

P O L S K A A K A D E M I A N A U K
K O M I T E T B I O C H E M I C Z N Y

ACTA
BIOCHIMICA POLONICA

KWARTALNIK

T O M 1
Zeszyt 3-4

WARSZAWA 1954

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

K O M I T E T R E D A K C Y J N Y

Mochnacka Irena, Mozołowski Włodzimierz,
Reifer Ignacy

R A D A R E D A K C Y J N A

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

ADRES REDAKCJI: Warszawa, Nowy Świat 72 (Pałac Staszycy).

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE —
DZIAŁ CZASOPISM — WARSZAWA, KRAK. PRZEDMIEŚCIE 79

| | |
|--|-------------------------------------|
| <i>Nakład 641+125</i> | <i>Oddano do składania 8.VII.54</i> |
| <i>Ark. wyd. 12,3 Ark. druk. 10,5</i> | <i>Podpisano do druku 25.I.55</i> |
| <i>Papier bezdrz. III kl. 80 g. 70×100</i> | <i>Druk ukończono 28.I.55</i> |
| <i>Cena zł 30.—</i> | <i>Zamówienie 871c 5-B-11436</i> |

DRUKARNIA IM. REW. PAŹDZIERNIKOWEJ — WARSZAWA

E. MIKULASZEK

**METODA ILOŚCIOWEGO OZNACZENIA SKŁADNIKÓW PRECYPITATU
W PRECYPITUJĄCYCH SYSTEMACH WIELOCUKROWYCH**

*Z Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej Akademii Medycznej w Warszawie
i z Instytutu Dermatologii i Wenerologii w Warszawie*

Metody ilościowego ujęcia odczynu precypitacji swoistej przy zastosowaniu chemicznego lub fizykochemicznego oznaczania składników powstałego precypitalu opierają się albo na mikrochemicznym oznaczeniu azotu w precypitacie, lub też na pomiarze zmętnienia, pojawiającego się po zmieszaniu antygeny i przeciwciała w określonych warunkach czasu i temperatury.

W celu zwiększenia czułości metody oraz jej uproszczenia wprowadzili Heidelbergger-Macpherson (1) oraz Heidelbergger-Anderson (2) a także Kabat-Kaiser-Sikorski (3) jak i Kabat-Bezer (4) oznaczenie białka mikrometodą kolorymetryczną, opartą na odczynie Folina-Ciocalteu. Wspomniane metody mogą jednak ulegać dalszemu udoskonaleniu i rozszerzeniu.

W przypadku kiedy użyty w odczynie precypitacyjnym antygen jest wielocukrowcem lub sympleksem wielocukrowym, możliwe jest wprowadzenie kolorymetrycznych mikrometod do oznaczenia zarówno białek, jak i wielocukrów w precypitacie. Jako metodę mogącą mieć szerokie zastosowanie, proponuję równoczesne oznaczenie w precypitacie węglowodanów metodą alfa-naftolową według Dischego oraz oznaczenie białek mikrometodą Folin-Ciocalteu w modyfikacji podanej przez Kabata-Mayera (5). Jako wzorca należy w tej metodzie użyć, przy oznaczeniu węglowodanów roztworu d-mannozy o znanym stężeniu, zaś jako standardu do oznaczenia białka roztworu gamma-globuliny surowicy, przy czym najlepsze wyniki otrzymuje się stosując gamma-globulinę pochodzącą z tego gatunku zwierzęcia, które dostarczyło surowicy precypitującej w danym systemie.

W szeregu oznaczeń okazała się odpowiednia następująca technika: w małych probówkach wirówkowych (pojemności 3 ml) przyrządzić w dwóch równoległych szeregach spadające rozcieńczenia antygeny wielocukrowego, począwszy od roztworu zawierającego 10 mg antygeny w ml, drogą dalszych rozcieńczeń w postępie geometrycznym; objętość roztworów antygeny

wynosi stale 0,5 ml. Do każdej probówki dodać po 0,5 ml precypitującej surowicy odpornościowej, całość zmieszać, po czym pozostawić 24 godziny w lodowni 0—2°. Na drugi dzień odwirować powstałe precypitaty a) przenosząc płyn nad precypitatem b) ilościowo do drugiego szeregu probówek; oddzielone precypitaty trzykrotnie dokładnie przemyć oziębionym płynem fizjologicznym, a po ostatnim odwirowaniu precypitaty rozpuścić w 0,5 ml 0,1 N NaOH. W otrzymanym roztworze precypitatu oznaczyć w 0,2 ml zawartość węglowodanów jako mannozę oraz białek jako gamma-globuliny. Jako kontrole służyć: 1/ 0,5 ml surowicy + 0,5 ml płynu fizjologicznego, 2) 0,5 ml roztworu antygeny o zawartości 0,1 mg/ml + 0,5 ml płynu fizjologicznego.

Wynik dwóch równoległych oznaczeń precypitatu podać jako średnią arytmetyczną.

Do płynu nad precypitatem b), przeniesionego do dwóch szeregów probówek, dodać w jednym szeregu po 0,5 ml użytej surowicy precypitacyjnej, zaś w drugim szeregu po 0,5 ml roztworu użytego antygeny (w stężeniu 1 mg/ml), po czym z oboma szeregami postępować jak przy precypitacji wyjściowej, z tą tylko różnicą, że oznaczenie węglowodanów i białek dotyczy jedynie precypitatu, nie zaś płynu nad precypitatem, który się odzuca. Jako uproszczenie metody można przy badaniu płynu nad precypitatem b) zastosować w miejsce kolorymetrycznego oznaczenia węglowodanów i białek fotometryczne oznaczenie gęstości optycznej, powstałe w precypitującym systemie po 20-minutowym przechowaniu w 20°.

Przykłady oznaczenia systemu precypitacyjnego wielocukrowego:

Przy konstrukcji tych tablic przyjęto, że precypitujące przeciwciało przeciw wielocukrowe jest w przeważającej ilości identyczne z gamma-globuliną surowicy konia i zawiera przy oznaczeniu metodą alfa-naftolową wg Dischego 2,0% węglowodanu jako mannoza. Odejmując od całkowitej ilości węglowodanów, oznaczalnych metodą alfa-naftolową i znajdujących się w precypitacie, ilość węglowodanów gamma-globuliny, obliczoną z zawartości białka precypitatu, otrzymujemy ilość węglowodanów precypitatu, pochodzącą z antygeny.

Tą drogą można obliczyć:

- 1) całkowity odsetek węglowodanów w precypitacie (jako mannoza);
- 2) odsetek węglowodanów pochodzących z antygeny; 3) odsetek dodanego wielocukru, pojawiający się w precypitacie.

W rzeczywistych wielocukrowych reakcjach precypitacyjnych, liczby w kolumnach 8 i 9 wykazują stały i wyraźny spadek, podczas gdy liczby kolumny 10 wykazują wzrost dochodzący do 100% a nawet go przekraczający (w przypadku, gdy antygen zawiera węglowodany, dające silniejszą od mannozy barwę w odczynie alfa-naftolowym).

Tablica 1

Mannan z *Candida albicans* surowica odpornościowa królika nr 1359
(system precypitacyjny o bardzo szerokiej strefie ekwiwalencji)

| | a | b | c | d | e | f | g | h | i | j | k | l | m | n | o | p | q | kontr. |
|----------------|--------------------------------|---|---|--|---|--|---|--|--|------|-------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|--------|
| mannanu mg | 5,0 | 2,5 | 1,25 | 0,62 | 0,31 | 0,16 | 0,08 | 0,04 | 0,02 | 0,01 | 0,005 | 0,0025 | 0,0012 | 0,0006 | 0,0003 | 0,00015 | 0,00007 | 0,000 |
| surowicy ml | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| 24 godziny 2° | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | | | | | | | | | |
| | Białko w precypitacie mg | Całkowity wielocukier w precypita- cie mg | Wielocukier pochodzący z antygenu mg | Płyn nad precypitatem + mannan (mg/ml) 0,umna Opt. D | Płyn nad precypitatem + surowicy 0,5 ml Opt. D | Strefy: A = nad- miaru antygenu Ekw = ekwiwa- lencji P = nad- miaru przeciwciała | wiw=i n n w5rm % mannozy w precypita- cie | % mannozy antygeny w całkowitej mannozie precypitatu | % dodanej mannozy- w/antygeny w precypita- cie | | | | | | | | | |
| a | 0,029 | 0,029 | 0,029 | 0,000 | 0,027 | A | 50,0 | 100,0 | 0,006 | | | | | | | | | |
| b | 0,033 | 0,032 | 0,031 | 0,000 | 0,020 | A | 47,7 | 96,8 | 0,012 | | | | | | | | | |
| c | 0,039 | 0,048 | 0,047 | 0,000 | 0,013 | A | 54,0 | 97,9 | 0,037 | | | | | | | | | |
| d | 0,056 | 0,079 | 0,078 | 0,000 | 0,008 | A | 57,7 | 98,7 | 0,12 | | | | | | | | | |
| e | 0,130 | 0,088 | 0,085 | 0,000 | 0,001 | Ekw | 38,9 | 96,6 | 0,27 | | | | | | | | | |
| f | 0,844 | 0,245 | 0,229 | 0,000 | 0,000 | Ekw | 21,0 | 93,5 | 1,4 | | | | | | | | | |
| g | 1,418 | 0,318 | 0,290 | 0,000 | 0,000 | Ekw | 16,7 | 91,2 | 3,7 | | | | | | | | | |
| h | 1,668 | 0,272 | 0,238 | 0,000 | 0,000 | Ekw | 12,2 | 87,5 | 6,1 | | | | | | | | | |
| i | 1,384 | 0,157 | 0,130 | 0,000 | 0,000 | Ekw | 8,4 | 82,7 | 6,6 | | | | | | | | | |
| j | 1,170 | 0,126 | 0,102 | 0,000 | 0,000 | Ekw | 7,8 | 80,9 | 10,4 | | | | | | | | | |
| k | 0,957 | 0,088 | 0,069 | 0,001 | 0,000 | P | 6,6 | 78,4 | 14,1 | | | | | | | | | |
| l | 0,642 | 0,058 | 0,045 | 0,004 | 0,000 | P | 6,4 | 77,6 | 15,5 | | | | | | | | | |
| m | 0,448 | 0,040 | 0,031 | 0,007 | 0,000 | P | 6,3 | 70,7 | 21,4 | | | | | | | | | |
| n | 0,396 | 0,032 | 0,024 | 0,009 | 0,000 | P | 5,6 | 75,0 | 33,3 | | | | | | | | | |
| o | 0,332 | 0,021 | 0,015 | 0,012 | 0,000 | P | 4,2 | 71,4 | 41,7 | | | | | | | | | |
| p | 0,277 | 0,016 | 0,011 | 0,015 | 0,000 | P | 3,7 | 68,7 | 61,1 | | | | | | | | | |
| q | 0,202 | 0,010 | 0,006 | 0,017 | 0,000 | P | 2,7 | 60,0 | 66,6 | | | | | | | | | |
| kontr. | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,018 | 0,000 | P | | | | | | | | | | | | |

T a b l i c a 2

Wielocukier somatyczny *Shigella shigae* (S18). Surowica odpornościowa konia nr 351

| | a | b | c | d | e | f | g | h | i | j | kontr. | |
|---------------------------|--------------------------|---|--------------------------------------|---|--|--|--------------------------|--|-----------------------------------|---|--------|--|
| wielocukier mg | 5,0 | 2,5 | 1,25 | 0,62 | 0,31 | 0,16 | 0,008 | 0,04 | 0,02 | 0,01 | 0,000 | |
| surowica ml | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | |
| 24 godziny 2 ^o | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | | | |
| | Białko w precipitacie mg | Całkowity wielocukier w precipitacie mg | Wielocukier pochodzący z antygeny mg | Płyn nad precipitatem + wielocukier S ₁₈ (mg/ml) 0,5 ml opt. D | Płyn nad precipitatem + surowica n 351 0,5 ml opt. D | Strefy: A = nadmiaru antygeny Ekw = ekwiwalencji P = nadmiaru przeciwciała | % mannozy w precipitacie | % mannozy antygeny całkowitej mannozie precipitatu | % mannozy antygeny w precipitacie | % dodanej mannozy antygeny w precipitacie | | |
| a | 0,396 | 0,188 | 0,180 | 0,000 | 0,600 | A | 30,9 | 95,7 | 3,6 | | | |
| b | 0,468 | 0,150 | 0,140 | 0,000 | 0,600 | A | 22,7 | 93,8 | 5,6 | | | |
| c | 0,480 | 0,113 | 0,103 | 0,000 | 0,590 | A | 17,4 | 91,7 | 8,3 | | | |
| d | 0,484 | 0,107 | 0,098 | 0,000 | 0,540 | A | 16,6 | 90,8 | 15,7 | | | |
| e | 0,393 | 0,084 | 0,077 | 0,000 | 0,495 | A | 16,1 | 90,3 | 24,6 | | | |
| f | 0,420 | 0,079 | 0,071 | 0,000 | 0,238 | A | 14,2 | 89,8 | 45,5 | | | |
| g | 0,412 | 0,076 | 0,068 | 0,015 | 0,025 | Ekw | 14,0 | 88,9 | 87,8 | | | |
| h | 0,353 | 0,050 | 0,043 | 0,078 | 0,000 | P | 10,6 | 86,9 | 107,5 | | | |
| i | 0,344 | 0,024 | 0,018 | 0,135 | 0,000 | P | 4,9 | 72,8 | 90,0 | | | |
| j | 0,217 | 0,015 | 0,011 | 0,203 | 0,000 | P | 4,6 | 70,6 | 109,3 | | | |
| kontr. | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,350 | 0,000 | P | | | | | | |

Tablica 3

Wielocukrowa frakcja z sympleksu *Shigella shigae* surowica konia odpornościowa nr 352

| | | a | b | c | d | e | f | g | h | i | j | kontr. |
|--------|--------------------------|---|--------------------------------------|--|---|---|--------------------------|--|---|------|------|--------|
| | | 5,0 | 2,5 | 1,25 | 0,62 | 0,31 | 0,16 | 0,08 | 0,04 | 0,02 | 0,01 | 0,005 |
| | | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| | | 24 godziny 2° | | | | | | | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | | | |
| | Białko w precipitacie mg | Całkowity wielocukier w precipitacie mg | Wielocukier pochodzący z antygeny mg | Płyn nad precipitatem + wielocukier (mg/ml) 0,5 ml | Płyn nad precipitatem + surowicy 0,5 ml | Strefy: A = nadmiaru antygeny Ekw = ekwiwalencji P = nadmiaru przeciwciała | % mannozy w precipitacie | % mannozy antygeny w całości mannozy precipitatu | % mannozy antygeny w całości mannozy precipitacie | | | |
| a | 0,254 | 0,021 | 0,016 | 0,000 | 0,180 | A | 6,3 | 76,2 | 0,32 | | | |
| b | 0,382 | 0,026 | 0,018 | 0,000 | 0,115 | A | 4,7 | 69,2 | 0,72 | | | |
| c | 0,433 | 0,028 | 0,020 | 0,000 | 0,082 | A | 4,6 | 71,4 | 1,6 | | | |
| d | 0,502 | 0,027 | 0,017 | 0,000 | 0,012 | A | 3,3 | 62,9 | 2,7 | | | |
| e | 0,632 | 0,027 | 0,014 | 0,000 | 0,000 | Ekw | 2,2 | 51,8 | 4,3 | | | |
| f | 0,648 | 0,025 | 0,012 | 0,000 | 0,000 | Ekw | 1,8 | 48,0 | 7,5 | | | |
| g | 0,705 | 0,023 | 0,09 | 0,000 | 0,000 | Ekw | 1,2 | 39,1 | 11,2 | | | |
| h | 0,795 | 0,022 | 0,07 | 0,004 | 0,000 | P | 0,8 | 31,8 | 17,5 | | | |
| i | 0,702 | 0,021 | 0,007 | 0,006 | 0,000 | P | 0,9 | 33,3 | 35,0 | | | |
| j | 0,664 | 0,020 | 0,007 | 0,015 | 0,000 | P | 1,0 | 35,0 | 70,0 | | | |
| k | 0,604 | 0,017 | 0,005 | 0,088 | 0,000 | P | 0,8 | 29,4 | 100,0 | | | |
| kontr. | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,618 | 0,000 | P | | | | | | |

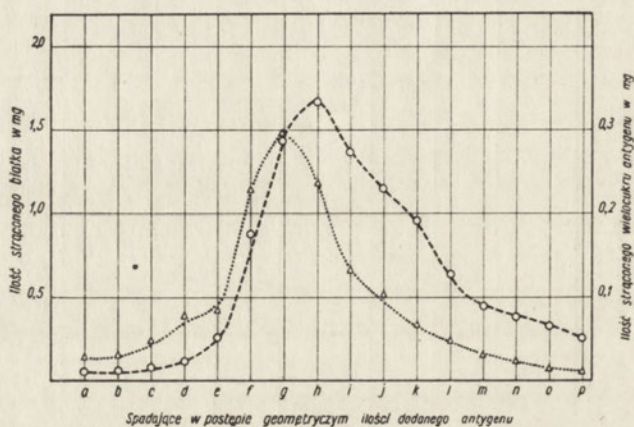
Tablica 4

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|--|------------------------------------|---------------------|--|------------------------------------|---------------------|--|--------------------------------------|---------------------|--|
| | % mannozy w precipitacie | | | % mannozy antygenu w precipitacie | | | % dodanego wielocukru w precipitacie | | |
| | strefa nadmiaru antygeny (skrajna) | strefa ekwiwalencji | strefa nadmiaru przeciwi ciała (skrajna) | strefa nadmiaru antygeny (skrajna) | strefa ekwiwalencji | strefa nadmiaru przeciwi ciała (skrajna) | strefa nadmiaru antygeny (skrajna) | strefa ekwiwalencji | strefa nadmiaru przeciwi ciała (skrajna) |
| Mannan z <i>Candida albicans</i> szczep 1156 | 63,5 | 4,6 | 0,9 | 96,9 | 86,2 | 71,8 | 0,15 | 7,2 | 99,8 |
| Mannan z <i>Candida albicans</i> szczep 1359 | 50,0 | 12,2 | 2,7 | 100,0 | 87,5 | 60,0 | 0,006 | 6,1 | 66,6 |
| Mannan z <i>Candida albicans</i> szczep 1274 | 30,0 | 9,3 | 3,1 | 100,0 | 74,6 | 62,5 | 0,06 | 56,4 | 104,7 |
| Mannan z <i>Candida albicans</i> szczep 281 (system heterol) | 15,4 | 8,2 | 3,1 | 90,6 | 86,3 | 62,4 | 1,9 | 49,0 | 100,0 |
| Wielocukier z <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> | 24,6 | 14,1 | 0,4 | 95,9 | 89,3 | 18,2 | 1,14 | 3,93 | 18,4 |
| Wielocukier somatyczny z <i>Shigella shigae</i> | 30,9 | 14,0 | 4,6 | 95,7 | 88,9 | 70,6 | 3,6 | 87,8 | 109,3 |
| Sympleks białk.-wielocukrowo-lipinowy z <i>Shigella shigae</i> | 23,3 | 10,9 | 3,9 | 94,1 | 86,0 | 74,1 | 4,0 | 7,0 | 17,0 |
| Sympleks białk.-wielocukrowo-lipinowy z <i>Shigella shigae</i> (system heterol). | 7,3 | 4,9 | 0,41 | 80,1 | 69,6 | 63,2 | 0,84 | 1,5 | 2,4 |
| Wielocukier z sympleksu <i>Shigella shigae</i> | 6,3 | 1,8 | 0,8 | 76,2 | 48,0 | 29,4 | 0,32 | 7,5 | 100,0 |

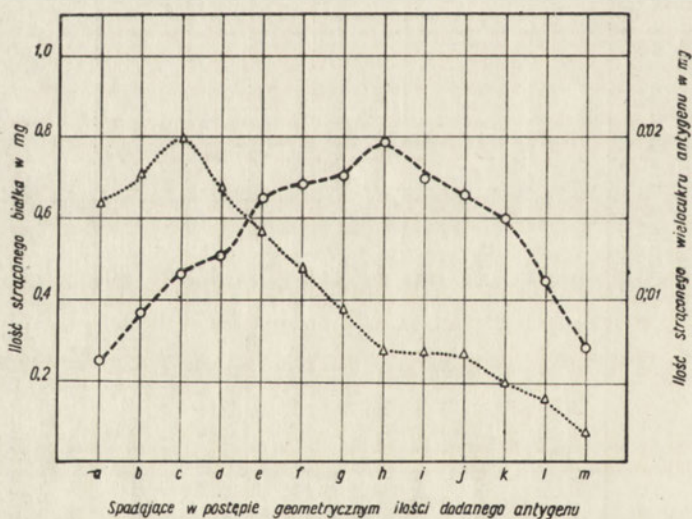
U w a g a: liczby tej rubryki należy skorygować, zależnie od wyniku oznaczenia zawartości węglowodanów w użytym antygenie. Liczby powyżej 100 występują w przypadku, gdy wielocukrowy antygen zawiera znaczny % cukrów (glukozy lub pentoz), dających w odczynie alfa-naftolowym barwę silniejszą od mannozy.

Kolumny 5 i 6 umożliwiają oznaczenie punktu bądź strefy ekwiwalencji oraz — na podstawie ogólnie przyjętych poglądów — wyprowadzenie wniosków co do jednorodności antygenów i przeciwciał w reagującym systemie precypitacyjnym.

Załączone krzywe, podane w sposób konwencjonalny, ilustrują przebieg zbadanych odczynów precypitacyjnych.



Rys. 1



Rys. 2

Opisaną metodę można zastosować również do badania systemów precypitacyjnych, w których antygenami są glikoproteidy, glikolipidy, nukleoproteidy a nawet proste białka.

Załączona tabela ilustruje 4 wpływ składu antygeny na przebieg odczynu precypitacyjnego oraz wpływ zawartości serologicznie czynnych wielocukrowców bądź ugrupowań węglowodanowych w dodanym antygenie.

W wielocukrowych systemach precypitujących stwierdza się następujące prawidłowości:

a) Porównanie krańcowej strefy nadmiaru antygeny ze strefą ekwiwalencji oraz ze strefą krańcowego nadmiaru przeciwciała wykazuje w kolumnach 2, 3, 4 bardzo znaczny spadek, w kolumnach 5, 6, 7 wyraźny spadek, a w kolumnach 8, 9, 10 wzrost, dochodzący w niektórych systemach do 100% w strefie nadmiaru przeciwciała.

W systemach precypitujących niewielocukrowych prawidłowości tych nie stwierdza się.

b) W kolumnie 2 stwierdza się korelację między składem użytego antygeny a odsetkiem węglowodanów w precypitacie; liczby odnoszące się do oczyszczonych antygenów wielocukrowych są znacznie wyższe od liczb, otrzymanych przy użyciu sympleksów, zawierających niższy odsetek węglowodanów. W systemach precypitacyjnych, w których surowica odpornościowa w stosunku do użytego antygeny nie jest homologiczna, liczby kolumny 2 są niższe od liczb systemu homologicznego.

c) W strefie nadmiaru antygeny odsetek węglowodanów w precypitacie, jest stale wyższy aniżeli w strefie ekwiwalencji, który ze swej strony jest wyższy aniżeli w strefie nadmiaru przeciwciała. W strefie nadmiaru antygeny płyn nad odwirowanym precypitatem zazwyczaj nie zawiera już przeciwciał reagujących z homologicznym antygenem, natomiast może on jeszcze być czynny wobec heterologicznego antygeny wielocukrowego.

Metoda ta nadaje się do:

- 1) określenia ilościowych stosunków łączenia się antygeny z przeciwciałem;
- 2) określenia punktu ekwiwalencji oraz umiejscowienia stref nadmiaru antygeny i nadmiaru przeciwciała;
- 3) stwierdzenia jednorodności antygeny w systemie precypitacyjnym;
- 4) określenia odsetka węglowodanów w precypitacie;
- 5) oznaczenia stosunku dodanego antygeny do antygeny, zawartego w precypitacie;
- 6) stwierdzenia różnic gatunkowych u użytych przeciwciał;
- 7) oznaczenia liczby przeciwciał zawartych w użytej surowicy precypitacyjnej;
- 8) ustalenia symetryczności krzywej precypitacyjnej.

Streszczenie

Opracowano fotometryczną mikrometodę, umożliwiającą w swoistych precypitatach oznaczenie zawartości białek i wielocukrów. Metodą tą zba-

dano szereg wielocukrowych systemów precypitacyjnych, przy czym udało się rozdzielić wielocukry, pochodzące z dodanego antygeny od wielocukrów, pochodzących z przeciwciał surowicy precypitującej. Za pomocą załączonych tabel i wykresów zademonstrowano możliwości proponowanej metody oraz zasięg jej zastosowania w badaniach immunologicznych.

LITERATURA

1. M. Heidelberger, C. F. C. MacPherson, *Science*, 97, 1943, 405—98, 1943, 63.
2. M. Heidelberger, D. M. Anderson, *J. Clin. Investig.*, 23, 1944, 607.
3. E. A. Kabat, H. Kaiser, H. Sikorski, *J. exp. Med.*, 80, 1944, 299.
4. E. A. Kabat, A. E. Bezer, *J. exp. Med.*, 82, 1945, 207.
5. A. Kabat, M. M. Mayer: *Experimental Immunochemistry*, Springfield 1948.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКОВ И ПОЛИСАХАРИДОВ В СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРЕЦИПИТАТАХ

Содержание

Новый фотометрический микро-метод, определяющий содержание белков и полисахаридов в специфических преципитатах был разработан автором. Этот метод применялся при изучении целого ряда полисахаридных преципитационных примеров. Притом успешно производилось отделение тех полисахаридов, источником которых был прибавленный антиген, от других полисахаридов, которые были доставлены антителами преципитирующей сыворотки.

При помощи приведенных в настоящем труде таблиц и диаграмм наглядно представлены возможные достижения нового метода а также возможности его применения при иммунологических исследованиях.

A METHOD FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF THE COMPONENTS OF PRECIPITATED POLYSSACHARIDE SYSTEMS.

Summary

A photometric micromethod was worked out for the simultaneous estimation of protein and polysaccharides in specific precipitates. A series of precipitating polysaccharide systems was examined; it was possible to estimate in specific precipitates the approximate amount of polysaccharides, originally present in the antigen, as also the amount of carbohydrates, forming a part of the antibody.

The accompanying tables and diagrams demonstrate the possibilities of the proposed method and its usefulness in immunological investigations.

B. GALOS i W. OSTROWSKI

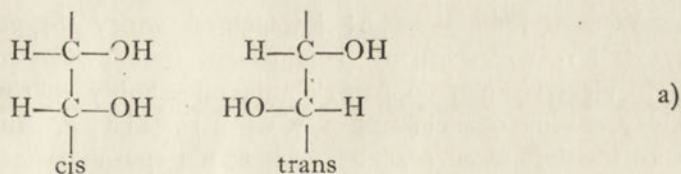
**ROZDZIELANIE CUKRÓW i ICH POCHODNYCH
 ZA POMOCĄ ELEKTROFOREZY BIBUŁOWEJ**

Z Zakładu Chemii Fizjologicznej A. M. w Krakowie

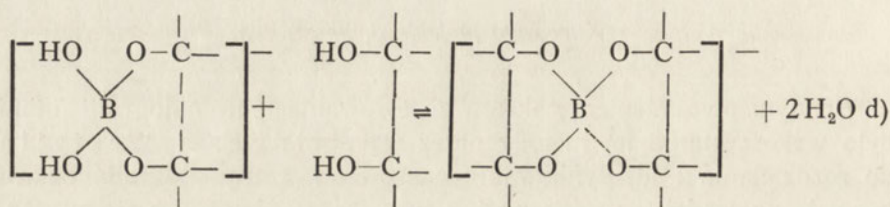
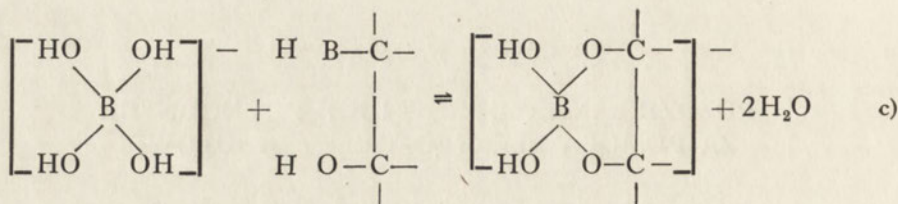
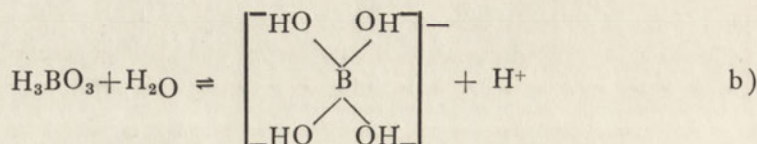
Kierownik: prof. dr B. Skarżyński

Cennym poszerzeniem zakresu zastosowania chromatografii bibułowej było wykorzystanie tej metody przez Partridge'a i Westalla (1) do rozdzielania i identyfikowania cukrowców. Chromatografia cukrowców pozwala na rozdzielenie mieszaniny cukrowców, różniących się między sobą wyraźnie wartościami współczynników rozdzielczych R_f . Przy zastosowaniu postępowania opracowanego przez Partridge'a wiele cukrowców nie daje się jednak oddzielić od siebie z powodu bardzo bliskich wartości cechujących te związki współczynników rozdzielczych. Próby modyfikacji pierwotnej metody Partridge'a usuwając pewne jej niedogodności stwarzały inne trudności (2), tak że chromatografia bibułowa, oddając wielkie usługi przy analizie cukrowców, nie może dotychczas sprostać wszystkim wymaganiom, jakie stawiają badania w tej dziedzinie.

Böseken (3) badając zachowanie się wielowartościowych alkoholi w roztworze kwasu borowego wykazał, że obie te substancje tworzą związek o większej zdolności dysocjacji niż czysty kwas borowy. Dodatek wielowartościowych alkoholi do roztworu kwasu borowego zwiększa znacznie jego przewodnictwo. Reakcja między kwasem borowym a wielowartościowym alkoholem zachodzi wówczas, gdy dwie sąsiadujące ze sobą grupy wodorotlenowe znajdują się w pozycji *cis* (a).



W toku reakcji jonu boranowego (b) z polialkoholem mogą wytworzyć się dwa typy związków:



Jeden typ kompleksu (c) powstaje przy małych stężeniach diolu a dużych stężeniach 4-boranu, natomiast drugi typ kompleksu (d) powstaje przy niedomiarze boranu w stosunku do diolu (4). Zdolność dysocjacji kompleksów boranowych zależy od pH roztworu, od stężenia jonów boranowych i stężenia cukrowca (5). Tendencja do wytwarzania kompleksu z boranem wzrasta w wielowartościowych alkoholach w miarę wzrostu ilości grup wodorollenowych, sąsiadujących ze sobą w konfiguracji cis. Na przykład glicerol reaguje z boranem słabiej niż erytrytol, ten zaś słabiej niż arabitol itd. Ketozy reagują łatwiej z boranem niż aldozy, formy pyranozowe reagują trudniej niż furanozowe. Z powyższych danych wynika, że struktura przestrzenna wielowartościowych alkoholi decyduje o natężeniu reakcji z boranem i że wobec tego różne cukrowce powinny różnić się między sobą pod względem zdolności do wytwarzania połączenia z jonem boranowym. Dalszą konsekwencją tych faktów powinny być różne stopnie dysocjacji kompleksów boranowych różnych cukrów i różna ruchliwość w polu elektrycznym.

W roku 1949 Krejci i współpracownicy (5) po raz pierwszy wykorzystali różną ruchliwość kompleksów boranowych różnych cukrowców w polu elektrycznym do rozdzielania mieszaniny cukrowców, posługując się klasyczną metodą elektroforezy wg Tiseliusa. Autorowie ci nie próbowali identyfikować rozdzielanych w ten sposób związków, poprzestając na stwierdzeniu możliwości preparatywnego rozdzielania wielocukrowców obdarzonych własnościami immunologicznymi. W kilka lat później odmienna ruchliwość kompleksów boranowych cukrowców w polu elektrycznym została

wykorzystana przy użyciu elektroforezy bibułowej do celów analitycznych. *Consden* i współpracownicy (6) badali ruchliwość kompleksów boranowych niektórych jedno- i kilkocukrowców przy różnych pH, posługując się elektroforezą bibułą. *Jaenicke* (7) w analogiczny sposób rozdzielał mieszaniny trzech pentoz i trzech hekzoz. *Michael* i współpracownicy (8), posługując się aparaturą do preparatywnej elektroforezy bibułowej, rozdzielał mieszaniny celobiozy, ramnozy, mannozy i glikozy. *Goldmacher-Mallinckrodt* (9) przy elektroforetycznym rozdzielaniu jednocukrowców od wielocukrowców zamiast bibuły używał jedwabiu. Próby rozdzielania niektórych cukrowców oraz alkoholi wielowodorotlenowych za pomocą elektroforezy bibułowej przeprowadzali również *Woodin* (10) i *Michl* (11).

Wszystkie wyżej wymienione badania ograniczały się do prób określenia ruchliwości w polu elektrycznym kompleksów boranowych nielicznych zaledwie cukrów, bez rozciągnięcia tego sposobu postępowania na produkty hydrolizy kilku- i wielocukrowców. Wobec tego, że elektroforetyczny rozdział cukrów w postaci kompleksów boranowych jest zabiegiem względnie prostym, trwającym znacznie krócej niż chromatografia bibułowa, postawiliśmy sobie za zadanie systematyczne opracowanie najdogodniejszych warunków, w których daje się przeprowadzać rozdział kompleksów boranowych, określenie ruchliwości najpospolitszych cukrów i ich pochodnych oraz próby zastosowania tej techniki do analizy kilku- i wielocukrowców.

Metoda

Elektroforetyczny rozdział przeprowadzano za pomocą aparatury, opracowanej i opisanej przez nas poprzednio (12). Pasek bibuły Whatman nr 4 zwilżono buforem i nakładano mikropipetą 10 μ l 1% roztworu cukru na linii poprzecznej, przechodzącej przez środek paska. Do rozdzielania cukrów używano buforu boranowego o składzie: 0,05 M H_3BO_3 + 0,05 M KCl + + 0,012 M NaOH, pH 8,6, $\mu = 0.1$. Czas trwania elektroforezy wynosił 8 godzin, napięcie 195 V, natężenie ok. 15 mA, temperatura 21°. Po ukończeniu rozdziału pasek bibuły był suszony na powietrzu i spryskany odczynnikiem anilino-ftalanowym wg *Partridge'a* (13), o składzie: 9,93 g przedestyłowanej aniliny + 1,66 g kwasu ftalowego w 100 ml butanolu nasyconego wodą i zakwaszonego kilkoma kroplami kwasu octowego lodowego. Zwilżony odczynnikiem pasek bibuły umieszczano w suszarce w temperaturze 105° na czas 10—15 minut. Po zastosowaniu tych zabiegów plamy odpowiadające położeniu poszczególnych cukrów uzyskiwały odpowiednie zabarwienie, charakterystyczne dla pewnych typów cukrów. Odczyn ten daje wszystkie cukry oprócz trehalozy i heksoz. Ilość cukru mniejsza niż 1 μ g daje się jeszcze na bibule wykazać. W świetle pozafioletkowym barwne plamy wyraźnie fluoryzują, przy czym natężenie plam fluorescencyjnych jest

znacznie wyraźniejsze niż w świetle widzialnym i dlatego wykrywanie bardzo drobnych ilości cukrowców daje się wygodniej przeprowadzić w świetle pozafioletkowym. Kilkocukrowce w porównaniu z monozami dają znacznie słabsze zabarwienie, często niewidoczne po pierwszym spryskaniu. Kilkocukrowce należy więc spryskiwać 2 lub 3-krotnie odczynnikiem i przedłużyć czas ogrzewania do 20 minut.

Trehalozę wykazywano po zhydrolizowaniu wiązania glikozydowego przez spryskiwanie paska bibuły 18% HCl i ogrzewanie w 100° przez 10 minut. Dopiero po tym zabiegu spryskiwano odczynnikiem anilino-ftalany i wywoływano zabarwienie w suszarce.

Heksytole wykazywano roztworem czteroctanu ołowiowego w benzynie (11). Po spryskaniu i podgrzaniu lampą podczerwoną cały pasek bibuły zabarwia się na brunatno, z wyjątkiem miejsc, gdzie znajduje się alkohol. Poważnym źródłem błędów przy przeprowadzaniu elektroforezy kompleksów boranowych cukrowców jest równocześnie przebiegające zjawisko elektroosmozy. Zjawisko to występuje skutkiem tego, że roztwór buforowy przyjmuje ładunek dodatni, natomiast pasek bibuły ładunek ujemny. Wytwarza się wówczas pole elektryczne, w którym obserwuje się przepływ cieczy od bieguna dodatniego do ujemnego, znoszący do bieguna ujemnego cząsteczki obdarzone ładunkiem ujemnym, wędrujące więc zasadniczo do bieguna dodatniego. Trudności wynikające z tego zjawiska omijaliśmy w ten sposób, że równolegle z roztworem badanego cukru umieszczano na pasku bibuły kroplę roztworu kreatyniny (6). W buforze o pH 8,6 kreatynina nie wędruje w polu elektrycznym i ulega przesunięciu na pasku tylko dzięki siłom elektroosmozy. W tych warunkach odległość położenia kreatyniny po ukończeniu elektroforezy od miejsca, w którym została umieszczona przed elektroforezą, jest miarą sił elektroosmozy. Przy obliczaniu ruchliwości dodano drogę przebyłą pod wpływem sił elektroosmozy do drogi przebytej dzięki elektroforetycznej ruchliwości, czyli

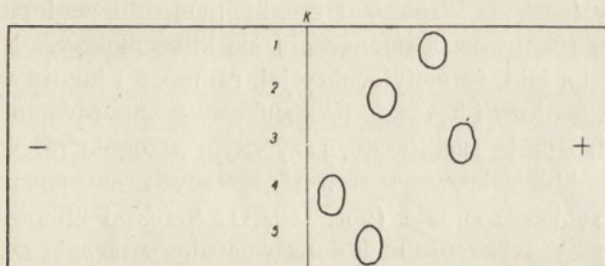
$$u = \frac{S_a + S_b}{l} \cdot t$$

u — ruchliwość
 S_a — droga substancji badanej
 S_b — droga kreatyniny
 E — napięcie w V
 l — długość paska bibuły w cm
 t — czas w sek.

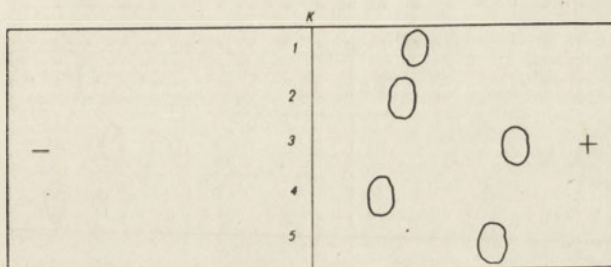
Położenie kreatyniny na pasku bibuły wykazywano przez spryskanie paska zasadowym roztworem pikrynianu sodu. Natychmiast po spryskaniu występuje intensywna pomarańczowa barwa.

Roztwory cukrów przygotowywano z preparatów o analitycznym stopniu czystości przez rozpuszczenie w buforze boranowym. Kwas glikuronowy otrzymano przez hydrolizę estru mentolu i kwasu glikuronowego (14) — ester mentolu i kwasu glikuronowego otrzymano z moczu królików karmio-

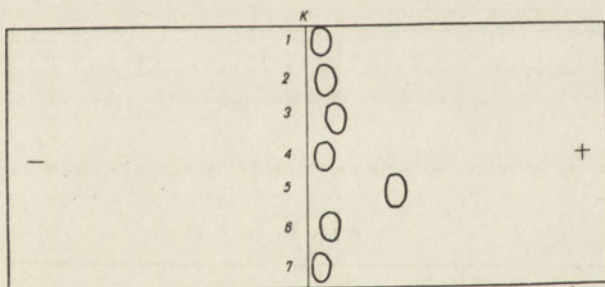
nych mentolem wg metody Williamsa (15). Kwas galaktouronowy uzyskano z kwasu poligalaktouronowego przez hydrolizę 1 N H_2SO_4 w 110° w ciągu 3 godzin.



Rys. 1. Elektroforetyczny rozdział pentoz: 1) ksyloza, 2) arabinoza, 3) ryboza, 4) ramnoza, 5) fukoza



Rys. 2. Elektroforetyczny rozdział heksoz: 1) glikoza, 2) galaktoza, 3) sorboza, 4) mannoza, 5) fruktoza



Rys. 3. Elektroforetyczny rozdział kilkocukrowców: 1) celobioza, 2) maltoza, 3) laktobioza, 4) sacharoza, 5) melibioza, 6) rafinoza, 7) trehaloza

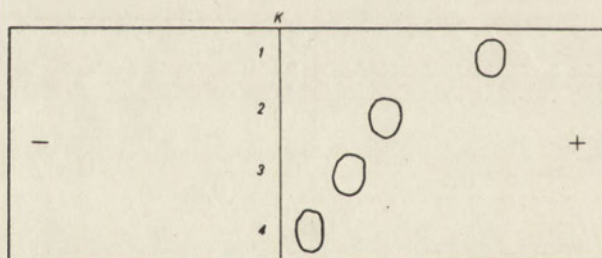
Omówienie wyników

Na rysunkach 1, 2 i 3 przedstawione są elektroferogramy trzech grup cukrowców, tj. pentoz, heksoz i kilkocukrowców. Linia oznaczona literą K na wszystkich rysunkach oznacza umiejscowienie kreatyniny po elektro-

foretycznym rozdzielaniu. Od tej linii mierzono drogę przebytą dla obliczenia ruchliwości poszczególnych cukrowców. Z rysunków widać, że wszystkie cukry w buforze boranowym o pH 8,6 wędrują do anody. Najszybciej wędrują ketozy (sorboza i fruktoza (rys. 2)), następnie pentozy oraz aldoheksozy, najniższą ruchliwością odznaczają się kilkocukrowce. Należy również zwrócić uwagę na fakt, że metylocukry jak ramnoza i fukoza wędrują znacznie wolniej niż pentozy i heksozy. Kilkocukrowce w porównaniu z monozami wykazują bardzo małą ruchliwość, przy czym w ogóle różnice ruchliwości poszczególnych kilkocukrowców nawet różniących się znacznie strukturą cząsteczki — są bardzo małe (por. tab. I). Spośród kilkocukrowców największą ruchliwość wykazuje melibioza wędrując znacznie szybciej niż monoza — ramnoza. Podobnym przykładem jest również rafinoza, która wędruje szybciej niż celobioza i sacharoza, co wskazuje na większą zdolność reakcji rafinozy z jonem boranowym niż w przypadku innych kilkocukrowców.

| | | κ |
|---|---|----------|
| - | 1 | 0 + |
| - | 2 | 0 + |
| - | 3 | 0 0+ |

Rys. 4. Elektroforetyczny rozdział kwasów uronowych. 1) kwas glikuronowy, 2) kwas galaktouronowy, 3) mieszanina obu kwasów.



Rys. 5. Porównanie szybkości wędrowania heksytoli i odpowiadających im cukrów: 1) sorboza, 2) sorbitol, 3) mannoza, 4) mannitol.

Na rys. 4 przedstawiony jest przykład elektroforetycznego rozdzielania kwasów uronowych. Jak widać z rysunku oraz tab. I ruchliwość tych pochodnych cukrowców jest bardzo znaczna i ok. 1,5 raza większa niż ketoheksoz. Zamiana więc pierwszorzędowej grupy alkoholowej na grupę karbonylową stwarza o wiele korzystniejsze warunki w cząsteczce dla reakcji

z jonem boranowym. Ogólnie można powiedzieć, że zdolność reagowania z jonem boranowym cukrowca zwiększa się wraz ze stopniem utlenienia cząsteczki, na co wskazuje również fakt, że heksytole, jak sorbitol i mannitol, wykazują przeszło dwukrotnie mniejszą ruchliwość niż odpowiadające im cukry, tj. sorboza i mannoza (por. rys. 5).

Tablica I zawiera wykaz ruchliwości badanych przez nas cukrowców. Wartości tablicy są średnią z trzech pomiarów. Ruchliwość zmniejsza się

Tablica I.

Ruchliwości cukrowców w buforze boranowym o pH 8,6 w temp. 20°, bibuła Whatman nr 4, napięcie 5,3 V/cm

| Lp. | Cukrowiec | Ruchliwość $\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ sek}^{-1}$ |
|-----|-----------------------|---|
| 1 | D-kwas glikuronowy | 4,92 |
| 2 | D-kwas galaktouronowy | 4,25 |
| 3 | L-sorboza | 3,58 |
| 4 | D-fruktoza | 2,78 |
| 5 | D-ryboza | 2,65 |
| 6 | D-ksyloza | 2,34 |
| 7 | N-acetyloglikozamina | 2,33 |
| 8 | D-glikoza | 2,10 |
| 9 | D-arabinoza | 1,93 |
| 10 | D-sorbitol | 1,81 |
| 11 | D-galaktoza | 1,70 |
| 12 | D-mannoza | 1,33 |
| 13 | D-fukoza | 1,12 |
| 14 | D-melibioza | 0,92 |
| 15 | L-ramnoza | 0,78 |
| 16 | D-mannitol | 0,56 |
| 17 | laktobioza | 0,49 |
| 18 | maltoza | 0,36 |
| 19 | rafinoza | 0,34 |
| 20 | celobioza | 0,18 |
| 21 | sacharoza | 0,17 |
| 22 | trehaloza | 0,17 |
| 23 | D-glikozamina | + 0,85 |

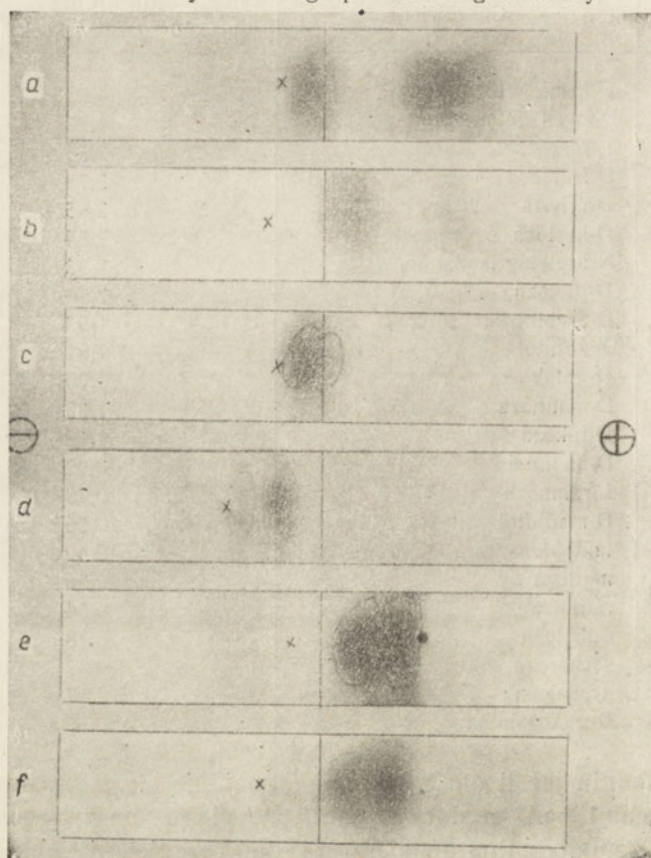
w pewnym stopniu jeżeli dany cukrowiec znajduje się w mieszaninie z innymi cukrowcami bądź aminokwasami. W ciągu naszych doświadczeń stwierdzono, że optymalną temperaturą dla rozdzielania cukrowców jest temperatura 19—21°. Powyżej 23° oraz poniżej 16° ruchliwość znacznie maleje i zasadniczo nie można przeprowadzić rozdziału mieszaniny.

Z pochodnych cukrowców jedynie glikozamina wykazuje wędrówkę katodową, natomiast N-acetyloglikozamina wędruje do anody i wykazuje nawet większą ruchliwość niż glikoza. Rozdział mieszaniny glikozaminy i N-

acetyloglikozaminy uwolnionej przez hydrolizę kwasu hyaluronowego przedstawiony jest na rys. 6.

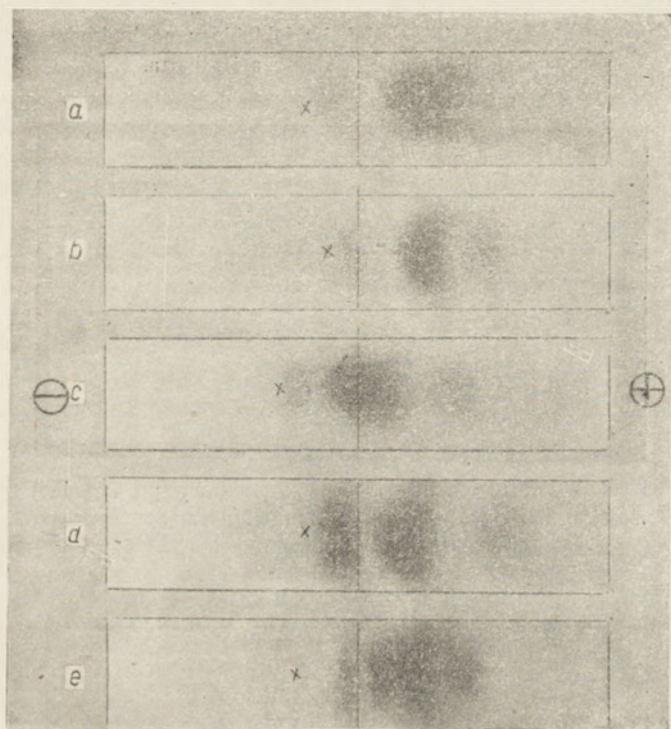
| | | | |
|-----|---|-----|---|
| - 1 | ○ | | + |
| - 2 | | ○ ○ | + |
| - 3 | ○ | ○ ○ | + |

Rys. 6. Rozdzielenie glikozaminy i N-acetyloglikozaminy: 1) glikozamina, 2) hydrolizat kwasu hyaluronowego (N-acetyloglikozamina + kwas glikuronowy), 3) hydrolizat kwasu hyaluronowego po dodaniu glikozaminy.



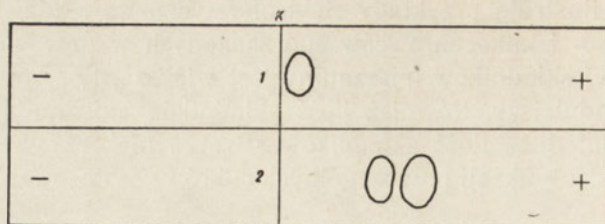
Rys. 7. Przykłady elektroforetycznego rozdzielania różnych mieszanin cukrowców: a) ramnoza, ryboza, fruktoza; b) mannoza, sorboza; c) ramnoza, fukoza; d) celobioza, melibioza; e) ksylloza, ryboza; f) sacharoza, glikoza, ryboza (znak x oznacza umiejscowienie kreatyniny na pasku bibuły po ukończeniu elektroforezy).

Rys. 7 i 8 ilustrują przykłady elektroforetycznego rozdzielania różnych mieszanin jedno- i kilkocukrowców sporządzonych w pracowni. Czym różnica ruchliwości składników mieszaniny jest większa, tym rozdział jest pełniejszy i dokładniejszy. Również ilość składników mieszaniny wpływa na wynik rozdziału; duża ilość składników stwarza niekorzystne warunki dla rozdzielania i identyfikacji poszczególnych cukrów. Zastosowanie elektrofore-

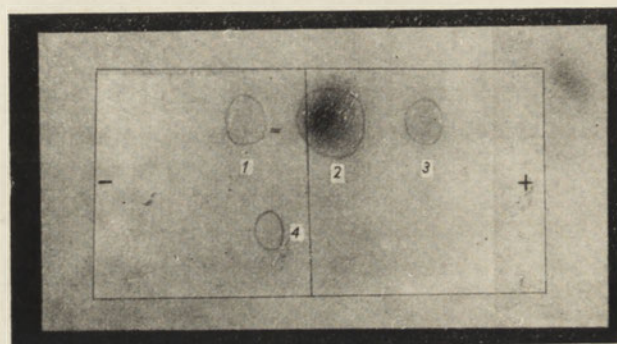


Rys. 8. a) laktobioza, arabinoza, ksyloza, sorboza; b) maltoza, arabinoza, fruktoza; c) celobioza, mannoza, arabinoza, sorboza; d) ramnoza, arabinoza, sorboza; e) ramnoza, galaktoza, ksyloza, fruktoza.

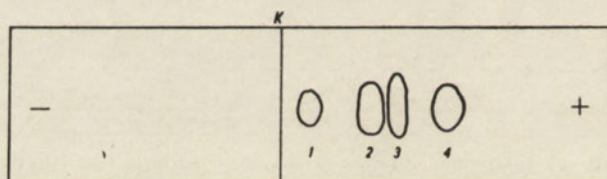
zy bibułowej do rozdzielania cukrowców otrzymanych po hydrolizie kilkocukrowców ilustrują poniżej zamieszczone rysunki. Rys. 9 ilustruje rozdzielanie składników laktobiozy po hydrolizie 1 N kwasem siarkowym. Położenie glikozy i galaktozy odpowiada ruchliwości oznaczonej na czystych preparatach tych cukrów. Rys. 10 przedstawia składniki rafinozy uzyskane przez tzw. łagodną hydrolizę (16), tj. melibiozę i fruktozę. Rys. 11 przedstawia rozdzielanie składników hydrolizatu gumy arabskiej. Zidentyfikowane przez nas cukrowce odpowiadają chemicznej analizie tego produktu podanej przez Mc Ilroya (17).



Rys. 9. Rozdzielenie składników laktobiozy po hydrolizie:
1) laktobioza, 2) galaktoza i glikoza.



Rys. 10. Rozdzielenie składników rafinozy po łagodnej hydrolizie: 1) kreatynina, 2) melibioza, 3) fruktoza, 4) rafinoza.



Rys. 11. Rozdzielenie składników hydrolizatu gumy arabskiej: 1) ramnoza, 2) arabinoza, 3) galaktoza, kwas glikuronowy.

Dyskusja

Jakkolwiek myśl zastosowania elektroforezy bibułowej do rozdzielania i identyfikacji cukrowców była podejmowana wcześniej, nie było dotąd pełnego opracowania metodycznego i teoretycznego pozwalającego stosować elektroforezę do celów analizy biochemicznej tych związków. Przede wszystkim celem naszej pracy było opracowanie rozdziału tych mieszanin cukrowców, które zwykłą techniką chromatograficzną nie dają się rozdzielić. Różni autorowie, jak Partridge i Westall (1), Jermyn i Isher-

woodd (2) oraz Opieńska-Blauth (2) stosowali najrozmaitsze układy rozpuszczalników dla chromatograficznego rozdzielania mieszanin cukrowców o bardzo bliskich wartościach współczynnika R_f jak: glikoza-galaktoza, mannoza-sorboza, mannoza-arabinoza, laktobioza-maltoza, sacharoza-kwas galaktouronowy. Doszło do tego, że Weinland i May (2) chcąc rozdzielić i zidentyfikować powyższe mieszaniny opracowali bardzo żmudną metodę chromatografii połączoną z fermentacją przez odpowiednie szczepy drożdży. Warto przy tym wspomnieć, że czas trwania doświadczenia przy tej metodzie wynosi około 15 dni.

| | | K | |
|---|---|-----|---|
| - | 1 | 00 | + |
| - | 2 | 0 0 | + |
| - | 3 | 00 | + |
| - | 4 | 0 0 | + |

Rys. 12. Elektroferogramy rozdzielonych mieszanin cukrowców o bliskich współczynnikach R_f : 1) galaktoza — glikoza; 2) mannoza — sorboza; 3) mannoza — arabinoza; 4) sacharoza — kwas galaktouronowy.

Na rys. 12 przedstawiony jest elektroferogram powyżej wymienionych mieszanin cukrów, z którego widać, że wszystkie mieszaniny można rozdzielić z wyjątkiem laktobiozy i maltozy. Różnica w ruchliwości tych dwucukrowców jest bardzo mała, wynosi zaledwie 0,13. Taka różnica ruchliwości wystarcza zupełnie do rozdzielania np. fruktozy i rybozy (por. rys. 7a oraz Tab. I), niemniej do rozdzielania kilkocukrowców jest już niewystarczająca. Zasadniczo można je od siebie rozdzielić już wówczas, gdy różnica ruchliwości jest większa niż 0,10, natomiast kilkocukrowce dopiero wówczas, kiedy różnica ta jest większa od 0,30, oczywiście w warunkach opisanych w tej pracy. Na rys. 7 przedstawione są przykłady rozdzielania mieszanin, których składniki mają bardzo małe różnice ruchliwości, jak fruktoza-ryboza (0,13), ramnoza-melibioza (0,14) mimo to rozdziela się dobrze. Stopień rozdziału zależy również będzie od ilości pojedynczych składników i od składu jakościowego mieszaniny. W ciągu naszych doświadczeń nad rozdzielaniem wielocukrów bakteryjnych stwierdzono, że bez trudności można rozdzielić nawet 5 składników mieszaniny, ale pod warunkiem, że różnice ruchliwości będą znaczne.

Na ogół skład naturalnych mieszanin cukrowców jest korzystny dla rozdzielania tą metodą, gdyż oprócz prostych cukrowców występują pochodne jak kwasy uronowe, metylocukry oraz aminocukry charakteryzujące się bardzo dużą ruchliwością w porównaniu z właściwymi cukrowcami (kwasy uro-

nowe) bądź bardzo małą ruchliwością (metylopentozy), wreszcie mogą wykazywać wędrówkę katodową (aminocukry).

Labilność kompleksu boranowego z polialkoholem powoduje, że dostateczny i dający się reprodukować rozdział można uzyskać tylko przy zachowaniu pewnych warunków. Wspomnieliśmy już, że rozdział jest w ogóle możliwy tylko w pewnym zakresie temperatury. Również stężenie molarne buforu i pH muszą mieć pewne stałe wartości: stężenie boranu nie niższe jak 0,08 M, pH ok. 9. Roztwory cukrów należy przygotowywać bezpośrednio przed użyciem, ponieważ w roztworze nawet słabo zasadowym po dłuższym czasie zachodzi izomeryzacja cukrów, skutkiem której pewne cukry przekształcają się w inne cukrowce. Czynniki wpływające na ruchliwość cukrowca w polu elektrycznym można ująć w dwie grupy: a) warunki doświadczenia, b) własności i struktura cząsteczki cukrowca. Była o tym mowa, że ruchliwość układu wielohydroksylowego w buforze boranowym i szybkość reakcji z jonem boranowym wzrasta wraz ze stopniem utlenienia. Aldozy wędrują szybciej niż heksytoli a kwasy uronowe szybciej niż aldozy. Ruchliwość elektroforetyczna kompleksu boranowego będzie zależeć przede wszystkim od stopnia dysocjacji tegoż kompleksu i będzie wprost proporcjonalna do stopnia dysocjacji. W pewnej mierze ruchliwość będzie również zależeć od wielkości cząsteczki (11).

Elektroforeza bibułowa cukrowców wymaga dalszego opracowania, zwłaszcza zastosowanie swoistych odczynów barwnych na bibule celem dokładnej charakteryzacji poszczególnych składników mieszaniny. Charakteryzacja tylko na podstawie samej ruchliwości jest niepewna i stwarza nawet poważne trudności zwłaszcza wówczas, gdy ilość składników w mieszaninie jest duża. Prace nad zastosowaniem różnych charakterystycznych odczynów i zastosowanie tej metody do analizy produktów naturalnych są w toku.

Streszczenie

Opracowano metodę elektroforetycznego rozdziału na bibule cukrów i ich pochodnych jako kompleksów boranowych.

Oznaczono ruchliwość 23 preparatów jedno- i kilkocukrowców, kwasów uronowych, heksytoli i aminocukrów. Składniki mieszaniny dadzą się wówczas rozdzielić elektroforetycznie, jeżeli różnica ruchliwości między cukrami prostymi wynosi więcej niż 0,10, a między kilkocukrowcami jest większa niż 0,30 w warunkach opisanych przez autorów.

Największą ruchliwość wykazują kwasy uronowe, mniejszą ketozy i aldozy; kilkocukrowce wykazują bardzo małą ruchliwość. Kwasy uronowe wędrują około 1,5 raza szybciej niż ketoheksozy, metylocukry wędrują około 2 razy wolniej niż odpowiadające im heksozy, heksytoli wędrują około 2 razy wolniej niż odpowiadające im cukry.

Wykazano, że cukrowce, wykazujące przy analizie chromatograficznej bardzo bliskie wartości współczynników R_f , różnią się bardzo znacznie ruchliwością i dadzą się rozdzielić elektroforetycznie.

W dyskusji zostały omówione warunki i czynniki wpływające na zdolność tworzenia kompleksów boranowych przez cukry i wykorzystanie tych czynników do elektroforetycznego rozdzielania.

Prof. drowi B. Skarżynskiemu za interesowanie się i pomoc w czasie wykonywania tej pracy składamy na tej drodze najserdeczniejsze podziękowanie. Również serdeczne podziękowanie składamy mgr J. Cholewińskiemu za wykonanie zdjęć ilustrujących naszą pracę.

LITERATURA

1. Partridge S. M. i Westall R. G., *Biochem. J.*, 42, 238, 1948
2. Jermyn M. A. i Isherwood F. A., *Biochem. J.*, 44, 402, 1949; Opieńska-Blauth J. i Madecka-Borkowska I., *Acta Physiol. Pol.*, 1, 134, 1950; Weinfeld H. i May F., *H-S. Ztschr., Physiol. Chem.*, 293, 153, 1953.
3. Böseken J., *Ber Chem. Ges.*, 46, 2612, 1913; 56, 2411, 1923; *Adv. in Carbohydrate Chemistry, 1949*, Academic Press, N. Y., vol. IV, s. 189
4. Zittle Ch. A., *Adv. in Enzymology*, 1951, Interscience Publishers, INC, N. Y., vol. 12, s. 493
5. Krejci L. E., Sweeney L. i Zittle Ch. A., *Arch. Biochem.*, 22, 253, 1949
6. Condsen R. i Stanier W. M., *Nature*, 169, 783, 1952
7. Jaenicke L., *Naturwiss.*, 39, 86, 1952
8. Micheel F. i van de Kamp F. P., *Angew. Chem.*, 64 607, 1952
9. Goldmacher-Mallinckrodt M. i May F., *H-S. Ztschr. Physiol. Chem.* 293, 256, 1953
10. Woodin A. M., *Biochem. J.*, 51, 319, 1952
11. Michl H., *Monaish. Chem.*, 83, 737, 1952
12. Ostrowski W. i Mikucki A., *Acta Physiol. Pol.*, III, 277, 1952; Ostrowski W., Skarżynski B. i Zak Z., *Acta Biochim. Pol.*, I, 13, 1954.
13. Partridge S. M., *Nature*, 164, 443, 1949
14. Quick A. J., *J. Biol. Chem.*, 74, 331, 1927
15. Williams R. T., *Nature*, 143, 641, 1939
16. Tollens-Elsner, *Kurzes Handbuch der Kohlenhydrate*, 1953, Johann Ambrosius Barth, Leipzig, s. 504
17. Mc Ilroy R. J., *The Chemistry of the Polysaccharides*, 1948, London, Edward Arnold a. Co., s. 48.

РАЗДЕЛЕНИЕ САХАРИДОВ ПО ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОМУ МЕТОДУ

Содержание

Авторами был разработан новый метод электрофоретического разделения на фильтровальной бумаге сахаридов и их производных в форме боратных комплексов.

Определена степень подвижности 23 моносахаридных и олигосахаридных препаратов, уроновых кислот, гекситов и аминсахаров. Элементы смеси способны подразделяться электрофоретическим методом тогда, когда разница степени подвижности между моносахаридами больше чем 0,10, а между сложными сахаридами больше 0,30 при условиях описанных авторами.

Самую большую подвижность проявляют уроновые кислоты, меньшую —

кетозы и альдозы; сложные сахараиды отличаются весьма малой подвижностью.

Уроновые кислоты передвигаются около 1,5 раза быстрее, чем кетогексозы, метиловые сахараиды передвигаются дви раза медленнее, чем соответствующие им гексозы, гекситы передвигаются почти два раза медленнее, чем соответствующие им сахараиды.

Доказано, что сахараиды, обнаруживающие во время хроматографического анализа весьма приближенные значения распределительных указателей R_f — значительно разнятся степенью подвижности и поддаются электрофоретическому разделению.

Обсуждаются условия и факторы, влияющие на способность образования сахараидами боратных комплексов и на возможность использовать эти факторы для электрофоретического разделения.

Авторы выражают глубокую благодарность проф. д-ру В. Скаржинскому за проявление интереса и оказанную им помощь во время выполнения настоящей работы. Одновременно, авторы выражают искреннюю благодарность магистру И. Холевинскому за изготовление фотографических снимков, как иллюстраций к настоящей работе.

SEPARATION OF SUGARS AND THEIR DERIVATIVES BY PAPER ELECTROPHORESIS

S u m m a r y

A method of electrophoretic separation of sugars and their derivatives as borate complexes has been elaborated.

The mobilities of 23 mono- and oligosaccharide preparations, of uronic acids, hexitols and aminosaccharides were determined. It is possible to separate the components of the mixture electrophoretically if the mobility difference between simple sugars amounts to more than 0,10 and between polysaccharides to more than 0,30 under the conditions described by the authors.

Uronic acids exhibit the highest mobilities, ketoses and aldoses lower ones and oligosaccharides very low mobilities. Uronic acids travel 1,5 times as fast as ketohexoses, methyl sugars at half the rate of their corresponding hexoses, hexitols at half the rate of their corresponding sugars.

It has been shown that saccharides exhibiting very close R_f values chromatographically, differ largely in mobility and may be readily separated electrophoretically.

The conditions and factors influencing the ability of sugars to form borate complexes, and the utilization of these factors for electrophoretic separations, are discussed.

We wish to thank Professor B. Skarżyński for his aid and interest in our work. We are also indebted to Mr J. Cholewiński for the accompanying photographs.

MARIUSZ ZYDOWO

NIEKTÓRE ZMIANY BIOCHEMICZNE KRWI ZDROWEGO CZŁOWIEKA
POD WPLYWEM ADRENALINY

II. Wpływ na równowagę kwasowo-zasadową

*Z Zakładu Chemii Fizjologicznej A. M. w Gdańsku**Kierownik: prof. dr Włodzimierz Mozolowski*

W pierwszym doniesieniu wykazano, że zmiany stężenia białka surowicy po podaniu zdrowemu człowiekowi adrenaliny są spowodowane zmianami ciśnienia w układzie krwionośnym (1). Obecne doniesienie ma na celu zbadanie zmian w równowadze kwasowo-zasadowej krwi u zdrowego człowieka spowodowanych podaniem adrenaliny. Także i tutaj nie ma żadnych przesłanek pozwalających przyjąć bezpośredni wpływ adrenaliny na chemizm krwi.

Metody

Obiektem badań byli zdrowi mężczyźni w wieku 20—33 lat. Krew pobierano na czczo z żyły łokciowej bez zastojów, pierwszy raz po półgodzinnym pozostawianiu badanego w pozycji leżącej. Pobieranie odbywało się bez dostępu powietrza do krwi, przy czym zapobiegano glikolizie. W tym celu dawano do probówki wirówkowej o pojemności 50 ml 1,5 ml mieszaniny 1 : 1 1% roztworu heparyny i 10% roztworu NaF (2), rozlewano po ściankach probówki do wysokości odpowiadającej pojemności około 30 ml i suszono w temperaturze około 80° C. Do tak przygotowanej probówki wlewano 3 ml płynnej parafiny i zakrywano ją gumowym korkiem z dwoma rurkami, z których jedna zanurzona była jednym końcem w parafinie, zewnętrzny zaś koniec połączony był z nasadką doszlifowaną do igły Luera. Przez dołączenie nasadki do tkwiącej w żyłę igły i usuwanie ustami poprzez drugą rurkę powietrza z probówki, można było pobrać krew wprost pod parafinę. Po pobraniu około 30 ml krwi mieszano ją tak, ażeby rozpuścił się osadzony na ściankach fluorek z heparyną uważając równocześnie aby krew nie stykała się z powietrzem, po czym odpipetowywano 10 ml krwi do osobnej rurki wirówkowej. Ta porcja krwi służyła po odwirowaniu do oznaczenia rezerwy zasadowej; pozostała pod parafiną krew była używana do oznacze-

nia pH. Po pierwszym pobraniu krwi podawano badanemu domięśniowo jeden mg (1 ml roztworu 1 : 1000) chlorowodoru adrenaliny (preparat handlowy produkcji ZZF). W okresie maksymalnego wzrostu ciśnienia i szybkości tętna, co przypadało około 50 do 60 minut po zastrzyku, pobierano krew powtórnie w analogiczny sposób jak za pierwszym razem. Przy badaniach kontrolnych postępowano tak samo, tylko zamiast adrenaliny podawano domięśniowo 1 ml roztworu soli fizjologicznej.

pH krwi oznaczano potencjometrem typu „Radiometr PHM3“ przy użyciu elektrody szklanej; zestaw pozwalający na osiągnięcie dokładności do $0,01$ pH. Jako moderatorów porównawczych używano roztworów fosforanów sporządzonych według nowych poprawionych wartości (3). Po nastawieniu aparatu zanurzano elektrody poprzez parafinę w krwi, znajdującej się w naczyniu, do którego pobrano ją bezpośrednio z żyły; pierwszy odczyt wykonywano w godzinę po zanurzeniu, a następnie powtarzano jeszcze odczyty 5 do 7 razy w odstępach pięciominutowych. Stwierdzono doświadczalnie na moderatorach pokrytych płynną parafiną, że czas potrzebny do ustalenia się potencjału wynosi około jednej godziny. Spowodowane jest to prawdopodobnie tym, że parafina pokrywa początkowo cienką warstwą elektrodę i powoli dopiero wspina się do góry. Stwierdzono także, że używana do naszych doświadczeń parafina pozostaje bez wpływu na słączenie jonów wodorowych moderatora, o ile odczeka się odpowiednią ilość czasu do ustalenia się potencjału. Graig i inni (2) badali wpływ dodanej mieszaniny NaF i heparyny na pH krwi i pH moderatora, nie stwierdzając żadnych różnic po dodaniu heparyny i NaF. Autorzy ci stwierdzili także, że dodatek tej mieszaniny w ilości użytej w niniejszej pracy zapobiega zmianie pH krwi w ciągu 24 godzin od pobrania, nawet jeśli jest ona przechowywana w temperaturze pokojowej. Wprawdzie D'Elsea i współpracownicy (4) znajdowali pewne zmiany pH krwi metodą gazometryczną przy użyciu heparyny pewnej produkcji, nie otrzymując żadnych zmian przy stosowaniu innej heparyny. We wszystkich doświadczeniach niniejszego doniesienia używano tej samej heparyny, można zatem przyjąć, że pozostaje to bez wpływu na wartość porównawczą otrzymanych liczb. Pomiary przeprowadzano w temperaturze pokojowej, a otrzymane wyniki przeliczano na wartości w temperaturze 37° według następującego równania:

$$pH_{37^{\circ}} = pH_t - 0,0149 (37 - t)$$

otrzymanego doświadczalnie przez Rosenthala (5) a sprawdzonego przez Graiga i współpracowników (2). Spotyka się wprawdzie w literaturze głosy (6) opowiadające się przeciwko oznaczaniu pH krwi w temperaturze pokojowej i stosowaniu jakichkolwiek poprawek, nie sądzę jednak, ażeby wartości porównawcze były przez to mniej przekonujące, zwłaszcza jeżeli rozważymy wyniki Graiga i współpracowników (2).

Rezerwę alkaliczną oznaczano, po wysyceniu osocza powietrzem wydechowym, w aparacie manometrycznym Van Slyke'a i Neill'a, uwzględniając przy obliczaniu poprawki podane przez Van Slyke'a i Sendroy'a (7).

Stężenie białka oznaczano refraktometrycznie w temperaturze 20°C. (8).

Wyniki doświadczeń i dyskusja

Liczbowe wartości dla krwi pobranej przed podaniem i po podaniu adrenaliny przedstawione są w tablicy I.

Tablica I

pH krwi, rezerwa zasadowa i stężenie białka osocza u zdrowych ludzi przed i po domięśniowym podaniu 1 mg chlorowodoru adrenaliny

| Symbol dośw. | pH | | Rezerwa zasadowa obj. % CO ₂ | | Białko g/100 ml | |
|--|-------|------|---|------|-----------------|-----|
| | przed | po | przed | po | przed | po |
| K | 7,44 | 7,40 | 75,1 | 71,9 | 6,7 | 7,0 |
| Że | 7,41 | 7,39 | 67,6 | 63,0 | 7,0 | 7,4 |
| R | 7,42 | 7,42 | 61,4 | 58,6 | 6,7 | 6,9 |
| J | 7,41 | 7,32 | 69,9 | 64,9 | 5,9 | 6,4 |
| Ż | 7,44 | 7,33 | 64,1 | 56,2 | 7,1 | 7,5 |
| A | 7,45 | 7,43 | 69,2 | 67,6 | 6,4 | 6,6 |
| M | 7,47 | 7,44 | 72,3 | 67,0 | 6,2 | 6,5 |
| K o n t r o l e | | | | | | |
| (roztwór 0,9% NaCl zamiast adrenaliny) | | | | | | |
| St | 7,51 | 7,51 | 67,2 | 68,3 | 6,2 | 6,2 |
| C | 7,39 | 7,37 | 64,1 | 66,9 | 7,0 | 6,7 |
| S | 7,37 | 7,37 | 71,4 | 72,3 | 6,4 | 6,4 |
| Ż | 7,42 | 7,44 | 69,0 | 70,7 | 6,6 | 6,6 |

Jak widać z powyższych cyfr, zaznacza się wyraźna tendencja do zakwaszenia krwi pod wpływem adrenaliny. Tylko jeden spośród badanych osobników nie zareagował obniżeniem pH na podanie adrenaliny, podczas kiedy w badaniach kontrolnych tylko jeden z 4 badanych wykazuje spadek pH; odczuwał on w czasie drugiego pobierania krwi pewne subiektywnie nieprzyjemne objawy, jak pocenie się i uczucie słabości. Rezerwa zasadowa jednak nie obniżyła się u niego.

U wszystkich badanych, którym podano adrenalinę, daje się zauważyć wyraźne obniżenie poziomu rezerwy zasadowej, natomiast w kontrolnych doświadczeniach istnieje pewna niewielka tendencja do podwyższenia zdolności wiązania CO₂ przez osocze.

Obserwowane zmiany wyraźniej występują w tablicy II.

Badanie stężenia białka osocza przeprowadzono jako kontrolę zadzia-

Tablica II

Srednie wartości liczb tablicy I oraz średnie zmiany tych wartości po podaniu adrenaliny lub soli fizjologicznej

| Rodzaj doświadczenia | Ilość badanych | pH krwi | | | Rezerwa zasadowa obj. $\% \text{CO}_2$ | | | Białko osocza g/100 ml | | |
|----------------------|----------------|---------|------|---------|--|------|---------|------------------------|-----|---------|
| | | przed | po | różnica | przed | po | różnica | przed | po | różnica |
| Adrenalina | 7 | 7,43 | 7,39 | -0,04 | 68,5 | 64,2 | -4,3 | 6,6 | 6,9 | +0,3 |
| Kontrola | 4 | 7,42 | 7,42 | 0,00 | 67,9 | 69,5 | +1,6 | 6,5 | 6,5 | 0,0 |

łania adrenaliny. Kontrolą taką było także przeprowadzone w niektórych przypadkach badanie zawartości cukru we krwi. Wykazywało ono zawsze wzrost po podaniu adrenaliny, brak natomiast większych zmian w badaniach kontrolnych.

Trudno jest znaleźć w literaturze ściśle dane dotyczące zmiany stężenia jonów wodorowych pod wpływem adrenaliny. Doświadczenia Czubałskiego (9) pozbawione są zupełnie oznaczeń kontrolnych, a podane liczby nie dają się ściśle interpretować. Schlegel (10) stwierdzał u królików alkalizację moczu po podaniu adrenaliny, ale nie we wszystkich przypadkach mógł obserwować zakwaszenie osocza.

Zmniejszenie się dwuwęglanów osocza obserwował Peters i współpracownicy (11) i jest on zdania, że dzieje się to na skutek wyrzucenia do krwi pewnej ilości kwasu mlekowego i kwasów ketonowych. Mechanizm ten zdaje się być bardzo prawdopodobny. Należałoby zatem wszystkie zmiany w równowadze kwasowo-zasadowej krwi pod wpływem adrenaliny odnieść do wpływu na przemianę węglowodanową.

Zbierając wyniki obecnego doniesienia, można powiedzieć, że adrenalina podana domięśniowo w dawce 1 mg zdrowemu człowiekowi powoduje spadek rezerwy zasadowej krwi przy równoczesnej tendencji do obniżenia pH.

Streszczenie

Oznaczano pH oraz rezerwę zasadową krwi zdrowych mężczyzn przed i po domięśniowym podaniu 1 mg chlorowodoru adrenaliny.

Stwierdzono, że rezerwa zasadowa obniża się pod wpływem adrenaliny średnio o 4,3 obj. $\% \text{CO}_2$, pH krwi spada średnio o 0,04 pH przy wzroście białka o 0,3 g/100 ml osocza, podczas kiedy w badaniach kontrolnych zmian tych nie obserwujemy.

LITERATURA

1. M. Zydowo, *Acta Biochimica Polonica* 1. 139, 1954
2. F. A. Graig, K. Lange, J. Oberman, S. Carson, *Arch. Biochem. a Biophys.*, 38, 357, 1952.
3. B. Modrzejewski, „Pomiary pH”, Warszawa 1952.

4. F. C. D'Elseux, F. C. Blackwood, L. E. Palmer, K. G. Sloman, *J. Biol. Chem.* **144**, 529, 1942.
5. T. B. Rosenthal, *J. Biol. Chem.* **173**, 25, 1948.
6. W. M. Clark, „Topics in physical chemistry“, Baltimore 1952, s. 374—375.
7. D. D. Van Slyke, J. Jr. Sendroy, *J. Biol. Chem.*, **73**, 127, 1927.
8. M. Żydowo, *Pol. Tyg. Lek.*, **7**, nr 22, 1952.
9. F. Czubalski, *Med. dośw. i spol.* **11**, 45, 1930.
10. J. U. Schlegel, *Am. J. Physiol.* **168**, 522, 1952.
11. J. P. Peters, D. D. Van Slyke, „Quantitative clinical Chemistry“ Interpretations Vol. I., Baltimore 1946, s. 234—245.

НЕКОТОРЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ КРОВИ ЗДОРОВОГО ЧЕЛОВЕКА

Содержание

Определены были: концентрация водородных ионов рН и резервная щелочность крови здоровых мужчин в период времени до и после внутримышечной инъекции 1 мг хлористоводородного адреналина.

Установлено было, что резервная щелочность крови в среднем понижается при действии адреналина на 4,3 объема % CO₂, а рН снижается в среднем на 0,04 при увеличении содержания белка на 0,3 г/100 мл плазмы крови, в то время, как при контрольных опытах эти перемены не наблюдались.

SOME BIOCHEMICAL CHANGES IN HEALTHY HUMAN BLOOD CAUSED BY ADRENALINE. PART II. INFLUENCE ON ACID-BASE BALANCE

Summary

Blood pH and blood alkali reserve were determined in healthy men before and after intramuscular injection of 1 mg adrenaline hydrochloride. It was found that adrenaline causes a drop in the blood alkali reserve averaging 4.3 vol. per cent of CO₂; the blood pH drop amounts, on the average, to 0.04 pH units; serum protein is raised by 0.3 g per 100 ml. In control tests no changes were observed.

A) HYDROLIZA WIELOCUKROWCÓW

Hydrolizę wielocukrowców przeprowadzano stale w ten sam sposób: 40 mg wielocukrów zadano 1 ml. 1 N H_2SO_4 w probówce, którą zatapiano, a następnie umieszczano we wrzącej łaźni wodnej na 8 godzin. Po tym czasie hydrolizat neutralizowano wodorotlenkiem baru wobec papierka z czerwienią Kongo i papierka lakmusowego (\pm pH 4,5).

B) CHROMATOGRAFIA

Chromatografię wykonywano na bibule Whatmana nr 4 według następującego przepisu, opartego w zasadzie na technice Jermyn-Isherwooda (2). Do rozwinięcia chromatogramu stosowano mieszaninę n-butanol : kwas octowy : woda w stosunku 4 : 1 : 5; rozwinięcie zstępujące w szczelnej komorze chromatograficznej za pomocą fazy górnej wymienionego solwentu, a nasyceniem komory parami fazy dolnej tegoż płynu. Zabarwienie plam węglowodanów odczynnikami:

- a) aniliny 0,93 ml, etanolu 96% 100 ml
- b) 0,2 M kwas szczawiowy. Do użytku zmieszać 1 część a) z 1 częścią b), napylić chromatogram odczynnikami i ogrzewać 5 minut w suszarce 105°; w tych warunkach dają

| | |
|--------------|--------------------------|
| heksozy | — barwę żółto-brunatną, |
| pentozy | — barwę różowo-czerwoną; |
| metylo-cukry | — barwę cytrynowożółtą. |

Glukozaminę wykrywano za pomocą odczynnika ninhydrynowego: 0,1% ninhydryny w n-butanolu. Po napyleniu ogrzać 5 minut w suszarce 105°; glukozamina daje barwę czerwono-fioletową.

Ketozy wykrywane za pomocą zmodyfikowanego odczynnika Seliwanowa:

- a) 10% rezorcynolu w etanolu,
- b) etanol 96%,
- c) 2N HCl — do użytku świeżo przyrządzić 1 część a), 4 części b) i 5 części c); napylić i ogrzać 5 minut w suszarce w 105°; ketozy dają barwę ciemnoczerwoną.

Odróżnienie galaktozy od glukozy: oba te cukry mają bardzo zbliżone R_f , wobec czego węglowodany te w chromatogramach należy rozdzielić. W tym celu stosowano metodę: na skrawku bibuły umieszczano obok siebie dwie plamki hydrolizatu badanego, w ilości po 10 kropeł każda. Po rozwinięciu chromatogramu mieszaną: butanol — kwas octowy — woda i wysuszeniu skrawka rozcięto skrawek podłużnie do kierunku wywołania na dwie części: na jednej zabarwiono plamy cukrów szczawianem aniliny, na drugiej wycięto segment, odpowiadający umiejscowieniu glukozy lub galaktozy, zaś segment bibuły, zawierający glukozę bądź galaktozę, eluowano

Tabela

Jakościowy skład wielocukrowców bakteryjnych

| Rząd, rodzaj, gatunek | Obecność składnika w hydrolizie | | | | | | | | |
|--|---------------------------------|---------------------------|---------|---------|-----------|---------|--------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| | Glukoza- mina | Galaktoza(f lub gluk.) | Mannoza | Ksyloza | Arabinoza | Ramnoza | Szybki me- tylocukier | Prawdop. obecn. kw. uron. | Liczba zbad. wielocu- krów |
| <i>Shigella flexneri</i> | + | + | | + | | + | 3*) | + | 16 |
| <i>Shigella shigae</i> | + | + | | + | | + | 1*) | + | 12 |
| <i>Shigella shigae</i> forma szorstka | | + | | + | | | | + | 3 |
| <i>Shigella sonnei</i> | + | + | | + | | | | + | 2 |
| <i>Shigella ambigua</i> (<i>schmitzii</i>) | + | + | | + | | | | | 1 |
| <i>Salmonella typhi</i> | 19*) | + | + | + | | + | | + | 27 |
| <i>Salmonella typhi</i> forma szorstka | | + | | + | | | | + | 3 |
| <i>Salmonella enteritidis</i> | 6*) | + | 5*) | + | | 6*) | 1*) | + | 8 |
| <i>Salmonella enteritidis</i> forma szorstka | | + | | + | | | | + | 2 |
| <i>Salmonella pullorum</i> | + | + | + | + | | 4*) | | + | 6 |
| <i>Salmonella pullorum</i> forma szorstka | | + | | + | | | | + | 2 |
| <i>Salmonella typhi murium</i> | + | + | + | + | | + | | + | 6 |
| <i>Salmonella abortus equi</i> | + | + | 2*) | + | | + | 1*) | + | 3 |
| <i>Salmonella paratyphi A</i> | | + | + | + | | + | | + | 2 |
| <i>Salmonella paratyphi A</i> forma szorstka | | + | | + | | | | + | 3 |
| <i>Salmonella paratyphi B</i> | + | + | 5*) | + | | + | 1*) | + | 7 |
| <i>Salmonella virginia</i> | + | + | 6*) | 6*) | | + | 6*) | 3*) | 7 |
| <i>Salmonella typhi gallinarum</i> | 1*) | + | + | + | | + | 1*) | + | 2 |
| <i>Proteus X</i> | + | + | + | + | | | | + | 1 |
| <i>Proteus X</i> forma szorstka | | + | | + | | | | + | 6 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 4*) | + | 2*) | + | | + | | + | 5 |
| <i>Klebsiella scleromatis</i> | | + | 4*) | 9*) | | | 4*) | + | 11 |
| <i>Klebsiella scleromatis</i> forma szorstka | | + | | + | | | | + | 3 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | | + | | + | | | | + | 1 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | + | | | + | | + | | | 3 |
| <i>Micrococcus pyogenes var aureus</i> | | + | | + | | | | | 1 |
| <i>Bacillus anthracis</i> | + | + | | 5*) | | | | 7*) | 9 |
| <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> | + | + | | + | | | | + | 1 |
| <i>Actinomycetales:</i> | | | | | | | | | |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | + | + | + | | + | | | 10*) | 20 |
| <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | 7*) | 7*) | 3*) | | + | | | 2*) | 11 |

* Liczby z gwiazdką oznaczają liczbę wielocukrów, zawierających dany składnik.

<http://rcin.org.pl>

w 1,5 ml wody, a po elucji plyn odwirowano. Z eluatem wykonano odczyn cysteinowy Dischego (1). W hydrolizacie zawierającym galaktozę występuje barwa ciemnoniebieska, natomiast w obecności glukozy barwa jest żółto-zielona.

Wobec trudności seryjnego zastosowania tej metody, kłopotliwej i zabierającej dużo czasu, użyliśmy jej jedynie w nielicznych wypadkach niezgodności z danymi literatury w celu bezspornego stwierdzenia obecności jednego z tych dwóch cukrów. I tak stwierdziliśmy w hydrolizatach *Shigella flexneri* obecność galaktozy, co jest w sprzeczności z danymi piśmiennictwa (17), w którym jako aldoheksoza, występująca w tym drobnoustroju, wymieniona jest jedynie glukoza. Niektórych składników węglowodanowych hydrolizatów nie mogliśmy zidentyfikować z powodu braku odpowiednich standardów. Odnosi się to głównie do rzadszych metylopentoz oraz heptoz jak i do kwasów uronowych. Obecność tych ostatnich jest prawdopodobna w szeregu badanych wielocukrów, za czym przemawiają ich R_f oraz odczyny barwne, które porównaliśmy z hydrolizatami pektyn, gumy arabskiej i kwasu hyaluronowego. Zidentyfikowanie kwasów uronowych utrudniała ponadto obecność w hydrolizatach wolno wędrujących komponentów węglowodanowych, pochodzących z niekompletnego rozkładu wielocukrowców.

We wszystkich przypadkach stwierdzenia plamy posiadającej R_f odpowiadające mannozie wykonano odczyn z rezorcynolem w celu wykluczenia fruktozy, posiadającej w użytym solwencie niemal identyczne R_f z mannozą.

Nie udało się nam również zidentyfikowanie komponenty węglowodanowej, bardzo szybko wędrującej i dającej odczyn barwny na metylocukry — mamy tu prawdopodobnie do czynienia z opisanymi ostatnio przez Westphala-Lüderitza (18) metylo-dezoksy-aldozami. Nie mogliśmy również rozpoznać niektórych plam wielocukrowych, które mogłyby odpowiadać heptozom, opisanym ostatnio w wielocukrowcach bakteryjnych (17).

Próby zidentyfikowania nie rozpoznanych dotychczas węglowodanów w naszych wielocukrowcach będą przedmiotem dalszych badań.

Wyniki badań

Sumaryczna tabela przedstawia wyniki jakościowego oznaczenia składników węglowodanów w badanych przez nas wielocukrach bakteryjnych.

INTERPRETACJA TABELI

Rodzaj *Shigella*. Charakterystycznymi cukrami dla tego rodzaju są: glukozamina, galaktoza lub glukoza, ksyloza, a nie można wykluczyć obecności kwasów uronowych. Ponadto gatunki *Sh. flexneri* i *Sh. shigae* zawierają ramnozę. Na 34 zbadanych wielocukrów z tego rodzaju u 4 stwierdzono obecność szybko wędrującego metylocukru. Formy szorstkie *Sh. shigae* różniły się od form gładkich brakiem glukozaminy i ramnozy.

Rodzaj *Salmonella*. Charakterystycznymi cukrami dla rodzaju *Salmonella* są: glukozamina, galaktoza, lub glukoza, mannoza, ksyloza i ra-

mnoza; nie można wykluczyć obecności kwasów uronowych. Na 78 badanych wielocukrów, należących do rodzaju *Salmonella*, u 10 wielocukrów stwierdzono obecność szybko wędrującego metylocukru. Formy szorstkie *Salmonelli* różniły się od form gładkich brakiem glukozaminy, mannozy i ramnozy. U zbadanych 2 wielocukrów gatunku *Salmonella paratyphi A* nie stwierdzono obecności glukozaminy. Rodzaj *Proteus*: jeden zbadany wielocukier z formy gładkiej zawierał glukozaminę, galaktozę lub glukozę, mannozę i ksylozę, przy czym nie można było wykluczyć obecności kwasów uronowych. Kilka wielocukrów z form szorstkich wyróżniało się brakiem glukozaminy i mannozy.

Rodzaj *Pseudomonas*. 5 zbadanych wielocukrów z gatunku *Ps. aeruginosa* zawierało: glukozaminę, galaktozę lub glukozę, ksylozę, ramnozę, a także nie można było wykluczyć obecności kwasów uronowych. W 2 wielocukrach tego gatunku obecna była mannoza.

Rodzaj *Klebsiella*. Charakterystycznymi cukrami dla tego rodzaju są galaktoza lub glukoza, ksyloza, a nie można wykluczyć obecności kwasów uronowych. Na 12 wielocukrów z form gładkich u 4 stwierdzono obecność mannozy; podobnie też u 4 wykazano obecność szybkiego metylocukru. Wielocukry z form szorstkich nie różniły się zasadniczo od form gładkich pod względem jakościowego składu wielocukrów.

Rodzaj *Streptococcus*. Trzy badane wielocukry paciorkowcowe zawierały glukozaminę, ksylozę i ramnozę.

Rodzaj *Micrococcus*. Jeden zbadany wielocukrowiec z gronkowca złocistego zawierał galaktozę lub glukozę oraz ksylozę.

Rodzaj *Bacillus*. Wśród 9 zbadanych wielocukrów z laseczki wąglika wszystkie zawierały glukozaminę, galaktozę lub glukozę, u 5 z nich stwierdzono ksylozę, a u 7 nie można było wykluczyć obecności kwasów uronowych.

Rodzaj *Erysipelothrix*. W jednym zbadanym wielocukrowcu z włoskowca różycy obecne były: glukozamina, galaktoza lub glukoza, ksyloza, nie można było wykluczyć obecności kwasu uronowego.

Rodzaj *Mycobacterium*. W 20 zbadanych wielocukrowcach prątką gruźlicy stwierdzono obecność: glukozaminy, galaktozy lub glukozy, mannozy, arabinozy, a w 10 wielocukrach nie można było wykluczyć obecności kwasu uronowego.

Rodzaj *Corynebacterium*. W 11 wielocukrach maczugowca błonicy obecna była arabinoza — zaś w 7 wielocukrach stwierdzono obecność galaktozy lub glukozy oraz glukozaminy, a w trzech obecność mannozy; w dwóch wielocukrach nie można było wykluczyć obecności kwasów uronowych.

Zmienione warunki hodowli, rodzaj pożywki oraz metoda izolowania wielocukrowca z badanej bakterii nie wpłynęły w znaczniejszym stopniu

na jakościowy skład cukrowców powstałych drogą hydrolizy kwaśnej wielocukrowca.

Streszczenie

Metodą jednowymiarowej bibułowej chromatografii zbadano jakościowy skład 182 wielocukrowców bakteryjnych. Najczęściej występującymi cukrowcami w hydrolizach wielocukrów były: glukozamina, galaktoza (i/lub glukoza), mannoza, ksyloza, arabinoza, ramnoza.

W około 10% zbadanych wielocukrów wykazano obecność szybko wędrującego metylocukru, którego identyfikacja nie udało się. W większości zbadanych wielocukrów nie można było wykluczyć obecności kwasów uronowych, ewentualnie powoli wędrujących produktów niepełnego rozkładu hydrolitycznego.

W jakościowym składzie wielocukrów pochodzących z rzędów *Eubacteriales* i *Actinomycetales* występuje charakterystyczna różnica: pierwsze zawierają jako pentozę — ksylozę, drugie arabinozę. Przejście formy gładkiej w szorstką połączone jest stale ze zubożeniem jakościowego zestawu cukrowców, przy czym ubytek dotyczy zawsze glukozaminy, ramnozy i mannozy.

W badanym materiale nie stwierdziliśmy wpływu warunków hodowli i metody otrzymywania wielocukrowców z bakterii na jakościowy skład wielocukrowców, izolowanych z porównywanych szczepów.

LITERATURA

1. Z. Dische, L. B. Shettles, M. Osnos, *Arch. Biochem.* 22, 1949, 169.
2. M. A. Jermyn, F. A. Isherwood, *Biochem. J.* 44, 1949, 402.
3. W. Kuryłowicz, E. Mikulaszek, *Arch. Tow. Nauk.*, Lwów 9, 1937, 2.
4. E. Mikulaszek, L. Rzucidło, *Med. Dośw. Mikrobiol.*, 1949, 465.
5. W. Kuryłowicz, E. Mikulaszek, S. Slopek, *Przegl. Epidemiol.* 1, 1947, 111.
6. W. Kuryłowicz, E. Mikulaszek, J. Ostrowski, *Med. Dośw. Mikrobiol.*, 1950.
7. H. Meisel, E. Mikulaszek, *Med. Dośw. Spot.* 14, 1932, 3, 4.
8. H. Meisel, E. Mikulaszek, *Med. Dośw. Spot.* 17, 1933, 3, 4.
9. H. Meisel, E. Mikulaszek, *Pol. Gaz. Lek.* 1933, 36.
10. E. Mikulaszek, *Pol. Gaz. Lek.* 1929, 6.
11. E. Mikulaszek, A. Ratomski, *Med. Weter.* 1945, 3, 4.
12. E. Mikulaszek, A. Ratomski, *Med. Weter.* 1946, 3, 4.
13. E. Mikulaszek, A. Ratomski, *Med. Dośw. Spot.*, 25, 1946, 65.
14. E. Mikulaszek, L. Rzucidło, *Med. Dośw. Mikrobiol.*, 1949, 465.
15. E. Mikulaszek, L. Rzucidła, H. Walecki, *Med. Dośw. Mikrobiol.* 1950.
16. E. Mikulaszek, J. Ostrowski, *Med. Dośw. Mikrobiol.* 1950.
17. W. M. Slein, G. W. Schnell, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 82, 1953, 734.
18. O. Westphal, O. Lüderitz, *Riass. Comunicaz. VI. Congr. Intern. Microbiol.* I, 1953, 580.

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ

С о д е р ж а н и е

С помощью хроматографического линейного анализа на фильтровальной бумаге был исследован состав 182 бактериальных полисахаридов. Моносахаридами, чаще всего выступающими в полисахаридных гидролизатах являются: глюкозамин, галактоза (и или глюкоза), манноза, ксилоза, арабиноза и рамноза.

Из числа, приблизительно, около 10% исследованных сахаридов обнаружено было наличие быстро передвигающегося метилосахарида, которого не удалось идентифицировать. В большинстве исследованных полисахаридов нельзя было устранить наличия уоновых кислот, или медленно передвигающихся продуктов неполного гидролитического распада.

В качественном составе полисахаридов, происходящих из рядов бактерий: *Eubacteriales* и *Actinomycetales* выступают характерные различия: первые содержат пентозу-ксилозу, другие — арабинозу.

Переход от гладкой к шероховатой форме бактерий сопровождается всегда обеднением качественного состава моносахаридов, причем убыток касается обычно глюкозамина, рамнозы и маннозы.

В испытуемом материале не было обнаружено влияния выращивающей среды, а также метода, применяемого для получения из бактерий полисахаридов на самый состав этих полисахаридов, полученных от различных сопоставляемых штаммов.

CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF BACTERIAL POLYSACCHARIDES

S u m m a r y

By means of unidimensional paper-partition-chromatography 182 bacterial polysaccharides were investigated. The most frequently encountered sugars in acid hydrolysates of these polysaccharides were: glucosamine, galactose (and/or glucose), mannose, xylose, arabinose, and rhamnose. In about 10% of the investigated polysaccharides there was established the presence of a fast-moving component, giving the characteristics of a methyl-sugar; an identification of this component could not be achieved. In the majority of our polysaccharides the presence of uronic acids (slow-moving hydrolysis-products) could not be excluded.

In the qualitative composition of polysaccharides from bacteria, belonging to the orders *Eubacteriales* and *Actinomycetales* there appears a characteristic difference: the former contain xylose, the latter arabinose.

The variation smooth-rough is always linked with a loss of several sugar components: these components are always glucosamine, rhamnose and mannose.

The conditions of cultivation as also the method of preparation showed in our experiments no marked influence on the qualitative composition of sugar components from polysaccharides, obtained from comparative strains.

I. REIFER i M. MOZEJKO

NOWA MIKROMETODA ILOŚCIOWEGO OZNACZANIA ALKALOIDÓW W LUBINACH PASTEWNYCH

Laboratorium Biochemiczne IUNG

Kierownik: Prof. dr J. Reifer

Łubin, a zwłaszcza trzy jego gatunki: żółty, wąskolistny i biały, jest cenną rośliną dla rolnictwa ze względu na wysoką zawartość łatwostrawnego białka (30—45%) w ziarnie oraz na jego właściwość wzbogacania gleby w związki azotowe dzięki symbiotycznemu wiązaniu azotu atmosferycznego (1). Jeden hektar łubinu jest zdolny w ciągu okresu wegetacyjnego związać 200 kg azotu atmosferycznego (14). Łubin pastewny stanowi w naszych warunkach najbardziej skoncentrowaną paszę białkową (1). Jednak dziko rosnące gatunki łubinu zawierają znaczne ilości (1—3%) alkaloidów toksycznych dla zwierząt. Zagadnienie zastosowania łubinu jako rośliny pastewnej wiąże się ściśle z otrzymaniem łubinów o silnie zmniejszonej zawartości alkaloidów (poniżej 0,1%), tak zwanych łubinów słodkich. Ze względu na silny rozwój prac doświadczalnych nad hodowlą odmian łubinu słodkiego oraz znaczenie, jakie ma odegrać łubin w bazie paszowej, wyłoniła się konieczność opracowania metody ilościowego oznaczania alkaloidów zawartych w tych odmianach łubinu, metody, która pozwoliłaby szybko i dokładnie oznaczać mikrogramowe ilości alkaloidów przy minimalnym zużyciu materiału roślinnego i obniżeniu kosztów analizy. Barbacki w swej pracy pt. *Łubin* podkreśla konieczność opracowania takiej metody pisząc:

„Przede wszystkim do obniżenia alkaloidów przeszkadzała do niedawna niedostateczna dokładność jakościowych metod oznaczania alkaloidów oraz brak uproszczonych metod ilościowego ich oznaczania. Wraz z obniżeniem zawartości alkaloidów musi iść w parze precyzowanie metod ich wykrywania“ (1). Poza opracowaniem metodyki ilościowego ujęcia alkaloidów łubinu wyłoniła się konieczność opracowania metod ekstrakcji tych alkaloidów z materiału roślinnego oraz właściwego oczyszczania wyciągów przed ujęciem ilościowym. Wiadomo jest, że odczynniki stosowane przy oznaczaniu alkaloidów nie są specyficzne i przy niedostatecznym oczyszczeniu badanego wyciągu wykrywa się ilość alkaloidów większą od rzeczywistej, co w efekcie powoduje dyskwalifikację czasem całego zbioru łubinu i naraża gospodarkę krajową na poważne straty.

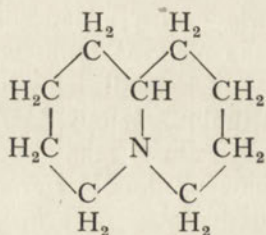
Przy opracowywaniu metody ilościowego oznaczania alkaloidów zawartych w łubinie białym i wąskolistnym znana była tylko metoda oznaczania sumy alkaloidów. Ze względu na to, że toksyczność alkaloidów występujących w tych łubinach może być różna, pożądanym jest znać skład ilościowy poszczególnych alkaloidów. Oznaczanie sumy alkaloidów w łubinie żółtym, białym i wąskolistnym nie jest słuszne jeszcze z innego względu. Przy oznaczaniu sumy alkaloidów robi się albo błędne założenie, że obydwa alkaloidy posiadają jednakowy współczynnik, lub też stosuje się ich rzeczywiste współczynniki, zakładając, że alkaloidy występują w materiale roślinnym zawsze w stałym stosunku.

Jak wynika z analiz łubinu w tabl. (XII i XIII), jak również z pracy W i e r z c h o w s k i e g o (16), ilości poszczególnych alkaloidów wahają się w bardzo szerokich granicach, co wyklucza przyjęcie stałego ich stosunku.

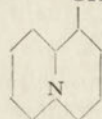
Chemizm alkaloidów zawartych w łubinie żółtym, białym i wąskolistnym

Alkaloidami, które interesują nas głównie z punktu widzenia uprawy łubinu, są lupinina i sparteina, zwana także lupinidyną, zawarte w łubinie żółtym, oraz lupanina i hydroksylupanina (w literaturze niemieckiej zwana błędnie oksylupaniną), wchodzące w skład łubinu białego i wąskolistnego.

Wszystkie te alkaloidy są pochodnymi norlupinanu — $C_9H_{17}N$ o wzorze strukturalnym



Lupinina $C_{10}H_{19}ON$ występuje obok sparteiny w łubinie żółtym (*Lupinus luteus*), a także w *L. niger* i *L. palmeri*.



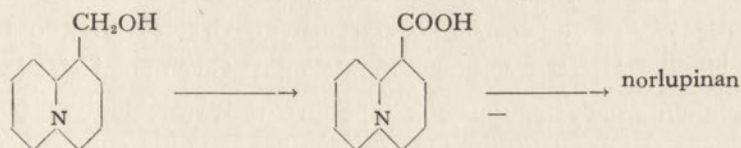
Jest ciałem krystalicznym o tt. 69—70°C (14), a według C l e m o i R a p e r a: 70—71°C (12). Z eteru naftowego krystalizuje w postaci rombów. Jest optycznie czynna, lewoskrętna, $[\alpha]_D^{17} = -19^\circ$. Ma odczyn zasadowy i rozkłada sole amonowe z wydzieleniem amoniaku. Rozpuszcza się lepiej w wodzie zimnej niż w gorącej, dobrze w alkoholu, eterze etylowym, benzenie, chloroformie i niskowrzącym eterze naftowym (13, 15).

Lupinina nie tworzy nierozpuszczalnych związków z chlorkiem rtęci w kwaśnym roztworze. Cecha ta została wykorzystana przy oddzielaniu

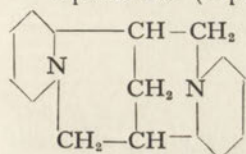
lupininy od sparteiny, która daje z chlorkiem rtęci trudno rozpuszczalny osad (15).

Z kwasem solnym tworzy sole o wzorze: B.HCl o temperaturze topnienia 212—213°C, z kw. pikrynowym — pikryniany o tt. 136—137°C, sole złota B.HAuCl₄ o tt. 196—197° oraz platynochlorki B₂.H₂PtCl o tt. 163—4°C.

Po raz pierwszy wyizolował lupinę B a u m e r t (13), a sposób jej otrzymywania opisali: K a r r e r, C a n a l t, Z o h n e r i W i d m e r (13). Budowa chemiczna lupininy została całkowicie ustalona i potwierdzona przez syntezę laboratoryjną. Pierwsi dokonali syntezę tej C l e m o, M o r g a n i R a p e r. Podczas utleniania lupinina przechodzi w kwas lupinowy, który poddany dekarboksylacji daje norlupinan (14) (4—12a).



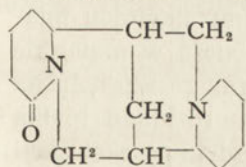
Sparteina (lupinidyna) — C₁₅H₂₆N₂, o wzorze strukturalnym:



W postaci lewoskrętnej występuje w łubinie żółtym (*L. luteus*), oraz *L. niger*, poza tym znaleziono ją w wielu gatunkach rodziny *Papilionaceae*.

Jest bezbarwną cieczą o odczynie alkalicznym i charakterystycznym przykrym zapachu, o gęstości D₂₀ = 1,0196, [α]_D²¹ = — 16,42° (Et—OH). Wrze w temp. 188°/18 mm Hg lub 325°/154 mm Hg w atmosferze wodoru. Jest trudno rozpuszczalna w wodzie (1 cz. sparteiny na 328 cz. wody w temp. 22°C). Dobrze rozpuszcza się w eterze etylowym, chloroformie i alkoholu (15). Z kwasami daje łatwo krystalizujące sole. Wobec kwasów jest dwuwartościowa. Z kwasem siarkowym tworzy sól B.H₂SO₄.5H₂O o tt. 159—62°C (bezw.) Znane są także sole platyny B.H₂PtCl₆.2H₂O o tt. 243,5°, złota: B₂.HCl.3AuCl₃ o tt. 184,3°C oraz pikryniany o tt. 208°, które po krystalizacji z wrzącego alkoholu tworzą błyszczące, żółte igły (13). Galinowsky i Kainz pierwsi dokonali całkowitej syntezy sparteiny w roku 1947 (14).

Lupanina — C₁₅H₂₄ON₂, o wzorze strukturalnym:



W łubinie białym (*L. albus*), wąskolistnym (*L. angustifolius*), *L. laxus* oraz *L. perennis* i *polyphyllus* występuje w postaci prawoskrętnej. Formę lewoskrętną znaleziono w *L. Macounii* i *L. pusillus*. W łubinie białym obok prawoskrętnej występuje także

d, l-lupanina (13 i 14).

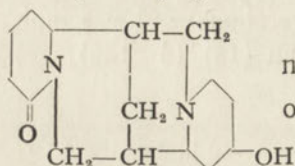
Lupanina jest ciałem stałym, krystalizuje w postaci bezbarwnych, pryzmatycznych kryształów, o tt. 98—9°C. Jest silnie alkaliczna i rozpuszcza się we wszystkich pospolitych rozpuszczalnikach, nie wyłączając wody.

Wobec kwasów zachowuje się jak jednowartościowa zasada, mimo to znany jest jej dwuchlorowodorek: $B.2HCl$. Są to bezbarwne pryzmaty o tt. $185^{\circ}C$ (hygroskopijne). Znany jest między innymi chlorowodorek lupaniny $B.HCl.2H_2O$ o tt. $127-8^{\circ}$ i $250-2^{\circ}$ (bezwodny).

Sposób izolowania lupaniny z nasion łubinu niebieskiego został opisany przez Davisa (13).

Mieszanina równych ilości d- i l-lupaniny, po krystalizacji z acetonu, ma tt. = $98^{\circ}C$ (13).

Hydroksylupanina: $C_{15}H_{24}O_2N_2$, o wzorze strukturalnym:



Hydroksylupaniny nie należy mylić z oksylupaniną produktem laboratoryjnego utlenienia lupaniny o wzorze sumarycznym $C_{15}H_{22}O_2N_2$, o tt. $123^{\circ}C$.

Syntezy tej dokonał Clemo i Leitch (4).

Hydroksylupanina występuje obok lupaniny w łubinie białym (*L. albus*), wąskolistnym (*L. angustifolius*), *L. hilarianus*, *perennis polyphyllus*.

Jest ciałem stałym, krystalicznym. Krystalizuje bardzo trudno w postaci romboidalnych pryzmatów z dwoma wodami i topi się w temp. = $76-7^{\circ}$ lub bezwodna — w temp. = $172-74^{\circ}C$.

Jest prawoskrętna: $[\alpha]_D +64,18^{\circ}$.

Hydroksylupanina jest bardzo dobrze rozpuszczalna w wodzie, alkoholu i zawierającym wodę acetonie, dobrze rozpuszczalna w chloroformie, fenolu i bezwodnym acetonie, bardzo trudno rozpuszczalna w zimnym eterze i benzynie, nierozpuszczalna w siarczku węgla i eterze naftowym (3).

Tworzy sole, na przykład sole złota — $B.HAuCl_4$ o tt. $205-6^{\circ}C$, platyny — $B.H_2PtCl_6.H_2O$ tt. $235-6^{\circ}C$, z kwasem solnym — $B.2HCl.H_2O$ o tt. $272^{\circ}C$ lub $B.HCl.2H_2O$ (3).

Ilościowe metody oznaczania alkaloidów w łubinach

Istniejące metody można podzielić na cztery grupy:

1. Acydymetryczne, oparte na alkalicznym charakterze alkaloidów. Zasada tej grupy metod polega na miareczkowaniu nadmiaru kwasu niezwiązanego z alkaloidem lub na bezpośrednim miareczkowaniu alkaloidu mianowanymi rozcieńczonymi kwasami. Ze względu na obecność w materiale roślinnym szeregu związków o charakterze zasadowym oraz ze względu na wydzielający się w czasie ekstrakcji amoniak w wyniku rozkładu białka i amidów, metoda ta może mieć zastosowanie tylko tam, gdzie po ekstrakcji i oczyszczeniu wyciągi zawierają wyłącznie alkaloidy i to w ilościach nie mniejszych aniżeli 10 mg na analizę.

2. Dalszą grupę stanowią metody wagowe. Zasada tych metod polega na tworzeniu przez alkaloidy trudno rozpuszczalnych soli kompleksowych

z takimi odczynnikami, jak na przykład: kwas krzemowolframowy, fosfomolibdenowy, pikrynowy, pikrolonowy i wiele innych. Ilość alkaloidów oblicza się z różnicy wagi osadu po suszeniu i po wyprażeniu. Według Wierzechowskiego (16) metodę tę można stosować przy koncentracji alkaloidów nie mniejszej niż 0,2%, co pociąga za sobą konieczność pobierania próbek łubinów słodkich w ilości 20—30 g oraz duże zużycie rozpuszczalników organicznych do ekstrakcji. Przy tym należy podkreślić, że w analizie łubinów słodkich różnica wagi tygla z osadem po suszeniu i po prażeniu nie przekracza 5 mg. W związku z tym metoda ta jest niedokładna przy zastosowaniu do materiału o niskiej zawartości alkaloidów.

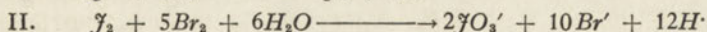
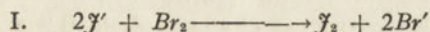
3. Trzecią grupę stanowią metody optyczne, obejmujące oznaczenia nefelometryczne, niedokładne ze względu na nietrwałość roztworów koloidowych, i metody kolorymetryczne, polegające na oznaczeniu odczynników związanych w kompleksie z alkaloidami, jak na przykład soli kw. Reinecke-go lub kwasu fosfomolibdenowego. Metody te nie są dokładne, ponieważ podobnie jak w metodach wagowych oznacza się nie poszczególne alkaloidy, lecz ich sumę.

4. Ostatnią grupę stanowią metody jodometryczne. Metoda opisana w tej pracy należy do tej grupy. Od dawna znana jest zdolność alkaloidów do tworzenia trudno rozpuszczalnych wielojodków lub kompleksów zawierających jodki, jak na przykład jodortęciany, jodobizmutany i inne. Związki te w zależności od własności poszczególnych alkaloidów tworzą kompleksy o zmiennym składzie, na przykład $(B.HJ)_n \cdot (HgJ_2)_m$ (15).

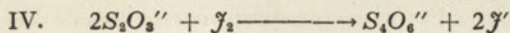
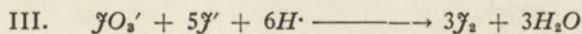
Punktem wyjściowym naszej pracy był kompleks jodortęciowy (odczynnik Mayera). W praktyce odczynnik ten okazał się nieodpowiedni, ponieważ nie strącał ilościowo wszystkich alkaloidów łubinu z roztworów o zawartości 25 γ oraz na skutek rozcieńczenia odczynnika roztworem analizowanym wytrącał się jodek rtęci, który uniemożliwiał ilościowe oznaczenie alkaloidów. Zmodyfikowany odczynnik Mayera zawiera w miejsce jodku potasu — jodek kadmu oraz chlorek sodu, który skutecznie zapobiega wytrącaniu się jodku rtęci.

Założeniem metody było opracowanie warunków rozdzielczego oznaczenia alkaloidów, a mianowicie lupininy i sparteiny w łubinie żółtym oraz lupaniny i hydroksylupaniny w łubinie białym i wąskolistnym.

Zasada opisanej metody polega na tym, że jodek zawarty w nierozpuszczalnym kompleksie zostaje utleniony wodą bromową do jodanu zgodnie z reakcją:



Po dodaniu jodku miareczkuje się wydzielony jod tiosiarczanem sodu,



Metody

A. METODA ILOŚCIOWEGO OZNACZANIA LUPININY I SPARTEINY W CZYSTYCH ROZTWORACH
(ALKALOIDY LUBINU ŻÓLTEGO)

Odczynniki:

1. Zmodyfikowany odczynnik jodortęciowy do wytrącenia sumy alkaloidów (a) 2,4 g jodku kadmu, 6,5 g jodku rtęci i 20 g chlorku sodu rozpuścić w 100 ml wrzącej wody, zagotować i po ostudzeniu przesączyć przez ilościowy sączek. Pozostały na sączku nadmiar jodku rtęci może być po przemyciu wodą i po wysuszeniu ponownie użyty (przechowywać w ciemnej butelce). Przed użyciem należy rozcieńczyć odczynnik buforem fosforanowym (3) w stosunku 6 : 4.

2. Odczynnik jodortęciowy do oznaczania sparteiny (b). 2 g jodku rtęci i 40 g chlorku sodu rozpuścić na gorąco w 100 ml wody, zagotować i po ostudzeniu przesączyć i przechowywać jak wyżej.

3. Bufor fosforanowy: 2,2 g jednozasadowego fosforanu sodu ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) rozpuścić w 100 ml wody.

4. Krystaliczny siarczan sodu ($\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

5. 2,5% roztwór wodorotlenku sodowego.

6. 10% roztwór fosforanu jednosodowego ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$).

7. Bufor szczawianowo-boranowy. a: 42,1 g kwasu borowego i 7,8 g wodorotlenku sodu rozpuścić w wodzie i dopełnić wodę do 100 ml, b: 2,5% roztwór kwasu szczawowego.

100 ml odczynnika a zmieszać z 20 ml odczynnika b i rozcieńczyć wodą do 600 ml.

8. 1,25 g siarczynu kadmu ($3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) rozpuścić w wodzie i uzupełnić do 100 ml.

9. Aceton.

10. Nasycony roztwór chlorku sodu.

11. 2,5% roztwór bezwodnego węglanu sodowego.

12. 30 ml stężonego kwasu siarkowego i 6 mg oranżu metylowego rozpuścić w wodzie i dopełnić do 1000 ml.

13. 3 ml stężonego kwasu siarkowego rozcieńczyć wodą do 100 ml.

14. Nasycona woda bromowa (przechowywać w ciemnej butelce).

15. 1% roztwór fenolu w wodzie.

16. 0,005 n tiosiarczan sodu (odczynnik ten nie zmienia miana na okres kilku miesięcy, jeżeli w 1000 ml roztworu zawiera około 0,2 g wodorotlenku sodowego. Tiosiarczan sodowy należy przechowywać w lodówce w butelce z ciemnego szkła).

17. Jodek potasu *in substantia*.

18. 0,25% roztwór skrobi rozpuszczalnej (przechowywana z agarem

zawierającym jodek rtęci skrobia nie ulega rozkładowi przez drobno-ustroje).

W celu rozdzielczego oznaczania sparteiny i lupininy stosuje się następującą metodę: I. Oznaczenie sumy obu alkaloidów. II. Oznaczenie sparteiny. Z różnicy po odpowiednim przeliczeniu otrzymuje się ilość lupininy zawartej w badanej próbce.

I. OZNACZANIE SUMY LUPININY I SPARTEINY

Do 2 probówek wirówkowych o pojemności około 10 ml odmierzyć pipetą po 2 ml roztworu analizowanego (lub 1 analizy + 1 wody) i dodać 1 ml odczynnika jodortęciowego a (1). Zawartość probówki dobrze wymieszać przez wstrząsanie, dodać kilka kryształków (5—10 mg) siarczanu sodu (4) w celu przyspieszenia wypadania osadu. Probówki pozostawić w temperaturze pokojowej w ciemnym miejscu na okres 5 minut, następnie wstawić do wody z lodem na 15 minut. Osad należy odwirować przez 5 minut przy 2500—3000 obrotów na minutę. Płyn znad osadu należy ostrożnie odsyfonować za pomocą zagiętej kapilary podłączonej do pompy wodnej. Probówki ustawia się następnie na bibule filtracyjnej do góry dnem na okres 2—3 minut. Płyn ze ścianek probówek zebrać ostrożnie bibułą filtracyjną zwiniętą w rulon. Do probówek dodać 1 ml buforu szczawianowoborowego (7) oraz 0,5 ml siarczanu kadmu (8). Starannie wymieszać zawartość probówki przez wstrząsanie i wirować jak wyżej przez 2—3 minut. Gdyby mimo odwirowania na powierzchni płynu pływał osad, należy probówkę wstrząsnąć i wirować ponownie. Po odwirowaniu płyn znad osadu odsyfonować i postawić na bibule filtracyjnej jak wyżej. Po osuszeniu ścianek probówki dodać 2 krople kwasu siarkowego (13) i 0,5 ml acetonu (9). W tych warunkach wytrąca się z kompleksu jodek rtęci (widoczny przy zawartości ponad 100 γ alkaloidów w próbce), który rozpuszcza się przez dodanie 1 ml chlorku sodu (10), następnie dodać 2 ml węgla sodu (11). Osad powinien być całkowicie rozpuszczony przed dodaniem węgla sodu, w przeciwnym razie w czasie bromowania nierozpuszczony kompleks alkaloidu wypływa na powierzchnię płynu i wolny jod zamiast utlenić się do jodanu sublimuje w powietrze. Zawartość probówki przenieść ilościowo do 50 ml kolbki Erlenmeyera ze szkła jenańskiego, przy czym zawartość płynu łącznie z myciem nie powinna przekraczać 10 ml. Najwygodniej można przemyć probówkę ilościowo stosując tryskawkę z automatycznym wylewem wody*. Aceton w kolbce należy odparować na kuchence elektrycznej przykrytej siatką azbestową. Aby zapobiec przegrzewaniu się płynu, należy przed

* Przez korek tryskawki przebiega dodatkowa rurka szklana. Ustnik tryskawki zaopatrzony jest od dołu węzłem gumowym o długości około 8 cm zamkniętym bagietką szklaną. Podłużne nacięcie gumy o długości około 2 cm umożliwia przedostanie się powietrza do tryskawki i wytworzone naciśnienie zezwala na automatyczny wylew wody przez kilkadziesiąt sekund.

odparowaniem acetonu dodać do kolbki perełkę szklaną i nakryć otwór kolbki kulką szklaną lub lejkiem. Po upływie około 10 minut, gdy nie czuć już acetonu, ostudzić pod kranem do temperatury pokojowej, zobojętnić kwasem zabarwionym oranżem metylowym (12), dodać 1 kroplę w nadmiarze i następnie po dodaniu 0,5 wody bromowej (14) nadmiar bromu odparować na wrzącej łaźni wodnej przez 10—15 minut. Zupełnie bezbarwny płyn ostudzić pod kranem, dodać 3 krople fenolu (15) w celu związania ewentualnych śladów pozostałego bromu. Po ściankach kolbki dodać 1 ml kwasu siarkowego (13), wymieszać zawartość kolbki wstrząsając i dosypać kilka kryształków (około 5 mg) jodku potasu (17). Wydzielony jod zmiażdżyć 0,005 n tiosiarczanem sodowym z mikrobiurety o podziałce 0,01 ml. Kończyć miareczkowanie wobec skrobi (18). Uwaga: przy oznaczaniu alkaloidów o zawartości poniżej 50 γ próbki należy mrozić w mieszaninie soli z rozdrobnionym lodem, zamiast trzymać 15 minut w wodzie z lodem. Takie mrożenie przyspiesza wytrącanie się osadu.

W tablicy I umieszczone są wyniki oznaczania sparteiny, w tablicy II wyniki oznaczania lupininy w czystych roztworach. W tablicy III zawarte są wyniki oznaczania mieszaniny lupininy i sparteiny.

Tablica I
Oznaczanie sparteiny analizą na sumę (metoda I)

| Użyto sparteiny w γ | ml 0,005 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ | | Mnożnik | Wykryto γ | Średni % błędu | |
|----------------------------------|--|--------------|---------|---------------------|-------------------|--------|
| | Zużyto | Średnia | | | | |
| 25 | 0,88 0,90 | 0,90 0,86 | 0,88 | 28,5 | 25,1 | + 0,4 |
| 50 | 1,70 1,76 | 1,79 1,80 | 1,76 | 28,5 | 50,2 | + 0,4 |
| 100 | 3,40 3,50 | 3,59 3,53 | 3,50 | 28,5 | 99,7 | - 0,3 |
| 250 | 8,83 8,90 | 8,90 8,83 | 8,86 | 28,5 | 252,5 | + 1,00 |

II. OZNACZENIE SPARTEINY W OBECNOŚCI LUPININY.

Oznaczenie sparteiny w obecności lupininy oparte jest na naszym spostrzeżeniu, że 2% roztwór jodku rtęci w nasyconym roztworze chlorku sodu (odczynnik b 2) nie tworzy osadu z lupiną, natomiast sparteinę wytrąca ilościowo.

Do 2 próbek wirówkowych o pojemności około 10 ml odpipetować po 2 ml roztworu analizowanego (lub 1 analizy + 1 wody) i oziębnić do temperatury od 2—4° w wodzie z lodem. Dodać 2 ml odczynnika jodortęcio-

wego b (2) i 0,5 ml wodorotlenku sodowego (5). Wstrząsnąć probówką energicznie uderzając palcem o dno lub wirując probówką między dłońmi tak długo, aż będzie widoczny pod światło wyraźny osad. Czynność ta trwa około 2 minut. Po dodaniu odczynnika przed wstrząsaniem plyn ulega tylko zmętnieniu, ponieważ początkowo powstaje koloidowy roztwór. Po wy-

Tablica II
Oznaczenie lupininy analizą na sumę (metoda I)

| Użyto lupininy w γ | ml 0,005 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ | | Mnożnik | Wykryto γ | Średni % błędu |
|---------------------------|--|---------|---------|------------------|----------------|
| | Zużyto | Średnia | | | |
| 25 | 1,20 | 1,22 | 20 | 24,4 | - 2,4 |
| | 1,26 | 1,20 | | | |
| 50 | 2,68 | 2,55 | 19 | 50,3 | + 0,6 |
| | 2,67 | 2,69 | | | |
| 100 | 5,11 | 5,14 | 19 | 97,9 | - 2,1 |
| | 5,14 | 5,17 | | | |
| 150 | 8,10 | 8,03 | 19 | 153,1 | + 2,0 |
| | 7,97 | 8,17 | | | |
| 250 | 12,94 | 12,89 | 19 | 246,8 | - 1,2 |
| | 13,15 | 12,99 | | | |

Tablica III
Oznaczenie mieszaniny lupininy i sparteiny analizą na sumę (metoda I)

| Użyto γ | | ml 0,005 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ | | | % błędu | | |
|----------------|----------|--|---------|--------------------|---------|--------|--------|
| sparteiny | lupininy | Zużyto | Średnia | Należało zużyć na: | | | |
| | | | | spart. | | lupin. | sumę |
| 25 | 200 | 11,32 | 11,33 | 0,89 | 10,52 | 11,41 | - 0,70 |
| | | 11,35 | | | | | |
| 200 | 25 | 8,36 | 8,37 | 7,12 | 1,22 | 8,34 | + 0,47 |
| | | 8,38 | | | | | |

trąceniu się osadu wstawić probówki do wody z lodem na 5 minut wstrząsając od czasu do czasu. Następnie dodać 0,5 ml jednosodowego fosforanu (6) i dokładnie zamieszać zawartość probówki. Dalsze postępowanie takie samo, jak w metodzie I oznaczania sumy obu alkaloidów.

Przy zastosowaniu opisanej metody lupininę i sparteinę można oznaczyć ilościowo w granicach od 25 γ do 250 γ włącznie. Suma alkaloidów według metody I również nie powinna przekraczać 250 γ .

Tablice IV i V zawierają wyniki oznaczania sparteiny oraz sparteiny

Tablica IV

Oznaczenie sparteiny w czystych roztworach (metoda II)

| Użyto sparteiny w γ | ml 0,005 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ | | Mnożnik | Wykryto γ | Średni % błędu | |
|----------------------------|--|--------------|---------|------------------|----------------|-------|
| | Zużyto | Średnia | | | | |
| 25 | 0,75 0,73 | 0,69 0,70 | 0,71 | 35,7 | 25,3 | + 1,2 |
| 50 | 1,38 1,39 | 1,34 1,38 | 1,37 | 35,7 | 48,9 | - 2,2 |
| 100 | 2,79 2,75 | 2,73 2,76 | 2,76 | 35,7 | 99,1 | - 0,9 |
| 200 | 5,59 5,47 | 5,55 5,54 | 5,54 | 35,7 | 199,8 | - 0,1 |
| 250 | 7,12 6,92 | 6,83 6,96 | 6,96 | 35,7 | 249,1 | - 0,4 |

Tablica V

Oznaczenie sparteiny w obecności lupiny

| Użyto γ | | ml 0,005 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ | | | Mnożnik | Wykryto γ | Średni % błędu | |
|----------------|-----------|--|---------|----------------|---------|------------------|----------------|-------|
| spar-teiny | lupi-niny | Zużyto | Średnio | Należało zużyć | | | | |
| 25 | 166 | 0,71 | 0,72 | 0,71 | 0,70 | 35,7 | 25,3 | + 1,2 |
| 250 | 166 | 7,11 | 6,95 | 7,03 | 7,00 | 35,7 | 251,0 | + 0,4 |

w obecności lupiny. Obliczenie: zawartość sparteiny i lupiny w badanej próbie oblicza się według następującego wzoru:

$$\gamma \text{ sparteiny} = a \cdot F$$

gdzie a = ilość ml 0,005 n tiosiarczanu sodowego zużytego w metodzie II, F = mnożnik ustalony doświadczalnie = 35,7

$$\gamma \text{ lupiny} = \left(b - \frac{a \cdot 35,7}{28,5} \right) F$$

gdzie b = ilość ml 0,005 n tiosiarczanu sodowego zużytego w metodzie I, a = ilość ml 0,005 n tiosiarczanu sodowego zużytego w metodzie II, F = = mnożnik ustalony doświadczalnie = 19 (w ilościach lupiny poniżej 50 mnożnik ten wynosi 20). Przykład: do analizy użyto mieszaninę alkaloidów zawierającą 25,0 γ sparteiny i 200,0 γ lupiny.

Ilość zużytego tiosiarcznanu metodą I wynosiła średnio 11,33 ml.

Ilość zużytego tiosiarcznanu metodą II wynosiła średnio 0,71 ml.

$$\gamma \text{ sparteiny} = a \cdot F = 0,71 \cdot 35,7 = 25,34$$

$$\begin{aligned} \gamma \text{ lupininy} &= \left(b - \frac{a \cdot 35,7}{28,5} \right) \cdot F = \left(11,33 - \frac{0,71 \cdot 35,7}{28,5} \right) \cdot 19 \\ &= (11,33 - 0,88) \cdot 19 = 198,45. \end{aligned}$$

Jak wynika z tablicy I i II, przy zastosowaniu odczynnika jodortęciowego lupinina i sparteina w metodzie na sumę w ilości do 250 γ dają wyniki proporcjonalne i powtarzalne w granicach błędu nie przekraczających $\pm 2\%$. Tylko w wypadku lupininy w ilości 25 γ mnożnik jest nieco wyższy i wynosi 20, podczas gdy dla ilości powyżej 25 γ wynosi on 19. Jak widać z tablicy III, metoda I do oznaczania obu alkaloidów w mieszaninie daje wyniki o dużej dokładności, nie przekraczające $\pm 2\%$ błędu, przy czym należy zaznaczyć, że obecność dużej ilości sparteiny nie wpływa w żaden sposób na strącanie lupininy w małej ilości i nie zmienia mnożnika, doświadczalnie ustalonego dla 25 γ sparteiny oznaczonej w roztworach nie zawierających lupininy.

W tablicy IV umieszczone są wyniki oznaczania sparteiny w czystych roztworach metodą II, przy czym błąd metody również nie przekracza $\pm 2\%$. Obecność lupininy nie wpływa na oznaczanie sparteiny metodą II, co wykazuje tablica V.

B. METODA ILOŚCIOWEGO OZNACZANIA LUPANINY I HYDROKSYLUPANINY W CZYSTYCH ROZTWORACH (ALKALOIDY LUBINU BIAŁEGO I WĄSKOLISTNEGO)

Metoda opracowana w celu ilościowego oznaczania alkaloidów występujących w łubinie białym i wąskolistnym w ogólnej zasadzie nie różni się od metody opracowanej dla łubinu żółtego. W obu metodach oznaczanie polega na utlenieniu jodku zawartego w kompleksie alkaloidu do jodanu. Różne są tylko warunki strącania oraz sposób rozdziału obu alkaloidów.

Lupanina i hydroksylupanina są zbyt blisko ze sobą spokrewnione i prawdopodobnie dlatego mimo usilnych starań nie zdołano znaleźć warunków, w których można by oznaczyć podobnie jak przy mieszaninie lupininy i sparteiny tylko jeden alkaloid w roztworach zawierających ich sumę. Wobec tego, że nie zdołano wykryć odpowiedniej metody chemicznej, umożliwiającej selektywne oznaczenie jednego z alkaloidów w mieszaninach, postanowiono opracować warunki ilościowego rozdziału lupaniny i hydroksylupaniny przed ich chemiczną analizą. W tym celu wykorzystano odmienne właściwości obu alkaloidów w stosunku do eteru naftowego. Wiadomo jest od dawna (3), że lupanina jest dobrze rozpuszczalna w eterze naftowym, na-

tomiast hydroksylupanina nie rozpuszcza się w nim zupełnie. Badania przeprowadzone przez nas potwierdziły, że różnice w zachowaniu się obu alkaloidów można wykorzystać do celów analizy ilościowej nawet w stężeniach roztworów nie przekraczających 0,001%.

Zasada metody ilościowego oddzielenia lupaniny od hydroksylupaniny przy pomocy eteru naftowego polega na tym, że roztwór wodny zawierający mieszaninę obu alkaloidów odpipetowuje się dokładnie do rozdzielacza, alkalizuje węglanem sodu i wyciąga do chloroformu. Chloroform zawierający oba alkaloidy odwadnia się bezwodnym węglanem sodu i oddestylowuje. Pozostałość zawierającą alkaloidy w postaci wolnych zasad i węglan sodu ekstrahuje się eterem naftowym. Do eteru naftowego przechodzi tylko lupanina. Po oddestylowaniu eteru naftowego i rozpuszczeniu pozostałości w wodzie oznacza się lupaninę niżej opisaną metodą. Sumę obu alkaloidów oznacza się bezpośrednio.

Przebieg analizy

Odczynniki:

1. Zmodyfikowany odczynnik jodortęciowy 2,4 g jodku kadmu, 6,5 g jodku rtęci i 20 g chlorku sodu rozpuścić w 100 ml wrzącej wody, zagotować i po ostudzeniu przesączyć przez ilościowy sączeek. Przechowywać w ciemnej butelce.
2. 21 ml stężonego kwasu siarkowego rozcieńczyć wodą do 100 ml.
3. Krystaliczny fosforan jednoamonowy.
4. 21 ml stężonego kwasu siarkowego i 0,5 g chlorku sodu rozcieńczyć wodą do 100 ml.

Pozostałe odczynniki, a mianowicie aceton, 2,5% węglan sodu, 3% kwas siarkowy z oranżem metylowym, nasycona woda bromowa, 1% fenol, 3% kwas siarkowy, jodek potasu, tiosiarczan i skrobia jak w metodzie A.

Do 2 probówek wirówkowych o pojemności około 10 ml odmierzyć pipetą po 2 ml próby (lub 1 próby+1 wody), dodać 1 ml kwasu siarkowego (2), wstrząsnąć energicznie, aby dodany kwas wymieszał się dobrze z badanym roztworem, i umieścić probówki w wodzie z lodem na przeciąg około 5 minut. Następnie dodać 0,2 ml odczynnika jodortęciowego (1), wymieszać zawartość probówki przez wstrząsanie, dodać kilka kryształków (około 5 mg) fosforanu amonu (3), ponownie wstrząsnąć, pozostawić w wodzie z lodem przez 15 minut i zamrozić w mieszaninie lodu z solą. Zamrożniętą zawartość wirować przy 2500—3000 obrotów na minutę aż do zupełnego roztopienia lodu, co trwa około 5—7 minut. Jeżeli na powierzchni płynu utworzył się kożuszek osadu alkaloidu, zawartość probówki wymieszać i wirować ponownie przez około 2 minuty. Z nad osadu odsyfonować i usunąć płyn, jak podano przy analizie lupininy, dodać 1 ml kwasu siarkowego za-

wierającego chlorek sodu (4) w celu wymycia nadmiaru odczynnika, ponownie wirować, odsyfonować i usunąć płyn jak wyżej. Osad rozpuścić w 1 ml acetonu, dodać 2 ml węgla sodowego i postępować dalej jak przy oznaczaniu lupininy.

Wyniki analiz lupaniny i hydroksylupaniny oddzielnie w czystych roztworach przedstawione są w tablicy VI i VII, wyniki analizy sumy obu alkaloidów w mieszaninie przedstawia tablica VIII.

Tablica VI
Oznaczanie lupaniny w czystych roztworach

| Użyto lupaniny w γ | ml 0,005 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ | | Mnożnik | Wykryto γ | Średni % błędu | |
|---------------------------|--|--------------|---------|------------------|----------------|-------|
| | Zużyto | Średnia | | | | |
| 25 | 0,71 0,72 | 0,72 0,73 | 0,72 | 33,3 | 24,9 | - 0,4 |
| 50 | 1,51 1,50 | 1,55 1,54 | 1,52 | 33,3 | 50,6 | + 1,2 |
| 100 | 2,98 2,98 | 2,97 2,92 | 2,96 | 33,3 | 98,5 | - 1,5 |
| 150 | 4,51 4,53 | 4,48 4,45 | 4,49 | 33,3 | 149,5 | - 0,3 |
| 200 | 5,97 5,98 | 5,96 6,00 | 5,98 | 33,3 | 199,1 | - 0,4 |
| 250 | 7,52 7,51 | 7,50 7,40 | 7,48 | 33,3 | 249,0 | - 0,4 |

Jak wynika z tablicy VI, opisana metoda zezwala na oznaczenie lupaniny w ilościach od 25 γ do 250 γ , przy czym ilości wytrąconego kompleksu w tych granicach są proporcjonalne. Stosując mnożnik 33,3 błąd analizy nie przekracza $\pm 1.5\%$.

Jak wynika z tablicy VII, ilość wytrąconej hydroksylupaniny nie wzrasta proporcjonalnie do stężenia roztworu ze względu na pewną w tych granicach już oznaczalną rozpuszczalność jodortęciowego kompleksu. Zastosowanie stałego mnożnika jest przeto niemożliwe. Zależność faktycznie użytych ml tiosiarczanu od ilości alkaloidów w roztworze przedstawiona jest na rysunku 1. Jak wynika z wykresu, zależność ta wyrażona jest prostą, z której można odczytać zawartość hydroksylupaniny w badanej próbce.

Ze względu na brak proporcjonalności w ilości użytego tiosiarczanu do stężenia hydroksylupaniny w roztworze, oznaczenie sumy lupaniny i hydroksylupaniny możliwe jest tylko w tym wypadku, jeżeli stężenia lupaniny nie wpływają na wzmożone wytrącanie hydroksylupaniny szczególnie

T a b l i c a VII

Oznaczenie hydroksylupaniny w czystych roztworach

| Użyto hydroksylupaniny w γ | ml 0,005 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ | | | | Średnia |
|-----------------------------------|--|------|------|------|---------|
| | Zużyto | | | | |
| 25 | 0,35 | 0,34 | 0,39 | 0,34 | 0,35 |
| 50 | 0,86 | 0,84 | 0,86 | 0,89 | 0,86 |
| 100 | 2,05 | 2,03 | 2,04 | 2,04 | 2,04 |
| 125 | 2,67 | 2,57 | 2,57 | 2,68 | 2,62 |
| 200 | 4,27 | 4,27 | 4,28 | 4,28 | 4,27 |
| 250 | 5,44 | 5,32 | 5,42 | 5,39 | 5,39 |

w małych ilościach od 25—100 γ . „Koprecypitacja“ jest bowiem zjawiskiem często spotykanym. Jak wynika z tablicy VIII, obecność lupaniny w różnych stężeniach nie zmienia ilości ml tiosiarczuanu zużytego na oznaczenie hydroksylupaniny w czystych roztworach.

T a b l i c a VIII

Oznaczenie sumy lupaniny i hydroksylupaniny

| Użyto w γ | | ml 0,005 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ | | | | | | Średni % błędu |
|------------------|------------------|--|---------|--------------------|------------------|------|------|----------------|
| Lupaniny | Hydroksylupaniny | Zużyto | Średnia | Należało zużyć na: | | | | |
| | | | | lupaninę | hydroksylupaninę | sumę | | |
| 250 | 25 | 7,82 | 7,80 | 7,81 | 7,48 | 0,34 | 7,82 | $\pm 0,0$ |
| 50 | 235 | 6,60 | 6,52 | 6,56 | 1,51 | 5,07 | 6,58 | $\pm 0,0$ |

Jak już wspomniano wyżej, zawartość lupaniny w mieszaninie obu alkaloidów można oznaczyć jedynie po uprzedniej ekstrakcji eterem nadtowym.

METODA ILOŚCIOWEGO ODDZIELENIA LUPANINY OD HYDROKSYLUPANINY

Dokładnie odmierzoną ilość roztworu zawierającego oba alkaloidy odpipetowuje się do rozdzielacza o pojemności 100 ml, alkalizuje 2 ml nasyconego węgla sodowego i wytrząsa z chloroformem 3 razy po 5 ml. Chloroform zbiera się do 100 ml suchej kolbki Erlenmeyera. Do kolbki dosypuje się około 2 g bezwodnego węgla sodu i oddestylowuje chloroform do sucha, zanurzając kolbkę aż po szyjkę w naczyniu z wrzącą wodą. Po od-

destylowaniu chloroformu pozostaje w kolbce poza alkaloidami suchy węgiel sodu. Wyjąć kolbę z wody nie odłączając od chłodniczki. Jest to konieczne, bowiem w przeciwnym razie para wodna osiada w szyjce kolbki. Ze względu na dużą rozpuszczalność lupaniny w wodzie nie przejdzie ona w tych warunkach całkowicie do eteru naftowego. Z drugiej strony eter naftowy nasycony wodą rozpuszcza małe ilości hydroksylupaniny. Dlatego należy nie dopuścić do gromadzenia się pary wodnej w kolbce. Kolbkę starannie wytrzeć z zewnątrz i odłączyć od chłodniczki. W celu pozbycia się ewentualnych śladów wody dosypać po ściankach kolbki 0,5 g bezwodnego węglanu sodowego, a ślady chloroformu odpędzić wstrząsając kolbką na płytce elektrycznej z siatką azbestową. Ostudzić kolbkę i dolać 5 ml eteru naftowego. Zawartość kolbki energicznie wymieszać, postawić na kuchence elektrycznej aż do lekkiego wrzenia (2—3 sek.). Po ostygnięciu eter zlać ostrożnie znad osadu do drugiej kolbki o tej samej pojemności i pozostały osad ekstrahować eterem naftowym jeszcze trzykrotnie. W tych warunkach do eteru naftowego przechodzi tylko lupanina. Do połączonych wyciągów eteru naftowego dolać około 2 ml wody i oddestylować eter na łaźni wodnej. Gdy cały eter zostaje oddestylowany, plyn przenieść ilościowo do kolbki miarowej lub wykalibrowanego cylindra i rozcieńczyć wodą do objętości wyjściowej lub, jeśli przewidziana zawartość alkaloidu jest mała, do odpowiednio mniejszej objętości. Na tak przyrządzonym roztworze lupaniny oznacza się alkaloid wyżej opisaną metodą.

Wyniki zawarte w tablicy IX dowodzą, że w wyżej opisanych warunkach lupanina przechodzi ilościowo do eteru naftowego, natomiast hydroksylupanina nie ulega ekstrakcji.

Tablica IX
Ilościowy rozdział lupaniny od hydroksylupaniny

| Użyto lupaniny w γ | ml 0,005 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ | | Dodano γ hydroksylupaniny | ml 0,005 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ | | % błędu | | |
|---------------------------|--|---------|----------------------------------|--|---------|---------|------|-------|
| | Zużyto | Średnia | | Zużyto | Średnia | | | |
| 200 | 6,05 | 6,00 | 6,02 | 250 | 5,95 | 6,00 | 5,97 | - 0,8 |
| 148 | 4,48 | 4,43 | 4,45 | 97,5 | 4,56 | 4,53 | 4,54 | + 2,0 |

Obliczenie:

$$\gamma \text{ lupaniny} = a \cdot F$$

gdzie a = ml 0,005 tiosiarczanu zużyte na oznaczenie lupaniny po ekstrakcji eterem naftowym.

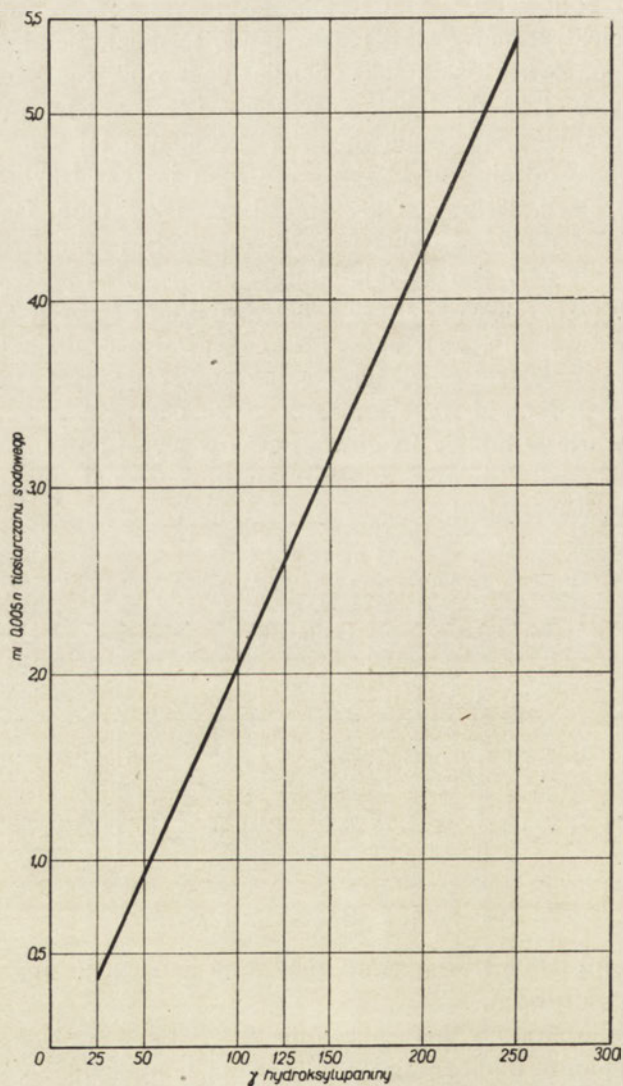
F = mnożnik ustalony doświadczalnie = 33,3.

Hydroksylupaninę oblicza się w sposób następujący:

$$c = b - a,$$

gdzie c = ilość ml 0,005 tiosiarczanu odpowiadająca hydroksylupaninie,
 b = ml 0,005 tiosiarczanu zużyte na sumę alkaloidów,
 a = ml 0,005 tiosiarczanu zużyte na oznaczenie lupaniny.
 γ hydroksylupaniny odpowiadające wielkości c odczytuje się z wykresu (rys. 1).

Przykład: ml 0,005 n tiosiarczanu zużytego na sumę = 3,59
 ml 0,005 n „ „ „ na lupaninę = 1,63
 γ lupaniny = $a \cdot F = 1,63 \cdot 33,3 = 54,3$
 γ hydroksylupaniny:



Rys. 1

$$c = b - a = 3,59 - 1,63 = 1,96 \text{ ml } 0,005 \text{ n } \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$$

z wykresu 1:

1,96 ml 0,005 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ odpowiada 97,5 γ hydroksylupaniny.

Zastosowanie metody do łubinów pastewnych

EKSTRAKCYJA ALKALOIDÓW Z MATERIAŁU ROŚLINNEGO I OCZYSZCZANIE WYCIĄGÓW.

Ilościowe oznaczanie alkaloidów w materiale roślinnym składa się z 4 etapów, a mianowicie: 1. Przygotowanie materiału do ekstrakcji. 2. Ekstrakcja. 3. Oczyszczenie wyciągów alkaloidowych. 4. Właściwa analiza ilościowa.

Ujęcie ilościowe alkaloidów zostało omówione w poprzednim rozdziale. Pozostaje omówienie przygotowania, ekstrakcji i oczyszczenia wyciągów.

Wszyscy autorzy (2, 13, 15, 16) zgodnie podkreślają konieczność dokładnego rozdrobnienia materiału przed ekstrakcją. Z danych cytologicznych wiadomo, że alkaloidy gromadzą się w wakuolach komórkowych i przez mechaniczne zniszczenie struktury komórki umożliwia się rozpuszczalnikiowi ilościowe wymycie alkaloidów. W normalnych warunkach uzyskuje się to przez rozcieranie materiału w moździerzu lub mielenie w młynkach. Rzadko, lecz z bardzo dobrym wynikiem bywa stosowane rozdrobnienie przez zamrażanie tkanki w stałym dwutlenku węgla.

W naszej pracowni mielono materiał na młynku typu „Junior laboratory mill“ z sitem o średnicy otworów 0,075 mm. Można również po zmieleniu w zwykłym młynku przesiewać materiał przez ręczne sito o w/w średnicy.

W literaturze podane są 2 typy ekstrakcji w zastosowaniu do alkaloidów. Jeden typ to kwaśna ekstrakcja wodna lub alkoholowa. Jak się jednak okazało w toku doświadczeń, przy zastosowaniu tej ekstrakcji alkaloid nie przechodzi do roztworu ilościowo. Do podobnego wniosku doszedł również W i e r z c h o w s k i (16) i uzasadnia to w sposób następujący: „Kwasy takie jak solny czy siarkowy nie działają w rozcieńczeniu dostatecznie rozkładczo na związki alkaloidów występujące w komórkach roślinnych, a białka pod wpływem kwasu i alkoholu ulegają denaturacji i prawdopodobnie wskutek tego ochraniają część alkaloidów przed ekstrakcją“.

Drugi rodzaj to ekstrakcja chloroformem, eterem etylowym lub ich mieszaniną w środowisku alkalicznym. Do alkalizacji stosowane bywają wodorotlenek sodu i węglanu sodu, przy tym ze względu na to, że alkaloidy łubinu są mniej lub więcej rozpuszczalne w wodzie, stosuje się zazwyczaj środki odwadniające. Wierzchowski w metodzie powszechnie w Polsce stosowanej używa gipsu. W wyniku naszych doświadczeń bardziej korzystne okazało się użycie bezwodnego węglanu sodowego. Gips jest niewygodny z tego względu, ponieważ przy nadmiernym jego użyciu w czasie wytrąsania rozpuszczalnika z wodą tworzy się warstwa emulsji, która często uniemożliwia rozdział fazy wodnej od rozpuszczalnika. Węglan sodowy może być użyty w dużo mniejszych ilościach i jest jednocześnie czynnikiem alkalizującym i odwadniającym.

Oczyszczanie wyciągów alkaloidów jest podstawą dokładnego oznaczenia alkaloidów w wyciągach roślinnych, bowiem do wyciągów chloroformowego lub eterowo-chloroformowego, poza alkaloidami, przechodzi szeregi innych związków, jak tłuszcze, barwniki, żywice, glukozydy, węglowodany i inne (2. 15). Większość tych związków daje reakcje z odczynnikami normalnie stosowanymi do oznaczania alkaloidów, dlatego bardzo istotne jest otrzymanie wyciągu alkaloidów pozbawionego tych zanieczyszczeń. Doświadczenia wykazały, że jednorazowe oczyszczenie wyciągów przez pasaż chloroform — rozcieńczony kwas jest nie wystarczające. Natomiast dwukrotne oczyszczanie wyciągów poprzez ekstrakcję wolnych zasad do rozpuszczalnika i ich soli do rozcieńczonych kwasów pozwala na uzyskanie czystych ekstraktów alkaloidów.

Wyniki otrzymane w naszym laboratorium wykazały, że wyciągi po jednorazowym oczyszczaniu są zanieczyszczone substancjami, które dają osady z odczynnikami alkaloidowymi, a mianowicie z kwasem krzemowolframowym i odczynnikiem jodortęciowym. Wyniki te ilustrują tablice X i XI

T a b l i c a X

Zawartości alkaloidów oznaczonych metodą Wierchowskiego
w zależności od oczyszczania

| Material | % zaw. alkal. oznaczony przez Wierchowskiego | % zaw. alk. oznaczony w naszej pracowni | | | Różnica w % |
|-----------------------|--|---|-------|-------|-------------|
| | | Oczyszczanie | | | |
| | | 1x | 2x | 3x | |
| Ł. żółty Przebędowo 8 | 0,065 | 0,060 | 0,035 | 0,034 | 41,6 |
| Ł. żółty Puławski 21 | 0,054 | 0,050 | 0,019 | 0,020 | 62,5 |
| Ł. żółty* Nr 434 | 0,150 | 0,150 | 0,053 | 0,050 | 64,6 |
| Ł. żółty* Nr 252 | — | 0,108 | 0,030 | 0,030 | 72,3 |
| Ł. żółty* Nr 401 | — | 0,28 | 0,056 | 0,056 | 80,0 |
| Ł. żółty G. 16 | — | 0,062 | 0,029 | 0,030 | 69,4 |

* Lubiny te pochodzą ze Stacji Chemiczno-rolniczej w Warszawie.

Z tablicy X wynika, że dwukrotne oczyszczenie obniża wyniki nawet czterokrotnie, podczas gdy dodatkowe trzecie oczyszczenie wyciągów na uzyskane wyniki nie wpływa.

Z tablicy XI wynika, że ekstrakty alkaloidowe oczyszczone tylko jeden

raz, również przy zastosowaniu naszej metody, dają zbyt wysokie wyniki. Jednorazowe oczyszczanie wyciągów jest przeto nie wystarczające i należy zawsze stosować oczyszczanie dwukrotne, niezależnie od wyboru metody analizy ilościowej.

Tablica XI

Wyniki zawartości alkaloidów metodą opisaną w zależności od oczyszczania (Lubin biały)

| Oczyszczanie | ml 0,005 Na ₂ S ₂ O ₃ | | Różnica w % |
|--------------|--|---------|-------------|
| | Zużyto | Średnia | |
| 1x | 2,35 | 2,36 | 2,35 |
| 2x | 1,76 | 1,72 | 1,74 |
| 3x | 1,72 | 1,78 | 1,75 |

PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO IŁOŚCIOWEJ ANALIZY ALKALOIDÓW

1 do 2 g (w zależności od zawartości alkaloidów) mączki lubinowej przesianej przez sito o średnicy otworów 0,075 mm rozciera się w moździerzu o średnicy około 8 cm z 1 ml wody, następnie dodaje się w 3 porcjach około 2 g bezwodnego węglanu sodowego i uciera się aż do powstania suchego sypkiego proszku (około 5 minut). Zawartość moździerza przenosi się ilościowo przez mały lejek do suchego 50 ml cylindra ze szczelnie doszlifowanym korkiem, dolewa się 30 ml chloroformu i wytrząsa przez 30 minut na wstrząsarce. Zawartość cylindra przenosi się na nuczę G-3 i sączy przy użyciu pompy wodnej, umieszczając wewnątrz kolby ssawkowej o pojemności 300 ml probówkę o średnicy około 25 mm i długości około 130 mm, która utrzymuje się w pozycji pionowej przez nóżkę nuczcy. Cylinder i osad na nuczcy przemywa się 2 razy około 5 ml chloroformu. Wyciąg chloroformowy oraz chloroform z przemycia osadu przenosi się do 100 ml kolbki Erlenmeyera ze szkła jenajskiego, dolewa się 2 ml 0,1 n kwasu solnego i oddestylowuje chloroform na łaźni wodnej. W kolbce pozostają zanieczyszczenia w postaci żółtego osadu o mazistej konsystencji oraz chlorowodorki alkaloidów w roztworze. Do kolbki dodaje się 10 ml eteru naftowego, w którym zanieczyszczenia ulegają rozpuszczeniu. Zawartość kolbki przenosi się ilościowo do rozdzielacza o pojemności 100 ml. Kolbkę przemywa się przy pomocy 5 ml eteru naftowego, 5 ml 0,1 n kwasu solnego i kilka ml wody. Zawartość rozdzielacza wytrząsa się i warstwę wodną przenosi się do drugiego rozdzielacza. Jeżeli warstwa wodna nie jest klarowna, należy przesączyć przez sączek z miękkiej bibuły filtracyjnej umieszczony w lejku na drugim rozdzielaczu. Eter naftowy ekstrahuje się w sumie trzy-

krotnie ($3 \times$ po 5 ml 0,1 n kwasu solnego). Wodny wyciąg alkaloidów alkalinizuje się 5 ml 10% węglanu sodowego i wyciąga do 5 ml chloroformu. Ekstrakcję chloroformem powtarza się jeszcze 2 razy. Wyciągi chloroformowe (15 ml) zbiera się ponownie do kolbki, dolewa się 2 ml wody i całkowicie oddestylowuje chloroform na łaźni wodnej. Do kolbki dodaje się jak wyżej 2 razy po 5 ml eteru naftowego, 5 ml 0,1 n kwasu solnego i przenosi ilościowo do rozdzielacza. Ekstrakcję 5 ml kwasu powtarza się jeszcze dwukrotnie. W odróżnieniu od pierwszej ekstrakcji eteru naftowego kwasem, przy drugiej ekstrakcji dodawany kwas musi być dokładnie odpipetowany, gdyż roztwór alkaloidów do analizy musi mieć odczyn obojętny. Wodny wyciąg alkaloidów z rozdzielacza zbiera się do zlewki o pojemności 100 ml i odparowuje ślady eteru naftowego na łaźni wodnej. Płyn zubożętnia się dokładnie przy pomocy 3 ml 0,5 n wodorotlenku sodowego. Jeżeli kwas i wodorotlenek nie są ściśle mianowane, przed zubożętnieniem należy je wobec siebie zmiareczkować i dodać ilość wodorotlenku odpowiadającą 15 ml użytego kwasu. Płyn przenosi się ilościowo do kolbki miarowej i uzupełnia do kreski. Do analizy łubinów słodkich należy użyć 2 g łubinu, a wyciąg do analizy uzupełnić do 25 ml. Do analizy pobierać po 2 ml roztworu. Do analizy łubinów gorzkich bierze się 1 g mączki, a rozcieńczenia wyciągów stosuje się odpowiednio większe (50—100 ml).

Dalszy przebieg analizy opisany jest dla łubinów żółtych na stronie 200, a dla łubinów białych i wąskolistnych na str. 205

Wyniki analiz łubinów żółtych, białych i wąskolistnych umieszczone są w tablicy XII i XIII.

Obliczenie zawartości w % na suchą masę materiału

$$\% \text{ alkaloidy} = \frac{a \cdot b}{c \cdot 10\,000}$$

gdzie

a = ilość alkaloidów

$$b = \frac{\text{rozcieńczenie}}{\text{ml użyte do analizy}}$$

c = ilość gramów materiału użytego do analizy

Przykład: do analizy użyto 2 g mąki łubinowej, wyciąg rozcieńczonego do 25 ml, do analizy pobrano po 2 ml. Sparteiny wykryto 28,5 γ , lupininy 8 γ .

$$\% \text{ sparteiny} = \frac{28,5 \cdot 12,5}{2 \cdot 10\,000} = \frac{366,25}{20\,000} = 0,018$$

$$\% \text{ lupininy} = \frac{8 \cdot 12,5}{2 \cdot 10\,000} = \frac{100}{20\,000} = 0,005$$

$$\% \text{ sumy alkaloidów} = 0,018 + 0,005 = 0,023\%$$

Tablica XII
 Zawartość alkaloidów w nasionach łubinów żółtych

| Materiał | % alk. wg Wierzchowskiego | Próba | | ml 0,005 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ | | Wykryto w % | | | Lupinina: sparteina | Różnica w % w porównaniu z wynikiem Wierzchowskiego | |
|----------------|---------------------------|-------|---------------|--|--------------|--------------|-----------|-------|---------------------|---|------|
| | | g | rozcieńczenie | ml do analizy | suma spart. | lupinina | sparteina | suma | | | |
| Nr 100 | — | 2 | 50 | 1 | 3,75 3,82 | 1,47 1,39 | 0,099 | 0,127 | 0,226 | 1/1,28 | — |
| Górka Narodowa | 0,165 | 2 | 25 | 2 | 2,95 3,05 | 1,17 1,20 | 0,019 | 0,026 | 0,045 | 1/1,37 | 72,7 |
| Osiny Weiko | 0,197 | 2 | 25 | 2 | 3,98 3,90 | 1,23 1,15 | 0,031 | 0,027 | 0,058 | 1/0,90 | 70,6 |
| G-20 | 0,121 | 2 | 25 | 2 | 1,38 1,44 | 0,81 0,80 | 0,005 | 0,018 | 0,023 | 1/3,6 | 81,0 |
| G-20 | 0,121 | 2 | 25 | 2 | 1,35 1,38 | 0,80 0,79 | 0,005 | 0,017 | 0,022 | 1/3,4 | 81,0 |
| G-20 | 0,121 | 2 | 25 | 2 | 1,44 1,42 | 0,81 0,82 | 0,005 | 0,018 | 0,023 | 1/3,6 | 81,0 |

Tablica XIII
Zawartość alkaloidów w łubinach białych i wąskolistnych

| Materiał | % alk. wg Wierzchowskiego | Próba | | | ml 0,005 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ | | Wykryto w % | | | Lupanina: hydroksylupanina | Różnica w % w porównaniu z wynikami Wierzchowskiego |
|---------------|---------------------------|-------|---------------|---------------|--|--------------|------------------|--------|--------|----------------------------|---|
| | | g | rozcieńczenie | ml do analizy | suma | lupanina | hydroksylupanina | suma | | | |
| Przebędowo 10 | 0,076 | 2 | 25 | 2 | 1,05 1,10 | 0,30 0,31 | 0,006 | 0,0273 | 0,0333 | 1/45,0 | 56,1 |
| Przebędowo 1 | 2,144 | 2 | 25 | 2 | 2,89 2,80 | 0,75 0,82 | 0,016 | 0,062 | 0,078 | 1/3,9 | 45,8 |
| Nr 12 | 1,727 | 1 | 100 | 1 | 3,57 3,61 | 1,61 1,65 | 0,543 | 0,975 | 1,518 | 1/1,79 | 12,1 |
| Kępa 51 | 1,26 | 1 | 100 | 1 | 1,72 1,67 | 0,60 0,59 | 0,196 | 0,600 | 0,796 | 1/3,1 | 36,9 |
| Kępa 50 | 0,49 | 1 | 50 | 2 | 2,45 2,50 | 1,73 1,70 | 0,142 | 0,106 | 0,248 | 1/0,74 | 42,1 |
| Nr 6 | 0,043 | 2 | 25 | 2 | 0,29 0,31 | 0,07 0,08 | — | — | — | — | — |
| Nr 8 | 0,065 | 2 | 25 | 2 | 0,41 0,38 | 0,02 0,03 | — | 0,016 | 0,016 | 0/1 | 74,5 |
| Nr 13 | 1,306 | 1 | 100 | 1 | 1,88 1,92 | 1,27 1,26 | 0,420 | 0,40 | 0,82 | 1/0,85 | 38,0 |
| Nr 13 | 1,306 | 1 | 100 | 1 | 1,86 1,90 | 1,25 1,24 | 0,415 | 0,393 | 0,80 | 1/0,85 | 38,0 |
| Nr 13 | 1,306 | 1 | 100 | 1 | 1,89 1,91 | 1,28 1,25 | 0,420 | 0,40 | 0,82 | 1/0,85 | 38,0 |

Dyskusja

Opisane w literaturze metody oznaczania alkaloidów w łubinach pastewnych przeważnie ograniczają się do analiz sumy alkaloidów. Ze względu na to, że współczynniki dla sparteiny i lupininy w łubinach żółtych oraz dla lupaniny i hydroksylupaniny w łubinach białych i wąskolistnych są różne, a ilościowy stosunek obu alkaloidów jest zmienny w bardzo szerokich granicach (tablica XII i XIII), przeto wszystkie metody oznaczania sumy alkaloidów posiadają co najwyżej wartość orientacyjną. Stosowanie dowolnych współczynników opierając się na „średnim“ stosunku zawartości obu alkaloidów, który jak wynika z pracy W i e r z c h o w s k i e g o, waha się w łubinach żółtych od 1:1,1 do 1:6,9 jest ponadto uproszczeniem o bardzo wątpliwej wartości, ponieważ toksyczność poszczególnych alkaloidów łubinów może być różna, co w metodzie oznaczania sumy nie da się uwzględnić.

Znaczenie przez nas opracowanej metody polega na tym, że umożliwia ona oddzielne oznaczenie alkaloidów zawartych w łubinach pastewnych, przeto unika niedokładności powszechnie stosowanych metod. Błąd opisanej metody nie przekracza $\pm 2\%$ i może być ona stosowana w rozcieńczonych roztworach alkaloidów w stężeniach od 0,001 do 0,005%, podczas gdy w metodach powszechnie u nas stosowanych koncentracja alkaloidów w roztworach nie może wynosić poniżej 0,2%.

Wyniki analiz łubinów pastewnych, a szczególnie „słodkich“ i „półgorzkich“ (0,03 do 0,2%), otrzymane naszą metodą są co najmniej o 50% niższe w porównaniu z metodą Wierzcrowskiego, powszechnie w Polsce stosowaną. Jak wynika z tablicy X i XI, różnice te można wytłumaczyć jedynie niedostatecznym sposobem oczyszczania analizowanych wyciągów. Niezależnie bowiem od stosowanej metody analizy alkaloidów ekstrakty oczyszczane jednorazowo wykazywały zawsze wyniki wyższe od wyciągów oczyszczanych dwukrotnie. Z drugiej strony wyniki analiz ekstraktów oczyszczanych 3 razy nie obniżały się. Nie ulega więc wątpliwości, że jednorazowe oczyszczanie wyciągów jest niewystarczające.

Niewłaściwe oczyszczanie wyciągów alkaloidowych, a co za tym idzie wyniki odbiegające czasem o kilkaset procent od rzeczywistej zawartości alkaloidów w łubinach pastewnych, jest powodem olbrzymich strat gospodarczych. Jak wynika z tablicy XII i XIII, łubiny zdyskwalifikowane jako pasza dla bydła, ponieważ zawierały rzekomo powyżej 0,1% alkaloidów, w zupełności nadawały się do użytku, oczywiście jeżeli toksyczność łubinów zależy wyłącznie od alkaloidów w nich zawartych.

Do ekstrakcji alkaloidów użyto w naszej metodzie czystego chloroformu, nie zaś mieszaniny chloroformu z eterem, a to z tego względu, że regeneracja obu rozpuszczalników po ich oddestylowaniu następuje duże trudności i poważne straty rozpuszczalników. Ilość rozpuszczalnika stosowana

w opisanej metodzie wynosi około 50 ml na analizę, co w porównaniu z powszechnie stosowanymi metodami stanowi zaledwie $\frac{1}{6}$.

Powtarzalność wyników otrzymanych z mączki tego samego łubinu (tablica XII i XIII) na odważkach nie przekraczających 2 g udowadnia, że pobieranie większej ilości materiału do analizy w celu uzyskania "średniej" próby jest niepotrzebne. Poza tym powtarzalność ta wykazuje, że warunki ekstrakcji przez nas opisane gwarantują ilościowe wydobycie alkaloidów z materiału roślinnego.

Stosowane przez nas oczyszczanie wyciągów zapobiega w zupełności powstawaniu emulsji między fazą wodną i fazą rozpuszczalnika, która wybitnie utrudnia przygotowanie wyciągów z nasion łubinu zawierających zazwyczaj duży procent tłuszczów. Przez nas zastosowany eter naftowy w kwaśnym środowisku rozpuszcza zanieczyszczenia i tłuszcze, które przeszły w czasie ekstrakcji do chloroformu. Chlorowodorki alkaloidów są dużo bardziej rozpuszczalne w rozcieńczonych kwasach aniżeli w eterze naftowym, który po trzykrotnej ekstrakcji 0,1 n kwasem solnym nie zawiera więcej śladów alkaloidów.

Wszelkie próby chemicznego oddzielenia lupaniny od hydroksylupaniny, to znaczy alkaloidów białego i wąskolistnego łubinu, nie powiodły się. Wykorzystano więc znane od dawna zachowanie się obu alkaloidów w stosunku do eteru naftowego, w którym przy odpowiednich warunkach hydroksylupanina jest zupełnie nierozpuszczalna, a lupanina rozpuszcza się ilościowo. Koniecznym warunkiem ilościowego rozdziału obu alkaloidów jest zachowanie środowiska bezwodnego. W przeciwnym bowiem razie rozpuszczalna w wodzie lupanina nie przechodzi ilościowo do eteru naftowego, a hydroksylupanina rozpuszcza się nieco w eterze naftowym nasyconym wodą. Zastosowanie bezwodnego węgla sodowego pozwala na ilościowy rozdział lupaniny i hydroksylupaniny.

Opisana metoda umożliwia wykonanie 2 równoległych pełnych analiz alkaloidów w łubinie w ciągu 4 godzin, przy tym błąd analizy nie przekracza $\pm 2\%$.

W pracy posługiwano się sparteiną i lupininą, preparatami firmy Merck, hydroksylupaninę wyizolowano w naszej pracowni w postaci chlorowodoru $B.2HCl.H_2O$ o tt. = $271^{\circ}C$, a lupaninę otrzymano od prof. dra G. R. Clemo.

Prof. drowi K. B a s s a l i k o w i i prof. drowi G. R. C l e m o składamy serdeczne podziękowania za udostępnienie nam czystych preparatów alkaloidów.

Streszczenie

1. Opisano nową jodometryczną mikrometodę oznaczania alkaloidów w łubinach pastewnych.
2. W łubinach żółtych oznacza się tą metodą oddzielnie sparteinę, a lu-

pininę i sparteinę oznacza się jako sumę. Z różnicy obu alkaloidów oznacza się zawartość lupininy w próbie.

3. W łubinach białych i wąskolistnych oznacza się sumę lupaniny i hydroksylupaniny oraz oddzielnie samą lupaninę po uprzedniej ekstrakcji z eterem naftowym. Do tego celu zostały opracowane warunki ilościowej ekstrakcji lupaniny w obecności hydroksylupaniny w środowisku bezwodnym.

4. Metoda zezwala na oznaczenie alkaloidów w stężeniach od 0,001 — 0.005% w granicach od 25 γ do 250 γ .

5. Błąd metody w zastosowaniu do czystych roztworów i do materiału roślinnego nie przekracza $\pm 2\%$.

6. Wykazano, że jednorazowe oczyszczanie alkaloidów jest niewystarczające i opracowano wygodną metodę dwukrotnego oczyszczenia wyciągów alkaloidowych.

7. Wykazano, że powszechnie u nas stosowana metoda oznaczania alkaloidów w łubinach daje wyniki czasem nawet 5 razy większe od rzeczywistej zawartości alkaloidów w nasionach łubinu. Fakt ten dotyczy szczególnie łubinów słodkich i wynika z niedostatecznego oczyszczania analizowanych wyciągów.

8. Ilość zużytych rozpuszczalników w naszej metodzie jest 6-krotnie mniejsza aniżeli w metodach powszechnie stosowanych.

9. Wg opisanej metody 2 wyciągi łubinowe mogą być zanalizowane w 2 powtórzeniach w czasie nie przekraczającym 2 godzin.

10. Dwie kompletne analizy alkaloidów w łubinie mogą być wykonane w 4 godzinach.

LITERATURA

1. Barbacki S., *Łubin*, PWRL, Warszawa 1952.
2. Bauer K. H., *Die organische Analyse*, Leipzig 1950.
3. Bergh G. F., *Arch. d. Pharm.* 1904, 242, str. 416.
4. Clemo G. R., Leitch G. C. *J. of Chem. Soc.*, Londyn 1928, str. 1811.
5. „ Raper R. *J. of Chem. Soc.*, Londyn 1929, str. 1927
6. „ Ramager G. R. *J. of Chem. Soc.* Londyn 1931, str. 437.
7. „ Ramager G. R., Raper R., *J. of Chem. Soc.*, Londyn 1932, str. 2959.
8. „ Morgan W., Raper R., *J. of Chem., Soc.*, Londyn 1935 str. 1743.
9. „ Morgan W., Raper R., *J. of Chem. Soc.*, Londyn 1936, str. 1025.
10. „ Morgan W., Raper R., *J. of Chem. Soc.*, Londyn 1937, str. 965.
11. „ Morgan W., Raper R., *J. of Chem. Soc.*, Londyn 1938, str. 1574.
12. „ Raper R., Short W. S. *J. of Chem. Soc.*, Londyn 1949, str. i 663.
- 12.a „ Raper R., Vipond H. J., *J. of Chem. Soc.*, Londyn 1949, str. i 2095
13. Henry Th. A., *Plant Alkaloids*, London 1950.

14. Galinowsky F., Lupinen-Alkaloide und verwandte Verbindungen, odbitka z *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe* Bd. VIII, 1952, str. 245.
15. Klein G., *Handb. d. Pflanzenanalyse*, Berlin 1933, str. 476.
16. Wierzchowski Z., *Roczniki Nauk Rolniczych* t. 61, 1952, str. 111.

МИКРОМЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЛКАЛОИДОВ В КОРМОВЫХ ЛЮПИНАХ

Содержание

1. Авторами представлен новый иодометрический микро-метод определения содержания алкалоидов в кормовых люпинах.
2. В желтых люпинах этим методом определяется отдельно содержание исключительно спартеина, в то время, как количество люпинина и спартеина, взятых вместе, определяют, как общую сумму алкалоидов. Из полученной разницы между обоими алкалоидами в приведенном опыте определяется содержание люпинина.
3. В белых и узколистных люпинах определяется сперва общую сумму люпинина и гидроксилюпинина, а потом отдельно — самый люпинин, после предварительного экстрагирования при помощи керосинного эфира. С этой целью были разработаны условия количественного экстрагирования люпинина при наличии гидроксилюпинина в безводной среде.
4. Новый метод дает возможность определить алкалоиды в концентрациях от 0,001 до 0,005% в границах от 25 γ до 250 γ .
5. Предел погрешности этого аналитического метода, при применении его к растворам и к растительному материалу, не превышает $\pm 2^0/0$.
6. Было установлено, что однократная очистка алкалоидов недостаточна, вследствие чего был выработан удобный метод двукратной очистки алкалоидных экстрактов.
7. Было доказано, что применяемый до сих пор метод определения алкалоидов в люпинах дает иногда результаты пятикратно превышающие эффективное содержание алкалоидов в семенах люпина. Этот факт встречается особенно часто при анализах сладких люпинов и обоснован недостаточной очисткой анализированных экстрактов.
8. Количество израсходованных по новому методу растворителей шестикратно меньше в сравнении с другими общеприменяемыми методами.
9. Существует возможность произвести новым методом двукратный анализ двух люпиновых экстрактов в течение времени, не превышающим двух часов.
10. Два полных анализа по содержанию алкалоидов в люпине могут быть произведены в течение четырех часов.

NEW MICROMETHOD FOR THE DETERMINATION OF ALKALOIDS IN LUPINS

Summary

1. A new iodometric micromethod for the determination of alkaloids in lupins has been described.

2. In yellow lupins (*L. luteus*) sparteine is separately determined, whereas values for lupinine are calculated after subtraction of sparteine from the sum of sparteine and lupinine.

3. In white and blue lupins (*L. albus* and *L. angustifolius*) firstly the sum of lupanine and hydroxylupanine is determined, followed by a separate determination of lupanine after extraction from petrol ether. To achieve this aim a method for the quantitative extraction of lupanine in the presence of hydroxylupanine has been worked out.

4. The described method permits the determination of alkaloids in concentrations from 0,001 to 0,005% within the limits of 25—250 γ .

5. The method gives quantitative recoveries in pure solutions as well as with plant material with an accuracy of $\pm 2\%$.

6. It was shown that a single purification of alkaloid extracts is insufficient and a suitable method for the purification of extracts has been worked out.

7. It was shown that the usual method applied in our laboratories for the determination of alkaloids in lupins gives results which are sometime as much as 5 times higher than the actual amount of alkaloids in lupin seeds. This applies particularly to lupins of low alkaloid content and the error arises from inadequate purification of extracts.

8. The amount of organic solvents used in our method is 6 times smaller than the amount employed in older methods.

9. According to the above method 2 lupin extracts can be analyzed for alkaloids in duplicate within a period not exceeding 2 hours.

10. 2 complete determinations of alkaloids in lupins can be made within 4 hours.

L. SZARKOWSKA i P. SZAFRAŃSKI

PORÓWNAWCZE BADANIA NAD WYTWARZANIEM KWASU JABŁKOWEGO PRZEZ RÓŻNE SZCZEPY *MYCOBACTERIUM*

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

Kierownik: prof. dr Józef Heller

Kwas jabłkowy został zidentyfikowany i ilościowo oznaczony jako pośredni produkt przemiany materii gruźliczego szczepu ludzkiego H37Rv (E. A. Sym, P. Szafranski 1950 i P. Szafranski 1952). W porównawczych badaniach rodzaju *Mycobacterium* nie należałoby jednak uogólniać zjawisk, poznanych na jednym szczepie, ponieważ różnice pomiędzy szczepami mogą być bardzo znaczne. Przykładem tej sytuacji jest *Myc. tbc. v. bovin. BCG*, gdzie w ramach nawet tego samego szczepu istnieją wyraźne jakościowe różnice metaboliczne. (F. Bernheim, W. E. de Turk, H. Pope 1953). W innym wypadku pewne fragmenty pośredniej przemiany materii mogą być jakościowo wspólne dla wielu szczepów, różniąc się jedynie swym udziałem ilościowym.

Prace ilościowe dotyczące kwasowych produktów dysymilacji u różnych szczepów *Mycobacterium* objęły dotąd tylko kwas szczawiowy (J. Szarkowski 1954) i cytrynowy (Z. Lassota 1954).

Badania nasze miały na celu ilościowe oznaczenie kwasu jabłkowego dla wykazania różnic ewentualnie podobieństw w wytwarzaniu tego kwasu przez różne szczepy *Mycobacterium*.

Część doświadczalna

Kwas jabłkowy oznaczono w pożywkach pobakteryjnych sześciu szczepów *Mycobacterium*. Wybrano zestaw szczepów, obejmujący zarówno szczepy zjadliwe typu ludzkiego, bydłowego i ptasiego, prątki gruźlicy niezjadliwe typu bydłowego oraz kwasooporne saprofity.

Zbadano następujące drobnoustroje:

Mycobact. tbc. v. hom. H37Rv. z Muzeum Instytutu Gruźlicy w Warszawie.

Mycobact. tbc. v. bovin ravenel z Muzeum Instytutu Gruźlicy w Warszawie.

Mycobact. tbc. v. bovin BCG. z Muzeum PZH w Warszawie.

Mycobact. tbc. v. avium Statens Serum Inst. Kopenhaga.

Mycobact. 279 z Muzeum PZH w Warszawie.

Mycobact. phlei z Muzeum PZH w Warszawie.

Bakterie hodowano w dwulitrowych kolbach Erlenmeyera przy dostępie powietrza. Wybrano kolby o dużym dnie w celu uzyskania jak największej powierzchni wzrostu. Prątki wysiewano na 250 ml porcje pożywki DGK (Sym 1949) pozbawionej kwasu cytrynowego, w której cytrynian $Fe NH_4$ zastąpiono siarczanem żelazowym. Wzrost bakterii w przypadku szybko rosnących saprofitów trwał 10 do 15 dni, w wypadku zaś szczepów zjadliwych, wolno rosnących, nawet 15 tygodni. Po wyrośnięciu kożucha oddzielano prątki od pożywki odsączając je przez lejek Schotta 3G4, przemywano wodą destylowaną, suszono w $110^{\circ}C$ do stałej wagi i ważono. Pożywkę pobakteryjną sączono powtórnie przez bakteriologiczny filtr Seitza, zagęszczano na łaźni wodnej do ok. 5 ml i po zakwaszeniu kwasem siarkowym do pH ok. 1 i wymieszaniu z azbestem włóknistym poddawano kilkakrotnej ekstrakcji eterem etylowym. Eter oddestylowywano, a w pozostałości oznaczano kwas jabłkowy metodą Pucher'a G. W., Vickery'ego H. B. i Wakeman'a A. J. (1934), przystosowaną do oznaczania tego kwasu w pożywkach przez P. Szafrąńskiego (1952). Metoda polega na utlenieniu kwasu jabłkowego i oddestylowaniu lotnych produktów do roztworu dwunitrofenylohydrazyny. Wytrącony hydrazon po odsączeniu rozpuszcza się w pirydynie i po wywołaniu barwy roztworem wodorotlenku potasu, kolorymetruje.

Poza oznaczeniami kwasu jabłkowego w pożywkach pobakteryjnych wykonano trzy ślepe próby z pożywkami wyjściowymi, które w przeliczeniu na kwas jabłkowy wynosiły odpowiednio 350 γ , 300 γ i 450 γ . Przyjęto średnią równą 370 γ . Wyniki zestawione są w tablicy.

Omówienie wyników

Spośród przedstawionych w tablicy wyników uwagę zwracają liczby, podane w rubryce szóstej. Są to ilości kwasu jabłkowego w pożywkach pobakteryjnych, przeliczone na 1 g suchych mas badanych drobnoustrojów. Charakterystycznym jest fakt, że liczby te wykazują zgodność w obrębie tego samego szczepu, pomimo znacznych różnic w masach bakteryjnych i są w małym stopniu zależne od wieku kultury. Najdalej idąca zgodność występuje u dwu szczepów saprofitycznych *Myc. phlei* i 279. Nieco mniejsza zgodność w ilości kwasu jabłkowego na 1 g suchej masy bakteryjnej występuje u szczepów wolnorosnących, takich jak *Myc. ravenel*, *avium* i BCG. W wypadku H37Rv otrzymane wyniki zdają się wykazywać odwrotną zależność pomiędzy ilościami kwasu jabłkowego w pożywkach, a wyhodowanymi masami bakteryjnymi. Z powodu jednak małej ilości doświad-

T a b l i c a

| Nr dośw. | Szczep. | Ilość ml po- żywki | Czas wzro- stu w dniach | Ilość prątków w g such. masy | Znaleziony kw. jabłk. w mg | Ilość mg kw jabłk. na 1 g such. masy | Kw. jabłk. w mg % | Przebiegna il. kw. jabłk. na 1 g such. ma- sy bakterii |
|----------|--------------------------|-----------------------|----------------------------|---------------------------------|-------------------------------|--|----------------------|---|
| 1 | <i>Myc. phlei</i> | 250 | 10 | 1,59 | 2,69 | 1,69 | 1,08 | |
| 2 | <i>Myc. phlei</i> | 250 | 12 | 2,57 | 4,85 | 1,81 | 1,94 | 1,70 |
| 3 | <i>Myc. phlei</i> | 250 | 14 | 1,17 | 1,87 | 1,60 | 0,74 | |
| 4 | <i>Myc. 279</i> | 250 | 10 | 3,45 | 10,35 | 3,00 | 4,14 | |
| 5 | <i>Myc. 279</i> | 250 | 15 | 1,67 | 5,25 | 3,14 | 2,10 | 3,08 |
| 6 | <i>Myc. 279</i> | 250 | 10 | 1,25 | 3,65 | 2,92 | 1,46 | |
| 7 | <i>Myc. 279</i> | 250 | 10 | 1,61 | 5,25 | 3,26 | 2,10 | |
| 8 | <i>Myc. tbc v.</i> | | | | | | | |
| | <i>bovin. Ravenel</i> | 250 | 60 | 1,55 | 7,15 | 4,61 | 2,86 | |
| 9 | <i>Myc. tbc v.</i> | | | | | | | |
| | <i>bovin. Ravenel</i> | 250 | 105 | 1,35 | 7,35 | 5,36 | 2,94 | 4,92 |
| 10 | <i>Myc. tbc v.</i> | | | | | | | |
| | <i>bovin. Ravenel</i> | 250 | 59 | 1,98 | 9,45 | 4,79 | 3,78 | |
| 11 | <i>Myc. tbc v. avium</i> | 250 | 52 | 0,670 | 3,85 | 5,74 | 0,26 | |
| 12 | <i>Myc. tbc v. avium</i> | 250 | 54 | 1,03 | 6,75 | 6,55 | 2,70 | 6,15 |
| 13 | <i>Myc. tbc v. avium</i> | 250 | 68 | 0,725 | 4,60 | 6,34 | 1,84 | |
| 14 | BCG | 250 | 37 | 0,970 | 5,75 | 5,92 | 2,30 | |
| 15 | BCG | 250 | 83 | 0,500 | 3,50 | 7,00 | 1,46 | 6,46 |
| 16 | <i>Myc. tbc v. hom.</i> | | | | | | | |
| | <i>H 37 Rv</i> | 250 | 58 | 1,01 | 7,75 | 7,67 | 3,10 | |
| 17 | <i>Myc. tbc v. hom.</i> | | | | | | | |
| | <i>H 37 Rv</i> | 250 | 58 | 0,932 | 9,53 | 10,23 | 3,81 | |
| 18 | <i>Myc. tbc v. hom.</i> | | | | | | | |
| | <i>H 37 Rv</i> | 250 | 42 | 1,49 | 4,44 | 2,92 | 1,76 | |
| 19 | <i>Myc. tbc v. hom.</i> | | | | | | | |
| | <i>H 37 Rv</i> | 250 | 42 | 1,35 | 5,59 | 4,55 | 2,23 | |
| 20 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |

czeń i rozbieżności wyników uzyskane dane nie pozwalają wyciągnąć ostatecznych wniosków.

Dane z kolumny ósmej wskazują, jak dające różnią się zawartością kwasu jabłkowego pożywki powzrostowe badanych szczepów. Różnice te są prawdopodobnie wyrazem współdziałania takich czynników jak szybkość przemiany, równowaga między kwasem jabłkowym i sąsiadującymi z nim metabolitami oraz zdolność dyfuzji z ciała bakteryjnego do podłoża. Wytwarzanie kwasu jabłkowego, szczawowego i cytrynowego oraz wielu innych metabolitów sugeruje istnienie wspólnych fragmentów metabolicznych u rodzaju *Mycobacterium*.

Na zakończenie pragniemy złożyć Panu Prof. drowi J. Hellerowi serdeczne podziękowanie za wskazówki i życzliwe interesowanie się naszą pracą.

Streszczenie

W pracy niniejszej oznaczono kwas jabłkowy w pożywkach pobakteryjnych sześciu szczepów *Mycobacterium*. Uzyskane wyniki wykazują dużą zgodność w obrębie jednego szczepu z wyjątkiem H37Rv. Stwierdzono znaczne różnice w ilości kwasu jabłkowego, przypadającego na 1 g suchych mas bakteryjnych u poszczególnych szczepów.

LITERATURA

1. Bernheim F., de Turk W. E., Pope H., J. Bact. 65, 5, 545, 1953.
2. Lassota Z., Acta Biochim. Pol., 1, 237, 1954.
3. Pucher G. W., Vickery H. B., Wakeman A. J., Ind. and Engineering Analyt. Edition 6, 1934.
4. Szafrański P. i Sym E. A., Gruźlica 3—4, 427, 1950.
5. Szafrański P., Acta Biochim. Pol. 1, 116, 1954.
6. Szafrański P., Gruźlica 6, 769, 1952.
7. Szarkowski J. W., Acta Biochim. Pol. 1, 259, 1954.
8. Sym E. A., Przegląd Epidemiol. 3, 205, 1949.

ОБРАЗОВАНИЕ ЯБЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ ШТАММОМ *MYCOBACTERIUM*

Содержание

Целью вышеприведенной работы было определить яблочную кислоту в по-культурных питательных средах шести штаммов *Mycobacterium*.

Полученные результаты обнаружили большую согласованность в границах одного и того же штамма, за исключением H 37 Rv.

Констатированы значительные различия в количестве яблочной кислоты, соответствующей каждому грамму сухой бактериальной массы определенных штаммов.

COMPARATIVE STUDIES ON THE FORMATION OF MALIC ACID BY
VARIOUS STRAINS OF MYCOBACTERIA

S u m m a r y

In this study malic acid was determined in media used for the cultivation of 6 Mycobacterial strains. Concordant results were obtained for each strain, with the exception of H37Rv. Large differences were found between individual strains as regards the malic acid content per g. of dry bacterial cells.

THE UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS

Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page.

M. ORŁOWSKI* i J. SIMON

MIARECZKOWA METODA OZNACZANIA CHOLESTEROLU

Z Pracowni Chemicznej Zakładu Anatomii Patologicznej Akademii Medycznej
 we Wrocławiu

Kierownik: prof. dr Z. Albert

Oznaczanie cholesterolu nabiera ostatnio coraz większego znaczenia zarówno w badaniach kliniczno-diagnostycznych, jak i naukowych.

Dotychczas opisane metody można podzielić na 4 grupy:

1) wagowa, polega na wytrąceniu cholesterolu digitoniną i wazeniu otrzymanego digitonidu (1, 2);

2) kolorymetryczna, oparta najczęściej na barwnej reakcji Liebermann-Burchard'a, przy czym oznaczenie przeprowadza się wprost albo po uprzednim wytrąceniu cholesterolu digitoniną bądź kwasem pirydynosulfonowym (3, 4);

3) utlenienie wytrąconego digitonidu odczynnikami *Nicloux* (5) i

4) nefelometryczna (6).

Zasada naszej metody polega na wysyceniu bromem podwójnego wiązania między C₅ i C₆ cholesterolu strąconego digitoniną oraz na oznaczeniu cholesterolu na podstawie ilości przyłączonego bromu. Zasada ta sprowadza się więc do oznaczenia liczby jodowej cholesterolu.

W dostępnym nam piśmiennictwie nie znaleźliśmy metody oznaczania cholesterolu opartej na opracowanej przez nas zasadzie.

Największą trudność sprawił wybór odpowiedniego odczynnika bromującego, gdyż uzyskiwane liczby jodowe cholesterolu są różne w zależności od użytego odczynnika, czasu trwania reakcji i od ilości użytego nadmiaru (7). Trudności te polegają na tym, że cholesterol oprócz reakcji przyłączenia daje stosunkowo łatwo reakcję podstawienia, co jest przyczyną błędnych wyników. Zastosowany przez nas odczynnik bromujący, tj. roztwór bromu w alkoholu metylowym nasyconym bromkiem sodu, daje wartości teoretyczne, przy czym uzyskiwane wyniki nie zależą w widocznym stopniu od czasu reakcji ani stosowanego nadmiaru (8, s. 225). Metodą naszą oznaczamy cholesterol zarówno wolny, jak i całkowity. Wyciąg lipidowy z su-

* Asyst. III Kliniki Chorób Wewnętrznych A. M. we Wrocławiu.

rowicy sporządzamy metodą Schoenheimer-Sperry, wolny cholesterol wytrącamy wprost digitoniną, całkowity po uprzednim zmydleniu. Po uwolnieniu osadu digitonidu od towarzyszących mu lipidów rozpuszczamy go w metanolu i zadajemy odczynnikami bromującym. Ilość cholesterolu obliczamy z ubytku bromu oznaczonego przez miareczkowanie $n/200$ roztworem tiosiarczanu sodowego w stosunku do ślepej próby.

Metoda

I. ODCZYNNIKI

1. 1% roztwór digitoniny w 95% etanolu (1 ml tego roztworu wystarcza na wytrącenie 1 mg cholesterolu) (2).
2. Mieszanka etanolu absolutnego i redestylowanego acetonu w stosunku 1 : 1.
3. Eter etylowy uwolniony od nadtlenków i wody (przemyć 10% roztworem siarczynu sodowego, następnie wodą destylowaną, osuszyć bezwodnym chlorkiem wapnia i przedestylować z nad świeżej porcji chlorku wapnia).
4. Mieszanka aceton — eter 1 : 2 (aceton redestylowany, eter oczyszczony jak wyżej).
5. Roztwór wodorotlenku potasu (10 g KOH rozpuścić w 20 ml wody destylowanej).
6. Roztwór kwasu solnego (25 ml stężonego kwasu rozcieńczyć wodą do 100 ml).
7. 1% alkoholowy roztwór fenoltaleiny.
8. Metanol absolutny.
9. Odczynnik bromujący: a) roztwór macierzysty: 1 ml bromu rozpuścić w 100 ml nasyconego roztworu bromku sodu w metanolu; b) roztwór roboczy: 3,5 ml roztworu macierzystego rozpuścić w 100 ml nasyconego roztworu bromku sodu w metanolu. 1 ml tego odczynnika powinien zużyć około 3—3,5 ml $n/200$ tiosiarczanu sodowego. Gdyby odczynnik był słabszy można go wzmocnić roztworem macierzystym.
10. 10% roztwór jodku potasu.
11. 1% roztwór skrobi.
12. $n/200$ tiosiarczan sodu.

II. WYKONANIE

a) Sporządzenie wyciągu lipidowego. Do kolbki miarowej na 25 ml z dotartym korkiem szklanym, zawierającej około 13 ml mieszanki alkohol-aceton, odmierzyć dokładną pipetą 2 ml surowicy.

Przy wlewaniu surowicy mieszać zawartość kolbki i uważać, aby surowica nie zetknęła się z szyjką. Zamieszać zawartość kolbki, aby zapobiec

powstawaniu większych grudek strątu białkowego. Kółbkę zanurzyć w gorącej łaźni wodnej ciągle mieszając aż do zawrzenia zawartego w niej płynu. Ochłodzić do temperatury pokojowej i uzupełnić mieszanką alkohol-aceton do znacznika. Kółbkę zatkać korkiem szklanym, zawartość dokładnie wymieszać. Przesączyć na małym lejku przez bibułę przykrywając lejek szkiełkiem zegarkowym dla uniknięcia parowania rozpuszczalnika.

b) Wytrącenie wolnego cholesterolu. Z przesączu odmierzyć dokładnie 10 ml (tj. 0,8 ml surowicy) do próbówki wirówkowej (najlepiej nadają się próbówki stożkowe) pojemności około 16—18 ml. Dodać 1 ml wody destylowanej, wymieszać dokładnie, używając uprzednio przygotowanej pałeczki szklanej z wyciągniętym i zatopionym końcem. Dodać 1 ml roztworu digitoniny i mieszać dokładnie aż do wystąpienia wyraźnego strątu digitonidu. Wyjąć pałeczkę nie dotykając ścian próbówki ponad poziomem płynu. Probówkę zatkać korkiem i odstawić do następnego dnia. Probówki i należące do nich pałeczki zaopatrzyć w jednakowe znaki, aby w dalszej pracy używać tych samych pałeczek do tych samych próbek. Korki używane do zatykania próbek powinny być dobrej jakości i uprzednio wyekstrahowane eterem oraz alkoholem metylowym. Zaleca się zaopatrzyć je w te same znaki, co próbówki i pałeczki. Dostanie się pyłu korkowego do próbek jest źródłem błędnych wyników. Następnego dnia oddzielić przylegające do ścian próbówki cząsteczki digitonidu używając odpowiedniej pałeczki szklanej. Zatkać korkiem i wirować przez 15 min. przy około 3000 obrotów na minutę. Po odwirowaniu odessać rurką kapilarną płyn znad osadu uważając, aby nie dotknąć nią ścianki próbówki ani nie zmącić osadu. Umieścić w próbówce pałeczkę szklaną i dodawać po ścianie 4 ml mieszanki woda-mieszanka alkohol-aceton (w stosunku 1 ml wody na 5 ml mieszanki), tak aby opłukać nią ścianki próbówki oraz pałeczkę. Wymieszać dokładnie osad pałeczką. Zatkać probówkę korkiem, odwirować i odessać jak podano wyżej. Przemyć osad w ten sam sposób raz 4 ml mieszanki aceton-eter oraz dwukrotnie 4 ml eteru. Po ostatnim płukaniu osuszyć osad z resztek eteru w temperaturze do 30°.

c) Wytrącenie całkowitego cholesterolu. Dać do próbówki wirówkowej 5 kropli roztworu wodorotlenku potasu, a następnie odmierzyć dokładnie 4 ml przesączu (tj. 0,32 ml surowicy). Wymieszać dokładnie pałeczką tak, aby na dnie nie pozostały krople ługu. Umieścić probówkę na 30 minut w łaźni wodnej lub piaskowej o temperaturze $\pm 45^{\circ}$ (4). Po upływie tego czasu ochłodzić probówkę do temperatury pokojowej, dodać 2 ml mieszanki alkohol-aceton, następnie 2—3 kropli 1% roztworu fenolfstaleiny. Wymieszać i zobojętnić roztworem kwasu solnego, dodając jedną kroplę kwasu nadmiaru. Dodać 2 ml wody destylowanej, mieszać do rozpuszczenia się ewentualnie wypadłego chlorku potasu. Dodać 1 ml roztworu digitoniny i mieszać aż wystąpi osad digitonidu. Wyjąć pałeczkę

szklaną, zatkać probówkę korkiem i odstawić do następnego dnia. Osad digitonidu odwirować i płukać identycznie, jak opisano przy wolnym cholesterolu.

d) **Rozpuszczanie osadu.** Osad digitonidu rozpuszczamy w 4 ml metanolu. Metanol należy dodawać kroplami, opłukując dokładnie pałeczkę szklaną oraz ścianki probówki z przylegających do nich cząsteczek digitonidu. Ponieważ osad digitonidu nie rozpuszcza się zbyt łatwo w metanolu (9), należy najpierw w powyższy sposób dodać 1 ml metanolu, osad rozdrobnić pałeczką, a następnie dodawać pozostałą porcję rozpuszczalnika. Dla przyspieszenia rozpuszczenia osadu zanurzyć probówkę w wodzie o temperaturze 60° i mieszać pałeczką. Po rozpuszczeniu osadu unieść pałeczkę nad poziom płynu, splukać ją oraz ścianki probówki 0,5 ml metanolu. Do każdej próbki odmierzyć dokładnie 1 ml odczynnika bromującego, zatkać korkiem i odstawić na około 60 minut. Równocześnie przygotować ślepą próbę: do czystej probówki odmierzyć 4,5 ml metanolu, dodać 1 ml odczynnika bromującego, zatkać probówkę i również odstawić na 60 minut.

e) **Miareczkowanie.** Po upływie czasu bromowania miareczkować mikrobiuretą kolejno wszystkie próby. Po otwarciu probówki dodać 1 ml 10% jodku potasu. Zawartość probówki wypłukać ilościowo 35—40 ml wody destylowanej do kolbki Erlenmeyera pojemności 150—200 ml. Użyć statywu oraz lejka, najlepiej analitycznego. Probówkę oraz lejek splukiwać porcjami używając pipety. Miareczkować mianowanym roztworem n/200 tiosiarczanu sodowego aż do odbarwienia w obecności skrobi jako wskaźnika.

f) **Wyliczenie.** Ilość cholesterolu wyliczamy z różnicy wyników miareczkowania próby badanej oraz próby ślepej. Ponieważ jedna gramocząsteczka cholesterolu przyłącza jedną gramocząsteczkę bromu, ilość cholesterolu wyliczamy przez pomnożenie ilości zużytego bromu przez iloraz z ciężaru drobinowego cholesterolu i bromu:

$$\frac{386,64}{159,83} = 2,419.$$

Ponieważ 1 ml n/200 tiosiarczanu sodowego odpowiada 0,4 mg Br, ilość cholesterolu otrzymamy mnożąc ilość zużytych ml roztworu tiosiarczanu sodowego przez 0,4 następnie przez 2,419. Jest to bezwzględna ilość cholesterolu w badanej próbce. Chcąc otrzymać wynik w mg % mnożymy znaną wartość dla cholesterolu wolnego przez 125, dla całkowitego przez 312,5. Np. próbka ślepa zużyła 3,47 ml n/200 tiosiarczanu sodowego. Probka na oznaczenie wolnego cholesterolu zużyła 3,02 ml n/200 tiosiarczanu sodowego.

Próbka na oznaczenie całkowitego cholesterolu zużyła 2,97 ml n/200 tiosiarcznanu sodowego.

Cholesterol wolny w mg % = $0,45 \times 0,4 \times 2,419 \times 125 = 54,4$ mg %

„ całkowity „ „ = $0,5 \times 0,4 \times 2,419 \times 312,5 = 151$ mg %

Kontrola metody

Oznaczenie cholesterolu przeprowadziliśmy:

- 1) w standardowych roztworach cholesterolu bez uprzedniego wytrącania go digitoniną,
- 2) w standardowych roztworach cholesterolu wytrącając go digitoniną i przeprowadzając oznaczenie w sposób opisany przy surowicy,
- 3) w surowicy z dodatkiem znanej ilości cholesterolu,
- 4) w surowicy.

W pierwszej grupie oznaczeń posługiwaliśmy się 0,1% roztworem cholesterolu w etanolu biorąc 1 ml roztworu na jedno oznaczenie. Oznaczenia wykonywaliśmy seriami po 8 próbek. Dla dokładności nastawialiśmy równocześnie 3 ślepe próby, przyjmując za podstawę obliczeń średnią arytmetyczną z wyników miareczkowania tych prób, mimo że poszczególne wyniki różniły się bardzo nieznacznie. W ośmiu próbkach jednej serii zawierających po 1 mg cholesterolu znaleziono 6 razy po 0,99 mg, a 2 razy po 0,98 mg. W większości serii uzyskiwaliśmy podobne wyniki.

W drugiej grupie oznaczeń używaliśmy tego samego roztworu standardowego. Oznaczenia przeprowadzaliśmy seriami po 6 prób stosując metodę opisaną przy surowicy. Podobnie jak w pierwszej grupie oznaczeń otrzymywaliśmy wyniki prawie zgodne z wartościami teoretycznymi. W jednej np. serii, ilustrującej przeciętne wyniki w sześciu próbkach zawierających po 1 mg cholesterolu, znaleziono raz 0,97 mg, 3 razy 0,98 mg i 2 razy 0,99 mg.

W trzeciej grupie oznaczeń dla sprawdzenia dokładności metody oznaczaliśmy cholesterol w surowicy z dodatkiem różnej znanej ilości cholesterolu. Wyniki uwidacznia tabl. I.

Wyniki zawarte w tabl. II uzyskaliśmy w równoległych próbach na tej samej surowicy.

Największe odchylenie od wartości przeciętnej wynosi przy cholesterolu wolnym 2,6%, przy całkowitym 2,8%.

Z przytoczonych danych wynika, że przy oznaczaniu w roztworach standardowych cholesterolu czystego i jego digitonidu błąd nie przekracza średnio 2%. Wyniki otrzymywane przy surowicy z dodatkiem znanej ilości cholesterolu świadczą, że metodą tą można oznaczać cholesterol ze stosunkowo dużą dokładnością również i w surowicy. Dokładność wyników zależy

oczywiście przede wszystkim od dokładności wykonania i dokładności przyrządów pomiarowych (pipety, biurety).

Opierając się na danych z literatury (2, 10, 8, s. 257) i na doświadczeniach własnych uważamy, że dotychczas używane metody, szczególnie ko-

Tablica I

| Nr próbki | Użyty materiał | Znaleziono w mg | U w a g i |
|-----------|---------------------------------|-----------------|-------------------|
| 1 | 0,8 surowicy | 0,38 | wolny cholesterol |
| 2 | „ | 0,38 | „ „ |
| 3 | „ | 0,37 | „ „ |
| 4 | 0,8 surowicy + 0,2 mg cholest. | 0,57 | „ „ |
| 5 | 0,8 surowicy + 0,4 mg cholest. | 0,76 | „ „ |
| 6 | 0,8 surowicy + 0,5 mg cholest. | 0,86 | „ „ |
| 7 | 0,8 surowicy + 0,5 mg cholest. | 0,87 | „ „ |
| 8 | 0,8 surowicy + 0,5 mg cholest. | 0,87 | „ „ |
| 9 | 0,32 surowicy | 0,49 | całkowity „ |
| 10 | „ | 0,51 | „ „ |
| 11 | „ | 0,50 | „ „ |
| 12 | 0,32 surowicy + 0,2 mg cholest. | 0,7 | „ „ |
| 13 | 0,32 surowicy + 0,4 mg cholest. | 0,88 | „ „ |
| 14 | 0,32 surowicy + 0,5 mg cholest. | 0,99 | „ „ |
| 15 | 0,32 surowicy + 0,5 mg cholest. | 0,98 | „ „ |
| 16 | 0,32 surowicy + 0,5 mg cholest. | 1,0 | „ „ |

Tablica II

| Nr próbki | Cholesterol wolny w mg % | Cholesterol całkowity w mg % |
|-----------|--------------------------|------------------------------|
| 1 | 66 | 196 |
| 2 | 64 | 199 |
| 3 | 64 | 193 |
| 4 | 67 | 202 |
| 5 | 66 | 193 |
| 6 | 65 | 196 |
| średnio | 65,3 | 196,5 |

lometryczne, dają mniej dokładne wyniki niż nasza. Poza tym metoda nasza jest prosta w wykonaniu i nie wymaga specjalnej aparatury, może więc być stosowana w każdej pracowni klinicznej i chemicznej. Metoda ta nadaje się również do oznaczania cholesterolu w wyciągach lipidowych z tkanek i w płynach ustrojowych.

Streszczenie

Opracowano metodę oznaczania cholesterolu we krwi i w innych substratach biologicznych. Metoda opiera się na oznaczaniu cholesterolu na podstawie ilości przyłączonego bromu do C₅ i C₆ w miejscu podwójnego wiązania. Wyniki uzyskane tą metodą są dokładniejsze od wyników uzyskiwanych innymi metodami. Uzyskiwane przez nas wyniki w roztworach standardowych różniły się od teoretycznych przeciętnie o 1,9%. Największa różnica od przeciętnego wyniku przy równoległych oznaczeniach w surowicy wynosiła od 2,6 do 2,8%.

LITERATURA

1. A. Windaus, *Z. f. physiol. Chemie* 65, s. 110, 1910.
2. O. Muhlbock i C. Kaufmann, *Biochem., Z.* 233, s. 222, 1931.
3. A. E. Sobel i J. Drecker, S. Natelson, *J. of Biol. Chem.*, 115, s. 381, 1936.
4. R. Schoenheimer i W. M. Sperry, *J. of Biol. Chem.*, 106, s. 745, 1934.
5. R. Okey, *J. of Biol. Chem.*, 88, s. 367, 1930.
6. O. Muhlbock i A. Kaufmann, *Biochem., Z.* 246, s. 229, 1932.
7. H. Dam, *Biochem., Z.* 152, s. 101, 1924.
8. K. Hinsberg i K. Lang, *Medizinische Chemie* 1938, s. 225, 257, Urban & Schwarzenberg, Berlin.
9. R. Schoenheimer i H. Dam, *Z. f. physiol. Chem.*, 215, 162, 1933.
10. M. K. Polano, *Arch. Dermat.*, 174, s. 417, 1936.
11. W. M. Sperry i M. Webb, *J. of Biol. Chem.*, 187, s. 97, 1950.

ТИТРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХОЛЕСТЕРОЛА

Содержание

Авторами был разработан метод определения количества холестерина в крови и других биологических субстратах.

При помощи этого метода можно определить содержание холестерина на основании количества присоединенного к C₅ и C₆ брома в местах двойной связи. Полученные этим приемом результаты оказываются более обстоятельными, чем результаты полученные другими методами.

Результаты со стандартными растворами, полученные авторами, отличались от таких-же теоретических — отклонением равным в среднем 1,9%. Самое большое отклонение от средней величины всех полученных результатов, при параллельных определениях в сыворотке, составляло 2,6 до 2,8%.

A TITRATION METHOD FOR THE DETERMINATION OF CHOLESTEROL

Summary

A method for the determination of cholesterol in blood and other biological substrates has been devised. This method determines cholesterol on

the basis of the amount of bromine added to C_5 and C_6 at the site of the double bond. The results are more accurate than those obtained by other methods.

Measurements carried out on standard solutions differed from the known values, on the average, by 1,9 per cent. The greatest divergences from average results in parallel determination in serum amounted to 2.6 — 2.8 per cent.

ZOFIA LASSOTA

WYTWARZANIE KWASU CYTRYNOWEGO PRZEZ NIEUSZKODZONE
KOMÓRKI DROBNOUSTROJÓW RODZAJU *MYCOBACTERIUM*

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

Kierownik: prof. dr Józef Heller

Rola kwasu cytrynowego w metabolizmie drobnoustrojów rodzaju *Mycobacterium* nie została dotąd wyjaśniona.

Wiadomo, że dodatek kwasu cytrynowego do pożywek syntetycznych pobudza wzrost na nich szeregu szczepów *Mycobacterium*, włącznie ze szczepami patogennymi (4, 8). Z tego względu większość pożywek syntetycznych, używanych do hodowli patogennych szczepów *Mycobacterium*, zawiera obok glikozy lub glicerolu jako źródła węgla również kwas cytrynowy. Wymienić tu można pożywki Longa i Seibert, Derseta, Lockemanna oraz pożywki Syma oznaczone symbolami NK i DKG. Z pożywek takich kwas cytrynowy jest zużywany przez rosnące *Mycobacteria* (18, 17, 4).

Kwas cytrynowy nie zwiększa jednak oddychania zawiesin bakteryjnych *Mycobacterium* (19, 4). Z reguły nie udaje się też uzyskać wzrostu inokulum, szczególnie szczepów patogennych, na pożywkach syntetycznych, w których kwas cytrynowy jest jedynym źródłem węgla (17, 19, 5). Z doświadczeń Syma (17) wynika, że kwas cytrynowy również dla gotowych mas bakteryjnych *Myc. tub. v. hom.* szczep H37Rv nie jest wystarczający jako jedyne źródło węgla. W takich warunkach prątki gruźlicy zachowują się jak w głodzie, następuje ubytek masy bakteryjnej, a iloraz oddechowy wskazuje na oddychanie endogenne. Równocześnie jednak obserwuje się znikanie kwasu cytrynowego z podłoża.

Mechanizm pobudzania wzrostu *Mycobacterii* na pożywkach syntetycznych przez kwas cytrynowy próbowano tłumaczyć w różny sposób. Sym (18) uważał za prawdopodobne, że główna rola kwasu cytrynowego polega na zapoczątkowaniu bądź umożliwieniu przeprowadzenia cyklu kwasów trójkarboksylowych. Pratt (11) natomiast w badaniach nad toksycznością dla *Myc. Phlei* śladowych ilości jonów miedziowych doszedł do wniosku, że kwas cytrynowy detoksykuje środowisko dzięki swej zdolności

do tworzenia niejonizujących kompleksów z miedzią i w ten sposób ułatwia wzrost na nim *Mycobacterii*.

Ostatnio Blakley (2) stwierdził, że uzyskane przez mechaniczne rozłarcie proszku acetonowego szczątki komórek *Myc. Phlei* w obecności DPN wykazują zdolność syntetyzowania kwasu cytrynowego. Substratami tej reakcji są: kwas szczawiooctowy i acetylofosforan, kwas octowy lub kwas pirogronowy jako dawcy fragmentu dwuwęglowego. Zdolność enzymatycznej syntezy kwasu cytrynowego wykazują również niedializowane i dializowane ekstrakty komórkowe *Myc. Phlei*, jednak dawcą fragmentu dwuwęglowego może być w ich przypadku tylko acetylofosforan.

Stwierdzenie obecności kompleksu czynników koniecznych do syntezy kwasu cytrynowego nie jest dowodem, że komórki *Myc. Phlei* wytwarzają ten kwas w toku normalnej przemiany. Celem niniejszej pracy było stwierdzenie:

a) czy komórki *Myc. Phlei* w czasie wzrostu na pożywce syntetycznej wytwarzają kwas cytrynowy,

b) czy zdolność tworzenia kwasu cytrynowego w tych warunkach wykazują również inne szczepy *Mycobacterium*.

Założono przy tym, że kwas cytrynowy może przenikać do pożywki. Pewnym uzasadnieniem tego założenia są prace Szafrąńskiego i Syma (12), którzy stwierdzili obecność w pożywce powzrostowej *Myc. tub. v. hom.* szczepu H37Rv, obecność takich metabolitów, jak kwasy: octowy, szczawioowy i jabłkowy, oraz prace późniejsze nad ilościowym oznaczeniem tych metabolitów (14, 15, 16).

Metody

1. Kwas cytrynowy oznaczano w pożywce mikrometodą kolorymetryczną wg Natelsona, Lugovoya i Pincusa (9). Metoda ta polega na utlenieniu kwasu cytrynowego do pięciobromoacetonu, ekstrahowaniu powstałego pięciobromoacetonu eterem naftowym i następnym kolorymetrycznym oznaczeniu natężenia żółtego zabarwienia, jakie pięciobromoacetone daje z wodnym roztworem siarczku sodu.

Zastosowano opisany przez Meduskiego (7) sposób postępowania przy użyciu tej metody. Do oznaczeń używano $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ cz. rekrytalizowanego oraz oczyszczonej frakcji benzyny lekkiej, wrzącej w zakresie temperatur $90^\circ - 100^\circ\text{C}$. Odbiałczanie okazało się w naszym wypadku zbędne. Zastosowana metoda jest w warunkach naszych doświadczeń stosunkowo wysoko specyficzna (7) a ponadto dostatecznie czuła, dokładna i szybka.

2. Drobnoustroje hodowano na 500 ml pożywki DGK zmodyfikowanej w kolbach Erlenmayera (Jena) o pojemności 1,5 l, w tempe-

raturze 37°C do chwili otrzymania na powierzchni pożywki dobrze wykształconego kożucha bakteryjnego. Czas hodowli zależał od szybkości wzrostu badanego szczepu. Inokulum przy posiewie pobierano eżą bądź z pożywki stałej Leowensteina, bądź z powierzchni hodowli otrzymanej na pożywce DGK zmodyfikowanej.

3. P o ż y w k ę DGK zmodyfikowaną, na której hodowano drobnoustroje, sporządzano w sposób następujący:

w 600 ml wody destylowanej rozpuszczano:

11 g kwasu glutaminowego,

0,5 g KH_2PO_4 ,

0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$,

0,02 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$,

0,03 g $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$,

pH pożywki doprowadzano do wartości 7,2 przez dodanie 1N KOH po czym uzupełniano objętość do 960 ml. Osobno rozpuszczano 40 g glukozy jednowodnej w 40 ml wody destylowanej. Obie składowe pożywki jałowiono osobno w autoklawie w 120°C przez 30 min. Ten sposób jałowienia termicznego pozwala w znacznym stopniu zapobiec powstawaniu ciemno zabarwionych tzw. produktów karmelizacji glukozy. Bezpośrednio przed przesiewem oba płyny zlewano razem, tak że wyżej podane ilości składników odnoszą się do objętości 1 l pożywki.

4. Przygotowanie pożywki do oznaczeń wykonywano następująco: po osiągnięciu odpowiedniego wzrostu odsączano bakterie na zwykłym, miękkim sączku, przemywano je dokładnie wodą destylowaną i wraz z sączkiem suszono w 105°C do stałej wagi. Wagę wyhodowanej masy bakteryjnej ustalano uwzględniając uprzednio oznaczoną wagę sączka.

Przesączoną pożywkę, do której dołączano pierwsze 20 ml wody z przemycia, sączono przez filtr Seitza, a następnie zagęszczano w strumieniu ciepłego powietrza (odparowanie na łaźni wodnej powoduje karmelizację) do konsystencji gęstego syropu.

Zagęszczoną pożywkę zakwaszano stężonym kwasem fosforowym do pH 2. Zakwaszenie kwasem siarkowym jest niewskazane. W tym zagęszczeniu kwas siarkowy powoduje zwęglanie składników organicznych pożywki oraz straty kwasu cytrynowego, prawdopodobnie przyspieszając powstawanie lotnych estrów etylowych kwasu cytrynowego (1). Zakwaszoną pożywkę mieszano z azbestem w celu zwiększenia powierzchni ekstrakcji i ekstrahowano absolutnym alkoholem etylowym na mechanicznej trzęsawce. Ekstrakcję prowadzono trzykrotnie po 1 godzinie, za każdym razem z 50 ml rozpuszczalnika. Jeśli następowało zbijanie się azbestu, grudki rozbijano przez dokwaszenie kwasem fosforowym bądź przez dodanie 1—2 ml wody destylowanej.

Z ekstraktu oddestylowywano następnie alkohol, aż objętość pozostałości w kolbie wynosiła 15—20 ml. Wyekstrahowany materiał podgęszczano ponownie w strumieniu ciepłego powietrza, mieszano z azbestem i po sprawdzeniu pH, które powinno wynosić około 2, ekstrahowano na mechanicznej trzęsawce eterem etylowym. Stosowano cztery 50-ml porcje eteru, wstrząsając z pierwszą porcją przez 3 godziny, a z następnymi trzema porcjami przez 2 godziny z każdą. Wyciąg eterowy przenoszono do kolby destylacyjnej, dodawano około 15—20 ml wody destylowanej i odpędzono eter etylowy. Pozostały wodny roztwór wyekstrahowanych substancji sączone, rozcieńczano do objętości 50 ml i pobierano próbki 2—5 ml, zależnie od stężenia kwasu cytrynowego, do oznaczeń.

Ten sposób przygotowania materiału do oznaczeń pozwala na usunięcie większości nierozpuszczalnych w alkoholu i eterze związków zarówno pierwotnej pożywki, jak też powstających na skutek wzrostu bakterii. Równocześnie przy tych operacjach nagromadzano w stosunkowo małej objętości kwas cytrynowy w ilości oznaczalnej.

W szeregu doświadczeń (tablica I) stwierdzono, że wyżej opisany sposób podwójnej ekstrakcji pozwala na odzyskiwanie dodanego w znanej ilości kwasu cytrynowego w ilości stałej, niezależnej od stężenia glukozy w pożywce.

Wydajność odzyskania jest, przy uwzględnieniu współczynnika podziału kwasu cytrynowego w układzie eter — woda (10), zadowalająca. Maksymalne odchylenie od średniej wynosi $\pm 5,9\%$. Uwzględniając, że stosowana metoda kolorymetryczna oznaczania kwasu cytrynowego daje 5% błędów, można przyjąć, że odzyskanie przy tym sposobie ekstrakcji jest stałe i wynosi 87,4%.

Do wyników otrzymanych kolorymetrycznie zastosowano wobec tego mnożnik 1.15.

Tablica I

Odzyskanie kwasu cytrynowego przy metodzie podwójnej ekstrakcji

| L.p. | Stężenie glukozy w pożywce % | Kwas cytrynowy | | Odzyskanie % |
|--------------------|------------------------------------|--------------------|------------------------|-----------------|
| | | dodano γ | znaleziono γ | |
| 1 | — | 2000 | 1785 | 89,2 |
| 2 | 0,5 | 1500 | 1400 | 93,3 |
| 3 | 0,5 | 1500 | 1285 | 85,7 |
| 4 | 1,0 | 1500 | 1285 | 85,7 |
| 5 | 1,0 | 1480 | 1285 | 86,8 |
| 6 | 2,0 | 1500 | 1335 | 89,0 |
| 7 | 2,0 | 1500 | 1225 | 81,7 |
| Odzyskanie średnio | | | | 87,4 |

T a b l i c a I I

Wytwarzanie kwasu cytrynowego przez komórki drobnoustrojów rodzaju *Mycobacterium* na pożywce płynnej syntetycznej DGK bez kwasu cytrynowego

| L.p. | Nazwa szczepu | Pasaż na poź. DGK bez kw. cytrynowego | Czas hodowli dni | Sucha waga masy bakt. g | Znaleziono kw. cytryn. w 500 ml poź. γ | Stężenie kw. cytrynowego | |
|------|---------------------------------|---|---------------------|-------------------------------|---|--------------------------|---|
| | | | | | | na 1 l pożywki mg | na 1 g su- chej wagi bakterii mg |
| 1. | <i>Mycobact.</i> 279 | 1 | 8 | 2,705 | 1 127 | 2,25 | 0,42 |
| 2. | <i>Mycobact.</i> 279 | 1 | 9 | 4,136 | 862 | 1,72 | 0,21 |
| 3. | <i>Mycobact.</i> 279 | 2 | 10 | 1,716 | 2 070 | 4,14 | 1,21 |
| 4. | <i>Mycobact.</i> 279 | 2 | 10 | 2,750 | 2 587 | 5,17 | 0,94 |
| 5. | <i>Mycobact. Phlei</i> | 1 | 15 | 2,618 | 2 737 | 5,47 | 1,05 |
| 6. | <i>Mycobact. Phlei</i> | 1 | 15 | 2,574 | 1 035 | 2,07 | 0,40 |
| 7. | <i>Mycobact. Phlei</i> | 1 | 17 | 2,365 | 2 886 | 5,77 | 1,22 |
| 8. | <i>Mycobact. Phlei</i> | 1 | 17 | 3,091 | 6 467 | 12,93 | 2,09 |
| 9. | BCG | 1 | 24 | 1,182 | 1 035 | 2,07 | 0,87 |
| 10. | BCG | 1 | 38 | 1,023 | 782 | 1,56 | 0,76 |
| 11. | BCG | 3 | 48 | 0,660 | 862 | 1,72 | 1,31 |
| 12. | <i>Myc. tub. v. bov. Vallée</i> | 1 | 52 | 1,340 | 1 391 | 2 76 | 1,03 |
| 13. | <i>Myc. tub. v. bov. Vallée</i> | 2 | 19 | 1,130 | 1 104 | 2,21 | 0,98 |
| 14. | <i>Myc. tub. v. bov. Vallée</i> | 3 | 22 | 1,310 | 1 150 | 2,30 | 0,88 |
| 15. | <i>Myc. tub. v. hom. H37Rv</i> | 2 | 57 | 1,030 | 3 772 | 7,54 | 3,66 |
| 16. | <i>Myc. tub. v. hom. H37Rv</i> | 3 | 64 | 1 275 | 2 403 | 4,81 | 1,88 |
| 17. | <i>Myc. tub. v. hom. H37Rv</i> | 5 | 53 | 0,803 | 1 644 | 3,29 | 2,05 |

Wyniki i dyskusja

Wytwarzanie kwasu cytrynowego przebadano w czasie wzrostu na pożywce syntetycznej DGK zmodyfikowanej następujących szczepów drobnoustrojów rodzaju *Mycobacterium*:

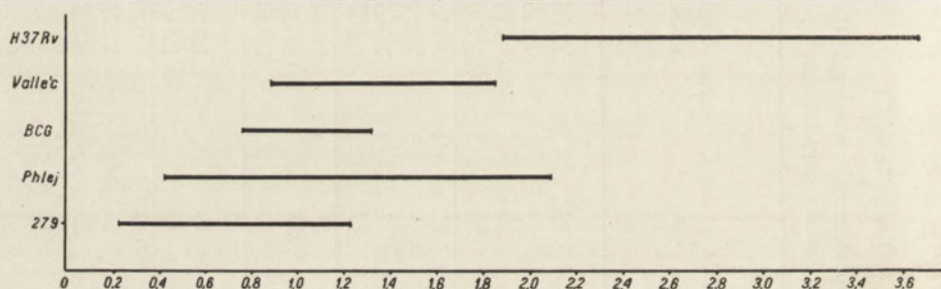
- szcypy saprofityczne szybkoorosnące: *Myc. Phlei* i *Myc. 279*,
- szczep wolnorosnący BCG,
- szcypy patogenne wolnorosnące: *Myc. tub. v. hom.* H37Rv i *Myc. tub v. bov.* Vallée.

Wszystkie szczepy pochodziły z Muzeum Dz. Bakteriologii PZH w Warszawie.

Otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli zbiorczej (tablica II) i na wykresie porównawczym (III).

Tablica III

Wykres granicznych stężeń kwasu cytrynowego w pożywce powzrostowej w mg na 1 g suchej wagi masy bakteryjnej



Otrzymane wyniki wskazują, że nieuszkodzone komórki *Mycobacterium Phlei*, rozwijającego się na pożywce syntetycznej pozbawionej kwasu cytrynowego, wytwarzają kwas cytrynowy i przepuszczają go do podłoża.

Zdolność ta cechuje również wszystkie inne przebadane szczepy *Mycobacterium* tak saprofityczne, jak i patogenne.

Kwas cytrynowy u pięciu badanych szczepów występuje w pożywce w ilościach tego samego rzędu kilku miligramów na 1 g suchej wagi masy bakteryjnej.

Z porównania przedstawionych graficznie dla różnych szczepów (wykres III) wartości granicznych stężeń kwasu cytrynowego w pożywkach powzrostowych w przeliczeniu na 1 g suchej wagi bakterii wynika, że zdolność gromadzenia kwasu cytrynowego jest najsilniej wyrażona u szczepu ludzkiego H37Rv. Nie wiadomo jednak, czy stężenie kwasu cytrynowego w środowisku jest wykładnikiem nasilenia wewnątrzkomórkowego procesu powstawania tego związku. Stężenie w podłożu może zależeć również od

różnej u różnych szczepów przepuszczalności komórki dla tego metabolitu. Różnice ilościowe w obrębie jednego i tego samego szczepu są tak znaczne, że nie można ich położyć na karb błędę metody. Czynniki takie, jak: czas trwania hodowli, ilość wyhodowanej masy bakteryjnej czy ilość przebytych pasaży na pożywce bez kwasu cytrynowego, nie wyjaśniają każdy z osobna zaobserwowanych różnic. Roli tych czynników, a być może również innych, tutaj nie uwzględnionych, nie można jednak zupełnie wykluczyć. Na pewną zależność od ilości masy bakteryjnej wydaje się wskazywać mniejszy rozrzut wyników przeliczonych na 1 g suchej wagi bakterii aniżeli rozrzut po przeliczeniu na jednostkę objętości pożywki.

Mało prawdopodobny wydaje się cytowany na wstępie pracy pogląd Pratta (11), że kwas cytrynowy w pożywce pobudza wzrost na niej *Myc. Phlei* wyłącznie przez wiązanie obecnych w środowisku jonów miedziowych. Jeśliby konsekwentnie uważać ilość kwasu cytrynowego, wydalonego do podłoża przez *Myc. Phlei*, za wyraz czynności detoksykujących, to ilość ta w przypadku wzrostu w identycznych warunkach na dwu porcjach tej samej, a więc zawierającej te same śladowe ilości miedzi, pożywki, powinna być w przybliżeniu taka sama. Wyniki w ten właśnie sposób przeprowadzonych doświadczeń z *Myc. Phlei*, oznaczonych w tablicy II lp. 5 i 6 oraz 7 i 8, przeczą jednak takiemu założeniu.

W przypadku wszystkich szczepów zauważono, że hodowle na pożywce DGK bez kwasu cytrynowego wykazują wzrost nieco opóźniony i mniej obfity w stosunku do szybkości i wydajności wzrostu tych samych szczepów na DGK z kwasem cytrynowym. Obserwacja ta potwierdza cytowane na wstępie dane (4, 8) o pobudzającym wpływie kwasu cytrynowego na wzrost *Mycobacterii*.

Nie uzyskano dotąd bezpośrednich danych potwierdzających pogląd Syma (18), że działanie stymulujące kwasu cytrynowego może polegać na jego roli jako związku pośredniego cyklu Krebsa. Z drugiej jednak strony fakt stymulacji oraz stwierdzenie wytwarzania tego związku przez *Mycobacterie* łącznie skłaniają do przypuszczenia, że u tych drobnoustrojów kwas cytrynowy jest normalnym metabolitem pośrednim.

Istnieją dane przemawiające za tym, że bierze on udział w przemianach cyklu kwasów trójkarboksylowych, bez względu na to czy cykl ten dostarcza komórkom *Mycobacterii* energii, czy też tylko cegiełek budulcowych (6). Do takich danych należy np. wykazanie u *Mycobacterii* prawie wszystkich enzymów cyklu kwasów trójkarboksylowych (5), stwierdzenie zdolności wytwarzania przez nieuszkodzone komórki *Myc. tub. v. hom.* H37Rv kwasu bursztynowego na podłożu syntetycznym oraz wytwarzania kwasu jabłkowego wobec kwasów bursztynowego i glutaminowego podanych jako jedyne źródła węgla (14).

Badania ilościowe nad wytwarzaniem kwasów jabłkowego (15) i szczawiowego (16) przez różne szczepy *Mycobacterium* wykazują, że oba te kwasy, podobnie jak kwas cytrynowy, gromadzą się w podłożu w ilościach tego samego rzędu tzn. kilku miligramów na 1 g suchej wagi masy bakteryjnej. Kwas szczawiowy może być traktowany jako przypuszczalny produkt rozpadu kwasów szczawiooctowego lub szczawiooborsztynowego (3). Niskie stężenia, w jakich te kwasy występują w podłożu, oraz wspomniana już zdolność komórki do ich dalszego wykorzystania, wskazują że nie są one produktami końcowymi przemian, wydalanyymi przez komórkę do środowiska.

Wydaje się, że obecność ich w podłożu jest wyrazem pewnej równowagi dynamicznej między komórką a podłożem. Za takim poglądem przemawiają zwłaszcza wyniki Szafrańskiego (13), który stwierdził, że życiowe usuwanie kwasu jabłkowego z podłoża podwyższa ogólną ilość tego metabolitu znajduwaną poza komórką.

Prof. dr J. Hellerowi pragnę podziękować za krytyczne i pomocne uwagi w toku doświadczeń i w czasie opracowywania zebranego materiału.

Streszczenie

Przebadano 5 szczepów rodzaju *Mycobacterium*: *Myc. Phlei*, *Myc. 279*, BCG, *Myc. tub. v. hom.* H37Rv i *Myc. tub. v. bov.* Vallée. Drobnoustroje hodowano na pożywce syntetycznej, pozbawionej kwasu cytrynowego, a zawierającej oprócz soli mineralnych glukozę jako źródło węgla i kwas glutaminowy jako źródło azotu.

Wykazano, że nieuszkodzone komórki badanych szczepów mają zdolność wytwarzania kwasu cytrynowego. Kwas cytrynowy u wszystkich pięciu szczepów występuje w pożywce w ilościach tego samego rzędu kilku miligramów na 1 g suchej wagi masy bakteryjnej. Różnice w obrębie tego samego szczepu są znaczne i nie dają się powiązać z czasem hodowli, ilością wyhodowanej masy bakteryjnej ani z ilością przebytych pasaży na pożywce bez kwasu cytrynowego.

otrzymane wyniki pozwalają przypuszczać, że kwas cytrynowy nie jest produktem końcowym przemiany materii, a jest normalnym metabolitem pośrednim. Obecność jego w podłożu byłaby wyrazem pewnej równowagi dynamicznej między komórką a środowiskiem. Rola kwasu cytrynowego w metabolizmie *Mycobacterii* może polegać na udziale tego związku w cyklu kwasów trójkarboksylowych.

LITERATURA

1. Beilstein, t. III, s. 556.
2. Blackley R. L., *J. Bact.* t. 64, s. 609, 1952.
3. Bomstein R. A., Johnson M. J., *J. Biol. Chem.* t. 198, s. 143, 1952.
4. Edson N. L., Hunter G. J. E., *Biochem. J.* t. 37, s. 563, 1943.

5. E d s o n N. L., *Bact. Revs.* t. 15, s. 147, 1951.
6. K r e b s, II Congres International de Biochimie, Paris, Symposium sur le Cycle Tricarboxylique, 1952.
7. M e d u s k i J. W., Studia nad przemianą kwasu cytrynowego w mięśniu sercowym, PZWL, Warszawa 1952.
8. M o d e l L. M., Biologia i Biochimia Tuberkuleznych Mikobakterii, Izadt. Akad. Med. Nauk SSSR, Moskwa 1952.
9. N a t e l s o n, S. L u g o v o y J. K., P i n c u s J. B., *J. Biol. Chem.* t. 170, s. 597, 1947.
10. P i n n o w J., *Z. f. Anal. Chem.* t. 54, s. 321, 1915.
11. P r a t t D., *J. Bact.* t. 65, 157, 1953.
12. S z a f r a ń s k i P., S y m E. A., *Gruźlica* t. 18, s. 427, 1950.
13. S z a f r a ń s k i P., *Acta Biochimica Polonica* 1. 116, 1954.
14. S z a r k o w s k a L., *Acta Biochimica Polonica* 1. 249, 1954.
15. S z a r k o w s k a L., S z a f r a ń s k i P., *Acta Biochimica* 1. 225, 1954.
16. S z a r k o w s k i J., *Acta Biochimica Polonica* 1. 259, 1954.
17. S y m E. A., *Med. Dośw. i Społ.* t. 25, s. 295, 1947.
18. S y m E. A., *Przegl. Epidemiol.* t. 3. s. 205, 1949.
19. Y o u m a n s G. P., Y o u m a n s A. S., *J. Bact.* t. 65, s. 96, 1953.

ОБРАЗОВАНИЕ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ КЛЕТКАМИ *MYCOBACTERIUM*

С о д е р ж а н и е

Приводятся результаты изучения пяти штаммов вида *Mycobacterium*: *Myc. Phlei*, *Myc. 279*, *BCG*, *Myc. tbc. v. hom. H. 37 Rv.* и *Myc. tbc. v. bov. Vallée*. Микробы были культивированы на синтетической питательной среде, не содержащей лимонной кислоты, а вмещающей, кроме минеральных солей, глюкозу — источник углерода и глютаминовую кислоту — источник азота.

Было доказано, что неповрежденные клетки изучаемых штаммов способны продуцировать лимонную кислоту.

Лимонная кислота выступает в питательной среде у всех пяти штаммов в количестве одного и того же ряда, т. е. нескольких мг на 1 г сухого веса бактериальной массы. Разницы в границах одного и того же штамма являются значительными и не находятся в причинной связи как со временем выращивания культур, так и с количеством выращенной бактериальной массы, ни с количеством примененных пассажей на питательных средах, не содержащих лимонной кислоты.

На основании полученных результатов следует допустить, что лимонная кислота не является окончательным продуктом обмена веществ, а лишь нормальным промежуточным метаболитом. Наличие ее в питательной среде следовало бы считать признаком некоторого динамического равновесия между клеткой и ее средой. Роль лимонной кислоты в метаболических процессах *Mycobacterium* сводится к участию ее, как химического соединения в цикле трикарбоксильных кислот.

FORMATION OF CITRIC ACID BY INTACT MYCOBACTERIAL CELLS

S u m m a r y

5 strains of Mycobacteria were examined: *Myc. Phlei*, *Myc. 279*, BCG, *Myc. tub. v. hom. H37Rv* and *Myc. tub. v. bov. Vallée*. The bacteria were cultivated on a synthetic medium deficient in citric acid, and containing in addition to mineral salts, glucose as a source of carbon and glutamic acid as a source of nitrogen. It was demonstrated that intact cells of the strains examined possess the ability of forming citric acid. This acid appears in the medium in quantities of the order of several mg per g. dry bacterial material for all 5 strains. The differences within one strain are marked and are connected neither with the culture time, nor with the quantity of bacterial material obtained and the number of passages on medium deficient in citric acid. The results suggest that citric acid is not an end-product of metabolism but a normal intermediary metabolite. Its presence in the substrate would then represent a certain dynamic equilibrium between the cell and its environment. The role of citric acid in the metabolism of Mycobacteria may be related to its participation in the tricarboxylic acid cycle.

LUDMIŁA SZARKOWSKA

**KWAS BURSZTYNOWY JAKO PRODUKT PRZEMIANY
MYCOBACTERIUM TBC. H37RV**

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

Kierownik: prof. dr Józef Heller

Przemiana pośrednia *Mycobacterium* jest stosunkowo mało poznana, zwłaszcza przemiana szczepów zjadliwych.

Większość stosowanych metod badania sprowadza się do stwierdzenia czynności enzymatycznej przy użyciu wymytych zawiesin, a ostatnio ekstraktów komórkowych. W ten sposób wykazano u *Mycobacterium in vitro* aktywność prawie wszystkich enzymów cyklu kwasów trójkarboksylowych, ale żaden z tych enzymów nie został dobrze scharakteryzowany ani zbadany w wystarczających szczegółach (Edson 1951). Jednakże samo stwierdzenie określonej czynności enzymatycznej nie jest dostatecznym dowodem na to, że dana reakcja enzymatyczna zachodzi przy udziale nieuszkodzonej komórki bakteryjnej. Jednoczesne wykazanie obecności substratu obok enzymu może wskazywać na to, że dany enzym rzeczywiście bierze udział w przemianie komórki. I takie jednak stwierdzenie nie przesądza o ilościowym udziale danej drogi metabolicznej. Dopiero zbadanie kinetyki reakcji może rzucić światło na jej rolę w metabolizmie.

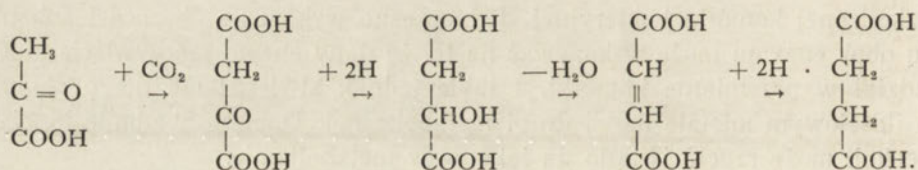
Identyfikacja metabolitów pośrednich będzie uzupełnieniem, a tym samym dalszym, bardziej szczegółowym rozwinięciem wyników, uzyskanych metodami poprzednimi.

Dotąd niewiele jest prac z tej dziedziny. Badania Debiessa (1939) wykazały tworzenie kwasu szczawiowego i bursztynowego przez szczep BCG, rozwijający się na pożywce Soutona, zawierającej jako źródło węgla glicerol. L o b s t e i n (1922) natomiast stwierdził powstawanie kwasu octowego u tego samego szczepu. C a t t a n e o (1934) wyizolował kwas pirogronowy jako dwunitrofenylohydrason z zawiesin *Mycobacterium Phlei* inkubowanych z fosfoglicerolem. S z a f r a ń s k i i S y m (1950) zidentyfikowali w pożywkach pobakteryjnych szczepu zjadliwego H37Rv hodowanego na glukozie kwasy jabłkowy, octowy i szczawiowy. Stwierdzono rów-

niez tworzenie przez *Mycobacterium* kwasu cytrynowego (Blakley 1951, Lassota 1954), aldehydu octowego (Model 1952) oraz w warunkach beztlenowych pewnych ilości kwasu mlekowego (Ebina i Nakamura 1937).

Małą ilość prac tego rodzaju należy przypisać trudnościom, na jakie napotyka identyfikacja metabolitów, głównie ze względu na bardzo małe ilości poszukiwanych substancji, przedostające się do środowiska. Długo panował nawet w literaturze pogląd, że *Mycobacterium* jako doskonale utleniacze spalają całkowicie pobrane substancje odżywcze do końcowych produktów, a więc wody, dwutlenku węgla i amoniaku nie wydalając nic do pożywki.

Kwas bursztynowy jest centralnym metabolitem w przemianie cukrocwów, tłuszczowców i bezazotowych reszt niektórych aminokwasów. Może powstawać bądź przez kondensację dwóch cząsteczek kwasu octowego, zapoczątkowując cykl kwasów dwukarboksylowych, bądź w drodze przemian kwasu pirogronowego poprzez kwas cytrynowy w cyklu kwasów trójkarboksylowych. Stwierdzono również u *Escherichia coli* (Elsden 1938), *Propionibacterium* (Wood i Werkman 1938), *Streptococcus coelicolor* (Cochrane 1953), drożdży (Kleinzeller 1941) i *Aspergillus niger* (Foster i Davis 1948) możliwość powstawania kwasu bursztynowego na drodze odwrócenia cyklu Krebsa, przez kondensację kwasu pirogronowego z przyswojonym dwutlenkiem węgla, co można przedstawić następująco:



Taki przebieg reakcji jest możliwy ze względu na to, że cykl ten u drobnoustrojów nie musi być mechanizmem energiodajnym, a raczej może tylko dostarczać cegiełek do syntezy (Krebs 1952).

Celem niniejszej pracy była identyfikacja kwasu bursztynowego i fumarowego w pożywkach pobakteryjnych zjadliwego szczepu prątka gruźlicy typu ludzkiego H37Rv oraz wykazanie roli kwasu bursztynowego w przemianie. Kwas ten został znaleziony uprzednio przez Debiessa'a u BCG. Z uwagi jednak na duże różnice metaboliczne, występujące między szczepami *Mycobacterium*, nie należałoby uogólniać faktów dotyczących jednego szczepu, a zwłaszcza przenosić ze szczepów niezjadliwych na zjadliwe.

Opis doświadczeń

Użyto szczepu zjadliwego prątka gruźlicy H37Rv. Bakterie hodowano w jednolitrowych kolbach Erlenmeyera na syntetycznej pożywce o następującym składzie:

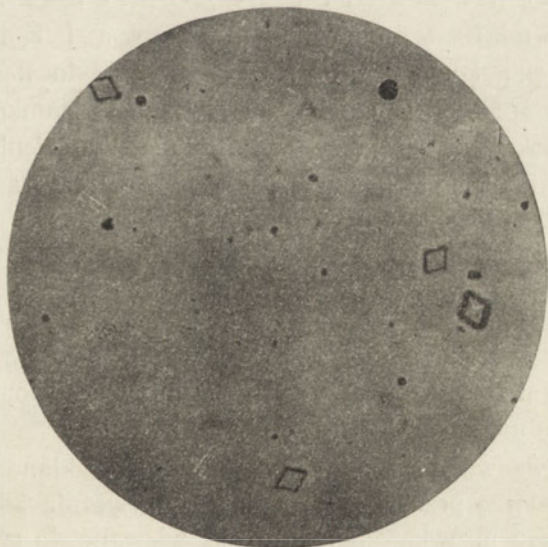
| | |
|---|------------------|
| glukoza | 40 g, |
| kwas glutaminowy | 11 g, |
| KH_2PO_4 | 0,5 g, |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,5 g, |
| $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ | 0,03 g, |
| ZnSO_4 | 0,02 g w litrze. |

pH pożywki doprowadzono do około 7,2 za pomocą wodorotlenku potasu. Jest to zmodyfikowana pożywka DGK (Sym 1949).

Prątki wysiewano w postaci błony wyhodowanej uprzednio na takiej samej pożywce z *inoculum* przeniesionego ze stałego podłoża Petraginiego. Po 4—5 tygodniach otrzymywano obfity kożuch, który oddzielano od pożywki za pomocą sączenia przez bakteriologiczny filtr Seitza.

IDENTYFIKACJA KWASU BURSZTYNOWEGO

Przesączoną pożywkę pobakteryjną odparowywano na łaźni wodnej do konsystencji syropu i po wymieszaniu z azbestem włóknistym i zakwaszeniu kwasem fosforowym do pH 1—2 poddawano kilkakrotnej ekstrakcji ete-



Fot. 1

Kryształy bursztynianu ołowiu otrzymane z frakcji sublimującej w temp. około 130°C pod ciśn. 12-14 mm Hg

rem zmieniając eter co kilka godzin. Z ekstraktu oddestylowywano eter, a pozostałość rozpuszczano w niewielkiej ilości wody i po oziębieniu sączono w celu usunięcia wyekstrahowanych z pożywki substancji tłuszczowych. Przesącz odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość poddawano mikrosublimacji metodą Klein'a i Werner'a (G. Klein 1931 — 1933). Sublimację przeprowadzano pod zmniejszonym ciśnieniem 12—14 mm Hg, uzyskiwanym za pomocą pompy wodnej. Zbierano frakcję sublimującą w temp. około 130°C (temp. sublimacji kwasu bursztynowego). Część przesublimowanej substancji przenoszono na szkiełko przedmiotowe, rozpuszczano w kropli wody, zadawano roztworem octanu ołowiawego i pozostawiano do powolnej krystalizacji, po czym badano pod mikroskopem. Otrzymano charakterystyczne kryształy bursztynianu ołowiu mające kształt dwupiramid czworokątnych (fot. 1).



Rys. 1

Wykonano pomiary kąta ostrego podstawy. Średnia pomiarów wynosi 74,5° i jest w granicach błędu równa wartości odpowiedniego kąta kryształów bursztynianu ołowiu, otrzymanych z czystych roztworów kwasu bursztynowego. Drugą część sublimatu rozpuszczano w kilku kroplach wody i poddawano badaniom chromatograficznym. Stosowano metodę zstępującej chromatografii bibułowej, niewiele różniącą się od ogólnie stosowanych (C o n s d e n, G o r d o n i M a r t i n 1944, O p i e ń s k a - B l a u t h, S a k ł a w s k a - S z y m o n o w a i K a ń s k i 1950). Jako komory chromatograficznej użyto naczynia Dewara o średnicy 10 cm i wysokości 45 cm, zamkniętego od góry pokrywką szklaną, uszczelnioną pierścieniem gumowym.

Atmosferę w komorze nasycano parami kwasu mrówkowego i fenolu. Jako rozpuszczalnika używano fenolu nasyconego wodą. Roztwory wkraplano na paski bibuły Whatmana nr 1 o wymiarach 1 cm × 30 cm. Paski umieszczano w rynience chromatograficznej w kształcie lejka z zatopionym odpływem i dotopioną koncentrycznie rurką, zamocowaną za pomocą korka gumowego w otworze znajdującym się w przykrywce komory, tak że można było napełniać rynienkę przy zamkniętej komorze poprzez koniec rurki znajdującej się na zewnątrz (rys. 1).

Paski bibuły wsuwano do rynienki pod perełki szklane i pozostawiano w zamkniętej komorze przez 4—5 godzin dla nasycenia bibuły parami fenolu, wody i kwasu mrówkowego. Wówczas wlewano do rynienki rozpuszczalnik, zamykano wylot rurki korkiem gumowym i pozostawiano do momentu, aż front rozpuszczalnika zbliży się do końca pasków, co w naszych warunkach trwało 14—15 godzin.

Chromatogramy po wysuszeniu wywoływano 0,04% roztworem błękitu bromo-fenolowego. Wyniki podane są w tabeli I.

Tabela I

Dane dotyczące chromatografii frakcji sublimującej
w temperaturze około 130°C i ciśnieniu około 12–14 mm Hg

| Nr dośw. | Szczep | Rodzaj pożywki | Układ rozpuszczalników | Wskaźnik | Dane dotyczące plam | | | Rf kwasu bursztynowego otrzymane z równoczesnej chromatogr. czystych roztworów |
|----------|--------|---------------------------|------------------------------|-----------------------|---------------------|------|--------------------|--|
| | | | | | X | Y | $Rf = \frac{x}{y}$ | |
| 1 | H37Rv | DGK bez kwasu cytrynowego | fenol — woda — kwas mrówkowy | błękit bromo-fenolowy | 15,7 | 25,5 | 0,62 | 0,59; 0,61; 0,66; |
| | | | | | 17,8 | 26,3 | 0,68 | |
| | | | | | 15,8 | 25,0 | 0,63 | |
| 2 | H37Rv | DGK bez kwasu cytrynowego | fenol — woda — kwas mrówkowy | błękit bromo-fenolowy | 19,0 | 26,4 | 0,72 | 0,65; 0,69; |
| | | | | | 17,5 | 26,4 | 0,66 | |
| | | | | | 18,7 | 26,7 | 0,70 | |
| 3 | H37Rv | DGK bez kwasu cytrynowego | fenol — woda — kwas mrówkowy | błękit bromo-fenolowy | 16,3 | 25,7 | 0,63 | 0,65; 0,60; 0,62; |
| | | | | | 15,9 | 26,0 | 0,61 | |

Dane powyższe są zgodne z wartościami Rf otrzymanymi dla kwasu bursztynowego przez Blauth-Opieńską i innych (1950).

W pożywkach wyjściowych, stosując powyższe metody, nie znaleziono kwasu bursztynowego.

Poszukiwanie kwasu fumarowego

Frację sublimującą w temp. 170–175°C rozpuszczano w kilku kropkach wody. Jedną część poddawano analizie chromatograficznej, drugą umieszczano na szkiełku przedmiotowym, dodawano kryształek chlorku sodu, oraz kroplę azotanu uranylu i przez lekkie ogrzanie zapoczątkowywano krystalizację. Nie otrzymano charakterystycznych kryształów soli sodowo-uranylowej kwasu fumarowego (Klein, *Hanbuch der Pflanzenanalyse*). Nie

otrzymano również pozytywnego wyniku stosując metodę strącania kwasu fumarowego w postaci kompleksu miedziowego (M a r s h a l l, O r t e n i S m i t h 1949), jak również nie otrzymano plam charakterystycznych dla kwasu fumarowego w wyniku analizy chromatograficznej.

ROLA KWASU BURSZTYNOWEGO W METABOLIZMIE PRĄTKA GRUŻLICY

W celu stwierdzenia, czy kwas bursztynowy jest produktem pośrednim w przemianie prątka gruzlicy, podawano prątkom kwas bursztynowy jako jedyne źródło węgla, a następnie badano, czy powstaje z niego kwas jabłkowy.

Prątki hodowano na pożywce DGK pozbawionej kwasu cytrynowego w litrowych kolbach okrągłodennych, zaopatrzonych w urządzenie do podwarstwiania kożucha bakteryjnego, stosowane przez S y m a (1946). Urządzenie to pozwala na ściąganie pożywki powzrostowej oraz wprowadzanie świeżej. Prątki posiewano na 250 ml pożywki w sposób opisany wyżej. Po wyrośnięciu obfitego kożucha ściągano pożywkę powzrostową, przemywano kożuch podwarstwiając go kolejno 250 ml jałowej wody destylowanej na okres 15—20 minut, a następnie 250 ml roztworu zawierającego 0,5 g KH_2PO_4 i 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ w litrze. Następnie pozostawiano kolbę z roztworem w temp. 37°C przez 24 godziny, aby umożliwić prątkom zużycie pozostałych w komórkach substancji odżywczych. Po czym ściągano roztwór, a na jego miejsce wprowadzano 250 ml pożywki, zawierającej jako jedyne źródło węgla kwas bursztynowy, i pozostawiano w 37°C przez 3 dni. Pożywka zawierała 0,6 g kwasu bursztynowego, 0,5 g KH_2PO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,03 g $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, i 0,02 g ZnSO_4 w litrze. pH doprowadzano do około 7,2 za pomocą amoniaku. Przed podwarstwieniem sprawdzano całkowitą usunięcia z kożucha składników pożywki, na której został wyhodowany, oznaczając główny jej składnik — glukozę. Do oznaczeń stosowano kolorymetryczną metodę Mendel'a i Hoogland'a (1950). Po upływie 3 dni odsączano prątki przez lejek Schott'a 3 G4, przemywano dokładnie wodą, suszono do stałej wagi w 110° i ważono. Pożywkę sączonej powtórnie przez bakteriologiczny filtr Seitza, a następnie, po odparowaniu i ekstrakcji eterem, poddawano analizie na zawartość kwasu jabłkowego metodą Pucher'a, Vickery'ego i Wakemana w modyfikacji S z a f r a ń s k i e g o (1952).

Analogiczne doświadczenia wykonano podając prątkom w miejsce kwasu bursztynowego kwas glutaminowy. Po przemyciu kożucha bakteryjnego w sposób opisany wyżej podwarstwiano go pożywką, zawierającą 11 g kwasu glutaminowego, 0,5 g KH_2PO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,3 g $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ oraz 0,02 g ZnSO_4 w litrze. pH nastawiano na około 7,2 za pomocą wodorotlenku potasu. Po 3 dniowej inkubacji w 37°C oznaczano kwas jabłkowy. Poza tym wykonano 3 doświadczenia kontrolne, mające na celu stwierdzenie

nie czy oznaczony ilościowo kwas jabłkowy nie pochodzi z przemiany endogennej. Kontrolne doświadczenia różniły się od właściwych tym, że wymyty kożuch bakteryjny podwarstwiano na przeciąg 3 dni roztworem 0,5 g KH_2PO_4 i 0,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ w litrze. Otrzymane ilości kwasu jabłkowego po odjęciu ślepej próby wynosiły 1100, 1000 i 1200 γ na 1 g suchej masy prątków. Przyjęto średnią 1100 γ .

Próby kontrolne, wykonane z pożywkami wyjściowymi, wynosiły w wypadku pożywki z kwasem glutaminowym 440, 380 i 410 γ . W wypadku pożywki z kwasem bursztynowym 1200, 1000 i 890 γ , zaś z płynem zawierającym kwaśny fosforan potasu i siarczan magnezu 370, 410 i 430 γ w przecięciu na kwas jabłkowy. Przyjęto odpowiednie średnie wyników 410 γ , 1030 γ i 410 γ .

T a b e l a II

Dane dotyczące oznaczeń kwasu jabłkowego w pożywkach pobakteryjnych, zawierających kwas bursztynowy i glutaminowy

| Nr dośw. | Pożywka użyta do podwarstwienia | Ilość pożywki w ml | Wiek hodowli w dniach | Znaleziony kwas jabłkowy w mg | Waga suchych prątków w g | Ilość kwasu jabłk. przypad. na 1 g suchej masy w mg | Ilość mg kwasu jabłk. przypad. na 1 g suchej masy w kontr. (średnia) | Różnica między próbą właściwą a kontrolą w mg | Wzrost ponad kontrolę w % (na 1 g suchej masy) |
|----------|---------------------------------|--------------------|-----------------------|-------------------------------|--------------------------|---|--|---|--|
| 1 | Z kwasem bursztynowym | 250 | 32 | 3,37 | 1,00 | 3,37 | 1,10 | 2,27 | 306 |
| 2 | „ | 250 | 33 | 3,30 | 1,36 | 2,43 | 1,10 | 1,33 | 221 |
| 3 | „ | 250 | 36 | 3,60 | 1,25 | 2,88 | 1,10 | 1,78 | 262 |
| 4 | Z kwasem glutaminowym | 230 | 29 | 4,20 | 1,80 | 2,33 | 1,10 | 1,23 | 212 |
| 5 | „ | 250 | 26 | 5,18 | 1,62 | 3,20 | 1,10 | 2,10 | 291 |
| 6 | „ | 250 | 31 | 3,30 | 1,30 | 2,54 | 1,10 | 1,44 | 231 |

Ekstrakcję pożywki z kwasem bursztynowym ze względu na dobrą jego rozpuszczalność w eterze przeprowadzano w ściśle określonych warunkach, tzn. stosowano 5-krotną ekstrakcję 50 ml porcjami eteru, zmieniając eter co 3 godziny. Wyniki doświadczeń, po uwzględnieniu ślepych prób, zestawione są w tabeli II.

Ilości kwasu jabłkowego, znalezione w próbach właściwych, znacznie przewyższają ilości pochodzące z przemiany endogennej. Różnice w ilościach, przypadających na 1 g suchej masy prątków, można przypisać niejednakowej żywotności kożuchów bakteryjnych.

Dyskusja

W pożywce pobakteryjnej, zawierającej jako źródło węgla glukozę, powstaje w wyniku czynności metabolicznej prątków gruźlicy zjadliwego szczepu H37Rv kwas bursztynowy. Kwas ten został uprzednio stwierdzony przez Debiesse'a u BCG, co wskazywałoby na pewne podobieństwo w metabolizmie tych szczepów.

Kultury powierzchniowe prątków szczepu H37Rv mają poza tym zdolność wytwarzania kwasu jabłkowego na pożywce, zawierającej jako jedyne źródło węgla kwas bursztynowy lub kwas glutaminowy. Fakty te w zestawieniu ze stwierdzeniem u *Mycobacterium* takich zaczynów, jak akonitaza, dehydrogenaza kwasu izocytrynowego, karboksylaza kwasu szczawobursztynowego, dehydrogenaza kwasu α -ketoglutarowego, dehydrogenaza kwasu jabłkowego, fumaraza, dehydrogenaza kwasu bursztynowego (Edson 1951) oraz wyizolowanie takich kwasów, jak jabłkowy, octowy, cytrynowy i pirogronowy mocno przemawiają za tym, że cykl kwasów trójkarboksylowych jest jedną z dróg metabolicznych prątka gruźlicy. Cykl ten, tak powszechny w komórkach zwierzęcych i roślinnych jako mechanizm końcowego utleniania, dostarczający komórkom energię, może spełniać tu co najmniej rolę dostawcy cegiełek budulcowych.

Niestwierdzenie w hodowlach prątków kwasu fumarowego nie wyklucza możliwości jego tworzenia. Z powodu silnie przesuniętej równowagi w kierunku powstawania kwasu jabłkowego kwas fumarowy może praktycznie nie przedostawać się z komórek do środowiska. Również może to być kwestią wybiórczej przepuszczalności otoczki komórkowej.

Dziękuję Panu prof. drowi J. Hellerowi za opiekę i cenne wskazówki w czasie wykonywania pracy.

Zakładowi Fizyki Technicznej Instytutu Chemii Ogólnej w Warszawie składam podziękowanie za wykonanie pomiarów kątów kryształów.

Streszczenie

W pracy niniejszej zidentyfikowano kwas bursztynowy w pożywkach powzrostowych *Mycobacterium tbc.* H37Rv, zawierających glukozę, jako

źródło węgla. Kwas bursztynowy wydzielono drogą mikrosublacji w temp. ok. 130°C pod ciśnieniem 12—14 mm Hg. Z frakcji tej otrzymano charakterystyczne kryształy bursztynianu ołowiu, mające kształt dwupiramid czworokątnych. Tożsamość kryształów potwierdzono, wykonując pomiary kątów. Otrzymano również plamy charakterystyczne dla kwasu bursztynowego w wyniku analizy chromatograficznej przesublimowanej substancji. Kwasu fumarowego nie znaleziono, stosując metodę wytrącania w postaci soli uranylowo-sodowej z frakcji sublimującej w temp. 170—175°C, metodę wytrącania w postaci kompleksu miedziowego oraz analizę chromatograficzną.

Stwierdzono również, że prątki gruźlicy mają zdolność wytwarzania kwasu jabłkowego z kwasu bursztynowego i kwasu glutaminowego, podanych jako jedyne źródło węgla.

LITERATURA

1. Blacley R. L., Proceedings of the University of Otago Medical School Research Society 1951, 29, 3, 27—28.
2. Condsen R., Gordon A. H. i Martin A. J., P. *Biochem. J.*, 1944, 38, 22.
3. Cochran V. W., *J. Bact.*, 1952, 63, 459—471.
4. Cattaneo C., *Biochem. Zeitschrift* 1934, 270, 382—385.
5. Debiesse J., Archives de l'Institut Pasteur de Tunisie 1939, XXVIII. 2. 135.
6. Ebina T. i Nakamura T., 1937. Über den Stoffwechsel der Säurefesten Bazillen. *Tohoku J. Exp. Med.* 31, 60—71.
7. Edson N. L., *Bacteriological Reviews*, 1951. 15. 3.
8. Elsdon S. R., *Biochem. J.*, 1938, 32 187—193.
9. Foster J. W. i Davis J. B., *J. Bact* 1948, 56, 329—338.
10. Klein G., Handbuch der Pflanzenanalyse, Wien 1931—1933.
11. Krebs H. A., II-e Congres Int. de Biochimie. Paris Symposium sur le Cycle Tricarboxylique, 1952, 42.
12. Krebs H. A., Gurin S. i Egleston L. V., *Biochem. J.*, 1952, 51, 5.
13. Kleinzeller A., *Biochem. J.*, 1941, 35, 495—501.
14. Lobstein, E., Recherches biochimiques sur le bacille tuberculeux. Thèse Doct. és Sc. nat., Strasbourg 1922, p. 64.
15. Lassota Z., *Acta Bioch. Pol.*, 1954, 1, 239.
16. Model L. M., Biologia i biochimija tuberkuloznych Mycobakterij, 1952.
17. Marshal L. M., Orten J. M., Smith A. H., *Arch. Bioch.*, 1949, 24 110—113.
18. Mendel B. i Hoogland P. L., *Lancet* 1950, 6618, 16—18.
19. Opińska-Blauth J., Sakławska-Szymonowa O. i Kański M., *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska* 1950, 9, 221.
20. Pucher G. W., Vickery H. B. i Wakeman A. J., *Ind. and Engineering Chemistry Analyt. Edition*, 1934, 6, 769.
21. Szafrański P., *Gruźlica*, 1952, 6. 769.
22. Szafrański P. i Sym E. A., *Gruźlica*, 1950, 3—4, 427.
23. Sym E. A., *Medycyna Dośw. i Społ.*, t. 25, 1946.
24. Sym E. A., *Przegląd Epidemiolog.*, 1949 3, 205.
25. Wood H. G. i Werkman C. H., *Biochem. J.*, 1938. 32, 1262—1271.

ЯНТАРНАЯ КИСЛОТА КАК ПРОДУКТ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ *MYCOBACTERIUM*

С о д е р ж а н и е

В оставшихся по-культурных питательных средах *Mycobacterium tuberculosis* H 37 Rv., содержащих глюкозу, как источник углерода — была обнаружена янтарная кислота.

Янтарная кислота была получена путем микросублимации при температуре около 130° и давлении 12—14 мм Hg. Из этой фракции были получены характерные кристаллы янтарно-кислого свинца, имеющие форму четырехугольных двойных пирамид. Тождественность кристаллов была установлена путем измерения углов. В результате применения хроматографического анализа сублимированной субстанции, были обнаружены пятна, характерные для янтарной кислоты. Наличие фумаровой кислоты не было обнаружено ни методом осаждения ее в виде уранил-натриевой соли из сублимированной при температуре 170—175°C фракции, ни методом осаждения ее в виде купратного комплекса, ни даже путем хроматографического анализа.

Было также установлено, что палочки туберкулеза способны производить яблочную кислоту из янтарной и глутаминовой кислот, являющихся единственным источником углерода.

SUCCINIC ACID AS A PRODUCT OF METABOLISM OF MYCOBACTERIUM TBC. H37Rv.

S u m m a r y

In this study succinic acid has been identified in media in which *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv was cultivated with glucose as source of carbon.

Succinic acid was isolated by microsublimation at about 130°C under 12—14 mm Hg pressure. Characteristic crystals of lead succinate in the shape of square bi-pyramids were obtained from this fraction. Their identity was confirmed by angle measurements. Chromatographic analysis of the sublimated substance gave spots characteristic for succinic acid. Fumaric acid was not found by the method of precipitating the uranyl-sodium salt from the fraction sublimating at 170—175°C, nor by precipitating the cupric complex or by chromatographic analysis.

It has also been shown that the tubercle bacillus possesses the ability of forming malic acid from succinic and glutamic acids, these latter being provided as the only sources of carbon.

JAN W. SZARKOWSKI

**IŁOŚCIOWE OZNACZANIE KWASU SZCZAWIOWEGO JAKO
METABOLITU MYCOBACTERIUM W POŻYWKACH POBAKTERYJNYCH**

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

Kierownik: prof. dr Józef Heller

Tworzenie kwasu szczawiowego stwierdzono u szeregu gatunków pleśni i grzybów, hodowanych na glukozie. Raistrick H. i Clark A. B. (1919) przedstawili drogę powstawania kwasu szczawiowego u *Aspergillus niger* prowadzącą od glukozy poprzez kwas cukrowy α , γ -dwuketoadypinowy, dający w wyniku hydrolizy kwas szczawiooctowy oraz kwas octowy. Kwas szczawiooctowy może ulegać dalszemu rozpadowi do kwasu szczawiowego i octowego, który dalej może utleniać się również do kwasu szczawiowego. Na podstawie prac Butkewitscha W. i Fedoroffa M. W. (1930), Bennet-Clarka T. A. (1933) Bernhauera K. i Slaniny F. (1934) i innych można przypuszczać, że kwas octowy gra decydującą rolę w procesie tworzenia kwasu szczawiowego z cukrów. Bezpośrednia przemiana kwasu octowego w kwas szczawiowy może przebiegać na drodze utleniania poprzez kwasy glikolowy i gliksalowy, które zostały wyosobnione z kultur *Aspergillus niger* zużywających octan przez Bernhauera K. i Scheuer Z. (1932), Challengera F. ze współautorami (1927), i Walkera T. K. ze współautorami (1927). Obecnie uważa się, że kwas szczawiowy powstaje u pleśni z kwasu octowego, ulegającego kondensacji na kwas bursztynowy, który dalej poprzez kwas fumarowy i jabłkowy daje kwas szczawiooctowy, a ten rozpada się — jak podano wyżej — na kwasy szczawiowy i octowy (Butkiewicz W. i Mielnikowa A. A., 1943). Nord F. F. i Vitucci J. C. (1947, 1948) na podstawie swych badań doszli do wniosku, że proces powstawania kwasu szczawiowego z octowego może przebiegać obydwoma drogami, przy czym rola każdej z nich zależy od szczepu grzyba i warunków hodowli. Wehmer C. twierdzi, że ze względu na małą zawartość energii w kwasie szczawiovym (60 kal/mol) w porównaniu np. z glukozą (705 kal/mol) dalsze wykorzystywanie go nie ma większego znaczenia dla syntezy komórkowej. Z tych też względów może być uważany raczej za produkt końcowy przemiany.

Wśród produktów przemiany *Mycobacterium* znaleziono kwas szczawiowy (Debiesse J. 1939, Szafranski P. i Sym E. A. 1950).

Celem doświadczalnej części pracy było ilościowe oznaczenie kwasu szczawiowego w pożywkach pobakteryjnych różnych szczepów *Mycobacterium*, ocena, jaką część produktów dysymilacji stanowi kwas szczawiowy, i wykazanie ewentualnych różnic w metabolizmie tych szczepów.

Część doświadczalna

Oznaczenia kwasu szczawiowego wykonano w pożywkach pobakteryjnych następujących szczepów *Mycobacterium*:

Myc. 279 (z Muzeum PZH w Warszawie)

Myc. phlei (z Muzeum PZH w Warszawie),

Myc. tbc. v. hom. H37Rv (z Muzeum PZH w Warszawie),

Myc. tbc. v. avium (z Muzeum Instytutu Gruźlicy w Warszawie),

Myc. tbc. v. bovin. BCG (z Muzeum PZH w Warszawie).

Bakterie hodowano na pożywce syntetycznej DGK (Sym E. A. 1949) bez kwasu cytrynowego, w której zamiast cytrynianu żelaza użyto siarczynu żelazowego. Kożuch bakteryjny oddzielano od pożywki w drodze sączenia przez lejek Schotta 3G4, następnie bakterie suszono i ważono. Pożywkę pobakteryjną sączono powtórnie przez bakteriologiczny filtr Seitza i poddawano analizie ilościowej na zawartość kwasu szczawiowego.

Pożywkę zagęszczano do objętości około 10 ml, po czym odbiałczano 10 ml 20% kwasu trójchlorooctowego i po półgodzinnym chłodzeniu w lodówce sączono. Przesącz alkalizowano 20% roztworem wodorotlenku sodu do $\text{pH} = 8$, po czym zakwaszano lodowatym kwasem octowym do $\text{pH} = 4$ i wytrącano kwas szczawiowy przez zadanie 5 ml 20% roztworu chlorku wapnia. W celu całkowitego wytrącenia szczawianu pozostawiano roztwór w lodówce przez 24 godziny. Po upływie tego czasu wytrącony osad odsączano i dokładnie przemywano początkowo wodą z niewielką ilością amoniaku, a następnie czystą wodą do całkowitego zaniku reakcji na chlorki. Przemity osad rozpuszczano w 10 ml 20% kwasu siarkowego o temp. 70°C . Roztwór rozcieńczano dwukrotnie wodą, podgrzewano ponownie do temp. 70°C i zadawano mianowanym roztworem n/100 nadmanganianu potasu w ilości zależnej od zawartości kwasu szczawiowego. Po trzech minutach dodawano 4 krople 10% jodku potasu i wydzielony jod miareczkowano n/100 tiosiarczanem sodu.

Wykonano próby kontrolne z pożywkami wyjściowymi dla stwierdzenia, czy w tych warunkach nie wytrąca się osad redukujący nadmanganian potasu. Wartości otrzymane w wyniku trzech analiz w przeliczeniu na kwas szczawiowy wynosiły 0,05; 0,03; 0,06 mg. Przyjęto średnią 0,05 mg. Następnie wykonano próby na odzyskanie kwasu szczawiowego dodanego do pożywki wyjściowej. Wyniki podano w tabeli I.

Tabela I

| Ilość kwasu szczawowego (bezwodnego) dodana do pożywki wyjściowej mg | Średni błąd próby kontrolnej z pożywki wyjściowej w mg kwasu szczawowego (bezwodnego) | Odnaleziony kwas szczawowy (bezwodny) po odjęciu próby kontrolnej mg | Odnaleziony kwas szczawowy (bezwodny) % |
|---|---|---|--|
| 1,20 | 0,05 | 0,98 | 81.7 |
| 3,00 | 0,05 | 2,60 | 86.7 |
| 6,00 | 0,05 | 5,60 | 93.3 |
| 8,00 | 0,05 | 7,75 | 94.6 |

Jak widać z otrzymanych wartości procent błędu przy większych ilościach dodawanego kwasu szczawowego jest mniejszy.

Z orientacyjnych oznaczeń kwasu szczawowego wynikało, że ilości tego kwasu w pożywkach pobakteryjnych mieszczą się w granicach od 1,5 do 3,5 mg.

W celu zmniejszenia błędu oznaczenia stosowano wzbogacanie roztworu badanego przez dodanie 4 mg kwasu szczawowego przed wytrącaniem chlorkiem wapnia.

Znalezione w pożywkach pobakteryjnych ilości kwasu szczawowego zestawiono w tabeli II.

Omówienie wyników

Wszystkie przebadane szczepy tworzą w wyniku czynności metabolicznych kwas szczawowy. Ilości tego kwasu, przypadające na 1 g suchej masy bakteryjnej, wahają się w niedużych granicach w obrębie jednego szczepu, bez względu na dość zróżnicowany okres hodowli. Dane te zgadzają się z danymi dotyczącymi kwasu jabłkowego, otrzymanymi przez L. S z a r k o w s k ą i P. S z a f r a ń s k i e g o (1954), gdzie ilości kwasu jabłkowego, przypadające na 1 g suchej masy bakteryjnej, są zgodne przy dużych różnicach w uzyskanych masach bakteryjnych oraz czasie hodowli.

Ilości kwasu szczawowego, wytwarzane przez poszczególne szczepy, różnią się znacznie między sobą. Różnice te dochodzą do kilkuset procent, co może być odbiciem różnic w przemianie poszczególnych szczepów lub może wynikać z różnych możliwości wydostawania się tego kwasu z komórki bakteryjnej.

Tabela II

| Nr doświadczenia | Szczep | Wiek hodowli dni | Ilość pożywki ml | Waga suchych bakterii g | Znaleziony kwas szczawiowy (bezwodny) mg | Ilość mg kwasu szczawiowego (bezwodnego) przypadająca na 1 g suchych bakterii | Średnia ilość mg kwasu szczawiowego (bezwodnego) przypadająca na 1 g suchych bakterii | Stężenie kwasu szczawiowego (bezwodnego) w mg % |
|------------------|--------------------------|---------------------|---------------------|----------------------------|--|---|---|---|
| 1 | Myc. 279 | 5 | 165 | 1,30 | 1,41 | 1,08 | | 0,85 |
| 2 | Myc. 279 | 10 | 165 | 1,52 | 1,71 | 1,13 | 1,06 | 1,04 |
| 3 | Myc. 279 | 8 | 165 | 1,89 | 1,85 | 0,98 | | 1,12 |
| 4 | Myc. phlei | 10 | 150 | 1,29 | 2,81 | 2,18 | | 1,87 |
| 5 | Myc. phlei | 10 | 150 | 1,40 | 2,65 | 1,89 | 2,00 | 1,26 |
| 6 | Myc. phlei | 10 | 150 | 1,39 | 2,69 | 1,93 | | 1,13 |
| 7 | Myc. tbc.. hom. H37Rv | 24 | 150 | 1,46 | 4,66 | 3,19 | | 3,11 |
| 8 | Myc. tbc.. hom. H37Rv | 41 | 165 | 1,21 | 3,27 | 2,70 | 3,09 | 1,98 |
| 9 | Myc. tbc.. hom. H37Rv | 41 | 165 | 1,10 | 3,74 | 3,39 | | 2,27 |
| 10 | Myc. tbc.. avium | 34 | 165 | 0,91 | 5,50 | 6,04 | | 3,33 |
| 11 | Myc. tbc.. bovin. BCG | 34 | 165 | 0,61 | 4,23 | 6,93 | | 2,56 |

Mała ilość energii, zawarta w kwasie szczawiowym, wskazywałaby na to, że jest on raczej produktem końcowym przemiany. Biorąc to pod uwagę należałoby oczekiwać nagromadzenia się tego kwasu w większych ilościach. Znalezione jednak stosunkowo małe ilości tego kwasu nie wykluczają jego

roli jako produktu pośredniego, podobnie jak kwasu cytrynowego (Lassota Z. 1954) i jabłkowego. Te dwie ewentualności można by pogodzić przyjmując, że z komórki dyfunduje produkt pośredni — kwas szczawiowoocetowy albo szczawiobursztynowy i te dopiero poza komórką odszczepiają kwas szczawiowy.

Panu prof. drowi J. Hellerowi dziękuję za udzielone wskazówki i wykazywane zainteresowanie pracą.

Streszczenie

W pracy niniejszej oznaczono kwas szczawiowy w pożywkach pobakteryjnych następujących szczepów *Mycobacterium*: *Myc. 279*; *Myc. phlei*; *Myc. tbc. hom.* H37Rv; *Myc. tbc. avium*; *Myc. tbc. bovin.* BCG; stosowano metodę wytrącania kwasu szczawiowego w postaci soli wapniowej. Stwierdzono różnice w wytwarzaniu tego kwasu przez różne szczepy dochodzące do kilkuset procent. Otrzymano zgodność w ilościach tego kwasu przypadających na 1 g suchej masy bakteryjnej w obrębie poszczególnych szczepów. Ilości te są rzędu od 1 do 7 mg na gram suchej masy bakteryjnej.

LITERATURA

1. T. A. Bennet-Clark, 1933, *New Phytologist*, 32, 197—230.
2. K. Bernhauer i Z. Scheuer, 1932, *Biochem. Z.*, 253, 11—15.
3. K. Bernhauer i F. Slanina, 1934, *Biochem. Z.*, 264, 109—112.
4. W. Butkewitsch i M. W. Fedoroff, 1930, *Biochem. Z.*, 219, 87—102.
5. W. Butkiewicz i A. A. Mielnikowa, 1943, *Doklady A. N. ZSRR*, 39, 148—150.
6. F. Chalenger ze współautorami *Chemical Activities of Fungi*, Jackson W. Foster 1949. W przekładzie rosyjskim. Izdat. Inostran. Lit. Moskwa 1950, s. 313.
7. J. Debieesse, 1939, *Archives de l'Institut Pasteur de Tunic XXVIII*, N. 2, 135.
8. Z. Lassota, 1954, *Acta Bioch. Pol.*, 1, 239, 1954.
9. F. F. Nordi J. C. Vitucci, 1947, *Arch. Biochem.* 14, 228—241.
10. F. F. Nordi J. C. Vitucci, 1948, *Advances in Enzymol.*, 8, 253—298.
11. H. Raistrick i A. B. Clark, 1919, *Biochem. J.*, 13, 329—344.
12. E. A. Sym, 1949, *Przegląd Epidemiol.* 3, 205.
13. P. Szafranski i E. A. Sym, 1950, *Gruźlica* 18, 427.
14. L. Szarkowska i P. Szafranski, 1954, *Acta Bioch. Pol.*, 1, 225.
15. T. K. Walker ze współautorami *Chemical Activities of Fungi*, Jackson W. Foster., 1949. W przekładzie rosyjskim Izdat. Inostran. Lit., Moskwa 1950, s. 313.
16. C. Welimer, *Chemical Activities of Fungi*. Jackson W. Foster., 1949. W przekładzie rosyjskim. Izdat. Inostran. Lit., Moskwa 1950, s. 303.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ШЦАВЕЛЕВОЙ КИСЛОТЫ В ПО-КУЛЬТУРНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Содержание

В настоящем труде определялось количество щавелевой кислоты, находящейся в по-культурных питательных средах следующих штаммов микобактерий: *Myc. 279*, *Myc. tbc. hom.* H. 37 Rv, *Myc tbc. avium*, *Myc. tbc. berin*, BCG.

Применялся метод осаждения щавелевой кислоты в виде кальциевой соли. При образовании микобактериями щавелевой кислоты были установлены отклонения, достигающие нескольких сот процентов для отдельных штаммов.

Была обнаружена количественная согласованность при образовании щавелевой кислоты, приходящейся на 1 г сухой бактериальной массы в границах определенных штаммов. Количества эти были порядка 1 до 7 мг на один грамм сухой бактериальной массы.

QUANTITATIVE DETERMINATION OF OXALIC ACID AS A MYCOBACTERIUM
METABOLITE IN CULTURE MEDIA

S u m m a r y

In this study oxalic acid was determined in bacterial media following cultivation of the following Mycobacterial strains: *Myc.* 279; *Myc.* phlei; *Myc.* tbc. hom. H37Rv; *Myc.* tbc. avium; *Myc.* tbc. bovin. BCG. The method used involved precipitation of oxalic acid as the calcium salt. Differences in the rate of formation of this acid by various strains amount to several hundred per cent. The measured amounts of this acid per g. of dry bacterial matter agreed within individual strains. These quantities are of the order of 1—7 mg per g. of dry bacterial matter.

B. GRABIANOWSKA

OZNACZANIE AKTYWNOŚCI KATALAZY W MATERIALE ROŚLINNYM

Katedra Biochemii Roślin SGGW w Warszawie

Kierownik prof. dr I. Reifer

W toku badań nad biochemią bulwy ziemniaka okazało się koniecznym opracowanie metody oznaczania aktywności katalazy — enzymu biorącego udział w procesach oksydo-redukcyjnych.

Katalaza jest sumarycznym określeniem grupy enzymów rozkładających nadtlenek wodoru na wodę i tlen [1, 2, 3].

Katalaza występuje zarówno w świecie roślinnym, jak i zwierzęcym. W większych ilościach występuje zarówno w czerwonych ciałkach krwi, jak i w wątrobie, które stanowią surowiec do otrzymania krystalicznej katalazy. W roślinach występuje ona w znacznie mniejszych stężeniach i jest znacznie mniej trwała od katalazy zwierzęcej [1].

Wyniki wstępnych oznaczeń aktywności katalazy roślinnej nie były zgodne między sobą, a wykazywały znaczne rozbieżności zależnie od sposobu homogenizowania oraz od temperatury i długości czasu przechowywania.

Celem niniejszej pracy było znalezienie odpowiedniego środka ochronnego, który zapobiegałby inaktywacji katalazy podczas homogenizowania oraz w czasie przechowywania.

Badania można podzielić na trzy części:

- a) opracowanie odpowiedniej metody oznaczania aktywności katalazy;
- b) opracowanie warunków homogenizacji materiału roślinnego dla ilościowej ekstrakcji katalazy;
- c) badanie wpływu przechowywania w różnych temperaturach na aktywność katalazy w wyciągach roślinnych.

Aktywność katalazy w otrzymanych wyciągach oznaczano według metody opracowanej w punkcie A).

Badania przeprowadzano na bulwach ziemniaka. Materiał pobierano w ten sposób, że z pięciu bulw przygotowywano skośnie cięte plasterki i z każdej brano proporcjonalną część. Naważka wynosiła 2 g. Pobraną próbkę homogenizowano w homogenizatorze „Waring Blendor“ przez 1,5 minuty (3 razy po 30 sekund z przerwami 10-sekundowymi celem uniknięcia zatarcia się aparatu) z ilością płynu proporcjonalną do aktywności katalazy

w materiale wyjściowym. Otrzymany homogenizat miesza się i sączy przez zwilżoną watę, odrzucając pierwsze mililitry przesączu. Przesącz używa się do doświadczeń.

Wyniki doświadczeń przedstawione są w tablicach, w których rubryka „roztwór“ podaje rodzaj płynu o temperaturze pokojowej, użytego przy homogenizowaniu. Rubryka „wynik“ podaje średnią wielkość co najmniej z 3 odczytów wyrażoną w mm^3 tlenu wydzielonego z 750 mikrogramów nadtlenu wodoru w temperaturze 7°C , w czasie 8 minut.

A. OZNACZANIE AKTYWNOŚCI KATALAZY W WYCIĄGACH Z ROSLIN I ZWIERZĄT

Oznaczenie aktywności katalazy opiera się na katalitycznym rozkładzie nadtlenu wodoru. Pomiar polega na oznaczeniu ilości wydzielonego tlenu lub też na odmiareczkowaniu pozostałego nadmiaru nadtlenu wodoru.

Ponieważ jednak miareczkowanie w barwnych roztworach, jakimi są wyciągi roślinne, natrafia na trudności, zastosowano manometryczne oznaczenie wydzielonego tlenu w aparacie Warburga.

ODCZYNNIKI

1. Nadtlenek wodoru: 10 ml 3% obj. H_2O_2 uzupełnić wodą do 200 ml, nastawić jodometrycznie na 1500 mikrogramów H_2O_2 w 1 ml (0,088N), po czym zmieszać dokładnie w stosunku 1 : 1 z M/25 buforem fosforanowym według Sörensena pH 7.

2. Chromianka do mycia naczynek: 50 g $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ rozpuszcza się w 100 ml wody ogrzewając do wrzenia. Po rozpuszczeniu wlewa się do tego roztworu (ostrożnie) około 500 ml stęż. H_2SO_4 (1,84) techn.

3. Smar do kranów: w zimie — „Hahnfett“ Mercka; w lecie — stopić 1 cz. wag. wosku z 1 cz. wag. kalafonii i z 2 cz. wag. wazeliny.

METODA

Do głównej komory naczynka Warburga odpipetowuje się 2 ml sporządzonego wyciągu katalazy. Do bocznej komory naczynka odpipetowuje się 1 ml zbuforowanego nadtlenu wodoru.

Całość, po założeniu do manometrów, umieszcza się w łaźni wodnej o temperaturze 7°C , gdzie przy otwartych kurkach w ciągu 5 do 10 minut następuje wyrównanie temperatury przy wstrząsaniu o częstotliwości 80 do 100 ruchów na minutę i wychyleniu o kąt 30° .

Po wyrównaniu temperatury zamyka się kurki, wprowadza się zawartość komory bocznej do głównej, miesza i obserwuje przebieg reakcji w ciągu 10 minut, odczytując zwyżkę ciśnienia na manometrach po 4, 6, 8 i 10 minutach.

Temperaturę należy w dalszym ciągu utrzymywać na wysokości 7°C , dodając odpowiednie porcje rozdrobnionego lodu. Wstrząsanie kontynuuje się przez 10 minut.

Wyciąg enzymu w doświadczeniu powinien być użyty w takim stężeniu, aby ilości tlenu wydzielonego po 8 minutach wynosiły 25 do 115 mm³. W tych warunkach istnieje proporcjonalność między stężeniem enzymu a ilością wydzielonego tlenu, jak wynika z tablicy I.

Tablica I
Wpływ koncentracji enzymu na ilość wydzielonego tlenu

| Nr | Stężenie wyciągu katalazy | Wynik O ₂ w mm ³ | | | | |
|----|---------------------------|---|--------|--------|---------|---------|
| | | 4 min. | 6 min. | 8 min. | 10 min. | 15 min. |
| 1 | 2,0 g ziemniaka/100ml | 53 | 82 | 104 | 127 | 179 |
| 2 | 1,0 „ „ „ | 25 | 41 | 56 | 68 | 104 |
| 3 | 0,5 „ „ „ | 11 | 20 | 25 | 32 | 54 |
| 4 | 2,0 „ „ „ | 57 | 81 | 114 | 131 | 171 |
| 5 | 1,0 „ „ „ | 27 | 43 | 59 | 72 | 105 |
| 6 | 0,5 „ „ „ | 13 | 20 | 29 | 33 | 52 |
| 7 | 2,0 „ „ „ | 55 | 89 | 112 | 130 | 175 |
| 8 | 1,0 „ „ „ | 27 | 41 | 55 | 70 | 104 |
| 9 | 0,5 „ „ „ | 16 | 20 | 28 | 35 | 56 |

Do obliczeń ilości mm³ wydzielonego tlenu stosuje się odczyty po 8 minutach, uwzględniając wartość ślepych kontrolnych, przygotowanych w identyczny sposób jak badana próba, z tą różnicą, że w miejsce wyciągu użyto 2 ml wody destylowanej. Kontrole przygotowane z inaktywowaną katalazą (po 3 min. wrzenia) dają te same wyniki, co próby ślepe nie zawierające enzymu. Odczytane różnice na manometrach Warburga wahają się w granicach od 1—5 mm³ O₂.

B. OPRAWOWANIE WARUNKÓW ILOŚCIOWEJ EKSTRAKCYI KATALAZY

Wodne wyciągi katalazy z materiału roślinnego wykazują znaczny spadek aktywności w czasie homogenizowania i przechowywania. Należało przeto znaleźć takie środki ochronne, które zapobiegają inaktywacji katalazy.

Jedynym znanym dotychczas środkiem ochronnym był 50% roztwór glicerolu w wodzie. Jednak stosowanie glicerolu w tych ilościach jest zbyt kosztowne (około 50 ml glicerolu na jedną analizę), ponadto, jak wykazują badania podane poniżej, nie chroni on katalazy przed częściową inaktywacją.

W doborze środków ochronnych stosowałam odczynniki normalnie używane do ekstrakcji katalazy z wątroby.

W tablicach II do VI stosowane są różne stężenia wyciągów katalazy, tak że wyniki należy porównywać tylko w ramach każdej tablicy oddzielnie. (Wyciągi katalazy tablic III — V przechowywano przed oznaczeniem około 5 godz. w temp. pokojowej.)

Brown [4] podaje użycie 35% dioksanu do ekstrakcji z wątroby. Równocześnie Tauber i Petit [5] stwierdzają, że dioksan zawiera szkodliwe nadtlarki. Doświadczenie wykazało nieprzydatność dioksanu.

Tablica II
Ekstrakcja katalazy w obecności dioksanu

| Nr | Roztwór | Wynik O ₂ w mm ³ |
|----|-----------------------------|---|
| 1 | Woda z nad lodu | 97 |
| 2 | 30 ml dioksanu + 20 ml wody | -11 |

Kreke i Maloney [6] podają zastosowanie ekstraktu drożdżowego przy badaniu aktywności katalazy. Doświadczenie wykazało, że 3,3% ekstrakt drożdżowy nie wywiera działania ochronnego.

Tablica III
Homogenizowanie w obecności ekstraktu drożdżowego

| Nr | Roztwór | Wynik O ₂ w mm ³ |
|----|-----------------------------|---|
| 1 | 50% roztwór wodny glicerolu | 90 |
| 2 | 3,3% ekstrakt drożdżowy | 14 |

George [7] stosuje przy manometrycznym oznaczaniu w aparacie Warburga 0,1 ml 2% roztworu żelatyny przy sumarycznej objętości pozostałych reagentów 3,3 ml.

Zastosowałam 2% roztwór żelatyny podczas homogenizowania, ale nie uzyskałam żadnego efektu.

Jednocześnie badałam wpływ 1% pirydyny, ale otrzymane wyniki były niższe aniżeli przy użyciu 50% roztworu glicerolu.

Tablica IV
Ekstrakcja katalazy w obecności żelatyny oraz pirydyny

| Nr | Roztwór | Wynik O ₂ w mm ³ |
|----|-----------------------------|---|
| 1 | 50% roztwór wodny glicerolu | 77 |
| 2 | 2% roztwór żelatyny | 4 |
| 3 | 1% „ pirydyny | 32 |

Eumiko Fukuoka [8], Błagowieszczeni i Kologriwowa [9] podają, że węglany, fosforany, kwas fumarowy, bursztynowy i cynamonowy są aktywatorami katalazy z wyciągów zwierzęcych i roślinnych. Ochronnego działania kwasu bursztynowego ani węglanu sodu nie zdołałam potwierdzić.

Tablica V

Ekstrakcja katalazy w obecności kwasu bursztynowego oraz węglanu sodu

| Nr | Roztwór | Wynik O ₂ w mm ³ |
|----|-----------------------|---|
| 1 | 0,5% kwas bursztynowy | 0 |
| 2 | 5,0% węglan sodu | 0 |

Tablica VI

Wpływ fosforanów na aktywność katalazy (homogenizat wodny, fosforany dodano z H₂O₂)

| Nr | Roztwór | Wynik w mm ³ O ₂ |
|----|-----------|---|
| 1 | 1/150 mol | 79 |
| 2 | 1/60 mol | 77 |

Jak wynika z tablicy VI, stężenie buforu fosforanowego o pH = 7 w 2,5-krotnych koncentracjach nie wpływa na aktywność katalazy.

Jo s l y n [10] stosuje węglan wapnia do homogenizowania jarzyn mrożonych. Używa on dużych ilości materiału roślinnego (50 g), 1 g węglanu wapnia i homogenizuje przez 3 minuty uzupełniając wodą do 200 ml, sączy przez sączek gazowy (*gauze-backed cotton milk filter*). Do 10 ml lub mniej tego przesącza dodaje on wody do objętości 43 ml i 5 ml 0,1 M buforu fosforanowego pH = 7, zawierającego 20% glikozy, miesza z około 2 ml 0,01 N nadtlenku wodoru i oznacza miareczkowo nierozłożony H₂O₂.

Dla celów mikrooznaczania katalazy w aparacie Warburga opracowano następującą metodę:

2 g ziemniaczanej bulwy homogenizuje się w suchym homogenizatorze z 100 mg węglanu wapnia, 500 mg glikozy, 98 ml wody o temperaturze pokojowej 3 razy po pół minuty. Homogenizat sączy się przez zwilżoną watę, odrzucając pierwsze ml przesącza. Oznaczenie katalazy dokonuje się według opisu podanego w pierwszej części niniejszej pracy.

Jak wynika z tablicy, węglan wapnia z glikozą działa ochronnie na aktywność katalazy w czasie homogenizowania, natomiast glicerol w czasie homogenizowania nie wydaje się być środkiem ochronnym.

Tablica VII

Ekstrakcja katalazy w obecności węglanu wapnia i glikozy

| Nr | Roztwór | Wynik w mm ³ O ₂ |
|----|--------------------------------|---|
| 1 | 50% roztwór glicerolu w wodzie | 62 |
| 2 | węglan wapnia i glikoza | 113 |

Należy zwrócić uwagę na czystość węglanu wapnia, aby zanieczyszczenia nie powodowały wydzielania się dwutlenku węgla. Z tego samego powodu należy ściśle przestrzegać utrzymania pH = 7,0, bowiem w środowisku bardziej kwaśnym następuje częściowy rozkład węglanu wapnia a w środowisku alkalicznym katalaza jest nietrwała [1].

Próba ślepa powinna zawierać te same stężenia glikozy i węglanu wapnia, jakie zawiera próba badana. W tym celu miesza się 100 mg węglanu wapnia i 500 mg glikozy z tą samą ilością wody, jaka jest stosowana do przygotowania wyciągu z materiału roślinnego, i sączy przez zwilżoną watę. Otrzymany roztwór odpowiednio przechowywany można użyć jako ślepa próbę do serii oznaczeń w przeciągu kilku dni.

W temperaturze pokojowej roztworu glikozy z węglanem wapnia nie można przechowywać. Wskazane jest przechowywanie w lodówce w temp. 2°. Świeże roztwory przygotowane były w naszym laboratorium raz na tydzień.

Bufer fosforanowy dodany do materiału roślinnego przed homogenizacją wyraźnie stabilizuje aktywność katalazy. Bufor dodany do wyciągu wodnego po homogenizacji daje znacznie obniżone wyniki ze względu na straty aktywności katalazy w czasie homogenizacji.

Tablica VIII

Wpływ buforu fosforanowego o pH = 7,0 na aktywność katalazy 2g ziemniaków w 0,025 mol. buforze fosforanowym, pH = 7,0

| Nr | Roztwór | Wynik w mm ³ O ₂ |
|----|---------------------------------|---|
| 1 | Woda | 60 |
| 2 | 25 ml 0,1 M buforu + 73 ml wody | 110 |

• Jak wynika z tablicy VII i VIII, zarówno węglan wapnia z glikozą, jak i bufor fosforanowy pH = 7,0 wykazują działanie ochronne na aktywność katalazy w czasie homogenizowania.

Jak wynika z tablicy IX, bufor fosforanowy stabilizuje katalazę podobnie jak glikoza z węglanem wapnia, natomiast glicerol działania ochronnego nie wykazuje.

Tablica IX

Aktywność katalazy w czasie homogenizowania w obecności różnych środków ochronnych

| Nr | Roztwór | Wynik w n m ³ O ₂ |
|----|---------------------------|--|
| 1 | 50% roztwór glicerolu | 62 |
| 2 | Bufor fosforanowy | 114 |
| 3 | Glikoza z węglanem wapnia | 112 |

W dalszych doświadczeniach wykazano, że czas trwania homogenizowania 3 razy po 0,5 minuty jest wystarczający dla całkowitej ekstrakcji katalazy. Pięciokrotnie dłuższe homogenizowanie nie wpłynęło na zawartość katalazy w wyciągach.

Tablica X

Wpływ czasu homogenizowania na ekstrakcję katalazy

| Nr | Roztwór | Mi- nuty | Wynik mm ³ O ₂ | Mi- nuty | Wynik mm ³ O ₂ |
|----|-------------------------|-------------|---|-------------|---|
| 1 | 50% glicerol | 7,5 | 62 | 1,5 | 64 |
| 2 | bufor fosforanowy | 7,5 | 111 | 1,5 | 113 |
| 3 | glikoza + węglan wapnia | 7,5 | 113 | 1,5 | 112 |
| 4 | woda | 7,5 | 60 | 1,5 | 66 |

Doświadczenia wykonano na materiale homogenizowanym w aparacie „Waring Blendor“, o 12000 obrotów na minutę. Tego typu homogenizatory nie są u nas bardzo rozpowszechnione. Z tego powodu wykonano ekstrakcje w homogenizatorze typu „Cyklon“ o 2000 obrotów, który znajduje się w handlu. Stwierdzono, że wyniki otrzymane w jednym i drugim homogenizatorze są identyczne.

Tablica XI

Porównanie homogenizatorów „Cyklon“ i „Waring Blendor“

| Nr | Homogenizator | Wynik w mm ³ O ₂ |
|----|------------------|--|
| 1 | „Cyklon“ | 115 |
| 2 | „Waring Blendor“ | 115 |

C. PRZECHOWYWANIE WYCIĄGÓW KATALAZY

Oznaczanie katalazy bezpośrednio po sporządzeniu wyciągu jest często niewygodne i zachodzi przeto potrzeba ich przechowywania na okres kilkuna-

stu godzin. W związku z tym przebadano wpływ przechowywania wyciągów roślinnych w różnych temperaturach na aktywność katalazy. Wyniki doświadczeń zebrane są w tablicy XII.

Tablica XII

Wpływ przechowywania wyciągów roślinnych w różnych temperaturach na aktywność katalazy

| Nr | Roztwór | Stężenie wyciągu | Temp. | mm ³ O ₂ po upływie dni | | | |
|----|------------------------------|------------------|-----------------|---|-----|-----|-----|
| | | | | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 1 | fosforan | 2 g/100 ml | 4 ^o | 114 | — | — | 100 |
| 2 | „ | 1 „ „ | 4 ^o | 59 | — | — | 55 |
| 3 | „ | 0,5 „ „ | 4 ^o | 29 | — | — | 27 |
| 4 | glikoza + Ca CO ₃ | 2 „ „ | 4 ^o | 112 | — | 111 | — |
| 5 | „ „ | 1 „ „ | 4 ^o | 55 | — | 55 | — |
| 6 | „ „ | 0,5 „ „ | 4 ^o | 28 | — | 25 | — |
| 7 | glicerol | 2 „ „ | 4 ^o | 62 | — | 36 | — |
| 8 | „ | 0,5 „ „ | 4 ^o | 17 | — | 4 | — |
| 9 | woda | 2 „ „ | 4 ^o | 64 | 30 | — | — |
| 10 | „ | 0,5 „ „ | 4 ^o | 16 | 4 | — | — |
| 11 | fosforan | 2 „ „ | 14 ^o | 109 | 106 | 86 | — |
| 12 | glikoza + Ca CO ₃ | 2 „ „ | 14 ^o | 110 | 108 | 88 | — |
| 13 | glicerol | 2 „ „ | 14 ^o | 62 | 30 | — | — |
| 14 | woda | 2 „ „ | 14 ^o | 56 | 15 | — | — |
| 15 | fosforan | 2 „ „ | 20 ^o | 113 | 89 | — | — |
| 16 | glikoza + Ca CO ₃ | 2 „ „ | 20 ^o | 111 | 90 | — | — |
| 17 | glicerol | 2 „ „ | 20 ^o | 63 | 20 | — | — |
| 18 | woda | 2 „ „ | 20 ^o | 51 | 5 | — | — |

Przedstawione w tablicy XII wyniki wykazują, że w temperaturze pokojowej wszystkie wyciągi ulegają częściowej inaktywacji katalazy, mimo że zawierają odpowiednie środki ochronne, jak również toluen w celu uniknięcia zakażenia przez drobnoustroje. W temperaturze 14^o przechować można tylko roztwory z buforem fosforanowym lub glikozą z węglanem wapnia na okres 1 dnia. W tych warunkach wyciągi wodne i wyciągi z glicerolem wykazują bardzo znaczny spadek aktywności. W temperaturze 4^o można wyciągi zawierające bufor fosforanowy lub węglan wapnia z glikozą przechowywać do 4 dni. Wyciągi glicerolowe i wodne nie mogą być w ogóle przechowywane, ponieważ aktywność katalazy opada gwałtownie zarówno w czasie homogenizowania, jak i przechowywania.

Dyskusja

Należyte wymieszanie wyciągu enzymatycznego z nadtlenkiem wodoru w naczynkach Warburga następuje dopiero po upływie 6 minut od chwili połączenia zawartości komory bocznej z komorą główną. W tym czasie ilości wydzielonego tlenu są wprost proporcjonalne do stężenia katalazy w badanym wyciągu roślinnym. Ta proporcjonalność utrzymuje się w ciągu dalszych 4 minut, po czym może zaniknąć wskutek znacznego spadku stężenia nadtlenu wodoru, szczególnie w tych próbach, które zawierają duże ilości katalazy (patrz tablica I, nr: 1, 4 i 7). Odczyty po 8 minutach okazały się najbardziej powtarzalne i proporcjonalne do ilości enzymu w próbie.

Optymalna temperatura działania katalazy uwarunkowana jest z jednej strony przez wzrastającą z temperaturą szybkość przebiegu reakcji, z drugiej strony przez gwałtowny spadek aktywności enzymu w obecności nadtlenu wodoru. S u m n e r i S o m e r s [11] podają, że optimum temperatury dla katalazy znajduje się między 0° — 10° . Ze względu na to, że w łaźni aparatu Warburga najwygodniej jest utrzymać temperaturę 7° (obniżenie temperatury w lecie napotyka duże trudności), przeto wszystkie analizy przeprowadzono w tej temperaturze. C h a n c e [12] podaje, że w granicach pH od 4—8,5 aktywność katalazy jest stała, poniżej pH 4 katalaza z nadtlenkiem wodoru nie daje aktywnego kompleksu, a powyżej pH 8,5 kompleks ten ulega rozkładowi.

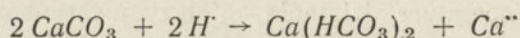
W literaturze podane są bufor fosforanowe o różnych pH i różnych stężeniach, począwszy od pH 5,58 do 7,2 i koncentracjach od 0,0067 M do 0,25 M roztworów (6, 7, 10, 13—21). W niniejszych doświadczeniach stosowano bufor fosforowy o pH 7 i stężeniu 0,0067 molarnym.

Materiały roślinne nie zawierające środków ochronnych wykazują gwałtowny spadek aktywności katalazy w okresie homogenizowania. Obecność węglanu wapnia z glikozą, bądź buforu fosforowego chroni wyciągi przed inaktywacją katalazy. Dodawanie odpowiednich środków ochronnych w postaci buforów jeszcze przed homogenizacją materiału roślinnego jest niezbędne, ponieważ wyciągi wodne i glicerolowe buforowane po sporządzeniu homogenizatu wykazują znacznie niższą aktywność katalazy aniżeli wyciągi sporządzone w obecności buforów. Po zakończeniu niniejszej pracy stwierdziłem, że również A p p l e m a n [20] stosował bufor fosforanowy do rozcierania materiałów roślinnych.

Oznaczenia wykonane na homogenizatach otrzymanych w obecności węglanu wapnia z glikozą oraz buforu fosforanowego dają identyczne wyniki. Świadczy to o właściwym pobieraniu średniej próby, o ilościowej ekstrakcji katalazy, jak i o dobrym działaniu ochronnym obu odczynników, w przeciwnym bowiem razie — wydaje się — że oznaczenia na homogenizatach z różnymi środkami ochronnymi powinny być różne.

Z tablic VII, VIII i XII wynika, że aktywności katalazy w wyciągach zawierających węglan wapnia z glikozą lub bufor fosforanowy są znacznie wyższe od wyciągów glicerolowych. Również trwałość aktywności katalazy podczas przechowywania wyciągów w różnych temperaturach jest większa przy zastosowaniu wymienionych środków ochronnych niż w obecności glicerolu, przeto należy zaniechać stosowania glicerolu i korzystać z fosforanu bądź węglanu wapnia z glikozą.

Węglan wapnia działa prawdopodobnie ochronnie na tej samej zasadzie jak bufor, tzn. przy nieznacznie kwaśnym środowisku materiału roślinnego tworzy się kwaśny węglan wapnia:



Jeżeli działanie węglanu wapnia polega na buforowaniu środowiska podobnie jak działanie fosforanów, to należy przypuszczać, że inne bufory będą również stabilizować trwałość aktywności katalazy w wyciągach roślinnych.

Profesorowi drowi I. Reiferowi składam podziękowania za cenne rady i zainteresowanie okazywane niniejszej pracy.

Streszczenie wyników

1. Stwierdzono, że wyciągi katalazy sporządzone z materiałów roślinnych bez środków ochronnych ulegają gwałtownej inaktywacji w czasie homogenizowania oraz podczas przechowywania.

2. Wykazano, że glicerol nie jest środkiem ochronnym w czasie homogenizowania materiału roślinnego i nie zabezpiecza katalazy przed częściową inaktywacją w czasie przechowywania.

3. Stwierdzono, że dioksan, ekstrakt drożdżowy, żelatyna, pirydyna, węglan sodu, kwas bursztynowy nie działają ochronnie na aktywność katalazy podczas homogenizowania materiału roślinnego.

4. Węglan sodu z glikozą, jak i bufor fosforanowy pH = 7 okazały się środkami stabilizującymi aktywność katalazy podczas homogenizowania oraz w czasie przechowywania.

5. Wyciągi roślinne z wyżej wymienionymi środkami nie wykazują spadku aktywności katalazy podczas przechowywania w okresie 4 dni w temperaturze 4°. W temperaturze 14° wyżej wymienione wyciągi można przechowywać około 24 godzin.

Wyciągi wodne, lub glicerolowe nie można przechowywać przez dłuższy okres czasu nawet w temperaturze 4°C.

LITERATURA

1. K. Zeile, Die Katalase, *Erg. d. Enzymforsch.* **8**, 264 (1934).
2. H. Lück, Zur Reaktionskinetik der katalatischen H_2O_2 -Spaltung, *Biochem. Ztschft.* **324**, 351 (1953).
3. J. G. Kaplan, The activity of catalase unfolded at the air-water interface, *J. Colloid Sci.* **7**, 382 (1952), ref. C. A. **46**, 10232 a (1952).
4. G. L. Brown, Solubility analysis of catalase, *Biochem. J.*, **51**, 570, 570 (1952).
5. H. Tauber, E. L. Petit, Convenient methods for preparing crystalline catalase, *J. Biol. Chem.* **195**, 703 (1952).
6. G. W. Kreke, F. Maloney, Acceleration of catalase action, *J. Biol. Chem.* **172**, 317, (1948).
7. P. George, Decomposition of hydrogen peroxide, *Biochem. J.* **43**, 289 (1948).
8. Eumiko Fukuoka, Studies on the activation of catalase, *Japan J. Med.* **1**, 25 (1948), ref. C. A. **43**, 255 i (1949).
9. A. W. Błagowieszczewski, A. Y. Kologriwowa, Activation of catalase by products of deamination of amino acids, *Dokl. Ak. Nauk. SSSR* **50**, 359 (1945), ref. C. A. **43**, 4309 b (1949).
10. M. A. Joslyn, Enzyme activity in frozen vegetable tissue, *Adv. i. Enzymol.* **9**, 613, (1949).
11. J. B. Sumner, G. F. Somers, Chemistry a. methods of enzymes, New York 1947, str. 208.
12. Br. Chance, Effect of pH upon t. reaction kinetics of t. enzymesubstrate compounds of catalases, T. effect of pH upon t. equil. of catalase compounds, *J. Biol. Chem.* **134**, 471, 483 (1952).
13. P. George, Effects of t. peroxide concentration a. other factors on t. decomposition of hydrogen peroxide by catalase, *Biochem. J.* **44**, 197 (1949).
14. H. Stern, L. H. Bird, Suppression of catalase activity by peroxidase a. its substrates, *Biochem. J.* **49**, 336 (1951).
15. G. E. Perlman, F. Lipman, Catalase in serum a. plasma, *Archiv. Biochem.* **7**, 159 (1945).
16. Masaru Shirakawa, Rapid determination of catalase by t. drop method, *J. Agr. Chem. Soc. Japan* **24**, 125 (1951), ref. C. A. **46**, 11296 c (1952).
17. J. Roca, R. Ondana, Catalase in bean varieties, *Anales inst. biol.* **22**, 3 (1951), ref. C. A. **46**, 3617 g (1952).
18. R. R. Kenten, P. J. G. Mann, Oxidation of amines by pea seedlings, *Biochem. J.* **50**, 361 (1952).
19. R. F. Beers, I. W. Sizer, A spectrophotometric method for measuring t. breakdown of H_2O_2 by catalase, *J. Biochem.* **195**, 133 (1952).
20. D. Appleman, Manometric determination of catalase activity, *Anal. Chem.* **23**, 1627 (1951), ref. C. A. **46**, 3110 h (1952).
21. Naomoto Takasugi, Izaoyamazaaki, The fluctuation of enzymes a. other important substances during wheat germination, *J. Agr. Chem. Soc. Japan* **25**, 113 (1951), ref. C. A. **46**, 10305 d (1952)

OPREDELЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ В РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ

Содержание

1. Обнаружено, что экстракты каталазы, приготовленные из растительных материалов без защитных средств подвергаются резкой инактивации во время гомогенизации и во время хранения.

2. Показано, что глицероль не является защитным средством во время гомогенизации растительных материалов. Глицероль во время хранения растительной каталазы не защищает её от частичной инактивации.

3. Обнаружено, что диоксан, дрожжевой экстракт, желатин, пиридин, карбонат натрия, янтарная кислота не оказывают защитного влияния на активность каталазы во время гомогенизации растительного материала.

4. Карбонат натрия с глюкозой и фосфатный буфер $pH = 7$ оказались средствами стабилизирующими активность каталазы во время гомогенизации и во время хранения.

5. Растительные экстракты вместе с выше названными средствами не снижают активности каталазы во время хранения на протяжении 4 дней при температуре 4° . В температуре же 140° названные выше экстракты могут оставаться на хранении в течении около 24 часов.

Водные или глицерольные экстракты нельзя хранить более продолжительное время даже при температуре $4^{\circ}C$.

DETERMINATION OF CATALASE ACTIVITY IN PLANT MATERIAL

Summary

1. Extracts of catalase prepared from plant material in the absence of protective reagents show a rapid drop of activity during homogenization as well as a steady drop of activity on keeping the extracts at various temperatures from $4^{\circ}C$ to $20^{\circ}C$.

2. It was shown that in plant extracts glycerol does not prevent the inactivation of catalase. Glycerol is also unsuitable for the purpose of preservation of plant catalase.

3. Dioxan, yeast, gelatine, pyridine, sodium carbonate, succinic acid do not prevent losses of catalase activity during homogenisation of plant material.

4. Calcium carbonate together with glucose as well as phosphate buffer $pH = 7$ have proved to be suitable reagents for the preservation of catalase activity during homogenisation and preservation.

5. Plant extracts containing the above buffers, held at $4^{\circ}C$ do not lose their catalase activity for a period of about 4 days. At a temperature of $14^{\circ}C$ these extracts can be held for about 24 hours. Water of glicerol extracts cannot be maintained for any length of time even at a temperature of $4^{\circ}C$.

M. KANSKI, O. SAKŁAWSKA-SZYMONOWA, M. SZYMONA

TRANSAMINACJA ASPARAGINOWO-alfa-KETOGLUTAROWA U *MYCOBACTERIUM PHLEI*

Z Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Lublinie

Kierownik Zakładu: prof. dr J. Opieńska-Blauth

W toku badań nad przemianą prątków kwasoodpornych (1) zajęliśmy się sprawą transaminacji jako jednym z ważnych procesów, łączących przemianę węglowodanową z przemianą aminokwasową. W porównaniu z obszernym piśmiennictwem, dotyczącym zagadnienia transaminacji i transaminaz w tkankach zwierzęcych, istnieje raczej niewielka ilość prac doświadczalnych, poświęconych transaminacjom u drobnoustrojów. Wśród nich należy wymienić prace Lichsteina i Cohena (2), Gunsalusa i Tonzeticha (3), Rudmana i Meistera (4), prowadzone na zawiesinach lub dezintegratkach *Escherichia coli*; Wiame'a i Storccka (5) — na *Bacillus subtilis* oraz Altenberna i Housewrighta (6) — na *Brucella abortus*. W dostępnej literaturze nie spotkaliśmy wzmianek na temat transaminacji u prątków kwasoodpornych poza przypuszczeniem wysuniętym przez Edsona (7), że szybkość zużywania kwasu glutaminowego przez zawiesiny *Mycobacterium* może być związana z procesem transaminacji.

Przedmiotem niniejszej pracy jest wykrycie transaminazy asparaginowo-alfa-ketoglutarowej (transaminazy asparaginowo-glutaminowej wg nomenklatury niektórych autorów) w zawiesinach i proszkach acetonowych *Mycobacterium phlei*, katalizującej proces przeniesienia grupy aminowej kwasu asparaginowego na kwas alfa-ketoglutarowy z wytworzeniem kwasu glutaminowego i kwasu szczawiooctowego jako produktów reakcji. W dalszym ciągu pracy oznaczamy ją skrótem: transaminaza asp-glu.

Część doświadczalna

Drobnoustroj. Do badań użyto szczepu *M. phlei*, dostarczonego nam przez Instytut Gruźlicy w Warszawie, hodowanego na pożywce Löwensteina i przeszczepianego w odstępach dwutygodniowych. Hodowlę *M. phlei*, inkubowaną w butlach Roux na podłożu Löwensteina w temp. 37°C, używano w okresie maksymalnego wzrostu do sporządzenia zawiesin lub preparatów acetonowych.

Przygotowanie zawiesiny. Po ukończonej inkubacji hodowle prątków zbierano z butli Roux za pomocą uszka platynowego do roztworu M/25 buforu fosforanowego o pH 8,3. Powstałą zawiesinę przemywano trzykrotnie świeżymi porcjami roztworu buforowego przez odwirowywanie. Po ostatnim przemyciu pobierano pipetą po 1 ml równomiernie rozklóconej za pomocą perełek szklanych zawiesiny do 25-mililitrowych erlenmajerek, zawierających: 2 ml pożywki DAK (zmodyfikowana płynna syntetyczna pożywka DGK wg Syma (8); w skład pożywki DAK wchodzi: glukoza 4,0 g, kwas cytrynowy 2,0 g, asparagina 11,0 g, KH_2PO_4 0,5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, cytrynian żelazowo-amonowy 0,05 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02 g, wody 1000 ml); 1 ml kwasu asparaginowego o stężeniu 200 mg %, 1 ml kwasu alfa-ketoglutowego o stężeniu 400 mg %.

Przygotowanie proszku acetonowego. Masę bakteryjną zebraną z butli Roux przemywano pięciokrotnie lodowatą wodą destylowaną w celu usunięcia składników podłoża, a następnie trzykrotnie przez odwirowywanie z acetonem o temp. -5°C . Osad suszono pod zmniejszonym ciśnieniem w ciągu 24 godz. ponad chlorkiem wapnia w temp. $+2 - +4^\circ\text{C}$. Wyszuszony proszek acetonowy ważono i rozcierano w moździerzyku agatowym z M/25 buforem fosforanowym o pH 8,3 w takiej objętości, aby otrzymać stężenie 50 mg proszku na 1 ml buforu. Po 1 ml otrzymanej w ten sposób zawiesiny dodawano do erlenmajerek poj. 25 ml, zawierających 2 ml kwasu alfa-ketoglutowego o stężeniu 400 mg % i 2 ml kwasu asparaginowego o stężeniu 200 mg % (oba składniki rozpuszczone w buforze fosforanowym M/25 o pH 8,3).

Analiza chromatograficzna

W doświadczeniach posługiwano się arkuszami bibuły Whatmana nr 1. Aminokwasy rozdzielano w układzie fenol-woda (7 : 3) techniką chromatografii wstępującej i wywoływano plamy po wysuszeniu chromatogramów 0,1% roztworem ninhydryny w wodzie nasyconej n-butanolem (w późniejszych doświadczeniach używano 0,5% roztworu ninhydryny w acetonie) przez kilkuminutowe ogrzewanie w temp. 95°C . Dla wykrycia związków redukujących stosowano układ rozpuszczalników n-butanol — pirydyna — woda (45 : 25 : 40) i technikę chromatografii zstępującej. Chromatogramy wywoływano azotanem srebra metodą zmodyfikowaną (W. E. Trevelyan, D. P. Proctor i J. S. Harrison (9)). Identyfikację plam aminokwasowych na chromatogramach przeprowadzano na podstawie aminokwasów kontrolnych, wkraplanych równolegle z próbkami badanymi.

Zawiesiny *M. phlei* inkubowano w termostacie w temp. 37°C w ciągu różnych okresów czasu w warunkach aerobowych lub anaerobowych (atmosfera N_2).

Do kompletu każdego doświadczenia wchodziły następujące próby kontrolne: zawiesina bakteryjna ogrzewana w ciągu 10 min. na wrzącej łaźni wodnej natychmiast po dodaniu do podłoża zawierającego substraty reakcji (kwas alfa-ketoglutarowy i kwas asparaginowy), zawiesina inkubowana z podłożem pozbawionym substratów oraz podłoża DAK z substratami bez zawiesiny bakteryjnej.

W określonym czasie pobierano inkubowane próbki objętości 1 ml, do których dodawano — celem odbiałczenia — 0,1 ml 20% kwasu trójchlorooctowego, a następnie sączono lub odwirowywano. Przezroczysty płyn z osadu wkraplano w ilościach po 50 lub 100 mikrolitrów na bibułę chromatograficzną celem ujawnienia zmian powstałych w składzie aminokwasowym i ciał redukujących podłoża w stosunku do podłoża inkubowanego wraz z zawiesiną prątków.

W wielu doświadczeniach zamiast pożywki DAK używano jedynie roztworu substratów w M/25 buforze fosforanowym o pH 8,3. Proszki acetonowe *M. phlei* inkubowano wraz z właściwymi substratami (jak podano wyżej w punkcie „przygotowanie preparatu acetonowego“) w temp 37°C w warunkach tlenowych lub beztlenowych (atmosfera N₂) w różnych okresach czasu, z reguły jednak krócej niż zawiesiny komórkowe. W skład prób kontrolnych wchodziły każdorazowo: proszek acetonowy wraz z substratami ogrzewany do wrzenia przez 10 min. natychmiast po zmieszaniu, substraty bez proszku acetonowego oraz proszek acetonowy bez substratów (dodany do 4 ml buforu). Pobrane po odpowiednim czasie inkubacji próbki odbiałczano 20% kwasem trójchlorooctowym i następnie postępowano analogicznie jak z próbkami zawiesin.

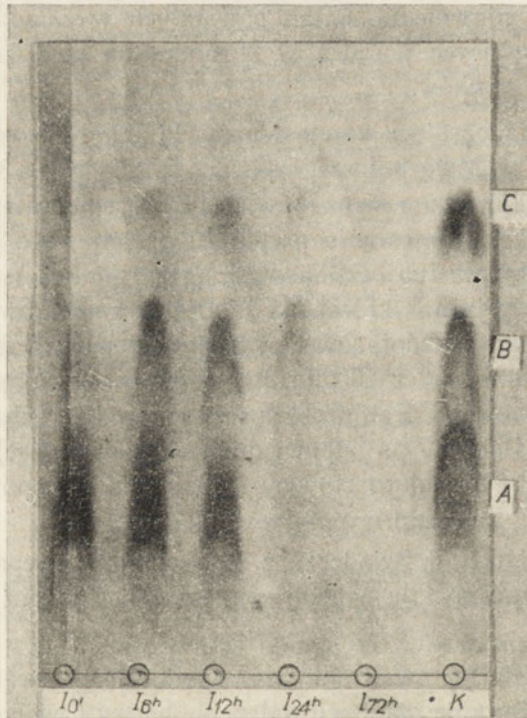
Przebieg i rezultaty doświadczeń z zawiesinami i preparatami acetonowymi *M. phlei* przedstawiają poniżej zamieszczone tabele i fotografie chromatogramów.

1. Doświadczenia prowadzone na zawiesinach prątków wykazały, że w miarę czasu trwania inkubacji natężenie barwy i wielkości plam kwasu glutaminowego wzrasta, osiąga ono swe maksimum i następnie stopniowo zanika. Natężenie barwy i wielkość plam kwasu asparaginowego w miarę inkubacji stopniowo maleje. Analiza zidentyfikowana na chromatogramach powyżej kwasu glutaminowego wykazuje z początku zwiększenie się wielkości i natężenia barwy plam i następnie ich stopniowe zmniejszanie się.

Jak wynika z danych tabeli I oraz fotografii nr 1, ślady kw. glutaminowego występują w próbce nie inkubowanej, ale jako produkt transaminacji asp-glu. kw. glutaminowy pojawia się w większych stężeniach dopiero po 6-godzinnej inkubacji. Zmniejszanie się natężenia barwy i wielkości plam kw. asparaginowego jest mniej widoczne wskutek jego stosunkowo znacz-

Tabela I
Transaminacja asp.-glu. w zawiesinach *M. phlei*

| Czas inkubacji | Stężenie wykrytych aminokwasów | | |
|----------------|--------------------------------|-----------------|---------|
| | Kw. asparaginowy | Kw. glutaminowy | Alanina |
| 0 godz. | ++++ | + | ± |
| 6 „ | ++++ | ++ | + |
| 12 „ | +++ | +++ | ++ |
| 24 „ | ± | + | + |
| 72 „ | — | — | ± |



Fot. 1

nego stężenia. Znikanie i kolejność znikania aminokwasów z podłoża związana jest najprawdopodobniej z działalnością oksydazy L-aminokwasów, której obecność w saprofitycznych prątkach kwasoodpornych znana jest od dawna (10).

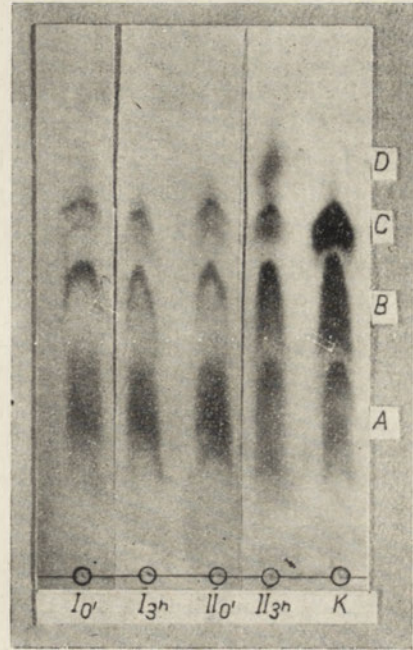
2. Doświadczenia z preparatami acetonowymi *M. phlei* wykazują obecność kwasu glutaminowego — jako produktu transaminacji asp.-glu. — już po 30 min. inkubacji proszku acetonowego wraz z substratami i stopniowe narastanie wielkości i natężenia plam kwasu glutaminowego na chromatogramach do końca trwania inkubacji, której czas w tych

doświadczeniach nie przekraczał nigdy 3,5 godzin. Podobnie jak w zawiesinach, tak i w preparatach acetonowych bez substratów stwierdza się nieznaczne ilości kwasu glutaminowego (fot. nr 2). Wyniki tych doświadczeń zebrane są w tab. II.

Zmniejszenie się stężenia kwasu alfa-ketoglutarowego nie zaznacza się tak wyraźnie na chromatogramach związków redukujących, prawdopodobnie wskutek stosunkowo małych zmian w ogólnym stężeniu tego kwasu w ciągu 3-godzinnej inkubacji i malej czułości testu redukcyjnego dla ketokwasów.

Niezależnie od opisanych wyżej doświadczeń przeprowadzono dodatkowe próby, mające na celu rozstrzygnięcie następujących zagadnień:

1) jak wpływa wiek hodowli na aktywność transaminazy asp-glu.,



Fot. 2

Tabela II

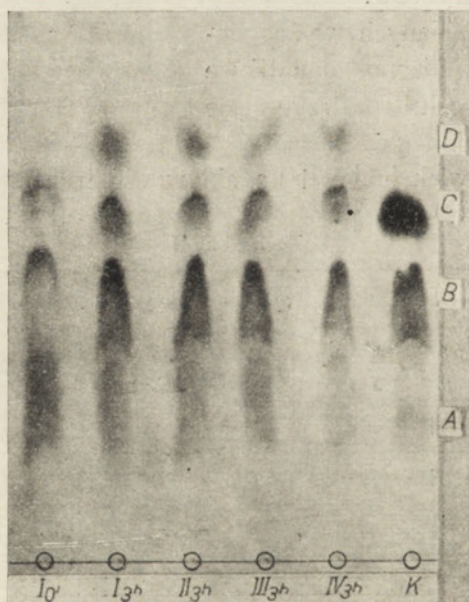
| Czas inkubacji | Stężenie wykrytych aminokwasów | | | |
|---|--------------------------------|------------------|---------|--------------------|
| | kwas asparaginowy | kwas glutaminowy | alanina | nie identyfikowany |
| 0 min. | ++++ | + | + | — |
| 30 „ | ++++ | ++ | + | ± |
| 60 „ | +++ | ++ | ++ | + |
| 180 „ | +++ | +++ | ++ | ++ |
| Kontrola bez substratów po 180 min. inkubacji | — | + | + | + |

U w a g i: Do doświadczeń użyto 50 mg suchej masy proszku acetonowego, 8 mg kw. alfa-ketoglutarowego i 4 mg kwasu asparaginowego. Końcowa objętość — 5 ml M/25 buforu fosforanowego o pH 8,3. Warunki aerobowe, t° 37° C. Oznaczenia stężeń aminokwasów jak w tab. I.

2) czy warunki aerobowe wpływają hamująco na aktywność badanej przez nas transaminazy,

3) jaki wpływ na aktywność transaminazy asp-glu. wywiera dodanie do układu reagującego przegotowanego wyciągu wodnego z mięśnia sercowego jako źródła koenzymu (11) lub dodanie mieszaniny kwasu adenylo-trójfosforowego i pirydoksyny (w miejsce fosforanu pirydoksalu, którego nie posiadaliśmy).

W jednym z doświadczeń użyto hodowli *M. phlei* rosnącej 2 tyg. w temp. 37°C, a następnie przechowywanej w ciągu 4 tygodni w temp. pokojowej na pożywce Löwensteina. Sporządzony z tej hodowli preparat acetonowy wykazał aktywność transaminacyjną asp-glu. W innych doświadczeniach użyto proszku acetonowego przechowywanego w ciągu kilku tygodni w chłodni (w temp. ok. + 2°C) w warunkach aerobowych. Również i w tym wypadku transaminacja asp-glu. przebiegała w sposób prawidłowy.



Fot. 3

Na fot. nr 3 przedstawiono przebieg porównawczych doświadczeń nad transaminacją asp-glu. proszków acetonowych w warunkach aerobowych i anaerobowych (w atmosferze N_2) w obecności koenzymu z mięśnia oraz w obecności mieszaniny 0,85 mg pirydoksyny i 2,5 mg ATP. Jak widać, przebieg transaminacji asp-glu. jest we wszystkich tych przypadkach jednakowy.

Dyskusja

Specyficzne cechy biologiczne prątków kwasoodpornych nie pozwalają na bezpośrednie porównanie wyników przedstawionych w tej pracy z doświadczeniami innych autorów, przeprowadzonymi na innych drobnoustrojach lub na tkankach zwierzęcych. Niemniej jednak należy stwierdzić, że błona komórkowa *M. phlei* nie stanowi istotnej przeszkody dla przenikania aminokwasów.

Aerobowe warunki inkubowania, jak i długotrwały okres przechowywania dezintegratu acetonowego w niskiej temperaturze nie wywierają istotnego wpływu na aktywność transaminazy asp-glu.

Spostrzeżenia Lichsteina i Cohena (2) o hamującym wpływie atmosfery tlenowej na aktywność transaminaz nie znajdują zastosowania w odniesieniu do transaminazy asp-glu. Dodawanie przegotowanego wyciągu z mięśnia sercowego myszy jako źródła koenzymu (11) do układu dezintegrat — substraty nie wzmagało szybkości ani wydajności transaminacji, co zgadza się dobrze z doświadczeniami Cammraty i Cohena (12), którzy wykazali, że wyciągi z mięśni działają aktywująco na różnorodne transaminacje tylko ze względu na zawartość dość znacznych ilości kwasu glutaminowego, a nie z powodu obecności w nich fosforanu pirydoksalu.

Streszczenie

1. Stwierdzono obecność transaminazy asp-glu. w zawiesinach komórkowych oraz dezintegratach acetonowych *Mycobacterium phlei*.

2. Wykazano, że atmosfera tlenowa nie wywiera widocznego na chromatogramach hamującego wpływu na transaminazę asp-glu. w dezintegratach acetonowych *M. phlei*.

3. Nie stwierdzono aktywującego wpływu przegotowanego wodnego wyciągu z mięśnia sercowego na aktywność transaminazy asp-glu u *M. phlei*.

LITERATURA

1. M. Szymona i O. Sakławska-Szymonowa (praca w druku).
2. H. C. Lichstein i P. P. Cohen, *J. Biol. Chem.*, 157, 85 (1945).
3. C. F. Gunsalus i J. Tonzetich, *Nature* (London), 170, 162 (1952).
4. D. Rudman i A. Meister, *J. Biol. Chem.*, 200, 591 (1953).
5. J. M. Wiame i R. Storck, *Biochim. et Biophys. Acta*, 10, 268 (1953).
6. R. A. Altenbern i R. D. Housewright, *J. Biol. Chem.*, 204, 159 (1953).
7. N. L. Edson, *Bacteriol. Rev.*, 15, 147 (1951).
8. E. Sym, *Medycyna Doświadczalna i Społeczna*, 1/2 (1946).
9. W. E. Trevelyan, D. P. Protor i J. S. Harrison, *Nature*, 166, 440 (1950).
10. H. G. Wells i E. R. Long, *The Chemistry of Tuberculosis*, Williams & Wilkins Co, Baltimore 1932.

11. M. G. Kritzman i O. P. Samarina, *Doklady Ak. Nauk. SSSR*, 63, 171 (1948).
12. P. S. Cammarata i P. P. Cohen, *Biochim. et Biophys. Acta*, 10, 117 (1953).

ASPARTATE — α -KATOGLUTARATE TRANSAMINASE IN *MYCOBACTERIUM PHLEI*АСПАРАГИНОВАЯ — α -КЕТОГЛЮТАРОВАЯ АМИНОФЕРАЗА
MYCOBACTERIUM PHLEI

С о д е р ж а н и е

1. Обнаружена аспарагино-глутаминовая трансминаза в клеточных эмульсиях и ацетонных дезинтегратах.
2. Показано, что кислородная атмосфера не оказывает влияния, заметного на хроматограммах, на аспарагино-глутаминовую трансминазу в ацетонных дезинтегратах.
3. Не было обнаружено активизирующее влияние переваренного водного экстракта сердечной мышцы на активность аспарагино-глутаминовой трансминазы у *Mycobacterium phlei*.

S u m m a r y

1. Evidence has been presented for the existence of an aspartic-glutamic transaminase in suspensions of intact cells, as well as of acetone disintegrated cells, of *Mycobacterium Phlei*.
2. It has been shown chromatographically that atmospheric oxygen exerts no inhibitory effect on the asp-glu-transaminase of acetone disintegrated *Mycobacterium Phlei*.
3. A boiled aqueous extract of *beef heart* had no stimulating influence on the asp-glu-transaminase activity.

K. ZAKRZEWSKI i M. WOJNAROWSKA

ESTRY SIARCZANOWE ZHYDROLIZOWANEGO DEKSTRANU

Doniesienie tymczasowe

Z Działu Biochemii Instytutu Hematologii w Warszawie

Kierownik: doc. dr K. Zakrzewski

Zidentyfikowanie heparyny jako estru siarczanowego wielocukrowca nadsunęło wielu badaczom myśl, ażeby stosować jako środki przeciwkrzepliwe syntetycznie otrzymane analogiczne estry różnych wielocukrów. Pierwsze próby w tym kierunku wykonywał *Astrup* (1). Dopiero jednak w ostatnich dwóch latach udało się uzyskać zadowalające leczniczo związki tego rodzaju, jak ester wielosiarkowy kwasu polimannuronowego (11) i ester wielosiarkowy kwasu poligalakturonowego (7). Główną przeszkodę stanowiła stosunkowo mała aktywność uzyskiwanych dawniej preparatów, w wyniku czego w leczeniu stanów zakrzepowych musiały być stosowane duże dawki, co pociągało za sobą objawy toksyczne.

Dekstran jako wielocukier całkowicie nieszkodliwy dla ustroju wydawał się dobrym surowcem do otrzymania syntetycznego środka zastępczego heparyny (4). Pierwszym zastosowanym klinicznie (10) estrem siarczanowym dekstranu był preparat otrzymany w wyniku bardziej systematycznych studiów *Rickettsa* (9). Badacz ten sulfonował dekstrany o różnych lepkościach wewnętrznych (od 0,02 do 0,36) podstawiając różne ilości grup siarczanowych. Najwyższa aktywność w hamowaniu krzepliwości, uzyskana przez tego badacza, nie przekracza 15 jednostek na miligram.

Celem pracy niniejszej jest przedstawienie wzajemnej zależności pomiędzy ciężarem molekularnym i ilością grup siarczanowych z jednej strony, a działaniem przeciwkrzepliwym i własnościami toksycznymi z drugiej strony.

Material i metody

1. Materiałem wyjściowym był hydrolizat dekstranu o lepkości wewnętrznej około 0,26 — 0,30, otrzymywany jako produkt uboczny przy produkcji poliglukanu (3), nie należący do poprzednio opisanego szeregu homologicznego (12). Frakcja ta była hydrolizowana 0,1N HCl w temp. 99 — 100°C

w czasie od 15 min. do 3 godz. w zależności od wielkości ciężaru molekularnego, jaki się chciało otrzymać. Hydrolizę przerywano ługiem sodowym, wielokrotnie wytrącano trzema objętościami etanolu 96%, osad rozpuszczano w wodzie, dializowano w wodzie wodociągowej i destylowanej, a następnie liofilizowano.

2. Estryfikowanie przeprowadzano analogicznie jak Grönwall (4) i Ricetts (9). Do bezwodnej pirydyny wkraplano kwas chlorosulfonowy, utrzymując temperaturę mieszaniny w 20°C. Otrzymaną w ten sposób zawiesinę soli pirydyniowej ogrzewano do 65 — 70°C i wsypywano odważoną ilość zhydrolizowanego dekstranu. Estryfikację prowadzono w 65°C przez 3 — 4 godz. Na każdy gram suchego zhydrolizowanego dekstranu zużywano 7 ml pirydyny. Kwasu chlorosulfonowego dawano o 0,5 mola więcej, niż wynikało z wyliczenia stechiometrycznego dla zestryfikowania każdego mola glukozy 1, 2 lub 3 grupami — SO₃H.

3. Izolowanie estru siarczanowego dekstranu. Po zakończonej estryfikacji mieszaninę chłodzono i rozcieńczano przez dodanie kruszonego lodu, pirydynę wypierano przez dodanie ługu sodowego. Dekstran sulfonowany wytrącano trzema objętościami etanolu 96%. Syropowaty osad rozpuszczano w wodzie, zobojętniano HCl, dializowano w wodzie wodociągowej i destylowanej i liofilizowano.

4. Lepkość wewnętrzną oznaczano w wiskozymetrze Höpplera w temp. + 25°C (13).

Ciężar molekularny obliczano wg wzoru $[\eta] = kM^a$ (12).

$$k = 9,87 \times 10^{-8}; a = 1.35$$

Ciężar molekularny dekstranu sulfonowanego obliczano stechiometrycznie po uwzględnieniu ilości grup — SO₃H.

5. Siarkę całkowitą oznaczano po wilgotnym spaleniu badanego preparatu z HNO₃ i NH₄NO₃ (8). W otrzymanym stopie oznaczano siarkę za pomocą miareczkowej metody benzydynamowej (2).

6. Aktywność przeciwwkrzepliwą *in vitro* oznaczano nieco zmodyfikowaną metodą Kuizenga (6). Modyfikacja polegała na użyciu w miejsce osocza baraniego — mieszanego osocza 10 zdrowych dawców krwi. Krew była pobrana do 3% cytrynianu sodu w stosunku 1 objętość cytrynianu i 4 objętości krwi.

Oznaczenia aktywności wykonywano zawsze w porównaniu z aktywnością standardowego preparatu heparyny¹. Aktywność jest oznaczona w jednostkach międzynarodowych na miligram suchej wagi preparatu.

7. Toksyczność badano przez wstrzykiwanie preparatu rozpuszczonego w buforze węglanowym pH 7,85 dorosłym, zdrowym, białym, myszom, wagi

¹ Otrzymanego dzięki uprzejmości dra J. Venuleta.

ok. 20 g każda do żyły ogonowej, w ilości odpowiadającej 1400 j na 1 kg wagi ciała, w objętości około 0,5 ml.

Wyniki

Zestawienie własności poszczególnych preparatów przedstawia tabela I

Tablica I
Właściwości poszczególnych preparatów dekstranowych

| Preparat | Lepkość wewnętrzna | C. cząst. dekstranu zhydrol. | Grup sulfonowych na cząsteczkę glikozy | C. cząst. dekstranu sulfonowanego | Aktywność w jedn./mg |
|------------------|--------------------|------------------------------|--|-----------------------------------|----------------------|
| IV ₃ | 0,15 | 38 000 | 2,4 | 83 000 | 23 |
| IV ₂ | 0,15 | 38 000 | 1,7 | 70 000 | 19 |
| IV ₁ | 0,15 | 38 000 | 0,5 | 47 000 | 7 |
| III ₃ | 0,1 | 28 000 | 2,6 | 64 000 | 29 |
| III ₂ | 0,1 | 28 000 | 1,7 | 51 500 | 19 |
| III ₁ | 0,1 | 28 000 | 0,7 | 37 500 | 8 |
| II ₃ | 0,05 | 17 000 | 2 | 34 000 | 20 |
| II ₂ | 0,05 | 17 000 | 1,6 | 30 500 | 19 |
| II ₁ | 0,05 | 17 000 | 0,4 | 20 500 | 7 |
| I ₃ | 0,037 | 13 500 | 2 | 27 000 | 25 |
| I ₂ | 0,037 | 13 500 | 1,3 | 22 000 | 26 |
| I ₁ | 0,037 | 13 500 | — | — | — |
| Ib ₃ | 0,03 | 11 500 | 2,6 | 26 500 | 40 |
| Ib ₂ | 0,03 | 11 500 | 1,5 | 20 000 | 22 |

Omówienie wyników

Pomimo zastosowania 3 — 4 godzinnego czasu sulfonowania maksymalna ilość wprowadzonych grup sulfonowych nie przekroczyła 2,6 na 1 mol bezwodnika glikozy. Dłuższa estryfikacja prowadzi do głębokich zmian w strukturze wielocukru.

Uzyskane wyniki (tabela I) wskazują, że aktywność jest wyraźnie funkcją ilości wprowadzonych grup siarczanowych. Preparaty zawierające 2,6 mola —SO₃H na 1 mol glikozy posiadają aktywność 1 jednostki międzynarodowej: preparat III₃ — w 0,034 mg, preparat R — w 0,03 mg, preparat

Tablica II

Badania toksyczności sulfonowanych produktów hydrolizy dekstranu

| Preparat | Użyto myszy | Padło w 24 godz. | Przeżyło do 10 dni | Ciężar myszy w g | | | | |
|------------------|----------------|------------------------|--------------------------|------------------|--------|--------|--------|---------|
| | | | | 1 dnia | 2 dnia | 3 dnia | 7 dnia | 10 dnia |
| IV ₃ | 5 | 1 | 4 | 86,2 | 77,4 | 85,3 | 84 | 93,5 |
| IV ₂ | 5 | 0 | 5 | 104,6 | 112,3 | 113 | 119,5 | 111,7 |
| IV ₁ | 5 | 0 | 5 | 100,6 | 101,6 | 101,5 | 102,2 | 110,1 |
| III ₃ | 5 | 1 | 4* | 91,5 | 66,9 | 77,5 | 81,7 | 83 |
| III ₂ | 5 | 0 | 4* | 110,8 | 97,8 | 107,5 | 109,0 | 84 |
| III ₁ | 5 | 0 | 5 | 100,6 | 99 | 102,3 | 98 | 107,8 |
| II ₃ | 5 | 0 | 5 | 98,8 | 98,4 | 103,5 | 101,3 | 110 |
| II ₂ | 5 | 0 | 5 | 105,8 | 92,9 | 110 | 108,4 | 111 |
| II ₁ | 5 | 0 | 5 | 102,5 | 102,2 | 100,2 | 97,5 | 107,8 |
| I ₃ | 5 | 0 | 5 | 94 | 87 | 91 | 99 | 98,2 |
| I ₂ | 5 | 0 | 5 | 105,8 | 96,5 | 108,2 | 97,5 | 108,5 |
| Ib ₃ | 5 | 0 | 5 | 91,1 | 91,6 | 93,5 | 92,7 | 102 |
| Ib ₂ | 5 | 0 | 5 | 96,8 | 98 | 97,4 | 100,3 | 98,5 |

* Padła z powodów nie związanych z wstrzyknięciem.

Ib₃ — w 0,025 mg (1 jednostka międzynarodowa aktywności jest zawarta w 0,0077 mg soli barowej oczyszczonej heparyny).

Tak więc preparat typu Ib₃ wykazuje czynność, która wydaje się większa od preparatów dotychczas opisanych, mających aktywność około 15 jedn/mg.

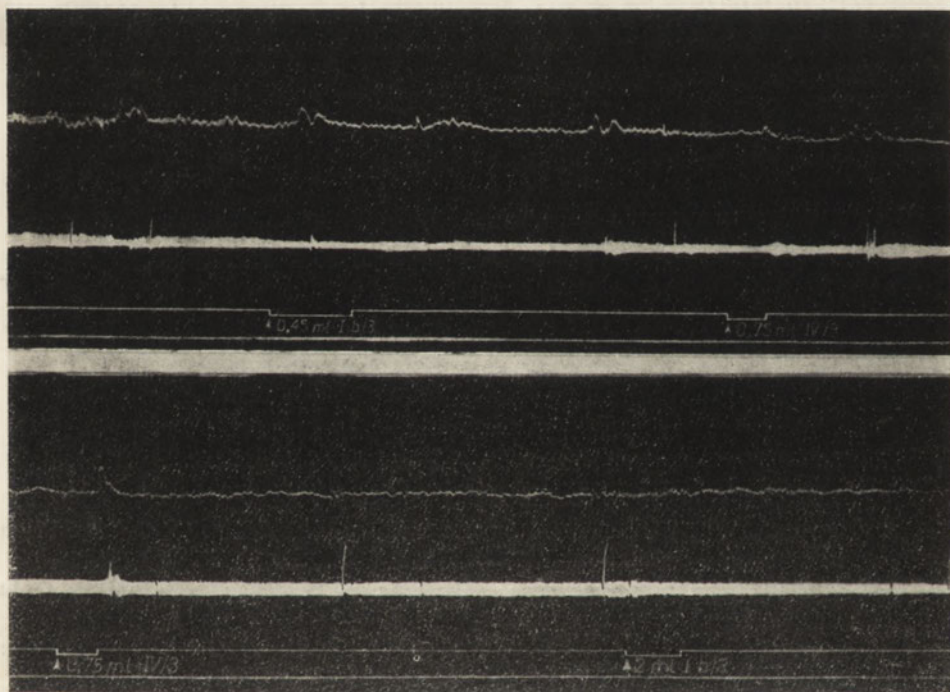
Aczkolwiek materiał przedstawiony w części doświadczalnej sugeruje, że preparaty o niższym ciężarze molekularnym mają nieco większą aktywność, to jednak ostateczne ustalenie tej zależności nie jest możliwe. Można się było jednak spodziewać, że wyższe ciężary cząsteczkowe będą powodowały gorszą tolerancję preparatu przez zwierzęta. W stosunku do preparatów dekstranu o ciężarach od 15000 — 37000, przebadanych jak wyżej, przypuszczenie to potwierdziło się przez regularne występowanie toksycznych objawów przy preparacie IV₃. Badanie tego preparatu na toksyczność było powtarzane kilkakrotnie w identycznych warunkach i zawsze jedna z pięciu myszy padła, a przy zwiększeniu dawki zwiększała się ilość myszy, które padły w ciągu 24 godzin.

Wyniki badania na toksyczność przedstawia tabela II.

Pełne badanie farmakologiczne opisanych powyżej heparynoidów jest w toku i będzie tematem następnej publikacji. Wstępne jednak eksperymenty przeprowadzone *in vivo* wskazują, że preparat na przykład typu Ib₃ może okazać się bardzo wartościowym środkiem zastępczym heparyny.

Na rys. 1 przedstawiono badanie wpływu preparatów: Ib₃, IV₃, III₃ na krążenie i oddychanie królika w ostrym eksperymencie. Z przedstawionego zapisu kimografionowego widać brak efektów toksycznych.

Wstrzyknięcie zdrowemu, nie uśpionemu królikowi 134 mg (tj. 48 mg na 1 kg wagi, czyli 1392 j (1 kg wagi) preparatu III₃ dożylnie spowodowało natychmiastowe przedłużenie czasu krwawienia z 2,5 min. do 14 min, a po 4 godz. do 19 min. Po 22 godz. czas krwawienia utrzymywał się na pozo-



Rys. 1 przedstawia zapis kimograficzny ciśnienia i oddechu królika, któremu wstrzyknięto dożylnie różne preparaty estrów siarczanowych dekstranu w ilości od 100 do 250 mg na kg wagi ciała. Na linii najwyższej uwidoczniają się zapisy ciśnienia krwi oraz normalna amplituda ciśnienia; linia średnia jest zapisem oddechu. Prawidłowy przebieg tych krzywych wskazuje na brak wpływu szkodliwego zarówno na ciśnienie krwi, jak i na oddech.

Linia najniższa zapisu kimografionowego wykazuje czas trwania eksperymentu (najmniejsza podziałka — 2 sek), a linia znajdująca się ponad nią zaznacza czas wstrzykiwania danego preparatu (kolejno: 0,45 ml Ib₃, 0,75 ml IV₃, 0,75 ml IV₃ oraz 2,0 ml Ib₃).

mie 9,5 min, a wstrzyknięcie dożylnie w tym momencie 1,4 mg błękitu toluidyny (5) skróciło natychmiast czas krwawienia do stanu normalnego (3 min.).

Autorzy pragną złożyć podziękowanie drowi Jerzemu Dubrowskiemu i drowi Jerzemu Kaźmierczakowi za pomoc i oddaną współpracę przy wykonaniu badań farmakologicznych.

Streszczenie

Praca przedstawia wstępne wyniki estryfikowania produktów hydrolizy dekstranu. Wprowadzano od 1 do 3 grup — SO_3H na 1 glukozę do frakcji dekstranu o ciężarach molekularnych od 11500 do 38000.

Otrzymano preparaty o własnościach przeciwkrzepliwych, o aktywności rzędu $1/3$ krystalicznej heparyny. Nieswoista toksyczność była zaznaczona w niewielkim stopniu tylko w preparacie o najwyższym ciężarze molekularnym i najwyższym stopniu sulfonowania.

LITERATURA

1. Astrup T., Piper J.: *Acta physiol. scand.* 9, 351, 19.
2. Cope C. L.: *Biochem. J.*: 25, 1183 (1931).
3. Czechowska Z. i współprac.: *Pol. Arch. Med. Wewn.* 24, 1 (1954).
4. Grönwall A., Ingelman B., Mosiman H.: *Uppsala Läk Flören. Föhr* 50, 397, (1945).
5. Jaques L. B.: *Revue d'Hemat.* 7, 74, (1952).
6. Kuizenga M. H., Spaulding L. B. J.: *Biol. Chem.* 148, 641, 1943.
7. Leger L.: *Presse med.* 60, 1233, 1952.
8. Milton R., Hoskins J., Jackman: *Analyst* 69, 299, 1944.
9. Ricketts C. R.: *Biochem. J.* 51, 129, 1952.
10. Ricketts C. R., Walton K. W.: *Lancet* 2, 1004, 1953.
11. Sorenson C. W., Wright I. S.: Blood clotting and allied problems Transaction of the second conference January 1949 New York.
12. Zakrzewski K., Krysiak J., Murawski K., May Z. i Malec J.: *Acta Biochim. Pol.* 1, 27, 1954.
13. Zakrzewski K., Murawski K., Malec J., May Z. i Krysiak J.: *Przem. Chem.* 3, 208, 1954.

СУЛЬФАТНЫЕ ЭФИРЫ ПРОДУКТОВ ДЕКСТРАНА

Содержание

Работа содержит вступительные результаты реакции образования простых эфиров продуктов гидролиза декстрана. Введено от 1 до 3 сульфогрупп в молекулу глюкозы фракции декстрана имеющей молекулярный вес 15 000 до 38 000. Получены препараты предупреждающие свертывание и имеющие активность порядка $1/3$ кристаллического гепарина токсичностью отличались

в небольшой степени только препараты имеющие самый большой молекулярный вес и самую высокую степень сульфирования.

SULFONIC ESTERS OF HYDROLYZED DEXTRAN

S u m m a r y

The paper presents a preliminary report on esterification of dextran hydrolysis products. One to three sulphate groups were introduced per glucose unit into dextran fractions of molecular weight from 11,500 to 38,000.

The anticoagulant activity obtained was about 1/3 that of crystalline heparin.

A slight non-specific toxicity was observed only in a product of highest molecular weight and the largest number of sulphate groups introduced.

IGNACY REIFER

NOWA METODA MIKROOZNACZANIA KWASU CYTRYNOWEGO

*Z Zakładu Biochemii SGGW, Warszawa**Kierownik: prof. dr I. Reifer*

Metoda oznaczania kwasu cytrynowego na zasadzie reakcji pięciobromoacetonowej uważana jest powszechnie za najbardziej selektywną metodę oznaczania tego kwasu w materiale biologicznym.

Reakcję utleniania i bromowania kwasu cytrynowego do pięciobromoacetonu, opisaną w 1847 roku przez C a h o u r s a (1), wykorzystał S t a h r e (2) w 1897 roku w analizie jakościowej. K u n z (3) opracował pierwszą wagową metodę ilościowego oznaczania kwasu cytrynowego, polegającą na nieznacznej rozpuszczalności pięciobromoacetonu w wodzie. K o m e n t i a n i (4) miareczkował pięciobromoaceton jodometrycznie, przez co zdołał znacznie obniżyć ilość oznaczalnego kwasu cytrynowego, bowiem w warunkach jego metody 3,20 mg kwasu cytrynowego odpowiada 10 ml 0,1 N tiosiarczuanu sodu.

Pierwszą mikrometodę opracowali P u c h e r, S h e r m a n i V i c k e r y (5), zmodyfikowaną później przez P u c h e r a (6). Metoda ta umożliwia oznaczanie kwasu cytrynowego w ilościach od 0,05 do 1,0 mg. W następnych latach G o l d b e r g i B e r n h e i m (7), T a u s s k y i S c h o r r (8), W o l c o t t i B o y e r (9), N a t e l s o n, P i n c u s i L u g o v o y (10) i E t t i n g e r, G o l d b a u m i S m i t h (11) wprowadzili dalsze modyfikacje i dostosowali reakcję pięciobromoacetonową do oznaczenia kwasu cytrynowego w mikroilościach od 2 do 40 γ , w granicach błędu \mp 5%.

Celem tych wszystkich modyfikacji było opracowanie najodpowiedniejszych warunków utleniania i bromowania kwasu cytrynowego, wprowadzenie odpowiedniego rozpuszczalnika dla pięciobromoacetonu i wreszcie ustalenie najlepszych warunków wytworzenia i utrwalenia barwnika do kolorymetrycznego pomiaru pięciobromoacetonu. Do ekstrakcji pięciobromoacetonu używano eteru naftowego bądź heptanu, a do wywołania żółtego zabarwienia wymienieni autorzy stosowali siarczek sodowy, jodek potasowy, jodek sodowy lub tiomocznik.

Wszystkie wymienione modyfikacje metody pięciobromoacetonowej naręczają przy wykonaniu analiz ilościowych poważne trudności. Stężenia i ilości nadmanganianu i bromku potasowego stosowane w celu utlenienia i bromowania kwasu cytrynowego w kwaśnym środowisku muszą być w każdej metodzie ściśle przestrzegane, bowiem zbyt małe ilości odczynników zmniejszają syntezę pięciobromoacetonu, nadmiary natomiast wytwarzają wolny brom, który reaguje z pirydyną stosowaną przez Puchera i współpracowników w charakterze stabilizatora barwnika w eterze naftowym. Również w metodzie Ettiingera i współpracowników wolny brom uniemożliwia ilościowe oznaczanie kwasu cytrynowego, polegające na barwnej reakcji trójhalogenopochodnych węglowodorów z pirydyną w zasadowym środowisku, opisaną przez Fujiwara (12).

Nadmiar wody utlenionej, używanej do redukcji nadmiaru nadmanganianu i wytworzonego w toku reakcji dwutlenku manganu, działa w wyżej opisanych metodach również niekorzystnie na ilościowe oznaczanie kwasu cytrynowego. Dodatkową trudnością jest kompletne oddzielenie rozpuszczalników organicznych od łazy wodnej i w związku z tym wirowanie stanowi składową część wspomnianych modyfikacji. Ponadto Goldberg i Bernheim wykazali, że ilość wykrytego kwasu cytrynowego zależy w dużym stopniu od kwasoty środowiska utleniania i bromowania. W środowisku 8 N kwasu siarkowego Tausky i Schorr otrzymali wyniki dwukrotnie wyższe aniżeli w obecności 1 N kwasu siarkowego.

Współczynnik ekstynkcyj oznaczonego pięciobromoacetonu zależy również w dużym stopniu od użytego eteru naftowego (patrz 6 i 8); zarówno Pucher, jak i Tausky mimo ostrożnej destylacji odpowiedniej frakcji eteru naftowego nie zdołali ustabilizować wyników na jednym poziomie, jeżeli korzystali z eteru naftowego pochodzącego z różnych źródeł.

W toku opracowania optymalnych warunków do oznaczania kwasu cytrynowego zauważono, że pięciobromoaceton przechodzi nader łatwo ze środowiska wodnego do chloroformu. Fakt ten umożliwia szybkie oddzielenie pięciobromoacetonu od nadmanganianu i zezwala na redukcję tegoż związku i dwutlenku manganu nadtlenkiem wodoru, który będąc nierozpuszczalny w chloroformie nie może reagować z wytworzonym pięciobromoacetonem. W ten sposób odczynniki, które wpływają szkodliwie na pięciobromoaceton, a jednocześnie są niezbędne do utlenienia kwasu cytrynowego, pozbawia się możliwości ujemnego działania na końcowe ilościowe oznaczanie kolorymetryczne. Synteza pięciobromoacetonu odbywa się wprawdzie w środowisku wodnym, ale obecny w naczyniu chloroform ekstrahuje łatwo rozpuszczalny produkt utlenienia i bromowania kwasu cytrynowego nieomal w chwili jego powstawania i w ten sposób chroni od szkodliwego wpływu nadmiaru środków utleniających.

W celu kolorymetrycznego oznaczania pięciobromoacetonu wykorzystano reakcję rezorcynolową, opisaną przez Reicharda (13). Rezorcynol w alkalicznym środowisku wodnym tworzy z małymi ilościami pięciobromoacetonu (0,1 mg) piękny, wiśniowoczerwony barwnik. W opisanej metodzie reakcja ta została dostosowana do ilościowego mikrooznaczania kwasu cytrynowego.

W niniejszej pracy opisano prostą i wygodną metodę utlenienia i bromowania kwasu cytrynowego do pięciobromoacetonu i opracowano nowe ilościowe kolorymetryczne oznaczanie pięciobromoacetonu w postaci czerwonego barwnika z rezorcynolem. Metoda zezwala na oznaczenie od 0,5 do 40 γ kwasu cytrynowego z dokładnością $\pm 5\%$ i może być stosowana do oznaczenia kwasu cytrynowego w materiale roślinnym i zwierzęcym, przy czym wymaga ona tylko bardzo prostych odczynników i podstawowej aparatury.

Odczynniki

I. Kwas siarkowy około 9N: 200 ml stężonego kwasu siarkowego o c. wł. 1,84 rozcieńczyć wodą destylowaną do 1000 ml.

II. Bromek potasowy: 1 g bromku potasowego rozpuścić w 100 ml wody destylowanej.

III. Nadmanganian potasowy: 0,7 g nadmanganianu potasowego rozpuścić w 100 ml wody destylowanej.

IV. Chloroform: chloroform należy przedestyłować, aby nie zawierał żadnych nierozpuszczalnych w wodzie składników.

V. Nadtlenek wodoru: 3% roztwór handlowy.

VI. Bufor fosforanowo-węglanowy: a) węglan sodowy: nasycony roztwór bezwodnego węglanu, b) fosforan sodowy dwuzasadowy: nasycony roztwór $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 50 ml roztworu *a* zmieszać z 100 ml roztworu *b* i zagotować z małą ilością węgla aktywnego. Sączyć na zimno i przechować w ciemnej butelce.

VII. Rezorcynol: 1,25 g rezorcynolu rozpuścić w 50 ml wody destylowanej, zagotować do wrzenia z małą ilością węgla aktywnego, przesączyć na zimno i przechować w ciemnej butelce. Rezorcynol w roztworze łatwo ulega utlenieniu do ciemno zabarwionych chinonowych związków już po upływie kilkunastu godzin. Z tego powodu należy sporządzać codziennie świeży odczynnik.

VIII. Siarczan amonowy: 50 g siarczanu amonowego rozpuścić w 1000 ml wody destylowanej.

IX. Kwas cytrynowy: rozpuścić 50 mg bezwodnego albo 54,7 mg uwodnionego kwasu cytrynowego w 10 ml około 1 N kwasu siarkowego, przenieść do kolby miarowej o pojemności 100 ml i dopełnić wodą desty-

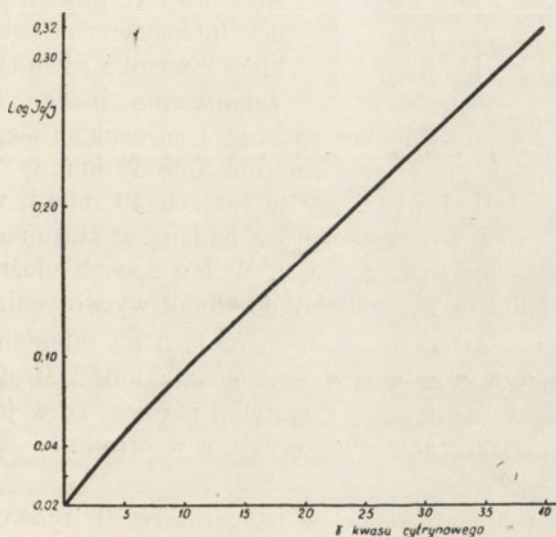
lowaną. Dowolne rozcieńczenia kwasu cytrynowego można sporządzić ze standardowego roztworu, przy czym należy dodać kilka ml rozcieńczonego kwasu siarkowego w celu zabezpieczenia płynu przed drobnoustrojami.

Część doświadczalna

Do 5 ml roztworu zawierającego kwas cytrynowy w granicach od 0,5 do 40 γ dodaje się w rozdzielaczu gruszkowym o pojemności 100 ml 1 ml kwasu siarkowego (I), 0,5 ml bromku potasowego (II), 2 ml chloroformu (IV) i 0,5 ml nadmanganianu (III). Po założeniu szczelnego korka szklanego wstrząsa się energicznie zawartość rozdzielacza i pozostawia na około 2 minuty wstrząsając od czasu do czasu. Następnie wlewa się do rozdzielacza około 10 — 20 ml wody destylowanej i redukuje nadmiar nadmanganianu i dwutlenek manganowy za pomocą 2 — 3 kropeł nadtlenku wodoru (V). Chloroform odpuszcza się do „wysokiej“ zlewki jenajskiej o pojemności 50 ml. Wodny roztwór w rozdzielaczu przemywa się dwukrotnie, wytrząsając 2 ml i 1 ml chloroformu. Połączone roztwory chloroformu zawierają cały pięciobromoaceton jak również wolny brom. Chloroform należy odparować na płytce elektrycznej, przy czym zlewkę utrzymuje się stale w ruchu i od czasu do czasu unosi ponad płytkę mieszając zawartość zlewki, aby zapobiec przegrzaniu się roztworu. Z przegrzanych roztworów, ulatnia się pewna ilość pięciobromoacetonu i wyniki otrzymane w tych warunkach są systematycznie za niskie. Podczas odparowania chloroformu brom ulatnia się całkowicie. Po upływie około 2 minut, kiedy na dnie zlewki znajdują się zaledwie 2 — 3 krople chloroformu, zlewkę należy natychmiast chłodzić pod bieżącą wodą. W wyniku skraplania podczas chłodzenia zlewka zawiera kilka kropeł chloroformu, który należy prawie w całości szybko odparować w temperaturze pokojowej przez dmuchanie lub przez szybkie kołowe poruszanie naczyniem. Do zlewki zawierającej zazwyczaj jeszcze jedną kroplę chloroformu dodaje się z kapilarnej pipety 0,2 ml buforu (VI) i miesza, aby zwilżyć całe dno zlewki. Po ulotnieniu się ostatnich śladów chloroformu dodaje się 1 ml rezorcynolu (VII), wstrząsa i dokładnie po upływie 1 minuty dodaje z odpowiednio kalibrowanej pipety 3,8 ml roztworu siarczanu amonowego (VIII). Następnie przenosi się szybko zawartość zlewki do kolorymetrycznej probówki, zamyka szczelnie korkiem, wstawia do mieszaniny tłuczonego lodu z wodą o temperaturze od 0 — 2 $^{\circ}$ i po upływie 10 minut oznacza przepuszczalność światła przez zabarwiony roztwór w fotokolorymetrze *Leitz*a, stosując filtr C (niebieski). Zawartość kwasu cytrynowego w badanej próbie odczytuje się wobec identycznie przygotowanej ślepej odczynnikowej, nastawionej na 100% przepuszczalności. Otrzymany barwnik nie jest trwały w temperaturze pokojowej i znika powoli już po upływie 15 minut. Z drugiej strony rezorcynol ulega powolnemu utlenieniu na powietrzu w temperaturze pokojowej, powodując ciemnienie bada-

nego roztworu. Natomiast w temperaturze od 0 — 20° barwny kompleks rezorcynolu z pentabromoacetonem nie ulega szybkiemu rozkładowi, a rezorcynol utlenia się bardzo powoli nawet po upływie 1/2 godziny w warunkach opisanych w metodzie. Maksimum intensywności zabarwienia osiąga się dopiero po upływie kilku minut, pomiary należy przeto przeprowadzić nie przed upływem 5 minut i nie po upływie 15 minut. W praktyce ślepa odczynnikowa wystarczy sporządzić raz dziennie, jest ona bowiem nieznaczna i nie różni się od odczytów czystego siarczanu amonowego.

W granicach od 8 do 40 γ kwasu cytrynowego otrzymuje się w wyżej opisanych warunkach w aparacie *Leitza*, filtr C wykres zgodnie z prawem Beera-Lamberta. W granicach poniżej 8 γ odczyty leżą na krzywej i dla każdego kolorymetru należy sporządzić krzywą wzorcową, wynikającą z oznaczenia około 10 stężeń kwasu cytrynowego w granicach od 0,5 do 40 γ (Rys. 1).



Rys. 1

W tabelicy 1 podane są wyniki analiz czystego kwasu cytrynowego (średnia z 5 oznaczeń), wykonanych nową metodą.

W tabelicy 2 podane są wyniki, które wykazują wpływ temperatury i czasu na utlenianie rezorcynolu w warunkach wyżej opisanych jak również wpływ na barwny kompleks pięciobromoacetonu z rezorcynolem w silnie zbuforowanym środowisku alkalicznym.

Jak wynika z tabelicy 2, rezorcynolowa ślepa odczynnikowa w temperaturze 0 — 20° nie ulega utlenieniu w czasie 30 minut i nawet po upływie 2 godzin ilość utlenionego rezorcynolu do barwnych chinonowych związków jest bardzo nieznaczna. Ta sama ślepa odczynnikowa w temperaturze 22° ulega powolnemu, ale stałemu utlenieniu. Jak wynika z kolumny III i IV

Tablica 1
Oznaczenie kwasu cytrynowego
nową metodą

| Użyto γ | Wykryto γ | Wykryto w % |
|------------|--------------|----------------|
| 40,0 | 40,25 | 100,6 |
| 30,0 | 30,25 | 100,8 |
| 20,0 | 19,50 | 97,5 |
| 16,0 | 15,75 | 98,4 |
| 12,0 | 12,00 | 100,0 |
| 8,0 | 7,75 | 96,9 |
| 4,0 | 3,82 | 95,4 |
| 2,0 | 1,92 | 96,0 |
| 1,0 | 1,05 | 105,0 |
| 0,5 | 0,53 | 106,0 |

tablicy 2, kompleks pięciobromoacetonu z rezorcynolem w temperaturze 22° jest nietrwały, ponieważ już po 10 minutach straty wynoszą przeszło 10%, a po 2 godzinach przeszło 40% (procent obliczono w odniesieniu do cyfry 48, którą otrzymuje się w warunkach pracy opisanych w części doświadczalnej). W temperaturze od 0—2° barwnik jest względnie trwały, a intensywność zabarwienia roztworu nie ulega żadnym zmianom w granicach od 5 — 90 minut (kolumna VII tablicy 2). Dopiero po upływie 2 godzin daje się zauważyć pewien nieznaczny spadek intensywności zabarwienia. Z tablicy 2 wynika również, że maksimum zabarwienia osiąga się dopiero po upływie 5 minut i że odczyty bez sporządzania osobnej ślepej próby mogą być bezpiecznie wykonane w granicach od 5 do 30 minuty. W wypadku jeżeli odczyt nie może być wykonany w ramach 30 minut, wówczas należy sporządzić ślepa próbę i odczytać próbę badaną w stosunku do ślepej, nastawionej na 100% przepuszczalności. W ten sposób można wykonać pomiary nawet po upływie 1½ godziny od chwili wytworzenia barwnika.

Siarczan amonu działa wybitnie hamująco na utlenianie rezorcynolu. W tablicy 3 umieszone są odczyty przepuszczalności ślepych odczynnikowych sporządzonych identycznie z tą tylko różnicą, że w jednym wypadku dodano 3,8 ml 5% siarczanu amonowego, a w drugim — 3,8 ml wody destylowanej.

Jak wynika z tablicy 3, nawet w temperaturze 0° rezorcynol ulega bardzo szybkiemu utlenieniu, jeżeli roztwór nie zawiera siarczanu amonowego.

Jak wiadomo, duże ilości glukozy, fruktozy i innych cukrów redukujących przeszkadzają w ilościowej syntezie pięciobromoacetonu i tym samym uniemożliwiają oznaczenie kwasu cytrynowego. Cukry te bowiem powoli redukują nadmanganian w kwaśnym środowisku i zmieniają stosunek tego odczynnika do bromku potasowego, który powinien być utrzymany w celu ilościowego utlenienia kwasu cytrynowego do pięciobromoacetonu. E t t i n g e r i współpracownicy zauważyli, że synteza pięciobromoacetonu przebiega normalnie, jeżeli badany roztwór nie zawiera ponad 0,5% glukozy lub fruktozy. To spostrzeżenie zostało potwierdzone w naszym laboratorium i zawartość 20 mg glukozy w 5 ml badanej próby nie wpływa ujemnie na oznaczanie kwasu cytrynowego.

Tablica 2

Wpływ temperatury i czasu na utlenienie rezorcynolu i na barwny kompleks pięciobromoacetonu

| Czas w minutach | Przepuszczalność | | | | | | | |
|-----------------|------------------|-----------|-------------------------------|---------|------------------|-----------|-------------------------------|---------|
| | Temperatura 22° | | | | Temperatura 0—2° | | | |
| | pr. ślepa | pr. pełna | II przy I na 100% przepuszcz. | III—w % | pr. ślepa | pr. pełna | II przy I na 100% przepuszcz. | III—w % |
| | I | II | III | IV | V | VI | VII | VIII |
| 0 | 100 | 51 | 51 | 93,8 | 100 | 51 | 51 | 93,8 |
| 5 | 97 | 50 | 53 | 89,6 | 100 | 48 | 48 | 100 |
| 10 | 95 | 48 | 53 | 89,6 | 100 | 48 | 48 | 100 |
| 15 | 94 | 50 | 56 | 83,3 | 100 | 48 | 48 | 100 |
| 30 | 94 | 51 | 57 | 81,3 | 100 | 48 | 48 | 100 |
| 60 | 90 | 52 | 62 | 70,8 | 99 | 47 | 48 | 100 |
| 90 | 88 | 52 | 64 | 66,7 | 98 | 46 | 48 | 100 |
| 120 | 84 | 52 | 68 | 58,4 | 97 | 46 | 49 | 97,9 |

Tablica 3

Wpływ siarczanu amonu na utlenianie rezorcynolu

| Czas w minutach | Przepuszczalność | | | |
|-----------------|------------------|------|----------------|------|
| | Temperatura | | | |
| | 22° | | 0° | |
| | Siarczan amonu | Woda | Siarczan amonu | Woda |
| 0 | 100 | 99 | 100 | 99 |
| 5 | 97 | 89 | 100 | 93 |
| 10 | 95 | 75 | 100 | 87 |
| 15 | 94 | 64 | 100 | 82 |
| 20 | — | 54 | 100 | 78 |
| 30 | 94 | — | 100 | 68 |

W materiale roślinnym praktycznie nie spotykamy się z takimi stężeniami cukrów redukujących, które mogłyby przeszkodzić w syntezie pięciobromoacetonu z kwasu cytrynowego. Zwykle do analizy sporządza się wyciągi

zawierające od 0,1% do 1,0% materiału roślinnego. Gdyby nawet dana roślina zawierała 10% cukrów redukujących, wówczas przy sporządzeniu 1% wyciągu 5 ml roztworu pobranego do analizy zawierałoby zaledwie 5 mg cukru. Mimo to w praktyce analiz farmaceutycznych lub przetwórstwa rolnego można czasem spotkać się z koniecznością oznaczenia bardzo małych ilości kwasu cytrynowego w obecności dużych stężeń cukrów redukujących.

W tablicy 4 umieszczone są cyfry, które wykazują, że w roztworach zawierających 0,8% glukozy (40 mg na 5 ml) wyniki oznaczania kwasu cytrynowego są przeszło o 20% za niskie. Natomiast stężenia 0,4% glukozy (20 mg na 5 ml) nie wpływają ujemnie na ilościowe oznaczanie tego kwasu. Trudności wynikające z dużych stężeń glukozy można wyeliminować w sposób nader prosty, a mianowicie przez odpowiednie rozcieńczenie badanego roztworu wodą destylowaną, tak aby przed utlenieniem i bromowaniem kwasu cytrynowego stężenie cukrów redukujących nie przekraczało 0,4%.

Tablica 4

Wpływ stężenia glukozy na oznaczanie kwasu cytrynowego

| Kwas cytrynowy w γ | Mg glukozy w 5 ml próby | Dodano ml wody przed utlenieniem | Wykryto kwas cytrynowy w γ |
|---------------------------|-------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| 30,0 | — | — | 30,25 |
| 30,0 | 20 | — | 30,0 |
| 30,0 | 40 | — | 24,50 |
| 30,0 | 80 | 15 | 30,25 |

Zastosowanie metody do oznaczania kwasu cytrynowego w materiale biologicznym

Zastosowanie metody do oznaczenia kwasu cytrynowego w materiale biologicznym przebadano przede wszystkim na moczu ludzkim. Zarówno Pucher, Sherman i Vickery, jak i Wolcott i Boyer zwracają baczną uwagę na konieczność oczyszczania moczu przez gotowanie z rozcieńczonym kwasem siarkowym i bromowanie przed syntezą pięciobromoacetonu z kwasu cytrynowego w celu usunięcia lotnych związków i rozłożenia substancji, które wchodzi w związek z bromem i są powodem zbyt wysokich odczytów. Ettinger i współpracownicy opuścili oczyszczanie badanych roztworów w swojej metodzie, jednak nie przytoczyli dowodów doświadczalnych na to, że gotowanie w kwasie siarkowym i wstępne bromowanie mogą być zaniechane. Wyniki umieszczone w tablicy 5 wykazują, że za pomocą wyżej opisanej metody można oznaczyć kwas cytrynowy w moczu nieoczyszczanym i że bromopochodne substancji występujących w moczu nie przeszkadzają w oznaczaniu pięciobromoacetonu. W moczu spotyka się

często substancje, które są utleniane nadmanganianem potasowym, dlatego należy przy syntezie pięciobromoacetonu odmierzyć 0,8 — 1,0 ml nadmanganianu zamiast normalnie stosowanych 0,5 ml.

T a b l i c a 5
Oznaczenie kwasu cytrynowego
w moczu ludzkim (mocz 5 razy rozcieńczony)

| Mocz w ml | Oczyszczanie | Dodano kwasu cytrynowego w γ | Wykryto w γ | Wykryto dodany kwas cytrynowy w γ |
|-----------|-------------------|-------------------------------------|--------------------|--|
| 0,2 | — | — | 11,75 | — |
| 0,2 | kw. siarkowy | — | 11,50 | — |
| 0,2 | kw. siarkowy brom | — | 11,75 | — |
| 0,2 | — | 2,0 | 14,00 | 2,25 |
| 0,2 | — | 8,0 | 19,75 | 8,00 |

W tabelicy 6 podane są wyniki oznaczania kwasu cytrynowego w materiale pochodzenia roślinnego i zwierzęcego, wykonane nową metodą. W większości przypadków oznaczenie przeprowadzono na materiale odbiałczanym przed analizą. Najbardziej odpowiednim odczynnikiem odbiałczającym okazał się wolframian sodowy z kwasem siarkowym — odczynnik Folina — Wu. 10 gr świeżego materiału roślinnego homogenizowano 6 razy po 30 sekund w homogenizatorze marki „Cyklon“ z około 50 ml wody destylowanej i przenoszono ilościowo po przesączeniu przez gazę do kolbki miarowej o pojemności 100 ml. Po przemyciu homogenizatora i sączka z gazy dopełniono zawartość kolbki do 100 ml. 5 ml roztworu odbiałczano w suchej probówce w znany sposób za pomocą 2 ml 10% wolframianu sodowego i 2 ml 1 N kwasu siarkowego. Po dodaniu pipetą 1 ml wody destylowanej sączono przez twardy sączek do suchej próbki i 5 ml absolutnie klarownego roztworu rozcieńczano w miarę potrzeby do 50, 100, lub 200 ml. Do oznaczania kwasu cytrynowego pobierano 5 ml roztworu, który oznaczano w sposób opisany w części doświadczalnej.

Dyskusja

Wszyscy autorzy opracowanych metod oznaczania kwasu cytrynowego na zasadzie reakcji pięciobromoacetonowej zgodnie podkreślają, że nadmiary nadmanganianu i bromku potasowego są przyczyną zbyt wysokich wyników, natomiast ilości mniejsze obniżają syntezę pięciobromoacetonu, przez

Tablica 6
Kwas cytrynowy oznaczony nową metodą

| Material | Rozcieńczenie w gr na ml wody | Wykryto γ | Obliczono w % |
|----------------------------|----------------------------------|--------------|------------------|
| Mleko* | 10/5000 | 8,75 | 0,087 |
| Mleko* | 10/2500 | 17,75 | 0,089 |
| Pomidory | 10/10000 | 20,5 | 0,410 |
| Cebula* | 10/2000 | 27,25 | 0,109 |
| Ziemniaki* | 10/4000 | 31,00 | 0,248 |
| Gruszka | 10/4000 | 5,00 | 0,040 |
| Młode ziarna kukurydzy* | 10/4000 | 11,25 | 0,090 |
| Wiśnie | 10/2000 | 5,75 | 0,023 |
| Liście kalafio- ra* | 10/4000 | 35,50 | 0,284 |
| Róża kalafio- ra* | 10/4000 | 8,75 | 0,070 |
| Kapusta* | 10/4000 | 12,00 | 0,096 |
| Ogórek | 10/2000 | 1,25 | 0,005 |
| Śliwka | 10/2000 | 4,00 | 0,016 |
| Marchew | 10/2000 | 4,50 | 0,018 |
| Jablko | 10/2000 | 0,00 | 0,000 |
| Burak cukr. | 10/2000 | 11,25 | 0,045 |

Produkty zaopatrzone gwiazdką były odbiałczane, pozostałe oznaczane były bezpośrednio w zhomogenizowanym materiale.

co wyniki dla kwasu cytrynowego wypadają za nisko. Większość autorów również zaleca chłodzenie prób poniżej 15° w toku całego oznaczania i uważa, że dodawanie nadmanganianu kroplami jest podstawowym warunkiem otrzymywania dokładnych wyników. Jak wynika z opisu nowo opracowanej metody, ilości dotychczas stosowanego nadmanganianu i bromku potasowego są około 25 razy za wysokie i mogą być odpowiednio zredukowane bez uszczerbku dla ilościowej syntezy pięciobromoacetonu. Przestrzeganie niskiej temperatury, dodawanie nadmanganianu kroplami i przesadnie dokładne utrzymywanie stosunku nadmanganianu do bromku potasowego okazały się w nowej metodzie niepotrzebne. Utlenianie i bromowanie kwasu cytrynowego w obecności chloroformu umożliwi bowiem ekstrakcję pięciobromoacetonu prawie w chwili jego powstawania. W ten sposób szkodliwy wpływ nadmiaru odczynników utleniających, jak nadmanganianu i nadtlenku wodoru, oraz ujemny wpływ temperatury pokojowej zostały wyeliminowane.

Nadmiar bromu, zwłaszcza w środowisku chloroformu, jest na pewno nieszkodliwy, bowiem wraz z pięciobromoacetonem przedostaje się do chloroformu brom w ilościach kilkaset razy większy, aniżeli ilość potrzebna do bromowania mikroilości kwasu cytrynowego. Brom ulatnia się całkowicie podczas odparowania chloroformu, nie przeszkadza przeto w końcowym oznaczeniu pięciobromoacetonu przez przyspieszenie utlenienia rezorcynolu w środowisku zasadowym.

Piękna reakcja Reichtarda pięciobromoacetonu z rezorcynolem w obecności wodorotlenku sodowego nie nadaje się do ilościowego oznaczania kwasu cytrynowego, ponieważ w obecności silnych zasad rezorcynol utlenia się bardzo szybko do ciemno zabarwionych związków chinonowych. W toku opracowania metody zauważono, że jon amonowy w dużym stopniu hamuje utlenianie rezorcynolu, szczególnie w temperaturze 0°. Hamowanie to jest jednak niekompletne i dopiero stosowanie nasyconego dwuzasadowego fosforanu w temperaturze 0° wytwarza warunki, w których ślepa odczynnikowa nie ulega żadnym zmianom przez okres 1 godziny. W celu uzyskania absolutnie bezbarwnej ślepej odczynnikowej należy koniecznie świeży roztwór rezorcynolu sporządzać codziennie, przy czym należy dodatkowo odbarwić roztwór węglem aktywowanym. Bufor fosforanowo-węglanowy powinien również być odbarwiony węglem aktywowanym i przechowanym w ciemnej butelce. Ten sposób przygotowania odczynników zmniejsza zabarwienie ślepej odczynnikowej do minimum do tego stopnia, że równa się ona ślepej sporządzonej z wody destylowanej.

Opisana metoda zezwala na szybkie oznaczenie kwasu cytrynowego i potrzebny czas do wykonania analizy w roztworach kwasu cytrynowego nie przekracza 20 minut. Pełne oznaczenie w materiale roślinnym lub zwierzęcym, łącznie z homogenizowaniem i odbiałczaniem, nie wymaga więcej niż 40 minut czasu. Dokładność metody wynosi $\pm 5\%$, jednak oznaczanie kwasu cytrynowego w ilościach od 0,5 do 1 γ wymaga pewnej wprawy i dużej staranności w wykonaniu analiz.

Za wydatną pomoc w wykonaniu wielu analiz wyrażam inż. J. Buchowiczowi serdeczne podziękowanie.

LITERATURA

1. A. Cahours: *Ann. chim.* **19**, 484, 1847.
2. L. Stahre: *Z. anal. Chem.* **36**, 195, 1897.
3. R. Kunz: *Arch. Chem. u. Mikr.* **7**, 285, 1914.
4. P. A. Komentiani: *Z. anal. Chem.* **86**, 359, 1931.
5. G. W. Pucher, C. C. Sherman, H. B. Vickery: *J. Biol. Chem.* **113**, 235, 1936.
6. G. W. Pucher: *J. Biol. Chem.* **153**, 133, 1944.
7. A. S. Goldberg, A. R. Bernheim: *J. Biol. Chem.* **156**, 33, 1944.
8. H. H. Tausky, E. Schorr: *J. Biol. Chem.* **169**, 103, 1947.
9. G. H. Wolcott, P. D. Boyer: *J. Biol. Chem.* **172**, 729, 1948.

10. S. Natelson, J. B. Pincus, J. K. Lugovoy: *J. Biol. Chem.* **175**, 745, 1948.
11. R. H. Ettinger, L. R. Goldbaum, L. H. Smith: *J. Biol. Chem.* **199**, 531, 1952.
12. K. Fujiwara: *Sitzungsber. Naturforsch.* — *Ges. Rostock* **6**, 33, 1916.
13. O. Reichard: *Z. anal. Chem.* **86**, 359, 1931.

Streszczenie

1. Opisano nową kolorymetryczną mikrometodę oznaczania kwasu cytrynowego w materiale roślinnym i zwierzęcym.

2. Metoda zezwala na oznaczenie kwasu cytrynowego w granicach od 0,5 do 40,0 γ z dokładnością $\pm 5\%$.

3. Zasada metody polega na reakcji pięciobromoacetonowej w obecności chloroformu. Obecność chloroformu zezwala na szybkie oddzielenie pięciobromoacetonu od nadmanganianu i nadtlenu wodoru, odczynników, które w nadmiarze wpływają ujemnie na końcowe oznaczenie kwasu cytrynowego.

4. Różowoczerwone zabarwienie, które powstaje w wyniku reakcji między pięciobromoacetonem i rezorcynolem w środowisku zasadowym, stanowi podstawę kolorymetrycznego oznaczania kwasu cytrynowego wg opisanej metody.

5. Wg opisanej metody można oznaczyć kwas cytrynowy w czasie nie przekraczającym 40 minut.

6. Opisana metoda jest prosta, szybka, nie wymaga żadnej aparatury poza kolorymetrem i z tego powodu nadaje się do masowego oznaczania kwasu cytrynowego w materiale roślinnym i zwierzęcym.

НОВЫЙ МЕТОД МИКРООПРЕДЕЛЕНИЯ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ

Содержание

1. Описан новый колориметрический микрометод определения лимонной кислоты в растительном и животном материале.

2. Метод позволяет определить лимонную кислоту в пределах от 0,5 до 40,00 γ с точностью $\pm 5\%$.

3. Метод основан на реакции пятибромацетона в присутствии хлороформа. Присутствие хлороформа позволяет быстро отделить пятибромацетон от перманганата и перекиси водорода, которые в избыточном количестве плохо влияют на конечное определение лимонной кислоты.

4. Розово-красный цвет возникающий в результате реакции пятибромацетона с резорцином в щелочной среде является сущностью колориметрического определения лимонной кислоты по вышеуказанному методу.

5. По данному методу можно определить лимонную кислоту в течении времени не превышающем 40 мин.

6. Этот метод прост, быстр, не требует никакой аппаратуры кроме ко-

лориметра и поэтому пригоден для массового определения лимонной кислоты в растительном и животном материале.

A NEW METHOD FOR THE MICRODETERMINATION OF CITRIC ACID

S u m m a r y

1. A new colorimetric micromethod for the determination of citric acid in plant and animal material has been described.

2. Quantities between 0,5 and 40,0 γ of citric acid can be determined with an accuracy of $\pm 5\%$.

3. The method is based upon the pentabromoacetone reaction in presence of chloroform which permits a rapid separation of this compound from permanganate and hydrogen peroxide. The presence of these reagents in excess interferes with the ultimate determination of citric acid.

4. A rose-red colour develops when pentabromoacetone reacts with resorcinol in alkaline medium which is used as the basis for the colorimetric determination of citric acid.

5. The time for the complete estimation of citric acid does not exceed 40 minutes.

6. The described method is simple, quick and with the exception of the colorimeter does not require any additional apparatus. For this reason it may be applied for mass analyses of citric acid in material of plant and animal origin.

J. JANICKI i J. PAWELKIEWICZ

WYTWARZANIE NOWEJ WITAMINY (WITAMIN) GRUPY B₁₂ PRZEZ BAKTERIE KWASU PROPIONOWEGO

Doniesienie tymczasowe

Z Zakładu Biochemii Żywności, Katedra Technologii Rolnej Wyższej Szkoły Rolniczej
w Poznaniu

Kierownik Katedry: prof. dr J. Janicki

Od chwili wyodrębnienia witaminy B₁₂ z wątroby zwierzęcej oraz z różnych mikroorganizmów (1) wyizolowano i opisano szereg substancji biosyntetyzowanych przez drobnoustroje, spokrewnionych z witaminą B₁₂, różniących się jednak od niej szeregiem własności fizycznych, chemicznych i biochemicznych.

Smith i inni znaleźli w płynach fermentacyjnych promieniowców *Streptomyces griseus* czynnik przeciwanemiczny, nazwany przez nich witaminą B_{12c} (2).

Lewis, Tappan i Elvehjem wyodrębnili z kału szczurów aktywny związek, zachowujący się w badaniach mikrobiologicznych jak witamina B₁₂. Nazwano ją witaminą B_{12f} (3).

Wijmenga wyizolował z kału świń mikrobiologicznie czynną witaminę B_{12m} (4).

Dion, Calkins i Piiffner z bakterii występujących w przewodzie pokarmowym cieląt otrzymali w stanie krystalicznym pseudowitaminę B₁₂, zwaną inaczej cjanoo-kobalaminą (5). Ci sami badacze donieśli o wyizolowaniu drugiej pseudowitaminy, nazwanej pseudowitaminą B_{12d}, z nieczystych preparatów krystalicznej pseudowitaminy B₁₂ (6).

Ford i Porter wyodrębnili z kału cieląt 4 substancje zachowujące się w próbach mikrobiologicznych jak witamina B₁₂. Jedną z nich zidentyfikowano jako witaminę B₁₂, 3 pozostałe stanowiły substancje pokrewne (frakcje A) cjanoo-kobalamina B i C (7). Witamina B_{12c} okazała się prostą pochodną witaminy B₁₂, a mianowicie azotyno-kobalaminą.

Pseudowitamina B₁₂ i B_{12d} według badań odkrywców różni się od witaminy B₁₂ obecnością adeniny bądź 2-metylo-adeniny w miejsce 5,6-dwu-

metylobenzimidazolu glukozydowo związanego w cząsteczce witaminy B₁₂ (8). Inne witaminy nie zostały do dziś bliżej scharakteryzowane.

W komunikacie niniejszym donosimy o wyizolowaniu nowej witaminy (witamin) grupy B₁₂ z bakterii kwasu propionowego. Lewiton i Hargrove (9) pierwsi zajęli się bakteriami kwasu propionowego, wytwarzającymi znaczne ilości witaminy B₁₂. Według ilościowych badań tych autorów, opartych na pomiarach mikrobiologicznych, szczep *Propionibacterium freudenreichi* (ATCC 6207) wytwarzał do 4 mg witaminy B₁₂ w 1 litrze pożywki w hodowlach mieszanych z *Lactobacillus casei*, a do 3 mg/l w hodowlach czystych. Dane stwierdzające labilność wytworzonej przez szczep witaminy na ogrzewanie jak również badania widmowe uzyskanych z nich koncentratów oraz badania chromatograficzne skłoniły autorów do wniosku, że głównym produktem syntezy jest witamina B_{12b} (maksymalna absorpcja 352 i 525 m μ ; 80% całości) obok mniejszych ilości witaminy B₁₂ (20%).

W badaniach naszych używaliśmy szczepu bakterii kwasu propionowego, fermentującego glukozę i laktozę, a nie fermentującego pentoz, sacharozę i skrobi, wytwarzającego kwas octowy i propionowy w przybliżonym stosunku 1:2. Na tej podstawie oraz na podstawie cech morfologicznych szczep określono jako *Propionibacterium shermanii* (10)¹⁾.

Stwierdziliśmy, że szczep ten wytwarza witaminy grupy B₁₂, z których tylko około 5% przypadało na witaminę B₁₂, resztę zaś na witaminę odrębną od witaminy B₁₂ czy witaminy B_{12b}.

Część doświadczalna

HODOWLA SZCZEPU

Do badań nad wytwarzaniem witamin grupy B₁₂ używano pożywki o następującym składzie: 60 ml kwaśnego hydrolizatu glutenu lub kazeiny, 2,5 g ekstraktu drożdżowego, 1,25 g namoku kukurydzianego, 1,0 ml 1% roztworu siarczanu kobaltowego, 4,5 g KH₂PO₄ i 20 g glikozy w 1 litrze roztworu. Pożywkę wyjaławiano w aparacie Kocha. Hydrolizaty glutenu i kazeiny przygotowywano w następujący sposób: 100 g glutenu lub kazeiny zadawano 1,5 l 20% HCl i gotowano 10 godzin pod chłodnicą zwrotną. Następnie produkt sączono i zagęszczano pod zmniejszonym ciśnieniem do gęstego syropu. Produkt rozpuszczano w ca. 1,5 l wody, zadawano 20 — 30 g węgla aktywowanego i ogrzewano. Następnie po 3 — 5 godzinach sączono przez lejek Büchnera. Hydrolizat doprowadzano 30% NaOH do pH 5 — 6, po czym uzupełniano wodą do objętości 2 l. Zliofilizowany szczep *Propionibacterium shermanii* wysiewano przez nakłucie na pożywkę agarową, stąd po ich rozmnożeniu się przenoszono do probówki z 25 ml płynnej pożywki (zawierającej tylko połowę zawartości glikozy), wstawiano do termostatu o temp.

¹⁾ Identyfikacji szczepu dokonała mgr Smurzyńska-Orłowska.

27 — 30°. Po 2 dniach uzyskanym inoculum zaszczipiano 100 ml normalnej pożywki. Po następnych 2 dniach 100 ml hodowlą zaszczipiano 1 l pożywki, a tą z kolei hodowlą butlę 10-litrową. Po 2 — 3 dniach hodowli w butlach 10-l (temp. 27 — 30°) kontrolowano pH. pH spadało zazwyczaj do wartości 4,5 — 5,0. Dodawano teraz jałowo nasycony roztwór węglanu sodu, by doprowadzić pH pożywki do 7 (ok. 200 ml/10 l), i jednocześnie dodawano 100 g glicerolu lub glikozy na każde 10 l pożywki. Czynność kontroli i korekty pH oraz dokarmianie przeprowadzano jeszcze raz po następnych 2 dniach hodowli. Po 7 — 10 dniach hodowli w butlach 10-litrowych — fermentację przerywano.

IZOLACJA I WŁASNOŚCI WITAMIN GRUPY B₁₂ IZOLOWANYCH Z BAKTERII KWASU PROPIONOWEGO

Zawiesinę bakterii z hodowli odwirowywano na wirówce typu Sharplesa, po czym witaminę wyodrębniano metodą uprzednio opracowaną (11), stosując czasami drobne modyfikacje, jak: słabe alkalizowanie eluatu z węgla do pH 7 zamiast 11, jak w cytowanej metodzie, lub wprowadzanie cjanków w innej fazie oczyszczania witaminy. Zmiany te nie miały istotnego wpływu na charakter otrzymywanego koncentratu. Niekiedy, w celu przekonania się, czy warunki uwalniania witaminy nie wywołują jej rozkładu, przeprowadzano uwalnianie witaminy z komórek bakteryjnych w inny sposób, jak w opisanej metodzie, a mianowicie na drodze ogrzewania do 110° zawiesiny bakterii w wodzie z dodatkiem NaCN przy pH 6,3. Na ogół jednak we wszelkich czynnościach izolowania witaminy unikano zbyt drastycznych warunków, jak wysokiej temperatury, zbyt wysokich lub niskich wartości pH.

Pierwszym rzucającym się w oczy spostrzeżeniem było stwierdzenie dużej stabilności form dwucjanowych otrzymywanych koncentratów witaminowych. Podczas gdy fioletowa barwa, typowa dla kompleksu dwucjanowego roztworu witaminy B₁₂, po zakwaszeniu do pH 6 lub niżej bardzo szybko znika i pojawia się barwa charakterystyczna dla witaminy B₁₂, koncentraty witamin uzyskane z bakterii kwasu propionowego zachowują w tych warunkach przez wiele dni barwę fioletową. Widmo absorpcyjne takiego roztworu było typowe dla formy dwucjanowej witaminy B₁₂ z maksimami absorpcji przy 542 — 544 i 582 m μ w części widzialnej widma. Gdyby w roztworze znajdowała się pierwotnie witamina B_{12b}, w warunkach takich musiałaby przejść w witaminę B₁₂. Stąd wypływał wniosek, że koncentraty witamin otrzymane z bakterii kwasu propionowego muszą zawierać inną witaminę z grupy B₁₂. W czasie dalszych procesów oczyszczania forma dwucjanowa ulegała rozkładowi, a barwa przechodziła w pomarańczową. Tak otrzymany koncentrat posiadał widmo absorpcyjne z maksimami dla fal o długościach 354 — 355, 498 m μ i słabszym dla fali 530 m μ . Widmo absorpcyjne przypomina widmo absorpcyjne witaminy B_{12b}. Uzyskane koncentraty mimo wysokiego stopnia czystości nie krystalizowały. Metodą chromatografii bibu-

łowej wykazano, że w koncentracji tym znajdują się niewielkie ilości witaminy B₁₂. Udało się również metodą chromatografii kolumnowej (tlenek glinu, 85% aceton) oddzielić od pozostałych witamin witaminę B₁₂, następnie wykrystalizować i bliżej zidentyfikować. Uzyskane po oddzieleniu witaminy B₁₂ koncentraty dodatkowo oczyszczano za pomocą p-chlorofenolu, po czym poddano bliższym badaniom.

W hydrolizacie koncentratu witamin nie znaleziono pochodnych benzimidazolu (12, 13). Stwierdzono obecność fosforu i kobaltu. Widmo absorpcyjne zmieniało się nieco wraz ze zmianami pH roztworu. W roztworach alkalicznych (pH 12) maksima przesunęły się w kierunku fal dłuższych (363, 520, 550 — 555 m μ), upodabniając widmo do widma witaminy B₁₂. Podobną zmianę wywoływał dodatek azydki lub azotynu sodu. Obniżenie pH do wartości 1 nie wpływało w sposób istotny na zmianę widma. Roztwór chloraminy T odbarwiał koncentrat, co odróżniało również zawartą w nim witaminę od witaminy B₁₂, która w tych warunkach daje fioletowo zabarwioną pochodną chlorowcową (14). Badania mikrobiologiczne, przeprowadzone za pomocą *E. coli mutans* (15), wykazały wysoką aktywność otrzymanej witaminy, przewyższającą 2 — 4-krotnie aktywność witaminy B₁₂. Aktywność mierzono wielkością powierzchni strefy wzrostu *E. coli*, przy czym praktycznie zamiast wielkości powierzchni ważono wykrojone plamy wzrostu, uprzednio skopiiowane na kalce technicznej. Tę samą powierzchnię strefy wzrostu dawała wyizolowana witamina w stężeniach 2 — 4 razy mniejszych niż witamina B₁₂. Natomiast witamina ta okazała się zupełnie nieczynna w metodzie oznaczania witaminy B₁₂ za pomocą *Euglena gracilis* (16). Otrzymaną witaminę nazwano witaminą B_{12p} (od *Propionibacterium*). W dalszych doświadczeniach udało się również wyodrębnić inną witaminę o bardzo podobnym widmie absorpcyjnym o zdecydowanie kwaśnym charakterze. Należy więc przypuszczać, że mamy tu do czynienia z całą grupą witamin B_{12p}. Być może, że znaleziona przez Lewitona i Haggrova (9) w bakteriiach *Propionibacterium freudenreichii* witamina, określona przez nich jako witamina B_{12b}, jest identyczna z witaminą B_{12p}.

Streszczenie

Stwierdzono, że bakterie kwasu propionowego (*Propionibacterium shermanii*) obok nieznacznych ilości witaminy B₁₂ wytwarzają odrębną witaminę (lub witaminy), nazwaną witaminą B_{12p}. Do tej pory nie udało się otrzymać witaminy B_{12p} w stanie krystalicznym. Witamina B_{12p} nie zawiera ugrupowania benzimidazolowego w cząsteczce, daje stabilny w roztworze słabo kwaśnym kompleks dwucjanowy i jest około 2 — 4 razy aktywniejsza mikrobiologicznie (*E. coli*) od witaminy B₁₂, natomiast nieczynna w doświadczeniach z *Euglena gracilis*.

Składamy serdeczne podziękowanie prof. dr Karnickiej z Olsztyna za uży-

czenie nam szczepu bakterii kwasu propionowego oraz asystentowi technicznemu naszej Katedry — B. Kosmowskiemu za pomoc przy wykonywaniu tych prac.

LITERATURA

1. E. L. Rickes, N. G. Brink, F. R. Koniuszy, T. R. Wood, K. Folkers: *Science* **107**, 396, 1948; **108**, 634, 1948; E. Lester Smith i L. F. N. Parker: *Biochem. J.* **43**, VIII, 1948.
2. E. Lester Smith, K. H. Fantes, S. Ball, J. G. Walter, W. B. Emery, W. K. Anslow i A. D. Walker: *Biochem. J.* **52**, 389, 1951.
3. U. J. Lewis, D. V. Tappan i C. A. Elvehjem: *J. Biol. Chem.* **194**, 539, 1952.
4. H. G. Wijmenga i W. L. Veer: *Chem. Weekblad*, **48**, 33, 1952.
5. J. J. Pfiﬀner, D. G. Calkins, R. C. Peterson, O. D. Bird, V. McGlohon: *Abstr. of 120 th. Meeting of Am. Chem. Soc. New York* 1951, 23c.
H. W. Dion, D. G. Calkins i J. J. Pfiﬀner: *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 1108, 1952.
6. H. W. Dion, D. G. Calkins i J. J. Pfiﬀner: *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 948, 1954.
7. J. E. Ford i J. W. G. Porter: *Biochem. J.* **51**, V, 1952.
8. N. G. Brink i K. J. Folkers: *J. Am. Chem. Soc.* **71**, 2951, 1949; **72**, 4442, 1950; **74**, 2856, 1952.
9. A. Lewiton i E. R. Hargove: *Ind. and Eng. Chem.*, **44**, 2651, 1952.
10. *Bergeys Manuals of Determinative Bacteriology*. W. Willkins, Baltimore 1948, str. 372.
11. J. Janicki, J. Pawełkiewicz, St. Stawicki, K. Szczebiotko, K. Z odrow: *Przemysł Chemiczny* **9**, 385, 1953.
12. N. G. Brink, K. Folkers: *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 4442, 1950.
13. J. G. Buchanan, A. W. Johnson, J. A. Mills i A. R. Todd: *J. Chem. Soc.* 2845, 1950.
14. J. Pawełkiewicz: *Acta Biochim. Pol.* **1**, 313, 1954.
15. J. Bogucka, J. Iwanowska, H. Kąkol: *Przem. Chemiczny*. **9**, 14, 512, 1953.
16. J. Janicki, J. Pawełkiewicz, St. Stawicki i K. Z odrow: *Przemysł Chemiczny*. **9**, 614, 1953.

ПРОИЗВЕДЕНИЕ НОВОЙ ВИТАМИНЫ ИЗ ГРУППЫ В₁₂ БАКТЕРИЯМИ
ПРОПИОНОВОЙ КИСЛОТЫ

Содержание

Установлено, что бактерии пропионовой кислоты (*Propionibacterium shermanii*) наряду с незначительными количествами витамина В₁₂ образуют иной витамин (или витамин) названный витамином В₁₂. До последнего времени не удалось получить витамина В₁₂ в кристаллическом виде. Витамин В_{12р} не содержит в молекуле бензилимидазольной группы, в слабо кислом растворе образует стабильное дициановое комплексное соединение и в 2—4 раза более микробиологически активен (*E. coli*) чем витамин В₁₂ и в тоже время неактивен в опытах с *Euglena gracilis*.

FORMATION OF NEW VITAMINS OF THE B₁₂ GROUP BY PROPIONIC ACID BACTERIA

S u m m a r y

It has been shown that, in addition to minor quantities of vitamin B₁₂, propionic acid bacteria (*Propionibacterium shermanii*) produce another vitamin which is referred to as B_{12p}. Thus far we have been unable to obtain this vitamin in the crystalline state. The new vitamin does not contain the benzimidazole group, forms in acid solution a stable complex containing two cyanide groups and is about 2—4 times as active microbiologically (*E. coli*) as Vitamin B₁₂, but inactive in *Euglene gracilis* test.

JERZY PAWELKIEWICZ

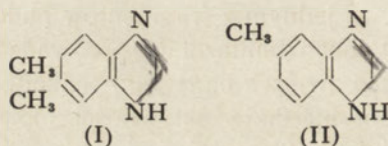
PREKURSORY BIOSYNTETY WITAMIN GRUPY B₁₂Synteza nowej witaminy z grupy B₁₂: 5,6-dwumetylobenzimidazolo-
cjano-kobalamininy*Z Zakładu Biochemii Żywności, Katedra Technologii Rolnej WSR w Poznaniu**Kierownik Katedry: prof. dr J. Janicki*

Odkąd stwierdzono, że jednym z fragmentów budowy cząsteczki witaminy B₁₂ jest 5,6-dwumetylobenzimidazol (1), prowadzono szereg prac, w których badano, czy sam ten związek bądź jego pochodne lub substancje blisko chemicznie spokrewnione nie mają aktywności biologicznej witaminy B₁₂. Emerson, Brink i inni (2) w doświadczeniach żywieniowych na szczurach wykazali, że 5,6-dwumetylobenzimidazol i 1,2-dwuamino-4,5-dwumetylobenzen posiadają aktywność witaminy B₁₂. Jednak dla uzyskania tego samego wzrostu zwierząt doświadczalnych dawki badanych związków musiały przewyższać około 10 000 razy ilości podawanej w diecie witaminy B₁₂. W tej samej pracy wykazano, że 5-metylobenzimidazol posiada również analogiczne własności, choć nieco słabiej zaznaczone. Brak aktywności biologicznej wykazał szereg następujących związków: benzimidazol, 1-metylo-, 2-metylo-, 4-metylo- oraz 4,6-dwumetylo-benzimidazol. 2,5-dwumetylobenzimidazol posiada nawet własności inhibitora wzrostu. Do podobnych wniosków dochodzą Cooperman i inni (3). Potwierdzają oni w doświadczeniach na szczurach i kurczętach biologiczną czynność 5,6-dwumetylobenzimidazolu i 1,2-dwuamino-4,5-dwumetylo-benzenu i zarazem stwierdzają, że najaktywniejszym związkiem jest 1- α -D-ribofuranozydo-5,6-dwumetylobenzimidazol, glukozydowe połączenie 5,6-dwumetylobenzimidazolu występujące w cząsteczce witaminy B₁₂. Natomiast szereg pochodnych o-fenylendwuaminy okazało się w badaniach Lambouya i Haleya (4) biologicznie nieczynnymi. Należą tu: 4-metylo-1,2-dwuaminobenzen, 4-etylo-1,2-dwuaminobenzen, 4,5-dwuetylo-1,2-dwuaminobenzen i 4-chloro-5-metylo-1,2-dwuaminobenzen.

Pierwszym badaczem, który zwrócił uwagę na możliwość wykorzystania 5,6-dwumetylobenzimidazolu przez drobnoustroje lub tkanki ustrojowe do biosyntezy witaminy B₁₂, był Sahaishi i inni (5). Wykazali oni, że do-

datek 20 mg 5,6-dwumetylobenzimidazolu na 1 litr pożywki syntetycznej Dulanaya zwiększa do 150% produkcję witaminy B₁₂ przez drobnoustroje z rodzaju *Streptomyces*. Stwierdzili oni również, że rozrtała miazga wątroby kurzej wykorzystuje 5,6-dwumetylobenzimidazol do syntezy substancji aktywnych. W badaniach tych aktywność oznaczano na drodze mikrobiologicznej. 5,6-dwumetylobenzimidazol i 1,2-dwuamino-4,5-dwumetylobenzen są same nieczynne wobec *Lactobacillus lactis Dorner* (2). Jednak dotychczas brak było bezpośrednich dowodów na to, że 5,6-dwumetylobenzimidazol bądź 1,2-dwuamino-4,5-dwumetylobenzen, bądź 5-metylobenzimidazol są wykorzystywane przez drobnoustroje czy tkanki organizmów wyższych do syntezy witaminy B₁₂.

W pracy niniejszej przedstawiono wyniki badań stwierdzających wykorzystywanie, 5,6-dwumetylobenzimidazolu (I) do syntezy witaminy B₁₂ przez bakterie kwasu propionowego. Podobnie 5-metylobenzimidazol (II)



związek, który okazał się również biologicznie czynny w doświadczeniach Emersona i innych (2), wykorzystywany jest przez bakterie kwasu propionowego do syntezy odpowiedniej pochodnej witaminy B₁₂: 5(6)-metylobenzimidazolo-cjano-kobalaminy. Następujące benzimidazole nie okazały się prekursorami biosyntezy odpowiednich witamin: 4,7-dwumetylo-, 2-propylo-4,7-dwumetylo-2-propylo-5-metylo-benzimidazol.

Leviton i Hargrove (6) pierwsi zwrócili uwagę na zdolność syntezy witaminy B₁₂ przez bakterie kwasu propionowego. Stwierdzili oni, że szczep *Propionibacterium-freudenreichi* (ATCC 6207) produkuje znaczne ilości witaminy B₁₂. Według badań tych autorów głównym produktem syntezy była witamina B_{12b}, obok mniejszych ilości witaminy B₁₂.

Analogiczne badania prowadzone w naszej pracowni wykazały, że szczep bakterii kwasu propionowego — którym dysponowaliśmy — oznaczony jako *Propionibacterium shermanii*, syntezuje obok tylko nieznacznych ilości witaminy B₁₂ inną, nie znaną dotychczas witaminę (lub witaminy) z grupy witamin B₁₂ (7). Witamina ta nie zawiera ugrupowania benzimidazolowego w cząsteczce. Nazwano ją witaminą B_{12p}.

Szczep *Propionibacterium shermanii* okazał się dogodnym obiektem dla badania prekursorów syntezy witamin grupy B₁₂. W obecności w pożywce wykorzystywanych benzimidazoli produkcja witaminy B_{12p} spada praktycznie do zera, a na jej miejsce pojawia się odpowiednia witamina z włączoną cząsteczką benzimidazolową.

Część doświadczalna

Związki użyte do doświadczeń:

5-metylobenzimidazol. Związek ten syntetyzowano wychodząc z p-toluidyny na następującej drodze: p-toluidyna → p-acetylotoluidyna → 2-nitro-4-metyloacetyloanilina → 2-nitro-4-metyloanilina → 4-metylo-1,2-dwuaminobenzen → 5-metylobenzimidazol. Reakcję nitrowania p-acetyloaniliny i hydrolizę otrzymanej pochodnej nitrowej przeprowadzano w następujący sposób: 32 g p-acetyloaniliny wprowadzano małymi porcjami do mieszaniny 200 ml stężonego kwasu azotowego i 80 ml stężonego kwasu siarkowego, oziębionej do temperatury -10° . W czasie wprowadzania acetylotoluidyny temperatura mieszaniny nitrującej nie przekraczała -5° . Po wprowadzeniu całości acetylotoluidyny ciecz mieszano jeszcze jedną godzinę, utrzymując temperaturę -5° , po czym produkt wlewano do wody z lodem (600 g). Wytrącony osad odsączano, przemywano wodą, następnie krystalizowano z wodnego acetonu. Otrzymaną 2-nitro-4-metylo-acetyloanilinę poddawano w całości hydrolizie. W tym celu produkt rozpuszczano w 180 ml etanolu, zadawano 160 ml wody i alkalizowano 20 ml 7n NaOH. Roztwór ogrzewano 1,5·godz. w temp. 80° . Po odstawieniu palnika, w miarę ostudzenia, krystalizowała 4-metylo-2-nitroanilina. T. t. $118,5^{\circ}$. Wydajność 65%. Redukcję nitroaniliny przeprowadzano za pomocą Zn i $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ w alkoholowo-wodnym roztworze NaOH lub za pomocą Sn i HCl (8). W ostatnim wypadku Sn usuwano za pomocą siarkowodoru, a roztwór chlorowodoru fenylendwuaminy zagęszczano w próżni do krystalizacji związku. 5-metylobenzimidazol otrzymano z 1,2-dwuamino-4-metylobenzenu metodą Phillipsa (9). Temperatura topliwości czystego związku 113° .

2-propylo-5-metylo-benzimidazol otrzymano w analogiczny sposób jak 5-metylobenzimidazol, ogrzewając 4-metylo-1,2-dwuaminobenzen z kwasem masłowym (*Merck puriss*) w 4n HCl. Produkt krystalizowano z wodnego alkoholu. Temperatura topliwości 158° .

4,7-dwumetylobenzimidazol otrzymano według Smitha i Steinleya (10) wychodząc z mieszaniny dwunitro-p-ksylenów. Mieszaninę dwunitro-p-ksylenów otrzymano wkraplając wśród energicznego mieszania 100 ml p-ksylenu (*British Drug Houses*) do 300 ml dymiącego kwasu azotowego. Naczynie z kwasem chłodzono zewnątrz wodą z lodem w ten sposób, by temperatura mieszaniny reagującej wahała się w granicach $20 - 30^{\circ}$. Po wkropleniu całości p-ksylenu, ciecz mieszano jeszcze pół godziny (25°), po czym wlewano do ca 1 l wody z lodem. Wytrącony osad — po przemyciu wodą i wysuszeniu — redukowano cyną i HCl. Po skończonej reakcji redukcji cynę usuwano siarkowodorem i po odsączeniu siarczków klarowny i bezbarwny przesącz zagęszczano pod zmniejszonym ciśnieniem do małej objętości. Z roztworu tego krystalizowały chlorowodorki odpowiednich

fenylenodwuamin. Temperatura topliwości 4,7-dwumetylobenzimidazolu 265 — 266° (266 — 267° wg Smitha i Steinleya) (10).

2-propylo-4,7-dwumetylobenzimidazol otrzymano ogrzewając mieszaninę wymienionych wyżej chlorowodorków p-dwumetylo-fenylenodwuamin z kwasem masłowym. Temperatura topliwości 218 — 219°.

5,6-dwumetylobenzimidazol. Związek ten otrzymano na drodze następujących przemian: p-nitrotoluen → 2-chlorometylo-4-nitrotoluen → 4-o-ksylidyna → 4,5-dwumetylo-acetyloanilina → 2-nitro-4,5-dwumetyloacetyloanilina → 2-nitro-4,5-dwumetyloanilina → 1,2-dwuamino-4,5-dwumetylo-benzen → 5,6-dwumetylo-benzimidazol.

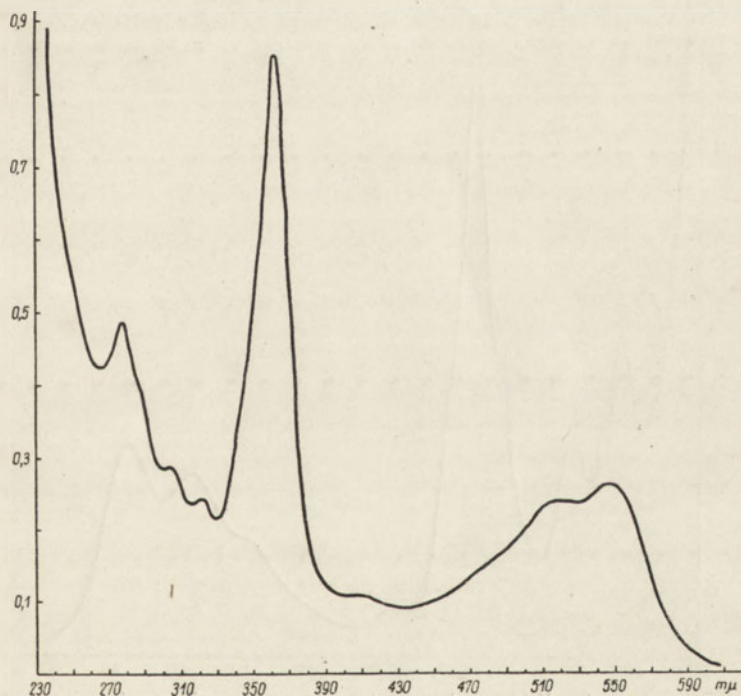
2-chlorometylo-4-nitrotoluen otrzymano kondensując p-nitrotoluen z eterem dwuchlorodwumetylowym metodą Sahashi i innych (11) w modyfikacji Berezowskiego i innych (12). Eter dwuchlorodwumetylowy otrzymano wg Schneidera (13). Redukcję 2-chlorometylo-4-nitrotoluenu przeprowadzono elektrolitycznie (14). Po przeprowadzeniu 4-o-ksylidyny w odpowiedni acetyloanilid za pomocą bezwodnika kwasu octowego dalszy szereg reakcji wykonano w sposób stosowany do otrzymywania 5-metylobenzimidazolu. Temperatura topliwości 5,6-dwumetylobenzimidazolu 206° (termometr ze skróconą skalą). Brink i Folkers (1b) podają 204—5°.

Wszystkie badania widmowe przeprowadzono na spektrofotometrze kwarcowym Unicam Cambridge model SP500.

Metoda badania prekursorów

Do 900 ml pożywki umieszczonej w kolbie jednolitrowej dodawano w sposób jałowy 20 mg odpowiedniego benzimidazolu, rozpuszczonego w rozcieńczonym roztworze kwasu solnego, po czym kolbę zaszczepiano 100 ml inoculum (2-dniowa hodowla bakterii kwasu propionowego). Po 7 — 10 dniach fermentacji, którą prowadzono wg metody opisanej w innym miejscu (7), zawiesinę bakterij odwirowywano i witaminy grupy B₁₂ izolowano, jak w opisanej uprzednio metodzie ilościowego oznaczania witaminy B₁₂ na drodze spektrofotometrycznej (15). Otrzymany koncentrat dodatkowo oczyszczano, ekstrahując witaminę z roztworu słabo zakwaszonego do pH 5,5, 35% roztworem fenolu w chloroformie i reekstrahując ją wodą po uprzednim oddestylowaniu w próżni chloroformu i zadaniu ekstraktu fenolowego 10-krotną objętością eteru. Następnie badano widmo absorpcyjne tak oczyszczonego koncentratu w zakresie fal długości 270 do 600 m μ . W próbie kontrolnej (bez dodatku prekursora) powstawała witamina B_{12p}, charakteryzująca się maksimami absorpcji (7) dla fal o długościach 355 i 500 m μ (słabe maksimum przy 530 m μ). Zmiana widma absorpcyjnego badanych prób świadczyła o wytworzeniu się innych witamin grupy B₁₂.

Z badanych prekursorów tylko 5,6-dwumetylo- i 5-metylo-benzimidazol wywołał zmianę widma absorpcyjnego z pojawieniem się maksimum dla fal o długościach 362 i 550 m μ (dla obu prób). Z tych też względów zajęto się szerzej badaniem tych prekursorów. We wstępnych badaniach ilościowych stwierdzono, że dodatek 20 mg 5,6-dwumetylobenzimidazolu na 1 l pożywki powoduje zwiększenie się ilości biosyntetyzowanych witamin o 60% w porównaniu z próbą kontrolną. W doświadczeniach tych wzrost stężenia badano wzrostem ekstynkcji otrzymanych koncentratów, zadanych nadmiarem NaCN dla fali o długości 582 m μ . W warunkach tych z badanych witamin tworzą się kompleksy dwucjanowe, posiadające dla tej długości fali maksimum absorpcji. Należy tu zaznaczyć, że analogiczne próby przeprowadzone w hodowlach promieniowca *Streptomyces griseus* (16) dały wynik negatywny. Dodatek 5,6-dwumetylobenzimidazolu nie wpływał na poziom wytwarzanej witaminy B₁₂.



Rys. 1. Widmo absorpcyjne witaminy B₁₂ wyodrębnionej z bakterii kw propionowego

Na osi rzędnych oznaczono wartości ekstynkcji (gęstości optycznej)
Na osi odciętych długość fal w milimikronach.

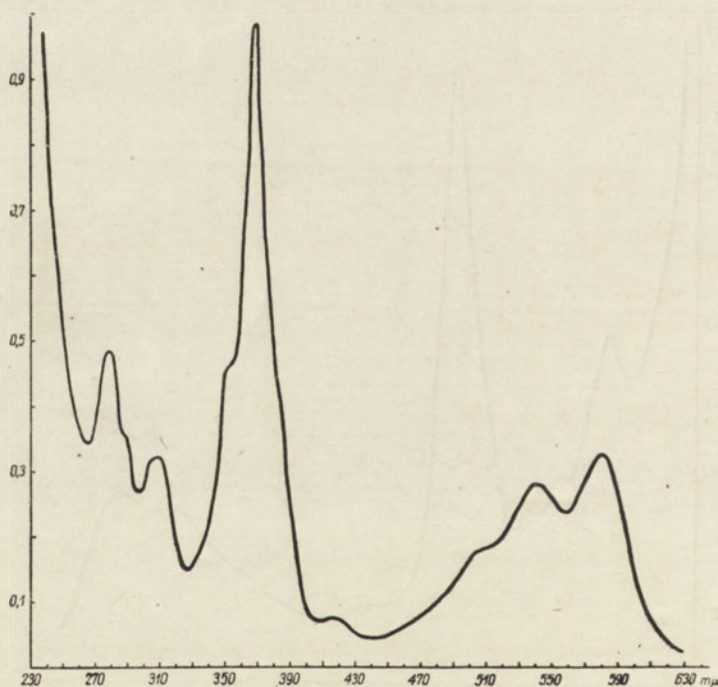
IZOLOWANIE WITAMIN

W celu izolowania powstałych witamin grupy B₁₂, wytworzonych przez bakterie kwasu propionowego na pożywce zawierającej 5,6-dwumetylo- lub

5-metylo-benzimidazol, nastawiono 100 litrowe hodowle (w kolbach po 10 l), dodano 2,00 g odpowiedniego prekursora i przeprowadzono fermentację w zwykły sposób (7). Po skończonej fermentacji zawiesinę bakterii odwirowano na wirówce typu Sharples (ok. 20 000 obr/min.), po czym witaminę wyodrębniano i krystalizowano wg opracowanej uprzednio metody (17). W ługach pokrystalicznych stwierdzono obecność tylko bardzo nieznacznych ilości witaminy B₁₂_p, pochodzącej być może z komórek bakteryjnych zawartych w inoculum, do którego nie dodawano prekursorów. Średnio otrzymywano od 50 — 60 mg kryst. witamin ze 100 litrowej hodowli.

BADANIE WŁASNOŚCI OTRZYMANÝCH WITAMIN

Otrzymane w stanie krystalicznym witaminy przebadano pod względem fizykochemicznym oraz wstępnie mikrobiologicznie. Obie witaminy posia-



Rys. 2. Widmo absorpcyjne formy dwucjanowej witaminy B₁₂ wyodrębnionej z bakterii kw. propionowego

Na osi rzędnych oznaczono wartości ekstynkcji (gęstości optycznej).

Na osi odciętych długość fal w milimikronach.

dają identyczne widma absorpcyjne (rys. 1) z charakterystycznymi dla witaminy B₁₂ maksimami: 278, 305, 322, 362, 520 i 550 mμ (podkreślone główne maksima). Minima absorpcji przypadają dla fal o długościach: 266, 300,

315, 331, 430—35 i 530 m μ . Również widma absorpcyjne roztworów obu witamin po zadaniu ich nadmiarem, NaCN są charakterystyczne dla kompleksu dwucjanowego witaminy B₁₂ (rys. 2). Roztwory witamin reagują z roztworem chloraminy T z utworzeniem się fioletowo zabarwionej pochodnej (świeżo przyrządzone roztwory chloraminy T reagują znacznie wolniej), zmieniając zabarwienie na niebieskie po zadaniu kryształkiem NaCN. Widma absorpcyjne tak otrzymanych pochodnych są identyczne z widmami absorpcyjnymi produktów chlorowania witaminy B₁₂ (18). W badaniach mikrobiologicznych obie otrzymane witaminy były równie czynne, jak witamina B₁₂. Czynność mikrobiologiczną badano za pomocą szczepu *E. coli mutans* metodą płytkową (19), mierząc powierzchnię strefy wzrostu drobnoustroju lub ważąc wykrojoną plamę wzrostu, skopiowaną uprzednio na kalce technicznej, oraz za pomocą *Euglena gracilis* metodą uprzednio opublikowaną (20). W metodzie z *Euglena gracilis* wzrost pierwotniaka mierzono przepuszczalnością światła hodowli na fotokolorymetrze Leitza przy użyciu czerwonego filtra.

Tablica 1 podaje wyniki oznaczenia wzrostu *Euglena gracilis*.

Tablica 1
Porównanie wzrostu *Euglena gracilis*

| Witamina Stężenie w $\mu\mu\text{g/ml}$ | Witamina B ₁₂ otrzymana z <i>Streptomyces griseus</i> | Witamina otrzy- mana z żywy- ki z 5,6-dwumety- tylobenzimidazo- zolem | Witamina otrzy- mana z żywy- ki z 5-metylo- benzimidazo- zolem |
|---|---|---|--|
| 1 | 99* | 97,5 | 100 |
| 5 | 95 | 94,5 | 94,5 |
| 20 | 75 | 74 | 82,5 |
| 100 | 63 | 60,5 | 59,5 |

*) % przepuszczalności światła.

Doświadczenia z *Euglena gracilis* wykonał dr K. Zodrow, za co składam mu na tym miejscu serdeczne podziękowanie.

BADANIE STRUKTURY OTRZYMANYCH WITAMIN

Na podstawie dotychczasowych badań należało przypuszczać, że otrzymane witaminy różnią się między sobą tylko częścią benzimidazolową. Pierwsza z nich powinna zawierać 5,6-dwumetylobenzimidazol, druga 5-metylobenzimidazol. W celu sprawdzenia tej hipotezy otrzymane witaminy poddano hydrolizie kwasowej (1b, 21). Z hydrolizatów wyodrębniono benzimidazole, po czym identyfikowano je na drodze widmowej.

Hydroliza witamin. Około 5 mg krystalicznej witaminy rozpuszczano w 1 ml 6n HCl, roztwór zatapiało w rurze szklanej i ogrzewano 10,5 godzin w temperaturze 153°. Po ostygnięciu rurę otwierano, roztwór sączono w celu usunięcia nierozpuszczalnych zanieczyszczeń, po czym klarowny przesącz odparowywano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Suchą pozostałość rozpuszczano w około 10 ml wody, dodawano kilka kropli 1n HCl, po czym ekstrahowano 2 razy chloroformem (po 10 ml), który odrzucano. Następnie za pomocą 10% NaOH doprowadzano pH roztworu do wartości 8 i ponownie ekstrahowano chloroformem (4 razy po 10 ml). Ekstrakty chloroformowe sączono do kolbki próżniowej, chloroform oddestylowywano pod zmniejszonym ciśnieniem, a suchą pozostałość rozpuszczano w 0,1n HCl, po czym badano widmo absorpcyjne w ultrafiolecie. Kwaśny roztwór alkaliczowano kilkoma kroplami 10% NaOH i ponownie badano widmo absorpcyjne. Jednocześnie przebadano w analogiczny sposób widma absorpcyjne wszystkich badanych tu syntetycznych benzimidazoli. Badania te wykazały identyczność widm produktów syntetycznych 5,6-dwumetylo- i 5-metylobenzimidazolu z benzimidazolami wyodrębnionymi z odpowiednich witamin, pierwszej otrzymanej z hodowli z 5,6-dwumetylobenzimidazolem, drugiej z hodowli z 5-metylobenzimidazolem jako prekursorami.

W tabelicy 2 zestawiono długości fal maksimum i minimum widm absorpcyjnych 5,6-dwumetylo- i 5-metylo-benzimidazolu: substancji syntetycznych i wyodrębnionych z witamin w roztworach kwaśnych i alkalicznych.

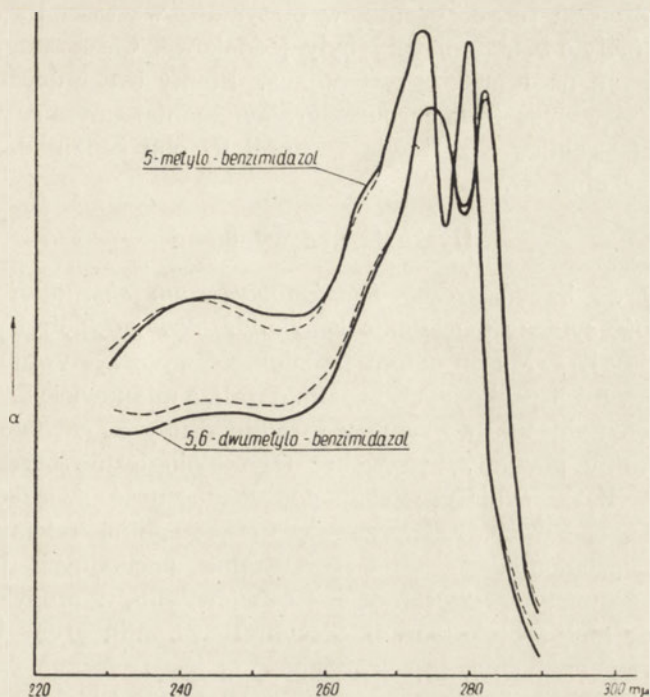
Tabela 2

Długości fal maksimum i minimum benzimidazoli syntetycznych i wyodrębnionych z odpowiednich witamin w roztworach kwaśnych i alkalicznych (w milimikronach)

| | | Roztwory kwaśne | | Roztwory alkaliczne | |
|----------------------------|-------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| | | maksima | minima | maksima | minima |
| 5,6-dwumetylo-benzimidazol | syntetyczny | 245; 274—6; 283 | 235; 250—55; 280 | 246—47, 5; 280; 285 | 227,5; 262; 282 |
| | z witaminy | 245; 274—6; 283 | 235—37,5; 250—55; 280 | 246; 279—80; 285 | 225; 262; 282 |
| 5-metylo-benzimidazol | syntetyczny | 242; 5—245; 273; 280 | 255; 277 | 245—47, 5; 276; 281—82 | 227,5—30; 262; 279—80 |
| | z witaminy | 242,5 273—74; 280 | 255; 277 | 245; 276; 281 | 227; 5—30; 260; 279 |

Rysunek 3 przedstawia wykres widm absorpcyjnych w roztworach kwaśnych omawianych benzimidazoli.

Dodatkowo starano się rozdzielić oba benzimidazole metodą chromatografii bibułowej. Badania te nie dały pozytywnych wyników, gdyż mimo



Rys. 3. Widma absorpcyjne 5-metylo- i 5,6-dwumetylo-benzimidazoli.

Linie ciągłe — produkty syntetyczne. Linie przerywane — produkty wyodrębnione z witamin. Na osi rzędnych oznaczono wartości ekstynkcji (gęstości optycznej). Na osi odciętych długość fal w milimikronach.

Tablica 3

Wartości R_f dla 5,6-dwumetylo- i 5-metylo-benzimidazolu

| Rozpuszczalnik *) | R _f |
|---|----------------|
| 1. Alk. izoamylowy: ln HCl (1 : 1) | 0,32 |
| 2. Alk. izobutyłowy: ln HCl (1 : 1) | 0,66 |
| 3. Octan butylowy: ln HCl (1 : 1) | 0,00 |
| 4. Octan butylowy: izopropanol: ln HCl (2 : 1 : 2) | 0,05 |
| 5. Octan butylowy: izopropanol: ln HCl (1 : 1 : 1) | 0,33 |
| 6. Octan butylowy: cykloheksylamina: woda (5 : 2 : 3) | 0,91 |
| kw. octowy | |
| 7. Octan butylowy: cykloheksylamina: | |
| woda (5 : 2 : 4 : 5) pH 6,5 | 0,35 |

*) Rozpuszczalniki mieszane w stosunkach objętościowych.

stosowania szeregu rozpuszczalników otrzymane wartości R_f dla 5,6-dwumetylo-, i 5-metylo-benzimidazolu były jednakowe. Chromatografowano na bibule Whatman nr 1 metodą wstępującą. Plamy benzimidazolu uwidacziano spryskując wysuszone chromatogramy amoniakalnym roztworem siarczynu miedzi. Tablica 3 zestawia wartości R_f obu benzimidazoli dla różnych rozpuszczalników.

Dyskusja nad wynikami

Używany do badań szczep *Propionobacterium shermanii* ma ograniczoną zdolność syntezy pierścienia benzimidazolowego, potrzebnego do budowy witaminy B_{12} . Ma on natomiast zdolność wykorzystywania zawartych w pożywce pewnych pochodnych benzimidazoli, a mianowicie 5,6-dwumetylo- i 5-metylo-benzimidazolu do syntezy witamin grupy B_{12} . Utworzone w ten sposób witaminy powinny być wobec tego biologicznie bardziej stabilne od witaminy B_{12p} , syntetyzowanej pod nieobecność związków benzimidazolowych w pożywce. Zaznacza się tu szczególna selektywność bakterii kwasu propionowego w wykorzystaniu pochodnych benzimidazolowych. 4,7-dwumetylo-, 2-propylo-, 4,7-dwumetylo-, 2-propylo- 5-metylo-benzimidazole nie są prekursorami biosyntezy witamin grupy B_{12} . Wydaje się rzeczą prawdopodobną, że selektywność ta jest związana z odpowiednią deformacją pierścienia benzenowego w benzimidazolu i blokowaniem aktywnych miejsc w jego cząsteczce. E f r o s (22) zajmując się badaniem pochodnych benzimidazolu dochodzi do wniosku, że ugrupowanie imidazolowe wywołuje znaczną deformację pierścienia benzenowego w benzimidazolu, prowadzącą do wzrostu energii wiązania podwójnego między wspólnymi dla pierścienia benzenowego i imidazolowego atomami węgla, oraz między atomami 4—5 i 6—7 a osłabieniem tej energii dla wiązania między atomami 5—6 aż do wartości charakterystycznej dla wiązania pojedynczego. Nadto wg Eirosa położenie 5 i 6 jest znacznie bardziej aktywne niż położenie 4 i 7, a podstawniki w położeniu 5 i 6 tyko w bardzo słabym stopniu wpływają na siebie. Bardzo zbliżone widma absorpcyjne 5-metylo- i 5,6-dwumetylo-benzimidazolu wskazują na podobny stan układu elektronowego w obu cząsteczkach, a zatem na analogiczną deformację.

Badania chemiczne i mikrobiologiczne wskazują, że syntetyzowana przez bakterie kwasu propionowego witamina (na pożywce zawierającej 5,5-dwumetylo-benzimidazol) jest prawdopodobnie identyczna z witaminą B_{12} wyodrębnioną z innych naturalnych źródeł, na przykład z hodowli *Streptomyces griseus* (17). Preparat ten oddano do przebadania klinicznego.

W świetle przedstawionych badań wydaje się bardziej racjonalne nazywać witaminę B_{12} 5,6-dwumetylobenzimidazolo-cjano-kobalaminą zamiast jak dotychczas cjanokobalaminą, zostawiając nazwę kobalaminy tylko dla tej części cząsteczki, która po hydrolizie zawiera atom kobaltu.

Drugą otrzymaną w tej pracy witaminę można nazwać 5(6)-metylo-benzimidazolo-cjano-kobalamina. Propozycja ta ma i to uzasadnienie, że znaleziono witaminy (23) różniące się od witaminy B₁₂ tylko obecnością adeniny lub 2-metyloadeniny w miejsce 5,6-dwumetylobenzimidazolu.

W myśl proponowanej nomenklatury można by je nazwać adenino- bądź 2-metyloadenino-cjano-kobalamina.

Wstępne badania mikrobiologiczne wykazały, że 5(6)-metylobenzimidazolo-cjano-kobalamina jest czynna zarówno wobec *E. coli mutans*, jak i wobec *Euglena gracilis*, tak jak witamina B₁₂. Jest rzeczą znaną, że niektóre syntetyczne flawiny, jak 6-metylo- i 7-metylo-9-(1-ribitylo)-izoalloksazyny, będące w pewnym sensie analogami 5(6)-metylobenzimidazolocjanokobalaminy, wykazują czynność biologiczną ryboflawiny, choć w mniejszym stopniu. Brak zdolności wykorzystywania 5,6-dwumetylobenzimidazolu z pożywki przez *Streptomyces griseus* wskazuje na inny mechanizm biosyntezy witaminy B₁₂ przez obydwie drobnoustroje. Przedstawione tu badania rzucają nowe światło na biologiczną czynność pochodnych benzimidazolu w badaniach żywieniowych i mikrobiologicznych.

Składam serdeczne podziękowanie asystentowi technicznemu K. Nowakowskiej za pomoc przy wykonywaniu tej pracy.

Składam również podziękowanie drowi Reinholzowi za umożliwienie mi korzystania z ultrawirówki Sharplesa oraz dr Iwanowskiej z Instytutu Leków w Warszawie za udzielenie nam szczepu *E. coli mutans*.

Streszczenie

Wykazano, że szczep bakterii kwasu propionowego *Propionibact. shermanii*, hodowany na pożywce zawierającej 5,6-dwumetylobenzimidazol, wytwarza witaminę B₁₂ (5,6-dwumetylobenzimidazolo-cjano-kobalamina) w miejsce witaminy B_{12p}, syntetyzowanej pod nieobecność związku benzimidazolowego. Otrzymana w ten sposób witamina B₁₂ nie różni się pod względem fizykochemicznym i mikrobiologicznym, od witaminy B₁₂ wytwarzanej przez *Streptomyces griseus*.

W analogiczny sposób otrzymano po raz pierwszy pochodną witaminy B₁₂, a mianowicie 5(6)-metylobenzimidazolo-cjano-kobalamina, gdy hodowle prowadzono na pożywce zawierającej 5-metylobenzimidazol.

Wstępne badania wykazały, że ostatnia witamina jest również mikrobiologicznie aktywna wobec *E. coli* oraz *Euglena gracilis*. Widma absorpcyjne obydwu witamin są identyczne. 4,7-dwumetylo-, 2-propylo-4,7-dwumetylo- i 2-propylo-5-metylo-benzimidazole nie są prekursorami biosyntezy odpowiednich witamin grupy B₁₂.

Promieniowce z rodzaju *Streptomyces griseus*, hodowane na zwykłych

produkcyjnych pożywkach, nie wykorzystują 5,6-dwumetylobenzimidazolu do wzmożonej syntezy witaminy B₁₂. Zaproponowano nową nomenklaturę dla witamin grupy B₁₂. W myśl propozycji witamina B₁₂ otrzyma nazwę 5,6-dwumetylobenzimidazolo-cjano-kobalaminy.

LITERATURA

1. N. G. Brink i K. Folkers: *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 2951, 1949; **16. 72**, 4442, 1950.
2. G. E. Emerson, N. G. Brink, F. W. Holley, F. Koniuszy, D. Heyl i K. Folkers: *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 3084, 1950.
3. J. M. Cooperman, B. Tabenkin i R. Drucker: *J. Nutrition* **46**, 467, 1952; *C. A.*, **46**, 6710, 1952.
4. J. P. Lambooy i E. E. Haley: *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 1087, 1952.
5. Y. Sahashi, M. Mikata i H. Sakao: *Bull. Chem. Soc. Japan*, **23**, 247, 1950; **46**, 8210, 1952.
6. A. Leviton i R. E. Hargrove: *Ind. and Eng. Chem.* **44**, 2651, 1952.
7. J. Janicki i J. Pawełekiewicz: *Acta Biochim. Pol.* **1**, 307, 1954.
8. A. I. Vogel: „Practical Organic Chemistry“ Langmans, Green and Comp. London 1948, str. 612.
9. J. Phillips: *J. Chem. Soc.* 2393, 1928.
10. W. T. Smith i E. C. Steinley: *J. An. Chem. Soc.* **75**, 1292, 1953.
11. K. Sahashi, H. Akamatsu i H. Genda: *Bull. Inst. Phys. Chem. Research (Tokyo)* **24**, 72, 1948; *C. A.* **42**, 5458, 1948.
12. W. M. Berezowski, W. A. Kurdiukowa i N. A. Preobrażenski: *Zurnal obszczej chemii*, **21**, 1163, 1951.
13. H. Schneider: *Angew. Chemie* **51**, 274, 1938.
14. W. N. Berezowski i W. S. Warkow: *Zurnal obszczej chemii* **23**, 100, 1953.
15. J. Janicki, J. Pawełekiewicz, St. Stawicki i K. Zodrow: *Przemyst Chemiczny*, **9**, 509, 1953.
16. J. Janicki, J. Pawełekiewicz, St. Stawicki i K. Zodrow: *Acta Microbiol. Pol.* **3**, 3, 1954.
17. J. Janicki, J. Pawełekiewicz, St. Stawicki, K. Szebiotko i K. Zodrow: *Przemyst Chemiczny*, **9**, 385, 1953.
18. K. Schmidt, A. Ebnöher i P. Karrer: *Helv. Chim. Acta.* **36**, 65, 1953.
19. J. Bogucka, J. Iwanowska i H. Kąkol: *Przemyst Chemiczny* **9**, 14, 1953 i **9**, 512, 1953.
20. J. Janicki, J. Pawełekiewicz, St. Stawicki i K. Zodrow: *Przemyst Chemiczny*, **9**, 614, 1953.
21. J. G. Buchanan, A. W. Johnson, J. A. Mills i A. R. Todd: *J. Chem. Soc.* 2845, 1950.
22. P. S. Efros: *Zurnal obszczej chemii*, **22**, 1008, 1952.
23. H. W. Dion, D. G. Calkins, J. J. Pfiffner: *J. Am. Chem. Soc.*: **74**, 1108, 1952 i **76**, 948, 1954.

ПРЕКУРСОРЫ БИОСИНТЕЗА ВИТАМИНА B₁₂

С о д е р ж а н и е

Установлено, что штамм бактерий пропионовой кислоты *Propionibact. shermanii*, культивированный на питательной среде содержащей 5,6-диметил-бензимидазол образует витамин B₁₂ (5,6-диметилбензимидазолциан-кобальтамин) вместо витамина B_{12p} синтезированного без участия этого соединения. Полученный таким образом витамин B₁₂ не отличается своими физикохимическими и микробиологическими свойствами от витамина B₁₂ образованного штаммом *Streptomyces griseus*. Аналогично была получена первый раз производная витамина B₁₂.

5,6-метилбензимидазол-циан-кобальтамин при росте бактерий на питательной среде содержащей 5 метилбензимидазол. Вступительные исследования обнаружили, что этот витамин микробиологически активен *E. Coli* и *Euglena gracilis*). Спектры поглощения обеих витаминов идентичны. Соединения 4,7-диметил,2-пропил-4,7 диметил и 2-пропил-5 метил-бензимидазолы не являются прекурсором биосинтеза соответствующих витаминов группы B₁₂. Актиномицеты из вида *Streptomyces griseus* культивированные на обыкновенных питательных средах не используют 5,6-диметилбензимидазола для синтеза витамина B₁₂. Предложена новая номенклатура для витаминов группы B₁₂, на основании которой витамин B₁₂ можно назвать 5,6-диметил-бензимидазол-циан-кобальтамин.

Автор выражает глубокую благодарность техническому ассистенту К. Новаковской за помощь в этой работе, доктору Рейнгольцу за разрешение пользоваться во время работы ультрацентрифугой Sharples'a, а также доктор Ивановской из Варшавского Фармацевтического Института за полученный штамм *E. Coli*.

BIOSYNTHETICAL PRECURSORS OF GROUP B₁₂ VITAMINS

S u m m a r y

It has been shown that a propionic acid bacterial strain of *Propionibact. shermanii*, cultivated on a medium containing 5,6-dimethylbenzimidazole, produces vitamin B₁₂ (5,6-dimethylbenzimidazole-cyano-cobalamin) in place of vitamin B_{12p} synthesised in the absence of benzimidazole compounds. The vitamin B₁₂ obtained in this way does not differ physico-chemically or microbiologically from vitamin B₁₂ produced by *Streptomyces griseus*.

An analogous procedure has resulted, for the first time, in the production of a vitamin B₁₂ derivative, 5(6)-methylbenzimidazole-cyano-cobalamin, when the culture medium contains 5-methylbenzimidazole.

Initial tests have shown that the latter vitamin is equally active micro-

biologically against *E. coli* as well as *Euglena gracilis*. The absorption spectrum of both vitamins is identical.

4,7-dimethyl-, 2-propyl-4,7-dimethyl- and 2-propyl-5-methyl-benzimidazole are not biosynthetical precursors of group B₁₂ vitamins. Of the type *Streptomyces griseus*, cultivated on commercial media, do not use 5,6-dimethylbenzimidazole for increased synthesis of vitamin B₁₂.

A new nomenclature is proposed for the vitamin B₁₂ group, according to which vitamin B₁₂ would be known as 5,6-dimethylbenzimidazole-cyanocobalamin.

SPIS TRESCI

| | |
|--|-----|
| 1. E. Mikulaszek — Metoda ilościowego oznaczania składników precypitatu w precypitujących systemach wielocukrowych | 163 |
| 2. B. Galos i W. Ostrowski — Rozdzielanie cukrów i ich pochodnych za pomocą elektroforezy bibułowej | 171 |
| 3. M. Zydowo — Niektóre zmiany biochemiczne krwi zdrowego człowieka pod wpływem adrenaliny. II Wpływ na równowagę kwasowo-zasadową | 185 |
| 4. J. Dżułyńska i E. Mikulaszek — Chromatograficzna analiza wielocukrowców bakteryjnych | 191 |
| 5. I. Reifer i M. Możejko — Nowa mikrometoda ilościowego oznaczania alkaloidów w lubinach pastewnych | 197 |
| 6. L. Szarkowska i P. Szafrański — Porównawcze badania nad wytwarzaniem kwasu jabłkowego przez różne szczepy <i>Mycobacterium</i> | 225 |
| 7. M. Orłowski i J. Simon — Miareczkowa metoda oznaczania cholesterolu | 231 |
| 8. Z. Lassota — Wytwarzanie kwasu cytrynowego przez nieuszkodzone komórki drobnoustrojów rodzaju <i>Mycobacterium</i> | 239 |
| 9. L. Szarkowska — Kwas bursztynowy jako produkt przemiany <i>Mycobacterium tbc. H37Rv</i> | 249 |
| 10. J. W. Szarkowski — Ilościowe oznaczanie kwasu szczawiowego jako metabolitu <i>Mycobacterium</i> w pożywkach bakteryjnych | 259 |
| 11. B. Grabianowska — Oznaczanie aktywności katalazy w materiale roślinnym | |
| 12. M. Kański, O. Sakławska-Szymonowa, M. Szymona — Transaminacja asparaginowo — alfa ketoglutarowa u <i>Mycobacterium phlei</i> | 277 |
| 13. K. Zakrzewski i M. Wojnarowska — Estrę siarczanowe zhydrolizowanego dekstranu | 285 |
| 14. I. Reifer — Nowa metoda mikrooznaczania kwasu cytrynowego | 293 |
| 15. J. Janicki i J. Pawelkiewicz — Wytwarzanie nowej witaminy (witamin) grupy B ₁₂ przez bakterie kwasu propionowego | 307 |
| 16. J. Pawelkiewicz — Prekursory biosyntezy witamin grupy B ₁₂ . Synteza nowej witaminy z grupy B ₁₂ : 5,6-metylobenzimidazolo-cjanokobalaminy | 313 |

