| 1 | pszenica | 11 | czerwiec | 4,75 | 2,84 | 1,91 | 167 % |
| 2 | pszenica | 7 | lipiec | 3,26 | 2,33 | 0,93 | 140 % |
| 3 | rajgras | 11 | ,, | 1,77 | 1,35 | 0,42 | 131 % |
| 4 | owies | 10 | ,, | 3,91 | 2,98 | 0,93 | 131 % |
| 5 | żyto | 8 | ,, | 5,12 | 1,85 | 3,27 | 275 % |
| 6 | żyto | 6 | wrzesień | 5,21 | 3,72 | 1,49 | 140 % |
| 7 | groch | 14 | sierpień | 5,87 | 4,70 | 1,17 | 124 % |
| 8 | groch | 15 | ,, | 7,26 | 6,92 | 0,34 | 104 % |
| 9 | łubin | 16 | ,, | 4,10 | 2,14 | 1,96 | 191 % |
| 10 | łubin | 17 | ,, | 5,40 | 3,16 | 2,24 | 170 % |
| 11 | koniczyna | 20 | wrzesień | 3,07 | 1,11 | 1,96 | 267 % |

http://rcin.org.pl

Po tych doświadczeniach wykonano oznaczenie glutaminy za pomocą hydrolizy nieenzymatycznej i enzymatycznej. Wiek roślin analizowanych wahał się od 1 — 3 tygodni od chwili wysiania. Rośliny wysiewano na piasku, podlewano je wodą i pożywką Hellriegela, zwykłą lub zmodyfikowaną, zawierającą mocznik, utrzymując stały procent wilgotności. Wyniki otrzymane obu metodami w przeliczeniu na mg% N - amidowego glutaminy w świeżej masie roślinnej zebrano w tablicy 6:

Dla roślin etiolowanych wyniki przedstawiono w tablicy 7 [1]):

Tablica 7

| L. p. | Roślina | Wiek w dniach | Miesiąc | mg % N-amidowego na świeżą masę | | Różnica w mg % | Wykryto hydrol. nie enzym. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Hydr. nie-enzym. | Hydrol. enzym. | | |
| 1 | rajgras II | 11 | lipiec | 1,77 | 1,35 | 0,42 | 131 % |
| 2 | żyto I | 9 | ,, | 3,26 | 1,39 | 1,87 | 234 % |
| 3 | pszenica I | 7 | ,, | 3,72 | 3,26 | 0,46 | 114 % |
| 4 | pszenica II | 8 | ,, | 3,12 | 3,22 | —0,10 | 97 % |
| 5 | owies I | 9 | ,, | 4,00 | 3,54 | 0,46 | 131 % |
| 6 | ,, II | 11 | ,, | 4,75 | 4,76 | 0,00 | 100 % |

Dla roślin podlewanych mocznikiem, czyli zmodyfikowaną pożywką Hellriegela, wyniki przedstawiono w tablicy 8:

Tablica 8

| L. p. | Roślina | Wiek w dniach | Miesiąc | mg % N-aminowego na świeżą masę | | Różnica w mg % | Wykryto hydrol. nie enzym. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Hydrol. nie-enzymat. | Hydrol. enzymat. | | |
| 1 | pszenica | 8 | lipiec | 2,84 | 2,33 | 0,51 | 122 % |
| 2 | rajgras | 11 | ,, | 3,58 | 2,60 | 0,98 | 137 % |
| 3 | owies | 10 | ,, | 5,21 | 3,07 | 2,14 | 169 % |
| 4 | owies | 13 | wrzesień | 4,00 | 2,51 | 1,49 | 159 % |

**Dyskusja**

Jak wynika z tablic, w 3 przypadkach na 21 zbadanych wyniki otrzymane metodą hydrolizy enzymatycznej i nieenzymatycznej okazały się

[1]) I — oznacza etiolowanie w ciągu 24 godz., a II — 48 godz.

http://rcin.org.pl

zgodne, przy czym dwa z nich dotyczyły roślin etiolowanych 48 godz., kiedy ilość amoniaku normalnie otrzymanego w hydrolizie nieenzymatycznej silnie spada w porównaniu z roślinami nieetiolowanymi. Fakt ten potwierdza wątpliwości autorów (1), (5), że hydroliza nieenzymatyczna nie jest specyficzna dla glutaminy, mimo że dotychczas nie mamy danych o innych związkach azotowych w materiale roślinnym, które w opisanych warunkach mogłyby ulec całkowitej lub częściowej hydrolizie. Ze względu na to, że wyniki otrzymane metodą hydrolizy nieenzymatycznej są prawie zawsze wyższe i to czasem o przeszło 200%, przeto oznaczenie glutaminy tą metodą w materiale roślinnym nie powinno być stosowane. Błędy metody Puchera-Vickery i modyfikacji Reifera i Tarnowskiej polegają więc nie tylko na hydrolitycznym rozkładzie asparaginy (2,6%) i mocznika (17% wg Puchera-Vickery i 4,5% wg Reifera-Tarnowskiej), ale i na hydrolizie nie rozpoznanych jeszcze związków azotowych, które w warunkach tych metod ulegają rozkładowi do wolnego amoniaku. Jedynie metoda hydrolizy enzymatycznej, w szczególności przy zastosowaniu szczepu *Cl. Welchii SR 12,* jak wynika z tablic, jest metodą specyficzną, przeto umożliwia interpretację wyników oznaczeń zawartości glutaminy w materiale roślinnym. Mocznik i asparagina nie ulegają hydrolizie enzymatycznej w warunkach oznaczenia glutaminy (p. tablice), a nieznaczny rozkład asparaginy podczas inkubacji materiału roślinnego nie przeszkadza w oznaczeniu glutaminy, ponieważ rozkład ten jest uwzględniony w próbie ślepej. Jedyna trudność metody enzymatycznej polega na względnie długim okresie przygotowania pożywki do hodowli bakterii i sporządzenia zawiesiny. Nie można pominąć również tego, że w pracy ze szczepem *Cl. Welchii* wskazana jest daleko idąca ostrożność ze względu na groźbę infekcji (zgorzel gazowa).

## LITERATURA

1. K. Tarnowska i I. Reifer, *Roczniki Nauk Rolniczych,* 61, 233, (1952).
2. H. A. Krebs, *Biochem J.,* 43, 51, (1948).
3. H. A. Krebs, *Biochem. J.,* 47, 605, (1950).
4. Mc Ilwain & D. E. Hughes *Biochem J.,* 38, 187, (1944).
5. H. B. Vickery, C. W. Pucher, H. E. Clark, A. C. Chibnall & E. G. Westall, *Biochem. J.,* 29, 2710, (1935).

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛУТАМИНА В РАСТИТЕЛЬНОМ ВЕЩЕСТВЕ

### Резюме

1. Описан специфический метод микроопределения глутамина в растительном веществе.

2. Путем применения *Cl. Welchii SR 12* были устранены ошибки

http://rcin.org.pl

в определении глутамина неэнзиматическим гидролизом, которые являлись следствием гидролиза мочевины, аспарагина и других азотеодержащих соединений.

3. В связи с этим результаты получены энзиматическим путем на много ниже результатов неэнзиматического определения.

4. Описанный метод дает возможность определять глутамин в количествах от 5 + 70 микрограммов, с точностью ± 3%.

5. Анализ длится не больше 2 часов.

## DETERMINATION OF GLUTAMINE IN PLANT MATERIAL

Summary

1. A specific method for microdetermination of glutamine in plant material is described.

2. Using the strain *Cl. Welchii SR 12,* errors due to hydrolysis of urine, asparagine and some indefinite nitrogen compounds in the determination of glutamine by the nonenzymatic hydrolysis method were eliminated.

3. The results obtained by the enzymatic method are much lower than those obtained by the nonenzymatic.

4. The described method permits the determination of glutamine in quantities of 5 — 70 micrograms with an accuracy of ±3%.

5. The time needed for the analysis does not exceed 2 hours.

*Department of Biochemistry Academy of Agriculture Warszawa*

http://rcin.org.pl

## SPIS TREŚCI


Dawid Shugar — Światłoczułe utlenianie niektórych 3-podstawionych pochodnych indolu w obecności riboflawiny . . . . . 3

Włodzimierz Ostrowski, Bolesław Skarżyński i Zdzisław Żak — Witamin $B_{12}$ we frakcjach białkowych surowicy krwi ludzkiej . . . . . 13

K. Zakrzewski, J. Krysiak, K. Murawski, Z. May, J. Malec — Struktura molekularna produktów hydrolizy dekstranu 27

Andrzej Morawiecki — Wpływ adenozynotrójfosforanu na denaturację cieplną białek . . . . . 47

Włodzimierz Mozołowski — Charakterystyka białek surowicy krwi człowieka przy pomocy zawartości azotu i niektórych właściwości fizycznych . . . . . 59

A. Dmochowski i H. Padzik — Ilościowe oznaczanie adeniny i guaniny w łuskach łuszczycy (*Psoriasis vulgaris*) . . . . . 73

A. Dmochowski, H. Panusz — Mikrojodometryczna metoda oznaczania guaniny . . . . . 81

I. Reifer, D. Wolszlegier i Zb. Kaniuga — Nowa metoda mikrooznaczania skrobi w materiale roślinnym . . . . . 93

W. Niemierko — Modyfikacja fotokolorymetru „Ersza" . . . . 107

Przemysław Szafrański — Metoda wyosabniania metabolitów na drodze przyżyciowej ekstrakcji ciągłej oraz zastosowanie jej do badania metabalizmu *Mycobacterium 279* . . . . . 116

I. Małachowska, A. Linde i J. Meduski — Przystosowanie *Escherichia coli* do wykorzystywania cytrynianów w stanach niedoboru azotowego . . . . . 133

Mariusz Żydowo — Niektóre zmiany biochemiczne krwi zdrowego człowieka pod wpływem adrenaliny 139

Maria Jeżewska — Oznaczanie glutaminy w materiale roślinnym . 149


http://rcin.org.pl

KOMITET DLA SZERZENIA NAUKI PAWŁOWA

przy Polskiej Akademii Nauk

ogłasza

# KONKURS

na

## NAJLEPSZĄ PRACĘ POPULARYZATORSKĄ W DZIEDZINIE NAUKI PAWŁOWA

W zasadzie tematyka nie jest ograniczona. Pożądanym byłoby naświetlenie następujących zagadnień:

— Rozwój ewolucyjny czynności nerwowej
— Kształtowanie się mowy ludzkiej
— Miejsce nauki Pawłowa w naukach przyrodniczych i społecznych
— Znaczenie nauki Pawłowa w teorii i w praktyce nauk medycznych, pedagogicznych, psychologicznych i innych
— Światopoglądowe znaczenie nauki Pawłowa.

Dzieło powinno być opracowane na poziomie dostępnym szerokiemu ogółowi. Pożądane liczne ilustracje.

Za prace, uznane przez Sąd Konkursowy za najlepsze, Komitet przeznacza następujące nagrody:

| | |
|---|---|
| I-sza nagroda w wysokości | zł 10.000.— |
| Trzy II-gie nagrody po | zł 5.000.— |
| Pięć III-ch nagród po | zł 2.000.— |

Niezależnie od nagrody autor otrzymuje honorarium autorskie. Komisja organizacyjna konkursu zastrzega sobie prawo zakupu nienagrodzonych prac według obowiązujących stawek autorskich.

Sąd Konkursowy będzie stanowiła Komisja wyłoniona przez Komitet dla Szerzenia Nauki Pawłowa.

*Termin składania prac do dnia 15 września 1954 r.*

Prace zaopatrzone godłem z oddzielnie zaklejoną kopertą zawierającą nazwisko i adres autora należy przesyłać do Komitetu dla Szerzenia Nauki Pawłowa, Polskiej Akademii Nauk — Warszawa— ul. Nowy Świat nr 72, pokój nr 139 z adnotacją „KONKURS".



http://rcin.org.pl