

R o s s i współprac. (8, 13) wykazali, że większość witaminu B_{12} zawartego w surowicy krwi ludzkiej występuje w postaci związanej z białkiem, a badania nasze (9) oraz P i t n e y a, B e a r d a i v a n L o o n a (10) doprowadziły do wniosku, że ponad 80% związanej z białkiem surowicy ludzkiej kobalaminy zawarte jest we frakcji α_1 - i α_2 -globulinów, reprezentującej zaledwie 15% ogólnej ilości białek. Fakt ten przemawia za zdecydowaniem za egzystencją swoistego połączenia witaminu B_{12} z białkiem surowicy. Wreszcie w ostatnich miesiącach G r e g o r y i H o l d s w o r t h (5) otrzymali z serwatki mleka świni białko o masie cząsteczkowej około 55 tys., zawierające 23,6 μg B_{12} w jednym mg masy białka, a W i j m e n g a i T h o m p s o n (20) wyosobnili podobne połączenie kobalaminy z białkiem ze śluzówki żołądka świni jako frakcję A o masie cząsteczkowej około 128 tys., wiążącą 10,4 μg B_{12} w 1 mg, oraz frakcję B o masie cząsteczkowej około 100 tys., wiążącą 12,8 μg B_{12} w 1 mg białka.

Badania nad połączeniem kobalaminy z białkiem surowicy były przeprowadzane tylko z krwią ludzką i niewiadome pozostawało zagadnienie egzystencji takich połączeń w surowicy innych zwierząt. Sprawa ta może mieć ewentualnie doniosłe praktyczne znaczenie dla prób wydzielenia takich połączeń z surowicy. Jedynie W o l f i K a r l i n (21) przeprowadzali badania nad zawartością witaminu B_{12} we krwi różnych gatunków zwierzęcych, stwierdzając przy tym bardzo poważne różnice zachodzące między poszczególnymi gatunkami. Zawartość witaminu B_{12} w różnych tkankach i narządach zwierzęcych była kilkakrotnie badana (3, 14), ale nie zwracano w toku tych badań uwagi na to, czy w badanym materiale kobalamina występuje w postaci wolnej, czy też jako połączenie z białkiem. Rozmieszczeniem kobalaminy w obrębie komórki wątrobowej zajmowali się S w e n d s e i d i współprac. (17) dochodząc do wniosku, że większość tego czynnika występuje w mitochondriach. Autorowie ci jednak nie zajmowali się innymi typami komórek.

Powyżej podkreślone luki w wiadomościach o rozmieszczeniu witaminu B_{12} związanego z białkiem skłoniły nas do podjęcia tego zagadnienia i zbadania obecności połączeń kobalaminy z białkami w surowicy różnych gatunków zwierzęcych oraz w różnych typach komórek.

Stosowane metody

O z n a c z a n i e k o b a l a m i n y przeprowadzaliśmy posługując się glonem *Euglena gracilis* var. *bacillaris*, stosując pożywkę i sposób postępowania opisany przez nas poprzednio (9). Wielka ilość prób

przeprowadzanych przy tym postępowaniu przekonała nas, że uzyskuje się tym sposobem wyniki o wiele bardziej regularne i zgodne, niż posługując się pierwotną techniką opisaną przez Rossa (13). Do tych samych wniosków doszedł Heinrich i Lahan (6).

Oznaczanie kobalaminy w poszczególnych frakcjach białkowych oparte zostało na zastosowaniu elektroforezy bibułowej. Szczegóły postępowania zostały również podane w poprzedniej pracy (9).

Oznaczanie witaminu B₁₂ we frakcjach morfotycznych komórek wątroby oparte zostało na zastosowaniu metody Schneidera i Hogebooma (15) oraz metody Vendrely i Vendrely (19). Tkanekę wątrobową homogenizowano w homogenizatorze szklanym Pottera z 5-krotną objętością odpowiedniego roztworu; dla wydzielania jąder stosowano różniczkowe wirowanie w M/3 i M/18 roztworze kwasu cytrynowego, w celu otrzymania mitochondri, wirowanie przeprowadzano w roztworze 0,25 M sacharozy. Jednorodność zawiesiny jąder i mitochondri kontrolowana była badaniem mikroskopowym, po uprzednim zabarwieniu preparatu hematoksyliną-eozyną.

Oznaczanie witaminu B₁₂ w elementach morfotycznych krwi przeprowadzane było po wydzieleniu komórek przy pomocy różniczkowego wirowania. Krew niekrzepnącą otrzymywano przez dodanie 1 g szczawianu amonu na 1 litr krwi, umieszczano w wysokim cylindrze i odstawiano w temperaturze pokojowej na 2 do 3 godz celem sedymentacji krwinek czerwonych. Leukocyty pozostające jako zawiesina w surowicy wirowano i przemywano trzykrotnie roztworem soli fizjologicznej. Po zdekantowaniu surowicy i zebraniu kożucha leukocytów, erytrocyty odwirowywano i przemywano kilkakrotnie solą fizjologiczną. W końcu rozcieńczano wodą destylowaną i brano do oznaczenia witaminu B₁₂.

Przygotowanie materiału do oznaczania zawartości witaminu B₁₂. W celu uwolnienia witaminu B₁₂ związanego z białkiem autoklawowano badany materiał w 105° przez 60 min przy pH = 7,0. Te optymalne warunki ustaliliśmy już poprzednio (9). Stosowaliśmy takie postępowanie wbrew opinii innych autorów, którzy twierdzili, że dla uwolnienia witaminu B₁₂ wystarczy już autoklawowanie w 100° przez 15 min. Ostatnio opublikowana praca (12) potwierdza całkowicie słuszność naszego od dawna ustalonego sposobu postępowania. Do sprawy tej powrócimy jeszcze w dalszym ciągu naszych wywodów.

Azot oznaczano metodą mikro-Kjeldahla; objętość komórek w badanej zawieszynie oznaczano przy pomocy hematokrytu.

Wyniki

1. ROZMIESZCZENIE WITAMINU B₁₂ WE FRAKCJACH BIAŁKOWYCH SUROWICY RÓŻNYCH GATUNKÓW ZWIERZĘCYCH

Badaniu poddaliśmy surowicę 8 gatunków zwierzęcych. Tablica 1 podaje wyniki średnie uzyskane z 4 do 10 serii oznaczeń. Jak z powyższej tablicy wynika, u większości badanych gatunków zwierzęcych witamin B₁₂ związany jest głównie z frakcjami α_1 - i α_2 -globulinów. Nieco odmiennie przedstawia się sprawa z surowicą myszy, w której pokaźna ilość witaminu B₁₂ wędruje razem z albuminami i z frakcją odpowiadającą β -globulinom. W przypadku surowicy świnki morskiej musimy uwzględnić tę okoliczność, że poszczególne frakcje białkowe surowicy tego gatunku zwierzęcego nie pokrywają się z klasycznymi frakcjami elektroforetycznymi surowicy ludzkiej. W tabl. 1 zaliczyliśmy do poszczególnych frakcji globulinowych te odcinki widma białkowego surowicy świnki morskiej, które cechują się taką samą szybkością wędrowania, jaką okazują frakcje globulinów surowicy ludzkiej, zdając sobie zresztą sprawę z pełnej dowolności takiego podejścia.

Tablica 1

Poziom witaminu B₁₂ we frakcjach białkowych surowic różnych gatunków zwierzęcych po rozdzieleniu elektroforetycznym

Lp.	gatunek	μg witaminu B ₁₂ na 1 ml surowicy							
		albumi- ny	g l o b u l i n y				suma po ele- ktrofore- tycznym rozdzie- leniu	poziom ogólny w pełnej surowicy	wolny
			I	II	III	IV			
1	człowiek	50,2	145,3	56,6	40,6	45,3	359,1	157,3	31,7
2	koń	160,5	187,5	32,5	84,5	37,5	502,5	298,0	142,5
3	krowa	31,8	43,8	48,0	37,5	40,7	201,8	305,0	0
4	królik	24,3	42,0	37,5	3,7	28,5	136,0	148,0	—
5	szczur	41,2	57,0	28,6	16,8	52,5	196,1	126,2	7,0
6	świnka								
	morska	14,0	8,2	73,0	93,5	6,4	195,1	145,0	82,5
7	myszka biała	39,0	15,0	27,0	42,0	26,4	149,4	—	—
8	pies	23,3	56,4	49,0	14,9	1,5	155,1	156,0	—

Przy rozpatrywaniu cyfrowych wyników podanych w tablicy 1 należy wziąć pod uwagę fakt, że frakcje α_1 - i α_2 -globulinów reprezentują zaledwie 15% ogólnej ilości białka surowicy, przy czym na frakcję α_1

przypada tylko 1,5%. Przy uwzględnieniu tej okoliczności szczególne zagęszczenie witaminu B₁₂ w białkach tych frakcji uwydatni się wyraźnie. Ponieważ to zagęszczenie witaminu B₁₂ we frakcjach α -globulinów występuje u wszystkich gatunków zwierzęcych, sądzimy, że fakt ten posiada bardziej ogólne znaczenie i że przemawia za egzystencją kompleksu kobalaminy z pewnym określonym typem białka, odznaczającym się prawdopodobnie zbliżonymi własnościami fizyko-chemicznymi, bez względu na pochodzenie gatunkowe.

Przedstawiając powyższe wyniki musimy zwrócić uwagę na zjawisko zaobserwowane przez nas już dawniej, które jednak w toku opisywanych doświadczeń stale się powtarzało. Suma ilości witaminu B₁₂, określonych w poszczególnych frakcjach białkowych surowicy po ich elektroforetycznym rozdzieleniu, jest niemal zawsze znacznie większa od ilości witaminu B₁₂, znalezionych w tej samej surowicy przed jej rozdzieleniem na poszczególne frakcje. Na fakt ten zwracają z naciskiem uwagę również P i t n e y i współprac. (10) i próbując wytłumaczyć przyjmują, że w surowicy istnieje jakaś substancja utrudniająca wykorzystanie kobalaminy przez organizm glonów używanych do mikrobiologicznych oznaczeń. Po elektroforetycznym rozdzieleniu surowicy ten czynnik hamujący zużycie witaminu B₁₂ zostaje wyeliminowany z poszczególnych frakcji białkowych i nie przeszkadza w badaniu mikrobiologicznym.

Możliwe jest jeszcze inne tłumaczenie powyżej opisanego zjawiska, przyjmujące inaktywację B₁₂ w surowicy skutkiem działania jakiegoś czynnika enzymatycznego. Ażeby sprawę wyświecić, trzymaliśmy surowicę w termostacie w 37° przez dwa tygodnie kontrolując codziennie poziom witaminu. Trzymaliśmy ją również w temperaturze pokojowej na świetle i w obu wypadkach stwierdziliśmy, że w ciągu dwóch tygodni zawartość kobalaminy w surowicy nie ulega dostrzegalnej zmianie. Naświetlanie surowicy lampą kwarcową już po godzinie powoduje wyraźne zmniejszenie się zawartości B₁₂.

W surowicach wszystkich badanych gatunków zwierzęcych część ogólnej zawartości witaminu B₁₂ przypada na kobalaminę, wykorzystywaną przez drobnoustrój bez uprzedniego autoklawowania, a więc nie związaną z białkiem. Szczególnie dużo wolnego B₁₂ znajduje się w surowicy końskiej. Znamiennym jest jednak fakt, że ta tzw. „wolna kobalamina” z surowicy końskiej nie dializuje przez błonę celofanową. Przypuszczalnie w tym wypadku mamy do czynienia z witaminem B₁₂ związanym nie z wielkocząsteczkowym białkiem, ale z jakimś peptydem, nie stanowiącym przeszkody dla wykorzystania witaminu przez drobnoustrój, lecz cechującym się dostatecznie dużą masą cząsteczkową uniemożliwiającą przejście przez błonę dializatora.

2. WITAMIN B₁₂ W ELEMENTACH MORFOTYCZNYCH KRWI

Tablica 2 podaje zawartość B₁₂ w ciałkach czerwonych oraz ciałkach białych krwi konia i człowieka, w porównaniu z zawartością witaminu w surowicy tej samej krwi. Cyfry zawarte w tej tablicy wskazują na to, że znaczna ilość kobalaminy znajduje się w obu typach elementów morfotycznych, przy czym leukocyty zawierają niejednokrotnie więcej kobalaminy, niż jej zawiera taka sama objętość surowicy.

Badaliśmy rozmieszczenie witaminu B₁₂ w różnych frakcjach elementów morfotycznych krwi. Po hemolizie erytrocytów 5-krotną objętością wody wodociągowej, dodawano kwasu octowego do zawartości 0,3%, wytrącony osad wirowano i przemywano 5-krotnie wodą wodociągową, a następnie 0,9% NaCl. Po autoklawowaniu tej nierozpuszczalnej pozostałości erytrocytów oznaczano zawartość B₁₂ stwierdzając, że większość kobalaminy uprzednio zawartej w erytrocytach związana jest z tą frakcją, jak to ilustruje tabl. 3. Zawiesinę leukocytów w NaCl homogenizowano w homogenizatorze typu Waring-Blendor, po czym oznaczano zawartość B₁₂ zarówno we frakcji rozpuszczalnej w NaCl, jak i we frakcji nierozpuszczalnej. Ilość B₁₂ przypadająca na 1 mg azotu w obu frakcjach była w przybliżeniu taka sama, gdyż we frakcji rozpuszczalnej przypadało 4,5 μg B₁₂/mg N, a we frakcji nierozpuszczalnej 3,3 μg B₁₂/mg N.

Tablica 2

Poziom witaminu B₁₂ w surowicy i składnikach morfotycznych krwi końskiej

Nr krwi	μg witaminu B ₁₂ na 1 ml		
	surowica	erytrocyty	leukocyty
1	266,0	36,6	—
2	200,0	47,0	170,0
3	405,0	104,0	440,0
4	129,0	92,0	—
5	204,0	65,0	980,0
6	223,0	32,4	457,0
7	305,0	57,9	505,0
8 ¹⁾	136,7	51,8	77,2

Tablica 3

Witamin B₁₂ w nierozpuszczalnej frakcji erytrocytów końskich

Nr	μg witaminu B ₁₂ na mg N		
	pełne erytrocyty	frakcja nierozpuszczalna	stopień zagęszczenia
1	3,1	26,6	8,5
2	2,5	8,9	3,6
3	2,0	20,7	10,4
4	3,7	30,2	8,3
średnio 2,8		21,6	7,7

3. ROZMIESZCZENIE WITAMINU B₁₂ W KOMÓRCZE WĄTROBY SZCZURA

Wątroba jest narządem zawierającym największe stężenia kobalaminy. Na fakt ten zwracali już uwagę poprzednio inni badacze podkre-

¹⁾ Krew ludzka.

ślając (3, 14), że wątroba bydłęca odznacza się 20—50 razy większym stężeniem B₁₂ w porównaniu z tkanką mięsną. W toku naszych badań oznaczaliśmy zawartość B₁₂ w homogenizacie wątroby 13 różnych szczurów stwierdzając, że stężenie witaminu B₁₂ waha się w granicach od 48—149 μg B₁₂/mg N, średnio 93 μg/mg N, podczas gdy w leukocytach końskich wynosi 34,2 μg/mg N, a w erytrocytach końskich 2,5 μg/mg N.

Homogenizaty wątroby były frakcjonowane przy zastosowaniu metody Schneidera i Hogeboom (15) dla uzyskania mitochondri oraz metody Vendrely (19) dla uzyskania możliwie nieuszkodzonych jąder. Rozmieszczenie witaminu B₁₂ w tych dwóch elementach morfotycznych komórek wątroby w porównaniu z zawartością w niefrakcjonowanym homogenizacie, po przeliczeniu na mg N, podaje tablica 4. Z wartości podanych w tej tablicy wynika, że witamin B₁₂ w szczególnie dużych stężeniach zawarty jest w mitochondriach, reprezentujących materiał biologiczny zawierający największe ilości B₁₂.

Tablica 4

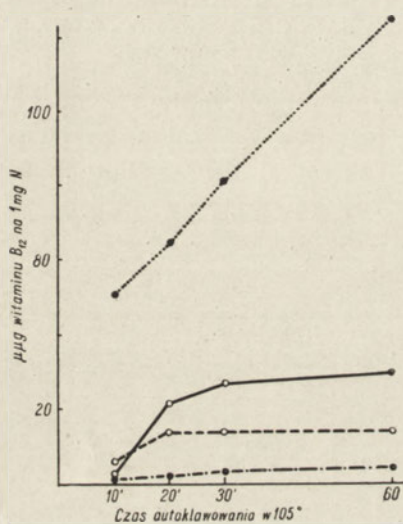
Rozmieszczenie witaminu B₁₂ we frakcjach morfotycznych komórek wątroby szczura

Lp.	μg witaminu B ₁₂ na mg N			uwagi
	pełny homogenizat	mitochondria	jądra	
1	48,6	107,2	50,4	frakcjonowano wg metody Schneider i Hogeboom (15)
2	61,5	344,4	60,8	
3	69,6	476,3	89,4	
4	133,6	481,6	66,0	
5	91,7	268,3	45,3	
6	67,2	476,1	60,7	
7	85,7	274,5	53,8	
8	56,8	141,2	—	
9	149,4	302,9	80,3	
10	72,2	—	23,6	wg metody Vendrely i Vendrely (19)
11	73,9	—	55,2	
12	123,0	—	52,0	
13	77,0	—	21,2	

Analogiczne badania przeprowadzaliśmy na homogenizatach nerki szczurzej, uzyskując średnie wartości 90 μg/mg N. Analiza zawartości B₁₂ w homogenizatach wątroby i nerek myszy dała wyniki cyfrowe leżące w tym samym rzędzie wielkości, w jakim obracają się wartości uzyskane przy badaniu wątrób i nerek szczurów: pełny homogenizat średnio 58,1 μg/mg N, mitochondria 136 μg/mg N, jądra 50 μg/mg N.

Witamin B₁₂ zawarty jest w mitochondriach w postaci łatwo rozpuszczalnego połączenia z białkiem. W odróżnieniu od wielu biologicznie czynnych składników mitochondri, to połączenie białkowe daje się całkowicie wyekstrahować za pomocą 0,15 M NaCl z mitochondri zniszczonych przez homogenizowanie w Waring-Blendor.

Połączenie kobalaminy z białkiem zawarte w mitochondriach ma odmienny charakter od połączenia występującego w otoczkach ciałek czerwonych krwi, w leukocytach i w surowicy. O ile autoklawowanie surowicy, leukocytów i erytrocytów już po 30 minutach uwalnia większość uprzednio związanego witaminu B₁₂, w przypadku mitochondri krzywa wyrażająca przyrost ilości uwalnianego B₁₂ nawet po jednogodzinnym autoklawowaniu nie zmienia kształtu. Ilustruje to rys. 1.



Rys. 1. Zależność czasu autoklawowania w 105° a ilości uwolnionego witaminu B₁₂ z połączeń z różnymi białkami. - - - - erytrocyty, o—o frakcja nierozpuszczalna erytrocytów, o—o leukocyty krwi końskiej, mitochondria wątroby szczura.

Wszystkie nasze oznaczenia zawartości witaminu B₁₂ oparte były na autoklawowaniu przez jedną godzinę. Trwałość połączenia kobalaminy z białkiem w mitochondriach nasuwa przypuszczenie, że wartości nasze, uzyskane przy badaniu homogenizatów wątroby i mitochondri, nie obejmują całości B₁₂ zawartej w tych materiałach, niemniej pozwalają na ustalenie pewnych porównawczych danych liczbowych. Dalsze badania nad wyjaśnieniem tego zagadnienia są w toku.

Wszystkie nasze oznaczenia zawartości witaminu B₁₂ oparte były na autoklawowaniu przez jedną godzinę. Trwałość połączenia kobalaminy z białkiem w mitochondriach nasuwa przypuszczenie, że wartości nasze, uzyskane przy badaniu homogenizatów wątroby i mitochondri, nie obejmują całości B₁₂ zawartej w tych materiałach, niemniej pozwalają na ustalenie pewnych porównawczych danych liczbowych. Dalsze badania nad wyjaśnieniem tego zagadnienia są w toku.

Omówienie wyników

Przedstawione powyżej szeregi doświadczeń przemawiają zdecydowanie za tym, że znaczna większość zawartości witaminu B₁₂ w komórkach i cieczach ustrojowych, a może nawet cała zawartość tego witaminu reprezentowana jest przez połączenia z białkami. Stwierdzamy co prawda w surowicy krwi obecność pewnej ilości kobalaminy, określanej jako wolny witamin B₁₂, ale pojęcie tej formy witaminu wywodzi się z wyników doświadczeń mikrobiologicznych opartych na zastosowaniu glonu *Euglena gracilis*. Nazywamy wolnym witaminem B₁₂

tę formę kobalaminy, która zostaje przez drobnoustrój zużyta bezpośrednio bez uprzedniego autoklawowania materiału. Z doświadczeń R o b i n s o n a i współprac. (12) wynika, że stosowany przez tych autorów jako wskaźnik mikrobiologiczny *Lactobacillus leichmani* potrafi zużytkować połączenie witaminu B₁₂ z jakimś peptydem, powstającym przy enzymatycznym rozkładzie białkowego kompleksu kobalaminy. Również nasze doświadczenia przemawiają za tym, że tzw. wolny B₁₂ w surowicy krwi końskiej jest jakimś połączeniem odznaczającym się stosunkowo dużą masą cząsteczkową, gdyż nie dializuje przez błonę celofanową, jakkolwiek jest zużywany przez glon *Euglena*. Możliwe jest więc, że to, co nazywamy potocznie wolnym witaminem B₁₂, jest zawsze połączeniem kobalaminy z jakimś prostszym peptydem.

Gdyby nawet okazało się, że istotnie pewna ilość kobalaminy występuje w ustroju zwierzęcym i krąży w surowicy w postaci nie powiązanej z jakimkolwiek peptydem, to jednak przeważająca większość tego witaminu w surowicy jest związana z białkami, przy czym ilościowo przeważa połączenie kobalaminy z jakimś białkiem wędrującym z frakcją α₁-globulinów. Na fakt ten zwracaliśmy już poprzednio uwagę w toku naszych badań nad surowicą ludzką (9), co zostało potwierdzone również w wynikach pracy P i t n e y a i współprac. (10). Badania surowicy innych gatunków zwierzęcych potwierdza — zdaniem naszym — wniosek o swoistym charakterze kompleksu witamin B₁₂-białko zawartego w surowicy.

Rozmieszczenie witaminu B₁₂ we frakcjach innych niż α-globuliny surowicy różnych gatunków zwierzęcych wyraża się co prawda wartościami odmiennymi od tych, które odpowiadają rozmieszczeniu B₁₂ we frakcjach surowicy ludzkiej. Niemniej, surowice wszystkich gatunków zwierzęcych wykazują największe stężenie kobalaminy w stosunku do ilości białka zawsze we frakcji α-globulinów. Należy więc przyjąć egzystencję w surowicy swoistego proteidu, w skład którego wchodzi kobalamina, wędrującego z α-globulinami, który proponujemy nazwać e r y t r o g l o b u l i n e m przez analogię do nazwy erytrotyna i eryteina, wprowadzonej przez T e r n b e r g a i E a k i n a (18) dla połączenia kobalaminy z czynnikiem wewnątrz-pochodnym Castle'a.

Oprócz erytroglobulinu występują w surowicy krwi inne połączenia witaminu B₁₂ z białkami, o czym świadczy fakt, że około połowy ogólnej ilości kobalaminy w surowicy wędruje podczas elektroforezy z innymi niż α-globuliny frakcjami białkowymi, reprezentującymi 85% ogólnej ilości białek. Czy te połączenia kobalaminy z białkami mają również

swoisty charakter tak jak erytroglobulin, o tym jeszcze nie można powiedzieć nic pewnego. Wyniki naszych badań przemawiają raczej przeciwko takiemu przypuszczeniu. Być może, że mamy do czynienia z nieswoistym połączeniem witaminu B₁₂ z białkami, wynikającym z działania sił międzycząsteczkowych.

Połączenia witaminu B₁₂ z białkami występują również w komórkach. W erytrocytach większość kobalaminy tkwi w części komórki nierozpuszczalnej w 0,9% NaCl. W leukocytach na część nierozpuszczalną komórki przypada około połowy zawartości witaminu B₁₂. Mamy więc w tym wypadku do czynienia z odmiennym połączeniem kobalaminy niż te połączenia, które krążą wraz z białkami surowicy.

W komórkach wątroby witamin B₁₂ zawarty jest głównie w mitochondriach i to całkowicie w postaci związanej z białkiem. Przypuszczalnie stanowi on składową część proteidów odznaczających się własnościami enzymatycznymi, nagromadzonych przecieź w tak dużych stężeniach w tych elementach morfotycznych komórki. Spośród wszystkich badanych przez nas materiałów pochodzenia biologicznego — mitochondria komórek wątroby i nerki zawierają najwięcej kobalaminy w stosunku do ilości białka. Dla porównania zwracamy uwagę na to, że stosunek ilości kobalaminy do ilości azotu białkowego wynosi w α_1 -globulinach surowicy ludzkiej 200 $\mu\text{g}/\text{mg N}$, podczas gdy w mitochondriach wątroby i nerki około 300 $\mu\text{g}/\text{mg N}$. To szczególne nagromadzenie się witaminu B₁₂ w mitochondriach obserwowali już S w e n d s e i d i współprac. (17), podając przy tym dla kobalaminy wartości jeszcze wyższe od tych, jakie znaleźliśmy w toku naszych badań. Należy jednak zwrócić uwagę na to, że badacze amerykańscy posługiwali się przy oznaczaniu B₁₂ *L. leichmani*, a więc drobnoustrojem reagującym nie tylko na obecność witaminu B₁₂ w pożywce, ale również na szereg innych związków, jak np. tymidyna, które niewątpliwie zawarte są w rozłożonych mitochondriach.

Połączenie kobalaminy z białkiem zawartym w mitochondriach jest najprawdopodobniej połączeniem całkowicie odmiennym od tych, jakie spotykamy w surowicy oraz w komórkach krwi, gdyż rozkłada się dopiero po znacznie dłużej trwającym autoklawowaniu. W toku naszych badań poprzestawaliśmy na autoklawowaniu przez 60 minut w 105°, ale według R o b i n s o n a i współprac. (12) całkowite wydzielenie kobalaminy z jej połączeń w tkance wątrobowej osiąga się dopiero po 4-godzinnym autoklawowaniu.

Przeprowadzając analogię z wielu innymi znanymi witaminami, których rola biologiczna polega na tym, że stanowią one składnik licznych

enzymów, możemy z dużym prawdopodobieństwem przypuszczać, iż kobalamina dopiero w połączeniu z odpowiednim białkowym apoenzymem katalizuje określone reakcje metaboliczne. Być może, że połączenia białkowe witaminu B₁₂, których egzystencję stwierdziliśmy w tylu różnych obiektach biologicznych, są właśnie owymi bliżej jeszcze nie poznanymi enzymami.

Streszczenie

1. Posługując się elektroforezą bibułową oraz metodą mikrobiologiczną *Euglena gracilis* zbadano surowicę szeregu gatunków zwierzęcych, stwierdzając, że znaczna większość zawartej w surowicy kobalaminy związana jest z białkami i to głównie z frakcją α -globulinów. Prawdopodobnie u wszystkich gatunków zwierzęcych występuje identyczny lub bardzo zbliżony kompleks kobalamina-białko, który autorowie proponują nazwać erytroglobulinem.

2. Badano zawartość kobalaminy w czerwonych i białych ciałkach krwi stwierdzając, że zawartość ta w krwi końskiej wynosi około 70 $\mu\text{g/ml}$ erytrocytów i około 500 $\mu\text{g/ml}$ leukocytów. W erytrocytach większość kobalaminy związana jest z białkiem nierozpuszczalnym.

3. W komórkach wątroby i nerki szczura kobalamina zawarta jest głównie w mitochondriach i to całkowicie w postaci związanej z białkiem, przy czym stężenie witaminu wyraża się cyfrą około 300 $\mu\text{g/mg}$ N mitochondri. Połączenie kobalaminy z białkiem w mitochondriach jest połączeniem odmiennego typu niż to, które spotykamy w białkach surowicy i komórkach krwi, gdyż znacznie trudniej ulega rozszczepieniu w toku autoklawowania.

LITERATURA

1. Bird O. i Hoevet D.: *J. Biol. Chem.*, **190**, 181, 1951.
2. Chow B. F. i Yamamoto R.: *Feder. Proc.* **12**, 189, 1953.
3. Cooperman J. M., Tabenkin B. i Drucker B.: *J. Nutrit.* **46**, 467, 1951.
4. Glass G. B. J., Boyd L. J., Rubinstein M. A. i Svigall Ch. S.: *Science*, **115**, 101, 1952; *Gastroenterology*, **23**, 219, 1953.
5. Gregory M. E. i Holdsworth E. S.: *Nature*, **173**, 830, 1954.
6. Heinrich H. i Lahann H.: *Z. Naturforsch.*, **7b**, 417, 1952.
7. Latner A. L. i Ungley C. C.: *Brit Med. J.*, **I**, 1448, 1953.
8. Mollin D. L. i Ross G. I. M.: *J. Clin. Pathol.*, **5**, 129, 1952.
9. Ostrowski W., Skarżyński B. i Żak Z.: *Acta Biochim. Pol.*, **1**, 13, 1954.

10. Pitney W. R., Beard M. F. i van Loon E. J.: *J. Biol. Chem.*, **207**, 143, 1954.
11. Prusoff W. H., Weich A. D., Heinle R. W. i Meachan G. C.: *Blood*, **8**, 491, 1953.
12. Robinson F. A., Fitzgerald M. E. H., Fehr K. i Grimshaw J. J.: *Nature*, **174**, 558, 1954.
13. Ross G. I. M.: *Nature*, **166**, 270, 1950; *Brit. Med. J.*, II, 640, 1953.
14. Scheid H. E., Andrews M. M. i Schweigert B. S.: *J. Nutr.*, **47**, 601, 1952; *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **78**, 558, 1951.
15. Schneider W. C. i Hogeboom G. H.: *J. Biol. Chem.*, **183**, 123, 1950.
16. Shaw G. E.: *Biochem. J.*, **47**, XXXV, 1950.
17. Swendseid M. E., Bettel F. H. i Ackermann W. W.: *J. Biol. Chem.*, **190**, 791, 1951.
18. Termberg J. L. i Eakin R. E.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **71**, 3858, 1949.
19. Vendrely R. i Vendrely C.: *Experientia*, **4**, 434, 1948.
20. Wijmenga H. G. i Thompson K. W.: *Biochim. Bioph. Acta*, **13**, 144, 1954.
21. Wolf R. i Karlin R.: *Bull. Soc. Chim. Biol.* **35**, 1409, 1953.

СОЕДИНЕНИЕ ВИТАМИНА В₁₂ С БЕЛКОМ

Резюме

1. Была исследована сыворотка крови целого ряда видов животных по методу электрофореза на фильтровальной бумаге и по микробиологическому методу и было обнаружено, что большая часть содержащегося в сыворотке кобальтамина связана с белком, главным образом с α -глобулярной фракцией. Повидимому все виды животных содержат идентичный или почти сходный комплекс кобальтаминбелок, который авторы предлагают назвать эритроглобулином.

2. Исследовано содержание кобальтамина в красных и белых тельцах крови и обнаружено, что в крови лошади содержание кобальтамина приблизительно равно 70 $\mu\text{g}/\text{мл}$ эритроцитов и 500 $\mu\text{g}/\text{мл}$ лейкоцитов. В эритроцитах кобальтамин связан главным образом с нерастворимым белком.

3. В клетках печени и почек крысы кобальтамин целиком связан с белком и содержится главным образом в митохондриях, причём концентрация витамина выражена приблизительной цифрой 300 $\mu\text{g}/\text{мг}$ N митохондрии. Соединение кобальтамина с белком в митохондриях во время автоклавирования распадается с трудом и этим отличается от соединений встречающихся в белках сыворотки и клетках крови, распадающихся в этих условиях гораздо легче.

COMBINATIONS OF VITAMIN B₁₂ WITH PROTEINS

Summary

1. Using paper electrophoresis as well as microbiological methods (*Euglena gracilis*), studies on the sera of a series of animal species showed that an appreciable fraction of the serum cobalamine is combined with proteins, in general with the α -globulin fraction. It is probable that an identical or similar cobalamine-protein complex exists in all animal species and the authors propose „erythroglubulins“ as a name for this complex.

2. An analysis of the cobalamine content of the red and white blood corpuscles showed that in horse blood it is about 70 $\mu\text{g/ml}$ erythrocytes and about 500 $\mu\text{g/ml}$ leucocytes. In the erythrocytes the major portion of cobalamine is bound to non-soluble proteins.

3. In the liver and kidney cells of the rat, cobalamine is generally found in the mitochondria, almost entirely bound to proteins, the vitamin concentration being in the neighbourhood of 300 $\mu\text{g/mg N}$ mitochondria. The binding of cobalamine to the proteins of the mitochondria is of a different type than that with serum proteins and in blood cells, where their separation by autoclaving is considerably more difficult.

Otrzymano 2.XI.1954.

działających szkodliwie na ditizon, ustaleniu pH reakcji na 6,5 oraz doborze sposobu tworzenia ditizonianu cynku.

Zasada metody

Badaną próbkę (surowica, krwinki) spala się kwasem siarkowym i azotowym przez 3 — 4 godziny. Szkodliwe działanie utleniające resztek kwasu azotowego na ditizon usuwa się przez dalsze spalanie z dodatkiem 5% kwasu szczawowego, a następnie z 5 ml wody.

Próbkę spaloną zobojętnia się za pomocą amoniaku wobec czerwieni metylowej jako wskaźnika, a następnie dodaje się do niej buforu octanowego o pH 6,5. Cynk ekstrahuje się roztworem chloroformowym ditizonu. Purpurowy ditizonian cynku zbiera się do kolbki miarowej i po skończeniu ekstrakcji kolorymetruje się wobec ślepej próby w długości fali — 530 m μ .

ODCZYNNIKI

1. Stężony kwas siarkowy (chem. czysty nie destylowany).
2. Stężony kwas azotowy, przedestylowany.
3. Stężony amoniak, przedestylowany.
4. 5% roztwór kwasu szczawowego (prod. FOCH Gliwice).
5. 1% alkoholowy roztwór czerwieni metylowej (FOCH).
6. Bufor octanowy o pH 6,5 (wolny od cynku).
7. Woda podwójnie destylowana.
8. Roztwór ditizonu (F-y BDH) w chloroformie: 10 mg/100 ml.

PRYZRĄDZANIE ROZTWORU DITIZONU

W lejku rozdzielczym na około 500 ml rozpuszcza się 10 mg ditizonu w 100 ml chloroformu, dodaje się 200 ml wody i 1 ml stężonego amoniaku. Wstrząsa się. Do fazy wodnej przechodzi tylko czysty ditizon. Wypuszcza się chloroform. Zakwasza się kroplą stężonego kwasu solnego i dodaje się do niej 100 ml chloroformu. Po ponownym wstrząśnięciu oczyszczony ditizon przechodzi do fazy chloroformowej. Odlewa się fazę wodną i przemywa się roztwór 2 — 3-krotnie wodą podwójnie destylowaną. Roztwór przechowuje się w lodówce nawarstwiając go 1% kwasem siarkowym. Tak przyrządzonym roztworem oczyszcza się bufor octanowy, wytrąsając w lejku rozdzielczym bufor z coraz nową dozą ditizonu aż do zaniku reakcji na cynk. Wodę używaną do badań należy zbuforować małą ilością oczyszczonego buforu octanowego i spraw-

dzić roztworem ditazonu, czy nie daje reakcji na cynk. Podobnie sprawdza się czystość szkła.

MYCIE SZKŁA

Z wyjątkiem lejków rozdzielczych używa się naczyń ze szkła jejnajskiego. Wymyte chromianką szkło zanurza się na 24 godziny w 4 N kwasie azotowym, a po wyjęciu płucze się wodą podwójnie destylowaną do całkowitego usunięcia kwasu.

WYKONANIE

1 ml surowicy z dodatkiem dokładnie odmierzonego 1 ml stężonego kwasu siarkowego i 1 ml kwasu azotowego stężonego spala się przez okres 3 — 4 godzin, aż zawartość kolbki stanie się bezbarwna. Po ochłodzeniu dodaje się 5 ml 5% kwasu szczawiowego i spala się znowu przez około 30 — 45 minut. Spalanie powtarzamy znowu po dodaniu 5 ml wody podwójnie destylowanej.

Zawartość kolbki przenosi się ilościowo do lejka rozdzielczego i dolewa się 4 razy po 10 ml gorącej wody podwójnie destylowanej. Zawartość lejka zobojętnia się ostrożnie amoniakiem wobec kropli czerwieni

Tablica 1

Dokładność metody oznaczania cynku w surowicy

Lp.		Oznaczo- no Zn w μg	Średnia Zn w μg	Zaw. Zn w próbie badanej w μg	Oznaczo- no Zn w μg	% odzys- kania
	Surowica A	1,23 1,12	} 1,17			
	Surowica B	1,37 1,30		} 1,33		
1	Surowica A + 1 μg Zn				2,17	2,02
2	+ 1,5 μg Zn			2,67	2,58	90,67
3	Surowica B + 1,0 μg Zn			2,33	2,11	90,56
4	+ 1,0 μg Zn			2,33	2,13	91,42
5	1,5 μg Zn			1,50	1,47	98,00
6	1,5 μg Zn			1,50	1,39	92,67
7	1,5 μg Zn			1,50	1,48	98,67
8	1,5 μg Zn			1,50	1,58	94,67
9	1,5 μg Zn			1,50	1,43	95,34
10	1,5 μg Zn			1,50	1,46	97,34
Średnio odzyskano \pm						94,84 2,83

metylowej i dodaje się 50 ml oczyszczonego buforu octanowego, a następnie przeprowadza się ekstrakcję cynku przez dodawanie po kropli ditizonu i wytrząsanie. Ditizonian cynku koloru rubinowego zbiera się do kolbki 25 ml. Ostatnie krople ditizonu mają barwę szarozieloną z powodu interferowania barwy zielonej — pochodzącej od nie zmienionego ditizonu i rubinowej — ditizonianu cynku obecnego w tej mieszaninie w małych ilościach.

Pierwsza nie zmieniona kropla ditizonu świadczy, że całkowitą ilość cynku wyekstrahowano. Na zawiązanie 1,50 μg cynku obecnego w próbce zużywa się około 5 ml roztworu ditizonu. Następnie kolbkę dopełnia się chloroformem do objętości 25 ml i kolorymetruje wobec ślepej próby wykonywanej równolegle z próbą badaną.

Kolorymetruje się w kolorymetrze Pulfricha używając filtru S53. Krzywą wzorcową sporządzono używając bezwodnego octanu cynku (prod. FOCH Gliwice).

Metoda ta nadaje się do oznaczeń cynku w próbach o zawartości 0,4 — 3,0 μg cynku.

Tablica 2
Dokładność metody oznaczania cynku w erytrocytach

Lp.		Oznaczo- no w μg	Srednia Zn w μg	Zaw. Zn w próbce w μg	Oznaczo- no w μg	% odzys- kania
	0,5 ml krew nr 1	1,54 1,48 1,54	} 1,52			
	0,5 ml krew nr 2	1,41 1,36		} 1,38		
1	0,5 krew: 1					
	„ + 1,0 μg Zn			2,52	2,13	84,53
2	„ + 0,6 „ „			2,12	1,91	90,10
3	„ + 0,4 „ „			1,92	1,52	79,17
4	„ + 1,2 „ „			2,72	2,23	81,99
5	„ + 1,4 „ „			2,92	2,45	83,91
6	„ nr 2 + 0,3 „ „			1,68	1,35	80,36
7	„ „ + 0,4 „ „			1,78	1,45	81,47
8	„ „ + 0,6 „ „			1,98	1,62	81,82
9	„ „ + 0,8 „ „			2,18	1,76	80,74
10	„ „ + 1,0 „ „			2,38	1,78	74,79
Srednio odzyskano \pm						81,89 3,94

PRZYGOTOWANIE PRÓBEK DO OZNACZANIA CYNKU W ERYTROCYTACH

Celem oznaczenia cynku erytrocytów do 1 ml krwi pobranej z żyły w kalibrowanej probówce dodano (0,3 ml 3,8) cytrynianu sodu. Krwinki przemywano trzykrotnie solą fizjologiczną używając do każdorazowego przemywania około 5 ml soli fizjologicznej (0,9%), a następnie po przemyciu uzupełniano zawartość probówki solą fizjologiczną do objętości 1 ml. Dla oznaczenia ilości erytrocytów w 1 mm³ pobrano próbkę i przez dodanie trzykrotnej objętości wody destylowanej powodowano hemolizę krwinek. Do oznaczenia zawartości cynku pobierano połowę hemolizatu.

Oznaczoną ilość cynku przeliczano na miliard krwinek znając objętość użytego roztworu krwinek i ich ilość w mm³.

Dyskusja

Przedstawiona modyfikacja oznaczania cynku we krwi oparta o zasady podane przez Fischera i inne znane metody pozwala na uniknięcie niepowodzeń wynikających z braku odczynników o dużej czystości.

Stosowanie przy analizie ściśle określonych ilości odczynników pozwala na używanie odczynników o stosunkowo dużych zanieczyszczeniach. Spalanie kwasem siarkowym i azotowym okazało się najlepsze. Użycie samego kwasu azotowego powoduje częste pękanie kolbek, spalanie w piecu elektrycznym wymaga kosztownego urządzenia. Zastosowano sposób tworzenia ditizonianu cynku bez użycia nadmiaru ditizonu, ponieważ usuwanie ditizonu za pomocą rozcieńczonego amoniaku lub siarczku sodu nie dawało dobrych wyników. Obecność kobaltu, kadmu, niklu pominięto jako źródło błędów i nie stosowano żadnych środków do ich „maskowania”. Metoda jest dokładniejsza przy oznaczaniu poziomu cynku w surowicy aniżeli w erytrocytach.

Streszczenie

Opisano zmodyfikowaną metodę oznaczania poziomu cynku w erytrocytach i surowicy. Metoda ta polega na spalaniu 1 ml surowicy krwi lub przemytych i zhemolizowanych erytrocytów kwasem siarkowym i azotowym oraz wytworzeniu barwnego połączenia z ditizonem o pH 6,5.

LITERATURA

1. Berfenstam R.: *Acta Paediatrica Supp.* **1**, 87, May 1952.
2. Fischer H.: *Z. f. angew. Chemie* **42**, 1023, 1929.
3. Fischer H., Leopoldi G.: *Zeitschr. analyt. Chemie* **107**, 241, 1936.
4. Vallee B. L., Gibson J. G.: *J. Biol. Chem.* **176**, 435, 1948.
5. Wolff H.: *Biochem. Z.* **320**, 291, 1950.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИНКА СЫВОРОТКИ И КРАСНЫХ КРОВЯНЫХ ТЕЛЕЦ

Резюме

Описан модифицированный метод определения уровня цинка в эритроцитах и сыворотке. Метод заключается в сжигании 1 мл сыворотки крови или промытых и подвергнутых гемолизу эритроцитов серной и азотной кислотой и образовании окрашенного соединения с дитизоном имеющем рН 6,5.

DETERMINATION OF ZINC IN SERUM AND RED BLOOD CELLS

Summary

A modified method is described for the determination of zinc in erythrocytes and serum. The method is based on the combustion of 1 ml of blood serum or washed and hemolyced erythrocytes with sulphuric and nitric acids and formation of a coloured complex with dithizone at pH 6,5.

Otrzymano 30.VIII.1954.

ZBIGNIEW SZOT

**ZAWARTOŚĆ ANHYDRAZY WĘGLANOWEJ I CYNKU WE KRWI
W STANACH ZDROWIA I CHOROBY**

II

*Z Pracowni Biochemii Klinicznej Instytutu Hematologii w Warszawie**Kierownik: dr med. E. Kowalski**Dyrektor Instytutu: Doc. dr A. Hausman*

Cynk uważa się obecnie za fizjologiczny składnik krwi i komórek ustroju. Cynk zawarty w erytrocytach jest składnikiem karboanhydrazy, której znaczenie fizjologiczne jest stosunkowo dobrze poznane. Rola cynku w osoczu krwi i tkankach nie jest jeszcze całkowicie wyjaśniona. Istnieją dowody świadczące, że cynk jest niezbędny dla normalnych funkcji enzymatycznych i hormonalnych ustroju (5). Obserwacje poziomu cynku surowicy wykazują, że poziom ten ulega wahaniom w różnych stanach patologicznych, a amplitudy tych wahań zależą bardzo często od ciężkości stanu chorego (2).

Niektórzy autorzy sugerują pogląd, że zmniejszona zawartość cynku w leukocytach białaczkowych w porównaniu z leukocytami prawidłowymi może mieć pewne znaczenie w patogenezie białaczek. Badając karboanhydrazę krwinkową nie można pominąć z powodów wyżej wspomnianych zagadnień związanych z obecnością cynku w krwinkach i surowicy. Zachowanie się karboanhydrazy erytrocytów w różnych stanach chorobowych jest mało poznane, a wyniki badań różnych autorów są bardzo często sprzeczne.

Celem pracy niniejszej jest badanie zachowania się karboanhydrazy krwinek czerwonych w przebiegu różnych stanów chorobowych oraz badanie poziomu cynku krwinek czerwonych i surowicy u ludzi zdro-

wych, jak również w niektórych stanach chorobowych wykazujących znaczne odchylenia w aktywności karboanhydrazy erytrocytów.

Materiał i metody

Oznaczano aktywność karboanhydrazy krwinkowej oraz poziom cynku we krwi u chorych przebywających na oddziałach klinicznych Instytutu Hematologii, jak również u osób zdrowych przeważnie krwiodawców. Krew ciężarnych i noworodków pochodziła z oddziału położniczego jednego ze szpitali warszawskich. Cynk w surowicy i krwinkach czerwonych oznaczano metodą podaną w doniesieniu I. Oznaczanie aktywności karboanhydrazy wykonywano metodą Brinkmana (2), która polega na pomiarze czasu uwodnienia CO_2 wobec czerwieni fenolowej jako wskaźnika. Czas niekatalizowanej reakcji winien wynosić około 120 sekund (R_0). Czas katalizowanej reakcji R jest krótszy. Jednostka

enzymu przyjęta w tej metodzie równa się $E = \frac{R_0 - R}{R}$ w 0°C . Pobie-

rano z opuszki palca 0,1 ml krwi rozcieńczając ją wodą destylowaną w stosunku 1:100. Jednocześnie pobierano krew celem obliczenia ilości krwinek w 1 mm^3 . Po całkowitej hemolizie krwinek oznaczano ich aktywność karboanhydrazową. Czas niekatalizowanej reakcji ustalano zawsze na 110 sekund. Osiągano go w sposób podany przez Bakker'a (4) (podgrzewanie jednego z roztworów albo przedmuchiwanie powietrzem pęcherzykowym płuc drugiego roztworu). Roztwory przygotowywano codziennie, ponieważ przechowywanie ich w specjalnych naczyniach bez dostępu powietrza nie dawało pożądaných wyników. Wykonując równolegle 10 oznaczeń czasu reakcji $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$ z krwinkami tego samego osobnika otrzymano średnią czasu uwodnienia równą $25,7 \text{ sek} \pm 1,8$ z odchyleniem krańcowym ($23,1'' - 28,5''$).

Aby móc porównywać ze sobą wyniki osób badanych, obliczano wskaźnik aktywności karboanhydrazowej jednej krwinki (I k-a) ze

wzoru $I \text{ k-a} = \frac{R_0 - R}{N}$, gdzie R_0 = czas reakcji nie katalizowanej,

R = czas reakcji katalizowanej, a N = ilość erytrocytów w 1 mm^3 . Ponieważ wskaźnik ten jest mały mnożono go wszędzie w zestawieniach przez 10^6 . Oznaczeń hematokrytu dokonywano metodą Wintrobe'a (3).

Wyniki

Z badań krwi osób zdrowych metodami podanymi otrzymano wartości następujące:

Aktywność karboanhydrazy krwinek czerwonych	osób 70	I k-a (wskaźnik aktywności krwinki) 20,01 $\sigma \pm 1,40$ ε 0,16. Wartości krańcowe 17,0 — 23,0. R (czas reakcji katalizowanej): średnia 19 sek (14 — 26"). Aktywność krwinek czerwonych wyrażona w jednostkach E Brinkmana: średnia 4,79 jedn. (3,23 — 6,85)
Objętość krwinki	50	Średnia: 0,97 (0,88 — 1,07) σ 0,049 ε 0,0069
Cynk w surowicy	10 ♂	Średnia 174 $\mu\text{g} \%$ (126 — 209 $\mu\text{g} \%$) $\sigma \pm 34$ ε 10,75
	10 ♀	Średnia 138 $\mu\text{g} \%$ (114 — 162 $\mu\text{g} \%$) $\sigma \pm 17$ ε 6,37
Cynk w krwinkach czerwonych w 10^9 erytrocytów		Średnia 0,56 μg (0,51 — 0,63)
	8 ♂	$\sigma \pm 0,045$ ε 0,015
	5 ♀	Średnia 0,48 μg (0,49 — 0,51) $\sigma \pm 0,0223$ ε 0,09

Wyniki z badania aktywności karboanhydrazy krwinkowej osób chorych zebrano w grupie i przedstawiono je poniżej.

Grupa 1. Niedokrwistość złośliwa.

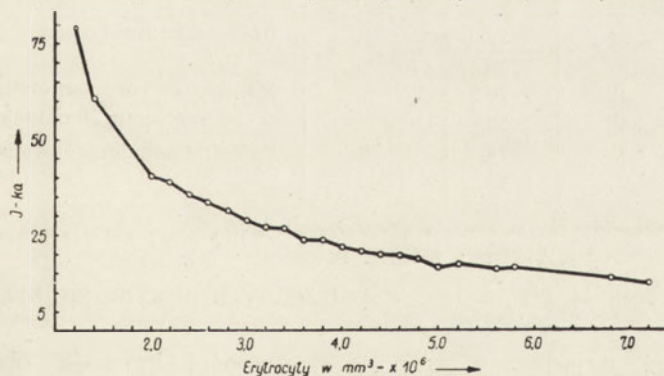
Nr przyp.	Erytroc. $\text{mm}^3 \times 10^6$	Przyp. reakcji w sek	I k-a	Nr przyp.	Erytroc. $\text{mm}^3 \times 10^6$	Przyp. reakcji w sek	I k-a
1	2,23	82,4	36	11	2,00	88,8	44
2	3,12	83,5	26	37	3,30	85,5	26
5	2,00	89,8	44	49	4,27	94,6	22
7	3,05	91,8	30	72	3,51	85,3	24
8	2,89	83,8	28	75	2,77	93,5	34
10	2,72	93,6	34	80	2,28	92,1	40

$$\sigma = \text{średnie odchylenia od średniej} \quad \sqrt{\frac{(x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$\varepsilon = \text{średni błąd średniej arytmetycznej} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

Nr przyp.	Erytroc. mm ³ × 10 ⁶	Przyp. reakcji w sek	I k-a	Nr przyp.	Erytroc. mm ³ × 10 ⁶	Przyp. reakcji w sek	I k-a
85	2,78	93,1	34	147	1,01	84,7	83
102	4,20	93,4	22	152	3,06	85,9	28
107	3,49	83,9	24	153	3,82	89,1	23
112	3,36	87,3	26	157	3,92	87,5	22
119	2,86	91,5	32	160	3,19	84,0	26
128	1,14	66,5	58	182	2,00	79,8	39
146	3,36	96,7	29				
Grupa 2. Niedokrwistości niedobarwliwe.							
6	2,14	69,0	32	86	3,88	89,5	23
9	1,26	78,5	62	88	3,35	92,6	28
18	2,38	89,8	37	90	2,45	85,0	35
19	2,98	92,6	31	100	3,95	89,9	23
23	3,35	93,0	27	108	3,12	87,4	28
34	3,50	87,9	25	132	3,61	85,9	24
59	3,50	87,5	25	140	3,72	91,5	25
63	3,39	91,9	27	148	3,91	92,2	24
81	3,51	93,2	26	163	3,53	88,3	25
84	3,26	87,8					
Grupa 3. Białaczki.							
39	2,27	68,5	30	180	3,43	82,7	24
42	2,07	77,0	37	184	2,39	82,2	34
43	2,48	74,2	29	185	2,60	87,5	33
44	3,48	78,5	22	188	3,65	89,7	24
45	3,83	82,9	22				
125	3,03	81,5	27				
150	3,32	83,8	25				
179	3,08	82,3	26				
Grupa 4. Schorzenia wątroby i dróg żółciowych.							
16	3,58	85,5	24	132	3,61	85,9	24
21	3,52	89,7	25	134	3,86	85,6	22
50	3,68	87,0	24	159	2,88	87,0	30
52	4,37	82,4	19	161	3,09	82,1	26
56	3,14	87,5	28	164	3,61	88,0	24
65	3,56	93,5	26	167	3,79	95,0	25
Grupa 5. Choroby przewodu pokarmowego.							
13	3,48	93,3	27	89	3,32	93,5	28
22	4,52	87,5	19	134	3,86	85,6	22
58	3,67	89,9	24	156	4,30	92,2	21
78	3,49	94,5	27				

Nr przyp.	Erytroc. $\text{mm}^3 \times 10^6$	Przyp. reakcji w sek	I k-a	Nr przyp.	Erytroc. $\text{mm}^3 \times 10^6$	Przyp. reakcji w sek	I k-a
Grupa 6. Schorzenia układu krążenia.							
25	2,78	86,0	30	158	4,15	91,0	21
33	4,87	86,2	17	162	3,57	92,0	25
46	3,83	85,5	22	166	4,00	91,8	23
24	3,77	82,3	22	170	4,30	86,8	20
55	3,63	92,3	25	171	4,10	94,8	23
95	3,77	92,0	24	172	3,92	81,8	20
137	5,47	89,0	16				
Grupa 7. Schorzenia układu oddechowego.							
29	3,62	87,5	24	51	4,42	93,0	21
32	4,21	85,9	20	98	4,14	90,8	22
38	4,10	88,5	21	165	3,90	92,5	23
47	4,10	82,0	20	169	4,50	94,6	21
48	3,69	86,6	23	192	4,47	91,9	21
Grupa 8. Choroba nadciśnieniowa.							
20	3,84	89,8	23	64	3,50	91,3	26
53	4,02	87,3	22	91	4,10	88,8	21
54	4,36	89,4	21	193	4,76	92,4	19
Grupa 9. Siatkowce.							
35	4,01	83,0	20	151	4,06	85,5	21
62	3,85	88,1	23	186	4,42	90,0	20
Grupa 10. Anemie z niedoboru żelaza.							
101	4,20	90,8	21	174	3,67	84,0	22
133	2,87	63,5	22	176	4,02	82,0	20
139	3,48	89,4	25				
Grupa 11. Anemie hemolityczne.							
70	1,00	86,3	86	175	3,39	83,8	25
82	2,83	90,7	32				
Grupa 12. Czerwienice.							
40	7,20	100	13	178	6,66	95,8	14
104	5,52	91,1	17	190	5,19	95,0	18



Rys. 1. Zależność I-ka od ilości krwinek czerwonych.

Celem krytycznej oceny otrzymanych wyników przeprowadzono wyliczenia statystyczne dla poszczególnych grup, które podano w zestawieniu 1.

Zestawienie nr 1

Grupa	Przyp. (średnia)	I k-a	σ	ε	t*	P**
1	87,5	33,38	$\pm 13,2$	5,09	2,62	0,20 > P > 0,01
2	88,07	29,15	$\pm 8,85$	2,08	4,37	P > 0,001
3	80,09	27,75	$\pm 4,90$	1,41	5,45	P > 0,001
4	87,43	24,75	$\pm 2,77$	0,80	5,83	P > 0,001
5	90,93	24,00	$\pm 3,46$	1,68	2,36	0,1 > P > 0,05
6	88,57	22,15	$\pm 3,62$	1,00	2,11	0,1 > P > 0,05
7	89,33	21,60	$\pm 1,35$	0,42	3,61	0,01 > P > 0,001
8	89,50	22,00	$\pm 2,14$	0,85	2,31	0,1 > P > 0,05
9	86,45	21,00	$\pm 1,41$	0,70	1,37	0,3 > P > 0,2
10	81,94	22,00	$\pm 1,87$	0,83	2,37	0,1 > P > 0,05
11	86,93	47,66	$\pm 33,38$	19,29	1,43	0,3 > P > 0,2
12	95,47	15,5	$\pm 2,5$	1,25	3,60	0,05 > P > 0,02

Dalsze dwa zestawienia uwidaczniają zachowanie I k-a pod wpływem leczenia (zestawienie 2) i zależność I k-a od czynności krwinek czerwonych (zestawienie 3).

Zestawienie nr 2

Nr przyp.	Erytroc. mm ³ , $\times 10^6$	I k-a	Dni lecz.	Rozpoznanie
11	2,00	44	11	Anemia złośliwa
11	3,00	30		
68	3,14	30	7	Niedokrwistość wtórna
68	3,32	28		
82	2,83	32	9	Anemia hemolityczna
82	3,50	25		
92	4,50	20	1	Małopłytkowość samoistna
92	4,50	20		po wycięciu śledziony
95	3,77	24	8	Powolne zapalenie wsierdzia
	3,64	25		

* t = wskaźnik znamienności (różnicy istotnej),

** P = prawdopodobieństwo z tablic Fischera.

Dane przeniesiono na osie współrzędnych otrzymując krzywą. (Patrz rys. 1).

Ponieważ największy wzrost aktywności krwinek obserwowano w grupie 1, należało sprawdzić, czy nie jest to związane ze zwiększoną

Zestawienie nr 3

Zależność I k-a od ilości krwinek czerwonych

Chorzy		Zdrowi		
Liczba krwinek w mm ³ , × 10 ⁶	I k-a	Suma przyp.	I k-a	Suma przyp.
1,00 — 1,20	79,2	4		
1,20 — 1,40	60,5	2		
1,40 — 1,60	—	—		
1,60 — 1,80	—	—		
1,80 — 2,00	41,0	2		
2,00 — 2,20	39,2	4		
2,20 — 2,40	36,7	7		
2,40 — 2,60	34,0	4		
2,60 — 2,80	33,0	6		
2,80 — 3,00	29,1	7		
3,00 — 3,20	27,6	13		
3,20 — 3,40	27,0	10		
3,40 — 3,60	24,9	22		
3,60 — 3,80	24,1	25		
3,80 — 4,00	22,7	21		
4,00 — 4,20	21,4	25	21,5	8
4,20 — 4,40	20,8	15	21,2	19
4,40 — 4,60	20,2	8	19,8	15
4,60 — 4,80	19,3	3	19,0	21
4,80 — 5,00	17,0	1	18,1	6
5,00 — 5,20	18,0	1	17,0	1
5,20 — 5,40	—	—		
5,40 — 5,60	16,5	2		
5,60 — 5,80	17,0	1		
5,80 — 6,00	—	—		
6,00 — 6,20	—	—		
6,20 — 6,40	—	—		
6,40 — 6,60	—	—		
6,60 — 6,80	14,0	1		
6,80 — 7,00	—	—		
7,00 — 7,20	13,0	1		
7,20 — 7,40	—	—		
7,40 — 7,60	—	—		

objętością krwinki. W tym celu wykonano oznaczenia hematokrytu i I k-a u 50 zdrowych osób, a następnie to samo u 41 chorych. Wyniki otrzymane u chorych zestawiono poniżej.

Ponieważ cynk erytrocytów wchodzi w skład karboanhydryzy, badano jego zawartość w erytrocytach u kilku chorych, u których zaobser-

wowano zwiększoną aktywność anhidrazową krwinek.
Wyniki podano w zestawieniu nr 5.

Zestawienie nr 4

Objętość krwinki	I k-a	Ilość przypadków
0,66	22	1
0,80	18	1
0,89	20	1
0,90	20	2
0,91	25	1
0,93	20,5	2
0,94	14	1
0,95	25	2
0,97	24	3
1,00	27,3	3
1,02	21,6	5
1,03	47,3	3
1,04	20	1
1,05	20,5	2
1,07	22	3
1,09	25	1
1,10	39	1
1,13	25	2
1,14	28	2
1,18	23	1
1,19	33	1
1,30	59	1
1,32	26	1

Zestawienie nr 5

Nr kol.	Rozpoznanie	Zn w surowicy $\mu\text{g}\%$	Zn w 10^9 erytrocyt. w μg	I k-a	Liczba erytrocyt. w $\text{mm}^3 \times 10^6$
1	Niedokr. złośli.	87	1,02	34	2,72
2	„ „	98	1,41	44	2,00
3	„ pokrwot.	81	0,90	31	2,98
4	Niedokr. złośli.	92	1,03	80	1,00
	„ „	108	0,92	29	2,85
5	„ „	77	1,39	40	2,28
6	Wrzód dwunastnicy	146	0,54	21	4,30 (kontrola)

Badano także poziom cynku surowicy u 17 chorych na różne choroby (zestawienie nr 6) oraz u 7 ciężarnych i 7 noworodków.

Zestawienie nr 6

Rozpoznanie	Chory	Poziom Zn w surowicy $\mu\text{g}\%$	Uwagi
Niedokrwistość złośliwa	O.K.	87	po leczeniu „
	O.A.	98	
	F.	92	
	L.G.	139	
	W.J.	88	
	G.J.	184	
	K.W.	155	
	S.J.	135	
Schorzenia wątroby	N.M.	61	
	S.N.	139	
	S.	105	
Niewydolność krążenia	B.J.	88	
	S.H.	126	
	S.S.	88	
Zmiany kiłowe tętnicy głównej		105	po leczeniu
	Z.W.	118	
	S.M.	92	
	M.M.	102	

Poziom cynku surowicy u ciężarnych i noworodków.

Zestawienie nr 7

Badany	Krew ciężarnych Zn w $\mu\text{g}\%$	Krew pępowinowa Zn w $\mu\text{g}\%$
W.W. IX m	90	
D.K.	97 ⁺	103
K.R.		76
M.P.		78
K.W. VI m	125	
O.B.	87 ⁺	78 ⁺
P.W. VIII m	103	
Ch.O.		89
K.K.		83
L.M. V m	121	
F.P.	96 ⁺	85 ⁺

(Krzyżyk oznacza, że otrzymane wyniki pochodzą z oznaczeń krwi matki i dziecka).

Omówienie wyników

Otrzymana w pracy tej średnia zawartość enzymu w erytrocytach u 70 osób zdrowych i wyrażona w jednostkach używanych w metodzie Brinkmana (E) równa jest 4,78 E (z odchyleniem 3,23 — 6,85).

V. Goor otrzymywał wartości równe 2,61 E (2).

Jak wynika z danych literatury, wyniki ilościowe badań nad enzymami nie dają się często porównywać ze sobą. I tak stosując metody łódkowe (manometryczne) do oznaczeń zawartości karboanhydrazy w erytrocytach niżej wymienieni autorzy znajdowali (4):

Meldrum i Roughton 0,37 — 0,68 E/mm³ (u 10 zdrowych)

Hodgson 1,39 — 1,75 E/mm³ (u 10 zdrowych)

Lambie 0,93 — 1,50 E/mm³ (u 15 zdrowych)

Z zestawienia 1 widać, że nie można rozpatrywać zachowania się enzymu w rozmaitych stanach chorobowych porównując wartości przyspieszenia reakcji uwodnienia CO₂ ani też ilości enzymu wyrażonych w jednostkach E, ponieważ nie odzwierciedlają one istoty badanego zagadnienia. Wydaje się zatem, że wprowadzenie wskaźnika I k-a jest celowe i uzasadnione.

Ilości cynku w surowicy i erytrocytach otrzymane w pracy niniejszej w porównaniu z danymi piśmiennictwa przedstawiają się następująco:

	Rok	Zn w surowicy w µg%	Zn w plazmie w µg%	Zn w 10 ⁹ erytroc. w µg
Burstein (1) Valee	1929		333	0,75
Gibson (6)	1949		300	1,34
Berfenstam (1)	1949		113 (dzieci)	1,30
Wolff (4)	1951	średnia 160 — 170		0,88
Własne wyniki		średnia 156		0,52

Z zestawień grup chorych wynika, że we wszystkich stanach chorobowych aktywność anhydrazowa krwinek czerwonych jest zwiększona. W rozpatrywaniach tych należy pominąć grupę siatkowic, anemii hemolitycznej i czerwienic, ponieważ liczba przypadków jest za mała do wyciągania wniosków.

I k-a podlega wahaniom w czasie leczenia zbliżając się przy poprawie stanu chorego do wartości prawidłowych. Największe wartości I k-a obserwowano u chorych przed rozpoczęciem leczenia. Po ukończe-

niu leczenia, gdy ilość krwinek czerwonych osiągała normalne wartości, wskaźnik osiągał także wartości jak u osób zdrowych. W przypadkach chorych z podwyższoną czynnością karboanhydrazową krwinek poziom cynku erytrocytów jest zwiększony, natomiast zawartość cynku w surowicy jest znacznie zmniejszona. Być może jest to pierwszą rezerwą cynku karboanhydrazy erytrocytów. Jak wynika z danych, między aktywnością krwinek a ich ilością istnieje stosunek odwrotnie proporcjonalny. Stwierdzono, że nie ma związku między objętością krwinek a ich aktywnością. Najlepszym przykładem tego są przypadki nr 160 (niedokrwistość złośliwa), w którym przy największym spośród obserwowanych objętości krwinki równej 1,32 aktywność jej równała się 26 — oraz przypadek nr 174 (niedokrwistość z niedoboru żelaza). Przy objętości krwinki 0,66 aktywność jej pozostawała w granicach normy.

W przypadkach chorób wątroby, niedokrwistości, niewydolnościach krążenia i w ciąży stwierdzano obniżenie się poziomu cynku surowicy. Zbliżone wartości poziomu cynku surowicy noworodków i matek nasuwa przypuszczenie, że cynk przechodzi przez łożysko. Skąpa ilość oznaczeń cynku nie pozwala na wyciąganie wniosków.

Streszczenie

Oznaczano aktywność karboanhydrazy krwinek czerwonych metodą Brinkmana u 70 osób zdrowych i 183 chorych na różne schorzenia.

Badano także poziom cynku w surowicy i w erytrocytach u osobników zdrowych oraz zawartość cynku w surowicy ciężarnych, noworodków i w różnych stanach chorobowych.

Aktywność karboanhydrazy erytrocytów przeliczano na jedną krwinkę. Aktywność krwinki nie jest zależna od rodzaju schorzenia, a jedynie od ilości erytrocytów pozostając do niej w stosunku odwrotnie proporcjonalnym.

Aktywność krwinki nie zależy od jej objętości, co wykazano oznaczając objętość krwinek oraz ich aktywność karboanhydrazową.

Poziom cynku w surowicy osób zdrowych wynosi przeciętnie 174 $\mu\text{g} \%$ u mężczyzn i 138 $\mu\text{g} \%$ u kobiet.

W stanach chorobowych, w ciąży poziom cynku w surowicy obniża się znacznie. U noworodków poziom cynku surowicy zbliżony jest do zawartości we krwi matki.

W przypadkach chorób z podwyższoną czynnością karboanhydrazową zwiększa się poziom cynku erytrocytów, a obniża się w surowicy.

L I T E R A T U R A

1. Berfenstam R.: *Acta Paediatrica Suppl.* **87**, 1952.
2. Goor H. *Enzymologia* **13**, 73, 1948.
3. Gradwohl A.: *Clinical Laboratory Methods and Diagnosis*. Vol. 1, 1948, str. 528.
4. Wolff H., Amann Rudolf: *Klin Wchschr.* **29**, 316, 1951.
5. Wolff H., Maske H., Stampel H., Baumgarten B.: *Klin. Wchschr.* **29**, 670, 1951.
6. Valee B., Gibson I.: *J. Blood* **4**, no 5, 1949.

СОДЕРЖАНИЕ КАРБОАНГИДРАЗЫ И ЦИНКА В КРОВИ ЗДОРОВЫХ И БОЛЬНЫХ ЛЮДЕЙ

Резюме

У 70 здоровых и 183 больных на разные болезни людей была определена активность карбоангидразы красных кровяных телец по методу Brinkmana.

Был исследован уровень цинка в сыворотке и в эритроцитах здоровых людей, а также был исследован уровень цинка в сыворотке беременных, новорождённых и во время различных заболеваний.

Активность карбоангидразы эритроцитов была пересчитана на один эритроцит. Активность эритроцита не зависит от рода болезни, а только от количества эритроцитов, находящихся к нему в обратнопропорциональном отношении.

Активность эритроцита не зависит от его объёма. Это было обнаружено при исследовании объёма эритроцитов и их карбоангидразной активности. Уровень цинка в сыворотке здоровых людей составляет в среднем у мужчин 174 $\mu\text{g}/\%$ и у женщин 138 $\mu\text{g}/\%$.

В большом состоянии и во время беременности уровень цинка в эритроцитах значительно понижается. У новорожденных уровень цинка в сыворотке крови приблизительно равен уровню цинка в крови матери.

В случаях болезней связанных с усилением карбоангидразной активности, уровень цинка в эритроцитах возрастает, а в сыворотке понижается.

CARBONIC ANHYDRASE AND ZINC CONTENTS OF THE BLOOD OF HEALTHY AND DISEASED INDIVIDUALS

Summary

The carbonic anhydrase content of red blood cells was determined by the method of Brinkman in 70 healthy individuals and in 183 patients suffering from various diseases.

Studies were also made of the zinc content of serum and erythrocytes in healthy individuals as well as the zinc content of the serum of pregnant females, newborn and in various diseases.

Carbonic anhydrase activity is calculated in terms of that of a single cell. The activity of the cells does not depend on the nature of the disease but only in inverse proportion to the number of erythrocytes.

The activity of the cells does not depend on their volume, as was shown by simultaneous determinations of the volume of the cells and their carbonic anhydrase activity.

The mean zinc content of the serum of healthy individuals is 174 $\mu\text{g } \%$ for men and 138 $\mu\text{g } \%$ for women.

In disease and in pregnancy the zinc content of the serum is markedly reduced. In newborn the serum zinc level is approximately the same as that of the mother.

In diseases accompanied by increased carbonic anhydrase activity, the zinc content of the erythrocytes is increased while that of the serum is decreased.

Otrzymano 30.VIII.1954.

ZOFIA LASSOTA

WYTWARZANIE I ZUŻYWANIE KWASU CYTRYNOWEGO PRZEZ
MYCOBACTERIUM PHLEI

Z Zakładu Biochemii PAN w Warszawie

Kierownik: prof. dr Józef Heller

W poprzedniej publikacji (2) doniesiono, że kultury pięciu różnych szczepów rodzaju *Mycobacterium*, rozwijając się na pożywce syntetycznej nie zawierającej kwasu cytrynowego, wytwarzają w podłożu kwas cytrynowy w ilościach kilku mg na 1 g suchej masy bakteryjnej.

Celem niżej przedstawionej pracy było zbadanie wytwarzania kwasu cytrynowego przez głodujące gotowe masy bakteryjne oraz zużywanie przez nie, jak i przez rozwijające się, normalne komórki, kwasu cytrynowego dodanego do podłoża w znanej ilości.

Doświadczenia przeprowadzono na szczepie *Mycobacterium phlei* (Muzeum Dz. Bakteriologii PZH w Warszawie), tym samym, którego użyto poprzednio (2). Sposób przyrządzania pożywki DGK zmodyfikowanej, ekstrakcji i oznaczania kwasu cytrynowego w pożywce oraz w przypadku doświadczeń z kulturami rozwijającymi się sposób hodowli był identyczny z postępowaniem opisanym w poprzedniej pracy. W eksperymentach z głodującymi masami bakteryjnymi zastosowano podwarstwianie. Używano kolb okrągłodennych (Jena) o pojemności 1 l zamkniętych korkiem z waty i zaopatrzonych w umieszczony w korku kran dwudrożny, którego dolne ramię sięgało dna kolby. W takiej kolbie, zawierającej 500 ml pożywki hodowano drobnoustroje powierzchniowo przez kilkanaście dni do uzyskania dobrze wykształconego kożucha bakteryjnego. Wówczas pożywkę usuwano i wprowadzano do kolby 500 ml jałowego roztworu soli mineralnych o składzie

KH_2PO_4	0,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,02 g
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	0,03 g

zawartych w 1000 ml roztworu o pH 7 (osiągniętym przy pomocy KOH).

Po 30 minutach roztwór soli usuwano, a przemyty w ten sposób kożuch bakteryjny podwarstwiano 500 ml roztworu o takim samym składzie na przeciąg 72 godzin. W doświadczeniach nad zużywaniem kwasu cytrynowego dodawano do jałowego podłoża znaną ilość wyjąłowionego na sączku Seitza standardowego roztworu kwasu cytrynowego. Użyte wyniki przedstawia tablica 1.

Przy obliczaniu stężenia kwasu cytrynowego uwzględniano wartość „ślepej próby” zarówno dla pożywki, na której hodowano bakterie, jak i dla roztworów użytych do podwarstwiania. Otrzymane wyniki wykazują, że głodujące gotowe masy bakteryjne *Myc. phlei*, podobnie jak to wykazał Sym (3) dla *Myc. tub. v. hom. H37Rv* zużywają kwas cytrynowy dodany do podłoża jako jedyne źródło węgla. Zestawienie wyników doświadczeń 5 — 8 wskazuje, że dodany kwas cytrynowy w badanych granicach stężeń nie jest z pożywki zużywany całkowicie przez rozwijające się kultury. Ilość kwasu cytrynowego w pożywce powzrostowej jest tego samego rzędu co stężenie kwasu cytrynowego wytworzonego w podłożu pierwotnie nie zawierającym go, przez rosnące komórki (doświadczenie 1 — 4).

Analogicznie przedstawia się wytwarzanie (doświadczenia 9 — 11) i zużywanie dodanego (doświadczenia 12 — 14) kwasu cytrynowego przez gotowe, głodujące masy bakteryjne. Znalezione końcowe stężenia kwasu cytrynowego w przypadku komórek głodujących całkowicie lub w obecności kwasu cytrynowego są z reguły niższe niż w przypadku tych samych komórek hodowanych na pełnowartościowym podłożu. Wyjątek stanowi jedynie doświadczenie 14.

Wykonano również doświadczenia na pożywce syntetycznej DGK bez kwasu cytrynowego, w której kwas glutaminowy zastąpiono równoważną pod względem azotu ilością węglanu amonu (tzn. 2,7 g $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ w 1 l pożywki). Wyniki przedstawiono w tablicy 2. Przy wyliczeniach uwzględniano wartość „ślepej próby” dla pożywki z węglanem amonu.

Doświadczenie 1 i 2 wykonano w sposób podany w poprzedniej pracy (2), w doświadczeniach 3 — 5 posłużono się opisanym na wstępie podwarstwianiem. Czas podwarstwiania wynosił w tych doświadczeniach 7 dni. W tym okresie masa bakteryjna rozwijała się dalej w sposób widoczny dla oka.

Ilości kwasu cytrynowego w doświadczeniu 1 i 2 nie zostały podane, ponieważ odczyty kolorymetryczne leżały poniżej granicy czułości metody i były bliskie wartości ślepej próby. W doświadczeniach tych kożuch bakteryjny był wyraźnie słabszy niż we wszystkich pozostałych. W doświadczeniach 3 — 5 ta sama kultura *Myc. phlei* wytwarzała kwas

Tablica 1

Wytwarzanie i zużywanie dodanego kwasu cytrynowego przez rozwijające się i przez gotowe glodujące masy bakteryjne (hodowle *Mycobacterium phlei* na 500 ml podłoża, pierwszy pasaż po pożywce Löwensteina)

Nr doświadczenia	Rodzaj podłoża	Czas		Waga suchej masy bakteryjnej g	Dodany kwas cytrynowy mg	Kwas cytrynowy w pożywce powzrostowej		Zużycie dodanego kwasu cytrynowego mg
		hodowli dni	podwarstwiania dni			w całości pożywki mg	na 1 g suchej masy bakteryjnej mg	
1	DGK bez kw. cytr.	15	—	2,62	—	2,74	1,05	—
2	DGK bez kw. cytr.	15	—	2,57	—	1,04	0,40	—
3	DGK bez kw. cytr.	17	—	2,86	—	2,89	1,22	—
4	DGK bez kw. cytr.	17	—	3,09	—	6,47	2,09	—
5	DGK bez kw. cytr.	15	—	2,79	10	2,47	0,89	7,53
6	DGK bez kw. cytr.	15	—	3,10	10	3,67	1,18	6,33
7	DGK bez kw. cytr.	15	—	3,35	50	6,15	1,84	43,85
8	DGK bez kw. cytr.	15	—	2,81	50	7,99	2,84	42,01
9	DGK bez kw. cytr. miesz. soli	11	3	2,11	—	0,53	0,25	—
						0,30	0,14	
10	DGK bez kw. cytr. miesz. soli	11	3	2,09	—	0,38	0,18	—
						0,17	0,08	
11	DGK bez kw. cytr. miesz. soli	14	3	2,52	—	0,35	0,14	—
						0,15	0,06	
12	DGK bez kw. cytr. miesz. soli	11	3	2,31	—	0,92	0,40	—
						0,13	0,06	4,87
13	DGK bez kw. cytr. miesz. soli	11	3	2,16	—	0,34	0,16	—
						0,20	0,09	9,80
14	DGK bez kw. cytr. miesz. soli	11	3	2,43	—	0,64	0,27	—
						1,76	0,73	8,24

Tablica 2

Wytwarzanie kwasu cytrynowego wobec organicznego i nieorganicznego źródła azotu
(kultury *Mycobacterium phlei* na 500 ml podłoża syntetycznego DGK bez kwasu
cytrynowego, pierwszy pasaż po pożywce Löwensteina)

Nr doświad- czenia	Źródło azotu	Czas		Waga suchej masy bakteryjnej g	Kwas cytrynowy w całości pożywki mg	Kwas cytrynowy na 1 g suchej masy bakteryjnej mg
		hodowli dni	podwar- stwienia dni			
1	$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	18	—	1,57	śląd	—
2	$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	18	—	1,57	śląd	—
3	$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	17		4,03	6,48	1,61
	kwas glutaminowy		7		0,34	0,08
4	$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	17		3,93	5,00	1,27
	kwas glutaminowy		7		0,65	0,16
5	$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	17		3,25	1,95	0,60
	kwas glutaminowy		7		0,25	0,08

cytrynowy w podłożu zarówno wobec kwasu glutaminowego, jak i wobec węgla amonowego jako źródła azotu. Ilości kwasu cytrynowego wytwarzane w czasie podwarstwiania pożywką z kwasem glutaminowym są tego samego rzędu co w podobnie prowadzonych hodowlach w doświadczeniach 9 — 12 tablicy 1.

Dyskusja

Stwierdzenie w hodowlach *Mycobacterium phlei* określonego, dość niskiego stężenia kwasu cytrynowego w podłożu, które go pierwotnie nie zawierało, oraz zużywanie dodanego do podłoża kwasu do takiego samego poziomu, pozwala przypuszczać, że poziom ten może odpowiadać równowadze kwasu cytrynowego między wnętrzem komórki, a podłożem. Równowaga ta ustala się tak w przypadku rozwijających się na pełnowartościowym podłożu, jak i w przypadku głodujących mas bakteryjnych, chociaż dla tych ostatnich na niższym poziomie.

Ponieważ ta sama kultura *Myc. phlei* wytwarza kwas cytrynowy niezależnie od tego, czy źródłem azotu jest kwas glutaminowy, czy węgiel amonowy, powstawanie kwasu cytrynowego nie jest związane wyłącznie z przemianą reszty bezazotowej kwasu glutaminowego. Stężenie kwasu cytrynowego w pożywce DGK bez kwasu cytrynowego jest niższe, jeśli przy tej samej objętości pożywki hodowlę prowadzi się w kolbie 1 l okrągłodennej, niż przy hodowli w 1,5 l kolbie Erlenmeyera. Może to być wynikiem zmienionego stosunku objętości pożywki do jej powierzchni. Wpływ tego czynnika na ilość wytwarzanego kwasu cytrynowego wykazali u pleśniaków Doegler i Prescott (1).

Streszczenie

Wykazano, że rozwijające się na pożywce syntetycznej kultury *Myc. phlei* zużywają dodany do podłoża w ilości 10 — 50 mg kwas cytrynowy, tak że jego stężenie w pożywce powzrostowej wynosi 0,89 — 2,48 mg na 1 g suchej masy bakteryjnej. *Myc. phlei* w czasie wzrostu na tymże podłożu bez kwasu cytrynowego wytwarza kwas cytrynowy w ilości 0,40 — 2,09 mg na 1 g suchej masy bakterii. Głodujące gotowe masy bakteryjne wytwarzają w przeliczeniu na 1 g suchej około 0,1 mg kwasu cytrynowego, zużywają zaś kwas cytrynowy dodany jako jedyną odżywkę w ilości 5 — 10 mg tak, że jego poziom w pożywce powzrostowej wynosi 0,1 — 0,7 mg na 1 g suchych bakterii.

Myc. phlei wytwarza kwas cytrynowy również wówczas, gdy w pożywce jako źródło azotu służy zamiast kwasu glutaminowego węgiel amonowy.

LITERATURA

1. Doegler W. P., Prescott S. C.: *Ind. Eng. Chem.* **26**, 1142, 1934.
2. Lassota Z.: *Acta Biochimica Polonica* **1**, 239, 1954.
3. Sym E. A.: *Med. Dośw. i Społ.* **25**, 295, 1947.

ОБРАЗОВАНИЕ И РАСХОД ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ МИКРОБОМ
MYCOBACTERIUM PHLEI

Резюме

Обнаружено, что развивающиеся на синтетической среде микробы *Myc. phlei* расходуют добавленную к среде лимонную кислоту в количестве 10 — 50 мг, так что её концентрация в питательной среде после роста на ней бактерий соответствует 0,89 — 2,84 мг на 1 г сухого веса бактерий. Микробы *Myc. phlei* во время роста на питательной среде без лимонной кислоты в количестве 0,40 — 2,09 мг на 1 г сухого веса бактерий. Голодающие готовые бактериальные массы образуют в пересчёте на 1 г сухого веса бактерий около 0,1 мг лимонной кислоты, расходуя лимонную кислоту (единственный источник питания в питательной среде) в количестве 5 — 10 мг таким образом, что уровень лимонной кислоты в среде после роста на ней бактерий будет 0,1 — 0,7 на 1 г сухого веса бактерий. *Myc. phlei* образуют лимонную кислоту и тогда, когда вместо глутаминовой кислоты в качестве источника азота в питательную среду прибавлен углекислый аммоний.

PRODUCTION AND UTILIZATION OF CITRIC ACID BY *MYCOBACTERIUM PHLEI*

Summary

It has been shown that *Myc. Phlei* cultures utilize citric acid when grown on a synthetic medium containing 10—50 mg. of citric acid, the concentration of the acid in the culture medium, flowing growth, being 0,89 — 2,84 mg. per gm. of bacteria (dry weight).

Myc. phlei, growing on the same medium without citric acid, produce 0,40 — 2,09 mg. of citric acid per gm. of bacteria (dry weight). Starved bacteria produce about 0,1 mg. of citric acid per gm. dry weight and utilize 5 — 10 mg if citric acid is the sole nutrient, so that the concentration of citric acid in the culture medium, flowing growth, to 0,1 — 0,7 mg per gm. dry weight.

Myc. phlei also synthesizes citric acid when the nitrogen source in the medium is ammonium carbonate in place of glutamic acid.

Otrzymano 20.X.1954.

W. LEYKO I S. GROSS

ZWIĄZKI ADENINOWE KRWI LUDZKIEJ

I. Oznaczenia polarograficzne i spektrofotometryczne adeniny we krwi odbiałzonej

Z Zakładu Biochemii Uniwersytetu Łódzkiego

Kierownik: Prof. dr A. Dmochowski

i Instytutu Medycyny Pracy w Łodzi

Dyrektor: Prof. dr E. Paluch

Zawartość nukleotydów adeninowych we krwi była od dawna przedmiotem zainteresowań wielu badaczy (Herbrand i Jaeger (10)). Bass (3) (1914) oznaczał azot purynowy (bez kwasu moczowego) w hydrolizatach z odbiałzonej krwi. Otrzymane przez niego wartości wahały się w granicach od 3,2 do 9 mg N w 100 g krwi, co odpowiada około 6,5 do 18 mg % adeniny. Thannhauser i Czoniczer (21) (1920) oznaczali azot nukleotydów w surowicy odbiałzonej. W surowicach normalnych otrzymali oni około 2,3 mg % N, co odpowiada około 4,4 mg % adeniny. W obu przytoczonych powyżej pracach do wykonania oznaczenia pobierano około 100 ml krwi. Buell i Perkins (5) (1928) zaproponowały do badania zawartości nukleotydów adeninowych we krwi nefelometryczną metodę oznaczania adeniny w hydrolizatach z odbiałzonej krwi. Mozołowski (15) (1929) zarzucił autorom tej pracy, że nie zdawali sobie sprawy z szybkiej dezaminacji nukleotydów we krwi. Buell (4) (1935) wprowadziła następnie pewne modyfikacje swojej metody i podała, że krew odbiałczano natychmiast po pobraniu. Metoda nefelometryczna jest wprawdzie bardzo skomplikowana, wydaje się jednak stosunkowo specyficzna i dokładna, a ponadto pozwala wykonać oznaczenie z niewielkiej objętości, tj. z 2 ml krwi. Buell podała, że dla mężczyzn zawartość nukleotydu adeninowego wahała się w granicach 24 — 37 mg %, co odpowiada 8,9 — 13,7 mg % adeniny, a dla kobiet 22 — 33 mg % nukleotydu, co odpowiada 8,1 — 12,2 mg % adeniny.

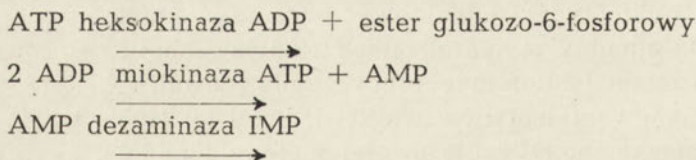
Zagadnienie znalezienia właściwej metody oznaczania nukleotydów adeninowych we krwi i tkankach stało się szczególnie ważne po wy-

jaśnieniu zasadniczej roli kwasu adenozyntrójfosforowego dla naszego ustroju. Green i współpracownicy (8) (1943) wysunęli hipotezę, że istotną przyczyną wstrząsu urazowego jest zakłócenie normalnego rozmieszczenia nukleotydów w organizmie. Dla sprawdzenia swej hipotezy autorzy ci przeprowadzili szereg badań na zwierzętach, stosując następujące metody oznaczania nukleotydów:

1. biologiczna metoda (7), wykorzystująca działanie związków adeninowych na serce świnki morskiej. Autorzy ci (18) (1944, 1945, 1949) podali, że zawartość związków adeninowych, wyrażonych jako adenozyna, wynosiła w normalnej, pełnej krwi królika około 200 jednostek (μg adenozyny na ml), co odpowiada około 10 mg % adeniny.

2. oznaczenie pentoz w plazmie metodą Mejbaum (4). Autorzy ci (9) (1949) podali, że w normalnej plazmie królika i szczura zawartość pentoz wynosiła około 5 mg %, co odpowiada około 5 mg % adeniny. Ostatnio wprowadzono dwie enzymatyczne metody oznaczania związków adeninowych. Jedna z nich — Strauba (19), dotycząca oznaczania ATP, oparta jest na wpływie ATP na lepkość aktomiozynu. W metodzie tej wykreśla się szereg krzywych lepkości jako funkcji czasu i przez interpolację znajduje się zawartość ATP w odpowiednich ekstraktach. Druga metoda — Kalckara (11) (1947) oparta jest na zmianach absorpcji w nadfiolecie na skutek działania specyficznych enzymów. Metoda ta została zastosowana do badań zawartości nukleotydów adeninowych we krwi przez Albauma i współpracowników (1, 2, 17) (1950 — 1953).

Przy użyciu 3 różnych enzymów, dodanych do odpowiednio przygotowanych odbiałczonych próbek krwi, składniki adeninowe były stopniowo przekształcane w kwas inozynowy według następującego schematu:



Zmiany, wywołane działaniem każdego enzymu, mierzone były przy 265 m μ na spektrofotometrze Beckmanna. Całkowitą zawartość puryn oznaczano w odbiałczonej krwi, nie poddanej działaniu enzymów, mierząc absorpcję przy 258 m μ i przyjmując wszystkie obecne puryny za adeninę. Autorzy (17) zaznaczyli, że z normalnych składników krwi tylko kwas moczowy i kreatynina wykazują niespecyficzne pochłanianie w tym zakresie widma; błąd spowodowany obecnością tych składników nie przekracza jednak 0,4 do 0,7 mg %. Dla normalnej krwi autorzy ci (17) podali całkowitą zawartość puryn (adeniny) w granicach około

10 — 15 mg %, natomiast sumę ATP, ADP, AMP wyrażoną jako adenina w granicach 4 — 10 mg % adeniny. Zadziwiające są tu wahania adeniny nukleotydów (ATP, ADP i AMP) dla jednego osobnika, szczególnie w porównaniu ze stosunkowo stałym poziomem wszystkich puryn (tablica 1).

Tablica 1

Wahania zawartości nukleotydów we krwi normalnego osobnika według Albauma i współpracowników (17)

1 Data pobrania krwi	2 Całkowite puryny	3 Nukleotydy (ATP + ADP + AMP)	4 Różnica 2 — 3
28. 2. 50	15,3 mg% adeniny	5,1 mg% adeniny	10,2 mg%
7. 7. 50	10,0 „	8,2 „	1,8 „
12. 9. 50	10,3 „	4,4 „	5,9 „
17.10.50	12,4 „	7,5 „	4,9 „
25. 7. 51	12,2 „	9,5 „	2,7 „

Inni autorzy podawali dość stały poziom nukleotydów adeninowych we krwi, np. Buell (4) zaobserwowała w ciągu 4 miesięcy zawartość nukleotydów adeninowych w granicach 29 — 31 mg %, co odpowiada 10,7 — 11,4 mg % adeniny. Ostatnio ukazała się praca Święcickiej (20) (1954), dotycząca frakcji fosforowych konserwowanej krwi. Autorka oznaczała kwas adenylotrójfosforowy jako fosfor łatwo hydrolizujący się, tj. po 8 minutach hydrolizy w 1 N HCl. Dla erytrocytów podała ona wartości od 6,2 — 11,3 mg % fosforu, co odpowiadałoby około 2,8 do 5 mg % P w pełnej krwi, a w przeliczeniu na adeninę 6 do 11 mg % adeniny, pochodzącej z ATP.

Poniżej przytaczamy zebrane wyniki, otrzymane przez różnych autorów na zawartość związków adeninowych w normalnej, odbiałczonej krwi ludzkiej (tablica 2).

Część doświadczalna

W niniejszej pracy podane są wyniki polarograficznych i spektrofotometrycznych oznaczeń adeniny, pochodzącej ze wszystkich jej związków, w pełnej krwi, odbiałczonej kwasem trójchlorooctowym. Oznaczenia wykonano według uprzednio podanej metody (13). W metodzie tej krew, po odbiałczeniu, zostaje poddana hydrolizie za pomocą 1 N H₂SO₄. Z otrzymanego hydrolizatu puryny wytrąca się 1 M zawiesiną Ag₂O,

Tablica 2

Zawartość związków adeninowych kwasorozpuszczalnych w normalnej krwi ludzkiej

L p.	Autor	Rok ogłosz. pracy	mg% adeniny		Metoda
			pełna krew	surowica lub osocze	
1	Bass (3)	1914	6,5 — 18	—	azot purynowy (także we krwi patologicznej)
2	Thannhauser i Czoniczer (21)	1920	—	4,4	azot nukleotydów
3	Buell i Perkins (5) Buell (4)	1928	8,1 — 13,7	ślady	nefelometria
		1935			
4	Stoner i Green (18)	1944 1949	10*		biologiczna
5	Green, Stoner i Bielschowsky (9)	1949	—	5*	ryboza
6	Kalckar (11)	1947	—	ślady	spektrofotometria przy użyciu enzymów
7	Rottino, Hofman i Albaum (17)	1952	10 — 15	—	całkowita zawartość puryn ATP + ADP + AMP, spektrofotometria przy użyciu enzymów
			4 — 10	—	
8	Święcicka (20)	1954	6 — 11	0,7	P-łatwo hydrolizujący, krew konserwowana

* Przytoczone dane dotyczą krwi królika. Ponieważ Buell (5) stwierdziła, że zawartości nukleotydów adeninowych we krwi królika i ludzkiej są bardzo zbliżone, umieściliśmy je również dla porównania.

a następnie osad srebrowy puryn ekstrahuje się 1 N HCl w temperaturze 100°C. W ekstrakcie oznacza się polarograficznie zawartość adeniny. Równoległe z pomiarami polarograficznymi wykonywano oznaczenia spektrofotometryczne. Poniżej podajemy przykład całości oznaczenia.

Przykład oznaczenia

Krew, przypadek nr 11, próba (hydrolizat) nr 25.

Do oznaczenia wzięto 0,8 ml krwi (tj. pobrano 2 ml na 2 równoległe

oznaczenia). Puryny, po wytrąceniu srebrem, ekstrahowano 1 N HCl do 10 ml.

1. OZNACZENIE POLAROGRAFICZNE

Oznaczenie wykonywano na polarografii Heyrovskiego ze zwykłym wyposażeniem. Do naczynka polarograficznego wzięto 0,3 ml ekstraktu, dodano 0,7 ml 0,83 N KOCH i 1,5 ml 0,21 N HClO₄, wykreślono krzywą (1), następnie dodano 0,2 ml adeniny o stężeniu 15 µg/l ml, wykreślono krzywą (2) i dodano jeszcze raz 0,2 ml tej samej adeniny — wykreślono krzywą (3) — rysunek 1. Roztwór badany wysycano CO₂ przez 5 minut, a następnie po 2 minuty po każdym dodaniu adeniny.

Stężenie adeniny obliczono ze wzoru

$$c_x = \frac{i_1 \cdot v_{\text{dod}} \cdot c_{\text{std}}}{\Delta i (v + v_{\text{dod}}) + i_1 \cdot v_{\text{dod}}},$$

gdzie

i_1 — początkowy prąd (wysokość fali),

Δi — przyrost prądu (wysokości fali),

c_x — szukane stężenie substancji badanej,

c_{std} — stężenie roztworu wzorcowego,

v — początkowa objętość roztworu,

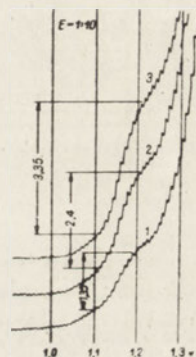
v_{dod} — objętość dodanego roztworu wzorcowego.

Z (1) i (2) krzywej $c_x = 1,3 \mu\text{g/ml}$,

z (1) i (3) krzywej $c = 1,20 \mu\text{g/ml}$ średnio $c = 1,29 \mu\text{g/ml}$,

a więc stężenie ekstraktu wynosi $1,29 \times \frac{2,5}{0,3} = 10,8 \mu\text{g/ml}$. W całości

ekstraktu (= 0,8 ml krwi) mamy 108 µg adeniny, co odpowiada 13,5 mg %.



Rys. 1. Polarogramy hydrolyzatu krwi.

2. OZNACZENIE SPEKTROFOTOMETRYCZNE

Pomiary spektrofotometryczne w nadfiolecie wykonywano przy pomocy spektrofotometru Beckmana, model DU, wyposażonego w lampę wodorową oraz w naczynka kwarcowe, pojemności 0,8 ml i o grubości warstwy 0,5 cm. Skalę długości fal skontrolowano przy pomocy linii emisyjnej rtęci $\lambda = 253,7 \text{ m}\mu$, zaś wskazania absorpcji z danymi cytowanymi w literaturze (12).

Stosowano szczelinę szerokości 2 mm, co odpowiada przy długości fali 260 mµ szerokości wiązki świetlnej 5 mµ. Pomiary absorpcji doko-

nazywano w odniesieniu do 0,1 N HCl Mercka. Do oznaczeń używano te same ekstrakty co przy oznaczaniu polarograficznym. Mieszano równe objętości ekstraktu i 0,8 N KOH, tak by badany roztwór (dwukrotnie rozcieńczony w stosunku do ekstraktu) posiadał $\text{pH} = 1 - 2$, odpowiadający około 0,1 N HCl. Otrzymane wyniki przedstawiono w postaci krzywych absorpcji w układzie: na osi odciętych długości fali λ w μm oraz na osi rzędnych absorpcja $A = \log \frac{I_0}{I}$ badanego roztworu o znanym rozcieńczeniu. Punktem wyjścia dla przeliczenia stężenia było każdorazowe porównywanie wyników serii pomiarów z absorpcją wzorcowego roztworu adeniny lub odpowiednich puryn. Stężenie puryn w tych roztworach określono przez oznaczenie azotu mikrometodą Kjeldahla, zaś ich czystości wykreślając całkowite krzywe absorpcji.

Obliczenie zawartości adeniny

2 ml ekstraktu w 1 N HCl zadano 2 ml 0,8 N KOH i po zmieszaniu wykonano pomiar absorpcji w 262 μm . Otrzymano wynik średni z 3 pomiarów $A = 0,265$, jednocześnie oznaczono absorpcję roztworu wzorcowego adeniny o stężeniu 11,25 $\mu\text{g/ml}$, która wynosiła $A = 0,540$.

$c_x = 11,25 \cdot \frac{0,265}{0,540} \cdot 2 = 11 \mu\text{g/ml}$, gdzie c_x — stężenie adeniny w badanym ekstrakcie.

Zawartość adeniny w całej próbce, odpowiadającej 0,8 ml krwi wynosi $10 \cdot 11 = 110 \mu\text{g}$, co odpowiada 13,75 mg % adeniny.

Możliwość błędów pochodzących z absorpcji odczynników została zbadana przez wykreślenie krzywych pochłaniania kilku ślepych prób. Szczególną uwagę zwrócono na kwas trójchlorooctowy i płyn konserwujący, które wykazują znaczną absorpcję w nadfiolecie, jednak w czasie wytrącania i przemywania osadu srebrowego puryn zostają całkowicie usunięte. Na rysunku 2 przedstawiono przykład krzywych absorpcji.

1. wzorcowy roztwór adeniny o stężeniu 11,2 $\mu\text{g/ml}$ w 0,1 N HCl.
2. roztwór adeniny przygotowany z roztworu wzorcowego w identyczny sposób jak przerabiane hydrolizaty krwi.
3. hydrolizat krwi.
4. hydrolizat tej samej krwi co (3) z dodatkiem 67 μg adeniny przed odbiałzeniem.

Z krzywych 1 i 2 wynika, że podany sposób preparowania nie wpływa na charakter krzywej adeniny, a z krzywych 3 i 4, że dodane do krwi

ilości adeniny odnajdują się wystarczająco ilościowo z różnicy pochłaniania przy 262 m μ .

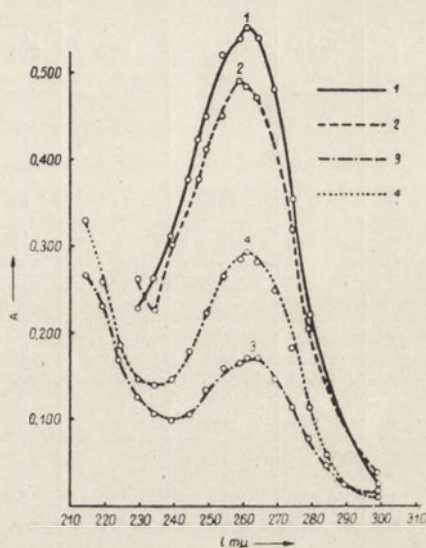
Sprawdzenie warunków oznaczenia

W pierwszym rzędzie sprawdzono, czy oznaczenie jest ilościowe, tj. czy po dodaniu znanej ilości adeniny otrzyma się odpowiednio podwyższone wyniki. Otrzymane wyniki przytoczone są w tabelicy 3.

Sądzymy więc, że przy zachowaniu odpowiednich ostrożności przy preparatyce (wytrącanie i przemywanie osadu srebrowego puryn w 0°C itp.) można uznać oznaczenie adeniny we krwi za wystarczająco ilościowe.

Przed przystąpieniem do właściwych oznaczeń ustalono wpływ warunków pobierania krwi na wyniki oznaczania adeniny. W tym celu pobierano 3 — 4 ml krwi, z czego połowę odbiałczano natychmiast po pobraniu, a pozostałą połowę dodawano do cytrynianu lub na płyn stosowany do konserwowania krwi, przechowywano w lodówce w 0°C i oznaczano po 24 godzinach. Płyn konserwujący zawiera 30 g kwaśnego cytrynianu sodu, 35 g glukozy, 5 g soli sodowej acetylo-amidu kwasu p-amino-benzenosulfonowego (albucyd Natrium) i 0,03 riwanolu w litrze roztworu; pobiera się 1 objętość tego roztworu na 5 objętości krwi. Przytaczamy typowe wyniki (średnie z oznaczeń polarograficznych i spektrofotometrycznych) w tabelicy 4.

Krew cytrynianowa wykazuje przy przechowywaniu znaczny spadek zawartości adeniny. Parnas (16) (1925) i Conway, i Cooke (6) (1939) badając zawartość amoniaku, wytwarzającego się przy przechowywaniu krwi, zaobserwowali po 24 godzinach od chwili pobrania dezaminację związków adeniny w podobnych granicach. Przy pobieraniu krwi na cytrynian stosowano więc możliwie szybkie odbiałczanie. W większości przypadków pobierano krew bezpośrednio do kolby miarowej. Tam



Rys. 2. Wpływ dodatku adeniny na krzywą absorpcji hydrolizatu krwi.

Tablica 3
Sprawdzenie ilościowego strącania puryn

Nr próby (hydroлізу)	Dodana adenina μg	Adenina w μg					% odzyskania (śred.)	Uwagi
		całkowita		odzyskana				
		polar.	spektrofot.	polar.	spektrofot.	średnio		
1	224	224	224	218	224	221		roztwór wzorcowy adeniny
2	224	206	203	206	203	204,5	92,7*	roztwór wytrącony srebrem
3	—	74	84	—	—	—	—	krew przypadku nr 2
8	67	135	145	61	61	61	91	„ „
19	—	68,8	78	—	—	—	—	krew przypadku nr 7
20	67	122	153	53,2	75	64,1	96	„ „
23	—	172	168	—	—	—	—	krew przypadku nr 10
24	67	227	235	55	67	61	91	„ „
33	—	98	95	—	—	—	—	krew przypadku nr 14
34	90	200	178	102	83	92,5	103	„ „
Dla krwi średnio							95,25%	

* Patrz rysunek 2.

gdzie z konieczności istniała przerwa paru godzin między pobraniem krwi a wykonaniem analizy, pobierano krew na płyn konserwujący.

Sprawdzono następnie wpływ na wyniki oznaczenia innych puryn, które mogłyby także występować we krwi, tj. gwaniny, hipoksantyny, ksantyny i kwasu moczowego. Żadna z tych puryn nie wywiera wpływu w warunkach doświadczenia na oznaczenie polarograficzne adeniny. Natomiast pochłanianie przy 262 m μ zostaje znacznie podwyższone przez dodatek gwaniny. Jednak zawartość gwaniny nawet w tych wypadkach

Tablica 4

Wpływ warunków pobierania krwi na wyniki oznaczeń adeniny

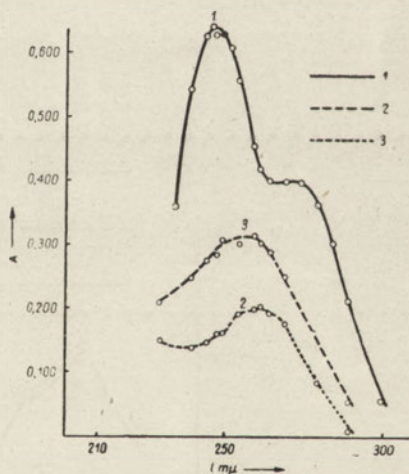
Przypadek nr	Hydroli- zat nr	Ilość krewi ml	mg% adeniny	Uwagi
7	17	0,6	11,3	krew pobrana bezpośrednio
7	19	0,6	12,0	" " na płyn konserwujący, po 24 godzinach
14	33	0,6	16,2	krew pobrana bezpośrednio
14	34	0,6	11,8	" " na cytrynian, po 24 godzinach

może być matematycznie obliczona (12), o ile pomiary wykonuje się jednocześnie w $\lambda = 245$ i $262 \text{ m}\mu$. Hipoksantyna, ksantyna i kwas moczowy wytrącają się nie ilościowo w podanych warunkach, a w ilościach występujących we krwi mają niewielki wpływ na przebieg krzywej spektrofotometrycznej. Ponieważ gwanina nie występuje we krwi ludzkiej (ewentualnie występuje w bardzo niewielkich ilościach), uważamy więc, że otrzymane wyniki zarówno polarograficzne, jak i spektrofotometryczne podają w zasadzie w jednoznaczny sposób zawartości związków adeninowych we krwi (możliwe, że oznacza się także częściowo oksyadeninę, której obecność we krwi stwierdziła Buell (5)).

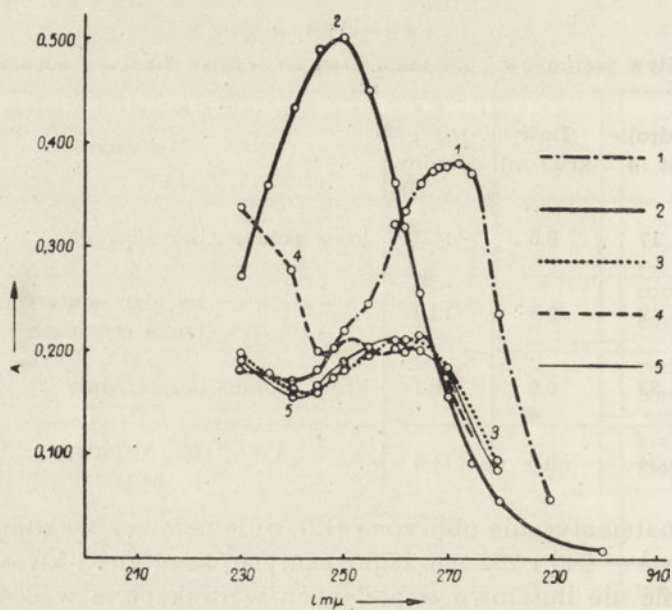
Poniżej podajemy orientacyjne krzywe absorpcji (otrzymane na pojedynczych przypadkach), przedstawiające wpływ innych puryn na wyniki adeniny (rysunek 3, 4, 5).

Szczegółowe dane dotyczące wpływu tych puryn będą treścią jednej z następujących publikacji.

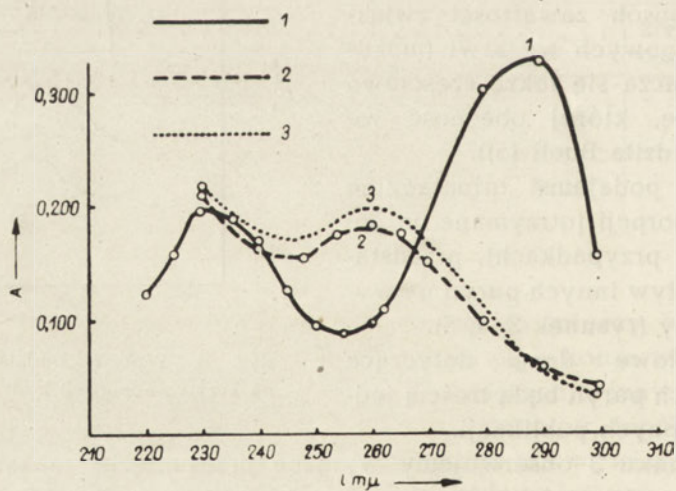
Na rysunku 3 obserwujemy wyraźne przesunięcie maksimum pochłaniania w stronę fal krótszych, charakterystyczne dla obecności gwaniny. Przyrost pochłaniania w $\lambda = 245 \text{ m}\mu$ krzywej 3 w stosunku do krzywej 2 odpowiada teoretycznie przewidzianemu dla dodanej ilości



Rys. 3. Wpływ dodatku gwaniny na krzywą absorpcji hydroliżatu krwi.



Rys. 4. Wpływ dodatku ksantyny i hipoksantyny na krzywą absorbcji hydrolizatu krwi.



Rys. 5. Wpływ dodatku kwasu moczowego na krzywą absorbcji hydrolizatu krwi.

gwaniny. Na rysunku 4 widzimy, że zarówno ksantyna, jak i hipoksantyna nie wpływają na podwyższenie wyników w $\lambda = 260$ m μ . Nieznaczny i zupełnie nieilościowy wpływ hipoksantyny jest widoczny w $\lambda = 250$ m μ . Rysunek 5 wskazuje, że kwas moczowy dodany do próbki krwi, nie pojawia się w kwaśnym ekstrakcie, ponieważ pochłanianie przy $\lambda = 290$ m μ dla krwi czystej i dla krwi z dodatkiem kwasu moczowego jest jednakowe. Różnica pochłaniania w $\lambda = 260$ m μ pochodzi z błędu pojedynczego oznaczenia.

Wyniki oznaczeń

W pracy niniejszej przebadano 14 przypadków krwi, stosując równolegle oznaczenia polarograficzne i spektrofotometryczne; różnice między tymi pomiarami na ogół nie przekraczają 10 — 15%; jako wyniki ostateczne brano średnie z oznaczeń wykonanych obu metodami. Wyniki przytoczone są w tablicy 5.

Wyników tych jest jeszcze zbyt mało, aby można z nich było wysnuć jakieś wnioski. Zawartość adeniny we krwi normalnej zgadza się w zasadzie z wynikami Buell (4) i całkowitą zawartością puryn według Rottino, Hofmana i Albauma (17). Związki adeninowe zawarte są przeważnie w krwinkach. Pewne ilości tych związków, oznaczone przez różnych autorów (21, 9, 20, 13) w osoczu lub surowicy, przedostają się tam prawdopodobnie z krwinek podczas procesu ich oddzielania. Z tych względów w przypadkach, w których zawartość adeniny nie mieści się w granicach 8 — 15 mg % adeniny podaliśmy liczbę erytrocytów.

W przypadku reumatyzmu i łuszczycy, przy normalnej zawartości krwinek, otrzymaliśmy wyniki nieco niższe od normy.

Dyskusja

Praca nasza miała na celu ilościowe skontrolowanie uprzednio podanej metody (13) polarograficznego oznaczania adeniny we krwi. W metodzie tej do oznaczenia używa się niewielkich ilości krwi (0,6 — 2 ml), a stężenie roztworu stosowanego ostatecznie do pomiaru leży w granicach 5 — 20 μ g adeniny/ml. Niewiele innych metod, poza polarograficzną, nadaje się do oznaczenia puryn w roztworach o tak niskich stężeniach. W pracy niniejszej równolegle do polarograficznych zastosowano oznaczenia spektrofotometryczne, przy czym różnice wyników otrzymanych obu tymi metodami nie przekraczały na ogół 10 — 15%.

Ponieważ na błędy obu metod wpływają zupełnie inne czynniki, można więc uznać, że wyniki polarograficznych oznaczeń adeniny zostały

Tablica 5

Zawartości związków adeninowych kwasorozpuszczalnych we krwi ludzkiej (podane wartości są średnimi z oznaczeń polarograficznych i spektrofotometrycznych)

Lp.	Przypadek nr	mg% adeniny	Uwagi		
			krew osobnika	dodawano do krwi	ilość czerwonych krwinek $\times 10^6$
1	2	11,5	normalnego	cytrynian	—
2	5	9,4	„	0	—
3	7	11,3	„	0	—
4	9	9,6	„	cytrynian	—
5	11	12,4	„	0	—
6	14	16,2	„	0	4,9
7	16*	14,1	„	0	—
8	6	4,2	chorego (rak płuc)	cytrynian	2,6
9	10	10,7	„ (żółtaczka zakaźna)	cytrynian	—
10	12	8,5	„ (rak odbytnicy)	cytrynian	—
11	13	9,6	„ (rak wątroby)	cytrynian	—
12	15	7,3	„ (łuszczyca)	0	4,5
13	17	2,4	„ (anemia złośliwa)	płyn konserwujący	2,0
14	18	5,3	„ (reumatyzm pierwotnie przewlekły)	płyn konserwujący	3,9

* Krew tego samego osobnika, co w przypadku nr 14 lp. 6, pobrano po tygodniu.

potwierdzone pomiarami spektrofotometrycznymi i odpowiadają zawartości tego związku we krwi. W pracy niniejszej określono zawartość adeniny we krwi odbiałzonej, po dodaniu znanej ilości adeniny oraz innych puryn, tj. gwaniny, hipoksantyny, ksantyny i kwasu moczowego, a także przy różnych warunkach pobierania krwi. Podano wyniki oznaczeń dla 14 przypadków krwi ludzkiej, normalnej i patologicznej. Wyniki te zgodne są z wynikami Buell (4) oraz Albauma i współpracowników (17).

Streszczenie

Praca miała na celu ilościowe skontrolowanie uprzednio podanej metody (13) oznaczenia adeniny we krwi, przy zastosowaniu oznaczeń po-

larograficznych i spektrofotometrycznych. Określano zawartość adeniny we krwi odbiałczonej po dodaniu znanej ilości adeniny oraz innych puryn, tj. gwaniny, hipoksantyny, ksantyny i kwasu moczowego. Podano wyniki oznaczeń dla 14 przypadków krwi ludzkiej, normalnej i patologicznej.

LITERATURA

1. Albaum H. G., Lipshitz R.: *Arch. Biochem.* **27**, 102, 1950.
2. Albaum H., Rottino A., Hofman G. T.: *J. Lab. Clin. Med.* **42**, 255, 1953.
3. Bass R.: *Arch. exp. Path. u. Pharmakol.* **76**, 40, 1914.
4. Buell M. V.: *J. Biol. Chem.* **108**, 273, 1935.
5. Buell M. V., Perkins M. E.: *J. Biol. Chem.* **76**, 95, 1928.
6. Conway E. J., Cooke R.: *Biochem. J.* **33**, 457, 1939.
7. Drury A. N., Lutwak-Mann C., Solandt O. M.: *Quart. J. exp. Physiol.* **27**, 215, 1938.
8. Green H. N.: *Lancet* ii, 147, 1943.
Bielschowsky M., Green H. N.: *Lancet* ii, 153, 1943.
Green H. N., Stoner H. B.: *Biological Actions of the adenine nucleotides*, London 1950.
9. Green H. N., Stoner H. B., Bielschowsky M.: *J. Path. Bact.* **61**, 101, 1949.
10. Herbrand W., Jaeger K. H.: *Das Adenylsäuresystem*, 1943, Rosenmeier i dr Saenger K. G., Berlin.
11. Kalckar H.: *J. Biol. Chem.* **167**, 429, 1947.
12. Kerr S. E., Seraidarian K., Wargon: *J. Biol. Chem.* **181**, 761, 1949.
13. Leyko W., Panusz H.: *Polski Tyg. Lek.* **34**, 1057, 1954.
Leyko W., Panusz H.: *Bull. Soc. Sci. Łódź, Classe III, Vol. V 2*, 1954.
14. Mejsbaum W.: *Z. f. physiol. Chem.* **258**, 117, 1939.
15. Mozołowski W.: *Biochem. Z.* **206**, 150, 1929.
16. Parnas J., K.: *Biochem. Z.* **155**, 247, 1925.
17. Rottino A., Hofman G. T., Albaum H.: *Blood* **7**, 836, 1952.
18. Stoner H. B., Green H. N.: *J. Path. Bact.* **56**, 343, 1944.
Ibid. **57**, 337, 1945.
Clin. Sci. **5**, 159, 1945.
J. Path. Bact. **61**, 114, 1949.
19. Straub F. B.: *Postępy Biochemii* т. 1, zesz. 1, 122, 1953.
20. Swiencicka M. B.: *Bull. eksper. Biologii i Medycyny* **1**, 32, 1954.
21. Thannhauser S., J., Czoniczer G.: *Z. f. physiol. Chem.* **110**, 307, 1920.

СОЕДИНЕНИЯ АДЕНИНА В КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Резюме

В этой работе производилась количественная проверка ранее указанного метода (13) определения аденина в крови человека. Измерения производи-

лись по полярографическому и спектрофотометрическому методу. Определялся содержащийся в крови (после удаления из нее белка) аденин после прибавления известного количества аденина и других производных пурина т. е. гуанина, гипоксантина, ксантина и мочевой кислоты. Указаны результаты исследований 14 вариантов нормальной и патологической крови человека.

ADENINE COMPOUNDS OF HUMAN BLOOD. I. POLAROGRAPHIC AND SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATIONS OF ADENINE IN PROTEIN-FREE BLOOD FILTRATES

Summary

The object of the present study was to control the quantitative aspect of the previously described method (13) of estimation of adenine in blood, using polarographic and spectrophotometric determinations. The contents of adenine in protein-free filtrates of blood was estimated after addition of known amounts of adenine and other purines i. e. guanine, hypoxanthine, xanthine and uric acid. The results of 14 cases of normal and pathological human blood are given.

Otrzymano 30.X.1954.

T. W. SZCZEPKOWSKI

NOWA METODA WYOSABNIANIA I OCZYSZCZANIA CYTOCHROMU c

Z Zakładu Chemii Fizjologicznej A. M. w Krakowie

Kierownik: Prof. *dr* B. Skarżyński

Dotychczas stosowane sposoby otrzymywania cytochromu c używanego do badań enzymatycznych wywodzą się z podstawowej metody podanej przez Keilina i Hartree'ego (4,5). Metoda ta polega na wyciągnięciu cytochromu c z rozdrobnionej tkanki roztworem 0,145 N kwasu trójchlorooctowego, na wysalaniu nieswoistych zanieczyszczeń z wyciągu siarczanem amonu i wytrącaniu z przesączu cytochromu c odpowiednim stężeniem kwasu trójchlorooctowego. Uzyskany w ten sposób preparat cytochromu cechuje się zawartością 0,34% Fe. Opracowano również szereg metod dalszego oczyszczania tego podstawowego preparatu, przy pomocy których można otrzymywać cytochrom c o zawartości 0,42 — 0,46% Fe. Modyfikacje te polegały na frakcjonowanym wytrącaniu siarczanem amonu w środowisku alkalicznym (Keilin i Hartree, 5) lub na wytrącaniu cytochromu wrzącym chloroformem (Tsou, 14). W ostatnich latach zastosowano również do oczyszczania cytochromu metody chromatograficzne. Carruthers (1) posługiwał się tlenkiem glinu nie wprowadzając jednak zasadniczych zmian w pierwotnej metodzie Keilina i Hartree'ego. Paleus i Neilands (9) używali kolumny wypełnionej amberlitem IRC-50 elując następnie cytochrom 0,1 M buforem o pH = 10,8, przy czym najczystsze frakcje uzyskane przez tych badaczy zawierały 0,466% Fe. Dla zagęszczenia tych preparatów stosowano wytrącanie cytochromu kwasem trójchlorooctowym, co pociągało za sobą znaczne inaktywowanie cytochromu. Neilands (8) zmodyfikował później postępowanie, wypłukując cytochrom c z amberlitu nasyconym roztworem octanu amonu i otrzymywał preparat enzymatycznie czynny, lecz bardzo rozcieńczony skutkiem długotrwałej dializy. Margoliash (7) posługiwał się również amberlitem IRC-50, wypłukiwał zaś cytochrom 0,25 M roztworem amoniaku lub 0,5 M roztworem chlorku potasu.

Modyfikacje pierwotnej metody Keilina i Hartree'ego doprowadzają do uzyskania czystych preparatów cytochromu c, ale cechujących się małą aktywnością, ponieważ posługiwanie się kwasem trójchlorooctowym z reguły doprowadza do co najmniej częściowego inaktywowania preparatu. Przy posługiwaniu się tymi sposobami postępowania, które ograniczają zastosowanie kwasu trójchlorooctowego uzyskuje się preparaty enzymatycznie aktywne, ale bardzo rozcieńczone.

Jedynie metoda opisana przez Theorella (13) unika całkowicie używania kwasu trójchlorooctowego. W metodzie tej cytochrom wyciągany jest z tkanki roztworem kwasu siarkowego, ale oczyszczanie preparatu jest bardzo zawiłe. Polega na adsorbowaniu siarczanem baru i skrawkami celofanu oraz na wytrącaniu nasyconym roztworem siarczanu amonu w temperaturze 60°. Stosując tę metodę Theorell otrzymał preparat o zawartości 0,34% Fe, nie opisał jednak aktywności enzymatycznej tego preparatu.

W toku naszych badań nad hemoproteidami, prowadzonych już od dłuższego czasu, nasuwała się konieczność opracowania możliwie taniej metody otrzymywania czystych preparatów cytochromu w postaci zagęszczonych, enzymatycznie czynnych roztworów. Wynikiem naszych usiłowań jest metoda, którą poniżej przedstawiamy.

Stosowane metody analityczne i preparaty

Zawartość żelaza w cytochromie oznaczana była według Keilina i Hartree'ego (5), przy czym w toku kolorymetrycznego oznaczania żelaza za pomocą 2-2-dwupirydyli [Hill (3)] zastosowano późniejsze modyfikacje polegające na posługiwaniu się octanem sodu i hydrochinonem, zamiast siarczynem sodu (Fister, 2).

Stężenie cytochromu c oznaczano spektrofotometrycznie za pomocą aparatu Königa-Martensa, stosując wartości podane przez Pottera (10). Stosowano również metodę spektrofotometryczną podaną przez Rosenthala i Drabkina (11).

Aktywność enzymatyczną oznaczano metodą manometryczną, badając zużycie tlenu przez układ: oksydaza cytochromowa-cytochrom c-kwas askorbinowy. Używano jako oksydazy cytochromowej preparatu otrzymanego z serc szczurzych, stosując częściowo postępowanie podane przez Keilina i Hartree'ego (6) dla mięśnia sercowego konia. Serca szczurze po rozdrobnieniu przemywano wielokrotnie wodą, po czym roztarto je w homogenizatorze szklanym. Odwirowany osad zawieszono w buforze fosforanowym 0,1 M o pH = 7,3. Tak otrzymany pre-

parat używano do oznaczeń. Kwas askorbinowy stosowano w stężeniu polecanym przez Slatera (12).

Do adsorpcji używano tlenku glinu produkcji Głwchimreaksziw „do chromatografii” ze znakiem „Czerwona pieczętka”. Permutyt przemysłowy używano roztworem 0,5 M amoniaku i wodą destylowaną.

Zasada metody

Wyciąg z tkanki zawierającej cytochrom c zostaje przygotowany w warunkach nie powodujących denaturacji. Z wyciągu tego adsorbuje się cytochrom c na tlenku glinu i eluuje 0,6 M NH_3 . Otrzymany eluat poddaje się chromatografii na kolumnie z tlenkiem glinu, wypłukując 0,6 M NH_3 , po czym roztwór zostaje chromatografowany na kolumnie z permutytem, wypłukując cytochrom c 0,5 M NH_3 .

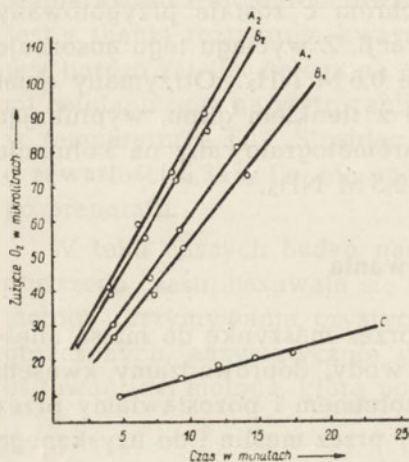
Sposób postępowania

1500 g dwukrotnie przepuszczonego przez maszynkę do mięsa mięśnia serca końskiego zadajemy 4500 ml wody, doprowadzamy kwasem siarkowym 2 N do $\text{pH} = 5,3$, zadajemy toluenem i pozostawiamy przez noc. Po upływie około 16 godzin sączymy przez muślin i do uzyskanego przesączu objętości 5 l dodajemy 10% NaOH, doprowadzając do $\text{pH} = 7$. Zubożony płyn zostawiamy w spokoju przez 2 godziny, w którym to czasie wydziela się osad. Płyn z nad osadu ściągamy lewarem, a osad z resztką płynu sączymy przez duży sącdek fałdowany. Otrzymujemy w ten sposób 5 l przejrzystego roztworu wykazującego wyraźne smugi absorpcyjne cytochromu c i hemoglobiny. Zawartość cytochromu w przesączu wynosi $1,82 \times 10^{-6}$ moli/l, tzn. z 1500 g mięśnia sercowego otrzymujemy $9,10 \times 10^6$ moli cytochromu c.

Do wyciągu zawierającego cytochrom dodajemy 20 g tlenku glinu, dobrze mieszamy, oddzielamy tlenek glinu od cieczy i wypłukujemy zaadsorbowany na Al_2O_3 cytochrom 0,6 M roztworem NH_3 . Zabieg ten powtarzamy z wyciągiem z mięśnia każdorazowo używając wypłukane amoniakiem, a następnie przemyte wodą, te same pierwotne 20 g Al_2O_3 tak długo, jak długo kontrola spektroskopowa amoniakalnego eluatu z tlenku glinu po dodaniu dwutioninu sodowego będzie wykazywała tylko bardzo słabą smugę absorpcyjną przy 550 m μ . Zazwyczaj wystarcza 6-krotne adsorbowanie na tlenku glinu.

Postępując w powyżej podany sposób uzyskujemy około 500 ml wypłuczyn z tlenku glinu, zawierającego cytochrom c. Z wypłuczyn tych

odpędzamy w próżni większość rozpuszczonego amoniaku, po czym dodajemy 60 g Al_2O_3 , mieszamy, płyn z nad osadu tlenku glinu dekantujemy, a tlenek glinu z zaadsorbowanym cytochromem c umieszczamy w grubej rurze chromatograficznej i wymywamy cytochromem posługując się 0,6 M NH_3 . Uzyskujemy w ten sposób 100 ml eluatu, z którego znów w próżni odpędzamy częściowo amoniak (do osiągnięcia stężenia 0,1 M). Z kolei przepuszczamy roztwór przez kolumnę z Al_2O_3 o długości 40 cm, średnicy 0,7 cm. Zaadsorbowany cytochrom eluujemy, przemywając kolumnę 0,6 M NH_3 , zbierając frakcję zabarwioną czerwono. Otrzymujemy w ten sposób 40 ml ciemnoczerwonych wypłuczyn zawierających $8,4 \times 10^{-6}$ moli cytochromu c o zawartości żelaza 0,33%. Z tak uzyskanego roztworu dializując odpędzamy częściowo amoniak do stężenia 0,05 M, po czym roztwór przepuszczamy przez kolumnę długości 40 cm, średnicy 0,7 cm wypełnioną permutytem.



Rys. 1. Porównywanie aktywności enzymatycznej cytochromu otrzymanego metodą Keilina i własną.

Porównanie aktywności enzymatycznej cytochromu otrzymanego przy zastosowaniu metody Keilina i własnej metody powyżej opisanej otwiera rysunek 1.

Krzywe A przedstawiają zużycie tlenu po dodaniu cytochromu otrzymanego metodą własną, krzywe B przedstawiają zużycie tlenu po dodaniu cytochromu otrzymanego metodą Keilina.

W wypadku krzywych ze wskaźnikami (1) — dodano cytochrom w ilości odpowiadającej 1 mikrogramowi żelaza, wskaźnik (2) — odpowiada 2 mikrogramom żelaza.

Krzywa C przedstawia zużycie tlenu bez dodatku cytochromu. Doświadczenia przeprowadzono równoległe na aparacie Warburga. W naczynku umieszczano 1 ml preparatu oksydazy cytochromowej i zmienne ilości roztworu cytochromu c uzupełniając wodą do objętości 2,9 ml. W kubeczku środkowym umieszczano 0,1 ml KOH 30%-ego. W odnodze

bocznej 0,3 ml roztworu kw. askorbinowego o stężeniu 50 mg/ml. Temperatura łaźni 38°.

Powyżej opisany sposób postępowania pozwala otrzymać stężony roztwór cytochromu c bez posługiwania się czynnikami denaturującymi białko. Wydajność naszej metody zależy głównie od sposobu przeprowadzania pierwotnej ekstrakcji cytochromu z mięśnia. Po zastosowaniu metody Keilina i Hartree'ego wydajność wynosi — jak pouczyły nas własne doświadczenia — średnio $5,47 \times 10^{-6}$ moli cytochromu na 1 kg mięśnia sercowego konia. Wydajność naszej metody wyraża się cyfrą $5,33 \times 10^{-6}$ mola na 1 kg mięśnia. Aktywność enzymatyczna produktu otrzymanego naszą metodą leży w tym samym rzędzie wielkości, jaki cechuje aktywność enzymatyczną preparatu uzyskanego przez Keilina. Zaznaczyć również należy, że opisana powyżej metoda jest zabiegiem względnie tanim, a stosowane do niej adsorbenty daje się z łatwością regenerować.

Prof. dr Bolesławowi Skarżyńskiemu dziękuję za pomoc w przygotowywaniu tej pracy.

Streszczenie

Opisano metodę otrzymywania zagęszczonych roztworów enzymatycznie czynnego cytochromu c o zawartości 0,43% Fe. Metoda polega na ekstrahowaniu z mięśnia serca końskiego rozcieńczonym H_2SO_4 , adsorbowaniu na Al_2O_3 oraz na permutycie i eluowaniu rozcieńczonym NH_3 .

LITERATURA

1. Carruthers Ch.: *J. Biol. Chem.* **171**, 641, 1947.
2. Fister H. J.: *Manual of Standardised Procedures for Spectrophotometric Chemistry*, New York 1950.
3. Hill R.: *Proc. Roy. Soc. B* **107**, 205, 1930.
4. Keilin D. i Hartree E. F.: *Proc. Roy. Soc. B.* **117**, 1, 1935.
5. Keilin D. i Hartree E. F.: *Biochem J.* **39**, 289, 1945.
6. Keilin D. i Hartree E. F.: *Biochem J.* **41**, 500, 1947.
7. Margoliash E.: *Biochem. J.* **56**, 529, 1954.
8. Neilands J. B.: *J. Biol. Chem.* **197**, 701, 1952.
9. Paleus S. i Neilands J. B.: *Acta Chem. Scand.* **4**, 1024, 1950.
10. Potter R. V., Umbreit W. W., Burris R. H. i Stauffer J. F.: *Manometric Techniques and Related Methods*, Minneapolis 1947, str. 188.
11. Rosenthal D. i Drabkin D. L.: *J. Biol. Chem.* **149**, 437, 1943.
12. Slater E. C.: *Biochem J.* **44**, 305, 1949.
13. Theorell H.: *Bioch. Zeitsch.* **285**, 207, 1936.
14. Tsou C. L.: *Biochem J.* **49**, 362, 1951.

НОВЫЙ МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ЦИТОХРОМА С

Резюме

Описан метод получения концентрированных растворов ферментативно активного цитохрома с, содержащего 0,43% Fe. По этому методу вначале производится экстрагирование сердечной мышцы лошади, разбавленной H_2SO_4 , после чего производится адсорбция Al_2O_3 и пермутитом и наконец элюирование разбавленным раствором NH_3 .

A NEW METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF CYTOCHROME C

Summary

A method is described for obtaining concentrated solutions of enzymatically active cytochrome c, containing 0,43% Fe. The method is based on the extraction of horse heart muscle with diluted H_2SO_4 and adsorption on permutit as well as aluminum oxide followed by elution with diluted NH_4OH .

Otrzymano 2.XI.1954.

J. DŻUŁYŃSKA, W. BARTOSIEWICZ, R. GAJZLER

FOSFATYDY WE FRAKCJACH BIAŁKOWYCH SUROWICY OTRZYMYWANYCH METODAMI: WYSALANIA I WYTRĄCANIA METANOLEM

Z Instytutu Dermatologii i Wenerologii

Dyrektor Instytutu: doc. dr J. Suchanek

Kierownik Sekcji Biochemicznej: mgr J. Dżułyńska

Coraz większe zainteresowanie wzbudza w ostatnich czasach zachowanie się fosfatydów we frakcjach białkowych surowicy. Okazało się bowiem, że w niektórych jednostkach chorobowych ilość fosfatydów w izolowanych białkach ulega tak znacznym zmianom, że mogą one służyć jako ważny wskaźnik rozpoznawczy.

Dotychczasowe metody oznaczania fosfatydów we frakcjach białkowych opierały się głównie na rozdzielaniu białek drogą elektroforezy swobodnej, względnie bibułowej, lub na wytrącaniu etanolem w ściśle określonych warunkach. Ponieważ zastosowanie tych metod w pracowniach klinicznych natrafia niejednokrotnie na trudności natury technicznej, związane z koniecznością posiadania odpowiedniej aparatury, opracowano szybką i nieskomplikowaną metodę oznaczania fosfatydów we frakcjach białkowych otrzymywanych drogą wysalania siarczanem sodu lub wytrącania metanolem w odpowiednich warunkach.

W naszej pracy zastosowano metodę rozdzielania białek Kibricka i Blonstein (9). Równocześnie przeprowadzano badania we frakcjach wytrącanych metanolem według Pillemera i Hutchinsona (14). Za wyborem tych metod przemówiły wyniki: różniły się one bardzo mało zdaniem autorów od otrzymywanych na drodze elektroforezy swobodnej. Poza tym wartości dla albumin i globulin otrzymywane przy użyciu obu wymienionych metod frakcjonowania nie różniły się między sobą wcale lub tylko bardzo nieznacznie, co stwierdzono na podstawie szeregu badań surowic normalnych i patologicznych. Kibrick i Blonstein (9), Dżułyńska (5, 6).

Założywszy na podstawie powyższych danych, że frakcje te mogą być względnie jednorodne, przeprowadzono szereg badań w celu zorientowania się w zachowaniu fosfatydów w tych frakcjach.

Część doświadczalna

Do badań używano surowic pochodzących z krwi pobranej od osób zdrowych w wieku od 20 do 30 lat, na czczo, po półgodzinnym leżeniu, bez zmiany pozycji. Surowicę oddzielano po 3-godzinnym staniu w temperaturze pokojowej drogą wirowania.

1. FRAKCYJNOWANIE BIAŁEK

Dla łatwiejszej orientacji w dalszym toku postępowania podaje się w skróceniu sposób frakcjonowania.

Zgodnie z Kibrickiem i Blonstein do wysalania prób surowicy w ilości 1 ml używano kolejno: 15,8%, 19,9% i 27,2% roztworów siarczanu sodu. Odsączone i przemyte osady zawierały kolejno: γ -globuliny, $\beta + \gamma$ -globuliny, wreszcie $\alpha + \beta + \gamma$ - czyli globuliny całkowite według terminologii użytej przez Kibricka. Przesączy używano do oznaczeń białka, zaś osadów globulin na sączkach do ekstrakcji fosfatydów. Wyniki dla poszczególnych frakcji białkowych wyliczono drogą odejmowania. Nomenklatura dla poszczególnych frakcji globulinowych zastosowana przez Kibricka będzie zachowana i w obecnej pracy, mimo że całkowitej zgodności frakcji wysalanych z otrzymywanymi na drodze elektroforezy nie udało się autorowi udowodnić.

Równolegle frakcjonowano surowicę metodą Pillemera, wytrącając białko z 1 ml surowicy 42% roztworem metanolu, w temperaturze 0°, utrzymując pH 6,9. Otrzymywano w ten sposób dwie frakcje: pierwszą odpowiadającą albuminom pozostającym w roztworze, drugą w postaci precypitatu składającego się z globulin całkowitych. Frakcje rozdzielano drogą wirowania w wirówce chłodzonej.

2. EKSTRAKCYJA FOSFATYDÓW

Ekstrakcję fosfatydów przeprowadzono przy pomocy bezwodnego etanolu. Rozpuszczalnik ten, jak stwierdzono, ekstrahuje w ciągu 24 godzin fosfatydy całkowicie, tak z surowicy całkowitej, jak i z frakcji białkowych, zarówno wysalanych, jak i wytrączanych metanolem. Powtórna ekstrakcja delipidowanych białek, przeprowadzana również i przy podgrzewaniu do wrzenia przez 1 godzinę, nie wykazywała nawet śladów fosfatydów.

Fracje białkowe zebrane na sączkach umieszczano w kolbkach stożkowych, poj. 50 ml, dodawano 30 ml bezwodnego etanolu i po dokładnym rozmieszaniu pozostawiano w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Następnie sączono przez miękkie sączki, osad przemywano dwukrotnie etanolem (po 10 ml), po czym odparowywano do małej objętości na łaźni wodnej. W identyczny sposób postępowano również i z frakcjami otrzymywanymi metodą metanolową, tj. odwirowanym osadem globulin i albuminami pozostającymi w roztworze. Te ostatnie bez poprzedzającego wytrącania białka, po ilościowym przeniesieniu z próbki wirowniczej do kolbki stożkowej, zadawano etanolem i postępowano jak wyżej podano. Podobnie ekstrahowano 1 ml surowicy, celem otrzymania wartości dla fosfatydów całkowitych surowicy.

Ponadto poddano ekstrakcji albuminy wytrącone za pomocą 5 ml 20% kwasu trójchlorooctowego z całkowitej ilości przesączu pozostałego po wysoleniu z globulin. Ze względu na bardzo małe różnice w otrzymywanych w powyższy sposób wartościach fosfatydów w porównaniu z uzyskanymi drogą wyliczenia z różnicy fosfatydów całkowitych i fosfatydów globulin oraz skąpe ilości materiału doświadczalnego, badanie przeprowadzono jedynie na 4 surowicach.

3. SPALANIE I OZNACZANIE FOSFATYDÓW

Spalania i oznaczania fosfatydów dokonywano według metody Fiskego i Subbarowa (8).

Zagęszczone ekstrakty przenoszono ilościowo przy pomocy pipetek kapilarnych do kolbek Kjeldahla, przemywając kolbki stożkowe, w których zagęszczano, małą ilością eteru. Następnie odparowywano prawie całkowicie i spalano w szeregowym piecyku nad mikropalnikami, po dodaniu 2,5 ml 10 N kwasu siarkowego, przyspieszając proces spalania przez dodawanie od czasu do czasu po kropli stęż. kwasu azotowego. Bardzo ważnym jest dla otrzymywania dokładnych wyników prawidłowy proces spalania. Musi przebiegać on niezbyt gwałtownie, ale i niezbyt wolno. Przy użyciu zbyt małego płomienia woda skrapla się w szyjce kolbki i spływa z powrotem utrudniając całkowite spalanie, przy czym proces spalania przeciąga się na szereg godzin, a czasem nawet dni. Prawidłowe spalanie powinno trwać około 1 — 2 godzin.

Oznaczania fosforu dokonywano ściśle według metody Fiskego i Subbarowa. Natężenie wytworzonego zabarwienia, powstającego w wyniku reakcji błękitu molibdenowego, odczytywano przy pomocy absorpcjometru Spekkera. Dla przeliczenia wartości fosforu na fosfatydy używano mnożnika 25.

Wyniki były powtarzalne, mimo dużego stosunkowo szeregu przejściowych operacji, co stwierdziliśmy przez dokonywanie dużej ilości podwójnych oznaczeń w tych samych surowicach.

4. BADANIA ZMIAN ZACHODZĄCYCH W ZAWARTOŚCI FOSFATYDÓW W ALBUMINACH I GLOBULINACH W CZASIE PRZECHOWYWANIA Z ODCZYNNIKIEM WYTRĄCAJĄCYM

Ciekawe zmiany zauważono przy dłuższym przetrzymywaniu w temperaturze 0° prób surowicy zadanych odczynnikiem metanolowym. W miarę stania, zawartość fosfatydów w albuminach malała, w globulinach zaś odpowiednio wzrastała. Przeprowadzono szereg doświadczeń, przetrzymując próby surowicy zadane odczynnikiem metanolowym przez różny okres czasu, po czym frakcje rozdzielano drogą wirowania w chłodzonej wirówce. Mimo że zawartość białka we frakcjach nie ulegała zmianie, zawartość fosfatydów zmieniała się znacznie. Zmiany zachodzące uwidacznia tablica 1.

Tablica 1

Zmiany zawartości fosfatydów w albuminach i globulinach w czasie stania z odczynnikiem metanolowym w mg/100 ml surowicy

Lp.	W albuminach				W globulinach			
	po 30 min	po 2 dniach	po 7 dniach	po 14 dniach	po 30 min	po 2 dniach	po 7 dniach	po 14 dniach
1	107	—	60	—	82	—	125	—
2	60	47	42	37	102	118	122	127
3	80	70	52	35	120	128	150	170
4	70	—	37	37	250	278	275	278
5	65	50	47	40	168	123	123	135
6	115	88	—	58	155	—	—	205
7	135	94	78	58	168	232	—	235
8	115	86	—	52	183	220	—	235
9	80	57	—	38	188	220	—	235
10	95	58	52	40	130	160	168	172
11	82	60	50	38	90	115	123	130
12	80	60	32	30	110	125	152	160
13	49	43	35	30	143	150	162	172
14	132	90	72	—	132	175	197	—
15	77	45	30	25	120	155	175	177
ubytek wyrą- żono w %	średnio	27%	42%	51%				

Jak wynika z powyższego zestawienia, szybkość ubywania fosfatydów z frakcji albuminowej w ciągu pierwszych 48 godzin jest na ogół dość znaczna; w tym czasie ubywa średnio 27%. Następne badania po tygodniu wykazują dalszy, jakkolwiek wolniejszy spadek poziomu fosfatydów w albuminach (średnio 42%). Wreszcie po dwóch tygodniach zaledwie połowa fosfatydów pozostaje związana z albuminami. Nie wszystkie surowice zachowują się podobnie, jak widać z powyższego zestawienia. Np. w niektórych frakcje albuminowe w ciągu 48 godzin tracą 12,2%, podczas gdy inne aż 57% fosfatydów.

Ze spadkiem fosfatydów w albuminach występuje równoczesne wzbogacanie się w nie frakcji globulinowych.

Podobnych zmian w przypadku frakcjonowania siarczanem sodu nie stwierdzono. Badania przeprowadzono bezpośrednio po wysoleniu po 24 godzinach i po 8 dniach; zawartość fosfatydów w albuminach i globulinach nie ulegała zmianie.

5. WYNIKI BADAŃ NAD ZAWARTOŚCIĄ FOSFATYDÓW WE FRAKCJACH BIAŁKOWYCH SUROWICY

Wyniki badań nad zawartością fosfatydów w poszczególnych frakcjach białkowych surowicy otrzymywanych metodą Kibricka oraz metodą Pillemera przedstawia tablica 2.

Jak wynika z powyższego zestawienia, zawartość procentowa fosfatydów w globulinach całkowitych jest nieco wyższa niż w albuminach, niezależnie od sposobu frakcjonowania białka. Średnio globuliny otrzymywane metodą wysalania zawierają 3,1%, zaś wytrącane metanolem 3,5% fosfatydów, podczas gdy albuminy 2,6% i 2,4% kolejno. Wśród białek globulinowych otrzymywanych metodą wysalania najwyższy odsetek fosfatydów wykazują α -globuliny, średnio 6,2%; znacznie niższy odsetek fosfatydów stwierdzono w β -globulinach, średnio 2,2%, a więc zbliżony do odsetka fosfolipidów w albuminach. Najmniejszą procentową zawartość znaleziono w γ -globulinach, bo zaledwie 1,0% średnio.

Dyskusja

Jak wynika z przeprowadzonych doświadczeń, otrzymano zarówno we frakcjach wysalanych, jak i wytrącanych metanolem, wartości dla fosfatydów albumin i γ -globulin zgodnie z danymi Blixa-Tiseliusa-Svensona (1), którzy posługując się elektroforezą swobodną wykazali w białku albumin 2,25%, zaś w γ -globulinach 1,0% fosfatydów. Niejasnym pozostaje natomiast zaobserwowane w naszych badaniach przeszu-

Tablica 2
Fosfatydy we frakcjach białkowych surowicy normalnej

Lp.	Zawartość fosfatydów																				
	w białku całkowitym				w albuminach				w globulinach				w α-globulinach		w β-globulinach		w γ-globulinach				
	mg %	% białka	mg %	% białka	mg %	% białka	mg %	% białka	wysalanych	wytrąconych metanolem	wysalanych	% białka	mg %	wysalanych	wysalanych	mg %	% białka	wysalanych	wysalanych	mg %	% białka
1	190	2,6	86	2,3	110	2,8	104	2,8	80	2,3	60	5,5	15	1,7	5	0,3					
2	205	2,8	99	2,5	113	2,7	107	3,3	92	2,8	52	4,0	22	5,5	18	1,1					
3	250	4,3	103	3,1	115	3,5	142	5,7	135	5,2	95	9,5	10	1,4	—	—					
4	180	2,8	86	2,5	95	2,9	94	3,0	85	2,6	60	6,0	10	1,2	15	1,0					
5	160	2,5	—	—	90	2,6	—	—	70	2,3	48	4,0	12	1,5	10	0,7					
6	166	2,4	65	1,8	86	2,3	97	3,0	80	2,6	—	—	—	—	12	0,9					
7	200	3,2	91	2,5	112	3,1	107	4,3	88	3,5	53	5,3	23	4,6	12	1,2					
8	174	2,2	70	1,6	86	2,0	103	3,0	88	2,5	70	6,3	8	1,1	10	0,6					
9	226	3,3	103	2,5	116	2,9	122	4,2	110	3,8	82	7,4	18	2,5	10	0,9					
10	172	2,2	88	2,0	94	2,2	84	2,5	78	2,3	—	—	—	—	17	1,2					
11	191	2,8	86	2,6	90	2,5	104	3,1	100	3,2	75	6,2	15	1,9	10	0,9					
12	195	2,9	53	1,5	77	2,0	139	4,3	118	4,1	88	5,8	14	2,8	16	1,8					
13	256	3,6	143	3,7	129	3,4	121	3,9	127	3,8	87	7,2	15	1,9	25	1,9					
14	197	2,6	83	2,1	92	2,2	114	2,9	105	2,9	75	7,5	10	1,2	20	1,1					
średnio	197	2,9	89	2,4	100	2,6	111	3,5	97	3,1	70	6,2	14	2,2	14	1,0					
standard. odchylenie 28,1	0,5	20,9	0,6	14,6	0,5	16,1	0,9	18,9	0,8	15,0	1,5	4,6	1,3	5,1	0,4	—	—	—	—	—	—

mg % = mg/100 ml surowicy,

% białka = % fosfatydów w białku badanym.

nięcie przewagi fosfatydów z β - w stronę α -globulin. Podczas gdy wyniki naszych badań wykazują w β -globulinach zaledwie 2,2%, zaś w α -globulinach blisko trzykrotnie więcej, bo 6,2% średnio, to wymienieni autorzy znajdują wyższy odsetek w β -globulinach (10,0%), niższy w α -globulinach (7,3%). Przyjmując, że otrzymane użyta przez nas techniką frakcje globulinowe są identyczne z frakcjami elektroforetycznymi Blixa i wsp., spostrzegane przez nas przemieszczenia mogłyby występować pod wpływem użytych do frakcjonowania stężonych roztworów soli. Takie zjawiska asocjacji i dysocjacji zachodzące pod wpływem roztworów soli opisał w swej pracy Soerensen (15), twierdząc, że skład kompleksu otrzymanego przy użyciu odczynnika wytrącającego nie może podać obrazu warunków istniejących w pierwotnym roztworze. Trudnym do wytłumaczenia pozostaje jednak, dlaczego przy użyciu dwu zupełnie różnych odczynników wytrącających siarczanu sodu i metanolu o odpowiednim pH otrzymane wyniki dla fosfatydów albumin tak mało różniły się między sobą i wynikami innych autorów uzyskiwanymi we frakcjach elektroforetycznych.

Badania Cohna i wsp. (2, 3) posługujących się metodą etanolową przy rozdzielaniu białek wskazują na to, że prawie całość lipidów znajduje się we frakcjach zawierających α_1 - i β_1 -lipoproteiny. Lever i wsp. (11) prowadząc dalsze badania w izolowanych, zmodyfikowaną przez siebie metodą Cohna (z r. 1950), frakcjach podają, że w wyodrębnionej frakcji IV+V, zawierających α -lipoproteiny, znajduje się większa ilość fosfatydów niż cholesterolu (stosunek mol. cholesterol: P lipid = 0,81) w porównaniu z frakcją I + III mieszczącą w sobie β -lipoproteiny (stosunek mol. cholesterol: P lipid. = 2,31).

Do podobnych wyników dochodzą Kunkel i Slatter (10) posługując się elektroforezą bibułową; wykazali oni, że współczynnik cholesterol fosfatydy wynosi 0,50 w α -globulinach, zaś β -globulinach 1,3 średnio. Przy użyciu ostatnio wymienionej techniki, tj. elektroforezy bibułowej, Fasoli (7) stwierdza, że w normalnych surowicach 60 — 75% absorbowanego zabarwienia i całkowitego cholesterolu pojawia się w smudze β_1 , zaś smuga α_1 zawiera prawie wszystkie inne składniki lipidowe, jak to wykazała absorpcja barwy i oznaczanie cholesterolu.

Porównanie wartości wykazanych dla fosfatydów w obecnej pracy z wynikami otrzymanymi dla cholesterolu w 6 badanych surowicach normalnych przy użyciu tej samej techniki frakcjonowania białek (Dżułyńska 6) wskazuje również na wyższy stosunek cholesterolu do fosfatydów we frakcji β -globulinowej w odniesieniu do α -globulin. W β -globulinach wynosi on 2,4, podczas gdy w α — 0,7 średnio.

Rozbieżności w wynikach otrzymywanych dla fosfatydów spotykane w piśmiennictwie są zrozumiałe, jeśli się weźmie pod uwagę zastosowanie przez autorów różnych sposobów rozdzielania białek. Zastanawiające są jednak wyniki Delsala (4), który przeprowadził w swej pracy porównawcze badania w kierunku oznaczania zawartości lipidów we frakcjach otrzymywanych przy użyciu różnych metod, między innymi metody Pillemera i Hutchinsona, użytej również i w naszej pracy. Autor otrzymał dwukrotnie większą zawartość fosfatydów w albuminach w stosunku do fosfatydów globulin (w globulinach 2,9 mg % P, w albuminach 6,2 mg % P), podczas gdy znalezione przez nas wartości w 13 surowicach na 14 badanych wykazywały przewagę, jakkolwiek nieznaczną, fosfatydów związanych z globulinami.

Dane przytoczone przez Delsala dotyczą badań przeprowadzonych na jednej tylko surowicy, zatem wartości uzyskane dla fosfatydów mogą być zupełnie przypadkowe. Dużą rolę może tu odgrywać wprowadzenie niezmiernie skomplikowanego sposobu postępowania, połączonego ze zbyt dużym zupełnie rozpuszczaniem otrzymywanych białkowych osadów, po to, aby je następnie wytrącać wrzącym alkoholem, po czym ekstrahować alkoholo-eterem. Nawet krótkie działanie gorącego etanolu musi spowodować częściową utratę fosfolipidów, co może być przyczyną otrzymywania za niskich wyników dla fosfatydów globulin i niemożności uzyskania wartości fosfatydów całkowitych ze sumy fosfatydów obu frakcji.

Zastosowany w naszej pracy prosty sposób postępowania jest zupełnie wystarczający; ekstrakcja jest zupełna, o czym świadczą otrzymane przez nas wyniki: suma fosfatydów towarzyszącym albuminom i globulinom pokrywa się całkowicie z całością fosfatydów surowicy, w granicach błędu doświadczalnego. Poza tym, jak już poprzednio wspomniano, w delipidowanych białkach nie stwierdzono nawet śladów fosfatydów przy powtórnej ekstrakcji.

Między innymi, badań wspomniany autor rozmieszczenia fosfatydów obok innych lipidów w albuminach i globulinach otrzymywanych z surowicy drogą połowicznego wysycenia siarczanem amonu, podobnie jak Macheboeuf (12) i Theorell (17). Niskie wartości dla fosfatydów globulin w porównaniu z wysokimi w albuminach, jakie otrzymywali wymienieni autorzy (Macheboeuf: ślady P w globulinach, prawie całość P w albuminach; Theorell: 0,57 g ‰ lecytyny w globulinach, 1,29 g ‰ w albuminach), jak również i Delsal (1,7 mg % P we frakcji globulinowej, zaś 4,6 w albuminowej), mogą być spowodowane przede wszyst-

kim niejednorodnością otrzymywanych przez nich frakcji białkowych. Badania bowiem Svensona (16) przy pomocy elektroforezy swobodnej wykazały, że stosując metodę frakcjonowania siarczanem amonu w połowicznym nasyceniu otrzymuje się roztwór albumin bogaty w lipidy, pochodzące z frakcji α_1 -lipoproteinowej, która w znacznym odsetku pozostaje w roztworze.

Odnosnie zjawisk wędrówki fosfatydów we frakcjach otrzymywanych metodą Pillemera, to zmiany te mogą pozostawać w związku z denaturacją białka, która zachodzi pod wpływem dłużej trwającego oddziaływania metanolu. Wskutek zmian w strukturze sympleksu lipido-białkowego, spowodowanych tym procesem, mogą ulec rozluźnieniu wiązania fosfatydów z białkiem, a uwolnione fosfatydy wypadać z roztworu i dołączać się do osadu globulin. Możliwe jest również rozluźniające oddziaływanie użytego buforu na wiązanie lipidów z białkiem. Podobne zjawisko stwierdził Maurer (13) oznaczając fosfatydy we frakcjach białkowych przy pomocy dłużej trwającej elektroforezy bibułowej, tłumacząc je wrażliwością wiązań występujących w lipoproteinach na działanie buforu.

Czy opracowana przez nas metoda będzie mogła mieć zastosowanie dla celów diagnostyki, to jest czy w stanach chorobowych wystąpią zmiany w rozmieszczeniu fosfatydów w otrzymywanych frakcjach, wykaże druga część pracy, która jest w toku.

Streszczenie

Zbadano 14 surowic normalnych pod względem zachowania się fosfolipidów w białku całkowitym i frakcjach białkowych, otrzymywanych dwoma metodami: metanolową Pillemera i Hutchinsona oraz wysalania za pomocą siarczanu sodu Kibricka i Blonstein. Niezależnie od użytego sposobu frakcjonowania stwierdzono, że większy odsetek fosfolipidów zawierają globuliny, mniejszy albuminy. Wśród frakcji globulinowych, otrzymywanych drogą wysalania, najwyższą procentową zawartość fosfatydów wykazują α -globuliny, znacznie niższą β -, a najniższą γ -globuliny.

W miarę stania z odczynnikiem metanolowym stwierdzono znaczne ubywanie zawartości fosfatydów związanych z albuminami z równoczesnym wzbogacaniem się w fosfolipidy globulin. Podobnych zmian we frakcjach wysalanych, przechowywanych w roztworze siarczanu sodu nie wykazano.

LITERATURA

1. Blix G., Tiselius A., Svensson H.: *J. Biol. Chem.* **137**, 485, 1941.
2. Cohn E. J., Strong L. E., Hughes W. L., Mulford D. J., Ashworth N. J., Melin M., Taylor H. L.: *J. Am. Chem. Soc.* **68**, 459, 1946.
3. Cohn E. J., Gurd F. R. N., Surgenot D. M., Barnes B. A., Brown R. K., Deronaux G., Gillespie J. M., Kahut F. W., Lever W. F., Liu C. H., Mittelman D., Monton R. F., Schmidt K., Uroma E.: *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 465, 1950.
4. Delsal J. W.: *Bull. Soc. Chim. Biol.* **32**, 213, 1950.
5. Dzułyńska J., Kodejszko E., Szymańska Z.: *P. Derm. i Wen.* **2**, 213, 1953.
6. Dzułyńska J.: *P. Derm. i Wen.* **3**, 158, 1954.
7. Fasoli A.: *Lancet* **262**, 107, 1952.
8. Fiske C. H., Subbarow Y.: *J. Biol. Chem.* **66**, 375, 1925.
9. Kibrick A. C., Blonstein M.: *J. Biol. Chem.* **176**, 983, 1948.
10. Kunkel H. G., Slatter R. J.: *J. Clin. Invest.* **31**, 677, 1952.
11. Lever W. F., Gurd F. R. N., Uroma E., Brown R. K., Barnes B. A., Schmidt K., Shultz E.: *J. Clin. Invest.* **30**, 99, 1951.
12. Macheboeuf M.: *Bull. Soc. Chim. Biol.* **11**, 116, 1939.
13. Maurer W.: *Klin. Wchschr.* **30**, 323, 1952.
14. Pillemer L., Hutchinson M. C.: *J. Biol. Chem.* **158**, 299, 1945.
15. Soerensen M.: *Kolloid Z.* **53**, 102, 170, 360, 1930.
16. Svensson H.: *J. Biol. Chem.* **139**, 805, 1941.
17. Theorell H.: *Biochem. Z.* **223**, 1, 1930.

ФОСФАТИДЫ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ СЫВОРОТКИ, ПОЛУЧЕННЫЕ
ПО МЕТОДАМ: ВЫСАЛИВАНИЯ И ОСАЖДЕНИЯ МЕТАНОЛОМ

Резюме

Исследовано 14 нормальных сывороток с точки зрения фосфолипидов белка и белковых фракций полученных по методу осаждения метанолом Pillemera и Natchinsona а также по методу высаливания сернокислым натрием Kubricka и Blonsteina.

Независимо от примененного метода фракционирования установлено, что больший процент фосфолипидов содержат глобулины, а меньший альбумины.

Среди глобулиновых фракций самое большое количество фосфатидов содержат α -глобулины, меньшее β -глобулины и самое меньшее γ -глобулины.

В присутствии метанолового реактива обнаружено уменьшение количества фосфатидов связанных с альбуминами и одновременный рост фосфатидов связанных с глобулинами. Не обнаружено подобных изменений в фракциях полученных путем высаливания и хранимых в присутствии сернокислого натрия.

PHOSPHATIDES IN SERUM — PROTEIN FRACTIONS, OBTAINED BY SALTING OUT
AND BY METHANOL PRECIPITATION

Summary

The content of phospholipides in the whole protein and in protein fractions was estimated in the serum of 14 healthy persons; the fractionation was performed by using the method of Pillemer — Hutchinson, employing methanol precipitation, as well as by salting out with sodium sulphate as described by Kibrick — Blonstein. Regardless of the procedure employed it was observed that globulins always contained a higher percentage of phospholipides than the albumin fraction.

Amongst the globulin fractions, obtained by salting out, the highest percentage of phosphatides was found in the α -globulin fraction, a significantly lower percentage in the β -globulins and the lowest content in the γ -globulin fraction.

Prolonged contact with the methanol reagent caused a decrease in the content of albumin-bound phosphatides, with a corresponding simultaneous enrichment of the globulin fractions. This phenomenon was not observed in serum fractions obtained by salting out and being in prolonged contact with solutions of sodium sulphate.

Otrzymano 21.XI.1954.

IGNACY REIFER I JERZY BUCHOWICZ

MIKROMETODA OZNACZANIA ALKALOIDÓW TROPOWYCH W MATERIALE ROŚLINNYM

Zakład Biochemii SGGW

Kierownik: Prof. dr I. Reifer

Roztwór p-dwumetylamino-benzaldehydu w stężonym kwasie siarkowym, znany pod nazwą odczynnika Wasickyego tworzy w odpowiednich warunkach z alkaloidami tropowymi połączenia o bardzo intensywnym zabarwieniu. Te barwne połączenia zostały w ostatnich latach wykorzystane do opracowania kolorymetrycznych semimikro- i mikrometod oznaczania atropiny, hyoscyny i hyoscyaminy w materiale roślinnym i w preparatach farmaceutycznych.

Pierwszą ilościową metodę oznaczania alkaloidów tropowych za pomocą p-dwumetylamino-benzaldehydu opracował Van Os (6). Pewne udoskonalenia i modyfikacje wprowadzili Gottlieb (1), Jentsch (2), a Romeike (3), Pal Rozsa (4) i Wilczyńska (5) dostosowali tę metodę do mikrooznaczania alkaloidów tropowych w ilościach od 50 µg wzwyż.

Metoda ilościowego oznaczania alkaloidów tropowych z p-dwumetylamino-benzaldehydem polega zasadniczo na barwnej reakcji kwasu tropowego z odczynnikiem Wasickyego w stężonym kwasie siarkowym, przy czym charakterystyczne zabarwienie występuje w środowisku bezwodnika kwasu octowego. Wymienione modyfikacje różnią się między sobą bardzo nieznacznie i w zasadzie sprowadzają się do małych zmian w stężeniu kwasu siarkowego i do zmian w czasie wywołania barwnego kompleksu.

Wszyscy autorzy zgodnie stwierdzają, że otrzymane barwne połączenie jest bardzo wrażliwe na wszelkie, nawet najmniejsze zmiany w warunkach przeprowadzenia analizy. Tak np. Jentsch (2) twierdzi, że stężenie kwasu siarkowego musi wynosić dokładnie 88% i zmiana stężenia, nie przekraczająca 1%, powoduje zmiany w ekstynkcji dochodzące do 10%. Również sam przebieg oznaczania jest nader uciążliwy i delikatny. Metoda Jentscha wymaga ogrzewania próby przez dokładnie 180 sekund

w łaźni wodnej, chłodzenia w lodzie dokładnie przez 15 sekund i pozostawienie próby na przeciąg 1 godziny w temperaturze pokojowej. W metodzie Wilczyńskiej (5) wartość absorpcji ulega podwyższeniu o 10%, jeżeli próba z odczynnikiem pozostawiona jest przed ogrzewaniem na 1^{1/2} godziny w temperaturze pokojowej. Autorka stwierdziła również, że dodatek soli żelazowych zwiększa trwałość i intensywność barwy, przy czym maksimum intensywności uzyskała przy użyciu 0,05 ml 2% roztworu chlorku żelazowego na 1 ml odczynnika przy ogrzewaniu przez 2 minuty.

Trudności metodyczne oznaczania alkaloidów tropowych za pomocą barwnej reakcji z p-dwumetylamino-benzaldehydem są tak duże, że korzystanie z ustalonych dla pewnych ścisłych warunków współczynników absorpcji czy też krzywych wzorcowych nie jest wskazane. Ponadto ze względu na dużą wrażliwość reakcji na zmiany w warunkach analizy konieczne jest przeprowadzenie równoległych oznaczeń w próbach wzorcowych o znanych ilościach alkaloidów.

W toku wstępnych badań w naszym laboratorium stwierdziliśmy, że roztwór p-dwumetylamino-benzaldehydu w stężonym kwasie siarkowym już po krótkim czasie wyraźnie ciemnieje, a po upływie 24 godzin jest już nie do użytku, ponieważ w warunkach analizy alkaloidów tropowych daje bardzo wysoką ślepą odczynnikową. W alkoholu natomiast odczynnik ten nie zmienia swej pierwotnie bladej żółtej barwy i przechowywany w ciemnej butelce może być używany przez okres co najmniej 2 tygodni. Następnie stwierdzono, że bezwodnik kwasu octowego jest niepotrzebny do wywołania barwnego związku alkaloidów tropowych z p-dwumetylamino-benzaldehydem. W obecności 60% kwasu siarkowego lub bardziej stężonego powstaje fioletowe zabarwienie, które w granicach od 1 do 80 µg alkaloidów jest proporcjonalne do ilości alkaloidów w próbie.

W niniejszej pracy opisano prostą i szybką mikrometodę oznaczania alkaloidów tropowych na zasadzie reakcji z p-dwumetylamino-benzaldehydem. Metoda zezwala na oznaczenie od 1 do 80 µg alkaloidów tropowych i może być stosowana do oznaczeń tych alkaloidów w preparatach farmaceutycznych i w materiale roślinnym.

Część doświadczalna

Odczynniki. I. p-Dwumetylamino-benzaldehyd. 1 g p-dwumetylamino-benzaldehydu rozpuścić na zimno w 20 ml 95% alkoholu etylowego. Odczynnik powinien być jasnożółty o t. top. 74°. Handlowy produkt jest często zanieczyszczony, o ciemnej barwie z zielonym odcieniem.

Szybko można go oczyścić w sposób następujący: rozpuścić na zimno w małym nadmiarze około 2 N kwasu siarkowego i wytrząsać kilkanaście razy z chloroformem. Większość zanieczyszczeń pozostaje w roztworze wodnym i częściowo oczyszczony intensywnie żółty p-dwumetylamino-benzaldehyd otrzymuje się po odparowaniu chloroformu pod zmniejszonym ciśnieniem. 25 g tego preparatu rozpuścić w 200 ml alkoholu, dodać 200 ml wody, odstawić na 24 godz, po dodaniu 400 ml wody odsączyć i przemyć małą ilością wody o temperaturze poniżej 10°C. Suszyć w eksykatorze, chroniąc przed światłem. Przechowywać w naczyniu z ciemnego szkła.

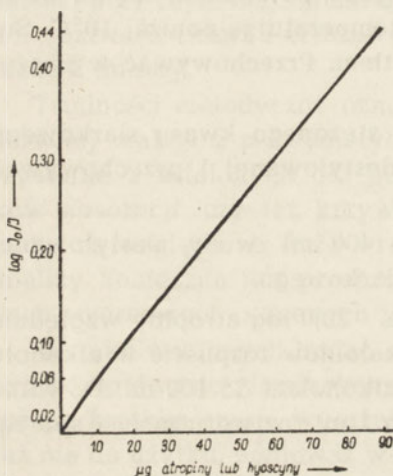
II. **Kwas siarkowy.** Do 30 ml stężonego kwasu siarkowego o c. wł. 1,82 — 1,84 dodać 4 ml wody destylowanej i przechowywać w szczelnie zakorkowanej butelce.

III. **Kwas siarkowy 60%.** Do 400 ml wody destylowanej wlać ostrożnie 600 ml stężonego kwasu siarkowego.

IV. **Atropina i hyoscyna.** 20,0 mg atropiny względnie hyoscyny albo odpowiednie ilości soli alkaloidów rozpuścić w alkoholu etylowym i w kolbce miarowej dopełnić alkoholem do 100 ml. Dowolne rozcieńczenie alkaloidów od 1 do 80 µg na 1 ml roztworu można sporządzić z roztworu macierzystego.

Metoda. 1 ml roztworu alkoholowego, zawierającego od 1 do 80 µg atropiny odparowuje się na wrzącej łaźni wodnej w normalnych próbkach laboratoryjnych o przekroju 15 — 17 mm, ściętych do wysokości około 50 mm. Po odparowaniu dodaje się z mikrobiurety 0,2 ml odczynnika (I) i ponownie odparowuje na łaźni wodnej, przez 2 — 3 minuty. p-Dwumetylamino-benzaldehyd w próbówce krystalizuje na wolnym powietrzu po upływie około 1 minuty i barwa jego jest słomkowo-żółta. Do zimnej próbówki dodaje się z mikrobiurety 0,2 ml kwasu siarkowego (II) i wstawia ponownie do wrzącej łaźni wodnej na 5 minut, przy czym przed ogrzewaniem należy p-dwumetylamino-benzaldehyd zupełnie rozpuścić w dodanym kwasie siarkowym przez wstawienie próbówki na kilka sekund do łaźni wodnej i splukanie osadu ze ścianek naczynia, wstrząsając próbówką. Po ostudzeniu próbek dodaje się 4,8 ml kwasu siarkowego (III), miesza i zawartość przenosi się do kolorymetrycznej próbówki. Mieszać należy przez 2 — 3-krotne przelanie płynu z próbówki do próbówki. Przepuszczalność światła przez zabarwiony roztwór mierzy się w fotokolorymetrze Leitza, stosując niebieski filtr C. Zawartość alkaloidu w badanej próbce odczytuje się wobec identycznie przygotowanej ślepej odczynnikowej nastawionej na 100% przepuszczalności. Otrzymany barwnik jest trwały w temperaturze pokojowej na okres co najmniej 3 godzin.

W granicach od 8 do 80 μg atropiny lub hyoscyny otrzymuje się w wyżej opisanych warunkach w aparacie Leitza, filtr C, wykres zgodnie z prawem Beera-Lamberta. W granicach poniżej 8 μg odczyty leżą na krzywej i dla każdego kolorymetru należy sporządzić krzywą wzorcową z oznaczeń na kilku poziomach atropiny w granicach od 1 do 80 μg .



Rys. 1. Krzywa standardowa atropiny oznaczonej kolorymetrem Leitza filtr C.

W tabelicy 1 podane są wyniki analiz czystej atropiny (średnia z 5 oznaczeń), wykonanych nową metodą.

Jak wynika z tabelicy 1, błąd metody w granicach od 1 do 8 μg alkaloidu nie przekracza $\pm 5\%$, a w granicach od 8 do 80 μg nie przekracza $\pm 3\%$.

W tabelicy 2 podane są wyniki analiz czystej hyoscyny (średnia z 5 oznaczeń) wykonane nową metodą. Ilości wykrytej hyoscyny odczytano z krzywej wzorcowej dla atropiny. Jak wynika z tabelicy 2, krzywa wzorcową dla hyoscyny jest identyczna z krzywą dla atropiny.

W tabelicy 3 podane są wyniki, które wykazują, że wytworzony barwnik jest trwały w temperaturze pokojowej co

Tabelica 1

Oznaczenie atropiny nową metodą

Użyto atropiny w μg	Wykryto w μg	Wykryto w %
80,0	80,0	100,0
70,0	68,0	97,2
50,0	50,5	101,0
35,0	34,4	98,2
25,0	25,0	100,0
20,0	19,6	98,2
12,5	12,5	100,0
8,0	8,2	103,0
4,0	4,2	105,0
2,0	2,0	100,0
1,0	1,05	105,0

najmniej przez okres 3 godzin. Wprawdzie próba ślepa i pełna po pewnym czasie nieznacznie dodatkowo się zabarwiają, ale różnica w przepuszczalności między próbą pełną i ślepą nie ulega zmianie.

Tablica 2

Oznaczenie hyoscyny nową metodą

Użyto hyoscyny w μg	$\log I_0/I$	Wykryto hyoscyny w μg	Wykryto w %
70	0,357	71,2	101,7
40	0,200	38,1	95,2
30	0,156	29,1	97,1
15	0,091	15,0	100,0
5	0,039	4,76	95,1
3	0,026	2,90	96,6

Tablica 3

Wpływ czasu na trwałość barwy alkaloidu z odczynnikiem. (Atropina = 12,5 μg)

Czas w minutach	Odczyt (ślepa na 100% przepuszczalności)	Odczyt próby ślepej
0	83	2
10	83	2
20	83	2
30	82,5	2
60	83,0	3,5
120	82,5	3,5
180	82,5	4,0

Zastosowanie metody do oznaczania alkaloidów tropowych w materiale roślinnym

Ze względu na konieczność oczyszczenia materiałów roślinnych przed kolorymetrycznym oznaczaniem alkaloidów tropowych, należało przede wszystkim stwierdzić, czy mikroilości atropiny i hyoscyny można ilościowo ekstrahować z roztworów wodnych do chloroformu. W tym celu pobrano 2 ml roztworu wodnego zawierającego 800 μg atropiny, zalkalizowano wodorotlenkiem sodowym i ekstrahowano atropinę chloroformem 4 razy 5 ml porcjami rozpuszczalnika. Chloroform oddestyloowano w łaźni wodnej, a pozostałość w kolbce zakwaszono rozcieńczonym kwasem siarkowym. Zalkalizowano jak poprzednio i ekstrahowano do chloroformu jak wyżej. Wyciąg uzupełniono chloroformem w kolbce miarowej do 25 ml i 1 ml roztworu chloroformowego, zawierającego 32 μg atropiny, pobrano do analizy. Dla porównania pobrano 2 ml roztworu wodnego atropiny z płynu standardowego, odparowano wodę i rozpuszczono w 25 ml chloroformu. W podobny sposób przygotowano i ekstrahowano roztwór wodny hyoscyny zawierający 700 μg hyoscyny w 25 ml chloroformu. Wreszcie ekstrahowano mieszaninę obu alkaloidów zawierającą 312 μg atropiny i 138 μg hyoscyny. Wyniki analiz omówionych ekstrakcji alkaloidów tropowych ujęte są w tablicy 4.

Jak wynika z tablicy 4, atropinę i hyoscyne można w mikroilościach ekstrahować do chloroformu bez strat. Analizy prób ekstrahowanych i kontrolnych są zgodne.

Tablica 4
Podwójna ekstrakcja atropiny i hyoscyny
do chloroformu

Alk. tropowy	Pobrano w μg	Sposób przygotowa- wania	Wykryto w μg
atropina	32,0	ekstrakcja	31,5
atropina	32,0	kontrola	31,5
hyoscyna	28,0	ekstrakcja	28,3
hyoscyna	28,0	kontrola	27,8
hyoscyna atropina	18,0	ekstrakcja	18,0

Następnie przystąpiono do ekstrakcji alkaloidów tropowych z materiału roślinnego. Alkoholowy wyciąg liści bielunia (*Datura stramonium*) odparowano na wrzącej łaźni wodnej, zakwaszono rozcieńczonym kwasem siarkowym i sączono do rozdzielacza. Po przemyciu sączka wodą destylowaną, zalkalizowano roztwór wodorotlenkiem sodowym i ekstrahowano alkaloidy do chloroformu. Następnie odparowano chloroform,

Tablica 5
Ekstrakcja alkaloidów tropowych z materiału roślinnego

Nr	Materiał	dodano alk. tropowych w μg	wykryto w 1 ml μg	wykryto μg w całości	powinno być
1	Bieluń liście młode	—	32,0	800,0	—
2	Bieluń liście naj- młodsze	—	59,0	1475,0	—
3*	1	1012	14,2	1775,0	1812,0
4*	2	1012	20,0	2500,0	2487,0

* Ze względu na duże stężenie alkaloidów próby nr 3 i 4 rozcieńczono przed analizą pięciokrotnie.

pozostałość kolbki rozpuszczono w rozcieńczonym kwasie siarkowym, sączono ponownie i zalkalizowany roztwór wodny ekstrahowano do 25 ml chloroformu. Do kolbki miarowej zawierającej alkaloidy w chloroformie dodano około 1 g bezwodnego węglanu sodowego i po energicznym wytrząsaniu 1 ml klarownego roztworu pobierano do analizy. Dla kontroli ekstrakcji wykonano również analizy na wyciągach roślinnych z dodanymi czystymi mieszaninami atropiny i hyoscyny.

Jak wynika z tablicy 5 ekstrakcja czystych alkaloidów dodanych do wyciągów alkoholowych liści bielunia jest ilościowa.

Ekstrakcja alkaloidów tropowych z materiału roślinnego

10 g drobno pociętego materiału roślinnego lub odpowiednio mniej suszonego materiału zalewa się około 50 ml alkoholu etylowego i homogenizuje w aparacie marki Cyklon lub Waring-Blendor 6 razy przez 30 sekund. Homogenizat przynosi się do kolbki Erlenmeyera o pojemności 200 ml i po dokładnym przemyciu homogenizatora około 40 ml alkoholu ogrzewa się połączone roztwory na łaźni wodnej przez 15 minut. W celu uniknięcia zbytniego parowania alkoholu zamyka się kolbkę korkiem zaopatrzonym w rurkę szklaną o długości około 30 cm. Zimny roztwór alkoholowy przynosi się do 100 ml kolbki miarowej, po uprzednim przesączeniu przez sączek z waty i uzupełnia alkoholem do znaku. W zależności od ilości alkaloidów tropowych w próbie, odpipetowuje się 1 do 10 ml roztworu alkoholowego do zlewki o pojemności 100 ml i odparowuje alkohol na łaźni wodnej. Do pozostałości w zlewce dodaje się 1 ml około 0,1 N kwasu siarkowego i około 10 ml wody destylowanej. Zawartość zlewki podgrzewa się do wrzenia i po ochłodzeniu sączy do rozdzielacza o pojemności 50 ml. Po 3-krotnym przemyciu sączka małymi ilościami wody destylowanej, alkalinizuje się roztwór w rozdzielaczu około 5 ml 0,1 N wodorotlenku sodowego i wytrząsa 4 razy po 5 ml chloroformu. Chloroform zawierający alkaloidy zbiera się w kolbce i oddestylowuje na łaźni wodnej. Pozostałość na dnie kolbki rozpuszcza się w 10 ml około 0,1 N kwasu siarkowego i sączy do rozdzielacza jak wyżej. Po przemyciu sączka wodą destylowaną, alkalinizuje się kwaśny roztwór 2 ml około 2 N wodorotlenku sodowego i wytrząsa chloroformem jak wyżej. Chloroform zawierający alkaloid zbiera się w 25 ml kolbce miarowej i uzupełnia chloroformem do znaku. W celu otrzymania klarownych roztworów dosypuje się do kolbki około 1 g bezwodnego węglanu sodowego i wytrząsa energicznie. Do oznaczenia pobiera się 1 ml roztworu i po odparowaniu chloroformu przez 3 — 5 minut na łaźni wodnej postępuje się jak podano przy analizie czystych roz-

tworów atropiny. W tablicy 6 umieszczone są wyniki analiz pokrzyku (*Atropa belladonna*) i bielunia (*Datura stramonium*).

Tablica 6
Zawartość alkaloidów tropowych
w bieluniu i w pokrzyku

Materiał	wykryto μg w próbce	% alkaloidów
Bieluń, liście najmłodsze	59,0	0,295
Bieluń, liście młode	32,0	0,160
Bieluń, liście dojrzałe	16,0	0,080
Bieluń, pąki	26,0	0,130
Bieluń, łodygi	10,25	0,051
Bieluń, korzenie	3,0	0,015
Bieluń, liście dojrzałe suszone	4,0	0,10
Pokrzyk, liście dojrzałe suszone	5,0	0,125

Dyskusja

Nowoopracowana mikrometoda umożliwia ilościowe oznaczanie alkaloidów tropowych w granicach od 1 do 80 μg . Bardzo małe ilości alkaloidów potrzebnych do analizy pozwalają na zmniejszenie ilości materiału potrzebnego do badania. W zasadzie w liściach bielunia i pokrzyku o zawartości np. 0,1% alkaloidów próbka nie przekraczająca 100 mg świeżego materiału w zupełności wystarczy do przeprowadzenia 25 analiz. Jednak ze względu na konieczność pobierania przeciętnej próby, proponuje się korzystać z naważek 10 g. Poza tym wykonanie ekstrakcji jest znacznie ułatwione, ponieważ przy użyciu rozcieńczonych alkoholowych roztworów alkaloidów rozdział fazy wodnej i chloroformowej jest bardzo szybki i ostry.

W nowoopracowanej metodzie p-dwumetylamino-benzaldehyd rozpuszczony jest w alkoholu, zamiast w kwasie siarkowym, co umożliwia

przechowanie odczynnika przez dłuższy okres czasu i obniża ślepą odczynnikową do minimum. Bezwodnik kwasu octowego zastąpiono 60% kwasem siarkowym, który jest odczynnikiem dużo tańszym i nie przykrym w użyciu. Metoda zezwala na korzystanie z krzywych wzorcowych, ponieważ wyeliminowano wrażliwość reakcji na drobne zmiany w warunkach jej przeprowadzenia.

W celu otrzymania dokładnych i powtarzalnych wyników, należy skrupulatnie przestrzegać zachowanie następujących warunków pracy:

1. Chloroform musi być całkowicie odparowany, bowiem najmniejsze ślady chloroformu reagują z kwasem siarkowym i są powodem nadmiernie wysokich ślepych odczynnikowych. Probówki zawierające wyciąg chloroformowy należy przeto ogrzewać na wrzącej łaźni wodnej co najmniej przez 3 minuty.

2. Ślady acetonu lub eteru naftowego w powietrzu powodują również wysokie ślepe i dlatego nie można wykonywać oznaczeń alkaloidów tropowych podaną metodą w pomieszczeniach, w których używa się acetonu lub eteru naftowego.

3. p-Dwumetylamino-benzaldehyd nie może zawierać żadnych zanieczyszczeń, a 5% roztwór odczynnika w alkoholu powinien mieć bladeżółte zabarwienie.

4. Najbardziej istotnym czynnikiem dokładnego oznaczania alkaloidów jest czysty kwas siarkowy (odczynnik II). Musi on być absolutnie bezbarwny, a w próbie ślepej z p-dwumetylamino-benzaldehydem nie może dawać zabarwienia, które w kolorymetrze wykazuje ponad 2% absorpcji światła. Jeżeli kwas siarkowy nie odpowiada tym wymaganiom, należy go przedestyłować. Do oznaczeń alkaloidów tropowych kwasu siarkowego nie można pobierać z butelki, ponieważ przez ciągłe otwieranie naczynia stężony kwas siarkowy zanieczyszcza się bardzo szybko i pochłania z powietrza lotne rozpuszczalniki organiczne, które uniemożliwiają wykonanie oznaczenia. Z tego powodu należy kwas siarkowy pobierać z mikrobiurety np. o pojemności 5 ml, przy czym oba górne otwory biurety i zbiornika muszą być zamknięte małymi płuczkami zawierającymi kilka kropel stężonego kwasu siarkowego. Krany biurety nie mogą być wazelinowane. Zwilżenie kranów stężonym kwasem siarkowym umożliwia łatwą nimi manipulację.

5. Probówki, w których przeprowadza się analizę muszą być absolutnie czyste. Jeżeli probówka była zanieczyszczona, wówczas wykrystalizowany p-dwumetylamino-benzaldehyd po odparowaniu alkoholu posiada brunatny odcień, a nie, jak winno być, jasnożółty. W tym wypadku należy oznaczenie powtórzyć.

Przez wyeliminowanie wrażliwości reakcji na zmiany w warunkach pracy czas ogrzewania alkaloidów z odczynnikiem nie jest krytyczny i można ogrzewanie przedłużyć np. do 10 minut bez zmiany w przepuszczalności kolorymetrycznego roztworu. Ogrzewane przez 5 minut próby wykazują czystą, piękną fiołkową barwę, podczas gdy dłuższe ogrzewanie powoduje wytworzenie brunatnych odcieni. Koncentracja kwasu siarkowego (odczynnik III) również nie jest krytyczna, można używać 60% i bardziej stężony kwas. Wytworzony barwnik jest trwały na okres 3 godzin, a ślepa odczynnikowa przy zachowaniu opisanych warunków jest minimalna.

Większość lotnych organicznych rozpuszczalników reaguje z gorącym kwasem siarkowym. W celu uzyskania bezbarwnych ślepych odczynnikowych należy przeto wystrzegać się obecności eteru naftowego, acetonu, eteru etylowego itp. w atmosferze pracowni.

Opisana metoda zezwala na szybkie oznaczenie alkaloidów tropowych w materiale roślinnym i czas trwania analizy w oczyszczonych ekstraktach roślinnych nie przekracza 20 minut. Pełne oznaczenie łącznie z homogenizowaniem i ekstrakcją może być wykonane w ciągu 45 minut. Metoda zezwala na oznaczenie od 1 do 80 μg alkaloidów tropowych w granicach błędów $\pm 5\%$.

Streszczenie

1. Opisano kolorymetryczną metodę mikrooznaczania alkaloidów tropowych w materiale roślinnym.

2. Metoda polega na reakcji p-dwumetylaminobenzaldehydu, który z alkaloidami tropowymi tworzy barwnik o intensywnym odcieniu umożliwiającą kolorymetryczne oznaczenie alkaloidów w ilościach od 1 do 80 μg .

3. Bezwodnik kwasu octowego zastąpiono 60% kwasem siarkowym i p-dwumetylaminobenzaldehyd rozpuszczono w alkoholu zamiast w kwasie siarkowym. Opracowane warunki oznaczenia umożliwiają korzystanie z krzywych wzorcowych i wrażliwość reakcji na drobne zmiany w stężeniu odczynników została wyeliminowana.

4. Według opisanej metody można oznaczyć alkaloidy tropowe w materiale roślinnym łącznie z przygotowaniem materiału i ekstrakcją w czasie nie przekraczającym 45 minut.

5. Ze względu na szybkość oznaczania i minimalną ilość potrzebnych rozpuszczalników i odczynników opisana metoda nadaje się do masowego oznaczania alkaloidów tropowych w materiale roślinnym i w preparatach farmaceutycznych.

L I T E R A T U R A

1. G o t t l i e b I.: *Dansk. Tids. Farm.* **24**, 40, 1950.
2. J e n t s c h H.: *Journ. Pharm. Pharmacol.* **4**, 785, 1952.
3. R o e i k e A.: *Pharmazie* **7**, 496, 1952.
4. R o z s a P a l.: *Magyar Kémi. Folyóirat.* **58**, 364, 1952.
5. W i ł c z y Ń s k a I.: *Acta Pol. Pharm.* **3**, 169, 1954.
6. V a n O s F. H. L.: *Recueil Trav. Chim. Pays-Bas.* **64**, 1/2, 1945.

МИКРОМЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРОПИЧНЫХ АЛКАЛОИДОВ
В РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ

Р е з ю м е

1. Описан calorиметрический микрометод определения алкалоидов в растительном материале.

2. Метод основан на реакции р-диметиламинобензальдегида образующего с тропичными алкалоидами интенсивно окрашенный краситель, способствующий calorиметрическому определению алкалоидов в интервале от 1 до 80 мкг.

3. Уксусный ангидрид был заменен 60% серной кислотой и для растворения р-диметиламинобензальдегида был применен спирт вместо серной кислоты.

Эти условия позволяют применять контрольные кривые и исключают зависимость хода реакции от незначительных изменений концентрации реактивов.

4. По этому методу можно определить алкалоиды в растительном материале, приготовить материал и произвести экстрагирование в течении времени не превышающем 45 минут.

5. В связи с быстротой определения и минимальным количеством необходимых растворителей и реактивов этот метод пригоден для массового определения алкалоидов в растительном материале и фармацевтических препаратах.

A MICROMETHOD FOR THE DETERMINATION OF TROPINE ALKALOIDS
IN PLANT MATERIAL

S u m m a r y

1. A new colorimetric method for the microdetermination of tropine alkaloids is described.

2. The method depends upon the reaction of tropine alkaloids with p-dimethylaminobenzaldehyde. The colour produced permits the determination of tropine alkaloids in amounts from 1 to 80 μg.

3. Anhydrous acetic acid has been replaced by 60% sulphuric acid and the p-dimethylaminobenzaldehyde reagent was dissolved in alcohol

instead of sulphuric acid. Working conditions have been elaborated which permit the use of standard curves, and the susceptibility of the reaction to minor changes in concentration of the reagents has been eliminated.

4. According to the described method it is possible to determine tropane alkaloids in plant material, including the preparation and extraction of the tissue, in a period not exceeding 45 minutes.

5. Owing to the speed of the estimation and the small amounts of necessary solvents and reagents, the described method can be employed for mass determinations of tropane alkaloids in plant material as well as in pharmaceutical preparations.

Otrzymano 11.I.1955.

PRZEMYSŁAW SZAFRAŃSKI I LUDMIŁA SZARKOWSKA

INFILTROWANIE DROBNOUSTROJÓW

Z Zakładu Biochemii Polskiej Akademii Nauk w Warszawie

Kierownik: Prof. dr Józef Heller

W badaniach metabolicznych na nieuszkodzonym materiale biologicznym należy zawsze brać pod uwagę wybiórczą przepuszczalność komórek w stosunku do badanego związku. Nieprzepuszczalność otoczki jest często poważnym utrudnieniem przy tego rodzaju doświadczeniach.

Dotychczasowe prace nad wprowadzeniem różnych substancji do komórki szły w kierunku zwiększenia jej przepuszczalności. Badania takie wykonano na drobnoustrojach, jak *Brucella abortus*, gdzie starano się to osiągnąć za pomocą zmian pH, stężenia substratów, zamrażania i suszenia (Gerhardt, Mac Gregar, Marr, Olsen i Wilson (1)), na kilku szczepach z rodzaju *Mycobacterium*, używając detergentów (Model (6)), oraz na drożdżach, stosując zamrażanie i odmrażanie badanego materiału (Krebs, Gurin i Eggleston (3)). Bardziej drastyczne metody, mające na celu przełamanie bariery, jaką stanowi otoczka, prowadzą do dezintegracji komórek.

W poszukiwaniu skutecznej i nie drastycznej metody wprowadzania do komórki substratów natknęliśmy się na referat A. Oparina (7) o pracach badaczy radzieckich stosujących próżniową infiltrację roślin. Naprowadziły nas one na pomysł zastosowania zmiennego ciśnienia do naszych celów. W przypadku drobnoustrojów należało jednak przezwyciężyć zasadniczą przeszkodę, bowiem metoda infiltracji materiału roślinnego opiera się na istnieniu przestrzeni gazowych w roślinie. Komórki drobnoustrojów przestrzeni takich nie posiadają. Zasada opracowanej przez nas metody polega na wytworzeniu sztucznych przestrzeni gazowych w komórkach drobnoustrojów. Metoda nasza pozwala wprowadzać do wypełnionych płynem komórek związku, które normalnie nie wnikają do nich. Może być ona wykorzystana zarówno do wprowadzania, jak i usuwania substancji z komórek bez znaczącego ich uszkodzenia.

Część doświadczalna

Badania wykonano na hodowli *Mycobacterium phlei*, wyhodowanej na płynnej pożywce DGK (Sym (9)). Około dziesięciodniowy kożuch odsączano od płynnego podłoża przez sączek z bibuły. Wilgotne drobnoustroje poddawano przez pół godziny działaniu dwutlenku węgla pod ciśnieniem 50 atmosfer w temperaturze pokojowej. Dwutlenek węgla jest dobrze rozpuszczalny w wodzie i w tych warunkach rozpuszcza się w płynie komórkowym. Następnie obniżano stopniowo w ciągu 1,5 minuty ciśnienie do atmosferycznego. Przy rozprężaniu rozpuszczony w płynie komórkowym gaz wydostaje się z komórki, wyciskając część jej zawartości. Drobnoustroje, zawierające przestrzenie gazowe, zawieszano w roztworze substancji, którą chcieliśmy wprowadzić do wnętrza komórek. Tak przygotowaną zawieszinę poddawano powtórnie ciśnieniu 50 atmosfer, uzyskanemu za pomocą sprężonego azotu. Po upływie pół godziny ciśnienie obniżano do atmosferycznego. Użyty w tym wypadku źle rozpuszczalny w wodzie azot umożliwia wprowadzenie pod ciśnieniem do komórki roztworu badanej substancji. Gaz dobrze rozpuszczalny spowodowałby przy rozprężaniu usunięcie wprowadzonego do komórki płynu.

Opisany wyżej proces zastosowano do modelu w postaci woreczka celofanowego, z którego usuwano i ponownie wprowadzano roztwór skrobi. Woreczek celofanowy wypełniony całkowicie roztworem skrobi poddawano działaniu dwutlenku węgla pod ciśnieniem 50 atmosfer. Przy rozprężaniu dwutlenek węgla wyciskał całkowicie roztwór skrobi z wnętrza woreczka. Wypełniony gazem woreczek zanurzano w roztworze skrobi i poddawano ciśnieniu azotu. W tych warunkach część roztworu skrobi została wprowadzona do wnętrza woreczka. Manipulacje te nie uszkodziły woreczka; odkształcenia, jakie zachodziły w czasie infiltrowania, były odwracalne, ponieważ po zakończeniu infiltracji skrobia nie przechodziła przez woreczek. W przypadku gdy rozprężanie było prowadzone bardzo gwałtownie (około 15 sekund) woreczek ulegał rozerwaniu.

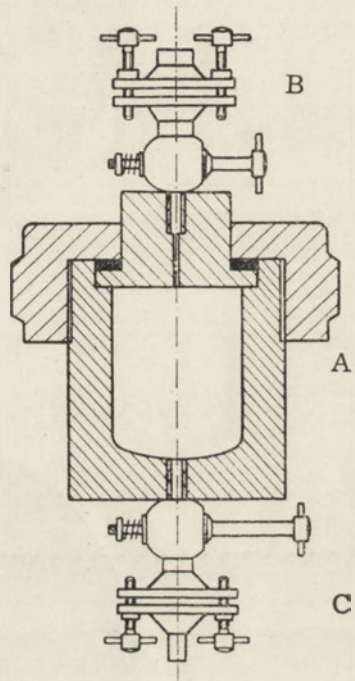
Infiltrowanie przeprowadzano w specjalnie skonstruowanej bombie stalowej, poniklowanej, która umożliwia pracę w jałowych warunkach. Bomba składa się z przestrzeni właściwej „A” o objętości około 150 ml, w której umieszcza się drobnoustroje. Zaopatrzona jest w dwa filtry Seitza „B” i „C”. Filtr górny „B” służy do jałowego wprowadzania gazów i odpowiednich roztworów, filtr dolny „C” do przepłukiwania drobnoustrojów oraz usuwania płynów z wnętrza bomby. Dokładny schemat bomby podaje rysunek 1.

Należało zbadać, czy wspomniane wyżej zabiegi nie uszkadzają komórek. W związku z tym przeprowadzono badania żywotności drobnoustrojów, poddanych tej procedurze. Wykonano cztery serie doświadczeń, oznaczając ilości żywych bakterii metodą płytkową. W tym celu część kożucha *Mycobacterium phlei* z około dziesięciodniowej hodowli na płynnej pożywce rozbijano perełkami szklanymi i sporządzano wodną zawiesinę. Gęstość optyczną tej zawiesiny oznaczano turbidymetrycznie w fotokolorymetrze Bonet-Maury przyjmując jako punkt wyjścia zawiesinę dającą 80% absorpcję. Z zawiesiny przyrządzono trzy rozcieńczenia 1 : 6⁶, 1 : 10⁷ i 1 : 10⁸. Posiewy wykonywano na agarowym podłożu „Difco”. Wyniki zebrano w tablicy 1.

Różnice w żywotności, jakie wystąpiły między drobnoustrojami traktowanymi dwutlenkiem węgla i azotem, a bakteriami nie traktowanymi były statystycznie nieistotne. Poza tym wykonano zdjęcia elektronowe bakterii przed i po działaniu dwutlenku węgla (rys. 1 i 2).

Na rys. 2 nie widać grubszych uszkodzeń komórek, a tylko zmianę ich kształtu. Aby przekonać się, że omawiana metoda pozwala wprowadzać substancje nawet niedyfundujące w normalnych warunkach do komórki zastosowano odpowiednie barwniki, używane nieraz jako jedno z kryteriów do określania przepuszczalności otoczki. Wybrano te barwniki, które normalnie nie barwiły komórek *Mycobacterium phlei*. Zawieszano żywe oraz martwe komórki w 0,5% i 2,5% roztworach badanych barwników na okres 24 godzin i następnie stwierdzano ich barwę pod mikroskopem. Jako martwe drobnoustroje użyto te, które w procesie liofilizacji straciły swoją żywotność. Odpowiednimi barwnikami okazały się indygo, zieleń jodowa oraz zieleń mocna. Wyniki zebrano w tablicy 2.

Dane z kolumny 3 wskazują, że użyte barwniki nie barwią w normalnych warunkach żywych komórek *Mycobacterium phlei*. Jedynie w przypadku zieleni jodowej zaobserwowano jasnozieloną barwę bakterii.



Rys. 1. Bomba do infiltracji.



Rys. 2. Elektronowe zdjęcie komórek *Mycobacterium phlei* z 10-dniowej hodowli na syntetycznej pożywce DGK. Powiększenie 6250X.



Rys. 3. Elektronowe zdjęcie komórek *Mycobacterium phlei* traktowanych CO₂. Na zdjęciu nie widać uszkodzeń komórek, widoczna jest natomiast zmiana ich kształtu, powstała pod wpływem rozprężenia CO₂. Preparat utrwalony kwasem osmowym. Powiększenie 8500X.

Tablica 1

Zywołność *Mycobacterium phlei* traktowanych CO₂ i N₂. Pożywka agarowa „Difco”.
Czas hodowli 7 dni. Rozcieńczenie 1:10⁶

Nr serii	Nr płytki	Ilość kolonii	
		kontrola	po działaniu CO ₂ i N ₂
I	1	160	163
	2	170	140
	3	196	151
	4	158	126
	5	134	155
II	1	92	107
	2	89	125
	3	90	105
	4	81	103
	5	112	108
III	1	96	121
	2	103	114
	3	89	67
	4	90	144
	5	101	128
IV	1	105	104
	2	110	94
	3	99	120
	4	82	108
	5	86	98

Martwe komórki, które z reguły posiadają zwiększoną przepuszczalność (Werkman i Wilson (11)), przy użyciu zieleni jodowej i indyga wyraźnie zabarwiły się, nie barwiły się natomiast zielenią mocną. Wyniki umieszczone w rubryce 6 odnoszą się do drobnoustrojów poddanych infiltrowaniu. Wskazują one, że udało się wprowadzić do wnętrza komórek barwniki, które w warunkach normalnych nie dyfundują do nich. W 0,5% roztworze zieleni mocnej bakterie przy zastosowaniu infiltrowania nie zabarwiły się. Udało się jednak zabarwić je przy użyciu 2,5% roztworu. W rubryce 5 przedstawione są wyniki prób kontrolnych. Polegały one na tym, że drobnoustroje w roztworach barwników wysyczonych uprzednio dwutlenkiem węgla pod ciśnieniem 50 atmosfer podda-

Tablica 2

Mikroskopowe badania dotyczące barwienia komórek *Mycobacterium phlei*.
Okres normalnego barwienia drobnoustrojów — 24 godziny. Okres infiltrowania
0,5 godziny

Nr doświad.	Użyty barwnik	Stęż. w %	Barwa komórek		Barwa komórek traktowanych	
			żywych	martwych	N ₂	CO ₂ i N ₂
1	Indygo	2,5	bezbarwne	ciemnoniebieskie	bezbarwne	ciemnoniebieskie
2	Indygo	0,5	bezbarwne	ciemnoniebieskie	bezbarwne	ciemnoniebieskie
3	Zieleń mocna	2,5	bezbarwne	bezbarwne	bezbarwne	jasnozielone
4	Zieleń mocna	0,5	bezbarwne	bezbarwne	bezbarwne	bezbarwne
5	Zieleń jodowa	0,5	jasnozielone	ciemnozielone	jasnozielone	ciemnozielone
Nr rubr.	1	2	3	4	5	6

wano od razu ciśnieniu azotu. Otrzymano rezultaty identyczne z uzyskanymi przy normalnym barwieniu żywych komórek, to jest brak zabarwienia (rubryka 3). Dowodzi to, że zastosowanie ciśnienia wywołanego tylko azotem nie zwiększa dyfuzji tych barwników do wnętrza drobnoustrojów oraz że samo wysycanie roztworu barwnika dwutlenkiem węgla nie odgrywa roli.

Widzimy zatem, że metoda nasza pozwala wprowadzać do komórek normalnie niedyfundujące związki. Kontrole dowodzą zarazem, że samo zastosowanie ciśnienia nie odgrywa decydującej roli. Istotnym jest wysycenie plazmy łatwo rozpuszczalnym gazem, który przy rozprężaniu wyrzuca część płynnej zawartości zostawiając drobne przestrzenie gazy.

Celem sprawdzenia słuszności tej interpretacji przeprowadzono ilościowe badania usuwanej przy rozprężaniu dwutlenku węgla zawartości komórek. W tym celu drobnoustroje odsączano od płynnego podłoża i przemywano wodą, aby usunąć z nich składniki pożywki. Bakterie poddawano następnie działaniu dwutlenku węgla pod ciśnieniem. Po rozprężeniu przemywano drobnoustroje na filtrze Seitza 100 ml wody i oznaczano w przesączu glikozę i azot aminowy. Jako ślepą próbę do tych oznaczeń przyjęto zawartość glikozy i azotu aminowego w ostat-

niej 100 ml porcji popłuczyn przed zastosowaniem dwutlenku węgla. Glikozę oznaczano metodą kolorymetryczną Mendela i Hooglanda (5), azot aminowy metodą Trolla i Cannana (10). Przedstawione w tabelicy 3 wyniki wyraźnie wskazują na usuwanie części płynu komórkowego.

Tabela 3

Zawartość glikozy i azotu aminowego w płynie komórkowym, uzyskanym z *Mycobacterium phlei* przy użyciu CO₂.

Czas rozprężania CO₂ : 1,5 min. Glikoza i azot aminowy w 100 ml popłuczyn bakteryjnych

Nr doświad.	Sucha masa bakterii w g	Oznaczana substancja	Substancja usunięta z drobnoustrojów w mg		
			przed działaniem CO ₂ (próba ślepa)	po działaniu CO ₂ (po uwzględnieniu ślepej próby)	pod działaniem CO ₂ w przeliczeniu na 1 g suchej masy bakterii
1	1,31	glikoza	0,00	6,30	4,8
2	1,61	glikoza	0,00	7,05	4,4
3	1,21	glikoza	0,00	6,50	5,4
4	0,88	azot aminowy	0,002	0,209	0,24
5	0,82	azot aminowy	0,003	0,297	0,36
Nr rubr.	1	2	3	4	5

Następne badania miały na celu wykazanie, że niedyfundujące barwniki wprowadzone metodą infiltrowania znajdują się istotnie w treści komórek. W tym celu zastosowaliśmy do zabarwionych komórek wysycanie dwutlenkiem węgla pod ciśnieniem, uzyskując przy rozprężeniu wyrzucenie części zabarwionej treści. Do doświadczeń brano około 10 g wilgotnych bakterii i używano 2,5% roztwór barwnika. Po infiltrowaniu indyga drobnoustroje przemywano na sączku wodą celem usunięcia nadmiaru barwnika. Przemywanie prowadzono 100 ml porcjami wody do uzyskania prawie bezbarwnych popłuczyn. Bakterie po przemyciu poddawano działaniu dwutlenku węgla pod ciśnieniem. W czasie rozprężania dwutlenek węgla usuwał część zawartości komórkowej. Przy przemyciu komórek 100 ml wody wyrzucone indygo zabarwiało popłuczyny i dało się oznaczyć kolorymetrycznie (fotokolorometr Pulfricha filtr S61). Wynik porównywano z zawartością indyga w ostatnich popłuczynach przed zabiegiem.

Wyniki ilościowe dotyczące usuwania indyga z komórek uprzednio wprowadzonego do nich zebrane są w tabelicy 4. W kolumnie 5 podane są ilości indyga zawarte w ostatnich popłuczynach przed działaniem

dwutlenku węgla przyjęte za ślepą próbę. Rubryka 7 przedstawia ilości barwnika usuniętego z drobnoustrojów przy użyciu dwutlenku węgla po uwzględnieniu ślepych prób. W tabelicy 4 są jednocześnie podane wyniki prób kontrolnych. Próby kontrolne polegały na tym, że drobnoustroje w roztworach barwników poddawano od razu ciśnieniu azotu. Dalsze postępowanie było analogiczne jak w próbach właściwych. Cyfry w kolumnie 8 wskazują, że ilości usuniętego indyga w próbach właściwych przekraczają dziesięciokrotnie ilości zawarte w próbach kontrolnych. Dowodzi to, że wprowadzony przez nas barwnik znalazł się istotnie wewnątrz komórki, zabarwiając jej treść.

Opisanym wyżej sposobem postępowania posłużyliśmy się, by raz jeszcze udowodnić, że stosowane przez nas barwniki nie dyfundują samorzutnie do komórek. W tym celu zawieszano bakterie na okres 24 godzin w 2,5% roztworze indyga, po czym przemywano je do osiągnięcia prawie bezbarwnych popłuczyn. Drobnoustroje poddawano następnie działaniu dwutlenku węgla pod ciśnieniem. Po rozprężeniu dwutlenku węgla przemywano bakterie 100 ml wody i oznaczano w przesączu zawartość indyga. Oznaczone ilości podane w rubryce 3 tabelicy 5 porównywano z ilością indyga wymytego 100 ml porcją wody przed działaniem dwutlenku węgla. Wyniki wskazują wyraźnie na brak dyfuzji indyga do komórek bakteryjnych w normalnych warunkach.

Tabela 5

Doświadczenia wykazujące brak dyfuzji indyga do komórek *Mycobacterium phlei*. Czas dyfuzji indyga: 24 godziny. Stężenie barwnika 2,5%. Czas rozprężania CO₂: 1,5 minuty. Indygo w 100 ml popłuczyn bakteryjnych

Nr doświad.	Sucha masa bakterii w g	Indygo usunięte z drobnoustrojów w mg	
		przed działaniem CO ₂	po działaniu CO ₂
1	0,925	0,070	0,078
2	1,035	0,080	0,080
3	0,700	0,070	0,075
Nr rubr.	1	2	3

Chcąc uzyskać krytyczną ocenę przydatności naszej metody, porównaliśmy ją z metodą infiltracji przez liofilizację.

Bakterie liofilizowano z roztworu soli fizjologicznej, stosując przyjęte na ogół warunki przy liofilizacji drobnoustrojów (Kuryłowicz, Kuź-

niecow i Kossakowski (4), Kolesow (2)). Nie można było liofilizować bakterii z płynów ochronnych, zawierających znaczną ilość dodatkowych substancji, ponieważ mogłyby one interferować w badaniach, jakie zakreślają nam cele infiltrowania. Do określania ilości żywych bakterii stosowano podobnie jak przy infiltrowaniu metodę płytkową. W przypadku kontroli stosowano rozcieńczenia $1:10^6$, $1:10^7$ i $1:10^8$, w przypadku zaś drobnoustrojów liofilizowanych rozcieńczenia $1:10^4$, $1:10^5$ i $1:10^6$. Jako punkt wyjścia przyjęto zawiesinę bakterii o 80% absorpcji. Wykonane metodą płytkową badania wpływu liofilizacji na żywotność *Mycobacterium phlei* wykazały, że po dziesięciodniowym przechowywaniu liofilizowanych bakterii w temperaturze pokojowej żywotność wynosiła około 2%. Tak niska przeżywalność nie pozwala niestety zastosować liofilizacji do naszych celów. Być może udałoby się znaleźć jakieś ochronne roztwory, których zastosowanie zwiększyłoby procent przeżywających bakterii i które nieinterferowałyby w późniejszych badaniach. Tego rodzaju poszukiwania jednak leżały poza granicami wytkniętych celów.

Dyskusja

Opracowana przez nas metoda infiltrowania drobnoustrojów stwarza możliwości wprowadzania różnych substancji do wnętrza komórek. Na przykładzie *Mycobacterium phlei* udowodniono infiltrowanie barwników, które nie zabarwiały żywych drobnoustrojów. Zarówno próby jakościowe z indygiem, zielenią jodową i zielenią mocną, jak i oznaczenia ilościowe z indygiem udowodniły infiltrowanie substancji niedyfundujących do wnętrza bakterii. Stosowane zabiegi nie uszkadzają komórek, czego dowodem były wyniki badań żywotności drobnoustrojów przeprowadzone metodą płytkową. Zastosowanie metody infiltracji rozszerza możliwości badań nad przemianą nieuszkodzonych komórek, pozwalając obejść poważną przeszkodę w tego rodzaju doświadczeniach, jaką jest nieprzepuszczalność otoczki komórkowej. Oczywiście trudno oczekiwać, aby infiltrowanie otwierało drogę dla wszystkich związków do wnętrza komórki. Prawdopodobnie możliwość ta ograniczy się tylko do pewnych wielkości cząsteczek, a także ładunki elektryczne zarówno otoczki, jak i wprowadzanego związku nie będą tu bez znaczenia.

Podana metoda może być zastosowana nie tylko do drobnoustrojów, lecz także do innego materiału biologicznego. Zaletą jej jest możliwość użycia zarówno do wprowadzania, jak i usuwania substancji z komórek bez ich uszkodzenia.

Tablica 4
Usuwanie indyga wprowadzonego do *Mycobacterium phlei* drogą infiltrowania.
Indygo w 100 ml popłuczyn bakteriujnych

Nr doświadczenia	Rodzaj próby	Sucha masa drobnoustrojów w g	Indygo usunięte z drobnoustrojów w mg						Indygo usunięte z komórek w stosunku do kontroli w %	Mikroskopowe badania barwy drobnoustrojów
			przed działaniem CO ₂	po działaniu CO ₂	przed działaniem CO ₂ (ślepa próba)	po działaniu CO ₂	na 1 g suchej masy bakterii	po działaniu CO ₂ z uwzględnieniem ślepej próby		
1	właściwa	2,35	0,220	1,180	0,093	0,020	0,409	1169	ciemnoniebieskie	
2	kontrola	2,03	0,200	0,270	0,098	0,133	0,035		bezbarwne	
3	właściwa	2,45	0,166	1,030	0,065	0,420	0,355		ciemnoniebieskie	
4	kontrola	2,73	0,286	0,370	0,105	0,139	0,034		bezbarwne	
5	właściwa	2,00	0,142	1,108	0,071	0,554	0,483		792	ciemnoniebieskie
6	kontrola	2,04	0,046	0,170	0,022	0,083	0,061			bezbarwne
Nr rubr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	

Wydaje się nam, że przydatność podanej przez nas zasady infiltrowania przekracza ramy wypracowanej metody i że zasada ta mogłaby być użyta z pożytkiem do różnych celów specjalnych. Warto by na przykład sprawdzić, czy przez zastosowanie nagłego rozprężania nie dałoby się przekształcić w metodę dezintegracji oszczędzającą układy enzymatyczne.

Poczuwamy się do miłego obowiązku podziękować Panu Doc. K. Zakrzewskiemu za przeprowadzenie liofilizacji badanych przez nas drobnoustrojów i Panu Mgr inż. A. Feltynowskiemu za wykonanie zdjęć elektronowych.

Streszczenie

W poszukiwaniu możliwości badania przemian nieuszkodzonego materiału biologicznego opracowano metodę infiltrowania drobnoustrojów. Polega ona na wytworzeniu sztucznych przestrzeni gazowych wewnątrz komórek. Udaje się to osiągnąć za pomocą wysycania wilgotnych bakterii dwutlenkiem węgla pod ciśnieniem 50 atmosfery. Przy rozprężaniu uchodzący dwutlenek węgla usuwa część zawartości komórki. Na miejsce przestrzeni gazowych w komórce wprowadza się roztwór badanej substancji stosując azot pod ciśnieniem 50 atmosfer. Stosowane zabiegi nie zmniejszają żywotności *Mycobacterium phlei*, co stwierdzono przy pomocy metody płytkowej. Udowodniono, że w czasie rozprężania dwutlenku węgla zostaje usunięta część zawartości komórki, oznaczając w uzyskanym tą drogą płynie glikozę i azot aminowy. Metoda pozwala wprowadzać do komórek substancje niedyfundujące do nich w normalnych warunkach. Stwierdzono to na przykładzie *Mycobacterium phlei*, do których przy pomocy tej metody wprowadzono barwniki, które normalnie nie zabarwiały tych drobnoustrojów. Do badań użyto indygo, zieleń jodową oraz zieleń mocną. Metodę infiltrowania można by zastosować nie tylko do drobnoustrojów, lecz także do innego materiału biologicznego. Przy użyciu opisanej procedury można wprowadzać jak i usuwać substancje z komórek bez ich uszkodzenia. Wydaje się, że można by ją również zastosować do niszczenia struktury komórkowej przy dobraniu odpowiednich warunków ciśnienia i szybkości rozprężania dwutlenku węgla.

LITERATURA

1. Gerhardt P., Mac Gregar D. R., Olsen C. B., Wilson J. B.: *J. Bact.* **65**, 5, 581, 1953.
2. Kolesow S. G.: *Wysusziwanie mikroorganizmów i biopreparatów*, Moskwa 1952.

3. Krebs H. A., Gurin S., Egglegston L. V.: *Biochem. J.* **51**, 614, 1952.
4. Kuryłowicz W., Kuźniecowa A., Kossakowski A.: *Gruźlica XXI*, 621, 1952.
5. Mendel M., Hoogland P. L.: *Lancet*, 6618, 6, 1950.
6. Model L. M.: *Biologija i biochimija tuberkuleznych Mikrobakterij*, Izdatielstwo Akademii Med. Nauk SSSR, Moskwa 1952.
7. Oparin A. I.: *Dokład na wtorem Miedzunarodnom Biochimizheskom Kongresie*, Paryż 1952. Izdatielstwo Akademii Nauk SSSR, Moskwa 1952.
8. Putman E. W., Hassid W. Z.: *J. Biol. Chem.*, **207**, 885, 1954.
9. Sym E. R.: *Przegląd Epidemiol.* **3**, 205, 1949.
10. Troll W., Cannan R. K.: *J. Biol. Chem.* **200**, 803, 1953.
11. Werkman C. H., Wilson P. W.: *Bacterial Physiology*, N. York 1951.

ИНФИЛЬТРАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Резюме

В поисках возможностей исследования обмена веществ неповрожденного биологического материала разработан метод инфильтрации микроорганизмов. Он заключается в образовании искусственных газовых пространств внутри клеток. Это достигается путем насыщения влажных бактерий двуокисью углерода под давлением 50 атмосфер.

При снижении давления уходящая двуокись углерода уносит часть содержимого клетки.

В образовавшееся в клетке пространство вводится раствор исследуемой субстанции, применяя азот под давлением 50 атмосфер. Применяемые операции не уменьшили жизнедеятельности *Mycobacterium phlei*.

Доказано, что при снижении давления двуокиси углерода удаляется часть содержимого клетки, после чего определяется в полученной таким образом жидкости глюкоза и азот аминокруппы. Этот метод делает возможным введение в клетку субстанции недиффундирующей в нее при нормальных условиях. Это обнаружено при работе с *Myc. phlei*, в которые по этому методу удалось ввести красители, не окрашивающие бактерии при нормальных условиях. Для исследований применены: индиго.

Метод инфильтрации можно применить не только при исследовании микроорганизмов, но и при исследовании другого биологического материала. Работая по указанному методу можно вводить в клетки и удалять из них субстанцию не разрушая при этом клетки. Кажется что этот метод можно применить для разрушения клетки, добывая при этом соответствующее давление и быстроту разряжения двуокиси углерода.

INFILTRATING OF MICROORGANISMS

Summary

A technique involving infiltration of bacterial cells has been developed in the search for a suitable method of conducting metabolic studies on undamaged biological material. It is based on the production of an artificial expansion of gas within the cells, which is achieved by saturation of the moist bacterial cells with carbon dioxide at 50 atmospheres pressure. During the subsequent decompression the carbon dioxide expels part of the cell constituents. The gaseous area within the cells is then occupied by a solution of the substance under investigation, which is introduced by means of nitrogen under 50 atmospheres pressure. By means of the plate method it was shown that the described procedure did not decrease the vitality of *Myc. phlei*. The displacement of part of the cell constituents by carbon dioxide has been proven by determinations of glucose and amino-N in the expelled solutions.

The method makes possible also the introduction of substances non-diffusible under normal conditions. In this way some dyes, such as indigo, iodine green and fast green, which do not normally stain *Myc. phlei*, have been introduced into the cells. The infiltration method can be applied not only to microorganisms, but also to other biological material. Introduction and removal of substances from the cells can be accomplished without destruction of the cellular structure.

Otrzymano 12.I.1955.

RYSZARD NIEMIRO

ZALEŻNOŚĆ ZAWARTOŚCI WAPNIA SUROWICY KRWI OD STĘŻENIA BIAŁKA

Z Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Gdańsku

Kierownik: Prof. dr Wł. Mozolowski

Od dawna wiadomo, że wapń surowicy występuje w dwóch fizjologicznych postaciach: jako wapń dyfundujący i niedyfundujący. Wapń niedyfundujący jest związany z białkami surowicy. Wapń dyfundujący, łatwo przechodzący przez ściany naczyń krwionośnych, jest częściowo zjonizowany, częściowo związany z kwasem cytrynowym.

Pomiędzy białkami surowicy i obydwooma postaciami wapnia istnieje ścisła zależność. Tę zależność można wyrazić ogólnym wzorem (3, 5, 6, 9, 11, 14).

$$(A) \quad \text{Tot. Ca} = m \times \text{Tot. Prot.} + b.$$

Tot. Ca — wapń całkowity; Tot. Prot. — białko całkowite; m i b przedstawiają wartości stałe. Wartości tych stałych u poszczególnych autorów są różne. Z podanego wzoru widać, że pomiędzy białkami i wapniem surowicy istnieje zależność dająca się przedstawić na wykresie jako linia prosta. Wartość m określać będzie nachylenie prostej, to jest ile wapnia wiąże 1 g białka. Stała b określa, o ile ta prosta będzie przesunięta poza zero układu współrzędnych, to jest stężenie wapnia dyfundującego. McLean i Hastings (9) uważają połączenie wapnia z białkami za słaby elektrolit mający pewną stałą dysocjacji K

$$(B) \quad K = \frac{[\text{Ca}^{++}][\text{Prot.}^-]}{[\text{CaProt.}]}$$

Porównanie wzoru (B) z (A) przedstawiać będzie stałą m równoważną wartości $\frac{[\text{Ca}^{++}]}{[\text{Ca}^{++}] + K}$, zaś stałą b równoważną wartości $[\text{Ca}^{++}]$. Wykres zależności stężenia wapnia od stężenia białek surowicy u McLeana i Hastingsa (9) przedstawia się jako linia prosta. Według Ludeviga i współpracowników (11) stosunki zachodzące pomiędzy wapniem i biał-

kami surowicy są bardziej złożone, aniżeli to przedstawia wzór (B). Użycie ultracentryfugi (11) dało możliwość oznaczenia wapnia w jednej surowicy przy różnych stężeniach białka dzięki temu, że badano różne warstwy wirowanej surowicy. W pewnych granicach zależność stężenia wapnia od stężenia białek przedstawia się jako linia prosta. Badano surowicę ludzi chorych i surowicę końską. McLean i Hastings (9) podają dla stałych m i b wartości, które wyliczają jako średnie danych z pięciu różnych prac. Stałe m i b otrzymane przy pomocy ultracentryfugi (11) różnią się od wartości stałych przez nich podanych. Z jednej strony, z wynikami osiągniętymi przy pomocy ultracentryfugi nie zgadza się pogląd, że wapń dyfundujący jest prawie całkowicie zjonizowany. Z drugiej strony, budzi poważne zastrzeżenia ujmowanie połączenia wapnia z różnymi białkami surowicy jedną stałą dysocjacji. W ostatnich latach badania Martina i Perkinsa (12) wykazały bardzo różne powinowactwo wapnia do białek surowicy. Sposób preparowania i oczyszczania białek ma tu istotny wpływ.

W dostępnym mi piśmiennictwie nie znalazłem pracy, która by wykorzystwała naturalną ultrafiltrację do badań nad zależnością białek i wapnia surowicy. Obecna praca ma na celu oznaczenie stałych m i b przy pomocy naturalnej ultrafiltracji.

Metody

Zwiększenie ultrafiltracji krwi z krwiobiegu do tkanek daje możliwość w pewnych granicach zwiększania stężenia tych wielkocząsteczkowych składników krwi, które nie przechodzą przez ściany kapilar. W tej pracy wykorzystano dwa sposoby zagęszczania krwi; jeden przez zmianę postawy człowieka z leżącej na pochyłą (16), drugi przez zastosowanie sztucznego zastój.

Doświadczenia przeprowadzono na subiektywnie zdrowych osobnikach obu płci w wieku od lat 18 do 27. Osobnikom będącym na czczo pobierano dwukrotnie krew bez zastój z żyły łokciowej, pierwszy raz po półgodzinnym leżeniu z możliwie daleko idącym ograniczeniem ruchów; drugi raz po trzydziesto-do czterdziestominutowym pozostawaniu badanego w postawie pochyłej pod kątem 54° do poziomemu, na specjalnie do tego celu przystosowanym łóżku. Przy drugim sposobie zagęszczania krwi osobom będącym na czczo pobierano krew bez zastój po półgodzinnym leżeniu. Następnie opaską aparatu do mierzenia ciśnienia uciskano ramię. Stosowano taką siłę ucisku, aby manometr wykazywał ciśnienie pomiędzy ciśnieniem skurczowym i rozkurczowym. W ten sposób wytworzony zastój krwi utrzymywano przez 3 — 10 minut, w cza-

się którego pobierano krew jeden raz, dwa lub trzy razy. Zarówno zmiana postawy człowieka, jak i krótkotrwały sztuczny zastój krwi nie pociągają za sobą widocznych zmian jakościowych białek surowicy (2, 13).

Surowicę oddzielano po dwugodzinnym pozostawianiu krwi w temperaturze pokojowej przez dwukrotne wirowanie. Do oznaczeń brano tylko surowicę niezhemolizowaną. Wapń oznaczano według metody Kramera i Tisdalla w modyfikacji Clarka i Collipa (15). Białko całkowite wyliczano z refrakcji surowicy oznaczonej refraktometrem zanurzeniowym Pulfricha w temperaturze 20°C. Od współczynnika refrakcji surowicy odejmowano współczynnik refrakcji ultrafiltratu równy 1,33574, a otrzymany wynik dzielono przez $1,81 \times 10^{-6}$, to znaczy przez wartość odpowiadającą przyrostowi refrakcji na 1 g białka w 100 ml (16).

Wyniki

Przez zmianę postawy badanego z leżącej na pochyłą ulegną zagęszczeniu składniki wielkocząsteczkowe, a więc białka osocza oraz te substancje, które są z nimi związane. Wyniki otrzymane przy zmianie postawy przedstawia tablica 1.

Tablica 1

Zmiany stężenia wapnia surowicy krwi człowieka w zależności od postawy

	Stężenie Ca w mg %		Stężenie białek w g/100 ml	
	Postawa leżąca	Postawa pochyła	Postawa leżąca	Postawa pochyła
1	10,7	11,4	7,9	8,8
2	10,1	10,6	7,35	8,05
3	9,9	10,5	7,8	8,5
4	10,9	11,3	7,2	7,8
5	10,7	11,2	7,4	8,0
6	9,7	10,3	7,6	8,3
7	11,0	11,3	7,85	8,15
8	10,2	10,8	7,3	8,4
9	10,4	11,0	6,9	7,9
10	10,4	10,9	7,4	8,3
11	9,5	9,8	7,4	7,9
12	10,3	10,8	6,55	6,8
13	9,8	10,8	7,8	8,5

Dane tablicy 1 wskazują, że zmiany stężenia białka i wapnia surowicy są jednokierunkowe. Jednak osiągnięte przyrosty w stężeniu białka i wapnia są zbyt małe, aby można było użyć je do wyliczenia stałych

m i *b*. W przypadku 9 tablicy 1 przeprowadzono doświadczenie w ten sposób, że pobierano krew trzykrotnie: w pozycji leżącej, pochyłej i znowu leżącej. Uzyskane wyniki wskazują, że zarówno wzrost, jak i spadek stężenia białka pociąga za sobą wzrost i spadek stężenia wapnia. Odpowiadające sobie stężenia wapnia i białka są następujące:

wapń: 10,4; 11,0; 10,8 mg %,

białko: 6,9; 7,9; 7,7 %.

Drugim sposobem zagęszczania krwi było stosowanie zastoju. Użytko dość znaczne zagęszczenie krwi. W niektórych przypadkach stężenie białka wzrastało powyżej 50% wartości wyjściowej. Uzyskane wyniki zostały przedstawione na tablicy 2.

Tablica 2

Stężenie wapnia i białka surowicy krwi otrzymanej bez zastoju i w zastoju oraz stałe równania (A) wiążące te wielkości ze sobą:

$$m = \text{mM Ca związane z 1 g białka} = \frac{[\text{Ca}_1] - [\text{Ca}_0]}{B_1 - B_0}$$

$$b = \text{mM Ca nie związane z białkiem} = [\text{Ca}_0 - m \cdot B_0]$$

	Stęż. Ca w mM/Kg H ₂ O			Stęż. białek w g/100g H ₂ O			<i>m</i>	<i>b</i>		
	w sur. krwi bez zast.	w surowicy krwi zagęszczonej***			w sur. krwi bez zast.	w surowicy krwi zagęszczonej***				
		1	2	3		1			2	3
1	2,84	3,32			8,4	11,6		0,150	1,58	
2	2,84	3,46			7,9	12,5		0,135	1,74	
3	2,93	3,14			8,3	9,9		0,150	1,66	
4	2,78	3,00			7,8	9,2		0,157	1,56	
5	2,75	3,15			7,8	11,0		0,128	1,75	
6	2,77	2,93			7,5	8,7		0,133	1,77	
7	2,98	3,23	3,26		7,8	9,6	10,0	0,133*	1,94*	
8	2,72	2,92	3,04		7,8	9,4	10,2	0,129*	1,71*	
9	2,68	2,82	2,96		8,0	8,8	9,6	0,175**	1,28**	
10	2,77	2,97	3,16	3,54	8,1	9,4	10,6 13,3	0,153*	1,53*	
							średnio	0,143	1,69	

* Podane wartości są średnimi wartościami wyliczonych dla poszczególnych zagęszczeń.

** Wartości nie uwzględnione przy obliczaniu średnich.

*** Surowice krwi zagęszczonej: znaczone 1 pochodzą z krwi pobranej w przybliżeniu po trzech minutach od początku zastoju; znaczone 2 w przybliżeniu po pięciu minutach, zaś surowica znaczone 3 z około ośmiu minut od początku zastoju.

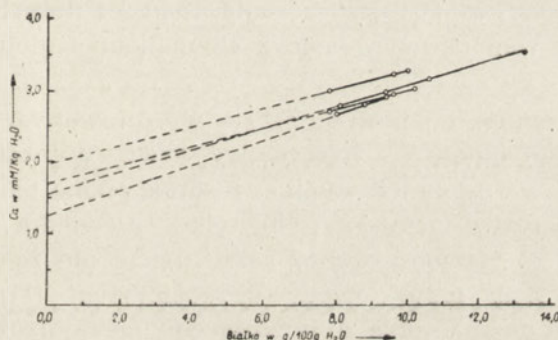
Stężenie białek surowicy wyrażano w g na 100 g H₂O. Wyliczenia oparto na równaniu: woda (ilość g w 100 ml surowicy) = 99,0 - 0,75 × P. P = ilość g białka w 100 ml surowicy. Stężenie wapnia wyrażono w mM na Kg H₂O. Wyliczenie przeprowadzono w oparciu o to samo równanie co dla białek. Wartość *m* przedstawia stosunek przyrostu stężenia wapnia do przyrostu stężenia białek surowicy. Przedstawić to można wzorem:

$$(C) \quad m = \frac{[Ca_1] - [Ca_0]}{B_1 - B_0},$$

B_0 i $[Ca_0]$ — stężenie białka i wapnia surowicy krwi bez zastoju, B_1 i $[Ca_1]$ — stężenie białka i wapnia surowicy krwi zagęszczonej. Wartość m podaje ile mM wapnia jest związanych z 1 g białka. Wartość b przedstawia stężenie wapnia nie związanego z białkami. Wyliczono ją z równania (A). Średnia wartość dla m wynosi 0,143, dla b 1,69 mM/Kg H_2O . Jeżeli we wzorze (A) podstawimy wartości dla m i b , przedstawiać się on będzie następująco:

$$\text{Tot. [Ca]} = 0,143 \times \text{Prot.} + 1,69.$$

Jeżeli dane tablicy 2 przedstawi się w ten sposób, że stężenie wapnia wyrazimy w mg/100 ml, a białko w g/100 ml, to średnia wartość dla m



Rys. 1. Wykres zależności stężenia wapnia od stężenia białek surowicy przypadków: 7, 8, 9, 10 tablicy 2.

wyniesie 0,51, zaś dla b 6,7 mg %. Wzór dla wapnia całkowitego surowicy przedstawiać się będzie następująco:

$$\text{Tot. Ca} = 0,51 \times \text{Prot.} + 6,7.$$

W przypadku 9 tablicy 2 (kobieta) wartości m i b wyraźnie odbiegają od pozostałych. Wartość m wynosi 0,175. Jest to być może przypadek wyjątkowo wysokiego powinowactwa wapnia do surowicy. Dlatego nie przyjęto tej wartości przy obliczaniu średnich wartości m i b .

Doświadczenia, dla których oznaczono co najmniej trzy punkty przedstawiono wykresem. Wykreślone proste ekstrapolowane do stężenia białka równego zero wyznaczają na osi rzędnych wartość b (stężenie wapnia dyfundującego).

Dyskusja

Wykorzystanie układu naczyniowego żywego człowieka jako ultraszczka do badań nad zależnością stężenia białek i wapnia surowicy dało możliwość sprawdzenia *in vivo* doświadczeń wykonywanych poprzednio *in vitro*. Wartości otrzymane dla wapnia dyfundującego przy pomocy naturalnej ultrafiltracji są w przybliżeniu zgodne z danymi tych autorów (7, 8, 10, 11), którzy tę wartość oznaczali *in vitro* (ultrafiltracja przez różne sztuczne błony napółprzepuszczalne, ultracentryfuga). Wapń dyfundujący stanowi w przybliżeniu 60% wapnia całkowitego. Reszta wapnia związana jest z białkami surowicy. Jąką część wapnia niedyfundującego wiążą albuminy, a jąką globuliny nie daje się dokładnie określić. Drinker i współpracownicy (4) wykazali, że różne frakcje globulinowe mają różne stałe dysocjacji, a Martin i Perkins (12) stwierdzili bardzo różne powinowactwo wapnia do białek surowicy w zależności od sposobu ich preparowania i oczyszczania. Stąd też dotychczasowe dane dotyczące ilości wapnia związanego z albuminami i globulinami budzą zastrzeżenia.

McLean i Hastings (9) posługując się wyizolowanym sercem żabim oznaczyli stężenie jonów Ca w surowicy krwi. Wynosi ono średnio 1,25 mM/Kg H₂O. Z pracy ich wynika, że praktycznie biorąc cały wapń dyfundujący jest zjonizowany, a tylko niewielka ilość około 0,15 mM/H₂O jest niezjonizowana. Takie ujęcie nie zgadza się z wynikami osiągniętymi przy pomocy ultracentryfugi (11) i naturalnej ultrafiltracji. Wartość wapnia dyfundującego niezjonizowanego, przyjmując z pracy McLeana i Hastingsa (9) poziom jonów Ca równy 1,25 mM/Kg H₂O, wynosi według Ludeviga i współpracowników (11) około 0,5 mM/Kg H₂O, a z danych tej pracy około 0,45 mM/Kg H₂O. Stałą *m* równą 0,188 McLean i Hastings (9) otrzymali obliczając ją jako średnią z pięciu prac różnych autorów, u których te wartości wahają się w dość szerokich granicach od 0,140 do 0,250. Średnia z pięciu liczb o tak dużym rozrzucie budzi zastrzeżenia, tym bardziej, że nie wszystkie te wartości były otrzymane z badań nad surowicą ludzi. Badania zależności białek i wapnia surowicy przy pomocy ultracentryfugi (11) dostarczyły danych, które są w dość dużej zgodności z wynikami osiągniętymi przy pomocy naturalnej ultrafiltracji. Dla stałej *m* Ludevig i współpracownicy (11) uzyskują wartość 0,150 jako średnią sześciu przypadków ludzi chorych na różne choroby. Wartość *m* tej pracy wynosi 0,144. Różnica pomiędzy stałymi *m* obydwu prac mogła częściowo wyniknąć z różnego sposobu oznaczania białek surowicy. Podczas gdy oni (11) poziom białek wyliczali z ilości azotu przyjmując mnożnik 6,3, w tej pracy wartość pozio-

mu białek wyliczona z refrakcji jest równoważna takiej ilości białka, dla której mnożnik azotowy wynosi 6,73 (1), (16). Jeżeli w ich pracy przeliczyć wartości białek z użyciem mnożnika 6,73 otrzymuje się dla m średnio wartość 0,147, którą można uznać za bardzo bliską wartości m tej pracy. Bliskie są także wartości wapnia dyfundującego. Wynoszą one: przy użyciu ultracentryfugi 1,75 mM/Kg H₂O, przy pomocy naturalnej ultrafiltracji 1,69 mM/Kg H₂O. Z pewnym uproszczeniem można przyjąć równanie dla wapnia całkowitego w następującej postaci:

$$\text{Tot. [Ca]} = 0,145 \times \text{Prot.} + 1,7.$$

W piśmiennictwie spotyka się często z dążeniem do ujmowania składników krwi w pewną całość, w której istnieje szereg czynników wzajemnie na siebie działających i warunkujących się. Podjętych zostało szereg prób ścisłego określenia tych wzajemnych zależności przy pomocy pewnych stałych. Celowość takiego ujęcia wydaje się oczywista. Trudno wyobrazić sobie, aby zmiana jednego ze składników krwi nie pociągnęła za sobą mniejszej lub większej zmiany innych. Mając dane liczbowe określające u zdrowych ludzi zależność jednego składnika od innych, łatwiej można zdać sobie sprawę, czy zmienność tego składnika wykracza poza nawiasy normy, czy też nie. Często do właściwej interpretacji danych laboratoryjnych nie wystarcza oderwany wynik jednego tylko składnika krwi, dopiero porównanie go z innymi doprowadza do właściwych wniosków. Poziom wapnia surowicy równy np. 9,5 mg % inaczej należałoby interpretować przy hypoproteinemii, inaczej przy normalnej zawartości białek czy też hyperproteinemii. Poziom białek ma istotny wpływ na zawartość poszczególnych postaci wapnia, tym samym na fizjologicznie aktywną postać wapnia, którą utożsamiamy z wapniem dyfundującym. Wprowadzenie sposobu naturalnej ultrafiltracji do oznaczania wapnia dyfundującego, czyli stałej b , w niektórych przypadkach klinicznych (tężyczki, stany przedtężyczkowe) wydaje się celowym.

Streszczenie

Przez zastosowanie ucisku ramienia zdrowych ludzi uzyskano wydatne zagęszczenie krwi. Oznaczano stężenie białka i wapnia surowicy krwi pobranej przed i po jej zagęszczeniu. Tym sposobem zbadano *in vivo* zależność wzrostu stężenia wapnia od białek i wyrażono tę zależność wzorem: $\text{Tot. Ca} = m \times \text{Prot.} + b$, gdzie Tot. Ca — wapń całkowity; Prot. — białko całkowite; m — stała określająca ile wapnia wiąże 1 g białka; b — stała określająca zawartość wapnia dyfundującego. Wyrażając stężenie Ca w mM/Kg H₂O, zaś białko w g/100 g H₂O: $m = 0,143$,

$b = 1,69$ mM/Kg H_2O . Jeżeli natomiast wyrazimy stężenie Ca w mg/100 ml, zaś białko w g/100 ml: $m = 0,51$, $b = 6,7$ mg %. Równanie to z podobnymi wartościami stałych podał Ludevig i współpracownicy (11) w oparciu o badania *in vitro* (ultracentryfuga).

LITERATURA

1. Armstrong S. H. jr., Budka M. J. E., Morrison K. C., Hasson M.: *J. Am. Chem. Soc.* **69**, 1747, 1947.
2. Byczkowski S.: *Pol. Tyg. Lek.* **7**, 923, 1952.
3. Darrow D. C., Cary M. K.: *J. Biol. Chem.* **105**, 327, 1934.
4. Drinker N., Green A. A., Hastings A. B.: *J. Biol. Chem.* **131**, 641, 1939.
5. Greenwald I.: *J. Biol. Chem.* **93**, 551, 1931 cyt. wg: *Rona's Ber.* **65**, 732, 1932.
6. Gutman A. B., Gutman E. B.: *J. Clin. Inv.* **16**, 903, 1937, cyt. wg: *Rona's Ber.*, **105**, 232, 1938.
7. Harnapp G. D.: *M Schr. Kinderklinik*, **87**, 69, 1941, cyt. wg: *Rona's Ber.* **126**, 8, 1941.
8. Hirth, Tschimber C.: *C. R. Soc. Biol.*, **91**, 592, 1924.
9. McLean F. C., Hastings A. B.: *J. Biol. Chem.* **108**, 285, 1935.
10. Levy M. J., Pacu M. M.: *Bull. Soc. Chim. Biol.* **15**, 1317, 1933.
11. Ludevig S., Chanutin A., Masket A. V.: *J. Biol. Chem.* **143**, 753, 1942.
12. Martin N. H., Perkins D. J.: *Biochem. J.* **47**, 323, 1950.
13. Mozołowski W.: *Acta Bioch. Pol.* **1**, 59, 1954.
14. Peters J. P., Eiserson L.: *J. Biol. Chem.* **84**, 155, 1929, cyt. wg: *Rona's Ber.* **54**, 78, 1930.
15. Rona P.: *Praktikum d. Physiol. Chem. II*, Berlin, Springer J., 1929, str. 271.
16. Żydowo M.: *Pol. Tyg. Lek.* **7**, 697, 1952.

ЗАВИСИМОСТЬ СОДЕРЖАНИЯ КАЛЬЦИЯ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКА

Резюме

Сдавлявая плечо здорового человека достигнуто значительное сгущение крови. Определялась концентрация белка и кальция сыворотки крови взятой до и после её сгущения. По этому методу исследовалась *in vivo* зависимость роста концентрации кальция от белков и эта зависимость выражалась формулой:

$Tot. Ca = m \times Prot. + b$, где Tot. Ca — кальций, Prot. — белок, m — постоянная, характеризующая сколько кальция соединяется с 1 г белка, b — постоянная характеризующая содержание дифундирующего кальция. Выражая концентрацию Ca в mM/kg H_2O , белко b г/100 г H_2O : $m = 0,143$, $b = 1,69$ mM/kg H_2O .

Если концентрацию Ca выразим в мг/100 мл, а белка в г/100 мл: $m=0,51$, $b = 6,7$ мг %.

Это уравнение с подобными значениями постоянных привел Ludevig с сотрудниками (II) основываясь на исследованиях *in vitro* (ультрацентрифуга).

DEPENDANCE OF CALCIUM CONCENTRATION OF BLOOD SERUM ON PROTEIN CONTENT

Summary

Calcium and protein concentrations of blood serum were determined in samples taken before and after concentrating them. In this way the „in vivo“ dependance of the growth of calcium concentration on protein was determined and is given by the following formula:

$$\text{Tot. Ca} = m \times \text{Prot. } b$$

where Tot. Ca refers to total calcium; Prot. refers to total protein; m is a constant defining the quantity of calcium bound by 1 gm. protein; b is a constant defining the content of calcium. Expressing calcium concentration in mM/kg H₂O, protein in gm/100 gm H₂O, $m = 0,143$, $b = 1,69$ mM/kg H₂O. If, however, calcium concentration is expressed in mg/100 ml. and protein in gm/100 ml., then $m = 0,51$, $b = 6,7$ mg %. A similar equation with practically identical constants has been given by Ludevig et al. (11), based on „in vitro“ studies using an ultracentrifugal technique.

Otrzymano 12.I.1955.

ZOFIA LASSOTA

ZWIĄZKI FOSFOROWE SAMORZUTNIE LABILNE W KIEŁKACH FASOLI

(Doniesienie tymczasowe)

Z Zakładu Biochemii Polskiej Akademii Nauk, Warszawa
Kierownik prof. Józef Heller

Fasolę (*Phaseolus vulgaris*, odmiana biała) hodowano na wilgotnym podkładzie, w temperaturze pokojowej przy normalnym dostępie światła, po uprzednim 24-godzinnym moczeniu nasion w wodzie wodociągowej.

Rośliny preparowano w całości (zarówno część nadziemną, jak i korzeń), ważono, zamrażano 30 min w temp. -20°C , po czym ziębiąc rozcie-rano z kwasem nadchlorowym. Końcowe stężenie kwasu wynosiło 7%. Ekstrakt wirowano, zobojętniano ługiem potasowym wobec fenoltaleiny i uzupełniano do znanej objętości.

W ten sposób ekstrahowano z roślin ok. 40% zawartego w nich fosforu. Między 4 a 7 dniem kiełkowania roślina zawiera w przeliczeniu na „świeżą” wagę ok. 100 mg% fosforu całkowitego, przy czym część nadziemna jest 1,5 — 2-krotnie bogatsza w fosfor niż korzeń. W uzyskanym ekstrakcie oznaczono fosfor całkowity i fosfor nieorganiczny metodą Fiskego i Subbarowa w modyfikacji Lohmanna i Jendrassika. Oznaczono również fosfor prawdziwy nieorganiczny wg Umbreita. Z porównania wyników otrzymanych obydwoma metodami okazało się, że 60 — 80% fosforu nieorganicznego oznaczonego w środowisku silnie kwaśnym (Fiske-Subbarow) stanowi fosfor organiczny hydrolizujący samorzutnie w warunkach oznaczania.

Stwierdzono, że fosfor samorzutnie labilny występuje w roślinie w różnych okresach kiełkowania (tabl. I).

Tablica 1
Zawartość fosforu w ekstrakcie HClO_4 w przeliczeniu na 1 g świeżych roślin

Czas kiełkowania (dni)	P całkowity (I)	P nieorganiczny (II)		P labilny (III)	
	μg	μg	P % całk.	μg	%P nieorg.
4	420	224	53	152	68
7	380	180	48	114	63
10	335	232	69	190	81

- (I) Oznaczony po spaleniu.
 (II) oznaczony met. Fiskego i Subbarowa.
 (III) Wyliczony z różnicy oznaczenia met. Fiskego i Subbarowa i wg Umbreita.

Zarodki wypreparowane z nasion bezpośrednio po 12 godzinach moczenia w wodzie wodociągowej zawierają na 1 g świeżych roślin 20 μg fosforu labilnego, co stanowi 15% pozornego fosforu nieorganicznego ekstraktu.

Rozłożenie fosforu samorzutnie labilnego w poszczególnych częściach rośliny nie jest jednakowe. (Tabl. 2).

Tablica 2

Zawartość fosforu samorzutnie labilnego w ekstrakcie HClO_4 w przeliczeniu na 1 g świeżych roślin w siódmym dniu kiełkowania

Część rośliny	Fosfor labilny	
	μg	% fosforu nieorg.
Część nadziemna	128	61
Korzeń	52	21
Liście	40	66

Streszczenie

Kiełki fasoli (*Phaseolus vulgaris*) w 4, 7 i 10 dniu wzrostu ekstrahowano kwasem nadchlorowym na zimno. W ekstraktach znaleziono na 1 g świeżych roślin 100 — 200 fosforu labilnego, hydrolizującego w warunkach oznaczania metodą Fiskego i Subbarowa. Zarodki nasion moczonych przez 12 godzin w wodzie zawierają ok. 20 μg fosforu labilnego na 1 g świeżych zarodków. Część nadziemna kiełka jest bogatsza w fosfor labilny niż korzeń. Liście kiełkujących nasion również zawierają fosfor labilny. W ekstraktach o pH 9 przechowywanych w temp. $+2^\circ\text{C}$ 60 — 70% fosforu labilnego ulega hydrolizie po 72 godzinach.

LITERATURA

- Lohmann K., Jendrassik L.: *Biochem. Z.* **178**, 419, 1926.
- Umbreit W. W., Burris R. W., Stauffer J. F.: *Manometric Techniques and Related Methods for the Study of Tissue Metabolism*, Burgess Publishing Co, Minneapolis, 1945.

САМОПРОИЗВЕСЬНО ГИДРОЛИЗУЮЩИЙ ФОСФАТ В ПРОРОСТКАХ ФАСОЛИ

Резюме

Четыре-, семи-, и десяти-дневные проростки фасоли (*Phaseolus vulgaris*) экстрагировали холодной хлорной кислотой. В вытяжках найдено (на 1 г свежих растений) 100 — 200 г лабильного фосфата гидролизующего в усло-

виях определения по методу Фиске-Сиббароу. Зародыши семян моченных 12 часов в воде содержат 20 г лабильного фосфата на 1 г веса свежего растения. Содержание лабильного фосфата в надземной части проростка выше чем в корню. В семядоли прорастающих семян тоже обнаружено лабильный фосфат. При хранении вытяжек оказывающих рН 9 в температуре + 2°C через 72 час. 60 — 70% лабильного фосфата исчезает вследствие самопроизвольного гидролиза.

SPONTANEOUS-LABILE PHOSPHORUS OF THE WHITE BEAN SEEDLINGS

Summary

Seedlings of white bean (*Phaseolus vulgaris*) 4, 7 and 10 days old have been extracted with cold perchloric acid. In the extracts 100 — 200 µg of labile phosphorus, hydrolysable in the Fiske-Subbarow method, has been found per 1 g of fresh material. The embryos of the seeds soaked per 12 hours in tap water contained 20 µg of labile phosphorus per 1 g fresh material. In the underground part of the seeding the greater amount of labile phosphorus has been found as contained the labile phosphorus as well. In the extracts showing pH 9 stored at +2°C 60 — 70% of the labile phosphorus hydrolyses in the course of 72 hrs.

Otrzymano 20.IV.55.

