

P O L S K A A K A D E M I A N A U K
KOMITET BIOCHEMICZNY

ACTA
BIOCHIMICA POLONICA

KWARTALNIK

T O M II

WARSZAWA 1955
PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE
<http://rcin.org.pl>

KOMITET REDAKCYJNY

Mochnacka Irena, Mozołowski Włodzimierz
Reifer Ignacy

RADA REDAKCYJNA

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

ADRES REDAKCJI: Warszawa 10, ul. Śniadeckich 8

MARIAN SZYMONA

**POWSTAWANIE KWASU PIROGRONOWEGO
W PREPARACIE ACETONOWYM *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*
H37Ra**

Zakład Chemi Fizjologicznej A. M. w Lublinie
Kierownik: prof. dr J. Opieńska-Bláuth

Według spostrzeżeń E d s o n a (2) kwas pirogronowy powstaje w preparacie acetonowym *M. phlei* w warunkach anaerobowych i przy udziale błękitu metylenowego, w warunkach aerobowych natomiast tworzy się z mleczanu prawie wyłącznie kwas octowy.

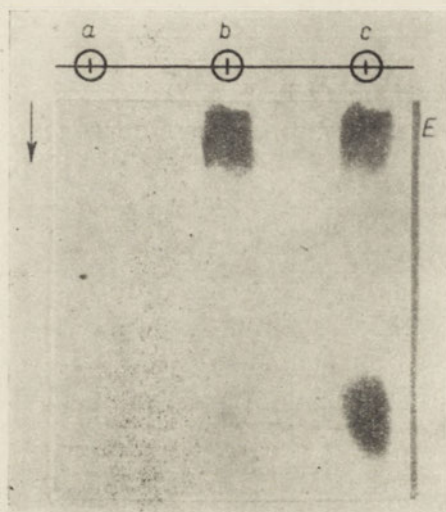
W niniejszym doniesieniu stwierdzono metodą chromatografii bibulowej powstawanie kwasu pirogronowego w preparacie acetonowym. *M. tuberculosis* H37Ra, inkubowanym w warunkach tlenowych bez dawania z zewnątrz akceptora wodoru.

Metody i wyniki doświadczeń

Drobnoustrój pochodzący z Instytutu Gruźlicy w Warszawie hodowano na pożywce Loewensteina. W okresie optymalnego wzrostu masę bakteryjną po przemyciu od składników podłoża dezintegrowano za pomocą acetonu (2,7). Otrzymany proszek rozcierano w moździerzku bakteryjnym z buforem fosforanowym 0,03 M przy pH ok. 7, w ilości 40—100 mg/2 ml buforu. Doświadczenia polegały na inkubowaniu zawiesiny w ciągu 2—3 godz w termostacie lub w aparacie Warburga (9) przy 37° w obecności powietrza, ew. z dodatkiem mleczanu sodowego (stężenie końcowe 0,05 M). Inkubację przerywano przez dodanie 0,1 objętości 30% CCl_3COOH . Bezbiałkowy przesącz poddawano analizie chromatograficznej. Stosowano bibułę Whatmana nr 1 i nr 3 bez uprzedniego przemywania czy też kondycjonowania. W celu oddzielenia kwasu pirogronowego od innych związków opracowano układ ¹⁾ składający

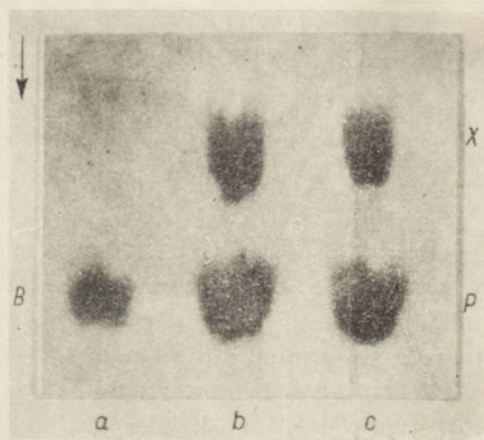
¹⁾ Przy poszukiwaniu układu celowe okazało się — ze względu na oszczędność czasu i materiału — wykonywanie próbnych chromatogramów w postaci małych pasków (o wymiarach 1,3 × 14 cm), które „rozwijano” w zwykłych probówkach, zawierających różne rozpuszczalniki lub układy rozpuszczalników.

się z n-propanolu, pirydyny i wody w stosunku 6:2:1. Zadowalające wyniki dawały również układy złożone z n-butanolu, pirydyny, wody (1,5). Rozwijanie się chromatogramów prowadzono sposobem wstępującym bądź zstępującym w kamerach szklanych przy 20—30° w ciągu 4—6 godz. Kwas pirogronowy wywoływano roztworem AgNO_3 (8), w postaci cha-



Rys. 1. Powstawanie kwasu pirogronowego (B) w preparacie acetonowym *M. tuberculosis* H37Ra

- a — próba początkowa
- b — „ inkubowana bez substratu
- c — „ „ z substratem
- E — plamy estrów heksozofosforowych (2).



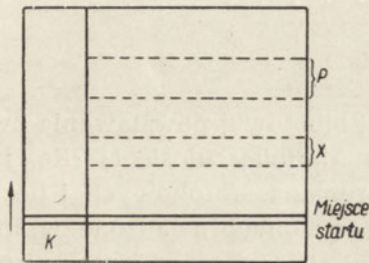
Rys. 2. Identyfikacja kwasu pirogronowego

- a — plama badana (B)
- b — plamy preparatu kontrolnego
- c — a + b.

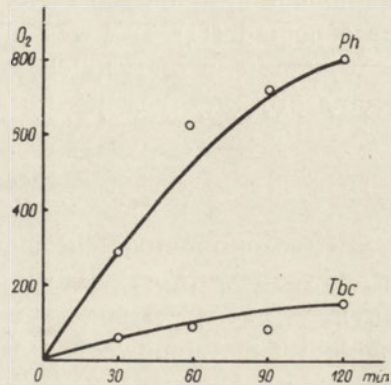
rakterystycznej, szarobrunatnej plamy, która występowała zwykle później niż plamy związków aldehydowych. Zieleń bromokrezolowa oraz inne wskaźniki, używane do wywoływania kwasów tłuszczowych (6), okazały się mniej dogodne z powodu obecności w badanym materiale soli mineralnych, dających dodatkowe plamy.

Chromatogram (rys. 1) przedstawia wyniki jednego z wielu doświadczeń. W próbce (c), inkubowanej w obecności mleczanu sodowego, pojawia się plama (B) odpowiadająca kwasowi pirogronowemu. Identyfikację przeprowadzono na chromatogramie (rys. 2), gdzie porównany został związek badany (B) z kwasem pirogronowym kontrolnym. Jak widać, preparat handlowy kwasu pirogronowego (L. Light & Ltd., Old Bowry Laboratories, Wraysbury) stanowi mieszaninę dwóch związków redukujących, które w układzie n-propanol-pirydyna-woda wykazują

dwie wyraźnie rozgraniczone plamy. W celu stwierdzenia, którą z dwóch plam kontrolnych stanowi kwas pirogronowy, wykonano dla preparatu handlowego osobny chromatogram (rys. 3), z którego oba związki zostały po rozdzieleniu wydzielone i sprawdzone próbami z nitroprusydkiem (4) i dwinitrofenilohydrazyną (2). Okazało się, że tylko związek eluowany z odcinka (P) reaguje z wyżej wymienionymi odczynnikami w spo-



Rys. 3. Chromatogram preparatywny. Bibuła Whatmana nr 3. K — pasek kontrolny wywołany zielenią bromokrezolową w celu zlokalizowania plam na pozostałej części chromatogramu. Linie przerywane oznaczają granice paszków odciętych i przemywanych wodą destyl.



Rys. 4. Pochłanianie O₂ przez preparaty acetonowe: *M. phlei* (Ph) — 35 mg i *M. tuberculosis* H37Ra (Tbc) — 40 mg.

Bufor fosforanowy pH 6,5.
Mleczan sodowy w końcowym stężeniu 0,05 M.

sób charakterystyczny dla kwasu pirogronowego. Nie czyniono dalszych prób w kierunku zidentyfikowania związku (X), nie występującego w proszku acetonowym prątką gruźlicy. Należy dodać, że te same próby, wykonane na eluacie (otrzymanym w podobny sposób) z przesączu proszku acetonowego, dały wyniki pozytywne, co potwierdza tożsamość związków (P) i (B). Oprócz kwasu pirogronowego wykrywano po inkubacji kwas octowy próbą z azotanem lantanu (4). W kilku preparatach acetonowych obserwowano ślad dodatniej próby V o g e s-P r o s k a u e r a w modyfikacji W e s t e r f e l d a (10). Podobne doświadczenia wykonane dla porównania przy użyciu proszku acetonowego *M. phlei* wykazały, że w obecności powietrza kwas mlekowy ulegał przemianom do kwasu octowego, czemu towarzyszyło intensywne pochłanianie tlenu (rys. 4). Próby wykazania w tych doświadczeniach kwasu pirogronowego nie dały wyników pozytywnych. Natomiast preparat acetonowy prątką gruźlicy w analogicznych warunkach pochłaniał znacznie mniejsze ilości tlenu (rys. 4) i produkował oprócz kwasu octowego — kwas pirogronowy.

Otrzymane rezultaty przemawiają za działalnością w badanym prątku systemu utleniającego kwas mlekowy. Powstawanie kwasu octowego świadczy o oksydatywnej dekarboksylacji, która według Y a m a m u r a i K u s u n o s e (10) przebiega pod wpływem odrębnego enzymu w warunkach aerobowych. Wydaje się, że zawartość lub aktywność wymienionego systemu jest różna u *M. tuberculosis* i *M. phlei*. Poparcie znajduje pogląd (11), że kwas pirogronowy i oksydazy kwasu mlekowego występują u wszystkich szczepów prątków kwasoodpornych — zarówno saprofitycznych, jak i gruźliczych.

Streszczenie

1. Stwierdzono metodą chromatografii bibułowej powstawanie kwasu pirogronowego w proszku acetonowym *M. tuberculosis* H37Ra, inkubowanym w obecności mleczanu w warunkach aerobowych i bez dodatku błękitu metylenowego. Doświadczenia przeprowadzone w analogicznych warunkach przy użyciu *M. phlei* nie wykazały kwasu pirogronowego.

2. Handlowy preparat kwasu pirogronowego, użyty jako kontrola, okazał się mieszaniną dwóch związków dających w układzie n-propa-nol-pirydyna-woda dwie plamy redukujące.

3. Poruszone zostały metodyczne szczegóły dotyczące chromatografii bibułowej.

L I T E R A T U R A

1. Ch a r g a f f E., L e v i n e C., G r e e n C h.: *J. Biol. Chem.* **67**, 175, 1948.
2. E d s o n N. L.: *Biochem. J.* **41**, 147, 1947.
3. E d s o n N. L.: *Bact. Rev.*, **15**, 147, 1951.
4. F e i g l F.: *Qualitative Analysis by spot. tests*, New York 1947.
5. K a e p s e l l K. J., T s u c h i y a H. M., H e l l m a n N. N., K a z e n k o A., H o f f m a n C. A., S h a r p e E. S., J a c k s o n R. W.: *J. Biol. Chem.*, **200**, 798, 1953.
6. 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, K a ń s k i.: *Ann. U. M. C. S. — S. D.* **9**, 1950.
7. S z y m o n a M., S a k ł a w s k a - S z y m o n o w a O.: *Biochimija*, **19**, 295, 1954.
8. T r e v e l y a n W. Z., P r o c t o r D. B., H a r r i s o n J. S.: *Nature*, **166**, 440, 1950.
9. U m b r e i t W. W., B u r r i s R. H., S t a u f e r J. F.: *Manometric Technique and related Methods for the Study of Tissue Metabolism*, Minneapolis 1948.
10. W e s t e r f e l d W. W.: *J. Biol. Chem.* **161**, 495, 1945.
11. Y u i c k i, Y a m a m u r a, M a s a m i t i K u s u n o s e: *Nature*, **170**, 207, 1952.

ОБРАЗОВАНИЕ ПИРОВИНОГРАДНОЙ КИСЛОТЫ В АЦЕТОНОВОМ
ПРЕПАРАТЕ *M. TUBERCULOSIS* H₃₇Ra

Резюме

1. При помощи бумажной хроматографии показан процесс образования во взвеси ацетонного препарата *M. tuberculosis* H₃₇Ra пировиноградной кислоты из молочной кислоты в присутствии воздуха и без добавления метиленовой сини. В подобных условиях не наблюдалось у *M. phlei* пировиноградной кислоты.

2. В контрольном, торговом препарате пировиноградной кислоты пользующейся системой и-пропанол-пиридин-вода 6:2:1, были обнаружены два редуцирующие пятна.

3. Обсуждено некоторые методические детали по хроматографии пировиноградной кислоты.

FORMATION OF PYRUVIC ACID IN ACETONE-POWDER OF *MACOBACTERIUM*
TUBERCULOSIS H₃₇Ra

Summary

1. The formation of pyruvic acid from lactate has been shown by the paper chromatography to occur in acetone-powder of *M. tuberculosis* H₃₇Ra under aerobic conditions, without methylene blue added. Similar experiments carried out with *M. phlei* under the same conditions did not give any pyruvate production.

2. The officinal preparation of pyruvic acid (L. Light Ltd, Old Bowry Laboratories, Wraysbury) used as control, gave on the chromatogram, developed with n-propanol-pyridin-water 6:2:1, two reducing compounds.

3. Some methodical details, as to the paper chromatography of pyruvic acid, were considered.

Otrzymano 19.VIII.1954

ANTONI DMOCHOWSKI I WITOLD DRABIKOWSKI

**NUKLEOPROTEIDY ŁUSEK ŁUSZCZYCY
OZNACZANIE ILOŚCI I BADANIE SKŁADU**

Z Zakładu Biochemii Uniwersytetu Łódzkiego

Kierownik: prof. dr A. Dmochowski

W ramach prac prowadzonych w Zakładzie Biochemii UŁ nad biochemią łuszczycy (*psoriasis vulgaris*) wystąpiła konieczność zbadania zagadnienia nukleoproteidów i kwasów nukleinowych zawartych w łuskach. Ł o z a (9) izolował z łusek nukleoproteidy, które zawierały tylko dezoksyrybozę. Otrzymywał on nukleoproteidy wyłącznie przez ekstrakcję łusek 0,1 N ługiem. Celem obecnej pracy było izolowanie nukleoproteidów i kwasów nukleinowych z łusek innymi metodami, co pozwoliłoby na dalsze zbadanie ich rodzaju i własności.

Do wyodrębniania nukleoproteidów i kwasów nukleinowych stosowano od dawna różnorodne metody. Materiał biologiczny świeży lub odwodniony i odlipidowany wyciągano głównie zasadami, czasem roztworami buforowymi, a nawet wodą. [Przegląd dawniejszych metod — G u l l a n d (4)].

W roku 1942 M i r s k y i P o l l i s t e r (10) podali metodę, która znalazła powszechne zastosowanie do izolowania nukleoproteidów tkankowych, polegającą na ekstrakcji materiału roztworami chlorku sodowego. 0,14 M roztwór NaCl usuwa materiał cytoplazmatyczny i rybonukleoproteidy, a z pozostałości 1 M NaCl wyciąga nukleoproteidy dezoksyrybozowe. Celem zahamowania działalności enzymów depolimeryzujących stosuje się dodatek fluorku sodu, arsenianu lub cytrynianu sodu. Nukleoproteidy bakteryjne i wirusowe nie zawsze dają się wyciągnąć roztworami soli. Przeważnie trzeba stosować hydrolizę zasadami, mimo że odczyn alkaliczny powoduje dość znaczną depolimeryzację kwasu dezoksyrybonukleinowego. Tak na przykład S m i t h i W y a t t (15) zastosowali do otrzymania kwasu dezoksyrybonukleinowego zmodyfikowaną metodę S c h m i d t a i T h a n n h a u s e r a (13).

Dawniejsze metody otrzymywania kwasów nukleinowych polegały głównie na strącaniu białka w punkcie izoelektrycznym, po hydrolizie alkalicznej roztworu nukleoproteidów. Subtelną metodę odbiałczania, mającą do dziś szerokie zastosowanie, podał *Sevag* (14). Roztwór nukleoproteidu po łagodnej hydrolizie alkalicznej [lub bez hydrolizy — *Gulland* (5)] wytrząsa się z chloroformem, co powoduje gromadzenie się białka na granicy obu faz.

Do ilościowego wyciągnięcia obu kwasów nukleinowych służyć może również metoda *Javilliera i Allaire'a* (6), polegająca na ekstrakcji odlipidowanego materiału na gorąco 10% roztworem chlorku sodu. Ostatnio *Bendich* i wspólnicy (1) zastosowali powyższą metodę do stwierdzenia obecności dwu odmiennych kwasów dezoksyrybonukleinowych, różniących się rozpuszczalnością w 0,14 M NaCl.

W pracy niniejszej próbowaliśmy zastosować wymienione wyżej metody do bliższego scharakteryzowania nukleoproteidów i kwasów nukleinowych łusek.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Metody

Wszystkie próby wykonywano na łuskach świeżych. Zawartość wody oznaczano przez suszenie do stałej wagi w 105°. Zawartość lipidów — przez ekstrakcję mieszaniną alkoholu i eteru (3:1). Frakcje fosforowe oznaczano według metody *Schmidta i Thannhausera* (13). Fosfor oznaczano kolorymetrycznie metodą *Fiskego i Subbara* (3) na absorpcjometrze *Spekera*. Azot purynowy oznaczano po dwukrotnym strąceniu $\text{CuSO}_4 + \text{NaHSO}_3$ w aparacie *Markhama*.

I. OTRZYMANIE NUKLEOPROTEIDÓW Z ŁUSEK METODĄ *MIRSKYEGO I POLLISTERA* (10) I KWASU DEZOKSYRYBONUKLEINOWEGO METODĄ *GULLANDA* (5)

25 g zmielonych łusek mieszano przez 48 godzin z 200 ml 0,14 M NaCl z dodatkiem 0,02 M cytrynianu sodu w temperaturze 0°. Całość odwirowano, osad łusek przemyto 50 ml. roztworu soli i ponownie odwirowano. Z połączonych przesączów strącono rybonukleoproteid wraz z innym materiałem cytoplazmatycznym przez dodatek dwu objętości alkoholu etylowego.

Łuski pozostałe po ekstrakcji zawieszono w 150 ml 1 M NaCl i mieszano w temperaturze 0° przez 48 godz. Po odwirowaniu i przemyciu pozostałości roztworem soli wytrącono z połączonych przesączów dezo-

ksyrybonukleoproteid dwoma objętościami alkoholu. Oba nukleoproteidy przemyto alkoholem i eterem i suszono pod zmniejszonym ciśnieniem.

Z łusek mieszanych o zawartości 10,67% wody i 22,1% lipidów (A) otrzymano w powyższy sposób strąty rybonukleoproteidów w ilości 5,58% (w stosunku do suchej masy łusek), o zawartości 214 mg% fosforu. Ilość uzyskanego dezoksyrybonukleoproteidu wynosiła 3,53%, o zawartości 322 mg% fosforu. Po przeliczeniu okazało się, że uległo wyciągnięciu 11,8 mg% fosforu KRN¹⁾ i 11,3 mg% fosforu KdN¹⁾ na suchą masę łusek. Z łusek mieszanych innego pochodzenia [zawartość wody 10,76%, zawartość lipidów 23,3% (B)] otrzymano 2,41% rybonukleoproteidu o zawartości 779,9 mg% P i 3,20% dezoksyrybonukleoproteidu o zawartości 333 mg% P. Wydajność wyciągniętego fosforu wynosiła 18,8 mg% fosforu KRN i 10,7 mg% fosforu KDN.

Przez ekstrakcję wyłącznie jednomolarnym chlorkiem sodu rozdrobionych łusek uzyskano 8,61% nukleoproteidu o zawartości 479,7 mg%, co odpowiada 41,3 mg% P nukleinowego w stosunku do łusek. Była to prawdopodobnie suma fosforu obu nukleoproteidów.

Roztwory nukleoproteidów w chlorku sodu były mlecznobiałe i opalizujące, a nukleoproteidy wytrącały się alkoholem w formie białych, puszystych osadów, które po wysuszeniu przybierały barwę jasnobrązową.

Z otrzymanego w powyższy sposób dezoksyrybonukleoproteidu (A) próbowano izolować KDN metodą S e v a g a (14) w modyfikacji G u l l a n d a (5). 1,14 g dezoksyrybonukleoproteidu rozpuszczono w 1 M NaCl i odwirowano. Klarowny przesącz odbiałczano równą objętością mieszaniny chloroformu z alkoholem amyłowym (w stosunku 9:1). Wytrząsanie trzeba było powtarzać kilkanaście razy do chwili, kiedy na granicy obu faz już nie występowała błonka białka i roztwór kwasu nukleinowego nie wykazywał dodatniej reakcji biuretowej. Odszczepiony KDN wytrącono przez dodatek 2 objętości alkoholu. Roztwory KDN nie były lepkie, a sam kwas wytrącał się alkoholem w postaci białego, puszystego osadu, ale nie w formie włóknistej. Reakcja Dischego dodatnia. W powyższej próbie otrzymano 28,6 mg KDN, o zawartości 8,1% P. Odpowiada to ilości 88,5 mg% KDN w stosunku do suchej wagi łusek.

W pracy Ł o z y (9) stwierdzono, że łuski łuszczycy zawierają w odlipidowanej frakcji kwasonierozpuszczalnej średnio 123,9 mg% fosforu oraz 163,5 mg% azotu purynowego, a kwas nukleinowy obecny w łuskach był jedynie typu dezoksyrybozowego. W porównaniu z tą

1) KRN — kwas rybonukleinowy, KDN — kwas dezoksyrybonukleinowy.

ilością fosforu ilość P, odzyskanego przez nas przy ekstrakcji łusek, w obu nukleoproteidach była dość niska, co wskazywało na bardzo niską wydajność metody ekstrakcji. Szczególnie niskie były wartości fosforu KDN w porównaniu z wynikami Ł o z y. Analiza łusek (A) pozostałych po ekstrakcji wykazała zawartość 86 mg% P. Uwzględniając wagę pozostałości (79,5% w stosunku do pierwotnej) otrzymano 68,3 mg% P w stosunku do pierwotnej wagi łusek. Łuski po ekstrakcji zawierały jeszcze 70,3 mg% azotu purynowego i wykazywały słabą reakcję Dischego.

Powyższe wyniki wysunęły koncepcję istnienia w łuskach dwóch typów kwasu dezoksyrybonukleinowego: jednego, występującego w małych ilościach i ekstrahującego się 1 M NaCl, pochodzenia jądrowego, i drugiego — będącego w nadmiarze, pozostającego po ekstrakcji w łuskach, pochodzenia nieznanego, być może wirusowego.

Powyższe próby były wykonywane na łuskach mieszanych, różnego pochodzenia. Zmienne ilości fosforu uniemożliwiały sporządzenie dokładnego bilansu fosforowego. W następnych próbach użyto więc łusek pochodzących od jednego chorego (seria BW/52), w których oznaczono poszczególne frakcje fosforowe. Zestawienie otrzymanych wyników podaje tablica 1.

Chcąc zbadać wpływ lipidów, zawartych w łuskach w dużych ilościach, na proces ekstrakcji — prowadzono równoległe próby na łuskach odlipidowanych alkoholem i eterem (3:1) na gorąco. Ekstrakty łusek odtłuszczonych nie były tak mętne i opalizujące, jak ekstrakty z łusek nieodlipidowanych. Charakterystyczny jest fakt, że rybonukleoproteidy z łusek odtłuszczonych zostają wyodrębnione w mniejszej ilości i zawierają dużo mniejszy procent fosforu.

Jak widać z tablicy 1, w przesączu alkoholowym po wytrąceniu dezoksyrybonukleoproteidu pozostaje spora ilość fosforu. Wskazuje to, być może, na nielościowe wytrącenie dezoksyrybonukleoproteidów.

Większe ilości uzyskanych rybonukleoproteidów (BW/52) w porównaniu z poprzednimi ekstrakcjami były prawdopodobnie wynikiem długotrwałego ługowania. Pierwsza ekstrakcja 0,14 M NaCl trwała 80 godzin, a następnie pozostałość była wyciągana ponownie 0,14 M NaCl przez 40 godzin. Ilość wyizolowanego fosforu rybonukleinowego była nadspodziewanie duża w porównaniu z danymi Ł o z y (9). Celem wyjaśnienia tej rozbieżności oraz faktu wyodrębniania małej ilości fosforu KDN zastosowano do izolowania dezoksyrybonukleoproteidu metody bardziej drastyczne, ale za to gwarantujące wydajność zbliżoną do ilościowej.

Tablica 1
Fracje fosforowe łusek łuszczycy

Łuski — seria BW/52

Zawartość wody 7,56%

„ lipidów 12,1%

„ N purynowego 86 mg%

Zawartość P całkowitego 182,8 mg%

„ P lipidowego 14,0 mg%

„ P kwasorozpuszcz. 100,0 mg%

„ P nukleinowego 68,8 mg%

Nukleoproteidy z łusek wyciągano kolejno 0,14 M (I) i 1 M NaCl (II) z łusek.

Z wyciągów nukleoproteidy strącano 2 objętościami alkoholu.

(Oznaczenia w równoległych próbach były zupełnie zgodne w granicach 2—3%).

	Łuski świeże				Łuski odlipidowane			
	P wyciągów w mg%	Ilość strąconego nukleoproteidu w % łusek	P nukleoproteidu w mg%	P kolejnych frakcji przeliczony na łuski mg%	P wyciągów w mg%	Ilość strąconego nukleoproteidu w % łusek	P nukleoproteidu w mg%	P kolejnych frakcji przeliczony na łuski mg%
1	2	3	4	5	6	7	8	9
I. Wyciąganie 0,14 M NaCl Rybonukleoproteid strącony Przesącz po strąceniu rybonukleoproteidu	102,8	8,06	522	42,1 55,5	94,5	6,36	225	14,3 79,6
II. Wyciąganie 1 M NaCl Dezoksyrybonukleoproteid strącony Przesącz po strąceniu dezoksyrybonukleoproteidu	32,3	2,32	177	4,1 27,0	31,8	1,70	171	3,0 27,1
III. Woda z przemywania pozostałości po II	3,3			3,3	2,6			2,6
IV. Łuski pozostałe po ekstrakcjach I i II i przemywaniu III		76,6	54	41,3		71,4	57	40,6
Łącznie ekstrakty i pozostałość				170,0				167,0

Tablica 2

Nukleoproteidy z łusek odlipidowanych, wyciągane 10% NaCl

Łuski mieszane „C”

Zawartość P całkowitego 265 mg%

” P lipidowego 15 mg%

” P kwasorozpuszcz. 135 mg%

” P nukleinowego 115 mg%

Nukleoproteidy z łusek odlipidowanych, nie przemywanych kwasem trójchloro-
octowym, wyciągano gorącym 10% NaCl. Z frakcji zbieranych co 3 godziny nukleopro-
teidy strącano 3 objętościami alkoholu lub HCl w pH 1 w dwu równoległych próbkach.

Ekstrakcja 10% NaCl 90°	Czas wy- ciągania poszcze- gólnej frak- cji w godz.	P ekstra- howany przeliczony na łuski w mg%	Strącenie alkoholem			Strącenie kw. solnym		
			Ilość strąconego nukleopro- teidu w % łusek	P strąconego nukleopro- teidu w %	P frakcji przeliczony na łuski w mg%	Ilość strąconego nukleopro- teidu w % łusek	P strąconego nukleopro- teidu w %	P frakcji przeliczony na łuski w mg %
I	2	3	4	5	6	7	8	9
I	3	162,0	1,032	4,08	42,5	0,605	4,94	30,0
II	3	18,8	0,357	2,11	7,5	0,150	2,17	3,3
III	3	9,9	0,289	1,89	5,5	0,140	1,00	1,4
IV	6	11,3	0,424	1,72	7,3	0,270	0,85	2,3
Całość wyciągów		202,0	2,102	—	62,8	1,165	—	37,0
Pozostałość łusek		49,9			49,9			49,9
Łącznie wyciągi i po- zostałość		251,9			112,7			86,9

Tablica 3
Zestawienie frakcji fosforowych i ilości nukleoproteidów otrzymanych z łusek łuszczy różnymi metodami
(Wszystkie wyniki podane w stosunku do suchej masy łusek).

Nr	Rodzaj łusek	Typ ekstrakcji	P w łuskach wyjściowych w mg%		Wyzolowany nukleo- proteid w %		P w nukleo- proteidzie w mg%		P nukleo- proteidu w stosunku do łusek w mg%		Pozosta- łość w % łusek	P pozosta- łość w mg % do łusek	P pozosta- łość w stosunku do łusek w mg%
			ogól- ny	nukle- inowy	rybo- -	dezo- ksy-	rybo- -	dezo- ksy-	rybo- -	dezo- ksy-			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	mieszane (A)	0,14 M NaCl; następnie 1 M NaCl	260	124	5,58	3,53	214	322	11,8	11,3	79,5	86,0	68,3
2	" (B)	" "	—	—	2,41	3,20	780	333	18,8	10,7	—	—	—
3	" (A)	1 M NaCl	260	124	8,61	—	480	—	41,3 ^{a)}	—	—	—	—
4	seria BW/52	0,14 M NaCl; następnie 1 M NaCl	183	69	8,06	2,32	522	177	42,1	4,1	76,6	54,0	41,3
5	" (odlipid.)	" "	188	69	6,36	1,70	225	171	13,3	3,0	71,4	57,0	40,6
6	mieszane (A)	5% NaOH; 100°, 0,5 godz	260	124	—	9,86	—	187	—	18,4	—	—	—
7	" (A)	1 N NaOH; 37°, 20 godz	260	124	—	18,1	—	111	—	20,1	—	—	—
8	" (B)	" "	—	—	—	9,78	—	220	—	21,5	—	—	—
9	" (C)	10% NaCl; 90°, 15 godz	265	115	2,10	—	śr. 2990 ^{b)}	—	—	62,8	80,0	62,4	49,9
	" (odlipid.)	" "	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

a) P mieszaniny KRN + KDN

b) według tabl. 2 z podzielenia rubryki 6 przez rubrykę 4.

II. OTRZYMANIE DEZOKSYRYBONUKLEOPROTEIDU PRZEZ HYDROLIZĘ ALKALICZNĄ METODĄ A) LEVENE'A (8) ORAZ B) SMITHA I WYATTA (15)

a. 25 g zmielonych łusek gotowano 35 minut z 150 ml 5% NaOH. Po zobojętnieniu całości kwasem octowym odsączono. Przesącz zakwaszono kwasem octowym do pH 4,5 i dodano 2 objętości alkoholu. Osad przemyto alkoholem i eterem, po czym suszono pod zmniejszonym ciśnieniem.

Uzyskano dezoksyrybonukleoproteid w ilości 9,86% wagi łusek o zawartości 187 mg% P, co po przeliczeniu na suchą masę łusek odpowiada 18,4 mg% P.

b. Do 25 g zmielonych łusek dodano 150 ml 1 N NaOH i inkubowano przez 20 godzin w temperaturze 37°. Całość odwirowano, a przesącz zakwaszono do pH 4,5 kwasem octowym i dodano 2 objętości alkoholu. Osad przemyto i wysuszono.

Otrzymano 18,1% nukleoproteidu o zawartości 111 mg% P, co odpowiada w przeliczeniu na suchą masę łusek 20,1 mg% P.

W drugiej próbie na innych, mieszanych łuskach (B), uzyskano 9,78% nukleoproteidu o zawartości 220 mg% P. Odpowiada to 21,5 mg% P w stosunku do łusek.

W obu wypadkach otrzymano wyłącznie dezoksyrybonukleoproteid, gdyż kwas rybonukleinowy w tych warunkach przechodzi w mononukleotydy, nie wytrącające się po zakwaszeniu i dodatku alkoholu.

III. OTRZYMANIE NUKLEOPROTEIDÓW METODĄ JAVILLIERA I ALLAIRE'A (6).

W poszukiwaniu innej metody, pozwalającej wyciągnąć z łusek nie tylko kwas dezoksyrybozowy, ale oba kwasy nukleinowe razem, zastosowano ekstrakcję gorącym roztworem chlorku sodu.

Próby wyciągania roztworem chlorku sodu w czasie 0,5 — 1,0 godz. doprowadziły do uzyskania bardzo małej ilości fosforu nukleinowego. Okazało się, że wyciąganiu ulega nie sam kwas nukleinowy, ale nukleoproteid. Wobec powyższego zastosowano długotrwałą ekstrakcję celem zbadania wpływu czasu na wydajność nukleoproteidów, względnie kwasów nukleinowych.

20 g zmielonych łusek (C) odlipidowano na gorąco mieszaniną alkoholu i eteru (3:1). Osad po wysuszeniu ogrzewano na wrzącej łaźni wodnej z 10% NaCl przez trzy godziny. Całość odsączono, pozostałość przemyto 10% NaCl i po odsączeniu ponownie ogrzewano z nową porcją NaCl. Identyczną procedurę powtórzono jeszcze trzykrotnie. Wyniki podaje tablica 2.

Poszczególne ekstrakty były lekko mętne i wszystkie zawierały białko. Z wyciągów strącono nukleoproteidy (prawdopodobnie zmieszane z kwasami nukleinowymi) przez dodatek trzech objętości alkoholu lub przez doprowadzenie kwasem solnym do pH 1. Z tablicy 2 widać, że mimo tak długiej ekstrakcji wyciągnięciu i strąceniu (alkoholem) uległo tylko około połowy P nukleinowego. Wyciąganiu ulegają coraz to mniejsze ilości nukleoproteidów. Jeszcze silniej spada zawartość fosforu w poszczególnych frakcjach. Strącanie kwasem w pH 1 daje mniejsze ilości fosforu, aniżeli strącanie alkoholem (37 mg% P zamiast 62,8 mg% P).

Zestawienie ilości wyizolowanych nukleoproteidów z łusek różnymi metodami, ilość zawartego w nich fosforu i ilość fosforu nukleinowego w stosunku do suchej masy łusek podaje tablica 3.

Z zestawienia (nr 7 i 8) wynika, że w badanych łuskach ilości fosforu w KDN, uzyskanym za pomocą metody ekstrakcji jednonormalnym NaOH, wynoszą maksymalnie 21,5 mg%. Stanowi to około 16% całego fosforu nukleinowego łusek i odpowiada około 215 mg% KDN w łuskach mieszanych (przyjmując około 10% fosforu w KDN).

Dyskusja

Brak ilościowego oznaczenia obu kwasów nukleinowych w łuskach uniemożliwia wyciągnięcie ostatecznych wniosków, ale uzyskane dane świadczą o obecności w łuskach większej ilości kwasu rybonukleinowego, niż kwasu dezoksyrybonukleinowego. Otrzymane dane korygują wyniki Ł o z y (9), który stwierdził występowanie w łuskach jedynie kwasu dezoksyrybonukleinowego, a brak kwasu rybonukleinowego.

Ilości fosforu rybonukleinowego, wyodrębnionego w formie nukleoproteidu są zmienne i dochodzą do 42,1 mg% fosforu KRN. Być może, ilość jego zależy od czasu ekstrakcji, gdyż właśnie w próbach 4 i 5 z tablicy 3 łuski były szczególnie długo i wyczerpująco ekstrahowane.

Z drugiej strony trudno jest porównać te dwie próby łusek (seria BW/52), w których zawartość fosforu nukleinowego była w ogóle wyjątkowo niska (69 mg%), z wynikami otrzymanymi z innych mieszanych łusek.

Rybonukleoproteidy z łusek odlipidowanych (nr 5 w porównaniu z 4 w tabl. 3) wyciągają się 0,14 M roztworem chlorku sodu trudniej i wykazują dużo mniejszą zawartość fosforu. Wskazuje to na ewentualny efekt rozerwania kompleksu liponukleoproteidowego, a może jednocześnie na denaturację wywołaną suszeniem przed odlipidowaniem.

Małe ilości nukleoproteidów, szczególnie dezoksyrybozowych izolowanych metodą Mirskiego i Pollistera (10) sugerowały obecność dużych ilości kwasu nukleinowego nie ekstrahującego się w ogóle roztworem chlorku sodu, być może kwasu dezoksyrybonukleinowego pochodzenia wirusowego (Ł o z a). Trzeba jednak zaznaczyć, że wydajności osiągane tą metodą przy ekstrakcji zwykłych nukleoproteidów tkankowych również nie są zbyt wysokie i dochodzą zaledwie do 50% (5), (7). Wprawdzie uważa się, że dezoksyrybonukleoproteidy wirusowe w większości wypadków nie ulegają wyciągnięciu molarnym chlorkiem sodu, ale ilości fosforu KDN uzyskane przez nas przez hydrolizę gorącym NaOH (nr 6 tabl. 3), a więc metodą bardziej ilościową, wskazują również na niską zawartość kwasu dezoksyrybonukleinowego w łuskach.

Wysokie ilości nukleoproteidu i wysoka wydajność fosforu nukleinowego uzyskane przez Ł o z ę (9) nie świadczą bynajmniej o tym, jak twierdzi autor, że nukleoproteid ten, wykazujący dodatnią reakcję na dezoksyrybozę, był wyłącznie dezoksyrybozowy. Ł o z a ekstrahował łuski 0,1 N NaOH na zimno, a po zakwaszeniu kwasem octowym izolował prawdopodobnie oba nukleoproteidy, podczas gdy w warunkach przez nas stosowanych (1 N NaOH, temp. 100° w czasie krótkim, lub 37° przez 20 godzin) kwas rybonukleinowy przechodzi ilościowo w mononukleotydy nie wytrącające się później z hydrolizatu.

Jak wynika z naszych badań, nukleoproteidy zawarte w łuskach ekstrahują się trudniej od nukleoproteidów tkankowych i to zarówno zimnym 0,14 i 1 M NaCl, jak i gorącym 10% NaCl, mimo że stosowany przez nas czas wyciągania był bardzo długi, natomiast nukleoproteidy skóry, jak to stwierdził O r m s b e e i współpracownicy (12), frakcjonując skórę poddaną działaniu iperytu, ekstrahują się łatwo 0,14 M NaCl, podobnie jak i inne nukleoproteidy tkankowe.

Istota związków fosforowych w łuskach, pozostających po ekstrakcji chlorkiem sodu pozostaje nieznana. Trudno stwierdzić z pewnością, który z nukleoproteidów dominuje w tej pozostałości i czemu należy przypisać wyjątkową odporność ich na ekstrakcję.

Brak danych w literaturze co do zawartości poszczególnych frakcji fosforowych w skórze normalnej utrudnia porównanie jej z łuskami. Ogólna zawartość fosforu w normalnej ludzkiej skórze jest niewiele mniejsza od zawartości jego w łuskach. Według B r o w n a (2) zawartość fosforu całkowitego wynosi średnio 186 mg% P. M i t c h e l l (11) podaje również wartość około 170 mg% P. Zawartość fosforu w warstwie rogowej skóry może być wprawdzie niższa, ale w tym ostatnim wypadku mamy do czynienia ze skórą, która przeszła normalny

proces rogowacenia. W tym wypadku do warstwy rogowej skóry przechodzić mogą bardzo małe ilości fosforu. Natomiast w łuskach łuszczycy, w wyniku nienormalnego rogowacenia z pozostawieniem może nawet jąder komórkowych, mogą wystąpić duże ilości fosforu. Być może, że kwas rybonukleinowy obecny w dużych ilościach w łuskach ma jakiś związek z tak wzmożoną syntezą białka łusek, tym bardziej, że *stratum granulosum* — rogowacząca warstwa skóry, cechuje się właśnie dużą zawartością kwasu rybonukleinowego.

Streszczenie

1. Z łusek łuszczycy (*Psoriasis vulgaris*) otrzymano przez wyciągnięcie 0,14 M i 1 M roztworem chlorku sodu nukleoproteidy rybo- i dezoksyrybozowe. Okazało się, że nukleoproteidy łusek ulegają tylko w małym stopniu wyciągnięciu zimnymi roztworami chlorku sodu.

2. Z dezoksyrybonukleoproteidu, otrzymanego w powyższy sposób, izolowano metodą *Sevaga* czysty kwas dezoksyrybonukleinowy o zawartości 8,1 % P.

3. Przez hydrolizę łusek 1 N NaOH otrzymano również niezbyt duże ilości dezoksyrybonukleoproteidu. Wskazuje to na obecność w łuskach łuszczycy dużych ilości kwasu rybonukleinowego obok niewielkich ilości kwasu dezoksyrybonukleinowego.

4. Nukleoproteidy zawarte w łuskach różnią się wyraźnie od innych nukleoproteidów tkankowych trwałością i odpornością na działanie gorącego 10% roztworu chlorku sodu. Długotrwała ekstrakcja usuwa tylko około połowy całego fosforu nukleinowego.

5. Istota związków fosforowych, nie wyciągających się z łusek zimnym i gorącym roztworem chlorku sodu, pozostaje nieznana.

LITERATURA

1. Bendich A., Russell P. J., Brown G. B.: *J. Biol. Chem.* **203**, 305, 1953.
2. Brown H.: *J. Biol. Chem.* **75**, 789, 1927.
3. Fiske C., Subbarow Y.: *J. Biol. Chem.* **66**, 375, 1925.
4. Gulland J. M., Barker G. R., Jordan D. O.: *Ann. Rev. Biochem.* **14**, 175, 1945.
5. Gulland J. M., Jordan D. O., Threlfall C. J.: *J. Chem. Soc.* 1129, 1947.
6. Javillier M., Allaire H.: *Bull. Soc. Chim. Biol.* **13**, 678, 1931.
7. Khouvine Y., Hirsch M. L.: *Bull. Soc. Chim. Biol.* **34**, 305, 1952.
8. Levene P. A., Bass Z. W.: *Nucleic Acids*, N. York., Chem. Catal. Comp. 1931.

9. Ł o z a E.: *Pol. Tyg. Lek.* **8**, 617, 660, 1953.
10. M i r s k y A. E., P o l l i s t e r A. W.: *Proc. Nat. Acad. Sci. US* **28**, 344, 1942.
11. M i t c h e l l H. H., H a m i l t o n T. S., S t e g g e r d a F. R., B e a n H. W.: *J. Biol. Chem.* **158**, 625, 1945.
12. O r m s b e e R. A., H e n r i q u e s F. C., jr, B a l l E. G.: *Arch. Biochem.* **21**, 301, 1949.
13. S c h m i d t G., T h a n n h a u s e r S. J.: *J. Biol. Chem.* **161**, 83, 1945.
14. S e v a g M., L a c k m a n n D. B.: *J. Biol. Chem.* **124**, 425, 1938.
15. S m i t h J. D., W y a t t S. R.: *Biochem. J.* **49**, 146, 1951.

НУКЛЕОПРОТЕИДЫ ШЕЛУХИ *PSORIASIS VULGARIS*. ИХ КОЛИЧЕСТВО И СОСТАВ

Резюме

1. В результате экстрагирования шелухи *psoriasis* 0,14 М и 1 М раствором NaCl были получены нуклеопротеиды, рибонуклеопротеиды и дезоксирибонуклеопротеиды.

2. Из таким образом полученного дезоксирибонуклеопротеида была выделена по методу Севага чистая дезоксирибонуклеоновая кислота содержащая 8,1% Р.

3. В результате гидролиза шелухи *psoriasis* 1 N NaOH были получены небольшие количества дезоксирибонуклеопротеидов, что свидетельствует о содержании в шелухе большого количества рибонуклеиновой кислоты, наряду с небольшими количествами дезоксирибонуклеиновой кислоты.

4. Нуклеопротеиды содержащиеся в шелухе резко отличаются от нуклеопротеидов плевы устойчивостью по отношению к 10% раствору NaCl. Продолжительным экстрагированием можно выделить только половину нуклеинового фосфора.

5. Строение и состав фосфорных соединений, которых нам не удалось выделить из шелухи холодным и горячим растворами NaCl, пока неизвестны.

NUCLEOPROTEINS OF THE *PSORIASIS* SCALES QUALITATIVE DETERMINATIONS AND COMPOSITION ANALYSIS

Summary

1. Ribonucleoproteins and desoxyribonucleoproteins from the psoriasis scales (*Psoriasis Vulgaris*) have been extracted with 0,14 M and 1 M NaCl. It has been evident, that nucleoproteins from the scales undergo extraction with cold sodium chloride solution only to a small extent.

2. Pure desoxyribonucleic acid, containing 8,1% of P, has been isolated according to the method of Svag, from the desoxyribonucleoprotein, obtained by the cold saline extraction.

3. Some amount of desoxyribonucleoproteins could be obtained by the alkaline hydrolysis of the scales with N NaOH. It accounts for the presence of large amount of ribonucleic acid and a small amount of desoxyribonucleic acid.

4. The nucleoproteins from the scales differ from the other tissue nucleoproteins in stability and resistance to the action of hot 10% sodium chloride solution. The prolonged extraction removes only about half of the total amount of nucleic phosphorus.

5. The character of the phosphorous compounds non extractable from the scales by cold and hot sodium chloride solution remains obscure.

Otrzymano 20.VIII.1954

ELŻBIETA SEMPIŃSKA

**BADANIA CHROMATOGRAFICZNE HYDROLIZATÓW ŁUSEK
I NUKLEOPROTEIDÓW Z ŁUSEK CHORYCH NA ŁUSZCZYCĘ***Z Zakładu Biochemii Uniwersytetu Łódzkiego**Kierownik: prof. dr A. Dmochowski*

Dotychczasowe badania w Zakładzie Biochemii UŁ nad purynami łusek łuszczycy i frakcji nukleoproteidów z tychże łusek doprowadziły: 1° do stwierdzenia występowania adeniny i guaniny [Ł o z a (5)], 2° do orientacyjnych oznaczeń wzajemnego stosunku ilości tychże aminopuryn w łuskach za pomocą metody grawimetrycznej: 1,3 razy więcej guaniny niż adeniny [D m o c h o w s k i i P a d z i k (3)], 3° do stwierdzenia znacznie większej ilości guaniny (2:1) za pomocą bardziej czułych metod, spektrofotometrycznej i jodometrycznej [D m o c h o w s k i i P a n u s z (4)]. Niezgodność ta mogła być spowodowana znacznymi błędami metody grawimetrycznej, ale również nasuwała przypuszczenie obecności znacznych ilości oksypuryn, jak hipoksantyny, ksantyny, a nawet innych, na przykład oksyadeniny. W tak mało zbadanym materiale, jak łuski, wszelkie niespodzianki były możliwe, toteż dla ostatecznego zorientowania się w rodzajach występujących puryn poddano łuski całkowite i szereg frakcji otrzymanych z nich badaniom chromatograficznym.

Część doświadczalna

Z wielu metod, stosowanych do rozdziału chromatograficznego puryn, wybrano dwie, a mianowicie metodę C a r t e r a (2) oraz metodę W y a t t a (9). C a r t e r używa jako rozpuszczalników alkoholu izoamylowego z różnymi buforami fosforanowymi. W takich układach guanina prawie się nie przesuwa z miejsca startu, a adenina, hipoksantyna i ksantyna oddzielają się wyraźnie od guaniny wędrując wraz z rozpuszczalnikiem. Dla buforu zastosowanego w niniejszej pra-

cy (5% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) kolejne R_f dla guaniny, adeniny, hipoksantyny i ksantyny wynoszą wg *Cartera*: 0,02, 0,44, 0,57, 0,49. Metoda *Wyatta* posługuje się alkoholem izopropylowym z dodatkiem kwasu solnego i wody. W metodzie tej, stosującej środowisko kwaśne, guanina wraz z innymi purynami wędruje wzdłuż paska z fazą ruchomą. R_f według *Wyatta* wynoszą kolejno: guaniny 0,25, adeniny 0,36, hipoksantyny 0,31, ksantyny 0,25. Jednoczesne zastosowanie tych dwóch metod wyklucza możliwość pominięcia jakiegś puryny, która pozostając niezauważona w jednym układzie (na skutek zbliżonych do siebie R_f) musi być z dużym prawdopodobieństwem wykryta w układzie drugim, charakteryzującym się innymi wielkościami R_f .

Do wywoływania chromatogramów stosowaliśmy metodę opisaną przez *Vischera* i *Chargaffa* (8). Przez zanurzenie pasków do roztworu azotanu rtęci w 0,5 N HNO_3 wytrącają się na bibule kompleksy purynowo-rtęciowe. Nadmiar azotanu rtęci wypłukuje się z bibuły i rozkłada kompleksy przez zanurzenie bibuły w roztworze $(\text{NH}_4)_2\text{S}$. W miejscach, gdzie znajdowały się puryny, powstają ciemne plamy HgS .

Puryny izolowano z badanych materiałów stosując hydrolizę kwaśną oraz strącanie roztworem Ag_2SO_4 lub $\text{CuSO}_4 + \text{NaHSO}_3$. Kompleksy srebrowe lub miedziowe puryn rozkładano kwasem solnym (w metodzie srebrowej) lub siarczkiem sodu (w metodzie miedziowej). Należy nadmienić, że jednorazowe strącenia puryn nie dawały zupełnie czystych chromatogramów. Zanieczyszczenia w nakraplanych roztworach powodowały powstawanie tak zwanych „ogonów“, utrudniających niejednokrotnie właściwe odczytywanie chromatogramów.

BADANIE CHROMATOGRAFICZNE HYDROLIZATÓW ŁUSEK PEŁNYCH (MIESZANYCH OD RÓŻNYCH PACJENTÓW)

Drobno zmielone i wysuszone łuski w ilości 5 g hydrolizowano w ciągu 2 godzin w 1 N H_2SO_4 . Po oziębieniu odsączono niezhydrolizowaną pozostałość, przemyto kilkakrotnie wodą, przesącze zebrano razem i zadano nadmiarem roztworu Ag_2SO_4 , nasyconego na gorąco. Wytrącony osad pozostawiono w lodówce na 24 godziny. Wytrącone kompleksy srebrowe przemyto kilkakrotnie wodą zakwaszoną kilku kroplami 2 N H_2SO_4 z dodatkiem Ag_2SO_4 , a następnie rozłożono gorącym 1 N HCl . Otrzymany roztwór odparowano do sucha, suchą pozostałość rozpuszczono w wodzie i strącono puryny ponownie. Roztwór otrzymany po dwukrotnym strąceniu, zawierający chlorowodorki puryn, zateżono do

10 ml i nakropiono na kilka pasków bibuły *Whatman* nr 1 w ilościach od 0,025 do 0,2 ml (nieznane stężenia puryn). Paski zawieszono w słojach i rozwijano chromatogramy za pomocą rozpuszczalników: a) alkohol izopropylowy-woda-HCl, b) alkohol izoamyłowy-5% roztwór $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. Jednocześnie sporządzano chromatogramy kontrolne, nakraplając roztwory siarczanu adeniny, chlorowodorku guaniny i hipoksantyny¹⁾, w ilościach po 20 μg wolnych puryn. Chromatogramy po rozwinięciu suszono i wywoływało metodą rtęciową.

Porównanie chromatogramów kontrolnych roztworów guaniny, adeniny i hipoksantyny z chromatogramami hydrolizatu łusek w dwóch rodzajach rozpuszczalników.

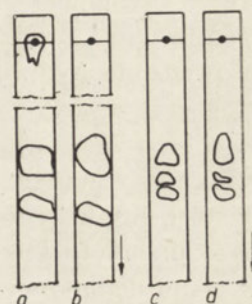
Rozpuszczalnik: alkohol izoamyłowy-5% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

- a) chromatogram kontrolny
- b) chromatogram hydrolizatu

Rozpuszczalnik: alkohol izopropylowy-woda-HCl

- c) chromatogram kontrolny
- d) chromatogram hydrolizatu

Gu = guanina, Ad = adenina, Hp = hipoksantyna



Rys. 1

Rys. 1. Na chromatogramach kontrolnych (a, c) widoczne są od góry a) rozpuszczalnik alkohol izoamyłowy-5% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$: guanina $R_f = 0,02$, adenina $R_f = 0,45$, hipoksantyna $R_f = 0,59$; c) rozpuszczalnik alkohol izopropylowy-woda-HCl, od góry: guanina $R_f = 0,25$, hipoksantyna $R_f = 0,32$ oraz adenina $R_f = 0,37$. Na chromatogramach roztworów puryn ze zhydrolizowanych łusek (b, d) widać kolejno od góry plamy, których R_f zgadzają się z R_f guaniny, adeniny i hipoksantyny na chromatogramach kontrolnych.

Obecny w łuskach kwas moczowy, nie zaznacza się na chromatogramach. Usuwa go prawie całkowicie dwukrotne strącenie srebrem, a ponadto odczynnik rtęciowy wywołuje go w o wiele większych stężeniach niż puryny.

W celu upewnienia się, czy odczynnik rtęciowy wywołał wszystkie związki purynowe, które mogły znajdować się na chromatogramach w większych lub mniejszych ilościach, prześwietlono paski bibuły bezpośrednio po wysuszeniu metodą *Markham* i *Smitha* (6) światłem z lampy kwarcowej, przechodzącym przez filtr z roztworu NiSO_4 i CoSO_4 oraz Cl_2 gazowego w CCl_4 [*Burrows* i wsp. (1)]. Filtr taki przepuszcza promienie o długości 253,7 $\text{m}\mu$ oraz 265 $\text{m}\mu$. Pu-

¹⁾ Eastman, Kodak.

ryny rozmieszczone na paskach bibuły pochłaniają promienie o tej długości fali i powodują powstawanie na podłożonym pod paski papierze światłoczułym białych plam na czarnym tle.

Zanalizowanie chromatogramów powyższą metodą potwierdziło poprzednio otrzymane wyniki. Ze względu na brak w naszym Zakładzie urządzeń do badania w nadfiolecie ograniczono się w dalszym ciągu pracy do metody rtęciowej, dającej zresztą zupełnie zgodne rezultaty.

Łuski są materiałem zwartym, twardym i źle zwilżalnym, a więc trudno ulegającym hydrolizie. W celu sprawdzenia, czy dwugodzinne ogrzewanie z kwasem wystarczy do uwolnienia wszystkich puryn, przeprowadzono hydrolizę dwustopniową łusek.

DWUSTOPNIOWA HYDROLIZA PEŁNYCH ŁUSEK

10 g łusek hydrolizowano 2 godziny w 1 N H_2SO_4 . Płyn odsączono, osad przemyto kilkakrotnie gorącą wodą i poddano dalszej hydrolizie w ciągu dodatkowych 10 godzin. Zauważono, że roztwór po 6—7 godzinach dalszej hydrolizy nabiera różowego zabarwienia.

Przesącz po 2-godzinnej hydrolizie podzielono na dwie części i strącono puryny w jednej porcji roztworem siarczanu srebra, w drugiej siarczanem miedzi. Zauważono, że przy zobojętnianiu roztworu w celu wytrącenia puryn metodą miedziową (puryny strącano przy pH 4,5) wypadł osad, rozpuszczający się po podgrzaniu roztworu i wytrącający się po oziębieniu. Osad odwirowano, przemyto wodą zakwaszoną CH_3COOH , a następnie zbadano jakościowo na zawartość fosforu i rybozy.

Próba wypadła dodatnio, co wskazywałoby na niecałkowitą hydrolizę kwasu nukleinowego rybozowego.

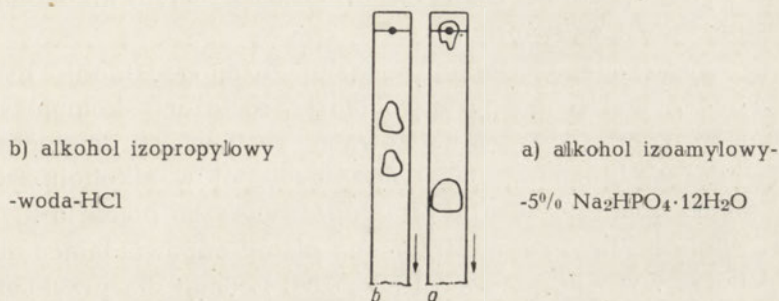
Osady srebrze i miedziowe puryn poddano po rozłożeniu analizie chromatograficznej. Uzyskano w obu układach rozpuszczalników plamy odpowiadające guaninie, adeninie i hipoksantynie.

Z roztworu po dodatkowych 10 godzinach hydrolizy wytrącono metodą miedziową bardzo niły, brunatny osad. Osad ten po rozłożeniu siarczkiem sodu i zagęszczeniu do niewielkiej objętości (0,5 ml) nakropiono na dwa paski bibuły w ilościach 0,1 ml. Po rozwinięciu chromatogramów w dwóch układach rozpuszczalników otrzymano (po wywołaniu rtęcią):

- a) alkohol izopropylowy-woda-HCl: plamę o $R_f = 0,99$,
- b) alkohol izoamylowy-5% $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$: plamę o $R_f = 0,85$.

**BADANIE CHROMATOGRAFICZNE RYBONUKLEOPROTEIDU WYCIĄGNIĘTEGO Z ŁUSEK
0,14 M NaCl METODĄ MIRSKYEGO I POLLISTERA (7)**

0,6 g rybonukleoproteidu, wyciągniętego z drobno zmielonych łusek 0,14 M NaCl w 0°, strąconego alkoholem i wysuszonego, poddano ośmiodzinnej hydrolizie w 1 N H₂SO₄. Niezhydrolizowaną pozostałość odsączono, przemyto gorącą wodą i z połączonych przesączów strącono puryny metodą miedziową. Rozłożony osad puryn poddano analizie chromatograficznej w używanych rozpuszczalnikach (rys. 2) a) alkohol izoamylowy-5% Na₂HPO₄·12H₂O: otrzymano plamy odpowiadające kolejno guaninie, adeninie; b) alkohol izopropylowy-woda-HCl: otrzymano plamy odpowiadające guaninie, adeninie. W obu wypadkach brak hipoksantyny.



Rys. 2

Chromatogram hydrolizatu rybonukleoproteidu

ANALIZA CHROMATOGRAFICZNA NUKLEOPROTEIDU WYCIĄGNIĘTEGO 1 M NaCl

1 g nukleoproteidu, wyciągniętego 1 M NaCl w 0° i wytrąconego alkoholem, poddano ośmiogodzinnej hydrolizie w 1 N H₂SO₄. Z płynu otrzymanego po odsączeniu niezhydrolizowanej pozostałości wytrącono puryny metodą miedziową.

Po rozłożeniu kompleksów kilkoma kryształkami Na₂S roztwór puryn poddano analizie chromatograficznej. Otrzymano w obu rozpuszczalnikach chromatogramy analogiczne do poprzednich.

**ANALIZA CHROMATOGRAFICZNA NUKLEOPROTEIDU WYCIĄGNIĘTEGO
0,1 N NaOH W 0°**

15 g łusek zalano 0,1 N NaOH i pozostawiono na 2 dni w 0°. Po tym okresie czasu odwirowano nie rozpuszczoną pozostałość, a płyn zobojętniono do pH 4 za pomocą kwasu octowego. Wytrącony osad, zawierający nukleoproteidy typu rybozowego i dezoksyrybozowego, przemy-

to alkoholem 50%, a następnie 96%, wysuszono, zhydrolizowano w ciągu ośmiu godzin w 1 N H₂SO₄, wytrącono puryny metodą miedziową, rozłożono kompleksy miedziowe i roztwór po zateżeniu poddano analizie chromatograficznej. Wykryto obecność guaniny i adeniny.

**ANALIZA CHROMATOGRAFICZNA NUKLEOPROTEIDU WYCIĄGNIĘTEGO
1 N NaOH W TEMP. 37°**

25 g łusek zalano 1 N NaOH, pozostawiono na 2 dni w temp. 37°, a następnie odwirowano. Przesącz zobojętniono kwasem octowym do pH 4. Wytrącony osad zawierał nukleoproteidy typu dezoksyrybozowego, gdyż rybonukleoproteidy rozpadają się w tych warunkach na nukleotydy i nie wytrącają się po zakwaszeniu. Osad przemyto alkoholem 50%, a następnie 96% i wysuszono.

1 g wysuszonego osadu poddano ośmiogodzinnej hydrolizie w 1 N H₂SO₄, wytrącono puryny miedzią, rozłożono kompleksy miedziowe siarczkiem sodu i zanalizowano roztwór chromatograficznie. Po rozwinięciu chromatogramów otrzymano: a) w alkoholu izopropylowym plamy guaniny, adeniny oraz dużą, wyraźną plamę o $R_f = 0,99$, b) w alkoholu izoamylowym otrzymano plamy odpowiadające guaninie, adeninie oraz wyraźną plamę o $R_f = 0,88$. Podano dla przykładu zdjęcie chromatogramu rozwiniętego w układzie alkohol izopropylowy-woda-HCl (rys. 3). Dwukrotne strącenie miedzią zmniejsza wielkość plamy (przy tym samym rozcieńczeniu).

Strącenie metodą srebrową powoduje występowanie na chromatogramach rozwiniętych w alkoholu izopropylowym zamiast plamy o $R_f = 0,99$ plamę o $R_f = 0,64$.

**ANALIZA CHROMATOGRAFICZNA POZOSTAŁOŚCI PO KOLEJNEJ EKSTRAKCYI ŁUSEK
1 M NaCl, A NASTĘPNIE 1 N NaOH**

Pozostałość po kolejnej ekstrakcji łusek 1 M NaCl oraz 1 N NaOH poddano hydrolizie w 1 N H₂SO₄ przez 8 godzin. Niezhydrolizowaną pozostałość odsączono, a do przesączu dodano 1% roztworu CuSO₄ + NaHSO₃. Wytrącił się nikły osad o kolorze brunatnoceglastym. Osad ten po rozłożeniu siarczkiem sodu dał na chromatogramach: a) w alkoholu izopropylowym-woda-HCl jedynie plamę o $R_f = 0,99$, b) w alkoholu izoamylowym-5% Na₂HPO₄·12H₂O plamę o $R_f = 0,85$.

Strącenie srebrem zmienia i w tym wypadku położenie plamy w układzie z alkoholem izopropylowym. Na rys. 4 podano zdjęcie

chromatogramu rozwiniętego w alkoholu izopropylowym (strącenie metodą miedziową).

W celu bliższego zanalizowania związku dającego nieznaną plamę rozwinięto chromatogram w rozpuszczalniku alkohol izopropylowy-woda-HCl i nie wywołując go wycięto miejsce odpowiadające plamie. Nieznany związek wyeluuowano 0,1 N HCl (w ciągu 24 godzin), i zbadano spektrofotometrycznie w ultrafiolecie.

Widmo okazało się zupełnie różne od typowego widma purynowego. Nie wykazało żadnego charakterystycznego maksimum w granicach 240—280 m μ . Gwałtowny wzrost pochłaniania zaznaczył się poniżej 230 m μ .

Rys. 3

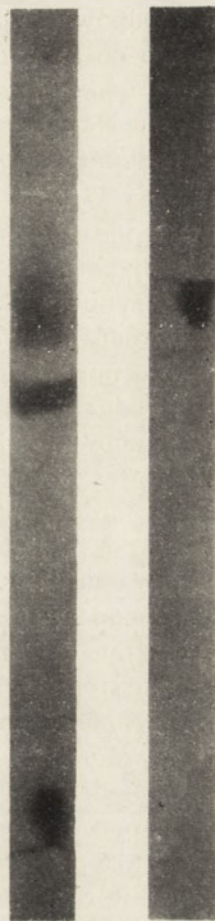
Chromatogram hydrolizatu nukleoproteidu wyciągniętego
1 N NaOH

Rozpuszczalnik: alkohol izopropylowy-woda-HCl

Rys. 4

Chromatogram hydrolizatu łusek po ekstrakcji 1 M NaCl
i 1 N NaOH

Rozpuszczalnik: alkohol izopropylowy-woda-HCl



Rys. 3

Rys. 4

Dyskusja

Chromatograficzna analiza łusek, jak również wyizolowanych z nich nukleoproteidów doprowadziła do ostatecznego potwierdzenia obecności w tym materiale znacznych ilości guaniny i adeniny. Okazało się ponadto, że pełne, nie poddane żadnej przeróbce chemicznej łuski zawierają również hipoksantynę i to, jak się zdaje, w dość znacznej ilości. Fakt ten wskazuje na przypuszczalny proces dezaminacji kwasu adeninowego z ATP na kwas inozynowy. Innych puryn w łuskach nie wykryto. Nukleoproteidy wyciągnięte z łusek wykazały jedynie obecność guaniny i adeniny. Ilości nukleoproteidów, szczególnie typu dezoksy-, są różne dla łusek od różnych pacjentów. Co się tyczy kwasu moczowego, to nie znajdowano go na chromatogramach. Przypuszczalnie zarówno metoda wywoływania, jak i stosowane układy rozpuszczalników

nie są odpowiednie do jego wyodrębnienia. Dodatek 40 μg kwasu moczowego do roztworu puryn nakraplanych na chromatogram powoduje jedynie lekkie rozciągnięcie plamy adeniny w alkoholu izoamylowym-5% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. Strącenie siarczanem srebra w kwaśnym środowisku i rozłożenie kompleksów srebrowych kwasem solnym eliminuje kwas moczowy z roztworu.

Wstępne badania nasuwały przypuszczenie, że dodatkowa plama, występująca na chromatogramach, może mieć coś wspólnego ze związkami purynowymi. Związek bowiem dający tę plamę strącał się zarówno srebrem, jak i miedzią w warunkach takich, jakie stosuje się przy strącaniu puryn, oraz wywoływał się rtęcią w środowisku 0,5 N HNO_3 . Dalsze jednakże obserwacje nad pochłanianiem w nadfiolecie, przeprowadzone metodą Markhama i Smitha (6) pod lampą kwarcową (patrz część doświadczalna), oraz badania spektrofotometryczne nie potwierdziły pierwotnego przypuszczenia. Dodatnia reakcja ninhydrinowa, wykonana z eluatem plamy oddzielonej chromatograficznie, wskazywałaby raczej na obecność jakiegoś aminokwasu lub związku połączonego z aminokwasem. Nie jest dotychczas zrozumiałe, dlaczego związek ten daje plamy w alkoholu izopropylowym o różnych R_f po strąceniu srebrem i po strąceniu miedzią. Być może, redukujące środowisko w metodzie miedziowej wywołuje jakieś bliżej nie określone zmiany. W celu uniknięcia zarzutu, że inny związek strąca się srebrem, a inny miedzią, wykonano kolejne strącenie związku miedzią, a następnie srebrem, za każdym razem wykonując chromatogram w układzie alkohol izopropylowy-woda-HCl. Plama z osadu miedziowego po wywołaniu rtęcią wykazała $R_f = 0,99$, zaś po strąceniu srebrem zmieniła swoje położenie na $R_f = 0,64$. Nieznany związek wyciąga się z łusek dość trudno, gdyż dopiero działaniem 1 N NaOH i to nie całkowicie. Ilości jego w różnych łuskach są bardzo różne. Dla bliższego określenia natury tego związku należałoby przeprowadzić dokładniejsze badania, przede wszystkim w sensie stwierdzenia domniemanego charakteru aminokwasowego lub peptydowego.

Jak ciekawym i obiecującym materiałem są łuski, może świadczyć kilka obserwacji poczynionych w trakcie hydrolizy oraz wyodrębniania nukleoproteidów. Prowadząc dwustopniowe ogrzewanie z kwasem siarkowym zauważono, że po odsączeniu 2-godzinnej hydrolizatu i po dodatkowej kilkugodzinnej hydrolizie z nową porcją 1 N H_2SO_4 roztwór nabiera wyraźnie różowego koloru. Po wyklóceniu takiego roztworu z alkoholem amylovym lub butylowym całe zabarwienie przechodzi do warstwy alkoholowej, która staje się intensywnie malinowa. Obserwacja ta również wymaga szerszego opracowania.

Przy wyciąganiu nukleoproteidów roztworami NaCl oraz NaOH zauważono jeszcze jeden frapujący fakt. Część wyodrębnionych nukleoproteidów miała zdolność rozpuszczania się na gorąco w wodzie, podobnie jak typowe β -rybonukleoproteidy, obecne w dużej ilości w trzustce. Przy dłuższym traktowaniu materiału łuskowego 1 N NaOH i kolejnym wytrącaniu kwasem octowym frakcji zawierającej nukleoproteidy otrzymuje się w drobnych ilościach związek dający reakcję biuretową, zawierającą fosfor i rybozę (a więc nukleoproteid) mający własność nie tylko rozpuszczania się w gorącej wodzie powyżej 60° , ale również wytrącania się po oziębieniu. Jedynym dotychczas znanym białkiem o podobnych własnościach jest białko Bence-Jonesa (bezfosforowe), występujące w moczu chorych na nowotwór szpiku kostnego. Dokładne badania nad β -rybonukleoproteidami łusek z uwzględnieniem zauważonych i opisanych wyżej własności są tematem oddzielnej pracy.

Streszczenie

1) Przeprowadzono na bibule Whatmana nr 1 metodą Cartera oraz Wyattta analizę chromatograficzną osadów srebrowych i miedziowych puryn z hydrolizatów kwaśnych łusek łuszczycy. Stwierdzono obecność w łuskach adeniny, guaniny i w mniejszej ilości hipoksyantyny.

2) Hydrolizaty nukleoproteidów wyciągniętych z łusek: a) 0,14 M NaCl, b) 1 M NaCl, c) 0,1 N NaOH wykazują na chromatogramach jedynie obecność adeniny i guaniny. Hydrolizaty z dezoksyrybonukleoproteidów wyciągniętych 1 N NaOH dają obok adeniny i guaniny dodatkową plamę o $R_f = 0,99$ w układzie alkohol izopropylowy-woda-HCl i 0,85 w układzie alkohol izoamylowy-5% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (z osadów miedziowych).

3) Nieznana plama pojawiła się również wraz z adeniną i guaniną na chromatogramach hydrolizatów pozostałości po ekstrakcji łusek 1 M NaCl. Usunięcie wszystkich nukleoproteidów z łusek przez kolejne ekstrakcje 1 M NaCl i 1 M NaOH daje w wyniku — na chromatogramie hydrolizatu z pozostałości — wyłącznie wspomnianą, nieznaną plamę.

4) Eluat z powyższej plamy nie wykazuje pochłaniania w obszarze 240—280 m μ .

LITERATURA

1. Burrows S., Grylls F. S., Harrison J. S.: *Nature* **170**, 800, 1952
2. Carter C. E.: *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 1466, 1950.
3. Dmochowski A. i Padzik H.: *Acta Biochim. Pol.* **1**, 73, 1954.

4. D m o c h o w s k i A. i P a n u s z H.: *Acta Biochim. Pol.* **1**, 81, 1954.
5. Ł o z a E.: *Pol. Tyg. Lek.*, **8**, 617, 660, 1953.
6. M a r k h a m H. i S m i t h J. D.: *Biochem. J.* **45**, 294, 1949.
7. M i r s k y A. E. i P o l l i s t e r A. W.: *Proc. Nat. Acad. Sci. US* **28**, 344 1942.
8. V i s c h e r E. i C h a r g a f f E.: *J. Biol. Chem.* **176**, 703, 1948.
9. W y a t t G. R.: *Biochem. J.* **48**, 584, 1951.

Niniejsza praca została wykonana dzięki subwencji otrzymanej na badania naukowe przez Zakład Biochemii UŁ z Komisji Popierania Twórczości Naukowej i Artystycznej przy Urzędzie Rady Ministrów.

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГИДРОЛИЗАТА ШЕЛУХИ *PSORIASIS VULGARIS*

Резюме

1. Был проведен хроматографический анализ серебрянных и медных осадков пуринов из кислотного гидролизата шелухи *psoriasis* на бумаге Ватман № 1 по методу Картера и Уайта. В шелухе были обнаружены аденин, гуанин и в меньшем количестве гипоксантин.

2. На хроматограмме, содержащей гидролизат нуклеопротеидов экстрагированных из шелухи а) 0,14 м NaCl б) 1 N NaCl в) 0,1 N NaOH, были обнаружены только аденин и гуанин. На хроматограмме, содержащей гидролизат дезоксирибонуклеопротеидов экстрагированный 1 N NaOH, наряду с аденином и гуанином было обнаружено пятно, имеющее $R_f = 0,99$ для растворителя состоящего из смеси изопропиловый спирт — вода — HCl и $R_f = 0,85$ для растворителя состоящего из смеси изоамиловый спирт — 5% NaHPO_4 12 RO (из медных осадков).

3) На хроматограмме, содержащей гидролизат шелухи, после первоначального экстрагирования ее 1 N NaCl наряду с аденином и гуанином было обнаружено неизвестное пятно.

На хроматограмме, содержащей гидролизат шелухи, после первоначального удаления из нее нуклеопротеидов путем последовательного экстрагирования 1 N NaCl и 1 N NaOH, было обнаружено только вышеуказанное, неизвестное пятно.

4. Элбат вышеуказанного пятна не обнаружил поглощения при 240—280 м/н.

CHROMATOGRAPHIC STUDIES ON THE NUCLEOPROTEIN HYDROLYSATES OF THE *PSORIASIS* SCALES

Summary

1. Silver and cupric precipitates of purines from the acid hydrolysate of the *psoriasis* scales have been analysed by Carter's and Wyatt's chro-

matographic method on Whatman 1 filter paper. The presence of adenine, guanine and a smaller amount of hypoxanthine has been proved.

2. Hydrolysates of nucleoproteins extracted with the following solvents: a) 0,14 M NaCl, b) 1 M NaCl and c) 0,1 N NaOH show on chromatographic analysis adenine and guanine. The hydrolysates of desoxynucleoproteins extracted with 1 N NaOH give an unidentified spot of $R_f = 0,99$ in isopropyl alcohol: water: hydrochloric acid mixture and $R_f = 0,85$ in isoamyl alcohol: 5% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ system (from cupric precipitates).

3. An unknown spot has appeared also together with adenine and guanine when residue following 1 M NaCl extraction have been hydrolysed and chromatographed. The residue left after removing of all nucleoproteins by the subsequent extraction of the scales with 1 M NaCl and 1 M NaOH, gives, while hydrolysed, the above mentioned spot on the chromatograms.

4. The eluate of the spot does not show absorption in 240—280 m region.

Otrzymano 20.VIII.1954

ANTONI DMOCHOWSKI, ELŻBIETA SEMPIŃSKA, LEOKADIA KŁYSZEJKO

O TAK ZWANYCH β -NUKLEOPROTEIDACH W ŁUSKACH ŁUSZCZYCY (*PSORIASIS VULGARIS*)

Z Zakładu Biochemii Uniwersytetu Łódzkiego

Kierownik: prof. dr A. Dmochowski

Dotychczasowe badania biochemiczne łusek łuszczycy, podjęte w Zakładzie Biochemii UŁ w celu uzyskania dowodów chemicznych wirusowej etiologii tego schorzenia, doprowadziły do stwierdzenia znacznych ilości nukleoproteidów w łuskach i pozwoliły na wyciągnięcie pewnych wniosków co do ich charakteru i składu chemicznego. Ł o z a (21, 22) znalazł mianowicie 37% nukleoproteidów suchej masy łusek, a na zasadzie dodatniej reakcji D i s c h e g o (6) z dwufeniloaminą przypisał im charakter prawie wyłącznie dezoksyrybonukleoproteidowy. D m o c h o w s k i i P a d z i k (8), oznaczywszy wagowo całkowitą adeninę i guaninę w hydrolizatach łusek, wykazali wyraźną przewagę guaniny (1,3 w stosunku molowym do adeniny). Jeszcze wyższe wartości na guaninę, oznaczone mikrojodometrycznie i spektrofotometrycznie, podali D m o c h o w s k i i P a n u s z (9). Ponieważ zaś rybonukleoproteidy w tkankach zwierzęcych wykazują znaczną przewagę guaniny nad adeniną [1,7:1, C h a r g a f f (3), C r o s b i e, D a v i d s o n (5)], a w tkankach nowotworowych nawet 4:1 [C h a r g a f f, M a g a s a n i k i w s p ó ł p r. (4)], to oznaczenia puryn w łuskach przemawiały raczej za obecnością znacznych ilości rybonukleoproteidów. Wstępne oznaczenia ilości rybo- i dezoksyrybonukleoproteidów w łuskach [D m o c h o w s k i i D r a b i k o w s k i (7)] przemawiały również za tym przypuszczeniem. Po uzyskaniu orcynolu ch. cz.¹⁾, niezbędnego do oznaczenia rybozy, podjęliśmy na nowo badania w celu stwierdzenia i scharakteryzowania związków rybozowych w kwasonierozpuszczalnych frakcjach białkowych.

¹⁾ Za przesłanie orcynolu jesteśmy zobowiązani prof. drowi T. B a r a n o w s k i e m u.

W czasie badań chromatograficznych nad purynami łusek S e m p i ń s k a (26) zauważyła ciekawy fakt, że znaczna część materiału białkowego wielu łusek rozpuszcza się stopniowo we wrzącej wodzie i to nawet po wielokrotnej ekstrakcji. Nasunęło się przypuszczenie obecności złożonych białek w rodzaju charakterystycznych β -nukleoproteidów trzustkowych, odznaczających się — jak wiadomo — zdolnością rozpuszczania się w gorącej wodzie i wyjątkowo wysoką zawartością guaniny w stosunku do adeniny i zasad pirymidynowych: 2—4 moli guaniny na 1 mol adeniny [według różnych autorów: O. H a m m a r s t e n (13), E. H a m m a r s t e n (12), J o n e s i P e r k i n s (14), J o r p e s (15), L e v e n e i J o r p e s (19), C h a r g a f f (4), B a c h e r i A l l e n (1), D m o c h o w s k i i L e s z c z y ń s k a (10)]. Wykonane przez nas analizy na fosfor, rybozę, adeninę i guaninę różnych frakcji potwierdziły w zupełności te przypuszczenia.

W miarę przedłużania czasu ekstrakcji łusek gorącą wodą, po zakwaszeniu końcowych wyciągów otrzymano frakcję rozpuszczalną w gorącej wodzie, ale wytrącającą się po oziębieniu do 40—50°C i rozpuszczającą się z powrotem na gorąco. Te niezwykle własności końcowych frakcji β -nukleoproteidów przypominają cechy specyficznego białka Bence-Jonesa, występującego — jak wiadomo — w ogromnych ilościach w moczu i krwi chorych na nowotwór szpiku kostnego (*Myeloma multiplex*). Skład łusek łuszczycy z punktu widzenia występowania nukleoproteidów okazał się więc nadspodziewanie skomplikowany i wysunął konieczność wszechstronnego zbadania wszystkich frakcji tych złożonych ciał białkowych.

Część doświadczalna

Badania nad rodzajem i ilościami nukleoproteidów łusek łuszczycy, przechodzących do gorącego wyciągu wodnego, rozpoczęliśmy od analiz chromatograficznych, gdyż najbardziej przekonującym dowodem obecności β -nukleoproteidu w wyciągach byłoby wykrycie tą drogą obu aminopuryn: adeniny i guaniny. Występowanie samej adeniny świadczyłoby raczej o przechodzeniu do wyciągu związków adenilowych kwasorozpuszczalnych. Wykonane przez nas analizy chromatograficzne potwierdziły w całości hipotezę występowania β -nukleoproteidu. Pracowaliśmy metodą W y a t t a (28), wypróbowaną już uprzednio w Zakładzie Biochemii UŁ [S e m p i ń s k a (26)].

ANALIZA CHROMATOGRAFICZNA PURYN W WYCIĄGU WODNYM

10 g łusek zhomogenizowanych i odlipidowanych mieszaniną acetonu i chloroformu [5 : 1, N i e m i e r k o (25)], wyciągnięto kilkakrot-

nie 100—200 ml wrzącej wody. Wyciąg wodny odparowano do niewielkiej objętości, zakwaszono H_2SO_4 tak, by roztwór był 1 N, i hydrolizowano 3 godz. na łaźni wodnej. Następnie strącono puryny nasyconym roztworem Ag_2SO_4 . Osad srebrowy puryn odsączono, przemyto wodą zakwaszoną kwasem siarkowym z dodatkiem siarczanu srebra, a następnie rozłożono kilkoma porcjami 0,1 N HCl na gorąco. Roztwór otrzymanych w ten sposób chlorowodorków puryn nakropiono na paski bibuły Whatmana nr 1 i poddano rozdzielowi chromatograficznemu w rozpuszczalnikach alkohol izopropylowy-2 N HCl [W y a t t (28)]. Chromatogramy wywołano azotanem rtęci. Otrzymano tylko dwie ciemne plamy odpowiadające guaninie o $R_f = 0,25$ i adeninie $R_f = 0,36$ (chromatogramy kontrolne — z roztworami czystej guaniny i adeniny). W ten sposób uzyskano potwierdzenie obecności jedynie dwóch aminopuryn w wyciągu wodnym.

Następnie metodą F i s k e g o i S u b b a r o w a (11) oraz metodą orcynolową wykonano analizy na zawartość w wyciągu fosforu i rybozy. Oznaczanie fosforu w środowisku bardziej kwaśnym (0,6 N H_2SO_4) niż w metodzie F i s k e g o i S u b b a r o w a, zastosowanie amidolu jako reduktora oraz odczytywanie wartości ekstynkcji ściśle po 10 minutach od chwili dodania amidolu zmniejszyły do minimum błąd, mogący powstać na skutek ewentualnej obecności krzemianów [K a r p i a k (16)].

Rybozę oznaczano metodą B i a l a - M e j b a u m (2, 24) w modyfikacji K e r r a i S e r a i d a r i a n a (17). W oznaczeniach kolorymetrycznych fosforu i rybozy posługiwano się fotokolorymetrem S p e k k e r a.

OTRZYMYWANIE β -NUKLEOPROTEIDU Z ŁUSEK ORAZ ANALIZA JEGO SKŁADU

Mając już dowody na obecność β -nukleoproteidu w wyciągach wodnych przystąpiono do jego wyizolowania i zanalizowania. Opierano się przy tym na odpowiednich pracach J o n e s a i P e r k i n s a (14), J o r p e s a (15), D m o c h o w s k i e g o i L e s z c z y Ń s k i e j (10), dotyczących otrzymywania β -nukleoproteidu z trzustki bydłej.

10—20 g łusek drobno zmielonych i odlipidowanych mieszaniną chloroformu i acetonu wygotowywano 3—5 razy wodą destylowaną o pH 6,5, zagęszczano wyciągi do małej objętości, zakwaszono kwasem octowym do pH 4—5, a następnie dodawano alkoholu do 70%. Wytrącony w ten sposób biały, kłaczkowaty osad opadał na dno po kilkunastu godzinach. Osad odwirowywano i przemywano 70%, a następnie 96% alkoholem, po czym suszono w 105°C. Otrzymywany w postaci białego proszku

β -nukleoproteid poddawano kolejnym analizom na zawartość poszczególnych puryn, fosforu i rybozy.

Opracowano ilościowo łuski dwóch różnych pacjentów, w innych wypadkach stwierdzono obecność β -nukleoproteidu tylko jakościowo.

Oznaczenie zawartości poszczególnych puryn wykonano metodą spektrofotometryczną na spektrofotometrze Beckmana. W tym celu zhydrolizowano 6 mg β -nukleoproteidu V (tabl. 2) w 2N kwasie siarkowym w ciągu 3 godzin. Po rozcieńczeniu roztworu do 0,5 N strącono puryny zawiesiną Ag_2O . Osad srebrowy puryn rozłożono po przemyciu 0,1 N kwasem solnym. Otrzymany w ten sposób roztwór chlorowodorków puryn w kwasie solnym służył do bezpośrednich oznaczeń spektrofotometrycznych¹⁾. Maksimum pochłaniania adeniny w 0,1 N kwasie solnym leży w pasmie 262 m μ , maksimum pochłaniania guaniny — w 247 m μ . Ponieważ w roztworze znajdowały się obok siebie obie puryny, wykonywano więc pomiary gęstości optycznej przy dwóch długościach fal, dla których różnice w wartościach molowych współczynników ekstynkcji były możliwie największe. Posługiwano się współczynnikami Kerra i Seraidariana (18), którzy pracowali w długościach fal 245 m μ i 262 m μ , oraz Loringa i współpr. (20), pracujących w długościach fal 240, 262 i 208 m μ .

Molowe współczynniki adeniny i guaniny podano w tablicy 1.

Tablica 1

Długość fali w m μ	Molowy współczynnik		Autorzy
	adeniny	guaniny	
240	5310	9400	Loring i współpr.
245	8050	10900	Kerr i Seraidarian
262	13100	7650	Loring i współpr.
262	13300	7580	Kerr i Seraidarian
820	4720	6660	Loring i współpr.

Po wykonaniu pomiarów wyliczono stężenia adeniny i guaniny (w molach na litr) ze wzorów:

$$C_{ad} = \frac{10\,900 D_{262} - 7580 D_{245}}{84 \times 10^6}$$

$$C_{gu} = \frac{13\,300 D_{245} - 8050 D_{262}}{84 \times 10^6}$$

[wg Kerra i Seraidariana (18)]

¹⁾ Oznaczenia mgra H. Panusza, st. asyst. Zakładu Chemii Ogólnej i Fizjologicznej AM w Łodzi.

$$C_{\text{ad}} = \frac{6.66 D_{262} - 7.65 D_{280}}{5.11 \times 10^4}$$

$$C_{\text{gu}} = \frac{13.1 D_{280} - 4.72 D_{262}}{5.11 \times 10^4}$$

[wg Loringa i współpr. (20)]

Dane do obliczeń: $D_{245} = 0,553$
 $D_{262} = 0,522$
 $D_{280} = 0,332$

Wzięto do analizy 69 mg β -nukleoproteidu.

Objętość roztworu po hydrolizie: 100 ml (0,1 N HCl).

Grubość kiuwety: 0,5 cm.

Wyliczona na podstawie powyższych danych zawartość procentowa guaniny w β -nukleoproteidzie V (z tabl. 2) wyniosła 1,62%, a zawartość adeniny 0,707% [wartości średnie obliczone ze wzorów Kerra i Seraidariana (18) i Loringa (20)]. Wynika stąd, że guaniny jest znacznie więcej niż adeniny, a mianowicie 2,3:1, czyli 2,1:1 w stosunku molowym, podobnie jak w β -nukleoproteidzie trzustki świńskiej, gdzie na przykład Vischer i Chargaff (27) znaleźli stosunek 2,4:1, a ostatnio Chargaff i współpr. (4) — stosunek 2,25:1.

W tablicy 2 podano kilka analiz na fosfor i rybozę w kilku preparatach β -nukleoproteidów z łusek w różnych okresach choroby.

Tablica 2

Zawartość procentowa fosforu i rybozy w β -nukleoproteidach nieoczyszczonych

β -nukleoproteid	fosfor w %	ryboza w %
I	2,73	3,53
II	2,80	3,36
IV	2,75	2,87
V	3,55	2,92
VI	4,04	3,14

β -nukleoproteidy I, IV, V i VI otrzymano z łusek pacjenta nr 1(B), β -nukleoproteid II z łusek pacjenta nr 2 (Cz.).

Jak wynika z tablicy 2, ilość fosforu w porównaniu z ilością rybozy była znacznie większa niż na przykład w kwasie nukleinowym drożdżowym, gdzie stosunek fosforu całkowitego, tj. fosforu nukleotydów pu-

rynowych i pirymidynowych do rybozy nukleotydów purynowych (dającej się oznaczyć orcynolem) wynosi 0,41 wagowo, a 2,0 molowo. Wydawało się mało prawdopodobne, aby przyczyną tego faktu była ogromna przewaga nukleotydów pirymidynowych nad purynowymi. Można było przypuścić raczej, że wchodzi tutaj w grę zanieczyszczenia fosforanami nieorganicznymi albo też obecność dodatkowych grup fosforanowych. Zanieczyszczenia fosfolipidami należało wykluczyć, gdyż β -nukleoproteid po odlipidowaniu w mieszance alkoholu i eteru (3:1) w temperaturze wrzenia nie zmieniał swojego składu. W celu rozstrzygnięcia tego zagadnienia porównaliśmy zawartości fosforu i rybozy β -nukleoproteidu otrzymanego przez ekstrakcję gorącą wodą z pełnych łusek (preparat VI) i preparatu z tychże.

Biorąc pod uwagę możliwość zanieczyszczenia β -nukleoproteidów fosforanem wapniowym, rozpuściliśmy 287,4 mg najbogatszego w fosfor β -nukleoproteidu VI (zawartość 11,53 mg P) w 1 N ługu sodowym i pozostawiliśmy w temp. 30°C na przeciąg jednej doby. Po prawdopodobnym rozpadzie rybonukleoproteidu na rozpuszczalne nukleotydy na dno opadł galaretowaty osad o charakterze czysto nieorganicznym, który odwirowano, przemyto roztworem bardzo rozcieńczonego ługu, wysuszono i spalono. Pozostałość po spaleniu w ilości 39,0 mg, rozpuszczalna w kwasach, zawierała 9,6% P, czyli 32,5% pierwotnego fosforu β -nukleoproteidu. Zawartość wapnia, oznaczona w tej pozostałości za pomocą fotometru płomieniowego, wyniosła 17,5%, a sodu 6%. Stwierdzono również znaczne ilości magnezu. Skład osadu potwierdził więc przypuszczenie obecności fosforanu wapniowego, być może z domieszką fosforanów magnezowych (Ca:P = 1,82 zamiast 1,93 — teoretycznego).

Identyczny zabieg z 248,7 mg β -nukleoproteidu VI, ale otrzymanego z łusek uprzednio ekstrahowanych kwasem trójchlorooctowym (zawierającego 1,61% P), dał zaledwie 2,4 mg nieorganicznej pozostałości, zawierającej 4,8% fosforu, czyli 0,11 mg P (2,8% całego fosforu). Wreszcie z 210 mg preparatu β -nukleoproteidu II otrzymaliśmy 38,4 mg nieorganicznej pozostałości o zawartości 5,29% fosforu (2,03 mg P), zawierającej również znaczne ilości wapnia i magnezu.

Osad fosforanów nieorganicznych, rozpuszczalny w kwasach, a odczepiony po łagodnej hydrolizie alkalicznej β -nukleoproteidu, zawierał więc znowu około 34,5% całkowitego fosforu wyjściowego preparatu nukleoproteidu.

Wszystkie preparaty nieoczyszczonych β -nukleoproteidów wykazywały wyraźną obecność krzemu. Wstępne, orientacyjne oznaczenia dały ilości 40—50 mg% Si, a prace nad tym zagadnieniem są w toku.

Tablica Nr 3

Łuski pacjenta Nr 1 (B)

Analizy kolejnych ekstraktów wodnych oraz odpowiednich pozostałości z łusek odlipi-
dowanych i ekstrahowanych krótko 5% CCl_3COOH (P łusek = 220 mg⁰%, ryboza =
= 415 mg⁰%)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Materiał wzięty do kolejnych ekstrakcji (I—VII)	P łusek (mg ⁰ %)	Ryboza łusek (mg%)	Ilość łusek wzięta do ekstrakcji (g)	Czas ekstrakcji (goez.)	Sucha masa ekstraktów (g)	Sucha masa ekstraktów w odniesieniu do łusek (%)	P w suchej masie ekstraktów (%)	Ryboza w suchej masie ekstraktów (%)	P ekstraktu w przeliczeniu na wyjściowe łuski (mg ⁰ %)*	Ryboza ekstraktu w przeliczeniu na wyjściowe łuski (mg)**
Łuski użyte do ekstr. I	220,0	415,0	9,20	3	0,425	4,51	1,366	2,086	01,6	04,1
Z łusek pozostałych po ekstrakcji I, wzięto do ekstrakcji II	—	—	5,52	3	0,150	2,59	1,447	2,837	37,5	73,5
Z łusek pozostałych po ekstrakcji II, wzięto do ekstrakcji III	—	—	4,44	10	0,31	6,49	0,828	1,386	53,7	90,0
„ IV	—	—	4,13	16	0,290	5,54	0,310	0,376	17,2	20,7
„ V	—	—	5,86	32	0,46	9,62	0,143	0,230	13,8	22,1
„ VI	—	—	3,20	36	0,35	7,30	0,064	0,322	4,9	16,2
„ VII	—	—	3,05	40	0,23	4,82	0,048	0,100	2,3	0,1
Ekstrakty I-VII (a)	—	—	—	135	—	40,86	—	—	190,7	325,7
Pozostałość po ekstrakcji VII (b)	—	—	2,60	—	—	54,46	0,032	0,112	17,6	61,3
Suma: a + b	—	—	—	—	—	95,32	—	—	208,3	387,0

*) Iloczyn rubryk 7 i 8.

**) Iloczyn rubryk 7 i 9.

BADANIE IŁGŚCI I SKŁADU KOLEJNYCH WYCIĄGÓW WODNYCH Z ŁUSEK

Łuski zhomogenizowane i odlipidowane mieszaniną chloroformu i acetonu (1 : 5) przemyto pięciokrotnie 5% kwasem trójchlorooctowym w celu usunięcia związków kwasorozpuszczalnych (nukleotydy, fosforany nieorganiczne), odmyto kwas trójchlorooctowy zimną wodą i wysuszono do stałej wagi. Po oznaczeniu fosforu i rybozy poddawano łuski wielokrotnej ekstrakcji wrzącą wodą destylowaną pod chłodnicą zwrotną. Wodę zmieniano średnio co kilka godzin (początkowo co $\frac{1}{2}$ godziny, w końcu średnio co 6 godzin).

Wyciągi wodne zlewano po kilka, odparowywano do sucha na łożni wodnej, ważono i oznaczano za każdym razem fosfor i rybozę. W ten sposób można było zorientować się w maksymalnej wydajności β -nukleoproteidów z łusek oraz w ich składzie w kolejnych wyciągach po krótkiej i długotrwałej ekstrakcji. Oznaczono również skład pozostałości po niektórych ekstrakcjach.

Do ekstrakcji użyto łusek pacjenta nr 1(B) z łuszczycą uogólnioną, nie leczonego od dłuższego czasu. Łuski suszone zawierały 277 mg % fosforu i 434 mg % rybozy, po częściowym odlipidowaniu acetonem i chloroformem 281 mg % fosforu i 463 mg % rybozy, wreszcie po krótkotrwałym wyciąganiu 5% CCl_3COOH na zimno — 220 mg % fosforu i 415 mg % rybozy. Długotrwała ekstrakcja kwasem dała w wyniku 183 mg % fosforu kwas nierozpuszczalnego i 98 mg % fosforu kwasorozpuszczalnego.

Wyniki podaje tablica 3.

Liczby z rubryk 7, 10 i 11 były wyliczane na 100 g łusek wyjściowych. Ilość pozostała po ekstrakcji VII wyniosła 2,6 g zamiast obliczonej 2,82 g, co było miarą stosunkowo niewielkich strat w czasie wszystkich manipulacji. Straty w ogólnym bilansie fosforowym wyniosły 6%, a w bilansie fosforu nukleinowego 7%, rybozy również 7%, co przy wielkiej liczbie oznaczeń należy uznać za wynik zadowalający.

Ilość substancji ekstrahowanych po 135 godzinach wyniosła ponad 40%, z czego połowa po 40 godzinach (szybkość ostatniej ekstrakcji zmalała do 10% pierwotnej). Po odliczeniu fosforanów nieorganicznych w ilości 37 mg % (220—183 mg %), ekstrahujących się w pierwszych ekstraktach, wyciąganie tzw. fosforu nukleinowego i rybozy w tym okresie przebiegało dość równolegle (75% wyjściowych ilości), dając zgodny obraz ilości ekstrahowanych rybonukleoproteidów. W pozostałości po ekstrakcji VII pozostało poniżej 10% pierwotnego fosforu nukleinowego i 15% rybozy łusek.

Stosunek ilości fosforu nukleinowego (nukleoproteidowego) do rybozy wynosił w łuskach 0,44, a w całości ekstraktów 0,47, natomiast w pozostałości po ekstrakcjach 0,3, a w ostatnich dwóch ekstraktach nawet 0,25.

Nawet po 135 godzinach ekstrakcji ilość białka wyciąganego, dającego się strącić mocnym kwasem trójchlorooctowym, jest dość znaczna, natomiast zawartość rybozy, a szczególnie fosforu spada w nim do minimum. Te końcowe wyciągi mają odmienny wygląd, są mętne, a po pewnym czasie dają niewielki osad, rozpuszczalny na nowo w gorącej wodzie. Do sprawy tej powrócimy w następnych rozważaniach.

Tablica 4
Łuski pacjenta nr 1(B)

Analizy kolejnych frakcji β -nukleoproteidów, strąconych alkoholem z wyciągów wodnych odlipidowanych łusek. Ilość ekstrahowanych łusek: 5,7 g (P łusek = 281,3 mg $\%$, ryboza = 463 mg $\%$).

1	2	3	4	5	6	7	8
Kolejność ekstrakcji nr	Czas ekstr. (godz)	Ilość strąconych nukleoproteidów (g)	Ilość nukleoproteidów przeliczona na wyjściowe łuski ($\%$)	P nukleoproteidów ($\%$)	Ryboza nukleoproteidów ($\%$)	P nukleoproteidów w przeliczeniu na wyjściowe łuski (mg $\%$)	Ryboza nukleoproteidów w przeliczeniu na wyjściowe łuski (mg $\%$)
I	13	0,36	6,3	2,725	3,528	172,0	223,0
II	27	0,20	3,5	0,448	0,570	15,8	20,0
III	19	0,20	3,5	0,347	0,283	12,1	10,0
IV	22	0,12	2,1	0,121	0,242	2,5	5,1
V	24	0,12	2,2	0,061	0,235	1,2	5,3
VI	21	0,10	1,8	0,049	0,241	1,0	4,2
VII	20	0,10	1,9	0,053	0,212	1,0	4,2
Ekstrakcje I—VII	146	1,20	21,3	—	—	205,6	271,8
Pozostałość po VII ekstrakcji łusek	—	3,0	52,6	0,037	0,125	19,3	65,7
Całość ekstraktów z łusek + pozostałość	—	4,2	73,7	—	—	224,9	337,5

Sucha pozostałość wyciągów, szczególnie początkowych, mogła zawierać substancje z łusek zupełnie odrębne od β -nukleoproteidów. Dla oznaczenia więc ilości i charakteru samych β -nukleoproteidów wykonaliśmy analogiczne, wielokrotne ekstrakcje, ale stosując każdorazowo strącanie osadów z zatężonych wyciągów za pomocą trzech części alkoholu w pH 4,5. Po odsączeniu, wysuszeniu i zważeniu osadów oznaczano w nich zawartość fosforu i rybozy i przeliczano na łuski wyjściowe. Do badań były użyte łuski dwóch pacjentów: tablica 4 daje obraz dla łusek poprzednio omawianych [nr(B)] odlipidowanych, ale nie wyciąganych kwasem trójchlorooctowym, tablica 5 — dla łusek pacjenta nr 2 (Cz.) z ciężką łuszczycą.

Tablica 5

Łuski pacjenta nr 2 (Cz.)

Analizy identyczne jak w tablicy 4. Ilość łusek: 18,9 g (P łusek = 403, mg %, ryboza = 563,5 mg %)

Kolejność ekstrakcji nr	Czas ekstr. (godz.)	Ilość strąconych nukleoproteidów (g)	Ilość nukleoproteidów przeliczona na wyjściowe łuski (%)	P nukleoproteidów (%)	Ryboza nukleoproteidów (%)	P nukleoproteidów w przeliczeniu na wyjściowe łuski (mg %)	Ryboza nukleoproteidów w przeliczeniu na wyjściowe łuski (mg %)
I	3	0,70	3,70	2,747	3,757	101,5	139,1
II	22	1,52	8,57	1,503	1,020	127,5	87,4
III	23	0,62	3,28	0,523	0,288	17,0	9,3
IV	19	0,34	1,80	0,247	0,267	4,5	5,0
V	24	0,36	1,90	0,162	0,264	3,1	4,5
VI	20	0,26	1,37	0,174	0,412	2,2	5,6
VII	20	0,37	1,99	0,083	0,222	1,6	4,5
VIII	20	0,13	0,69	0,120	0,343	0,83	2,38
IX	20	0,036	0,15	0,169	0,888	0,34	1,76
X	20	0,050	0,26	0,071	0,850	0,18	2,15
Ekstrakcje I—X	191	4,48	23,71	—	—	258,8	261,7
Pozostałość po X ekstrakcji łusek	—	7,76	41,1	0,047	0,250	19,60	102,7
Całość ekstraktów z łusek + po pozostałość	—	12,24	64,81	—	—	278,12	364,4

Ekstrakcja łusek nie traktowanych uprzednio kwasem trójchlorooctowym była znacznie słabsza, strącanie nukleoproteidu pociągało za sobą

znaczne straty (26%). Straty te w ogólnym bilansie fosforowym wyniosły 20%, a rybozy 27%; w obliczeniu fosforu nukleinowego kwasonierozpuszczalnego — nawet 30%. Wyciągnięto ogółem około 60% fosforu nukleinowego wyjściowych łusek i tyleż rybozy, a pozostałość po 146 godzinach ekstrakcji zawierała jeszcze ponad 10% pierwotnego fosforu nukleinowego i prawie 15% rybozy. Stosunek fosforu nukleinowego do rybozy w łuskach wyjściowych wynosił 0,4, podobnie w strąconych nukleoproteidach, z wyjątkiem dalszych ekstrakcji (IV—VII), gdzie, prawie zgodnie z pozostałością po wszystkich ekstrakcjach, wynosił poniżej 0,3.

Łuski powyższe odznaczały się wyjątkowo wysoką zawartością fosforu nukleinowego, o 66% wyższą niż łuski nr 1 (B), natomiast fosfor nieorganiczny był podobny, ryboza zaś o 22% wyższa. W przeciwieństwie do słabej reakcji D i s c h e g o w pozostałości nr 1 (B) odpowiednia pozostałość nr 2 (Cz.) wykazała znaczną zawartość dezoksyrybozy, a więc dezoksyrybonukleoproteidów nie ekstrahujących się wrzącą wodą. Zgodnie z tymi faktami ilość ekstrahowanego fosforu nukleinowego rybonukleoproteidów była niższa, a mianowicie 52% (po odjęciu 102 mg% fosforu nieorganicznego), a rybozy 47%. Nadmienić należy, że długo-trwała ekstrakcja łusek nr 2 (Cz.) zimnym CCl_3COOH wykazała zawartość 301,8 mg % P kwasonierozpuszczalnego, a 102 mg % P kwasorozpuszczalnego.

β -nukleoproteid z ekstrakcji I zawierał, jak to już podano wyżej, 34,5% łatwo odczepianego fosforu nieorganicznego (str. 9), a z ekstrakcji II podobnie znaczne ilości; prawdopodobnie cały ten fosfor ulegał ekstrakcji i strącał się wraz z nukleoproteidami, i to w postaci fosforanu wapnia i magnezu (patrz wyżej).

Po zsumowaniu wszystkich ekstraktów i pozostałości straty w ogólnym bilansie wyniosły 35% suchej masy łusek, w bilansie całkowitym — fosforu 31%, fosforu nukleinowego 42%, rybozy 38%.

Dyskusja

Niniejsza praca miała za zadanie dalsze wniknięcie w skomplikowane zagadnienie rybonukleoproteidów łusek łuszczycy. Niektóre obserwacje nasunęły przypuszczenie, że mogą to być tak zwane β -nukleoproteidy, rozpuszczalne w gorącej wodzie, znajdowane w drobnych ilościach w wielu tkankach, ale w większych ilościach tylko w trzustce, a więc w narzędzie niezmiernie intensywnie syntetyzującym ciała białkowe.

Przypuszczenie to znalazło potwierdzenie w niniejszej pracy, a klasyczne metody otrzymywania β -nukleoproteidów wykazały istotnie obecność bardzo znacznych ilości tych ciał we wszystkich zbadanych

łuskach. Analiza chromatograficzna rozłożonych osadów srebrowych z hydrolizatów strąconych nukleoproteidów wykazała obecność dwóch aminopuryn, tj. guaniny i adeniny.

Oznaczenia spektrofotometryczne puryn wyniosły w jednym preparacie (preparat V) 1,62% guaniny, a 0,707% adeniny, a więc 2,1:1 w stosunku molowym, podobnie jak w β -nukleoproteidzie z trzustki.

Upřednio D m o c h o w s k i i P a d z i k (8) metodą wagową otrzymali wprawdzie dla całych łusek stosunek najwyższy 1,3:1, ale wagowe oznaczenia guaniny mogły dawać znaczne straty, natomiast D m o c h o w s k i i P a n u s z (9) jodometrycznie, spektrofotometrycznie i polarograficznie otrzymali średnio z paru preparatów całych łusek również stosunek 2:1.

Z zawartości puryn (2,33%) we wspomnianym β -nukleoproteidzie V wynika teoretyczna zawartość kwasu nukleinowego (statystycznego tetranukleotydu) 10,45%, a ewentualnego pentanukleotydu (2 mole guaniny, 1 mol adeniny, 2 mole pirymidyn) 8,7%; z zawartości rybozy (2,92%) wyliczono podobnie 10,5% tegoż pentanukleotydu.

Znajdowana początkowo przez nas w różnych preparatach β -nukleoproteidu z łusek wysoka zawartość fosforu zdawała się przemawiać za znacznie wyższą ilością kwasu nukleinowego, ale stwierdzenie obecności fosforanów wapniowych i usunięcie ich drogą hydrolizy alkalicznej obniżyło procentową zawartość fosforu (np. z 2,8% P preparatu II na 1,83% P; z 4,04% P preparatu VI na 2,67% P, przy tym równoległy preparat z tych łusek, upřednio ekstrahowanych kwasem trójchlorooctowym, wykazał nawet 1,61% P); opierając się na tej ostatniej liczbie mieliśmy maksymalną zawartość kwasu nukleinowego w tych β -nukleoproteidach w granicach 16%. Te 10% lub też 16% kwasu nukleinowego są to liczby dość wysokie, gdyż większość nukleoproteidów izolowanych z tkanek zawiera do kilku procent kwasu nukleinowego, a tylko niektóre, jak na przykład β -nukleoproteidy trzustki, nukleohistony, bakteriofagi i nieliczne wirusy roślinne osiągnęły i przekraczają 40%.

Co się tyczy składu kolejnych ekstraktów wodnych z łusek lub strąconych z nich β -nukleoproteidów, to bilansowe oznaczenia fosforu i rybozy rzuciły pewne światło na ilość i charakter substancji wyciągowych oraz na dynamikę ich ekstrakcji z łusek świeżych lub traktowanych upřednio kwasem trójchlorooctowym.

Na ogół straty bilansowe są niewielkie, co przemawia za słusnością obranej metody. Ilości ekstraktu są nadspodziewanie wysokie, na przykład w czasie 21 godzin ekstrakcji wrzącą wodą o pH 6,5 wyciągnięto 13,6% suchej masy łusek, po 135 godzinach 40% (tablica 3), wytrącone zaś β -nukleoproteidy wyniosły po 13 godzinach 6,3%, po 146 — 21% su-

chej masy łusek (tablica 4). Ilości suchej masy ekstraktów szybko spadają, ale nawet po najdłuższej ekstrakcji otrzymujemy drobne ilości β -nukleoproteidów, co świadczy, że następuje widocznie rozpad złożonych kompleksów w łuskach, uwalniających charakterystyczne, rozpuszczalne β -nukleoproteidy o coraz niższej zawartości kwasu nukleinowego. Otrzymane β -nukleoproteidy zawierają dość znaczne ilości krzemu, a preparaty z łusek nie traktowanych uprzednio kwasem trójchlorooctowym wykazują nadspodziewanie duże ilości wapnia i magnezu (str. 8). Badania nad hipotetycznymi kompleksami z dodatkowymi grupami fosforowymi β -nukleoproteidów, nad oczyszczaniem β -nukleoproteidów oraz nad oznaczaniem zawartości wapnia, magnezu i krzemu są w toku. Dodatkowe grupy fosforanowe w β -nukleoproteidach stają się prawdopodobne na tle nowszych prac B r e s l e r a i N i d z i a n a (2a) oraz D o u n c e ' a (10a). D o u n c e osiągał do 48% przyrostu zawartości fosforu przez działanie ATP i miokinazę na kwas rybonukleinowy z trzustki. Również nowoodkryta rola jonów magnezu w tworzeniu wiązania między grupą aminową guaniny a sąsiednią fosforanową [B r o w n i W a t s o n (2b)] może być źródłem pewnych sugestii co do występowania magnezu i wapnia w opisanych przez nas β -nukleoproteidach.

W czasie ekstrakcji występują dość znaczne zmiany stosunku fosforu do rybozy w kolejnych preparatach β -nukleoproteidów.

Tak na przykład w łuskach dokładnie wyciągniętych kwasem trójchlorooctowym $P_{\text{nukl.}}: \text{Ryb.} = 183 : 415 = 0,44$ (wagowo), czyli 2,15 molowo, w pozostałości po ekstrakcjach odpowiednio $P_{\text{nukl.}}: \text{Ryb.} = 17,6 : 61,3 = 0,28$ (wagowo), czyli 1,35 molowo. W „statystycznym tetranukleotydzie”, jak wiadomo, stosunek $P_{\text{nukl.}}: \text{Ryb.} = 2$ (molowo), a w pentanukleotydzie z trzustki 1,67. Zmniejszenie udziału pirymidyn w cząsteczce kwasu nukleinowego obniżyłoby tę liczbę. Nasuwa się więc konieczność dokładnego zbadania stosunku puryn do pirymidyn w różnych frakcjach nukleoproteidów z łusek.

Zmniejszony udział pirymidyn w β -nukleoproteidach trzustkowych oraz nadmiar guaniny przypisują B a c h e r i A l l e n (1) działaniu rybonukleazy, zgodnie z teorią M a r k h a m a (23) budowy kwasów nukleinowych. Jednak dotychczas nic nie wiadomo o obecności rybonukleazy w łuskach, dalsze badania muszą tę sprawę wyjaśnić. Możliwe jest przypuszczenie, że kolejne ekstrakcje doprowadzały do rozfrakcjonowania odrębnych kwasów rybonukleinowych o różnym stosunku puryn do pirymidyn. Po pracach C h a r g a f f a i wsp. (4a), B r o w n a i W a t s o n a (2b), L u c y i B u t l e r a (20a) nad dezoksyrybonukleoproteidami oraz E l s o n a i C h a r g a f f a (10b) nad rybonukleoproteidami przypuszczenie to staje się prawdopodobne.

Dalszą trudność stanowi niezmiernie różny skład łusek różnego pochodzenia. Tak na przykład łuski z tabl. 3 i 4 zawierają 183 mg % fosforu nukleinowego, ale tylko minimalną ilość dezoksyrybonukleoproteidów (reakcja D i s c h e g o ujemna), natomiast łuski z tablicy 5 ($P_{\text{nukl.}} = 301,0 \text{ mg \%}$) znacznie wyższą, co odbiło się na zwiększonym stosunku $P_{\text{nukl.}}$: Ryb. = 0,54. Staje się konieczne oznaczenie udziału dezoksyrybonukleoproteidów nie ekstrahujących się wrzącą wodą.

Dość niespodziewanie stwierdzono zmiany własności β -nukleoproteidów w miarę przedłużania czasu ekstrakcji i zmniejszania się zawartości fosforu i rybozy. Końcowe ekstrakty nie są już przezroczyste i po zateżeniu wypadają z nich osady rozpuszczalne w gorącej wodzie, a wypadające z powrotem po obniżeniu temperatury do 50—60°C itd. Własności te przypominają znane białka Bence-Jonesa z moczu chorych na *Myeloma multiplex*, a drobne ilości otrzymanego przez nas końcowego nukleoproteidu wykazały zawartości 161 mg% rybozy (?) i 172 mg% fosforu. Białka tego typu jeszcze łatwiej można było otrzymać przez wyciąganie łusek (odlipidowanych lub nieodlipidowanych) 1 N ługiem sodowym w 20°C przez 1—2 dni i strącanie w pH 4,5. Analizy na fosfor tych białek dały zawartość 150 mg%, a więc podobnie do β -nukleoproteidów z końcowych ekstraktów wodnych z łusek. Koniecznym warunkiem uzyskania tych nukleoproteidów, wytrącających się po ochłodzeniu roztworu, było widocznie odczepienie większości kwasów rybonukleinowych. Badania nad tą ciekawą frakcją białek z łusek są prowadzone dalej, a szczególnie badania elektroforetyczne powinny wykazać ich charakter.

Streszczenie

1) Wyciągano mieszane, odlipidowane łuski łuszczycy wrzącą wodą. Wyciągi hydrolizowano 1 N H_2SO_4 , strącono Ag_2SO_4 i analizowano chromatograficznie. Wykryto duże ilości adeniny i guaniny, co przemawia za obecnością β -nukleoproteidów.

2) Kolejne wodne wyciągi z łusek odlipidowanych i wyciąganych uprzednio zimnym kwasem trójchlorooctowym (3—135 godzin ekstrakcji wrzącą wodą) odparowywano, ważono i oznaczano zawartość fosforu i rybozy. Wyciągnięto ogółem 40% suchej masy łusek, 86% fosforu i 78% rybozy łusek.

3) Z kolejnych wyciągów wodnych odlipidowanych łusek strącano β -nukleoproteidy alkoholem i oznaczano w nich zawartość fosforu i rybozy

4) Oznaczono spektrofotometrycznie zawartość adeniny i guaniny

w β -nukleoproteidzie. Guaniny znaleziono 2,1 raza więcej niż adeniny w stosunku molowym.

5) β -nukleoproteidy strącane z wyciągów z łusek nietraktowanych uprzednio kwasem trójchlorooctowym wykazują nadmiar fosforu. Łagodna hydroliza alkaliczna tych β -nukleoproteidów odczepia znaczne ilości fosforanów wapnia i magnezu (ponad 1/3 P).

6) Szybszy spadek zawartości fosforu niż rybozy w β -nukleoproteidach, otrzymywanych przez bardzo długą ekstrakcję łusek gorącą wodą, nasuwa przypuszczenie frakcyjnego rozdzielania nukleoproteidów zawierających kwasy nukleinowe o różnym stosunku puryn do pirymidyn.

7) Nukleoproteidy z końcowych frakcji wyciągów wodnych oraz pewną część β -nukleoproteidów ekstrahowanych z łusek N NaOH rozpuszcza się w gorącej wodzie i strąca się po oziębieniu, podobnie jak białko Bence-Jonesa.

Praca niniejsza została wykonana dzięki subwencjom przyznanych na badania naukowe dla Zakładu Biochemii UŁ przez:

1) Komisję Popierania Twórczości Naukowej i Artystycznej przy Radzie Ministrów oraz 2) Polską Akademię Nauk.

LITERATURA

1. Bacher J. i Allen W.: *J. Biol. Chem.* **183**, 641, 1950.
2. Bial M.: *Deut. med. Wochschr.* **28**, 252, 1902. *Berl. Klin Wochschr.* **40**, 405, 1903.
- 2a. Bresler S. E. i Nidzian E. J.: *Dokł. Akad. Nauk SSSR*, **75**, 79, 1950.
- 2b. Brown G. L. i Watson M.: *Nature* **172**, 339, 1953.
3. Chargaff E.: *Experientia*, **6**, 201, 1950.
4. Chargaff E., Magasanik B., Vischer E., Green Ch., Doniger R. i Elson D.: *J. Biol. Chem.* **186**, 51, 1950.
- 4a. Chargaff E., Crampton C. F. i Lipshitz R.: *Nature* **172**, 289, 1931.
5. Crosbie G. W., Smellie R. M. S. i Davidson J. N.: *Biochem. J.* **54**, 287, 1953.
6. Dische Z.: *Mikrochemie* **7**, 33, 1929; **8**, 4, 1930; **10**, 129, 1931.
7. Dmochowski A. i Drabikowski W.: *Acta Biochim. Pol.* **2**, 9, 1955.
8. Dmochowski A. i Padzik H.: *Acta Biochim. Pol.* **1**, 73, 1954.
9. Dmochowski A. i Panusz H.: *Acta Biochim. Pol.* **1**, 81, 1954.
10. Dmochowski A. i Leszczyńska L.: *Badania nad β -nukleoproteidami trzustki, 1939 (nie opublikowane).*
- 10a. Dounce A. J. i Kay E. R. M.: *Proc. Soc. Exp. Biol.* **83**, 321, 1953.
- 10b. Elson D. i Chargaff E.: *Nature* **173**, 1037, 1954.
11. Fiske C. H. i Subbarow Y.: *J. Biol. Chem.* **66**, 375, 1925.
12. Hammarsten E.: *J. Biol. Chem.* **43**, 243, 1920.
13. Hammarsten O.: *Z. f. physiol. Chem.* **19**, 1894.
14. Jones W. i Perkins M. E.: *J. Biol. Chem.* **62**, 291, 1924.

15. Jorpes E.: *Biochem. J.* **28**, 2102, 1934.
16. Karpiak S. E.: *Postępy Biochemii* **1**, 59, 1953.
17. Kerr S. E. i Seraidarian K.: *J. Biol. Chem.* **159**, 211, 1945.
18. Kerr S. E. i Seraidarian K.: *J. Biol. Chem.* **181**, 761, 1949.
19. Levene P. A. i Jorpes E.: *J. Biol. Chem.* **86**, 389, 1930.
20. Loring H. S., Fairley J. L., Bortner H. W., Seagran H. L.: *J. Biol. Chem.* **197**, 809, 1952.
- 20a. Lucy J. A. i Butler J. A.: *Nature* **174**, 32, 1954.
21. Łoza E.: *Pol. Tyg. Lek.* **8**, 617, 1953.
22. Łoza E.: *Pol. Tyg. Lek.* **8**, 660, 1953.
23. Markham R.: *Biochem. J.* **52**, 565, 1952.
24. Mejsbaum W.: *Z. i. physiol. Chem.* **258**, 117, 1939.
25. Niemierko W.: *Postępy Biochemii* **1**, 34, 1953.
26. Sempńska E.: *Acta Biochim. Pol.* **2**, 19, 1955.
27. Vischer E. i Chargaff E.: *J. Biol. Chem.* **176**, 715, 1948.
28. Wyatt G. R.: *Biochem. J.* **48**, 584, 1951.

β -НУКЛЕОПРОТЕИДЫ ШЕЛУХИ PSORIASIS VULGARIS

Резюме

1. Экстрагируют шелуху psoriasis кипящей водой после первоначального удаления из нее липидов. Экстракты гидролизуют 1 N H₂SO₄, осаждают Ag₂SO₄ и исследуют по хроматографическому методу. Было обнаружено большое количество аденина и гуанина, что дает основание предполагать присутствие β -нуклеопротеидов.

2. Последовательно полученные экстракты шелухи, после первоначального удаления из нее липидов и экстрагирования ее холодной трихлоруксусной кислотой, упаривались, взвешивались и определялся в них фосфор и рибоза. В сумме получено 40% сухой массы шелухи, 86% фосфора и 78% рибозы.

3. Из очередных водных экстрактов шелухи (после удаления из нее липидов) осаждались спиртом β -нуклеопротеиды и определялся в них фосфор и рибоза.

4. Определено по спектрофотометрическому методу содержание аденина и гуанина в β -нуклеопротеиде. Обнаружено гуанина в 2,1 раза больше, чем аденина (Молярные соотношения).

5. В β -нуклеопротеидах осажденных из экстрактов шелухи, не обработанной первоначально трихлоруксусной кислотой, обнаружено избыточное количество фосфора. В результате щелочного гидролиза β -нуклеопротеидов освобождается значительное количество фосфатидов, кальция и магния. (свыше $\frac{1}{3}$ Н).

6. При длительном экстрагировании шелухи горячей водой наблюдается более быстрое уменьшение содержащегося в β -нуклеопротеиде фосфора по сравнению с рибозой, что дает основание считать возможным фракциониро-

ванное разделение нуклеопротеидов, содержащих нуклеиновые кислоты, имеющие различное отношение пуриновых оснований к пиримидиновым.

7. Нуклеопротеиды последних фракций водных экстрактов, а также определенная часть β -нуклеопротеидов экстрагированных из шелухи IN Na/OH растворяются в горячей воде и осаждаются после охлаждения также как белок Bence-Jonesa.

ON THE SO-CALLED β -NUCLEOPROTEINS

Summary

1. The mixed, *psoriasis* scales devoid of lipids have been extracted with boiling water. The extracts, have been hydrolysed with 1 N H_2SO_4 , precipitated with Ag_2SO_4 and analysed by the chromatographic method. Large amount of adenine and guanine found in the extracts accounts for the presence of β -nucleoproteins.

2. The subsequent aqueous extracts, (3—135 hr. extraction with boiling water) previously hydrolysed with cold trichloroacetic acid, have been evaporated to dryness, weighted and the ribose and phosphorus content has been estimated. 40% of dry matter, 86% of phosphorus and 76% of ribose can be extracted from the scales by the above mentioned method.

3. β -nucleoproteins have been precipitated with alcohol from the subsequent aqueous extracts of the scales devoid of lipids: phosphorus and ribose content being determined each time.

4. The adenine and guanine content in β -nucleoproteins has been determined by the spectrophotometric method: Guanine has been found to be 2,1 times more than adenine, considering the molar ratio.

5. β -nucleoproteins precipitated from the extracts of the scales untreated with trichloroacetic acid, show an excess of phosphorus. Large amount of phosphates, calcium, and magnesium split off under the conditions of mild alkaline hydrolysis (above 1/3 of P).

6. The faster decrease of phosphorous content of β -nucleoproteins as compared with ribose during a prolonged extraction of the scales with boiling water suggests a fractional separation of nucleoproteins on the basis of the different ratio of purines and pyrimidines in the nucleic acids.

7. Nucleoproteins from the final fractions of the aqueous extracts and some part of β -nucleoproteins extracted with N NaOH are soluble in hot water and precipitate, on cooling very much like Bence-Jones proteins.

Otrzymano 20.VIII.1954

M. ŻYDOWO, W. BIELAWSKI, S. CHYREK-BOROWSKA, J. JUŠKO, A. MANITIUS,
R. NIEMIRO, R. WOŁOWSKI

NIEKTÓRE ZMIANY BIOCHEMICZNE KRWI ZDROWEGO CZŁOWIEKA POD WPLYWEM ADRENALINY

III. WPLYW NA NIEORGANICZNE JONY SUROWICY

Zakład Chemii Fizjologicznej A. M. w Gdańsku
Kierownik: prof. dr W. Mozołowski

W poprzednich dwóch doniesieniach (29, 30) badano wpływ domięśniowo podanej adrenaliny na białka surowicy krwi oraz równowagę kwasowo-zasadową krwi zdrowego człowieka. Wykazano, że w godzinę po zastrzyku wzrasta stężenie białka surowicy na skutek naturalnej ultrafiltracji krwi poprzez ściany naczyń krwionośnych. Równocześnie spada rezerwa zasadowa osocza, czemu towarzyszy nieznaczne zakwaszenie krwi. Obecny komunikat ma za zadanie przedstawić zmiany w elektrolitach surowicy spowodowane podaniem adrenaliny.

Przebieg doświadczeń

Przedmiotem doświadczeń byli subiektywnie zdrowi mężczyźni w wieku od 20 do 30 lat. Krew pobierano dwukrotnie. Pierwsze pobranie następowało po półgodzinnym pozostawianiu badanego w pozycji leżącej, drugie w 50 do 60 minut po domięśniowym podaniu 1 mg chlorowodoru adrenaliny (preparat handlowy produkcji ZZF). Badany pozostawał przez cały czas doświadczenia w pozycji leżącej. Do żyły łokciowej wprowadzano bez zastoju igłę osadzoną na strzykawce typu „Luer” i pobierano około 2 ml krwi. Następnie usuwano strzykawkę pozostawiając igłę w żyłę i dołączano do igły probówkę z płynną parafiną na dnie i tak umieszczonymi rurkami szklanymi, że można było pobrać krew wprost pod parafinę bez dostępu powietrza. Krew zawartą w strzykawce natychmiast odbiałczano wodorotlenkiem cynku i używano do oznaczenia cukru metodą H a g e d o r n a i J e n s e n a (14). Analogicznie postępowano przy drugim pobieraniu krwi po zastrzyku adre-

naliny. W badaniach kontrolnych postępowanie było takie samo, jak opisano wyżej, tylko zamiast adrenaliny badany otrzymywał 1 ml 0,9% roztworu chlorku sodowego w zastrzyku domięśniowym. Przed doświadczeniem badani nie byli uprzedzani, czy otrzymają zastrzyk adrenaliny, czy też soli fizjologicznej. Około 40 ml krwi zawartej w próbówce pozostawiano na przeciąg 2 godzin w temperaturze pokojowej, a następnie wirowano dwukrotnie pod parafiną, uważając, ażeby przy wszystkich zabiegach aż do oddzielenia surowicy krew nie stykała się z powietrzem. Po oddzieleniu surowicy część jej pobierano bezpośrednio spod parafiny do aparatu manometrycznego Van Slyke'a i Neilla, za pomocą którego oznaczano stężenie jonu dwuwęglanowego (25, 26). Reszta surowicy służyła do wykonania następujących oznaczeń.

Wapń oznaczano według K r a m e r a i T i s d a l a w modyfikacji C l a r k a i C o l l i p a (23) przez bezpośrednie strącanie szczawianem amonu, rozpuszczenie szczawianu wapnia w H_2SO_4 i miareczkowanie powstałego kwasu szczawowego 0,01 N nadmanganianem potasowym.

Stosowany sposób oznaczania magnezu oparto na dwóch metodach (2,16). 1 ml surowicy odbiałczano kwasem wolframowym i wirowano (2 ml wody, 1 ml 10% Na_2WO_4 , 1 ml 2/3 N H_2SO_4). Do 3 ml odbiałczanego płynu dodawano 0,2 ml odczynnika składającego się z 60 ml NH_4OH o ciężarze wł. 0,900 i 4 ml HCl o cięż. wł. 1,19 oraz 0,2 ml roztworu 8-oksychinoliny (0,5 g 8-oksychinoliny w 45 ml bezwodnego alkoholu etylowego). Po wymieszaniu, próbówki zakrywano luźnymi korkami szklanymi i wstawiano do zimnej łaźni wodnej. Łaźnię podgrzewano stopniowo w ciągu 45 minut do temp. 90—95° i w tej temperaturze utrzymywano ją 10—15 minut. Powstały osad po ostudzeniu odwirowywano przy 3000—3500 obr./min i lewarowano płyn ostrożnie, ażeby nie stracić części osadu pozostającego niekiedy na powierzchni płynu. Najlepiej nadaje się do tego celu pipeta zgięta na końcu pod kątem prostym. Osad płukano dwukrotnie 4 ml 2% NH_4OH zachowując przy lewarowaniu te same ostrożności. Pozostały osad rozpuszcza się w 1 ml HCl o cięż. wł. 1,19, a następnie dodaje się 2 ml 10% HCl, 8 ml wody redestylowanej, 0,5 ml 0,1 N KBr oraz 2 ml 0,01 N $KBrO_3$ świeżo sporządzonego z 0,1 N $KBrO_3$. Probówkę zatykano szczelnym korkiem gumowym, zawartość dokładnie mieszano i pozostawiano przez 3 minuty. Następnie przenoszono ilościowo zawartość próbówki do zlewki, w której znajdowały się 2 ml 10% świeżo sporządzonego roztworu KJ, a powstały jod miareczkowano 0,01 $Na_2S_2O_3$. Dokładność metody — około 10% (dziewięć oznaczeń wykonanych na tej samej surowicy dało wynik od 1,7 do 1,9 milirównoważnika w litrze).

Sód oznaczano kolorymetrycznie według Kinga (18) w fotometrze Pulfricha przy użyciu filtru zielonego S57.

Potas (1) oznaczano przy użyciu chlorku choliny i azotyno-kobaltanu sodowego, kolorymetrując powstały kompleks fotometrem Pulfricha poprzez filtr czerwony S61.

Fosfor nieorganiczny oznaczano metodą Fiskego i Subbarrowa (16). Niebieski roztwór kolorymetrowano w stosunku do wody w fotoelektrycznym kolorymetrze radzieckim „FEK-M” używając czerwonego filtru.

Chlorki oznaczano metodą Kinga i Baina (19) polegającą na strąceniu chlorków jodanem srebra i jodometrycznym oznaczeniu uwolnionego w reakcji z jonem chlorkowym jonu jodanowego. Do miareczkowania używano N/10 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ z mikrobiurety Conwaya.

Wszystkie oznaczenia wykonywane były podwójnie.

Ponadto w każdej surowicy oznaczono refraktometrycznie stężenie białka, przyjmując wartości ultrafiltratu i refrakcji właściwej białka takie, jakie stosował Zydowo (31).

Wartości „P” tablicy III uzyskano przez obliczenie następujących

wielkości: dyspersja $\sigma = \sqrt{\frac{\sum(\text{An}-\text{A})^2}{n-1}}$, średni błąd średniej arytmetycznej

$$S = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}, \text{ wskaźnik istotnej różnicy } t = \frac{A_1 - A_2}{\sqrt{S_1^2 + S_2^2}}$$

oraz liczbę stopni swobody $N = n_1 + n_2 - 2$. A oznacza średnią arytmetyczną jednego z porównywanych szeregów, An — wielkość poszczególnego pomiaru, n — liczbę pomiarów danego szeregu. Znając N oraz t można z tablic Fishera (13) obliczyć prawdopodobieństwo istotnej różnicy pomiędzy dwoma szeregami o średnich arytmetycznych A_1 i A_2 .

Wyniki doświadczeń i dyskusja

Znaną jest rzeczą wpływ adrenaliny na poziom cukru gronowego we krwi (21) oraz stężenie białka surowicy (29). Dlatego też jako kontrolę działania adrenaliny przeprowadzono równoległe oznaczenia tych dwóch składników.

Ewentualna równoległość zmian stężenia jakiegoś jonu do zmian stężenia glikozy lub białka mogłaby dać pewne wskazówki, czy zmiany te są spowodowane wpływem hormonu na przemianę węglowodanową, czy też na ciśnienie krwi. Uzyskane wyniki przedstawia tablica 1.

Jak widać z tablicy, nie można wykazać ścisłej równoległości pomiędzy zmianami stężenia żadnego z oznaczonych elektrolitów z jednej strony a stężeniem cukru lub białka z drugiej. Być może, zmiany w stę-

Tablica I Stężenie elektrolitów surowicy, białka surowicy i cukru we krwi przed i po domięśniowym podaniu 1 mg chlorowodoru adrenaliny lub (w kontrolach) 1 ml roztworu soli fizjologicznej

Symbol	Ca ⁺⁺		Mg ⁺⁺		Na ⁺		K ⁺		HPO ₄ ^{''}		Cl [']		HCO ₃		Białko g/100 ml		Cukier mg%		
	w milirównoważnikach na liter																		
	przed	po	przed	po	przed	po	przed	po	przed	po	przed	po	przed	po	przed	po	przed	po	przed
M.	5,2	5,4	—	—	136	134	5,6	5,2	—	—	103	107	—	—	6,6	7,1	84	101	
R.	5,1	5,1	—	—	140	141	4,6	3,9	1,2	0,8	98	98	27,8	25,6	7,2	7,3	113	177	
W.	5,5	5,6	—	—	—	—	5,8	5,2	2,1	1,6	97	98	30,7	25,8	7,3	7,5	94	127	
L.	5,3	5,4	2,2	2,1	—	—	4,4	3,8	1,5	1,3	93	93	27,4	26,8	7,1	7,3	110	131	
Ć.	5,3	5,4	2,4	2,7	152	151	5,2	4,8	1,0	0,8	103	103	27,7	25,6	7,2	7,6	96	117	
Mi.	5,4	5,4	1,8	1,8	147	148	4,1	4,0	1,1	0,8	98	98	28,2	28,1	7,1	7,0	119	137	
P.	5,0	5,1	—	—	136	137	5,2	4,1	1,2	0,8	105	105	29,7	26,2	6,9	7,2	112	178	
Mo.	5,2	5,2	2,2	2,3	132	134	4,3	3,3	2,0	1,5	106	105	27,6	27,2	7,1	7,3	101	134	
Pi.	—	—	—	—	136	132	4,1	3,6	1,4	1,1	105	105	—	—	6,9	7,1	100	154	
S	5,1	5,4	—	—	128	127	4,6	4,7	1,5	1,2	101	101	31,6	29,4	7,6	8,0	92	127	
T.	—	—	1,6	1,6	—	—	5,2	4,3	—	—	—	—	—	—	6,5	7,0	122	151	
C.	—	—	1,3	1,3	—	—	4,9	3,7	—	—	—	—	—	—	6,8	7,2	86	112	
Wl.	—	—	1,3	1,4	146	146	—	—	1,5	1,0	—	—	—	—	6,8	7,2	103	121	
Rz.	5,7	5,7	—	—	136	136	—	—	—	—	—	—	29,8	27,4	7,3	7,7	80	82	
Z.	—	—	1,4	1,6	—	—	—	—	—	—	—	—	29,4	28,3	7,6	8,1	74	89	
K o n t r o l e																			
N.	4,9	4,8	—	—	—	—	4,8	4,6	1,9	1,8	100	99	28,9	28,5	7,5	7,8	90	81	
S.	5,1	5,1	—	—	—	—	—	—	2,6	2,4	100	100	29,9	29,7	7,1	7,1	101	97	
Ż.	5,2	5,2	—	—	140	143	5,1	5,1	1,8	1,5	98	98	27,9	29,1	7,3	7,2	105	114	
C.	5,7	5,7	2,0	1,9	142	144	5,3	5,2	—	—	97	98	31,6	31,7	7,4	7,4	85	90	
Ć.	5,1	5,1	1,9	1,9	143	144	5,0	5,1	2,0	2,0	103	105	29,4	29,7	7,3	7,5	78	76	
W.	—	—	1,6	1,6	146	147	4,3	4,8	1,8	1,9	—	—	—	—	—	—	—	—	—

żeniu białka są zbyt małe, ażeby mogły odbić się w sposób bezsporny na poziomie na przykład wapnia, który — jak wiadomo — związany jest częściowo z białkiem, jednakże zaznacza się pewna tendencja do wzrostu stężenia tego jonu po adrenalinie. Przyczyną braku osobniczej równoległości zmian w stężeniu tych elektrolitów, które zdają się być związane z przemianą węglowodanową, i glikozy może być także fakt, że maksima jednych zmian w porównaniu z drugimi występują w niejednakowym czasie po podaniu adrenaliny (8).

Zmiany, jakie obserwujemy w elektrolitach osocza pod wpływem adrenaliny, lepiej uwidacznia tablica 2.

Tablica 2

Srednie wartości stężenia elektrolitów surowicy w milirównoważnikach na liter (mE/l) przed i po podaniu 1 mg chlorowodoru adrenaliny lub 1 ml soli fizjologicznej (w kontrolach)

	Ca ⁺⁺			Mg ⁺⁺			Na ⁺			K ⁺			HPO ₄ '			Cl [']			HCO ₃ '		
	L. przyp.	przed	po	L. przyp.	przed	po	L. przyp.	przed	po	L. przyp.	przed	po	L. przyp.	przed	po	L. przyp.	przed	po	L. przyp.	przed	po
Adrena- lina	10	5,3	5,4	8	1,8	1,8	10	139	139	12	4,8	4,2	10	1,5	1,1	10	101	101	10	29,1	27,0
Kontrola	5	5,2	5,2	3	1,8	1,8	4	143	144	5	4,9	5,0	5	2,0	1,9	5	100	100	5	29,5	29,7

Szczegółowa analiza różnicy stężeń oznaczonych składników przedstawiona jest w tablicy 3.

Oprócz cukru, którego wzrost stężenia pod wpływem adrenaliny jest bezsporny, statystycznie istotne różnice wykazują jony: potasowy, fosforanowy i dwuwęglanowy. Dla każdego z tych jonów prawdopodobieństwo, że trafi się taka seria adrenalinowa, która pokryje się z kontrolną, leży pomiędzy 0,01 a 0,001.

Spadek stężenia potasu w surowicy krwi pod wpływem adrenaliny jest zjawiskiem dość dobrze znanym, aczkolwiek jego mechanizm jest zupełnie niejasny (5, 7, 9, 12). Wiadomo (6), że szczury, którym usunięto nadnercze, giną po podaniu glikozy wśród objawów hiperkaliemii, o ile nie otrzymały adrenaliny. Wykazywano także (8), że zachowanie się poziomu potasu we krwi po adrenalinie jest inne u ludzi zdrowych aniżeli u epileptyków. Ostatnio D u r y i współpracownicy (27, 10) badają zależność pomiędzy zmianami poadrenalinowymi w elektrolitach a frak-

Tablica 3

Srednie różnice stężenia elektrolitów surowicy krwi przed i po domięśniowym podaniu 1 mg chlorowodoru adrenaliny oraz

(w kontrolach) po podaniu 1 ml soli fizjologicznej

	Liczba badanych	Ca ⁺⁺ mE/l	Liczba badanych	Mg ⁺⁺ mE/l	Liczba badanych	Na ⁺ mE/l	Liczba badanych	K. mE/l	Liczba badanych	HPO ₄ ^{''} mE/l	Liczba badanych	Cl ['] mE/l	Liczba badanych	HCO ³ mE/l	Liczba badanych	Cukier mE/l	Liczba badanych	Białko g/100 ml
Adrena- lina	10	+0,1±0,1	8	0,0±0,15	10	0±1,8	12	-0,6±0,4	10	-0,4±0,12	10	0±1,4	10	-2,1±1,4	15	+30±19	15	+0,31±0,17
Kontro- le	5	0,0±0,05	3	0,0±0,02	4	+1±1,1	5	+0,1±0,27	5	-0,1±0,16	5	0±1,2	5	+0,2±0,1	5	0±7	5	+0,08±0,16
P*)		> 0,1		—		> 0,2		> 0,001		> 0,001		—		> 0,001		< 0,001		< 0,001

*) P oznacza prawdopodobieństwo braku istotnej różnicy pomiędzy doświadczeniami z adrenaliną i kontrolnymi (13).

cjami lipidowymi osocza i wątroby. Nie wydaje się — jak wynika z doświadczeń *H a u g a a r d i S t a d i e* (15) na skrawkach wątrobowych — aby adrenalina miała jakiś bezpośredni wpływ na przemianę tłuszczową. Jest rzeczą niewątpliwą, że spadek poziomu potasu w surowicy związany jest bezpośrednio z samą adrenaliną, a nie z jej jakimkolwiek pośrednim działaniem przez inny hormon (7), jak na przykład na fosforany poprzez insulinę. Udowodniono to w doświadczeniach na szczurach; zwierzęta te reagują obniżeniem potasu osocza zarówno na insulinę, jak i na adrenalinę, jednakże insulina działa tylko wtedy, jeżeli znajduje się w ustroju prawidłowy rdzeń nadnercza, natomiast adrenalina wywiera wpływ niezależnie od tego i niezależnie od usunięcia trzustki. Wydaje się, że przyczyny obniżenia potasu po adrenalinie należy szukać w przemianie węglowodanowej (11). Wprawdzie nie udało się w naszych doświadczeniach wykazać jednolitej zależności pomiędzy wzrostem poziomu cukru we krwi a obniżeniem się potasu i fosforanów, jednakże nie jest wykluczone, że fosforylacja glikozy w ustroju prowadzi do wytworzenia glikozofosforanu potasowego (12).

Stężenie fosforanu nieorganicznego surowicy ulega obniżeniu zarówno po podaniu adreneliny, jak i insuliny (28); adrenalina działa tylko wtedy, kiedy w ustroju znajduje się zdrowa trzustka. Jest to zatem działanie reflektoryczne, powodowane prawdopodobnie przez podwyższenie poziomu cukru we krwi i pobudzenie wydzielania insuliny. Spadek stężenia fosforanów nieorganicznych nie odbija się zupełnie na stężeniu fosforu całkowitego osocza, które wzrasta w przybliżeniu proporcjonalnie do wzrostu stężenia białka. Uwidacznia to tablica 4.

Jon dwuwęglanowy zmniejsza swoje stężenie po adrenalinie najprawdopodobniej na skutek pojawienia się we krwi zwiększonej nieco zawartości kwasów organicznych bądź też jako wynik żywszego oddychania, które adrenalina może pobudzać (21).

Suma oznaczonych kationów przed podaniem adrenaliny wynosi 150,9 milirównoważnika w litrze, suma natomiast anionów — 131,6 mE/l. Różnica zatem, która powinna być pokryta przez białko, wynosi 19,3 mE/l. Ponieważ średnie stężenie białka wynosi przed adrenaliną 7,06 g/100 ml, wyliczony stąd równoważnik elektrochemiczny białka wynosi 3658. Jeżeli w analogiczny sposób obliczymy równoważnik elektrochemiczny białka z średnich wartości otrzymanych po zastrzyku adrenaliny [73 700:(150,4—129,1)], to wyniesie on 3460. *D i l l i n n i* (3), (4) przyjmują, że w surowicy znajduje się 17,4 mE/l białka przy jego stężeniu 7,22 g/100 ml. Obliczając stąd równoważnik elektrochemiczny otrzymamy wartość 4149.

Tablica 4

Stężenie fosforu całkowitego surowicy w porównaniu ze stężeniem białka przed i po domięśniowym podaniu 1 mg chlorowodoru adrenaliny lub (w kontrolach) 1 ml soli fizjologicznej

Symbol dośw.	Rodzaj dośw.	P całkowity mg %		Białko g/100 ml	
		przed	po	przed	po
R. N.	adrenalina	9,9	10,4	7,05	7,31
J. K.	„	9,9	10,7	6,70	7,05
L. Z.	„	10,0	10,5	7,05	7,38
W. R.	„	10,4	11,1	6,69	6,91
M. Z.	„	10,2	11,2	7,15	7,52
M. Z.	kontrola	9,8	9,4	6,60	6,60
H. S.	„	11,0	10,8	6,20	6,20

Sumarycznie biorąc, stężenie kationów surowicy nie zmienia się po adrenalinie (150,9 mE/l przed; 150,4 mE/l po), obniża się natomiast suma nieorganicznych anionów surowicy o 2,5 mE/l (131,6 przed; 129,1 po). Ten spadek jest (przynajmniej w znacznej swej części) wyrównany przez wzrost stężenia białka surowicy z 19,5 mE/l do 20,7 mE/l po adrenalinie. W obliczeniach tych nie uwzględniono anionów organicznych surowicy takich, jak mleczan, cytrynian czy pirogronian, których stężenie może się zmieniać pod wpływem adrenaliny (19, 20, 21); nie wydają się one jednak odgrywać większej ilościowej roli i nie są przedmiotem obecnego doniesienia.

Widzimy, że biochemiczne zmiany, jakie powoduje podanie nadmiernej, нефизjologicznej ilości adrenaliny w ustroju człowieka, nie są jasne, a spotykane w literaturze dane niejednokrotnie sprzeczne. Prawie zupełnie nieznanne są mechanizmy powstawania tych czy innych zmian powodowanych adrenaliną. Istnieją wprawdzie dane, pozwalające przyjąć, że adrenalina działa na przemianę węglowodanową poprzez fosforylaze (17), badano także wpływ adrenaliny na niektóre enzymy na przykład hyaluronidaze (24), jednakże nie można jeszcze w tej chwili zestawzić jednolitego i jasnego mechanizmu działania hormonu na ustrój.

Streszczenie

Pobierano krew u zdrowych mężczyzn przed i po domięśniowym podaniu 1 mg chlorowodoru adrenaliny lub (w badaniach kontrolnych) 1 ml 0,9% roztworu chlorku sodowego. Wykonywano w obu próbkach następujące oznaczenia:

- 1) Stężenie cukru gronowego we krwi,
- 2) Stężenie białka w surowicy,
- 3) Stężenie w surowicy jonów: wapniowego, magnezowego, sodowego, potasowego, fosforanowego, chlorkowego i dwuwęglanowego.

Stwierdzono, że w 60 minut po adrenalinie następuje wzrost stężenia białka i cukru oraz spadek stężenia jonów: potasowego, fosforanowego i dwuwęglanowego.

Obliczono równoważnik elektrochemiczny białka i wyrażono przypuszczenie, że spadek stężenia potasu i nieorganicznego fosforu we krwi jest spowodowany wpływem adrenaliny na przemianę węglowodanową.

LITERATURA

1. Barry J. H., Rowland S. J.: *Biochem. J.* **53**, 213, 1953.
2. Cruess-Collaghan G.: *Biochem. J.* **29**, 1081, 1935.
3. Dill D. B., Edwards H. T., Consolazio W. V.: *J. Biol. Chem.* **118**, 635, 1937.
4. Dill D. B., Falbott J. H., Consolazio W. V.: *J. Biol. Chem.* **118**, 649, 1937.
5. Dury A.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **77**, 199, 1951.
6. Dury A.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **79**, 315, 1952.
7. Dury A.: *Endocrinology* **49**, 663, 1952.
8. Dury A., Holler J. W., Smith C.: *J. Clin. Invest.* **31**, 440, 1952.
9. Dury A., Moss D.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **80**, 199, 1952.
10. Dury A., Treadwell C. R.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **82**, 719, 1953.
11. Dury A.: *Endocrinology* **53**, 564, 1953.
12. Fenn W. O.: *Biol. Chem.* **128**, 297, 1939.
13. Fisher R. A., Yates F.: *Statistical tables for biological, agricultural and medical research*, London 1948.
14. Hagedorn H. C., Jensen B. N.: *Bioch. Ztschr.* **135**, 46, 1923.
15. Haugaard E. S., Stadie W. C.: *J. Biol. Chem.* **200**, 753, 1953.
16. Hinsberg K., Lang K.: *Medizinische Chemie*, Berlin 1938, str. 17, str. 64.
17. Kerppola W.: *Endocrinology* **51**, 192, 1952.
18. King E. J.: *Microanalysis in Medical Biochemistry*, London 1946, str. 40.
19. King E. J., Bain D. S.: *Biochem. J.* **48**, 51, 1951.
20. Pansini R., Cairella N.: *Bull. Soc. Ital. Biol. Sper.* **29**, 734, 1953.
21. Peters J. P., Van Slyke D. D.: *Quantitative Clinical Chemistry Vol. I. Interpretations*, Baltimore 1936, str. 43.
22. Pincus J. B., Natelson E., Lugovy J. K.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **78**, 24, 1951.
23. Rona P.: *Praktikum der physiologischen Chemie*, Berlin 1929, str. 271.
24. Rywkińska D. E.: *Biochimia* **17**, 25, 1952.
25. Van Slyke D. D.: *J. Biol. Chem.* **71**, 121, 1927.
26. Van Slyke D. D., Sendroy J. Jr.: *J. Biol. Chem.* **73**, 127, 1927.
27. Treadwell C. R., Dury A.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **82**, 727, 1953.
28. Weissberger L. H.: *J. Biol. Chem.* **160**, 481, 1945.
29. Żydowo M.: *Acta Biochim. Pol.* **1**, 139, 1954.

30. Z y d o w o M.: *Acta Biochim. Pol.* 1, 000, 1954.
31. Z y d o w o M.: *Pol. Tyg. Lek.* 7, 697, 1952.

НЕКОТОРЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КРОВИ ЗДОРОВОГО ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ ДЕЙСТВИЯ АДРЕНАЛИНА

Резюме

Взята кровь здоровых мужчин до и после внутримышечного введения 1 мл 0,9% раствора хлоргидрата адреналина или (при контрольных исследованиях) 1 мл 0,9% раствора NaCl. В обеих пробах произведены следующие определения:

1. концентрация виноградного сахара в крови,
2. концентрация белка в сыворотке,
3. концентрация в сыворотке следующих ионов:

кальция, магния, натрия, фосфатида, хлора, бикарбоната. Установлено, что в 60 минут после введения адреналина концентрация белка и сахара возрастает, а концентрация ионов калия, фосфатида, бикарбоната уменьшается. Вычислен электрохимический эквивалент белка и выдвинуто предположение, что уменьшение концентрации калия и неорганического фосфора в крови вызвано влиянием адреналина на обмен углеводов.

SOME BIOCHEMICAL MODIFICATIONS IN THE BLOOD OF A HEALTHY INDIVIDUAL UNDER THE INFLUENCE OF ADRENALINE

Summary

Blood samples were taken from healthy male individuals before and following intramuscular administration of 1 mg of adrenaline hydrochloride or (in the case of controls) 1 ml of a 0,9% solution of NaCl. The following determinations were made on both series of samples:

1. Blood glucose concentration,
2. Serum protein concentration,
3. Serum concentration of the following ions: calcium, magnesium, sodium, potassium, phosphorus, chloride and bicarbonate.

It was demonstrated that during the 60 minutes following administration of the adrenaline, there is an increase in the concentrations of protein and sugar as well as a decrease in concentration of the following ions: potassium, phosphorus and bicarbonate.

The electrochemical equivalent of the proteins was calculated and the hypothesis formulated, that the decrease in concentration of potassium and inorganic phosphorus in the blood is due to the influence of adrenaline on the metabolism of carbohydrates.

Otrzymano 23.VIII.1954

BARBARA KANIUGA

BADANIA NAD STRUKTURĄ CZĄSTECZKOWĄ NATURALNEGO DEKSTRANU¹⁾

*Pracownia Dekstranu Głównego Instytutu Przemysłu Rolnego i Spożywczego
Kierownik Pracowni: mgr Irena Januszewicz*

Dekstran wytwarzany przez *Leuconostoc mesenteroides* jest polimerem zbudowanym z cząsteczek α -D-glikopiranozy połączonych w łańcuchy za pomocą wiązań 1,6 (1). Na podstawie ostatnich badań (11) można wnosić, że główny łańcuch jest zwinięty spiralnie, przy czym na jeden zwój spirali przypada 4-5 reszt glikozy. Łańcuchy boczne, połączone z łańcuchem głównym wiązaniami 1,4 (1), występują w zmiennej ilości, zależnej od szczepu używanego do fermentacji. Dotychczas nie stwierdzono, czy długość łańcuchów bocznych jest wielkością stałą, czy zmienną. Badacze szwedzcy (3) wykazali, przy użyciu mikroskopu elektronowego, że cząsteczki dekstranu przedstawiają długie rozgałęzione nitki o grubości od 30 do 100 Å. Ponieważ długość cząsteczki glikozy wynosi ∓ 5 Å, łańcuch boczny zawiera więc od 6 do 20 jednostek glikozy. Badania Zakrzewskiego i współpracowników (11) nad budową cząsteczek w roztworze wykazały, że szerokość łańcucha zhydrolizowanego dekstranu wynosi 17 Å, z czego można by wnosić, że łańcuchy boczne zawierają jedną lub dwie cząsteczki glikozy. Badania te dotyczą jednak dekstranu częściowo zhydrolizowanego, a w czasie hydrolizy może ulegać pękaniu zarówno łańcuch główny, jak i łańcuchy boczne.

Ciężar cząsteczkowy dekstranu waha się w szerokich granicach dochodząc do kilkudziesięciu milionów. Ma tu znaczenie przede wszystkim szczep użytego drobnoustroju, ale i dla jednego szczepu wartości te wykazują znaczną rozpiętość. Ingelman i Siegbahn (3) oznaczyli ciężar cząsteczkowy dekstranu za pomocą ultrawirówki i otrzymali wartości dla poszczególnych frakcji w granicach od 14 000 do

¹⁾ Terminem dekstran naturalny określa się bezpośredni produkt fermentacji *Leuconostoc mesenteroides* w odróżnieniu od dekstranu częściowo zhydrolizowanego, jakim jest dekstran-lek.

38 000 000. Dekstran amerykański, wytwarzany przez szczep oznaczony NRRL B-512, ma cząsteczkę o ciężarze od 30 do 50 milionów (10).

Najszerze zastosowanie znalazł dekstran jako surowiec do wyrobu środka zastępczego osocza krwi, przewyższając pod wielu względami środki dotychczas stosowane (6). Otrzymanie dekstranu-leku wymaga częściowego zhydrolizowania dekstranu naturalnego, a następnie odrzucenia frakcji o ciężarze cząsteczkowym zbyt niskim i zbyt wysokim. Małe cząsteczki zostają zbyt szybko wydalone z organizmu, duże zaś powodują groźne dla życia zlepianie się krwinek.

Pewne właściwości preparatu leczniczego, jak maksymalna wielkość cząsteczek oraz występowanie groźnych dla organizmu odczynów, są związane z produktem wyjściowym, tj. naturalnym dekstranem, na którego zróżnicowanie wpływa głównie używany do syntezy szczep (7).

W produkcji naturalnego dekstranu największą trudność przedstawia wyodrębnienie odpowiedniego szczepu, ustalenie dla niego optymalnego składu pożywki i warunków fermentacji. W 1952 r. w naszej pracowni wyodrębniono ze zgęstniałej lemoniady szczep, który oznaczono literą „L”, oraz opracowano warunki produkcji naturalnej dekstranu na skalę przemysłową (4).

Dekstran ten był przedmiotem badań Instytutu Farmacji i Instytutu Hematologii, które wykazały, że jest on właściwym surowcem do wyrobu dekstranu-leku. Obecnie wytwarzany w naszej pracowni dekstran służy dla potrzeb przemysłu farmaceutycznego.

Pracę niniejszą podjęto w celu scharakteryzowania dekstranu wytwarzanego przez szczep „L” pod względem najistotniejszych cech budowy cząsteczkowej. Za parametry takie przyjęto stosunek wiązań 1,6 do innych, lepkość roztworu dekstranu oraz skręcalność właściwą. Stosunek wiązań w naturalnym dekstranie świadczy o przydatności jego do przerobu na dekstran-lek, gdyż wiązania 1,6 nie ulegają rozerwaniu przez amylazy ustrojowe (9). Lepkość roztworu jest zależna od ciężaru i asymetrii cząsteczki. Skręcalność daje obraz zanieczyszczenia produktu głównie cukrami oraz wskazuje na właściwy przebieg fermentacji.

Materiał doświadczalny

Badania prowadzone były na materiale otrzymanym w naszej pracowni z 47 fermentacji prowadzonych na skalę półtechniczną przy użyciu szczepu „L”. Fermentacje były prowadzone w tych samych warunkach. Do badań pobierano średnią próbkę z całej ilości wyprodukowanego dekstranu po wytrąceniu go alkoholem etylowym z przefermentowanej brzeczki i przechowywano pod warstwą etanolu w szklanych na-

czyniach. Do badań w czasie fermentacji wytrącano dekstran z brzezki pobranej z fermentora.

Część przeznaczoną do oznaczeń próby suszono w suszarce próżniowej w temperaturze 50°C, ucierano na drobny proszek i powtórnie suszono do stałej wagi. Próby przechowywano w ekzykatorze w zamkniętych naczynkach wagowych. Niektóre analizy przeprowadzano na materiale oczyszczonym. Dekstran oczyszczony, głównie od cukrów i soli mineralnych pochodzących z pożywki, otrzymywano przez trzykrotne rozpuszczenie w wodzie i strącenie alkoholem. Próby materiału oczyszczonego suszono i przechowywano tak samo, jak nieoczyszczonego.

Metody analityczne

1. **L e p k o ś ć** dekstranu nieoczyszczonego oznaczano w wiskozy-metrze Hoespplera. Przy oznaczaniu lepkości względnej 1% roztworu wodnego dekstranu stosowano kulkę o stałej 0,07874, a dla wody kulkę o stałej 0,01033. Przy oznaczaniu lepkości wewnętrznej stosowano kulkę o stałej 0,01033. Pomiary wykonywano w temperaturze 25°C ± 0,1°.

Lepkość względną i wewnętrzną określano według następujących definicji:

η — lepkość bezwzględna w centipauzach (cP),

η_w — lepkość względna w stosunku do wody = $\frac{\eta}{\eta_0}$

η_0 — lepkość bezwzględna rozpuszczalnika (wody),

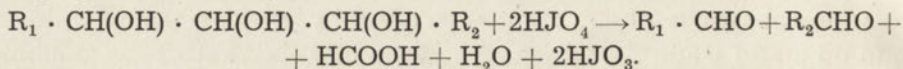
η_{sp} — lepkość właściwa = $\frac{\eta - \eta_0}{\eta_0}$,

$[\eta]$ — lepkość wewnętrzna = $\lim_{c \rightarrow 0} (\eta_{sp}/c)$ wzór Kraemera (8),

gdzie c — stężenie w gramach na 100 ml roztworu.

2. **S t o s u n e k** w i ą z a ń 1,6 do innych wiązań dekstranu oczyszczonego oznaczano przez utlenienie nadjodanem według techniki opracowanej dla dekstranu przez **J e a n e s a i W i l h a m a** (5), wprowadzając poprawkę na kwasowość dekstranu. Utlenienie nadjodanem jest znaną metodą stosowaną dla uzyskania wskazań dotyczących struktury wielocukrów. Działanie nadjodanu polega na jego zdolności utleniającej, przy czym ulega on redukcji do jodanu. W odniesieniu do dekstranu dane otrzymane przy pomocy utlenienia nadjodanem dają dobrą zgodność z danymi metylowania, gdyż dekstrany o wysokim ciężarze cząsteczkowym nie wykazują zawartości grup redukujących (5).

Gdy sąsiadują ze sobą więcej niż dwie grupy wodorotlenowe, wtedy po utlenieniu nadjodanem środkowe grupy $-\text{CH}\cdot\text{OH}$ dają kwas mrówkowy zgodnie z reakcją:



Z dwóch moli nadjodanu otrzymują się zatem 1 mol kwasu mrówkowego, co ma miejsce przy wiązaniach 1,6.

W przypadku pierwszorzędowej grupy alkoholowej powstaje aldehyd mrówkowy zgodnie z reakcją:

$R \cdot \text{CH}(\text{OH}) \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{OH} + \text{HJO}_4 \rightarrow R \cdot \text{CHO} + \text{HCHO} + \text{H}_2\text{O} + \text{HJO}_3$,
czyli z jednego mola nadjodanu otrzymuje się jeden mol aldehydu mrówkowego, co ma miejsce przy wiązaniach innych niż 1,6. Utworzony kwas mrówkowy oznacza się przez miareczkowanie ługiem. Aldehydu mrówkowego nie oznacza się bezpośrednio, natomiast oznacza się niezużyty nadjodan. Stosunek wiązań 1,6 do innych wylicza się z wzoru:

$$\frac{C}{C_1 - 2C}$$

gdzie C — liczba moli kwasu mrówkowego na jedną resztę glikozową, C_1 — liczba moli nadjodanu zużytego na jedną resztę glikozową.

Odważkę 0,4 g rozpuszczano i dopełniano w kolbie miarowej do 500 ml. Do 4 prób po 50 ml dodawano 50 ml roztworu nadjodanu potasowego (3,44 g/l). Po 72 godzinach utleniania w ciemności w temperaturze $25^\circ\text{C} \mp 2^\circ$ w dwóch próbach oznaczano kwas mrówkowy i w dwóch niezużyty nadjodan. Kwas mrówkowy miareczkowano 0,01 N NaOH po uprzednim dodaniu 3 ml 0,3 M glikolu etylenowego w celu związania nieprzereagowanego KJO_4 . Nadjodan oznaczano po zubożeniu próby, dodaniu 10 ml nasyconego na zimno NaHCO_3 i około 2 g KJ, miareczkując 0,05 N arseninem wobec skrobi. Miano arseninu nastawiano na odważkę resublimowanego jodu.

Oznaczenia prowadzono w atmosferze azotu w celu uniknięcia wpływu CO_2 .

3. Skręcalność $[\alpha]^{20}$ dekstranu oczyszczonego i nieoczyszczonego badano w polarymetrze kołowym przy użyciu lampy sodowej i rurki o długości 1 dm. Oznaczano skręcalność 0,5% roztworu dekstranu w normalnym ługu sodowym dla uzyskania lepszej przejrzystości.

Wyniki badań

1. STOSUNEK WIĄZAŃ I LEPKOŚĆ

W tabelicy 1 przedstawiono wyniki oznaczeń stosunku wiązań 1,6 do innych wiązań, lepkość i skręcalność dekstranu. Utrzymywanie się skrę-

Tablica 1. Cechy charakterystyczne naturalnego dekstranu.

Lepkość oznaczano w dekstranie nieoczyszczonym, stosunek wiązań oznaczano w dekstranie oczyszczonym

Lp.	Granice lepkości	Lepkość względna 1 ^o /o roztworu wodnego	Stosunek wiązań 1,6 do innych	Procent wiązań 1,6	[α] _D ²⁰ dekstranu	
					oczyszczonego	nieoczyszczonego
1	5—10	5,77	5	83,3	180	158
2		6,78	5	83,3	189	168
3		6,93	5	83,3	186	158
4		6,93	8	88,9	184	158
5	10—15	11,55	5	83,3	184	166
6		11,62	8	88,9	192	162
7		12,05	8	88,9	184	159
8		12,20	6	85,7	190	174
9		12,35	8	88,9	196	160
10		13,00	7	85,7	190	158
11		13,00	5	83,3	184	158
12		13,30	5	83,3	196	158
13		14,44	8	88,9	184	160
14		14,44	5	83,3	170	163
		14,73	6	85,7	186	160
16	15—20	15,52	6	85,7	170	160
17		15,59	5	83,3	178	160
18		16,07	8	88,9	180	170
19		16,16	5	83,3	180	159
20		16,18	5	83,3	189	177
21		16,63	6	85,7	182	161
22		16,81	6	85,7	183	159
23		17,71	5	83,3	189	165
24		17,97	5	83,3	178	160
25		18,76	4	80,0	175	166
26		19,35	6	85,7	190	172
27		19,49	6	85,7	186	160
28		19,50	6	85,7	190	168
29	20—25	20,78	5	83,3	182	157
30		21,08	6	85,7	192	170
31		21,67	6	85,7	180	170
32		21,94	6	85,7	190	170
33		22,02	8	88,9	190	160
34		22,38	6	85,7	178	162
35		23,34	5	83,3	186	172
36		23,49	5	83,3	188	158
37		23,82	4	80,0	200	162
38		24,26	9	90,0	194	172

Lp.	Granice lepkości	Lepkość względna 1% roztworu wodnego	Stosunek wiązań 1,6 do innych	Procent wiązań 1,6	[α] _D ²⁰ dekstranu	
					oczyszczonego	nieoczyszczonego
39	25—30	25,10	5	83,3	180	164
40		29,16	5	83,3	176	160
41	30—35	30,50	5	83,3	184	162
42		30,75	6	85,7	187	162
43		30,75	5	83,3	196	160
44		32,49	7	87,5	184	164
45		34,92	5	83,3	192	160
46	35—40	36,09	4	80,0	189	180
47		36,97	5	83,3	187	164

calności właściwej oczyszczonego dekstranu w graniach 178° — 198° wskazuje na właściwy przebieg fermentacji.

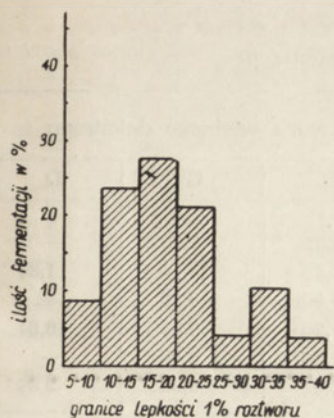
Rys. 1 przedstawia procentową częstość występowania poszczególnych wartości lepkości w przebadanych próbach. Dla uproszczenia zastosowano podział wartości lepkości na klasy. Lepkość względna 1% roztworu dekstranu waha się w graniach od 5 do 37, przy czym lepkość w granicach od 10 do 25 stanowi około 72%.

Rys. 2 przedstawia procentową częstość występowania poszczególnych wartości stosunku wiązań 1,6 do innych wiązań w przebadanych próbach. Stosunek ten waha się w granicach od 4—9, przy czym wartości 5 i 6 stanowią 72%.

Rys. 3 przedstawia procentową częstość występowania poszczególnych wartości lepkości w przebadanych próbach o stosunku wiązań 5 i 6. Około 73% badanych dekstranów o stosunku wiązań 5 i 6 ma lepkość w granicach 10—25.

Rys. 4 przedstawia procentową częstość występowania poszczególnych wartości stosunku wiązań 1,6 do innych w przebadanych próbach o lepkości od 10 do 25. Około 70% prób o lepkości względnej 1% roztworu w granicach od 10 do 25 ma stosunek wiązań o wartości 5 i 6.

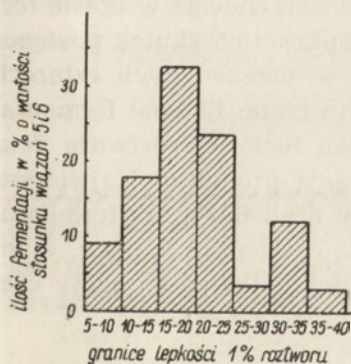
A więc dla dekstranu, produkowanego za pomocą szczepu „L”, wartościami najbardziej typowymi są: dla stosunku wiązań — wartości 5 i 6, a dla lepkości względnej 1% roztworu — wartości w granicach 10—25. Można uważać, że pod względem stosunku wiązań produkt jest wyrównany, niejednorodny zaś pod względem lepkości 1% roztworu.



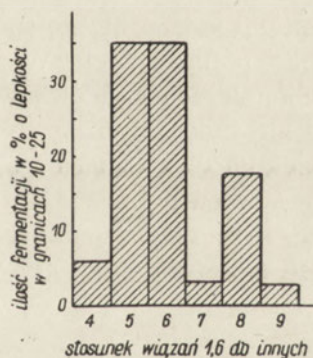
Rys. 1. Procentowa częstość występowania poszczególnych wartości lepkości w przebadanych 47 próbach dekstranu.



Rys. 2. Procentowa częstość występowania poszczególnych wartości stosunku wiązań 1,6 do innych w przebadanych 47 próbach dekstranu.



Rys. 3. Procentowa częstość występowania poszczególnych wartości lepkości w przebadanych 47 próbach dekstranu, w których wartość stosunku wiązań 1,6 do innych wynosi 5 i 6.



Rys. 4. Procentowa częstość występowania poszczególnych wartości stosunku wiązań 1,6 do innych w przebadanych 47 próbach dekstranu, w których wartość lepkości wynosi od 10 do 25.

2. ZMIANY LEPKOŚCI W CZASIE FERMENTACJI

W celu stwierdzenia, czy istnieje zależność między lepkością dekstranu a czasem trwania fermentacji, badano zmiany lepkości w ciągu sześciodobowej fermentacji w odstępach jednodobowych.

Tablica 2
Zmiany lepkości w czasie fermentacji

Doba fermentacji	Lepkość względna 1% roztworu wodnego dekstranu				
	Seria:	A	B	C	D
$1/2$		11,55	19,35	7,80	—
$1\frac{1}{2}$		13,72	11,55	13,14	11,84
$2\frac{1}{2}$		14,00	8,66	8,30	—
$3\frac{1}{2}$		8,23	11,26	6,93	10,84
$4\frac{1}{2}$		7,58	12,56	8,08	—
$5\frac{1}{2}$		7,50	16,61	5,62	5,84
Amplituda wahań		6,42	10,69	7,52	6,00

Jak widać z liczb przedstawionych w tabl. 2 lepkość dekstranu w czasie fermentacji ulega wahaniom. Najwyższa wartość dla amplitudy wahań wynosi 10,7.

W wahanich tych nie ma żadnej regularności, chociaż w czasie fermentacji można by się spodziewać wzrostu lepkości na skutek postępowania polimeryzacji. W żadnym przypadku w przebadanych czterech fermentacjach końcowa wartość nie była najwyższa. Badane fermentacje nie były zakażone. Nieregularności wahań lepkości roztworu dekstranu można wyjaśnić jedynie niejednorodnością produktu. Najwidoczniej stopień polimeryzacji nie jest jednakowy dla całej masy fermentującej brzeczki. W jednych miejscach powstają cząsteczki większe, w innych mniejsze. Mogą też występować mniejsze i większe agregaty cząsteczek.

3. PORÓWNANIE POD WZGLĘDEM LEPKOŚCI PRÓB DEKSTRANU POCHODZĄCYCH Z JEDNEJ FERMENTACJI

W celu potwierdzenia przypuszczeń o niejednorodności produktu otrzymanego z jednej fermentacji oznaczono lepkość względną 1% roztworu sześciu prób pobranych z różnych miejsc po wytrąceniu dekstranu z całej brzeczki, tj. 450 l. Otrzymane wyniki przedstawiono w tabl. 3.

Jak widać z tabl. 3, różnice między równoległymi oznaczeniami wynoszą od 0 do 2,6. Amplituda wahań między poszczególnymi próbami wynosi 6,0. Wartość ta jest niższa od wartości dla prób badanych w ciągu fermentacji prawdopodobnie dlatego, że przy wytrącaniu alkoholem następuje wymieszanie i produkt jest bardziej jednolity.

Tablica 3

Lepkość dekstranu z różnych miejsc produktu otrzymanego w czasie jednej fermentacji

Nr próby	Lepkość względna 1% roztworu	Różnice między równoległymi próbami (w zaokrągleniu)	Wartość średnia z równoległych oznaczeń (w zaokrągleniu)
I a b	19,06 16,98	2,0	18,0
II a b	17,91 20,58	2,6	19,3
III a b	18,05 18,87	0,9	18,4
IV a b	16,98 16,98	0,0	17,0
V a b	15,88 14,58	1,3	15,2
VI a b	18,19 17,91	0,3	18,0
Wartość średnia			17,7

4. FRAKCYONOWANE WYTRĄCANIE

Aby wyjaśnić, na czym polegają różnice, w lepkości roztworów dekstranu, przystąpiono do rozdzielania poszczególnych frakcji. Zastosowano frakcjonowane wytrącanie według techniki używanej dla częściowo zhydrolizowanego dekstranu (2).

Roztwór dekstranu sączono przez sączek Schotta G3. Następnie, silnie mieszając, dodawano z biurety 96% alkohol do chwili wystąpienia zmętnienia. Temperaturę podwyższano do 40°C i utrzymywano aż do rozpuszczenia osadu, po czym powoli obniżano temperaturę do 20°C. Znad osadu zlewano płyn i traktowano go w podobny sposób większą ilością alkoholu. Zebrany osad ponownie rozpuszczano w wodzie i strącano alkoholem. W celu przyspieszenia opadania osadu zastosowano wirowanie (5000 obr./min). Przy użyciu 1% roztworu osad nie dał się odwirować, prawdopodobnie z powodu dużej lepkości i nagrzewania się podczas długiego wirowania. Przy użyciu 0,5% roztworu osad tworzył się po 5 minutach.

W pierwszym doświadczeniu otrzymano dwie frakcje, z których pierwsza stanowiła 77%, a druga 23%. Lepkość 1% roztworu dekstranu z pierwszej frakcji wynosiła 18,0, gdy tymczasem lepkość tej samej pró-

by przed rozdzieleniem wynosiła 13,0. (Lepkość frakcji drugiej nie została oznaczona z powodu zbyt małej ilości próby).

W drugim doświadczeniu otrzymano sześć frakcji. Oznaczona lepkość najcięższej frakcji wynosiła 8,74. W związku z tym dalsze prowadzenie badań stało się bezcelowe, ponieważ lepkość zamiast wzrosnąć znacznie zmalała. Najwidoczniej czynności związane z frakcjonowanym wytrącaniem, a szczególnie intensywne mieszanie wywołują depolimeryzację łańcuchów.

5. LEPKOŚĆ WEWNĘTRZNA

Oznaczenia lepkości wewnętrznej wykonano dla zorientowania się o ciężarze cząsteczkowym neutralnego dekstranu. Lepkość wewnętrzną wyznaczano przez graficzne rozwiązanie wzoru K r a e m e r a (patrz wyżej).

Do badań wzięto próby o lepkościach względnych największych, najmniejszych i pośrednich. Pierwsze oznaczenia wykonano na roztworach o stężeniu: 1%, 0,8%, 0,6%, 0,5% i 0,4%. Okazało się, że otrzymane punkty nie wyznaczają kierunku, w którym można by poprowadzić prostą. Wobec tego wykonano pomiary przy stężeniach niższych: 0,3%, 0,2%, 0,1%. Otrzymane wyniki przedstawiono w tabl. 4.

Tablica 4
Lepkość wewnętrzną dekstranu naturalnego

Lepkość względna 1% roztworu wodnego dekstranu	Lepkość wewnętrzną (tej samej próby)
36,97	2,0
32,49	1,5
24,26	1,4
15,52	1,3
14,44	1,6
9,10	1,6
4,48	1,1

Między lepkością względną 1% roztworu a lepkością wewnętrzną nie ma prostej zależności. Niektóre dekstrany o mniejszej lepkości względnej 1% roztworu mają większą lepkość wewnętrzną. Wahania lepkości względnej 1% roztworu dochodzą nawet do ośmiokrotnej wartości, a wahania lepkości wewnętrznej są około dwukrotne. Świadczy to o tym, że nie ma tak znacznych różnic w wielości cząsteczek dekstra-

nów pochodzących z poszczególnych fermentacji, jak można by przypuszczać tylko na podstawie lepkości względnej 1% roztworu.

Omówienie wyników

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń można wysnuć pewne wnioski, dotyczące budowy cząsteczkowej dekstranu wytwarzanego przez *Leuconostoc mesenteroides* szczep „L”.

Sądząc z bardzo wysokich lepkości względnych oraz porównując otrzymane wartości lepkości wewnętrznej z danymi z literatury dla innych dekstranów (7), (2), można przyjąć orientacyjnie, że średni ciężar cząsteczki naszego dekstranu osiąga wartość powyżej 50 000 000.

Mimo jednakowych warunków fermentacji istnieją różnice w budowie otrzymanego produktu. Biorąc za miernik różnice w wartościach lepkości względnej można zrobić następujące zestawienie:

Tablica 5
Maksymalne różnice lepkości względnej

	W próbach pobranych:	Wartość różnicy
1	z produktów poszczególnych fermentacji	32
2	w ciągu jednej fermentacji w odstępach jednodobowych	10,7
3	z różnych miejsc produktu tej samej fermentacji	6,0
4	z jednej wysuszonej i roztartej próbki	2,6

Różnice w lepkości między produktami poszczególnych fermentacji mimo jednakowych warunków ich prowadzenia są zapewne uwarunkowane różnym stopniem polimeryzacji. Różnice lepkości produktu jednej fermentacji świadczą o nierównomierności brzezki. Po wymieszaniu produktu w czasie wytrącania różnice maleją.

Na rozbieżności między próbkami z jednej wysuszonej i roztartej próbki wywiera wpływ sposób i czas rozpuszczania oraz mieszania dekstranu. W jak silnym stopniu czynniki te mogą wywoływać depolimeryzację, najlepiej zostało uwidocznione przy frakcjonowanym wytrącaniu, gdzie lepkość najcięższej frakcji zamiast wzrosnąć zmalała w porównaniu z lepkością przed frakcjonowaniem. Fakt ten świadczy o dużej nietrwałości tych ogromnych cząsteczek dekstranu.

Wyniki oznaczeń lepkości są obciążone błędem, wpływającym z niejednorodności i nietrwałości dekstranu. Jednakowe warunki rozpuszczania są niemożliwe do osiągnięcia, gdyż sproszkowany dekstran po zetknięciu z wodą zbija się w różnej wielkości bryłki, które niejednakowo szybko się rozpuszczają.

Streszczenie

Przebadano dekstran wytwarzany przez *Leuconostoc mesenteroides* szczep „L”, wyodrębniony w Pracowni Głównego Inst. Przem. Rol. i Spoż. Do badań służył materiał pochodzący z 47 fermentacji, w którym oznaczano lepkość względną 1% roztworu wodnego, stosunek wiązań 1,6 do innych wiązań oraz skręcalność właściwą produktu oczyszczonego i nieoczyszczonego.

Lepkość oznaczano za pomocą wiskozymetru Hoepplera, stosunek wiązań 1,6 do innych metodą utleniania nadjodanem.

Przebadano zmianę lepkości w ciągu sześciodobowej fermentacji w odstępach jednodobowych oraz jednolitość produktu pochodzącego z jednej fermentacji przez pobranie prób z sześciu miejsc.

Przeprowadzono próby z frakcjonowanym wytrącaniem.

Porównano lepkość względną z lepkością wewnętrzną.

Lepkość względną 1% roztworu wahała się w granicach od 5 do 35, przy czym z 47 fermentacji około trzy czwarte posiadało lepkość od 10 do 25.

Stosunek wiązań 1,6 do innych wahał się w granicach od 4 do 9, przy czym około trzy czwarte fermentacji posiadało stosunek wiązań o wartości 5 i 6.

Między lepkością roztworu dekstranu a czasem trwania fermentacji nie stwierdzono prostej zależności.

Dekstran pochodzący z jednej fermentacji jest produktem niejednorodnym pod względem lepkości.

Próby z frakcjonowanym wytrącaniem wykazały, że cząsteczki dekstranu ulegają łatwo depolimeryzacji.

Lepkość wewnętrzną wykazała wahania od 1,1 do 2. Orientacyjna średnia wielkość cząsteczki badanych dekstranów wynosi powyżej 50 000 000.

Cząsteczki dekstranu ulegają depolimeryzacji głównie pod wpływem rozpuszczania i intensywnego mieszania.

LITERATURA

1. Hassid W. Z., Barker H. A.: *J. Biol. Chem.*, **134**, 163, 1940.
2. Ingelman B., Halling M. S.: *Arkiv Kemi*, **1**, 61, 1950.
3. Ingelman B., Siegbahn K.: *Nature*, **154**, 237, 1944.
4. Januszewicz I., Wojcieszak P.: *Prace Gl. Inst. Przem. Rol. i Spoż.*, w druku.
5. Jeanes A., Wilham C. A.: *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 2655, 1950.
6. Morawski K., Krysiak J.: *Pol. Tyg. Lek.*, 34—35, 1953.
7. Pigman W. W., Wolfrom W. H.: *Adv. Carb. Chem.*, **2**, 203, 1946.

8. Weissberger A.: Physical Methods of Organic Chemistry (1949) Vol. II, str. 331.
9. Willenberg W.: Zucker 2, 33, 1953.
10. Wolf I. A., Mehlretter C. L., Melloes R. L., Hofreiter P. R., Patrick P. L., Rist C. E.; *Ind. Eng. Chem.*, 46, 370, 1954.
11. Zakrzewski K., Krysiak J., Murawski K., May Z., Malc J.: *Acta Biochim. Pol.*, 1, 27, 1954.

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ ДЕКТРАНА ОБРАЗОВАННОГО БАКТЕРИЯМИ *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES*

Резюме

Исследовано декстран образованный бактериями *Leuconostoc mesenteroides* штамма „L“ и полученый в лаборатории Декстрана Главного Института Пищевой и Сельскохозяйственной промышленности. В исследованном материале взятом с 47 ферментаций определялась: относительная вязкость 1% водного раствора, соотношение связей 1,6 к другим и вращение очищенного и сырого продукта. Вязкость определялась вискозиметром Гешлера а отношение связей 1,6 к другим по методу окисления периодатом. Исследовано изменение вязкости раствора в течении шестисуточной ферментаций беря пробы в односуточных промежутках времени. Исследована однородность продукта одной ферментации. Исследовано фракционированное осаждение. Сравнивалась относительная вязкость с внутренней вязкостью. Относительная вязкость 1% раствора находилась в пределах 5 — 35. 72% продуктов ферментации имело вязкость 10 — 25. Отношение связей 1,6 к другим, колебалось в границах 4 — 9, причем величина характеризующая отношение связей 72% продуктов ферментации равнялась 5 и 6. Не была установлена прямая зависимость между вязкостью раствора декстрана и длительностью ферментативного процесса. Декстран взятый с одной ферментации имел неоднородную вязкость. Опыты с фракционированным осаждением обнаружили, что молекулы декстрана легко деполимеризуются. Внутренняя вязкость колеблется в границах 1,1 — 2. Ориентировочная средняя величина молекулы исследованного декстрана превышает 50 000 000. Молекулы декстрана деполимеризуются главным образом во время растворения и усиленного перемешивания.

STUDIES ON THE MOLECULAR STRUCTURE OF NATURAL DEXTRAN

Summary

Studies have been made on dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides*, strain „L“ isolated in the Dextran Laboratory of the Central Institute of the Agricultural and Food Industry. The studies embraced

material derived from 47 fermentations and included determinations of the relative viscosity of 1% aqueous solutions, the proportion of 1,6 to other bonds, as well as the rotation of the crude and purified material.

Viscosity was measured by means of the Hoesppler viscosimeter and the ratio of 1,6 to other bonds by periodate oxidation.

Measurements were made of the change in viscosity during a 6-day fermentation run, at one-day intervals, and of the uniformity of the product derived from one fermentation run by withdrawing samples from 6 different places.

Tests were carried out on fractional precipitates.

A comparison was made of relative viscosity with intrinsic viscosity.

The relative viscosity of a 1% solution varied within the limits 5 to 35, of which 72% of 47 fermentations had a viscosity of 10 to 25.

The ratio of 1,6 to other bonds varied within the limits 4 — 9, of which 72% fell between 5 and 6.

No simple relationship could be found between the viscosity of the solution and the time of duration of the fermentation.

Dextran originating from one fermentation run is nonhomogeneous as regards viscosity.

Fractional precipitation trials showed that the dextran molecules are quite readily depolymerized.

The intrinsic viscosity varied from 1,1 to 2. An average rough value of the molecular weight of the dextran studies is about 50 000 000.

The dextran molecules undergo depolymerization while being dissolved and during vigorous stirring.

Otrzymano 5.IX.1954

TADEUSZ GŁĘBICKI

METABOLIZM FOSFOROWY PRĄTKA GRUŻLICY

Dział Biochemii P. Z. H. w Warszawie

Kierownik: prof. dr J. Heller

Dane piśmiennictwa światowego odnośnie do metabolizmu fosforowego *Mycobacterii* są bardzo skąpe i o charakterze fragmentarycznym. Zapoczątkowane przez S y m a (8, 9) bilansowe badania przemiany materii prątka gruźlicy obejmowały metabolizm ogólny węglowy, azotowy, tlenowy i wodorowy. Niniejsza praca jest próbą ujęcia w sposób bilansowy fosforowego metabolizmu prątka.

Metoda

Przystępując do oznaczenia fosforu w hodowlach prątka gruźlicy zmodyfikowano płynne podłoże syntetyczne DGK (2), stosując bufor cytrynianowy w miejsce fosforanowego. Należało bowiem zmniejszyć stężenie fosforu w pożywce wyjściowej, by metabolizm fosforowy prątka był jak najwyraźniejszy. Zmniejszono ilość dodawanego KH_2PO_4 do 0,05 g/l, zwiększając ilość kwasu cytrynowego do 5,50 g/l. Tak zmienioną pożywkę DGK, w której zawartość fosforu wynoszącą około 100 mg% oznaczono symbolem DGKC1. W toku dalszej pracy okazało się, że ta ilość fosforu jest dla szczepu ludzkiego wirulentnego niewystarczająca; fosfor zostaje bowiem prawie całkowicie wbudowany w ciało bakteryjne i nie odnajduje się go niemal w pożywce powzrostowej. Z drugiej strony procentowa zawartość fosforu w prątkach jest wówczas bardzo niska. Dlatego w dalszych seriach doświadczeń zwiększono ilość fosforu w podłożu wyjściowym do 200 mg% i 300 mg% stosując pożywkę DGKC2 i DGKC3.

W doświadczeniach użyto prątków następujących szczepów: *Myc. phlei*, *Myc. tuberculosis v. hominis* H37Rv oraz *Myc. tuberculosis t. bovinus* Vallée. Szczepy te otrzymano z Muzeum Szczepów Instytutu Gruźlicy. Prątki z podłoża Petragnaniego przesiewano na podkład z waty

i bibuły (3) napojony zmodyfikowaną pożywką DGK. Otrzymywano w ten sposób w stosunkowo krótkim czasie obfitą hodowlę dającą szybki wzrost po przeniesieniu na pożywkę płynną DGKC. Z tej hodowli jedno oczko ezy przenoszono no kolby hodowlane, zaopatrzone w korki z waty i gazy. Sposób sporządzania i sterylizacji pożywki opisano już poprzednio (7). Wyjałowioną pożywkę odpipetowywano do kolb hodowlanych i kontrolnych. Kultury hodowano w 37°C. Prątki po okresie wzrostu odsączano przez sączek Seitza i przemywano wodą.

Spalanie prątków i pożywki wykonywano metodą *Neumanna* (4). W dalszych seriach doświadczeń posłużono się sposobem podanym przez *Kennedy* (5) dla spalania krwi, polegającym na ogrzewaniu spalanej substancji z mieszaniną stężonego kwasu siarkowego i 60% kwasu nadchlorowego. Wypróbowano tę metodę i stwierdzono, że nadaje się ona dobrze do naszych celów. Doświadczalnie ustalono, że należy dodawać 2 ml stężonego H_2SO_4 i 1 ml 60% $HClO_4$ na 100 mg suchej masy prątków oraz taką samą ilość kwasów na 4 ml pożywki wyjściowej bądź 10 ml powzrostowej. Spalanie metodą *Kennedy* trwa znacznie krócej niż metodą *Neumanna* i nie wymaga stałego nadzoru.

Fosfor oznaczano metodą *Fiskego i Subbarowa* w modyfikacji *Lohmanna i Jendrasika* (6). Oznaczenia wykonywano na fotokolorymetrze Pulfricha stosując filtr S66.

W obawie, że badany materiał może zawierać substancje interferujące w oznaczeniu fosforu, posłużono się metodą *Delory* (1), w której fosforany strąca się jako fosforan wapnia, osad rozpuszcza się w kwasie nadchlorowym i oznacza się fosfor kolorymetrycznie. Otrzymano wyniki zgodne w granicach błędu doświadczalnego z uzyskanymi metodą zwykłą. Wobec powyższego zaniechano stosowania metody *Delory* w analizowaniu badanego materiału.

Wyniki i dyskusja

Wyniki analiz zebrano w tablicach. Z prątkiem saprofitycznym *Myc. phlei* wykonano 3 serie doświadczeń, po 3 kolby w każdym doświadczeniu. Stosowano pożywkę DGKC1 hodując prątki 7 dni (I seria) oraz DGKC2 hodując 7 (II seria) i 16 dni (III seria). Prątki saprofityczne hodowano stosunkowo krótko, gdyż wzrastają one szybko pokrywając kożuchem całą powierzchnię pożywki już w niedługim czasie.

W tablicy 1 rzuca się w oczy bardzo niski procent fosforu w prątkach (0,33 — 0,41%). Zwiększenie ilości fosforu w pożywce wyjściowej przy tym samym czasie hodowli nie zmienia procentowej zawartości fosforu

Tablica 1
Przyswajanie fosforu przez *Mycobacterium phlei*

Nr kolby		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Dni hodowli		7	7	7	7	7	7	16	16	16
mg % P w po- żywce	wyjściowej	113,0	113,0	113,0	205,0	205,0	205,0	205,0	205,0	205,0
	powzrostowej	26,0	30,0	33,0	34,0	34,0	58,0	28,0	25,0	28,0
	zużycie	87,0	83,0	88,0	171,0	171,0	147,0	177,0	180,0	177,0
	zużycie P w %	77,0	73,5	70,8	83,4	83,4	71,7	86,3	88,0	86,3
prątki	wyhodowano mg	228,4	211,0	190,0	384,1	397,6	418,6	536,4	486,5	522,1
	zawierają P w %	0,41	0,41	0,40	0,44	0,43	0,35	0,33	0,37	0,34

w prątkach, zwiększa się tylko znacznie masa wyhodowanych bakterii. Hodując prątki *Myc. phlei* przez 16 dni otrzymujemy tzw. „stary kożuch” — grubszy, o barwie ciemniejszej, mocno pofałdowany, wychodzący na ściany naczynia. Przedłużenie czasu hodowli obniża bardzo nieznacznie zawartość fosforu w prątkach, powodując natomiast dość duży wzrost ilości wyhodowanej masy bakteryjnej. Zużycie fosforu pożywki zwiększa się stale choć nieznacznie w dalszych seriach doświadczeń.

Hodując szczep ludzki zjadliwy H37Rv (tablica 2) na DGKC1 przez 48 dni obesrwujemy niemal całkowite zużycie fosforu pożywki. W tych warunkach hodowli procent fosforu w prątkach jest niski, tego rzędu co u *Myc. phlei*. Przez zwiększenie zawartości fosforu w pożywce wyjściowej do 215 mg% osiągamy poważny wzrost procentowej zawartości fosforu w prątkach (0,63 — 0,71%). Porównanie kolb serii II (nr 12, 13 i 14) hodowanych przez 30 dni z serią III (nr 15, 16 i 17), w której okres wzrostu wynosił 40 — 41 dni, nie wykazuje wyraźnej zmiany w procentowej zawartości fosforu w prątkach. Różnica czasu hodowli była w tym wypadku zbyt mała.

Wzrost stężenia fosforu w pożywce wyjściowej (DGKC3) przy czasie hodowli 30 — 39 dni powoduje zwiększenie zawartości fosforu w prątkach do 0,86 — 1,09%. Należy podkreślić, że we wszystkich przypadkach tej serii (kolby 24 — 29) wyhodowano praktycznie taką samą ilość

Tablica 2
Przyswajanie fosforu przez *Mycobacterium tuberculosis t. bovinus* — Vallée

Nr kolby	10	11	12	13	14	15	16	17	24	25	26	27	28	29	30	31	32
Dni hodowli	48	48	30	30	30	40	40	41	30	32	34	35	37	39	61	63	65
wyjscio- wej	116,0	116,0	215,0	215,0	215,0	215,0	215,0	215,0	326,0	326,0	326,0	320,0	320,0	320,0	326,0	326,0	326,0
P w po- zyw- ce	6,0	2,0	128,0	107,0	1,0	97,0	105,0	110,0	115,0	116,0	115,0	105,0	115,0	116,0	161,0	163,0	146,0
zużycie P w ‰	94,8	98,3	40,5	50,4	99,5	54,9	51,2	48,8	64,7	64,5	64,7	67,1	64,0	63,9	50,6	50,0	55,2
wyho- dowano mg	261,9	265,1	108,5	166,8	302,8	177,5	153,3	166,1	193,6	230,8	221,6	222,6	214,6	236,7	300,2	339,0	237,2
prąt- ki zawierają P w ‰	0,42	0,43	0,77	0,63	0,72	0,64	0,69	0,66	1,09	0,91	0,95	0,97	0,96	0,86	0,55	0,48	0,76

masy bakteryjnej w każdej z kolb przy zużyciu fosforu pożywki w 64 — 67%. Dalsze zwiększanie ilości fosforu w pożywce wyjściowej nie powoduje już wzrostu procentowej zawartości fosforu w ciele prątka. Oznaczenia wykonane na prątkach szczepu H37Rv hodowanych na niezmodyfikowanej pożywce DGK (zawierającej 1100 mg% fosforu) wykazały około 1% fosforu w bakteriach. W odróżnieniu od „starego kożucha” saprofitów, który przez dość długi czas hodowli dobrze utrzymuje się na powierzchni pożywki, kożuch prątków zjadliwych starzejąc się łatwo opada na dno naczynia.

Ostatnią serię kolb szczepu H37Rv hodowano również na pożywce DGKC3 przez czas dostatecznie długi, by spowodować częściowo opadanie kożucha na dno kolby. Ilość wyhodowanej masy bakteryjnej zwiększa się wprawdzie znacznie w tych warunkach, lecz procent fosforu w prątkach spada do 0,48—0,55%. Kolba nr 32 stanowi przejście pomiędzy tą serią a kolbami serii poprzedniej, gdyż mimo że czas wzrostu wyniósł 65 dni, masa wyhodowanych prątków jest niemal taka sama, jak w kolbach o znacznie krótszym czasie hodowli. Zawartość fosforu wynosi w tym przypadku 0,76%.

Tablica 3

Przyswajanie fosforu przez *Mycobacterium tuberculosis t. bovinus* — Vallée

Nr kolby		18	19	20	21	22	23
Dni hodowli		50	52	54	59	61	63
mg% P w pożywce	wyjściowej	320,0	320,0	326,0	326,0	326,0	326,0
	powzrostowej	93,0	101,0	103,0	106,0	121,0	146,0
	zużycie	227,0	219,0	223,0	220,0	205,0	180,0
zużycie P w %		70,9	68,5	68,5	67,5	62,9	55,5
prątki	wyhodowa: o mg	507,6	557,2	532,1	578,9	521,0	427,3
	zawartość P w %	0,45	0,39	0,42	0,38	0,39	0,42

Prątki zjadliwe typu bydłowego szczep Vallée hodowano na pożywce DGKC3 w dwóch seriach: I 50—54 dni i II 59—63 dni. W kolbach I serii hodowle nie zajmowały jeszcze całej powierzchni pożywki, gdy

kożuchy II serii rozpoczęły już opadać na dno kolb. Prątki bydlęce wzrastając zajmują powierzchnię pożywki powoli, tworzą jednak gruby kożuch, co w efekcie daje bardzo duże ilości wyhodowanych mas bakteryjnych. Mimo różnego czasu hodowli obu serii w przyswajaniu fosforu nie występują tak ostre różnice, jak to obserwowaliśmy w doświadczeniach ze szczepem H37Rv. We wszystkich przypadkach ilość fosforu wynosi 0,38—0,45% przy zużyciu fosforu pożywki w 56—71%.

Porównując procentową zawartość fosforu w prątkach tych trzech szczepów w zależności od stężenia fosforu w pożywce wyjściowej i czasu hodowli dochodzimy do następujących wniosków: Hodując prątki szczepu *Myc. phlei* na pożywce zawierającej 100 mg% i 200 mg% fosforu przez ten sam okres czasu, nie stwierdzamy różnic w procentowej zawartości fosforu w prątku. Zużycie fosforu w pożywce bogatszej w fosfor zwiększa się jedynie nieznacznie powodując wzrost ilości wyhodowanej masy bakteryjnej.

Szczep ludzki zjadliwy wymaga większej ilości fosforu w pożywce wyjściowej. Procent fosforu w prątkach wzrasta wraz ze stężeniem fosforu w pożywce, osiągając przy hodowli na pożywce DGK3 graniczną wartość 1,09%. Przyswajanie fosforu szczepu wirulentnego ludzkiego H37Rv jest znacznie intensywniejsze, o czym świadczy około dwukrotnie wyższa zawartość fosforu w prątkach w porównaniu z dwoma pozostałymi szczepami.

Zawartość fosforu w zjadliwych prątkach typu bydlęcego jest podobna jak u *Myc. phlei* i wynosi 0,4—0,5%.

Przedłużenie czasu hodowli do otrzymania tzw. „starego kożucha” nie zmienia praktycznie procentowej zawartości fosforu w bakteriach u *Myc. phlei* i szczepu bydlęcego Vallée. Natomiast u szczepu zjadliwego ludzkiego zawartość fosforu w prątkach spada bardzo znacznie w tych warunkach.

Streszczenie

Szczep *Myc. phlei* hodowany równie długo na pożywce zawierającej 100 mg% i 200 mg% fosforu wykazuje jednakową zawartość fosforu w bakteriach wynoszącą 0,3 — 0,4%. Szczep ludzki zjadliwy wymaga większej ilości fosforu w pożywce wyjściowej. Procent fosforu w prątkach wzrasta wraz ze stężeniem fosforu w podłożu osiągając graniczną wartość 1,1% przy hodowli na pożywce zawierającej 300 mg% fosforu. Zawartość fosforu w prątkach typu bydlęcego jest podobna jak u *Myc. phlei* i wynosi 0,4 — 0,5%.

Przedłużenie czasu hodowli do otrzymania tzw. „starego kożucha” nie zmienia praktycznie procentowej zawartości fosforu w bakteriach

u *Myc. phlei* i szczepu bydłowego. Natomiast u szczepu zjadliwego ludzkiego procent fosforu w prątkach spada bardzo znacznie w tych warunkach aż do wartości około 0,5%.

LITERATURA

1. Delory G. E.: *Biochem. J.*, **32**, 7, 1161, 1938.
2. Głębiński T., Jałowicka K., Sym E. A.: *Gruźlica*, **18**, 413, 1950.
3. Głębiński T., Sym E. A.: *Gruźlica*, **20**, 303, 1952.
4. Hinsberg K., Lang K.: *Medizinische Chemie*, Urban — Schwarzenberg, Berlin, Wien 1938.
5. Kennedy R. P.: *J. Biol. Chem.*, **74**, 385, 1927.
6. Lohmann K., Jendrassik K.: *Bioch. Z.*, **178**, 419, 1926.
7. Palewicz F.: *Przegl. Epid.*, **3**, 232, 1949.
8. Sym E. A.: *Med. Dośw. i Społ.*, **25**, 3, 1946.
9. Sym E. A.: *Med. Dośw. i Społ.*, **25**, 395, 1947.

МЕТАБОЛИЗМ ФОСФОРА В ТУБЕРКУЛЕЗНЫХ ПАЛОЧКАХ

Резюме

Штамм *Myc. phlei* независимо от культивирования его на среде содержащей 100 мг % и 200 мг % фосфора обнаружил одинаковое содержание фосфора в бактериях, равное 0,3 — 0,4%.

Вирулентный штамм человеческого типа во время роста употребляет большее количество фосфора из исходной среды. Процент фосфора в туберкулезных палочках возрастает в зависимости от концентрации фосфора в среде, достигая предельной величины равной 1,1% при культивировании на среде содержащей 300 мг. % фосфора.

Содержание фосфора в туберкулезных палочках животного типа подобно с содержанием в *Myc. phlei* и равно 0,4 — 0,5%. Продление времени культивирования до момента получения так называемой „Старой пленки” не изменяет процентного содержания фосфора в *Myc. phlei* и в штамме животного типа.

В описанных условиях содержание фосфора в туберкулезных палочках вирулентного штамма человеческого типа значительно понижается, достигая величины около 0,5%.

THE PHOSPHORUS METABOLISM OF TUBERCLE BACILLI

Summary

A strain of *Mycobacterium phlei*, cultivated for equal lengths of time on media containing 100 mg % and 200 mg % of phosphorus, showed equal phosphorus contents amounting to 0,3 — 0,4%. A virulent human strain

requires a larger amount of phosphorus in the culture medium. The phosphorus content of the bacilli increases with the phosphorus content of the medium, attaining a limiting value of 1,1% for a culture cultivated on a medium containing 300 mg% phosphorus. The phosphorus content of animal bacilli is similar to that of *Myc. phlei* and varies from 0,4 — 0,5%.

Increasing the cultivation time to the point where an „old“ bacterial layer is obtained does not result in any practical change in the phosphorus content of *Myc. phlei* or the animal strain. On the other hand with the virulent human strain, the phosphorus content of the bacilli, under these conditions, showed a marked decrease, attaining a value as low as 0,5%.

Otrzymano 7.IX.1954

JAN W. SZARKOWSKI

WPLYW KWASU OCTOWEGO NA POWSTAWANIE KWASU SZCZAWIOWEGO W PRZEMIANIE *MYCOBACTERIUM PHLEI*

Z Zakładu Biochemii Polskiej Akademii Nauk i z Zakładu Chemii Fizjologicznej AM w Warszawie

Kierownik: prof. dr J. Heller

Na podstawie szeregu prac odnośnie do powstawania kwasu szczawowego u pleśni i grzybów można przypuszczać, że kwas octowy w tym procesie gra rolę zasadniczą.

Chrzaszcz i Tiukow (3) badając biochemiczną przemianę kwasu octowego i chemizm powstawania kwasu cytrynowego u pleśni wykazali obok kwasów bursztynowego, fumarowego i jabłkowego także i kwas szczawowy. Dodając do kultur grzybów kwasu octowego w obecności zasad udało się otrzymać przyrost ilości powstającego kwasu szczawowego dochodzący do 40—70%, a w niektórych wypadkach przyrost ten sięgał 93—100% zawartości w hodowlach kontrolnych (1, 2). Celem poniżej przedstawionej pracy było przebadanie wpływu kwasu octowego na powstawanie kwasu szczawowego w przemianie *Mycobacterium phlei*.

Część doświadczalna

Wykonano dwa rodzaje doświadczeń, w pierwszym wysiewano bakterie na pożywkę zawierającą dodatek kwasu octowego, w drugim podwarstwiano pożywkę z kwasem octowym gotową hodowlę wyrosłą na pożywce bezoctanowej.

W pierwszej serii doświadczeń bakterie hodowano na 160 ml pożywki DGK (5) bez kwasu cytrynowego, w której również cytrynian żelazowo-amonowy zastąpiono siarczanem żelazowym. Do poszczególnych hodowli dodawano kwas octowy w ilościach około 1, 2 i 3 g na 160 ml pożywki. pH pożywki nastawiano na 9, ługiem sodowym 0,1 N. Jako kontrola służyła hodowla *Myc. phlei* na takiej samej pożywce, nie zawierającej tylko kwasu octowego.

Wyhodowane bakterie odsączano przez lejek Schotta 3G4, a następnie przez bakteriologiczny filtr Seitz'a. W przesączonej pożywce powzrostowej oraz w pożywce wyjściowej oznaczano kwas octowy i szczawiowy. Zebrane bakterie z lejka Schotta suszono w temp. około 105° i ważono.

Kwas octowy oznaczano acydymetrycznie po oddestylowaniu z parą wodną z zakwaszonej kwasem fosforowym pożywki. Kwas szczawiowy strącano jako sól wapniową, a następnie oznaczano jodometrycznie, jak opisano w poprzedniej pracy (6). Otrzymane wyniki zestawiono w tabelicy 1.

Tablica 1

Wpływ kwasu octowego w pożywce na powstawanie kwasu szczawiowego w hodowlach *Mycobacterium phlei*. Czas hodowli 18 dni. Ilość pożywki 160 ml, pH pożywki 9, temp. hodowli 37°

Nr	P o ż y w k a				Suche bakterie	Powstało kwasu szczawiowego na 1 g suchych bakterii	
	Dodany kwas octowy	Pozostało kwasu octowego	Zużyty kwas octowy	Powstało kwasu szczawiowego		w mg	średnia w mg
	w g	w g	w g	w mg			
1	0	—	—	3,64	0,955	3,81	3,65
2	0	—	—	3,56	1,023	3,48	
3	1,06	—	—	2,80	0,816	3,43	3,24
4	1,06	—	—	2,75	0,918	3,00	
5	1,06	0,28	0,78	2,13	0,648	3,29	8,52
6	2,10	0,58	1,52	6,36	0,691	9,20	
7	2,10	0,61	1,49	6,12	0,706	8,67	11,38
8	2,10	0,64	1,46	5,90	0,766	7,70	
9	3,25	1,30	1,95	8,41	0,680	12,36	11,38
10	3,25	1,22	2,03	7,16	0,630	11,37	
11	3,25	1,10	2,15	7,87	0,755	10,42	
	1	2	3	4	5	6	7

W drugiej serii doświadczeń bakterie hodowano w litrowych kolbach okrągłodennych, zaopatrzonych w urządzenie do podwarstwiania (4). Bakterie hodowano na 160 ml pożywki DGK o pH 7,2, bez kwasu cytrynowego. Po 13 dniach pożywkę ściągano i oznaczano w niej kwas szczawiowy. Kozuch podwarstwiano 160 ml pożywki zawierającej około 3 g kwasu octowego o pH 9. Po upływie 5 dni bakterie odsączano, suszono i ważono. W pożywce oznaczano pozostały kwas octowy oraz powstały kwas szczawiowy. Uzyskane wyniki zestawiono w tablicy 2.

Tablica 2

Wpływ kwasu octowego na wytwarzanie kwasu szczawiowego przez podwarstwione kozuchy *Mycobacterium phlei*. Wiek kozucha 13 dni. Czas doświadczenia 5 dni. Ilość pożywki 160 ml, pH pożywki 9, temp. hodowli 37°

Nr	P o ż y w k a				Suche bakterie	Powstało kwasu szczawiowego na 1 g suchych bakterii	
	Dodany kwas octowy	Pozostało kwasu octowego	Zużyty kwas octowy	Powstało kwasu szczawiowego		w mg	średnia w mg
	w g	w g	w g	w mg			
1	0	—	—	1,70	2,16	0,79	0,75
2	0	—	—	1,55	2,23	0,70	
3	3,39	0	3,39	3,65	1,74	2,10	1,80
4	3,39	0	3,39	3,50	1,99	1,75	
5	3,39	0	3,39	2,73	1,76	1,55	
	1	2	3	4	5	6	7

Omówienie wyników

Rubryka 4 tabl. 1 przedstawia ilości kwasu szczawiowego (bezwodnego) wytworzone w czasie całego wzrostu bakterii na pożywkach kontrolnych (nr 1,2) oraz na pożywkach zawierających różne ilości kwasu octowego. Liczby w rubryce 6 i 7 oznaczają ilości mg kwasu szczawiowego przypadające na 1 g suchej masy bakteryjnej. Dodatek około 1 g kwasu octowego na 160 ml pożywki (nr 3, 4, 5) nie wpływa na zwiększenie zawartości kwasu szczawiowego w stosunku do kontroli, nato-

miast przy dodatku około 2 g (nr 6, 7, 8) uzyskano ilości kwasu szczawiowego przewyższające kontrolę przeszło dwukrotnie. Przy dodatku około 3 g (nr 9, 10, 11) ilość kwasu szczawiowego przewyższa kontrolę przeszło trzykrotnie.

Ilość kwasu szczawiowego przypadająca na 1 g suchej masy bakteryjnej, uzyskana w kontroli, wynosi średnio 3,65 mg, co przewyższa odpowiednio ilości kwasu szczawiowego uzyskane w poprzedniej pracy (6), gdzie ilość ta wynosiła około 2 mg na 1 g suchej masy bakteryjnej. Rozbieżność tę można wytłumaczyć bardziej alkalicznym odczynem pożywki, na której odbywał się wzrost bakterii (pH 9). Analogiczne zjawisko wpływu bardziej alkalicznego środowiska na wzmożenie wytwarzania kwasów, w tym i kwasu szczawiowego, zaobserwowali Chrząszcz T i Tiukow (3) badając przemianę pleśni.

W drugiej serii doświadczeń (tabl. 2) z podwarstwianiem gotowych kożuchów bakteryjnych w pożywkach pierwszych o pH 7,2, na których wyrosły bakterie, znaleziono 4,41; 4,49; 4,65; 4,71; 4,11 mg kwasu szczawiowego. W pożywce drugiej, zawierającej około 3 g kwasu octowego, którą podwarstwiono kożuchy, uzyskano po 5 dniach hodowli wzmożoną produkcję kwasu szczawiowego w stosunku do kontroli dwukrotnie.

Otrzymane wyniki przemawiają za tym, że kwas octowy w wypadku *Mycobacterium phlei*, podobnie jak i u pleśni, gra zasadniczą rolę w procesie powstawania kwasu szczawiowego.

Streszczenie

Kwas octowy wzmaga wytwarzanie kwasu szczawiowego przez *Mycobacterium phlei* zależnie od ilości dodanej do pożywki. Przy dodaniu 2 lub 3 g kwasu octowego na 160 ml pożywki uzyskano ilości kwasu szczawiowego przewyższające kontrolę odpowiednio dwu i trzykrotnie. W przypadku podwarstwiania gotowych kożuchów bakteryjnych pożywką z 3 g kwasu octowego uzyskano ilości kwasu szczawiowego przewyższające kontrolę dwukrotnie.

LITERATURA

1. Bernhauer K. i Slanina F.: *Biochem. Z.* **264**, 109, 1934.
2. Butkiewitsch Wl. S. i Fedoroff M. W.: *Biochem. Z.* **219**, 87, 1930.
3. Chrząszcz T. i Tiukow D.: *Biochem. Z.* **229**, 343, 1930.
4. Sym E. A.: *Medycyna Dośw. i Społ.* **25**, 3, 1946.
5. Sym E. A.: *Przegląd Epidemiol.* **3**, 205, 1949.
6. Szarkowski J. W.: *Bull. Acad. Pol. Sci.* **2**, 97, 1954; *Acta Biochim. Pol.*, **1**, 269, 1954.

ВЛИЯНИЕ УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ НА ОБРАЗОВАНИЕ ЩАВЕЛЕВОЙ
КИСЛОТЫ БАКТЕРИЯМИ *M. PHLEI*

Резюме

Уксусная кислота усиливает образование щавелевой кислоты штаммом *Mycobacterium phlei* в зависимости от количества уксусной кислоты добавленной к питательной среде. При добавлении 2 или 3 гр. уксусной кислоты к 160 мл питательной среды получено соответствующее количество щавелевой кислоты дважды и трижды превышающее контрольную пробу.

В случае подслоивания готовой бактериальной пленки питательной средой, содержащей 3 гр. уксусной кислоты, получены количества щавелевой кислоты дважды превышающие контрольные пробы.

THE INFLUENCE OF ACETIC ACID ON THE FORMATION OF OXALIC ACID BY
MYCOBACTERIUM PHLEI

Summary

Acetic acid increases the formation of oxalic acid by *Mycobacterium phlei*, depending on the amount added to the culture medium. The addition of 2 or 3 gms. of acetic acid to 160 ml. culture medium resulted in a 2 to 3-fold increase in the amount of oxalic acid produced. In case of introducing the medium containing 3 g of acetic acid under the bacteria layer the amount of oxalic acid obtained was twice that of the control.

Otrzymano 8.IX.1954

W. TYSAROWSKI

ODDYCHANIE *MYCOBACTERIUM PHLEI*

I. WPŁYW HYDRAZYDU KWASU IZONIKOTYNOWEGO NA ODDYCHANIE *MICOBACTERIUM PHLEI*

Zakład Chemii Fizjologicznej AM w Warszawie

Kierownik: prof. dr J. Heller

Hydrazyd kwasu izonikotynowego (INH) jest związkiem strukturalnie podobnym do amidu kwasu nikotynowego, składnika nukleotydu dwufosfopirydynowego (DPN) i trójfosfopirydynowego (TPN).

Podobieństwo to nasuwa przypuszczenie, że znane działanie INH, hamujące wzrost prątków kwasoopornych, polega na hamowaniu funkcji nukleotydów fosfopirydynowych. Ponieważ nukleotydy te odgrywają istotną rolę w oddychaniu komórkowym jako koenzymy dehydrogenaz, przebadano wpływ INH na oddychanie *Myc. phlei*.

Część doświadczalna

1. *Mycobacterium phlei*, szczep muzealny Instytutu Gruźlicy, hodowano na bulionie glicerynowym. Po 2—3 dniowym okresie wzrostu zbierano kożuch na szklanym sączku Schotta G1, przemywano trzykrotnie wodą destylowaną i rozbijano przez wstrząsanie ze szklanymi perełkami. Prątki zawieszano w buforze fosforanowym M/15 pH 7,0. Gęstość zawiesiny określano z ilości azotu przypadającego na 1 ml.

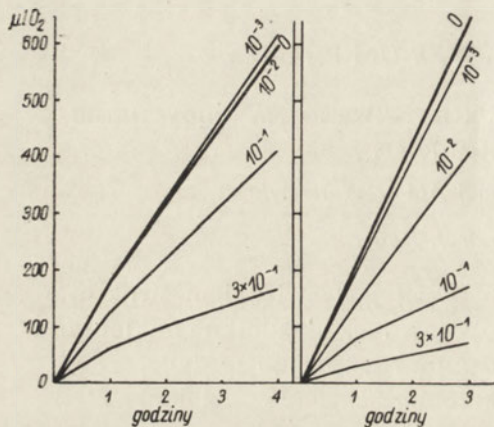
2. Zużycie tlenu mierzono bezpośrednią metodą Warburga. Naczynka manometryczne zawierały zawiesinę bakteryjną z INH, ewentualnie z dodatkiem glicerolu, uzupełnioną buforem do 3 ml. W naczynku środkowym umieszczano 0,2 ml 10% roztworu KOH. Fazę gazową stanowiło powietrze atmosferyczne. Czas doświadczenia wynosił 4 godziny, temperatura łaźni wodnej 37°C.

3. INH pochodzący z produkcji Zakładu Syntezy Środków Przeciwgruźliczych Instytutu Gruźlicy pierwotnie stosowano nie oczyszczony, w późniejszych doświadczeniach dwukrotnie krystalizowany z alkoholu etylowego (t. topn. 172°—173°C).

4. Glicerol był redystylowany.

Wyniki

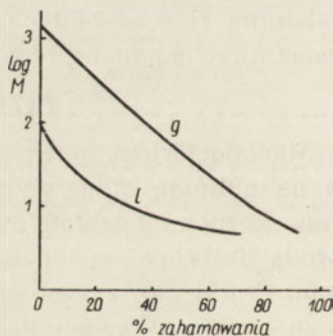
Hydrazyd kwasu izonikotynowego w stężeniu 10^{-2} M (137 mg %) i 10^{-3} M wpływa nieznacznie hamująco na oddychanie endogenne *Myc. phlei*. Stężenie INH 10^{-1} M w 4 godzinnym doświadczeniu obniża bezsubstratowe zużycie tlenu o 32%, zaś $3 \cdot 10^{-1}$ M o 72% (rys. 1a, wykres 1).



Rys. 1

a) Wpływ różnych stężeń INH na oddychanie endogenne *Myc. phlei*. W naczynku 1 ml zawiesiny zawierającym 1,95 mg azotu oraz różne stężenia INH. I. Bez dodania INH, 3×10^{-1} : 72% zahamowania, 10^{-1} M: 32% zahamowania 10^{-2} M i 10^{-3} M: brak wpływu.

a) Zużycie tlenu przez 1 ml zawiesiny *Myc. phlei* zawierającej 1,6 mg azotu w obecności M/50 glicerolu i różnych stężeń INH. I. bez dodania INH, 3×10^{-1} M — 91% zahamowania, 10^{-1} M — 74% zahamowania, 10^{-2} M — 38% zahamowania, 10^{-3} M — 6% zahamowania.



Rys. 2. Zależność obniżenia oddychania od stężenia INH. g = w obecności glicerolu, e = dla oddychania endogennego.

fektu, a nawet przeciwnie, oczyszczony preparat działa nieznacznie silniej w odpowiadających sobie stężeniach. Wyklucza to przypuszczenie że czynnikiem hamującym jest jakaś substancja obecna w preparacie jako zanieczyszczenie.

Rys. 2 obrazuje zależność zahamowania oddychania od stężenia INH. Jest ona liniową w zakresie stężeń skutecznych. Oddychanie w obecności substratu jest hamowane przez INH w stężeniu 10^{-3} M do

$3 \cdot 10^{-1}$ M, bez substratu w stężeniu INH 10^{-1} M do $3 \cdot 10^{-1}$ M. Krzywe przecinają się w punkcie odpowiadającym 100% zahamowaniu oddychania i stężeniu ok. $5 \cdot 10^{-1}$ M.

Dyskusja

Przebadane stężenia INH wielokrotnie przewyższają dawki bakteriostatyczne dla *Myc. phlei*. Wyraźny wpływ na oddychanie endogenne *Myc. phlei* ma stężenie 10^{-2} M przewyższające dawkę bakteriostatyczną 40-krotnie. W obecności glicerolu wpływ wystąpił w stężeniu INH 10^{-3} M, które jest około 4 razy wyższe od dawki bakteriostatycznej.

Użycie wyższych stężeń (10^{-1} M i $3 \cdot 10^{-1}$ M) pozwala na wyraźniejsze i wcześniejsze zaobserwowanie efektu w krótkim doświadczeniu metabolicznym. Tak duże stężenia mogą budzić zastrzeżenia co do specyficzności działania badanego związku, jednak można się spodziewać, że w czystych układach enzymatycznych znacznie mniejsze dawki mogłyby się okazać skuteczne.

Związek użyty w większym stężeniu w zawiesinach całych komórek bakteryjnych łatwiej przechodzi przez błonę komórkową i z większym prawdopodobieństwem dociera w obrębie ciała komórkowego do miejsca reakcji, na którą działa wybiórczo. Jest to szczególnie ważne w przypadku, gdy wprowadzony związek ulega rozłożeniu lub zamianie na formę nieczynną.

Wpływ INH na oddychanie zarówno endogenne, jak i w obecności glicerolu przemawia za mechanizmem hamującym główny szlak utleniania w prątkach kwasoopornych, być może działa na układ oksydazy DPN lub TPN, w nieznanym dotychczas miejscu. M. W. F i s c h e r (1) na podstawie badań nad zniesieniem przez różne związki, a w tym i heminę, hamującego działania INH na wzrost szczepu H37Rv, uważa, że INH uszkadza metabolizm porfirynowy prątków kwasoopornych.

W trakcie przygotowania niniejszej pracy do druku ukazała się praca H. P o p e (2), która stwierdziła, że INH w stężeniach około 200 i 2000-krotnie przewyższających dawki bakteriostatyczne obniża wpływ pobudzający benzoanu i salicylanu na oddychanie szczepu H37Rv.

Również ostatnio Z a t m a n, K a p l a n, C o l o w i c k i i C i o t t i (3) wykazali występowanie dwóch rodzajów DPNaz; jedna z nich jest „wrażliwa” na INH, druga zaś, „niewrażliwa”, tworzy w obecności INH i DPN dwunukleotyd, w którym zamiast amidu kwasu nikotynowego występuje INH (analog DPN).

Streszczenie

1. Hydrazyd kwasu izonikotynowego obniża oddychanie *Myc. phlei* endogenne i w obecności glicerolu.

2. Zahamowanie oddychania w obecności substratu występuje przy użyciu mniejszych stężeń.

LITERATURA

1. Fischer M. W.: *Amer. Rev. Tuberc.* **69**, 797, 1954.
2. Pope H.: *Amer. Rev. Tuberc.* **69**, 705, 1954.
3. Zatman L. J., Kaplan N. O., Colowick S. P., Ciotti M. M.: *J. Biol. Chem.* **209**, 453, 467, 1954.

ДЫХАНИЕ ШТАММА *MYCOBACTERIUM PHLEI*. ВЛИЯНИЕ ГИДРАЗИДА ИЗОНИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Резюме

Дыхание штамма *Mycobacterium phlei* задерживается гидразидом изоникотиновой кислоты имеющей концентрацию 10^{-1} м — 3×10^{-1} м без субстрата и концентрацию 10^{-3} м — 10^{-2} м в присутствии м/50 глицероля.

THE INFLUENCE OF ISONICOTINIC ACID HYDRYZIDE ON THE RESPIRATION OF *MYCOBACTERIUM PHLEI*

Summary

The respiration of *Mycobact. phlei* is inhibited by isonicotinic acid hydrazide at a concentration of 10^{-1} M and 3×10^{-1} M in the absence of substrate, at a concentration of 10^{-3} M and 10^{-2} M in the presence of 0,02 M glycerol.

Otrzymano 9.IX.1954

J. NOWORYTKO I M. SARNECKA-KELLER

ZASTOSOWANIE IZATYNY I JEJ POCHODNYCH W CHROMATOGRAFII BIBUŁOWEJ AMINOKWASÓW I PEPTYDÓW

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

Dotychczasowe metody chromatografii bibułowej stosowane dla rozdzielania aminokwasów wykazują liczne braki, utrudniające zastosowanie tego sposobu postępowania do szybkich seryjnych oznaczeń, szczególnie dla potrzeb klinicznych.

Chromatografia jednowymiarowa nie doprowadza do zupełnego rozdziału wszystkich aminokwasów. Aminokwasy posiadające bardzo zbliżone do siebie wartości R_f , w zależności od stężenia, nakładają się częściowo lub niemal całkowicie. W często używanym układzie butanol-kwas octowy- H_2O (4 : 1 : 5) wędrują razem glikokol i seryna oraz metionina i walina. Często obserwuje się, szczególnie przy większych stężeniach, bezpośrednie stykanie się warstw szeregu aminokwasów, np. w wyżej wymienionym układzie prolina-tyrozyna, tryptofan-metionina, feniloalanina-leucyna-izoleucyna-nurleucyna-walina-norwalina-feniloalanina (6). Aminokwasy te rozdzielają się, ale przy barwieniu ninhydryną tworzą jednolite, rozciągnięte smugi, gdyż ninhydryna daje z większością aminokwasów niemal jednakowe purpurowe lub niebieskofioletkowe zabarwienie. Trudność określenia granicy między plamami odpowiadającymi poszczególnym aminokwasom zaznacza się szczególnie w przypadku aminokwasów posiadających wysokie wartości R_f , gdyż aminokwasy te wskutek przebywania dłuższej drogi ulegają znaczniejszemu rozciągnięciu wzdłuż paska niż aminokwasy o niskich wartościach R_f .

To nakładanie się i wzajemne stykanie się warstw aminokwasów uniemożliwia analizę mieszanin cechujących się dużymi stężeniami. Najlepsze rozdzielanie osiąga się przy użyciu mieszaniny aminokwasów zawierającej 10—30 μg każdego składnika w analizowanej objętości mieszaniny (3). Ponieważ jednak w hydrolizatach białek zachodzi zwykle

duża rozpiętość między stężeniami poszczególnych aminokwasów, składniki występujące w większych stężeniach tworzą szerokie, wyraźne smugi, podczas gdy stężenie aminokwasów innych znajduje się jeszcze poniżej granicy czułości ninhydryny stosowanej jako wywoływacz plam. W takich wypadkach konieczne jest zwiększenie ogólnego stężenia analizowanego hydrolizatu, co z kolei pociąga za sobą utworzenie ciągłego łańcucha plam aminokwasów przedstawiającego się jako jednolita fioletowa plama, w której trudno zauważyć drobne różnice odcieni barwy fioletowej spowodowanych poszczególnymi aminokwasami.

Wymienione powyżej trudności ujawniają się jeszcze bardziej wybitnie w toku chromatografii krążkowej. Metoda ta jest co prawda szybsza i wygodniejsza, ale droga przebywana przez aminokwasy jest znacznie krótsza, co doprowadza do jeszcze większego nakładania się warstw poszczególnych aminokwasów i zlewania się ich w jednobarwną plamę po zastosowaniu ninhydryny. Aminokwasy o wysokich wartościach R_f rozdzielają się stosunkowo dobrze, ale z powodu rozprzestrzeniania się na większej powierzchni ich stężenie przypadające na jednostkę powierzchni jest tak małe, że często leży poza granicą czułości ninhydryny jako wywoływacza (6).

Chromatografia dwuwymiarowa przy zastosowaniu dwóch układów rozpuszczalników doprowadza wprawdzie do całkowitego rozdzielenia aminokwasów, ale czas potrzebny na całkowite rozwinięcie chromatogramu jest bardzo długi, a ilość zużywanej bibuły kilkanaście razy większa niż w metodach poprzednio wymienionych. Ogranicza to w znacznym stopniu stosowanie chromatografii dwuwymiarowej w seryjnych rutynowych analizach.

Z powyższego omówienia stosowanych dotychczas odmian chromatografii bibułowej do analizy aminokwasów wynika, że główną trudność stanowi brak wyraźnych różnic barw plam wywołanych ninhydryną. Ponieważ powtarzalność wartości R_f zależy od wielu czynników zewnętrznych i w danym rozpuszczalniku stała jest jedynie kolejność aminokwasów (2), konieczne jest rozwijanie chromatogramów w takich samych warunkach, co nie zawsze jest możliwe do osiągnięcia w słabo wyposażonych laboratoriach. Wartości R_f ulegają zresztą nawet w stałych warunkach pewnym wahaniom (ok. 15%) (2), identyfikacja aminokwasów jest więc szczególnie utrudniona wówczas, gdy występują one łącznie z innymi substancjami również barwiącymi się ninhydryną. Ninhydryna nie jest bowiem odczynnikiem ściśle swoistym dla aminokwasów, daje również barwne reakcje z peptydami, białkami, alifatycznymi pierwszorzędowymi aminami, aminocukrami, aminoalkoholami itd. (2,6).

Głównym celem naszych badań było rozwiązanie powyższych trudności i umożliwienie identyfikacji aminokwasów przy pominięciu długotrwałej i nieekonomicznej chromatografii dwuwymiarowej. W tym celu zastosowaliśmy:

- 1) różnicowe barwienie plam za pomocą różnych odczynników,
- 2) praktyczne wykorzystanie tego sposobu wywoływania plam przez odpowiednie modyfikacje techniki chromatografii krążkowej i jednowymiarowej oraz stosowanie dwóch różnych kolejno używanych rozpuszczalników.

Materiały i odczynniki

- I. Bibuła Whatmana nr 4 i krążki bibuły Whatmana nr 2.
- II. n-Butanol produkcji Głwachimreaktiw, dwukrotnie destylowany i przygotowany do analizy wg przepisu Partridge'a (9).
- III. Fenol p. a., dwukrotnie destylowany i zastosowany wg przepisu Blocka (1).
- IV. Aminokwasy i peptydy f-my F. Hoffmann - La Roche, Light i Pfanstiehl.
- V. Odczynniki używane do wywoływania plam:
 - a) ninhydryna B. D. H. Laboratory Reagent
 - b) p-benzochinon otrzymany syntetycznie (14)
 - c) antrachinon otrzymany syntetycznie (4)
 - d) alloksan f-my E. Merck
 - e) kwas 1,2-naftochinono-4-sulfonowy, sól sodowa B. D. H. Laboratory Reagent
 - f) izatyna otrzymana syntetycznie (8),
 - g) 5-bromo-izatyna
 - h) 5-nitro-izatyna } preparaty pozostałe po prof. L. Marchlew-
 - i) N-etylo-izatyna } skim, otrzymane przez niego syntetycznie.

Badania nad różnicowym barwieniem plam aminokwasów

Oprócz powszechnie używanej ninhydryny spotykamy dotychczas w piśmiennictwie dane dotyczące zastosowania soli sodowej kwasu 1,2-naftochinono-4-sulfonowego (5), alloksanu (7), oraz roztworu KJ w obecności skrobi (12), lub benzydyny w roztworze kwasu octowego (11), po uprzednim przeprowadzeniu aminokwasów w chloroaminopochodne. Dwie ostatnie metody ze względu na konieczność stosowania gazowego chloru są niewygodne i nie były przez nas wykorzystane.

Próby zastosowania dwóch pierwszych wywoływaczy plam doprowadziły nas do poniżej opisanych wyników

1. SÓL SODOWA KWASU 1,2-NAFTOCHINONO-4-SULFONOWEGO

Odczynnik ten stosowany był przez nas w dwojaki sposób: wg G i r i (5) w roztworze acetonowym w wyższej temperaturze, oraz wg M a c e k a (6) w roztworze alkoholowym. Obie metody doprowadzają do powstania w przypadku poszczególnych aminokwasów barw zgodnych z opisem podanym przez G i r i. Szczególnie wyraźnie występuje zabarwienie pomarańczowe z proliną i pomarańczoworóżowe z oksyproliną.

Znamienne jest przy użyciu tego wywoływacza powstawanie barw zdecydowanie różnych z różnymi aminokwasami — ciemnofiołkowa z histydyną, zielona z seryną, treoniną i kwasem glutaminowym, brunatna z tryptofanem i kwasem β -aminomasłowym, jasnoniebieska z kwasem asparaginowym, argininą, lizyną i ornityną. Te własności okazywane przez sól sodową kwasu 1,2-naftochinono-4-sulfonowego jako wywoływacza plam mogą być bardzo użyteczne przy różnicowaniu poszczególnych aminokwasów, z czego niejednokrotnie korzystaliśmy.

Niemniej odczynnik ten wykazuje poważne niedogodności. Czułość soli sodowej kwasu 1,2-naftochinono-4-sulfonowego jako wywoływacza plam aminokwasów jest znacznie mniejsza niż czułość ninhydryny (5). Zaznaczyć również należy, że stosowanie tego odczynnika w acetonie, przy którym plamy aminokwasów muszą być wywoływane przez ogrzewanie z roztworem odczynnika pod chłodnicą zwrotną, jest dosyć niewygodne i wiąże się z pokaźną stratą rozpuszczalnika. Z alkoholowym roztworem barwa występuje już na zimno, ale wówczas czułość reakcji jest jeszcze mniejsza.

2. ALLOKSAN

Stosowaliśmy ten odczynnik wg przepisu L i e b e n a (7), tj. w roztworze wodnym. Pasek bibuły spryskany odczynnikiem suszony był w temperaturze 75°, co pozwalało wodzie użytej jako rozpuszczalnik pozostawać przez długi czas w kontakcie z plamami aminokwasów, powodując rozlewanie się tych plam na większej przestrzeni bibuły.

Wszystkie aminokwasy z wyjątkiem proliny (która nie barwi się z alloksanem) dają czerwone zabarwienie o jednakowym odcieniu, co wyklucza możliwość różnicowania poszczególnych aminokwasów.

Wobec tego, że większość dwuketonów daje w wyższej temperaturze barwne produkty z aminokwasami, podjęliśmy próby z szeregiem innych odczynników, o których w piśmiennictwie nie spotkałyśmy żadnej

wzmianki względnie tylko krótkie notatki. Zbadaliśmy możliwość zastosowania p-benzochinonu, antrachinonu oraz izatyny i jej pochodnych.

Zaznaczamy od razu, że próby zastosowania antrachinonu w nasyconym roztworze alkoholowym zarówno kwaśnym, jak i zasadowym, nie doprowadziły do pozytywnego wyniku.

3. p-BENZOCHINON

Stosowaliśmy 1% roztwór eterowy zawierający 1% kwasu octowego. Po spryskaniu chromatogramu tym roztworem, suszyliśmy bibułę przez kilka minut na powietrzu, a następnie ogrzewaliśmy przez 5 minut w 80°. Barwa występuje po dłuższym czasie również w temperaturze pokojowej, ogrzanie przyspiesza jednak proces barwienia.

A m i n o k w a s y: glikokol, seryna, alanina, walina, arginina, prolina, oksy-prolina, treonina, feniloalanina, metionina, leucyna, izoleucyna, norleucyna, tyrozyna, norwalina, histydyna, lizyna, kwas glutaminowy i kwas asparaginowy dają zabarwienie brunatnofiołkowe lub brunatne. Cysteina zabarwia się oliwkowozielono, tryptofan jasnobrunatno.

Przy zastosowaniu p-benzochinonu znamienne jest występowanie intensywnego zabarwienia z proliną i oksyproliną, a więc tymi aminokwasami, wobec których czułość odczynu z ninhydriną jest niewystarczająca, a które z alloksanem nie barwią się zupełnie. Ponadto odczyn barwny z p-benzochinonem daje tylko cysteina, podczas gdy cystyna nie daje zabarwienia, przynajmniej w granicach stosowanych przez nas stężeń.

Znaczna część aminokwasów przy zastosowaniu benzochinonu zabarwia się identycznie, co ogranicza możliwość zastosowania tego odczynnika do różnicowania aminokwasów. Granica czułości odczynu z p-benzochinonem dla większości aminokwasów odpowiada stężeniu około 0,3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, co świadczy, że odczyn ten cechuje się czułością taką samą lub nieco mniejszą od czułości odczynu z ninhydriną. Poważną niedogodnością odczynu z p-benzochinonem jest zabarwienie się tła na kolor jasnobrunatny, co utrudnia wykazywanie plam odpowiadających aminokwasom występującym w małych stężeniach.

4. IZATYNA I JEJ POCHODNE

Izatyna była już dawno stosowana jako odczynnik do wykrywania i ilościowego oznaczania proliny (1), a jako odczynnik używany do identyfikacji innych aminokwasów była omawiana przez Saifera i Oreskesa (13). Autorzy ci stosowali 0,2% roztwór izatyny w acetonie zawierającym 4% CH_3COOH . Po zanurzeniu chromatogramu w powyższym

roztworze suszyli go kilka minut na powietrzu, a następnie ogrzewali przez 10 min w 100°. W publikacji swej opisują barwy występujące z 12 aminokwasami, twierdząc przy tym, że reszta aminokwasów reaguje z izatyną dopiero w stężeniach większych niż 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Nasze próby zastosowania izatyny wkrótce doprowadziły nas do wniosku, że związek ten jest szczególnie dogodnym odczynnikiem dla identyfikacji aminokwasów. Stosowaliśmy technikę barwienia według *S a i f e r a i O r e s k e s a*, ogrzewając chromatogramy przez 10 minut w 110°.

Wyniki uzyskane w toku badania 22 aminokwasów, szeregu peptydów i innych substancji dających zabarwienie z ninhydriną podaje tablica 1.

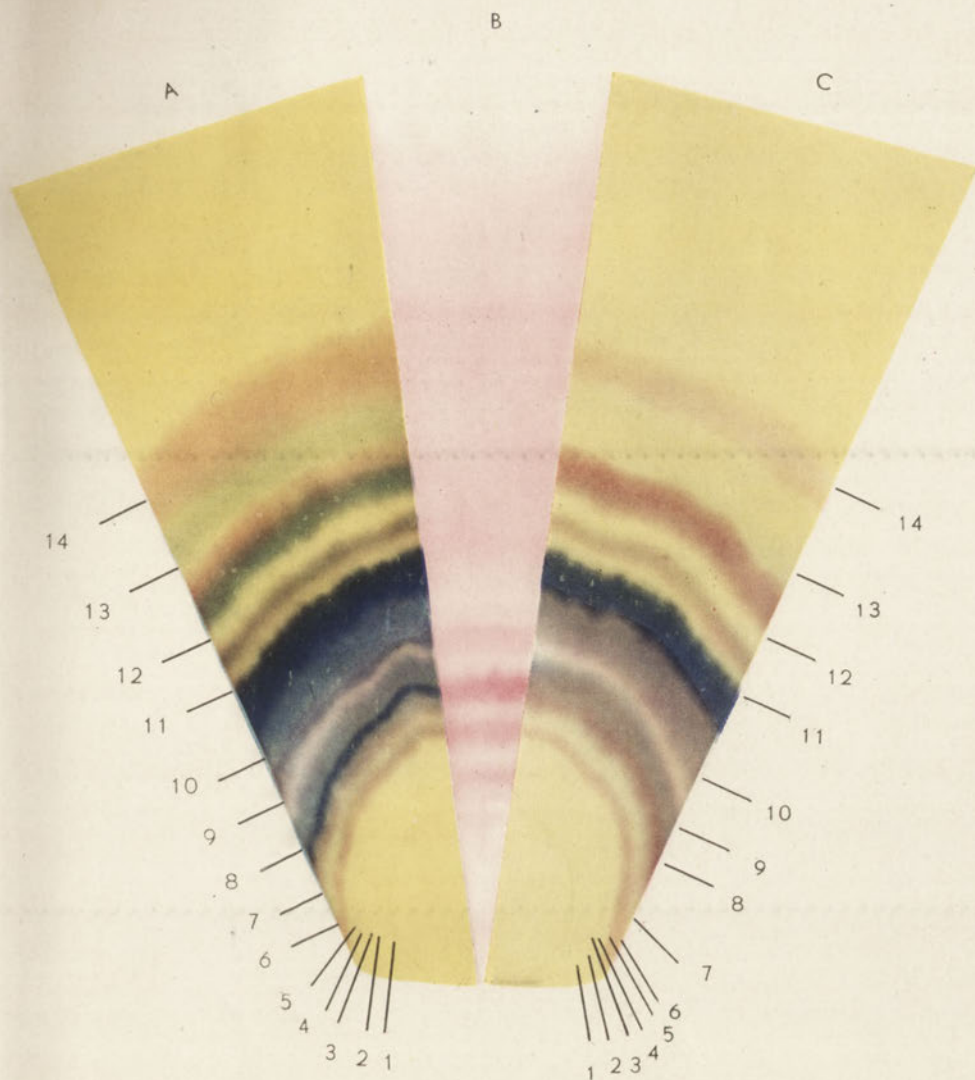
Charakter barw określony słowami powyższej tablicy nie oddaje wyraźnych różnic odcieni charakterystycznych dla poszczególnych aminokwasów. Różnice te dają się jednak łatwo stwierdzić przy bezpośrednim porównaniu odpowiednich plam aminokwasowych wybarwionych izatyną. Poza tym w przypadku niektórych aminokwasów odcienie te zmieniają się zależnie od stężenia aminokwasów, co pozwala przy pewnej wprawie na wnioskowanie o przybliżonym stężeniu danego aminokwasu.

Jak wynika z danych tabl. 1 czułość odczynu z izatyną jest taka, jak czułość odczynu z ninhydriną, a w niektórych wypadkach nawet większa, np. dla histydyny, proliny, tyrozyny (dane co do czułości odczynu z ninhydriną wg *M a c e k a* (6)).

Szczególnie cenną zaletą izatyny jest dawanie zabarwień odmiennych z tymi aminokwasami, które mają bardzo zbliżone wartości R_f , a z ninhydriną dają identycznie zabarwione produkty, np. norwalina-walina (układ: butanol- $\text{CH}_3\text{COOH-H}_2\text{O}$), prolina-feniloalanina, arginina (układ: fenol- NH_3). Poza tym izatyna reaguje z pierwszorzędowymi aminami alifatycznymi i z glikozaminą dopiero przy stężeniach ok. 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, a więc jest mniej czuła w odniesieniu do tych substancji niż ninhydryna, co stanowi dużą zaletę, gdyż wyklucza pomyłki w identyfikowaniu aminokwasów w obecności wyżej wymienionych substancji. Zabarwienie z peptydami daje w tych samych stężeniach, w jakich daje je ninhydryna.

Wadą izatyny jest szybkie znikanie barw, ale trudność tę można ominąć zanurzając chromatogramy w gorącej parafinie, co pozwala na przechowywanie chromatogramu przez dłuższy czas, a nawet wpływa korzystnie na wzmocnienie intensywności plam.

Zachęcone powodzeniem zbadaliśmy zastosowanie szeregu pochodnych izatyny do wywoływania plam aminokwasowych. Jak tego nale-



Chromatogram hydrolizatu edestynu

A – sektor barwiony izatyną

C – sektor barwiony nitroizatyną

- 1) cystyna
- 2) lizyna
- 3) histydyna
- 4) arginina
- 5) kwas asparaginowy
- 6) glikokol
- 7) kwas glutaminowy
- 8) alanina
- 9) prolina
- 10) tyrozyna
- 11) metionina
- 12) walina
- 13) fenylalanina
- 14) leucyna

- 1) cystyna
- 2) lizyna
- 3) histydyna
- 4) arginina
- 5) kwas asparaginowy
- 6) glikokol
- 7) kwas plutaminowy
- 8) alanina
- 9) prolina
- 10) tyrozyna
- 11) metionina
- 12) walina
- 13) fenylalanina
- 14) leucyna

B – sektor barwiony ninhydryną



Tablica 1
Barwy plam aminokwasów przy użyciu izatyny

Substancja	Barwa	Czułość w $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
cysteina	karminowofioletkowa	4
cystyna	brunatna	3
lizyna	niebieskopomarańczowa	1
histydyna	zielonofioletkowa	3
arginina	karminowoniebieska	0,5
kwas asparaginowy	niebieska ciemna	0,8
seryna	brązowofioletkowa	5
glikokol	brunatnoróżowa	3
oksyprolina	szarofioletkowa	1
kwas glutaminowy	zielonofioletkowa	0,5
treonina	cynobrowobrązowa	1
alanina	błękitna ciemna	0,2
prolina	granatowa	0,1
tyrozyna	niebieskoszara	0,3
tryptofan	pomarańczowobrązowa	0,8
metionina	szarofioletkowa	0,5
walina	karminowa	0,2
norwalina	fioletkowiebieska	0,5
feniloalanina	błękitnozielona	3
izoleucyna	karminowa	0,3
leucyna	karmiowiebieska	0,5
norleucyna	niebieska	0,8
glicyl-l-tryptofan	brązowofioletkowa	10
d-leucyl-l-tyrozyna	różowa	5
glicyl-dl-leucyna	różowa	5
d-leucyl-glicylglicyna	różowa	5
l-leucyl-glicyna	różowa	5
metyloaminy chlorowoderek	brązowopomarańczowa	50
etyloaminy chlorowoderek	zielonoszara	50
amyoamina	zielonoszara	50
n-heksyloamina	nie barwi się	przy 50
glikozamina	różowopomarańczowa	50

U w a g a:

Barwy zestawione w tablicy 1, 2, 3 odnoszą się do stężeń substancji około $30\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Przy stężeniach mniejszych barwa zmienia się przyjmując najczęściej jeden z odcieni składowych, np. tryptofan — barwa pomarańczowa, tyrozyna — szara.

żało się spodziewać, pochodne izatyny z zablokowanymi grupami ketonowymi, jak np. semikarbazon, tiosemikarbazon i oksym nie reagują z aminokwasami przy zastosowaniu takiego samego sposobu postępowania, jakie dawało wynik pozytywny przy użyciu izatyny. N-alkilo-

-pochodne izatyny wykazują mniejszą czułość jako wywoływacze aminokwasów. N-etyloizatyna dawała wprawdzie zabarwienia o nieco odmiennych odcieniach w porównaniu z wolną izatyną, ale dolna granica czułości dla większości aminokwasów obracała się w granicach 1—5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, dla peptydów 10—15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Czułość odczynu z izatyną i innymi stosowanymi przez nas wywoływaczami wyznaczaliśmy w następujący sposób: sporządziliśmy roztwory zawierające 10, 50, 100, 500, 1000,

Tablica 2
Barwy plam aminokwasów przy użyciu 5-bromoizatyny

Substancja	Barwa	Czułość w $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
cysteina	różowofioletkowa	1
cystyna	brunatna jasna	7
lizyna	różowopomarańczowa	1
histydyna	różowofioletkowa	1
arginina	różowobrunatna	1
kwas asparaginowy	niebieskofioletkowa	0,8
seryna	brązowofioletkowa	0,3
glikokol	różowa jasna	0,8
oksyprolina	różowofioletkowa	0,8
kwas glutaminowy	fioletkowopomarańczowa	0,5
treonina	różowopomarańczowa	1
alanina	niebieskofioletkowa	0,5
prolina	granatowa	0,1
tyrozyna	szarofioletkowa	0,8
tryptofan	fioletkowopomarańczowa	0,3
metionina	różowofioletkowa	0,5
walina	różowa ciemna	0,3
norwalina	różowofioletkowa	0,3
feniloalanina	fioletkowszara	0,8
izoleucyna	różowa ciemna	0,5
leucyna	różowofioletkowa	0,3
norleucyna	fioletkoloróżowa	0,5
glicyl-l-tryptofan	brązowopomarańczowa	10
d-leucyl-l-tyrozyna	różowofioletkowa	5
glicyl-dl-leucyna	różowa	5
d-leucyl-glicylglicyna	różowa	3
l-leucyl-glicyna	różowa	5
metryloaminy chlorowodorok	różowa jasna	50
etyloaminy chlorowodorok	różowa jasna	50
amyoamina	nie barwi się	przy 50
n-heksyloamina	nie barwi się	przy 50
glikozamina	różowa	10

5000 μg badanej substancji w ml. Mikropipetką nakładaliśmy po 0,01 ml każdego roztworu na bibułę Whatmana nr 4 i po wysuszeniu barwiłyśmy odpowiednim wywoływaczem. Powierzchnię barwnych plam mierzyłyśmy planimetrem. Znając ilość naniesionej substancji oraz wielkość powierzchni plamy obliczałyśmy ilość tej substancji przypadającą na 1 cm^2 . Jako dolną granicę czułości przyjęłyśmy to jednostkowe stężenie, przy którym barwa była jeszcze dobrze widoczna.

Z innych pochodnych izatyny szczególnie interesująca okazała się 5-bromoizatyna i 5-nitroizatyna.

5-bromoizatyna stosowana w ten sam sposób, w jaki była stosowana izatyna, daje zabarwienia zasadniczo podobne do uzyskanych przy pomocy izatyny (tabl. 2), ale odcienie barw przesunięte są ku czerwieni, co w niektórych wypadkach jest korzystne, zwłaszcza przy różnicowaniu mieszanin: alanina-prolina-tyrozyna (układ: butanol- $\text{CH}_3\text{COOH-H}_2\text{O}$) prolina-feniloalanina (układ: fenol- NH_3). Czułość odczynu obraca się w tym samym rzędzie wielkości, jaki odpowiada czułości odczynu z izatyną.

5-nitroizatyna stosowana była w ten sam sposób, w jaki używałyśmy poprzednio omówione wywoływacze. Okazało się, że grupa nitrowa nitroizatyny powoduje przesunięcie się barw ku części fioletowej widma, co wpływa dodatnio przy identyfikacji np. norwaliny-feniloalaniny (układ: butanol- CH_3COOH), oraz wzmaga czułość barwnego odczynu (tabl. 3).

Jak wynika z powyższego zestawienia 5-nitroizatyna powoduje dużą rozpiętość barw z różnymi aminokwasami, co łącznie z czułością tego odczynnika, większą w porównaniu z izatyną czy bromoizatyną, pozwala przy użyciu tego wywoływacza na wygodne zróżnicowanie mieszaniny aminokwasów. 5-nitroizatyna wybarwia plamy aminokwasowe szczególnie wyraźnie na chromatogramach rozwijanych najczęściej stosowanymi układami rozpuszczalników, jak np. butanol- $\text{CH}_3\text{COOH-H}_2\text{O}$ i fenol- NH_3 , oraz daje z aminokwasami połączenia, których barwa jest trwalsza w porównaniu z barwami wywołanymi przez izatynę lub bromoizatynę.

Praktyczne wykorzystanie różnicowego barwienia przy odpowiedniej modyfikacji techniki chromatograficznej

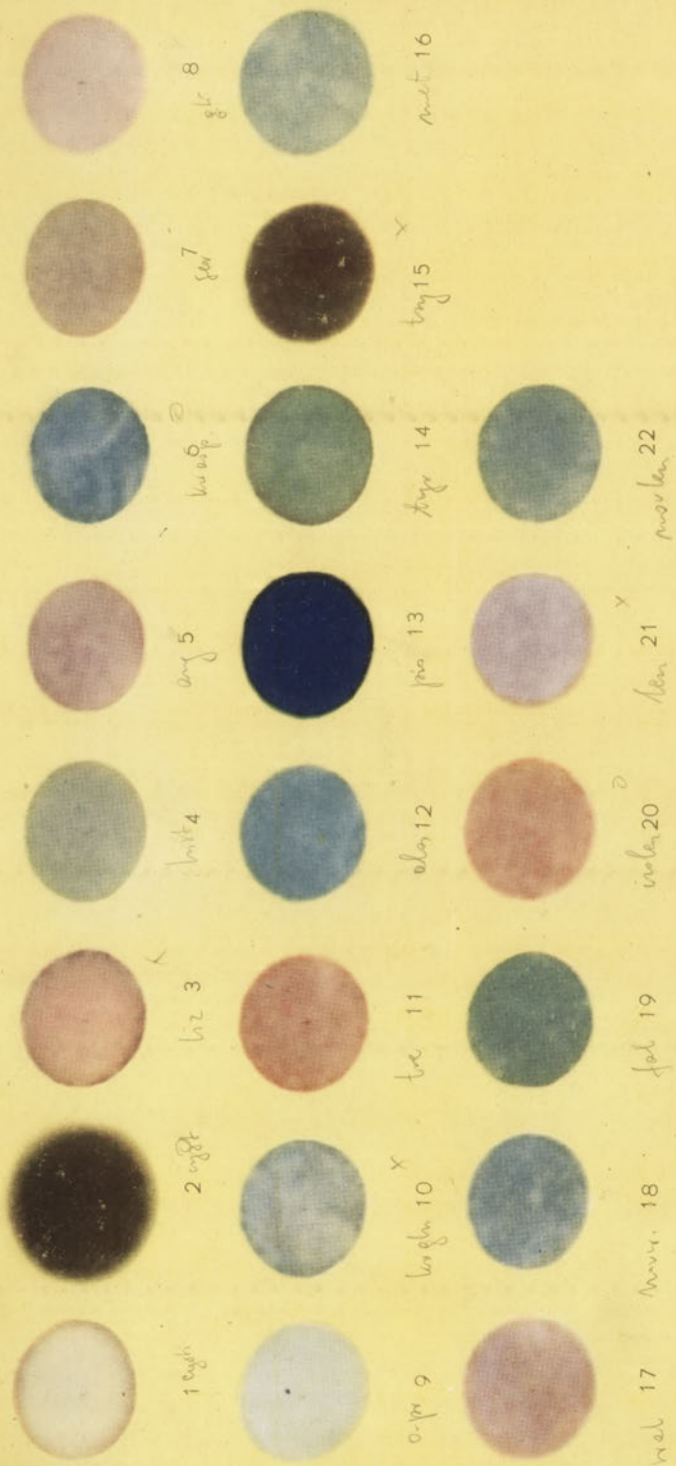
Jako wstępną orientacyjną metodę stosowałyśmy chromatografię krążkową przeprowadzaną wg techniki R a o (10). W wielu wypadkach zastosowanie chromatografii krążkowej okazało się zupełnie wystarczające dla przeprowadzenia całkowitej analizy, jeżeli zwiększono drogę przebywaną przez aminokwasy przykładając knot doprowadzający roz-

Tablica 3
Barwy plam aminokwasów przy użyciu 5-nitroizatyny

Substancja	Barwa	Czułość w $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
cysteina	karminowofioletkowa	0,8
cystyna	brunatna	3
lizyna	fioletkowopomarańczowa	0,8
histydyna	fioletkowiełona	1
arginina	karminowofioletkowa	0,8
kwas asparaginowy	niebieska	0,5
seryna	brązowocynobrowa	0,3
glikokol	różowa	0,5
oksyprolina	fioletkoróżowa	0,5
kwas glutaminowy	karminowofioletkowa	0,3
treonina	cynobrowopomarańczowa	0,2
alanina	niebieskoszara	0,1
prolina	granatowa	0,1
tyrozyna	fioletkowszara	0,3
tryptofan	pomarańczowobrązowa	0,3
metionina	fioletkoróżowa	0,3
walina	różowa ciemna	0,1
norwalina	fioletkowa	0,5
feniloalanina	niebieskoszara	0,8
izoleucyna	różowa ciemna	0,5
leucyna	różowofioletkowa	0,2
norleucyna	fioletkowa	0,3
glicyl-l-tryptofan	brązowopomarańczowa	10
d-leucyl-l-tyrozyna	karminowofioletkowa	3
glicyl-dl-leucyna	karminowa jasna	3
d-leucyl-glicylglicyna	karminowa	3
l-leucyl-glicyna	karminowa	1
metryloaminy chlorowodrek	różowa jasna	5
etyloaminy chlorowodrek	fioletkoróżowa jasna	10
amyloamina	różowa jasna	30
n-heksyloamina	nie barwi się	przy 30
glikozamina	pomarańczoworóżowa	10

puszczalnik nie do środka krążka, lecz do jego obwodu, oraz gdy zastosowano barwienie trzema różnymi wywołującymi (izatyna, bromoizatyna i nitroizatyna), trzech sektorów wyciętych z tego samego krążka.

W celu dokładniejszego rozdzielania mieszaniny stosowaliśmy chromatografię jednowymiarową, wstępującą na paskach bibuły długości 40 cm o szerokości dolnej 2 cm a górnej 8 cm. Tego rodzaju kształt pa-



Plamy aminokwasów barwione izantyną. Kolejność ułożenia aminokwasów według wartości Rf uzyskanych w układzie butanol-kwas octowy-woda

sków okazał się dogodniejszy dla rozdziału aminokwasów o wysokich wartościach R_f . Aminokwasy te nie ulegały wówczas rozciąganiu wzdłuż paska i dawały plamy takiej samej szerokości, jak aminokwasy o niskich wartościach R_f .

Często chromatografia jednowymiarowa nie wносиła nic nowego, lecz jedynie potwierdzała wynik uzyskany przy zastosowaniu chromatografii krążkowej.

W układzie butanol-kwas octowy-woda (4:1:5) wyznaczyliśmy następującą kolejność aminokwasów:

- | | |
|----------------------|-------------------|
| 1. Cysteina | 12. Alanina |
| 2. Cystyna | 13. Prolina |
| 3. Lizyna | 14. Tyrozyna |
| 4. Histydyna | 15. Tryptofan |
| 5. Arginina | 16. Metionina |
| 6. Kwas asparaginowy | 17. Walina |
| 7. Seryna | 18. Norwalina |
| 8. Glikokol | 19. Feniloalanina |
| 9. Oksyprolina | 20. Izoleucyna |
| 10. Kwas glutaminowy | 21. Leucyna |
| 11. Treonina | 22. Norleucyna |

Szczególnie dogodne okazało się zastosowanie kolejno następujących po sobie dwóch rozpuszczalników, mianowicie: 1) fenol w atmosferze par NH_3 i HCN , a następnie 2) n-butanol- $\text{CH}_3\text{COOH-H}_2\text{O}$ (4:1:5), przy czym stosunek dróg przebywanych przez te rozpuszczalniki wynosił 1/3:1 długości paska. W tych warunkach aminokwasy posiadające podobne wartości R_f w układzie butanol- $\text{CH}_3\text{COOH-H}_2\text{O}$, jak np. seryna i glikokol, rozdzielają się znacznie lepiej, co w połączeniu z zastosowaniem różnicowego barwienia pozwala na dokładną ich identyfikację.

Po rozwinięciu chromatogramu w sposób powyżej opisany krążki bądź paski bibuły suszono celem dokładnego usunięcia rozpuszczalników, a następnie rozcinano na trzy równoległe części, na których położenie poszczególnych aminokwasów wykazywano posługując się trzema różnymi odczynnikami — izatyną, bromoizatyną i nitroizatyną.

Przykładem zastosowania powyżej opisanych modyfikacji technicznych jest analiza hydrolizatu edestyny, której wyniki podane są na załączonej barwnej tablicy. Nadmienić przy tym należy, że cała analiza trwała w tym wypadku zaledwie 10 godzin.

Omówienie wyników

Na podstawie wyżej opisanych doświadczeń dochodzimy do wniosku, że izatyna, a szczególnie jej pochodne — 5-bromo- i 5-nitro-izatyna okazują zdecydowaną wyższość nad ninhydryną oraz innymi dotychczas stosowanymi wywoływaczami plam aminokwasów. Czulość bromo- i nitro-izatyny leży w tym samym rzędzie wielkości, w jakim obraca się czulość ninhydryny, a w przypadkach niektórych aminokwasów, jak np. feniloalanina, histydyna i lizyna czulość jest znacznie większa, nie wspominając już o prolinie, dla której izatyna i jej pochodne są wręcz swoistymi odczynnikami. Natomiast reakcja izatyny i jej pochodnych z aminami alifatycznymi oraz aminocukrami (glikozamina) zachodzi w stężeniach tych substancji o wiele większych, niż te, które powodują wyraźny odczyn z ninhydryną. Czulość izatyny i jej pochodnych wobec peptydów jest równa czulości ninhydryny.

Szczególnie cenną zaletą izatyny jest różnorodność barw i odcieni, jakie odczynnik ten daje z poszczególnymi aminokwasami. Wprawdzie leucyna i arginina, metionina i kwas glutaminowy oraz feniloalanina i alanina dają zabarwienie prawie identyczne, ale znaczne różnice R_f tych par aminokwasów uniemożliwiają pomyłkę w odczytywaniu zabarwionego chromatogramu. Seryna i histydyna oraz tyrozyna i norleucyna dają z izatyną zabarwienia bardzo zbliżone do siebie, ale o wyraźnie odmiennych odcieniach dających się łatwo odróżnić.

Ważne jest jednak to, że w tych przypadkach, gdy dwa aminokwasy dają prawie identyczne zabarwienie z izatyną, ich barwa z nitro- lub bromo-izatyną jest wyraźnie odmienna, np. tyrozyna i norwalina, alanina i metionina. Równoczesne barwienie trzech równoległe wyciętych skrawków jednokierunkowego chromatogramu tymi trzema odczynnikami pozwala wykluczyć pomyłkę w identyfikacji aminokwasów.

Najcenniejszą zaletą izatyny i jej pochodnych jest to, że aminokwasy o bardzo zbliżonym R_f barwią się tym odczynnikiem odmiennie. W tych przypadkach, gdy przy użyciu ninhydryny uzyskuje się w chromatogramie jednolitą barwną smugę, izatyna lub nitroizatyna pozwalają w tej smudze wyróżnić odmiennie zabarwione odcinki odpowiadające poszczególnym wędrującym razem aminokwasom. Odnosi się to np. do seryny i glikokolu, metioniny i waliny oraz trzech izomerów leucyny. W przypadku niezbyt złożonych mieszanin aminokwasów zastosowanie tylko jednego wywoływacza izatynowego może od razu wyjaśnić skład mieszaniny. Jeżeli jednak mieszanina obejmuje wiele aminokwasów, jak to np. ma miejsce w przypadku hydrolizatów białka, do jednoznacznego wyniku doprowadza rozcięcie rozwiniętego jednowymiarowego chromatogramu na 3 równoległe podłużne paski i zabarwienie każdego

z tych pasków odmiennym wywoływaczem izatynowym. Porównanie w ten sposób wybarwionych trzech chromatogramów pozwala rozwiązać wątpliwości, których nie może nigdy rozstrzygnąć ocena jednowymiarowego chromatogramu wybarwionego ninhydriną.

Do szczególnie korzystnych wyników doprowadziło nas różnicowe barwienie wywoływaczami izatynowymi przy użyciu dwóch kolejno po sobie stosowanych układów rozpuszczalników. Przy tym sposobie postępowania rozpoczynamy rozwijanie chromatogramu fenolem w atmosferze par NH_3 i HCN i kontynuujemy butanolem + H_2O + CH_3COOH . Posługując się tym zabiegiem można rozsunąć plamy tych aminokwasów, które w samym butanolu wędrują razem. Dotyczy to szczególnie seryny i glikolu oraz metioniny i waliny.

Izatyna i jej pochodne jeszcze pod jednym względem górują nad ninhydriną. Są to związki tanie, łatwo dające się otrzymać syntetycznie, nawet w skromnie wyposażonym laboratorium chemicznym.

Na podstawie powyższych danych twierdzimy, że izatyna i jej nitro- i bromo-pochodna mogą nie tylko wytrzymać konkurencję z ninhydriną jako wywoływaczem plam aminokwasowych, ale że zastosowanie ich upraszcza znacznie chromatograficzną analizę aminokwasów, sprowadzając ją wyłącznie do bardziej ekonomicznego i krócej trwającego jednowymiarowego postępowania.

Streszczenie

Badano zastosowanie kwasu 1,2-naftochinono-4-sulfonowego, aloksanu, p-benzochinonu i izatyny oraz jej nitro- i bromo-pochodnej jako wywoływaczy plam aminokwasów w chromatografii bibułowej. Spośród wszystkich związków izatyna i jej pochodne okazały się szczególnie cennymi odczynnikami, gdyż dają bardzo szeroką rozpiętość barw z poszczególnymi aminokwasami. Już przy zastosowaniu wyłącznie tylko izatyny można wygodnie odróżnić plamy aminokwasów, cechujących się bardzo zbliżonym R_f , co pozwala bez trudności ocenić skład mieszaniny aminokwasów przy zastosowaniu chromatografii krążkowej lub jednowymiarowej. Czułość, dokładność postępowania można zwiększyć przez odpowiednie, równoczesne użycie izatyny, 5-bromoizatyny i 5-nitroizatyny w jednym i tym samym chromatogramie, oraz przez kolejno następujące po sobie zastosowanie 2 różnych rozpuszczalników, jako fazy ruchomej w rozwijaniu jednowymiarowego chromatogramu. Podano opis postępowania, pozwalający przy użyciu powyższych modyfikacji przeprowadzić całkowitą analizę mieszaniny aminokwasów przy po-

мocy chromatografii jednowymiarowej, w bardzo krótkim okresie czasu i ekonomicznym wykorzystaniu materiału.

Za koncepcję zagadnienia oraz teoretyczne wskazówki składamy serdeczne podziękowania Prof. Dr. B. Skarżyńskiemu.

LITERATURA

1. Block R. J.: *Anal. Chem.* **22**, 1327, 1950.
2. Boulanger P., i Biserte G.: *Exposés annuels de biochim. méd.* **11**, 53, 1950.
3. Cramer F.: *Papierchromatographie* Chem. G, m, b, H, Weinheim, 1952.
4. Frietzsch: *J. pr.* **106**, 287, 1923.
5. Giri K. V. i Nagabhushanam A.: *Naturwiss.* **39**, 548, 1952.
6. Hais I. M. i Macek K.: *Papirova chromatografie* Čes. Akad. Véd., Praha, 1954
7. Lieben F. i Edel E.: *Biochem. Zeit.* **244**, 402, 1932.
8. Marvel C. S., Hiers G. S.: *Org. Synth. coll.* vol. I, **327**, J. Willey & Sons, New York, 1948.
9. Partridge S. M.: *Biochem. J.*, **42**, 238, 1948.
10. Rao M. V. K.: *Experientia*, **9**, 151, 1953.
11. Reindel F. i Hoppe W.: *Naturwiss.* **40**, 221, 1953.
12. Rydan H. N. i Smith P. W. G.: *Nature*, **169**, 922, 1952.
13. Saifer A. i Oreskes I.: *Science*, **119**, 124, 1954.
14. Willstätter R. i Dorogi: **42**, 2155, 2167, 1903.

ПРИМЕНЕНИЕ ИЗАТИНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ В КАЧЕСТВЕ ПРОЯВИТЕЛЯ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПЕПТИДНЫХ ПЯТЕН НА ХРОМАТОГРАММЕ

Резюме

Исследовано применение 1,2 нафтохин-4-сульфо-кислоты, аллоксана, п-бензохинона, изотина и его нитро и бромпроизводных в качестве проявителя аминокислотных пятен на хроматограмме. Среди всех соединений самыми лучшими оказались изатин и его производные, т. к. образуют с отдельными аминокислотами резкое разделение цветов. Применяя исключительно изатин, можно отличить пятна аминокислот имеющих очень близкие величины R_f , благодаря чему можно без труда определить аминокислотный состав смеси, применяя метод круговой или одномерной хроматографии. Можно увеличить чувствительность метода употребляя одновременно изатин, 5-бромизатин и 5 нитроизатин на одной и той же хроматограмме, а также путем последовательного применения двух разных растворителей в качестве подвижной фазы при одномерном хроматографировании. По этому методу с соответствующими модификациями можно провести в течении короткого времени полный анализ аминокислотной смеси.

THE USE OF ISATIN AND ITS DERIVATIVES IN PAPER CHROMATOGRAPHY
OF AMINO-ACIDS AND PEPTIDES

S u m m a r y

A study has been made of the application of 1,2-naphthoquinone-4-sulfonic acid, alloxan, p-benzoquinone and isatin as well as its nitro- and bromo-derivatives as developing agents for amino-acid spots in paper chromatography. Of all these compounds, isatin and its derivatives proved to be the most useful, giving welldefined coloured spots for individual amino-acids. The use of isatin alone makes it possible to readily distinguish amino-acids with very close R_f values, so that one may, without difficulty, evaluate the composition of an amino-acid mixture by circular or one-dimensional chromatography. The sensitivity and accuracy may be increased through the suitable and simultaneous use of isatin, 5-bromo-isatin and 5-nitro-isatin on one and the same chromatogram, as well as by the use, one after the other, of two different solvent systems on a one-dimensional chromatogram. A description of the method is presented, which makes it possible to carry out a complete analysis of a mixture of amino-acids by one-dimensional chromatography within a short space of time and economical use of material.

We express our heartfelt thanks to Prof. dr B. Skarżyński for suggesting this work and for his constant advice.

Otrzymano 4.XI.1954

ANALYSIS OF THE ...

The study has been made of the application of ...

We express our thanks to ...

REFERENCES

ANDRZEJ MORAWIECKI

HAMOWANIE TRANSFORYLAZY FOSFOPIROGRONOWEJ PRZEZ
ADENOZYNOTRÓJFOSFORAN I PIROFOSFORAN

(Tymczasowe doniesienie)

Zakład Chemii Fizjologicznej Akademii Med. we Wrocławiu

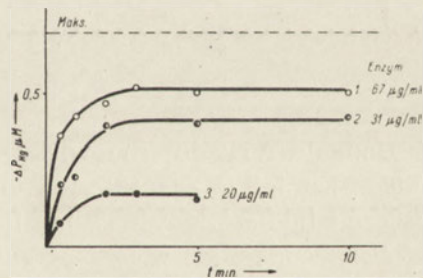
Kierownik Zakładu: Prof. Dr. T. Baranowski

Podczas badań nad transfosforylazą fosfopirogronową z mięśnia królika, która katalizuje reakcję: kw. enolofosfopirogronowy + ADP → kw. pirogronowy + ATP¹⁾, stwierdziłem, że przebieg tej reakcji w czasie jest szczególny. Reakcja nie osiąga stanu równowagi, która przesunięta jest silnie na stronę prawą ($K = 1650$ wg. Meyerhofa (1)), ale zatrzymuje się na pewnym poziomie zależnym od stężenia enzymu (Rys. 1). Przy większych stężeniach enzymu przereagowuje większa ilość substratów. Prawdziwy stan równowagi można osiągnąć w tych warunkach jedynie przy pomocy dużych ilości transfosforylasy.

Tego rodzaju przebieg reakcji można wytłumaczyć przyjmując, że katalizujący ją enzym inaktywuje się w miarę postępu reakcji, aż do całkowitego unieczynnienia. W r.

1949 Meyerhof w cytowanej wyżej pracy (1) zamieścił wzmiankę że: „...ATP hamuje reakcję fosfopirogronianu z ADP...” nie badając jednak bliżej tego efektu. Spostrzeżenie to pozostało bez echa w literaturze biochemicznej.

Przytoczone poniżej doświadczenia wskazują, że zaobserwowane nieprawidłowości przebiegu transfosforylacji są spowodowane hamowaniem transfosforylasy fosfopirogronowej



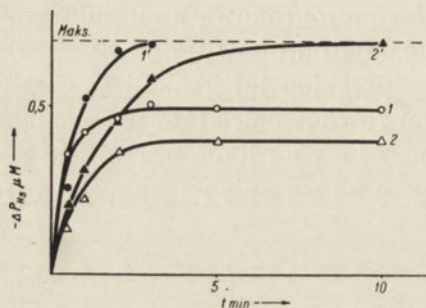
Rys. 1

¹⁾ ADP = kw. adenosynodwufosforowy.
ATP = kw. adenosynotrójfosforowy.

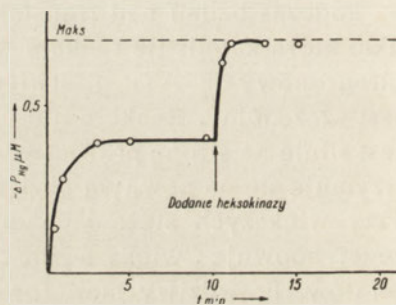
przez powstający w czasie reakcji ATP oraz że efekt ten może mieć znaczenie w fizjologicznym procesie glikolizy.

Doświadczenia wykonano przy użyciu transfosforylasy z mięśnia królika, oczyszczonej przez wytrącanie acetonem i frakcjonowanie siarczanem amonu. Preparat był jednorodny elektroforetycznie w moderatorze fosforanowym 0,1 M, o $\text{pH} = 7,70$. Szczegółowy sposób otrzymywania enzymu będzie podany później. Środowisko reakcji zawierało: kwas fosfopirogronowy, ADP, MgSO_4 , KCl, KCN, NaHCO_3 , oraz transfosforylaza i ew. glukozę, heksokinazę, lub ATP. Miarą przebiegu reakcji było znikanie kwasu fosfopirogronowego, który oznaczano przez katalityczne odszczepianie fosforanu, octanem rtęci.

Gdy reakcję przeprowadzano w takich warunkach, aby powstający ATP był natychmiast usuwany, co osiągnięto dodając do środowiska nadmiar glukozy i heksokinazy, transfosforylacja przebiegała do końca tj. do wyczerpania się kw. fosfopirogronowego (Rys. 2 i 3).



Rys. 2



Rys. 3

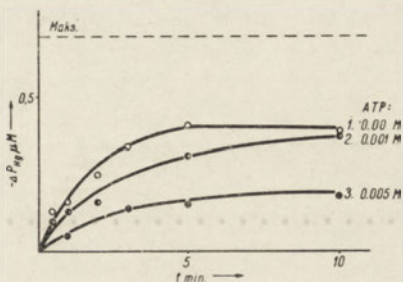
Dodanie ATP do środowiska reakcji w stężeniach rzędu 0,001 M — 0,005M zmniejsza znacznie jej początkową szybkość; hamowanie to jest jeszcze silniejsze, gdy ATP pre-inkubować przez 5 min z enzymem. Jednakże nie udaje się w tych warunkach całkowicie unieczynnić enzymu. Widać to z rys. 4. Gdy reakcja przebiega bez dodania ATP, enzym ulega całkowitemu zahamowaniu po wytworzeniu 0,4 μM ATP/ml, a więc roztworu $4 \cdot 10^{-4}$ M; natomiast dodany ATP, nawet w stężeniu $5 \cdot 10^{-3}$ M, nie hamuje całkowicie reakcji. Być może, że ATP powstający w czasie transfosforylacji jest silniej lub inaczej związany z enzymem. ²⁾

Pirofosforan ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) w stężeniu 0,001 M wywiera podobne działanie hamujące jak ATP. Natomiast kwas adenilowy i pirogronowy w tych samych stężeniach nie wpływają (w granicach dokładności oznaczeń) na transfosforylację.

²⁾ Możliwe są też różnice w budowie ATP, związanego z białkiem, w porównaniu z ATP otrzymanym preparatywnie.

Fakty te wskazują na to, że wiązanie się ADP z transfosforylaza fosfopirogronową odbywa się poprzez resztę pirofosforanową.

Hamowanie transfosforylasy przez ATP może mieć znaczenie w regulacji glikolizy w zależności od stanu energetycznego ustroju. Jak widać bowiem, obecność wolnego ATP w stężeniu 0,005 M (tj. ok. 250 mg% — a więc rzędu zawartości ATP w mięśniu) zmniejsza początkową szybkość transfosforylacji o kilkadziesiąt % (Rys. 4). W ten sposób przesunięcie stosunku ATP/ADP w tkance na korzyść ATP (np. na skutek reakcji utlenienia) mogłoby wpłynąć hamująco na całość glikolizy. Hamujący wpływ ATP na glikolizę w rozcierniach mózgowych był już w pewnych warunkach obserwowany (2).



Rys. 4

Szczegółowa praca będzie opublikowana później.

S t r e s z c z e n i e

Zbadano hamowanie transfosforylasy fosfopirogronowej przez ATP i pirofosforan.

Nagromadzenie się ATP podczas transfosforylacji może doprowadzić do całkowitego unieczynnienia enzymu; aktywność jego można przywrócić usuwając ATP. Efekt ten może mieć znaczenie w regulacji przebiegu glikolizy.

Jest prawdopodobne, że wiązanie się ATP z transfosforylaza fosfopirogronową odbywa się poprzez grupę pirofosforanową.

LITERATURA

1. O. Meyerhof, P. Oesper, *J. Biol. Chem.* **179**, 1371, (1949).
2. H. Keller, *Z. f. physiol. Chem.* **229**, 93 (1955).
Wpłynęło 11.3.1955.

THE INHIBITION OF PHOSPHOPYRUVIC PHOSPHORYLASE BY ATP AND PYROPHOSPHATES HAS BEEN INVESTIGATED

Accumulation of ATP during transphosphorylation may completely inactivate the enzyme. By elimination of ATP the enzyme can be reacti-

vated. This may have a certain bearing upon the regulation of the process of glycolysis.

It is possible that ATP links up with the phosphopyruvic transphosphorylase by means of the pyrophosphate group.

ERRATA

do 1-go zeszytu 1955 r. Acta Biochimica Polonica. Artykuł: A. Morawiecki:
„Hamowanie transfosforylasy...”

Objaśnienia rysunków

Rys. 1. Przebieg transfosforylacji z kwasu fosfopirogronowego na ADP przy różnych stężeniach enzymu.

Odcięte: czas w min.

Rzędne: ubytek fosforanu ($\mu\text{M}/\text{ml}$) odszczepiającego się pod wpływem octanu rtęci.

Środowisko reakcji: Kw. fosfopirogronowy $7 \times 10^{-4}\text{M}$, ADP $8,5 \times 10^{-4}\text{M}$, MgSO_4 $3,5 \times 10^{-3}\text{M}$, KCl $2 \times 10^{-2}\text{M}$, KCN 10^{-3}M , NaHCO_3 $3,5 \times 10^{-3}\text{M}$ pH = 8,5 Temperatura: 25°

Stężenie enzymu: 1) $67 \mu\text{g}/\text{ml}$, 2) $31 \mu\text{g}/\text{ml}$, 3) $20 \mu\text{g}/\text{ml}$

Na wykresach zaznaczono ——— maksymalną ilość fosforanu, jaka może być przeniesiona na ADP.

Rys. 2. Transfosforylacja w obecności heksokinazy.

1) Transfosforylaza $67 \mu\text{g}/\text{ml}$

1') „ $67 \mu\text{g}/\text{ml}$ + heksokinaza $63 \mu\text{g}/\text{ml}$

2) „ $31 \mu\text{g}/\text{ml}$

2') „ $31 \mu\text{g}/\text{ml}$ + heksokinaza $63 \mu\text{g}/\text{ml}$

Środowisko zawiera $0,5\%$ glukozy. Pozostałe warunki jak poprzednio.

Rys. 3. Przebieg transfosforylacji. W czasie $t = 10$ min. dodano heksokinazy do stężenia $80 \mu\text{g}/\text{ml}$.

Transfosforylaza: $30 \mu\text{g}/\text{ml}$.

Glukoza: $0,5\%$

Pozostałe warunki jak poprzednio.

Rys. 5. Przebieg transfosforylacji z dodanym ATP.

Enzym inkubowano przez 5 min. przed dodaniem do roztworu substratów

Końcowe stężenia ATP podano przy wykresach.

Transfosforylaza: $25 \mu\text{g}/\text{ml}$.

Pozostałe warunki jak poprzednio.

UNIVERSITY OF TORONTO LIBRARY

100 St. George Street, Toronto, Ontario M5S 1A5

Acquired from the University of Toronto Library
on 10/10/2001 for the purpose of
preserving the original work.

For more information on this work, please contact
the University of Toronto Library at
416-978-2810 or library@utoronto.ca

UNIVERSITY OF TORONTO LIBRARY

100 St. George Street, Toronto, Ontario M5S 1A5

Acquired from the University of Toronto Library

on 10/10/2001 for the purpose of

preserving the original work.

For more information on this work, please contact

the University of Toronto Library at

416-978-2810 or library@utoronto.ca

UNIVERSITY OF TORONTO LIBRARY

100 St. George Street, Toronto, Ontario M5S 1A5

Acquired from the University of Toronto Library