

IGNACY REIFER

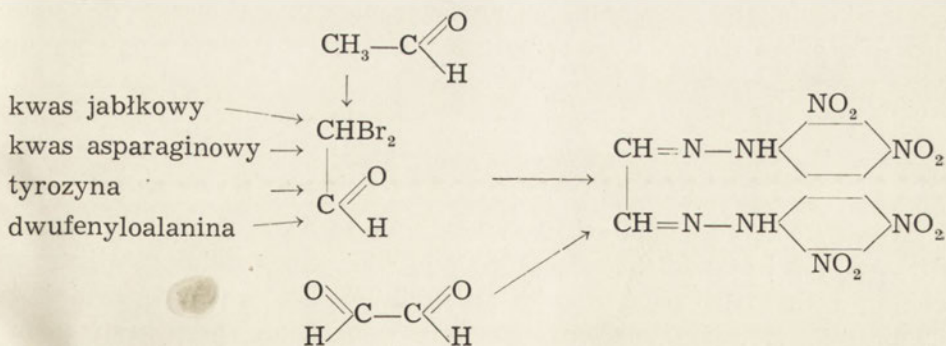
MIKROMETODA OZNACZANIA KWASU JABŁKOWEGO

Z zakładu Biochemii SGGW, Warszawa

Kierownik prof. dr I. Reifer

Kwas jabłkowy jest szeroko rozpowszechniony w świecie roślinnym i obok kwasu cytrynowego jest ilościowo dominującym oksykwasm wielu roślin, a w szczególności owoców. W małych katalitycznych ilościach w cyklu kwasów trójkarboksylowych występuje znacznie szerzej, zarówno w organizmach roślin, jak i zwierząt, i drobnoustrojów.

Specyficzne metody oznaczania kwasu jabłkowego istnieją dopiero od stosunkowo krótkiego okresu czasu, przy czym metoda Puchera, Vickersy i Wakemana (1,2) jest niewątpliwie najbardziej selektywna. Metoda ta polega na utlenieniu kwasu jabłkowego w kwaśnym środowisku przy pomocy bromu wydzielonego z bromku i nadmanganianu do lotnego związku, który z 2,4-dwunitrofenylohydrazyną tworzy nierozpuszczalny osazon. Suomalainen i Arhimo (3) wykazali, że produktem utleniania kwasu jabłkowego jest dwubromoacetaldehyd, który z 2,4-dwunitrofenylohydrazyną tworzy glioksal-2,4-dwunitrofenyloosazon. Ten sam osazon powstaje również z kwasu asparaginowego, tyrozyny i dwufenyloalaniny. Suomalainen i Arhimo udowodnili następujący schemat mechanizmu reakcji utlenienia kwasu jabłkowego i syntezy osazonu



Ten glioksalowy osazon tworzy w zasadowym środowisku w obecności pirydyny piękny, rozpuszczalny, niebieski barwnik, którego intensywność zabarwienia jest w szerokich granicach proporcjonalna do ilości kwasu jabłkowego w próbce.

Specyficzność metody Puchera i wsp. zaznacza się ponadto w ekstrakcji kwasu jabłkowego z materiału roślinnego przy pomocy eteru etylowego, w którym wyżej wspomniane aminokwasy są zupełnie nierozpuszczalne. Mimo to metoda ta jest rzadko stosowana w badaniach laboratoryjnych i jak wykazał W o l f (4) nastęrcza ona przy wykonaniu analiz ilościowych poważne trudności związane z procesem utleniania kwasu jabłkowego do dwubromoacetaldehydu, i otrzymanie powtarzalnych wyników zależy od ścisłego i dokładnego przestrzegania wszystkich szczegółów metody. S u o m a l a i n e n i A r c h i m o (3) wykazali, że proces utleniania kwasu jabłkowego metodą Puchera i wsp. nie przebiega ilościowo i wynosi zaledwie 50 — 60%. Poza tym metoda ta nie jest mikro-metodą w ścisłym tego słowa znaczeniu, ponieważ polega na strąceniu osazonu i odseparowaniu osadu od nadmiaru dwunitrofenylohydrazyny. Wyjściowa zawartość kwasu jabłkowego musi przeto wynosić około 2 mg, jeżeli normalne granice dokładności mają być zachowane. Oddzielenie osazonu od nadmiaru odczynnika jest konieczne w metodzie Puchera i wsp., ponieważ dwunitrofenylohydrazyna z pirydyną i wodorkiem sodowym tworzy intensywny czerwony barwnik, który przeszkadza w oznaczeniu kwasu jabłkowego. Inne czynności, jak destylacja dwubromoacetaldehydu, sączenie, mycie, suszenie i rozpuszczanie osazonu w pirydynie komplikują metodę i w dużym stopniu obniżają jej przydatność do celów masowego oznaczania kwasu jabłkowego.

Niniejsza praca miała na celu przebadanie warunków oznaczenia kwasu jabłkowego w ilościach wyjściowych około tysiąc razy mniejszych od ilości wyjściowych wymaganych w metodzie Puchera i wsp., co związane było z rozwiązaniem następujących zadań: 1. ominięcie destylacji dwubromoacetaldehydu, 2. wyeliminowanie oddzielenia osazonu od nadmiaru odczynnika, 3. powiększenie czułości metody i 4. opracowanie optymalnych warunków utlenienia kwasu jabłkowego w celu zabezpieczenia powtarzalności wyników.

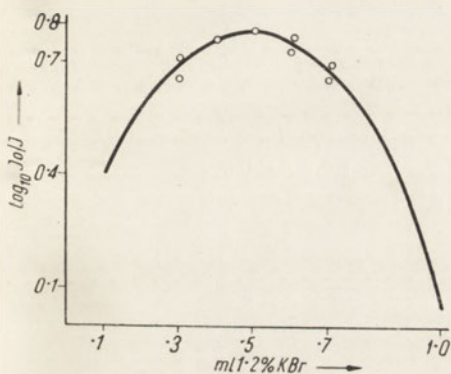
Część doświadczalna

We wstępnych badaniach zauważono, że zarówno dwunitrofenylohydrazyna, jak i osazon rozpuszczają się łatwiej w benzenie aniżeli w rozcieńczonych roztworach kwasów mineralnych. Stwierdzono również, że dwunitrofenylohydrazyna, rozpuszczona w benzenie, przy wytrząsaniu

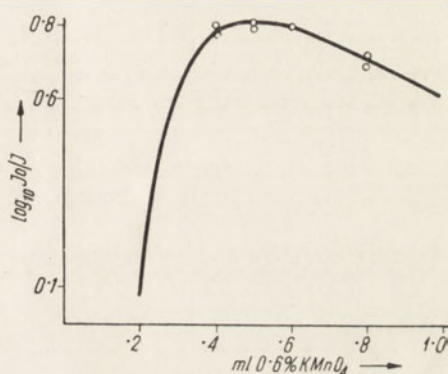
kwadem siarkowym 1:1 przechodzi ilościowo do fazy wodnej, natomiast rozpuszczony osazon pozostaje całkowicie w benzenie. Ta obserwacja umożliwiła opracowanie metody, w której oddzielenie osazonu od nadmiaru odczynnika zostało wyeliminowane.

Do ustalenia optymalnych warunków syntezy dwubromoacetaldehydu posługiwano się D,L-kwasem jabłkowym firmy Merck, dwukrotnie przekryształizowanym z wody destylowanej.

5 ml roztworu zawierającego 16 μg kwasu jabłkowego odpipetowano do próbki i dodawano kolejno rozcieńczony kwas siarkowy 1:1, 1,2% roztwór bromku potasowego i 0,6% roztwór nadmanganianu potasowego, zmieniając każdorazowo tylko ilości jednego odczynnika. Oznaczenie wykonano dokładnie wg metody opisanej poniżej.



Rys. 1. Zależność wartości ekstynkcji od ilości 1,2% KBr (0,5 ml 0,6% KMnO_4 i 1 ml H_2SO_4 1:1 w 7 ml płynie) 16 μg kwasu jabłkowego

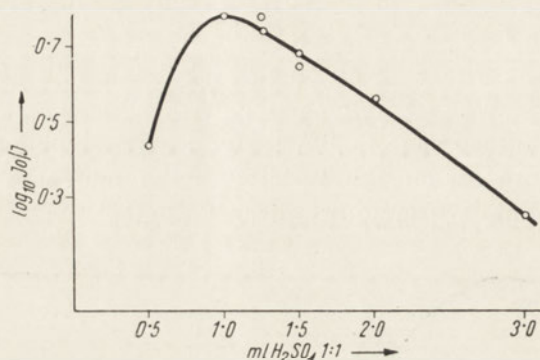


Rys. 2. Zależność wartości ekstynkcji od ilości 0,6% KMnO_4 (0,5 ml 1,2% KBr i 1 ml H_2SO_4 1:1 w 7 ml płynie) 16 μg kwasu jabłkowego

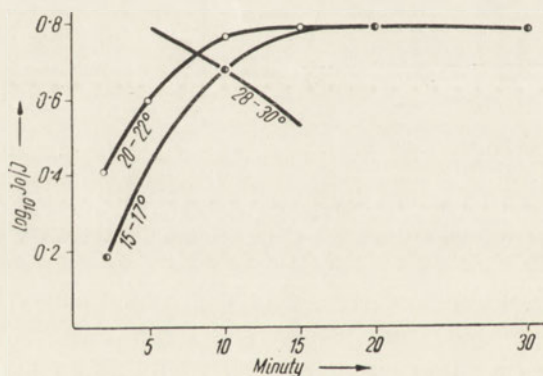
Jak wynika z wykresów (rys. 1 i 2), optymalne warunki utlenienia kwasu jabłkowego zależą od ilościowego stosunku bromku do nadmanganianu, przy czym maksimum syntezy dwubromoacetaldehydu otrzymuje się we względnie wąskich granicach. Najwyższe intensywności zabarwienia zaobserwowano przy użyciu 0,5 ml 1,2% bromku potasu i 0,5 ml 0,6% nadmanganianu potasu w obecności 1 ml kwasu siarkowego 1:1, z tolerancją nie przekraczającą $\pm 20\%$. Również ilości kwasu siarkowego są krytyczne (rys. 3), ponieważ ze wzrastającym jego stężeniem rośnie proporcjonalnie utlenianie bromku do wolnego bromu kosztem nadmanganianu. Optymalne zakwaszenie wynosi 1 ml kwasu siarkowego 1:1 w granicach $\pm 10\%$.

Obecność nadmiaru nadmanganianu w mieszaninie jest niezbędna i w próbach, w których nadmiar ten został usunięty przez dodatkowe

ilości bromku, względnie kwasu siarkowego, synteza dwubromoacetaldehydu w ogóle nie nastąpiła. Z tego powodu wniosek W o l f a (4), że utlenianie kwasu jabłkowego wynika na skutek działania bromu *in statu nascendi* wydaje się niesłuszny, tym bardziej, że ilość wytworzonego dwubromoacetaldehydu w temperaturach poniżej 20° jest zależna od



Rys. 3. Zależność wartości ekstynkcji od ilości H_2SO_4 1 : 1 (0,5 ml 1,2% KBr i 0,5 ml 0,6% KMnO_4 w 7 ml płynu) 16 μg kwasu jabłkowego



Rys. 4. Zależność wartości ekstynkcji od temperatury i czasu utleniania

czasu utleniania. Mniej krytyczne są temperatura i czas utleniania (rys. 4) i w temperaturze $20^\circ \pm 2^\circ$ w czasie od 10 do 20 minut następuje maksymalne utlenienie kwasu jabłkowego. W temperaturach wyższych obserwuje się szybki rozkład dwubromoacetaldehydu i tak np. w temp. 30° maksimum utlenienia osiąga się już po upływie 5 minut, po czym po upływie dalszych 5 względnie 10 minut wyniki opadają o 12% względnie 24%.

Aldehydy i ketony, jak również produkty utleniania niektórych oksykwasów często spotykanych w materiale roślinnym tworzą odpowiednie osazony, które przeszkadzają w oznaczeniu kwasu jabłkowego. Do tych należy w pierwszym rzędzie zaliczyć: kwas pirogronowy, winowy, cytrynowy, askorbinowy, jak również cukry proste. Wprawdzie w warunkach oznaczania kwasu jabłkowego opisaną metodą osazony wymienionych związków tworzą barwne kompleksy o małej intensywności, bo wynoszące zaledwie 1 do 2% intensywności osazonu glioksalu, tym niemniej w materiale biologicznym, zawierającym duże ilości wymienionych oksykwasów w obecności małych ilości kwasu jabłkowego, wyniki analiz byłyby zupełnie bezużyteczne. Wpływ tych oksykwasów da się jednak z łatwością wyeliminować, ponieważ utleniają się one już w obecności samego nadmanganianu, natomiast do utlenienia kwasu jabłkowego niezbędna jest obecność wolnego bromu. Zamiast ślepej próby odczynnikowej sporządza się przeto ślepą próbę materiałową, zawierającą kwas jabłkowy i utlenia się samym nadmanganianem. Ponieważ wolny brom wydziela się z bromków w obecności nadmanganianu dopiero po dodaniu kwasu siarkowego, przeto ślepą próbę materiałową utlenia się identycznie jak próbę pełną, z tą różnicą, że kwas dodaje się dopiero po redukcji nadmanganianu siarczynem sodowym. Różnica między barwą próby pełnej i ślepej materiałowej odpowiada ilości kwasu jabłkowego w badanym materiale. Poza tym ekstrakcja kwasu jabłkowego eterem etylowym eliminuje szereg innych związków, jak kwas asparaginowy, tyrozyna, dwufenyloalanina, kwas askorbinowy i cukry, które w eterze są nierozpuszczalne. W analizach zestawionych w tablicy 2 wykazano, że ślepa próba materiałowa niewiele różni się od ślepej odczynnikowej mimo obecności dużych ilości oksykwasów i nie przekracza w zabarwieniu 0,5 μg do 2,0 μg w przeliczeniu na kwas jabłkowy.

Odczynniki:

1. D,L-kwas jabłkowy (firmy Merck). Rozpuścić 40 mg kwasu jabłkowego w wodzie destylowanej, przenieść ilościowo do kolby miarowej o poj. 100 ml i dopełnić do znaku. Dowolne rozcieńczenia można sporządzić ze standardowego roztworu.

2. Rozcieńczony kwas siarkowy 1:1. Do 100 ml wody destylowanej dolać ostrożnie 100 ml stężonego kwasu siarkowego, o c. wł. 1,84.

3. 1,2% roztwór bromku potasowego.

4. 0,6% roztwór nadmanganianu potasowego.

5. 5% roztwór siarczyny sodowego. Sporządzić świeży roztwór bezpośrednio przed użyciem.

6. 0,05% roztwór 2,4-dwunitrofenylohydrazyny. Do 25 mg odczynnika dodać 10 ml kwasu solnego 1:1, rozpuścić na gorąco i uzupełnić wodą do 50 ml. Przechowywać w ciemnej butelce. Świeży roztwór należy sporządzać raz na tydzień.

7. Benzen.

8. Bezwodny węglan sodowy *in substantia*.

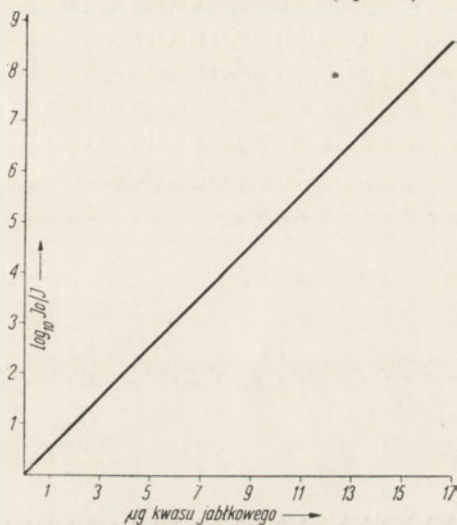
9. 1% roztwór wodorotlenku sodowego w 95% alkoholu.

Metoda: 5 ml wodnego roztworu zawierającego od 0,5 μg do 16 μg kwasu jabłkowego odpipetować do probówki 160 \times 16 mm, dodać 1 ml kwasu siarkowego (2), 0,5 ml bromku (3) i wstrząsając energicznie dodawać kroplami 0,5 ml nadmanganianu (4), po czym probówki wstawić do zlewki z wodą o temp. 20° \pm 2° na 15 minut. Następnie chłodzić probówki w mieszaninie wody z lodem przez około 5 minut i zredukować nadmiar bromu i nadmanganianu roztworem siarczynu sodu (5), który, aby uniknąć jego nadmiaru, należy ostrożnie dodawać kroplami. Po dodaniu 1 ml dwunitrofenylohydrazyny (6) wstawić do łaźni z wrzącą wodą na 15 minut, wstrząsając od czasu do czasu. Woda w łaźni powinna sięgać ponad poziom płynu w probówce. Po ostudzeniu przenieść ilościowo zawartość probówki do cylindrycznego rozdzielacza o poj. 30 ml, z dokładnie doszlifowanym korkiem szklanym, przemyć probówki 3 razy około 5 ml wody i dodać do rozdzielacza dokładnie 3 ml benzenu (7). Nałożyć korek i wstrząsać energicznie zawartość rozdzielacza, odczekać jedną minutę i powtórzyć wyklócanie jeszcze dwukrotnie. Osazon i nadmiar dwunitrofenylohydrazyny rozpuszczają się w benzenie. Odseparować fazę wodną, a benzen wytrząsać dwukrotnie 2 ml rozcieńczonego kwasu siarkowego (2), do którego przechodzi nadmiar dwunitrofenylohydrazyny. Benzen zawierający osazon przemyć 3 razy około 5 ml wody (bez wstrząsania) i odpuścić wodę, możliwie do ostatniej kropli. Przez suchy lejek dodać około 0,5 g bezwodnego węgla sodowego (8), wymieszać kilkakrotnie przez wstrząsanie, dodać dokładnie 3 ml alkoholowego wodorotlenku (9) i po nałożeniu płukanego i obsuszonego korka szklanego na rozdzielacz wymieszać benzen z alkoholem wstrząsając energicznie. Barwny roztwór benzenu z alkoholem przesączyć do kolorymetrycznej probówki o średnicy 10 mm przez sącdek z waty i odczytać przepuszczalność światła w kolorymetrze Leitza, stosując zielony filtr D, po nastawieniu ślepej próby materiałowej na 100% przepuszczalności. Ślepą próbę materiałową należy przygotować w sposób identyczny jak próbę pełną, z tą różnicą, że kwas siarkowy 1:1 (2) dodaje się dopiero po zredukowaniu nadmanganianu siarczynem sodowym (w obojętnym roztworze nadmanganian zostaje zredukowany do dwutlenku manganowego, przeto po zaniku barwy nadmanganianu i do-

daniu kwasu należy dodatkowo zredukować koloidowy dwutlenek manganu 1 — 2 kroplami siarczynu).

Wytworzony barwnik jest trwały przez czas nieograniczony. Jeżeli odczyty mają być wykonane dopiero po upływie pewnego czasu, należy próbówki kolorymetryczne szczelnie zakorkować ze względu na zmętnienie, które powstaje z czasem na skutek powstawania węglanu sodowego, nierozpuszczalnego w mieszaninie benzenu z alkoholem.

W granicach od 0,5 μg do 16 μg kwasu jabłkowego otrzymuje się w wyżej opisanych warunkach w aparacie Leitz, filtr D, wykres zgodnie z prawem B e e r a - L a m b e r t a (rys. 5).



Rys. 5

Krzywą wzorcową sporządzono na podstawie średnich z oznaczeń różnych stężeń kwasu jabłkowego w granicach od 0,5 μg do 16 μg . W tabelicy 1 podane są wyniki analiz czystego kwasu jabłkowego wykonanych nową metodą.

Jak wynika z tabelicy 1, maksimum odchylenia od obliczeń z krzywej wzorcowej dla kwasu jabłkowego w granicach od 0,5 μg do 2 μg wynosi od 4 do 8%, a w ilościach od 2 μg do 16 μg nie przekracza $\pm 4\%$.

Zbadano wpływ następujących kwasów na oznaczenie kwasu jabłkowego i wykazano, że 200 μg kwasu szczawiowego lub 200 μg kwasu glutaminowego, lub 100 μg kwasu mlekowego, względnie mieszanina złożona z 200 μg kwasu fumarowego, 200 μg kwasu bursztynowego, 200 μg kwasu malonowego i 200 μg kwasu maleinowego, wreszcie mieszanina 100 μg kwasu α -ketoglutarynowego i 100 μg kwasu szczawiooctowego nie zmieniają wyników, tzn., że ślepa odczynnikowa i ślepa materiałowa w obecności wymienionych kwasów są identyczne.

Tablica 1

Oznaczenie kwasu jabłkowego nową metodą

μg	E z wykresu	Ekstynkcja (E)					Maks. odchylenia od odczytu z wykresu w %	
0,5	0,026	0,024	0,027	0,024	0,028	0,025	+7,8	-7,7
1,0	0,052	0,053	0,054	0,049	0,056	0,053	+5,7	-7,5
2,0	0,103	0,099	0,104	0,107	0,102	0,104	+3,9	-1,0
4,0	0,206	0,206	0,208	0,212	0,208	0,212	+3,4	-0,0
6,0	0,308	0,305	0,313	0,311	0,317	0,307	+2,9	-1,0
8,0	0,411	0,413	0,423	0,418	0,416	0,423	+2,9	-0,0
10,0	0,513	0,520	0,529	0,523	0,523	0,514	+3,1	-0,0
12,0	0,614	0,631	0,626	0,622	0,618	0,614	+2,7	-0,0
16,0	0,817	0,808	0,800	0,797	0,797	0,807	+0,0	-2,5

W tablicy 2 umieszczone są wyniki oznaczeń kwasu jabłkowego w obecności oksykwasów, które podobnie jak kwas jabłkowy są rozpuszczalne w eterze, które są utleniane nadmanganianem do związków tworzących osazony i tym samym zwiększających odczyty kwasu jabłkowego. Ponieważ jednak kwas jabłkowy samym nadmanganianem się nie utlenia do związków tworzących osazony, a oksykwasy jak kwas pirogronowy, kwas cytrynowy i kwas winowy w obecności bromu reagują podobnie jak w obecności nadmanganianu, przeto powodują one równomierne przyrosty intensywności zabarwienia tak w próbie pełnej, jak i w ślepej materiałowej. Kwas asparaginowy, tyrozyna, dwufenylalanina, kwas askorbinowy i cukry proste nie zostały uwzględnione, ponieważ są one nierozpuszczalne w eterze i pozostają bez wpływu na ślepą próbę materiałową.

Tablica 2

Oznaczenie kwasu jabłkowego w obecności oksykwasów wpływających na wielkość ślepej materiałowej (średnia z 5 oznaczeń)

Kwas jabłkowy μg	Kwas cytrynowy μg	Kwas pirogronowy μg	Kwas winowy μg	E próby pełnej	E próby ślepej	Różnica	Wykryto kw. jabłkowego μg	Różnica w %
8,0	—	—	—	0,4523	0,0363	0,4160	8,05	+0,6
8,0	200	—	—	0,5528	0,1428	0,4100	7,97	-0,4
8,0	—	100	—	0,5057	0,0809	0,4248	8,22	+2,7
8,0	—	—	200	0,4684	0,0656	0,4028	7,84	-2,0

Jak wynika z tablicy 2, nawet 200 μg kwasu cytrynowego nie przeszkadza w oznaczeniu kwasu jabłkowego i ślepa materiałowa tak dużej ilości tego kwasu odpowiada zaledwie 2 μg w przeliczeniu na kwas jabłkowy, wynosząc zaledwie 1% intensywności barwy osazonu w alkalicznym środowisku. W dużych ilościach kwas cytrynowy wpływa na zmianę zabarwienia próby pełnej i ślepej, które przyjmuje odcień fiołkowy na miejsce normalnej barwy niebieskiej. Kwasy pirogronowy i winowy również tylko nieznacznie zwiększają ślepą próbę materiałową. Wyniki otrzymane w obecności tych oksykwasów znajdują się w ramach błędu metody.

Zastosowanie metody do oznaczania kwasu jabłkowego w materiale biologicznym

Przygotowanie materiału do ekstrakcji: 1 g suchego materiału zadaje się 1 ml eteru etylowego, 1 ml 1 N kwasu siarkowego, dodaje około 5 g bezwodnego siarczanu sodowego (jeżeli materiał zawiera dużo cukrów, jak np. suszone owoce, należy dodać około 7 g siarczanu) i rozciera dokładnie w moździerzu o średnicy około 6 cm. Wymieszany suchy materiał przenosi się przy pomocy lejka do cylindra o poj. 25 ml z dobrze doszlifowanym korkiem szklanym, przemywa moździerz przy pomocy około 1 g bezwodnego siarczanu sodowego i wytrząsa materiał w cylindrze przez 5 minut z 20 ml eteru etylowego. Eter dekantuje się do kolbki stożkowej o poj. 100 ml i wytrząsa materiał ponownie przez 5 minut jak wyżej. Po zdekantowaniu eteru przemywa się materiał około 10 ml eteru i sączy przez sączek z waty. Z połączonych wyciągów oddestylowuje się eter i suszy zawartość kolbki w temp. 50° aż do całkowitego odparowania eteru. Do kolbki dodaje się wody destylowanej, 1 ml 1 N wodorotlenku sodowego, sączy i przenosi ilościowo do kolbki miarowej. Po uzupełnieniu do znaku, pobiera się 5 ml do analizy. Ekstrakcja kwasu jabłkowego ze świeżego materiału przebiega w sposób identyczny z tym, że zamiast 1 ml 1 N kwasu siarkowego dodaje się 0,1 ml 10 N kwasu, ze względu na wodę zawartą w świeżym materiale. Jeżeli próba badana zawiera od 0,08 — 1,2% kwasu jabłkowego, wówczas należy rozcieńczyć wyciąg do 200 ml i 5 ml tego roztworu rozcieńczyć ponownie do 100 ml. Jeżeli zawartość kwasu jabłkowego w próbce wynosi od 0,005 — 0,08%, względnie od 0,0005 — 0,008%, wówczas należy rozcieńczyć roztwór do 250 ml, względnie 25 ml.

Obliczenie: % kwasu jabłkowego = $A \cdot B \cdot 0,02$, gdzie

A = miligramy kwasu jabłkowego w 5 ml roztworu,

B = całkowita objętość w ml.

W celu potwierdzenia ilościowego przebiegu ekstrakcji nową metodą, przeprowadzono dodatkowo wytrząsanie eterem 2×20 minut na mechanicznej wstrząsarce i ekstrakcję w aparacie Soxhleta przez 4 godziny. Wyniki w tabelicy 3 wykazują, że wytrząsanie eterem 2×5 minut ekstrahuje ilościowo kwas jabłkowy z odwodnionej próby.

T a b l i c a 3

Ekstrakcje kwasu jabłkowego z jabłka

Ekstrakcja	Wykryto w %	Różnice w %
Soxhlet	0,292	100
2×20 min. mechanicznie	0,288	98,9
2×5 minut ręcznie	0,288	98,9

W tabelicy 4 podane są wyniki oznaczania kwasu jabłkowego w materiale pochodzenia roślinnego wykonane nową metodą.

T a b l i c a 4

Kwas jabłkowy oznaczony nową metodą

Materiał	Rozcieńczenie g na ml wody	Wykryto μg	Obliczono w %
Jabłko	1 : 4000	3,60	0,288
Figa suszona	1 : 4000	2,15	0,172
Gruszka suszona	1 : 4000	6,82	0,545
Rengłoda suszona	1 : 4000	9,70	0,776
Śliwka suszona	1 : 10.000	7,80	1,560
Liście cykorii	1 : 4000	1,08	0,086
Koniczyna suszona	1 : 4000	5,15	0,412
Mączka łubinu	1 : 200	13,25	0,053
Liść rajgrasu	1 : 200	4,75	0,019
Kiełki łubinu	1 : 200	3,31	0,013
Rabarbar łądyga	1 : 4000	15,12	1,210
Żórawina	1 : 4000	9,87	0,790
Szczypiorek	1 : 4000	1,40	0,112
Liście pietruszki	1 : 4000	2,15	0,172
Liście sałaty	1 : 4000	1,16	0,093

W tabelicy 5 umieszczone są wyniki analiz kwasu jabłkowego dodanego do materiału roślinnego przed ekstrakcją. Do 1 g próby dodano

zamiast 1 ml 1 N kwasu siarkowego 1 ml roztworu 1 N kwasu siarkowego zawierającego 400 μg kwasu jabłkowego, po czym ekstrahowano jak wyżej.

Tablica 5

Ekstrakcja dodanego kwasu jabłkowego

Materiał	Rozcieńczenie	Zawartość kw. jabłkowego w 5 ml próby μg	Dodano kwasu jabłk. μg	Wykryto ogółem μg	Różnica μg	Wykryto dodanego kwasu jabłkowego w %
Otręby pszenne	1 : 500	2,47	4,00	6,45	3,98	99,5
Słoma jęczmienna	1 : 1000	8,42	2,00	10,45	2,03	101,5
Koniczyna suszona	1 : 2000	10,15	2,00	12,10	1,95	97,5

Jak wynika z tablicy 5, ekstrakcja kwasu jabłkowego, dodanego do próby, przebiega ilościowo i błąd ekstrakcji nie wykracza poza ramy błędu metody.

Dyskusja

Maksimum syntezy dwubromoacetaldehydu zależy w głównej mierze od dokładnego przestrzegania warunków utleniania kwasu jabłkowego. Ilości użytego kwasu siarkowego, bromku i nadmanganianu są czynnikami krytycznymi, jak również, ale w mniejszym stopniu, temperatura i czas utleniania. Jak wynika z wykresów od 1 — 4, maksimum utleniania uzyskuje się tylko w bardzo wąskich granicach i odchylenia wybiegające poza $\pm 20\%$ powodują wyraźne obniżenia syntezy dwubromoacetaldehydu i tym samym ilości kolorymetrowanego osazonu.

Wg opisaney metody stosowane ilości odczynników utleniających są znacznie niższe aniżeli w metodzie Puchera i wsp. W przeliczeniu na 7 ml roztworu autorzy oryginalnej metody stosują 40 mg bromku potasowego i 40 mg nadmanganianu potasowego, podczas gdy w opisaney powyżej metodzie ilości te wynoszą 6 mg, względnie 3 mg. Jak wynika z wykresów 1 — 3, nadmiar nadmanganianu jest jednym z powodów obniżenia syntezy dwubromoacetaldehydu.

S u o m a l a i n e n i A r h i m o (3) wykazali, że współczynnik utleniania kwasu jabłkowego wg metody Puchera i wsp. wynosi od

50 — 60% w zależności od ilości kwasu jabłkowego w próbie. W tabelicy 6 zestawione są współczynniki metody Puchera i wsp. w porównaniu z nową metodą.

Tablica 6
Współczynnik utleniania kwasu jabłkowego

Mg na 100 ml osazonu	Przeliczono na kwas jabłkowy mg	E	Metoda Puchera		Nowa metoda	
			przeliczono na kwas jabłkowy mg	%	przeliczono na kwas jabłkowy mg	%
0,240	0,077	0,246	0,124	62,1	0,080	96,25
0,480	0,154	0,599	0,305	50,5	0,195	78,9

Jak wynika z tabelicy 6, utlenianie metodą Puchera i wsp., jak również nową metodą, nie przebiega ilościowo. Jednakże w nowej metodzie utlenianie wynosi od 79 — 96% teorii zawartego kwasu jabłkowego obliczonego z osazonu. Czułość metody jest przeto o około 50% wyższa od metody Puchera i wsp.

Obniżono również znacznie ilości dwunitrofenylohydrazyny. Metoda Puchera stosuje 50 mg odczynnika na jedno oznaczenie, podczas gdy w nowej metodzie ilość ta wynosi 0,5 mg, jest więc 100 razy mniejsza.

Opisana metoda ekstrakcji eterem eliminuje suszenie badanej próby, odbiałczanie i oczyszczanie ekstraktów, jest prosta w manipulacji, szybka i nie wymagająca żadnej aparatury. Wyniki otrzymane na drodze wytrząsania eterem są identyczne z ekstrakcją w aparacie Soxhleta. Krótka ekstrakcja przez wytrząsanie 2×5 minut jest bardziej korzystna aniżeli ekstrakcja w Soxhlecie, ponieważ po 4 godzinach ekstrakcji eterem ślepa materiałowa jest znacznie wyższa na skutek wymywania związków, które reagują z dwunitrofenylohydrazyną.

Kwas cytrynowy, pirogronowy i winowy utleniają się nadmanganianem i tworzą osazony, które w alkalicznym środowisku barwią się na fiołkowo. W tych warunkach kwas jabłkowy nie daje osazonów, przeto ślepa materiałowa wprowadzona na miejsce ślepej odczynnikowej umożliwia oznaczenie kwasu jabłkowego w obecności wyżej wymienionych oksykwasów. W ten sposób zdołano wyeliminować konieczność oddestylowania dwubromoacetaldehydu, która jest niezbędna w metodzie Puchera i wsp. Ponieważ kwas cytrynowy nie przeszkadza w analizie kwasu jabłkowego, przeto ekstrakcja pentabromoacetonu (produkt utleniania kwasu cytrynowego) do rozpuszczalników organicznych okazała się również niepotrzebna.

W opisanej metodzie zrezygnowano ze stosowania kosztownej i przykłej w pracy pirydyny i zastąpiono ją tanim i wygodnym roztworem wodorotlenku sodowego w 95% alkoholu etylowym.

Opisana metoda zezwala na szybkie oznaczenie kwasu jabłkowego i czas potrzebny do wykonania pełnej analizy z materiału roślinnego nie przekracza 2 godzin. Powyżej 2 μg błąd metody nie przekracza $\pm 4\%$.

Analizy kwasu jabłkowego w materiale roślinnym wykonał mgr. inż. J. Kączkowski, któremu na tym miejscu składam serdeczne podziękowanie.

Streszczenie

1. Opisano mikrometodę oznaczania kwasu jabłkowego w materiale roślinnym.

2. Metoda zezwala na oznaczenie 0,5 — 16 μg kwasu jabłkowego.

3. Zasada metody polega na utlenieniu kwasu jabłkowego do dwubromoacetaldehydu, który z dwunitrofenylohydrazyną tworzy niebieski barwnik w zasadowym środowisku.

4. Opracowano optymalne warunki utlenienia kwasu jabłkowego, podwyższono znacznie czułość metody i wyeliminowano destylację dwubromoacetaldehydu. Pirydynę zastąpiono alkoholowym roztworem wodorotlenku sodowego.

5. Kwas cytrynowy, pirogronowy i winowy tworzą osazony, które wchodzi w skład ślepej materiałowej i ich obecność nawet w dużych nadmiarach nie przeszkadza w analizie kwasu jabłkowego.

6. Wg opisanej metody można oznaczyć kwas jabłkowy w materiale roślinnym w czasie nie przekraczającym 2 godzin.

7. Opracowana metoda nie wymaga poza kolorymetrem żadnej aparatury, jest szybka i prosta, nadaje się przeto do masowego oznaczania kwasu jabłkowego w materiale pochodzenia biologicznego.

LITERATURA

1. Pucher G. W., Vickery H. B. i Wakeman A. J., *Ind. Eng. Chem. Anal. Edit.* **6**, 288, 1934.
2. Pucher G. W., Wakeman A. J. i Vickery H. B., *Ind. Eng. Chem. Anal. Edit.* **13**, 244, 1941.
3. Suomalainen H. i Arhimo E., *A. Anal. Chemie* **128**, 206, 1943.
4. Wolf J., *Z. Anal. Chemie* **136**, 401, 1952.

МИКРОМЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЯБЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ

Резюме

1. Описан микрометод определения яблочной кислоты в растительном материале.
2. Метод допускает определение 0,5 — 16 μg яблочной кислоты.
3. Сущность метода заключается в окислении яблочной кислоты до дибромоацетальдегида, который образует, совместно с динитрофенильгидразином, голубое красильное вещество в щелочной среде.
4. Были разработаны оптимальные условия окисления яблочной кислоты, была значительно повышена точность метода и устранена дестилляция дибромоацетальдегида. Пиридин заменен был спиртовым раствором едкого натрия.
5. Лимонная, пировиноградная и винная кислота образуют осазоны, входящие в состав контрольной образца и даже чрезмерный их излишек не препятствует анализу яблочной кислоты.
6. Можно определять яблочную кислоту согласно описанному методу в растительном материале в промежутке времени не превышающем 2 часов.
7. Разработанный метод не требует никакой аппаратуры кроме колориметра, это скорый и простой метод, поэтому он пригоден при массовом определении яблочной кислоты в материале биологического происхождения.

A MICROMETHOD FOR THE DETERMINATION OF MALIC ACID

Summary

1. A microchemical method for the determination of malic acid has been described.
2. The method permits to determine quantities between 0,5 — 16 μg of malic acid.
3. The method is based upon the oxydation of malic acid to dibromoacetaldehyde, which reacts with dinitrophenylhydrazine, giving a blue coloured complex in alcoholic alkaline solution.
4. Optimal conditions for the oxidation of malic acid have been worked out, the sensitivity of the reaction has been considerably increased. The distillation of dibromoacetaldehyde has been eliminated and pyridine has been replaced by ethyl alcohol.
5. Pyruvic, citric and tartaric acid produce osazones, which are incorporated in the blind estimation and their presence even in large excess does not interfere with the analysis of malic acid.

6. The time for the complete estimation of malic acid in plant material does not exceed 2 hours.

7. The described method does not require with the exception of the photocolorimeter any additional apparatus. The method is quick and simple and for this reason it may be applied for mass analyses of malic acid in material of biological origin.

Otrzymano 12.4.1955

ELŻBIETA ROMANOWSKA

POLAROGRAFICZNA MIKROMETODA OZNACZANIA POTASU W OSOCZU I SUROWICY KRWI

Z Zakładu Chemii Fizjologicznej A. M. we Wrocławiu
 Kierownik prof. dr T. Baranowski

Znane są dwie polarograficzne metody oznaczania potasu w surowicy. W jednej z nich potas oznacza się na podstawie zmniejszenia się znanej ilości dwupikrylaminy, które ma miejsce na skutek wiązania się potasu z tym związkami (3). W drugiej metodzie oznacza się polarograficznie kobalt w wytrąconym osadzie azotyno-kobaltanu sodowo-potasowego, którego ilość jest proporcjonalna do ilości potasu w badanej próbce (4). Ta druga metoda została ogłoszona w czasie, kiedy nasze doświadczenia były już daleko posunięte.

Metoda nasza polega na strąceniu potasu jako nierozpuszczalny azotyno-kobaltan sodowo-potasowy, który następnie rozkłada się stężonym kwasem solnym i oznacza polarograficznie sumę sodu i potasu. Sumaryczna ilość sodu i potasu jest miarą ilości potasu ze względu na stechiometryczny stosunek sodu i potasu w azotyno-kobaltanie sodowo-potasowym $K_2Na/Co(NO_2)_6$. Warunki ilościowego wytrącenia osadu azotyno-kobaltanu sodowo-potasowego są ściśle określone i powinny być zawsze zachowane, aby skład osadu nie uległ zmianie. Warunki te, to przede wszystkim: pH odczynnika strącającego (wynosi ok. 6) i stała temperatura (optimum 10°). Poza tym osad powinno się strącać zawsze z tej samej objętości roztworu.

Metoda ta nadaje się szczególnie w tych przypadkach, gdzie obok dużych ilości sodu potasu jest stosunkowo mało, np. w osoczu, gdzie stosunek ilości sodu do ilości potasu wynosi jak 1:20.

Część doświadczalna

ODCZYNNIKI

1. Alkohol etylowy 96%.
2. Roztwór azotyno-kobaltanu sodowego. A) 25 g azotanu kobaltu

cz. d. a. rozpuszcza się w 50 ml wody i dodaje się 12,5 ml lodowatego kwasu octowego. B) 120 g azotynu sodowego cz. d. a. wolnego od K rozpuszcza się w 180 ml wody. Do roztworu A) dodaje się 210 ml roztworu B). Wywiązują się tlenki azotu, które wypędza się z roztworu przez przepuszczanie powietrza. Otrzymany roztwór ma $\text{pH} = 5,7$. Roztwór ten sporządza się więc analogicznie jak w metodzie K r a m e r a - T i s d a l l a (2).

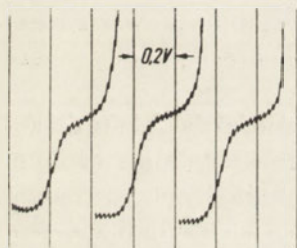
3. Stężony kwas solny.

4. 0,1 N wodorotlenek czterometyloamoniowy. Odczynnik ten został sporządzony wg przepisu podanego przez H. E r d m a n n a (5).

OPIS METODY

Oznaczenia potasu przeprowadzono we krwi żyłnej. Aby zapobiec krzepnięciu, do 1 ml krwi dodawano 1 jednostkę międzynarodową heparyny. W czasie 10 — 15 min. po pobraniu krwi odwirowywano krwinki, a osocze natychmiast odpipetowano.

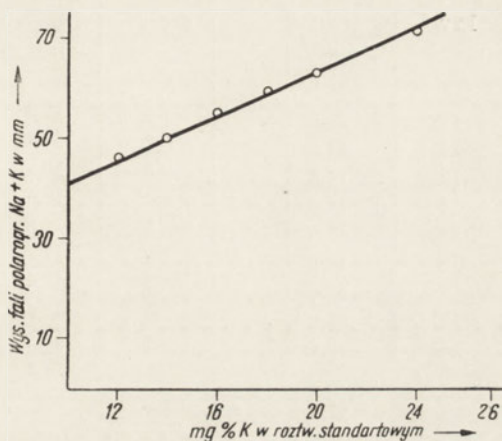
1 ml osocza odbiałca się, dolewając 2 ml alkoholu etylowego. Osad białka odwirowuje się, a następnie przemywa mieszkanką alkoholu etylowego z wodą (1 objętość wody, 2 objętość alkoholu). Roztwór alkoholowy łączy się z roztworem z przemycia i odparowuje do sucha. Pozostałość rozpuszcza się w około 0,5 ml wody. Odwirowuje się nierozpuszczone resztki zdenaturowanego białka. Płyn znad osadu przenosi się ilościowo do drugiej probówki wirówkowej, stosując trzykrotne przepłukiwanie (ok. 1 ml płynu), dodaje powoli kroplami 2 ml roztworu azotyno-kobaltanu sodowego i pozostawia przez 45 min. dla zupełnego wytrącenia się osadu. Żółty osad azotyno-kobaltanu sodowo-potasowego odwirowuje się i przemywa



Rys. 1. Polarogramy otrzymane przy oznaczaniu potasu w osoczu krwi. Czułość galw. 1/50

3 — 4-krotnie wodą, ostrożnie, nie wzruszając osadu, aż płyn nad osadem będzie bezbarwny. Następnie osad rozpuszcza się w stężonym kwasie solnym na gorąco. Roztwór przenosi się na parowniczkę i odparowuje do sucha. Suchą pozostałość rozpuszcza się w 2,5 ml 0,1 N wodorotlenku czterometyloamoniowego i oznacza polarograficznie sumę sodu i potasu (jon sodowy i potasowy mają jednaki potencjał półfali). Oznaczenia wykonano na aparacie Heyrowskiego przy czułości galwanometru 1/50, czas spadania kropli 3 sek. Wysokość fali polarograficznej odczytywano przy — 2,2 V. Wygląd otrzymanych polarogramów przedstawia rys. 1.

Krzywą kalibrowania otrzymano w ten sposób, że z roztworu chlorku potasu o znanym stężeniu wytrącono potas jako azotyno-kobaltan sodowo-potasowy i po przeprowadzeniu tego związku w chlorki sodu i potasu sposobem opisanym wyżej polarografowano. Wysokość fali polarograficznej jest bezpośrednią miarą ilości potasu w roztworze (rys. 2).



Rys. 2. Krzywa kalibrowania do polarograficznego oznaczenia potasu. Z 1 ml standardowego roztworu chlorku potasu wytrąca się potas jako $K_2Na [Co(NO_2)_6]$. Po przeprowadzeniu tego związku w chlorki sodu, potasu i kobaltu rozpuszcza się je w 2,5 ml 0,1 N $(CH_3)_4NOH$ i polarografuje sumę ilości sodu i potasu

Wyniki

Oznaczono zawartość potasu w osoczu 18 różnych próbek krwi ludzkiej. Średnia zawartość potasu wynosi 17,4 mg %, średnie odchylenie σ wynosi $\pm 10\%$.

Wyniki, które otrzymano, podaje tabl. 1.

Oprócz tego, aby sprawdzić powtarzalność oznaczeń opisaną metodą, wykonano 10 równoległych oznaczeń potasu w jednym i tym samym osoczu. Wyniki otrzymane podaje tabl. 2.

Tablica 1

Zawartość potasu w osoczu ludzi zdrowych

Nr próbki krwi	Zawartość potasu w osoczu w mg %	Nr próbki krwi	Zawartość potasu w osoczu w mg %
1	18,4	10	20,6
2	18,2	11	17,9
3	18,2	12	14,6
4	17,4	13	14,6
5	17	14	17,3
6	15,2	15	17,3
7	14,6	16	18,4
8	17,4	17	19,4
9	16,6	18	19,4

średnia zawartość potasu w osoczu w mg% 17,4

średnie odchylenie od wartości

$$\text{średniej } S = \sqrt{\frac{\sum f^2}{n(n-1)}} \quad 0,41$$

$$\text{średnie odchylenie } \sigma = \sqrt{\frac{\sum f^2}{n-1}} \quad 1,73$$

średnie odchylenie w % 10

f — pojedyncze odchylenie od wartości średniej

n — ilość oznaczeń

Tablica 2

Wyniki 10 oznaczeń potasu w tym samym osoczu

Nr oznaczenia	Zawartość potasu w osoczu w mg %	Odchylenie od wartości średniej	Kwadrat odchylenia od wartości średniej
1	17,8	0	0
2	17,4	0,4	0,16
3	18,2	0,4	0,16
4	18,6	0,8	0,64
5	17,8	0	0
6	17	0,8	0,64
7	17,8	0	0
8	17,4	0,4	0,16
9	18,2	0,4	0,16
10	17,8	0	0

średnia zawartość potasu w osoczu w mg % 17,8

średni błąd pojedynczego pomiaru σ 0,46

średni błąd pojedynczego pomiaru w % 2,6

średni błąd wartości średniej S 0,14

Dyskusja

Przy oznaczaniu potasu tą nową polarograficzną modyfikacją metody Kramera-Tisdalla ważne jest zachowanie tych samych reguł co i w innych metodach polegających na wytrąceniu potasu jako azotyno-kobaltanu sodowo-potasowego, odnośnie sposobu i warunków wytrącania osadu, w celu zapewnienia jego stałego i określonego składu, tzn. aby zawsze powstawał $K_2Na/Co(NO_2)_6$. Warunki te to pH roztworu, które powinno wynosić ok. 6 i stała temperatura (optimum 10°). Poza tym osad powinien być zawsze wytrącany z tych samych objętości roztworu (1 ml odbiałzonego osocza strąca się 2 ml roztworu azotyno-kobaltanu sodowo-potasowego).

W metodzie tej stosuje się odbiałczanie osocza w tym celu, aby usunąć ochronne działanie białek. Białka przeszkadzają ilościowemu wy-

trąceniu potasu, specjalnie w osoczach dłużej przechowywanych. Wytrącanie potasu bezpośrednio z osocza, jak to ma miejsce w oryginalnej metodzie Kramera-Tisdalla, a również w niektórych jej modyfikacjach, jest niekorzystne również z tego względu, że osad azotyno-kobaltanu sodowo-potasowego adsorbuje z osocza substancje organiczne (np. białka), które mogą powodować błędy przy oznaczaniu potasu. Substancje te w metodzie Kramera-Tisdalla zwiększają zużycie nadmanganianu przy miareczkowaniu azotynów.

Oznaczanie bezpośrednio sodu i potasu po rozłożeniu azotyno-kobaltanu sodowo-potasowego wydawało się słuszniejsze, niż oznaczanie kobaltu lub azotynów i obliczanie na tej podstawie zawartości potasu, jak to ma miejsce prawie we wszystkich innych modyfikacjach metody Kramera-Tisdalla. Oznaczanie kobaltu lub azotynów zamiast bezpośredniego oznaczania potasu powodowałoby błąd szczególnie wtedy, gdy wraz z azotyno-kobaltanem sodowo-potasowym strąciłyby się jeszcze azotyno-kobaltany innych kationów, np. azotyno-kobaltan amonowy.

Metodą powyższą można oznaczać potas równie dobrze w osoczu jak i w surowicy.

Wyniki otrzymane na zawartość potasu w osoczu krwi różnych ludzi mieściły się w granicach 14,6 — 20,6 mg %. Średnia zawartość potasu wynosiła 17,4 mg %, przy czym średnie odchylenie od tej wartości wynosiło 1,73, tzn. 10%. Normy zawartości potasu w krwi ludzkiej podane przez Kinga E. J. (1) są następujące: 13,5 — 21,7 mg %, przy czym średnia zawartość potasu wynosi 17,35 mg %. Porównanie tych wyników z wynikami otrzymanymi metodą wyżej przedstawioną jest zadowalające. Średnie zawartości potasu są niemal identyczne, a zakres wahań fizjologicznych potasu we krwi otrzymany metodą opisaną w niniejszej pracy jest nawet węższy.

Metoda nadaje się do seryjnego oznaczania potasu w osoczu lub surowicy.

Powyższa praca była subsydiowana przez Komitet Biochemiczny PAN.

Streszczenie

Przedstawiono metodę polarograficznego oznaczenia potasu w osoczu lub surowicy krwi. Metoda polega na tym, że potas wytrąca się jako azotyno-kobaltan sodowo-potasowy, który rozkłada się stężonym kwasem solnym. Po przeprowadzeniu tego związku w chlorki sodu, potasu i kobaltu, oznacza się polarograficznie sumę ilości sodu i potasu proporcjonalną do ilości potasu w próbce.

LITERATURA

1. King E. J., *Micro-analysis in medical Biochemistry*, Churchill A., London 1951.
2. Kramer B., Tisdall F. J., *J. Biol. Chem.* **48**, X 219, 1921.
3. Monnier D., Besso Z., Wegner P. E., *Helv. Chim. Acta* **34**, 933, 1951.
4. Podivinsky R., *ČLČ* **92**, 205, 1953.
5. Vanino L., *Handbuch der präparativen Chemie*, II Band Org. Teil s. 286, F. Enke, Stuttgart 1914.

ПОЛЯРОГРАФИЧЕСКИЙ МИКРОМЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАЛИЯ
В ПЛАЗМЕ И В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Резюме

Изложен полярографический метод определения калия в плазме или сыворотке крови.

Метод заключается в удалении калия в виде калий-натрий-кобальтонитрита, который разлагается концентрированной соляной кислотой. После превращения этого соединения в хлориды натрия, калия и кобальта, сумма количеств натрия и калия, пропорциональная количеству калия в образце, определяется полярографическим методом.

NEUE POLAROGRAPHISCHE MIKROMETHODE ZUR KALIUMBESTIMMUNG

Zusammenfassung

Es wird eine Methode zur polarographischen Kaliumbestimmung im Blutserum beschrieben. Das Kalium wird als Kalium-Natrium-Kobalt-nitrit ausgefällt, der Niederschlag mit konz. Chlorwasserstoffsäure zersetzt und in entsprechenden Chloride übergeführt. Die Gesamtmenge Kalium + Natrium, die zur Menge Kaliums proportional ist wird danach polarographisch bestimmt.

Otrzymano 22.4.1955

E. BOROWSKI, S. KRYŃSKI, Z. KURYŁO-BOROWSKA, D. WASIELEWSKA

IZOLOWANIE I WŁASNOŚCI CZYSTEJ CEREINY B₂— ANTYBIOTYKU SZCZEPU „φ” *Bacillus cereus**

Z Instytutu Medycyny Morskiej (dyr. āoc. dr Z. Buczowski), Katedry Technologii Środków Leczniczych Politechniki Gdańskiej (kier. prof. dr Z. Ledóchowski) i Katedry Mikrobiologii Akađ. Med. w Gdańsku (kier. prof. dr S. Kryński)

W jednej z poprzednich prac wykazano, że wyhodowany przez A. K u c h t ę szczep zarodnikującej laseczki tlenowej, *Bacillus cereus*, wytwarza substancję działającą antybiotycznie na szereg drobnoustrojów, głównie powodujących schorzenia przewodu pokarmowego (8). Najbardziej z nich wrażliwym jest pałeczka czerwonki *Shigella shigae*.

Wyhodowany szczep *B. cereus* oznaczano literą „φ”. Wykazano także (7), że wytwarzana przez szczep *B. cereus* substancja antybiotyczna jest kompleksem kilku ciał czynnych. Kompleks ten nazwano cereiną. Antybiotykowi występującemu w głównej ilości nadano nazwę „Cereina B₂”. Stwierdzono, że substancja ta nie odpowiada własnościami żadnemu z poznanych dotychczas antybiotyków. Zbadano szereg własności, głównie biologicznych, antybiotyku będącego w stanie nieoczyszczonym. Opisano też własności samego szczepu oraz określono warunki wytwarzania przez drobnoustrój ciała czynnego na podłożach naturalnych i syntetycznych.

Celem niniejszego doniesienia jest przedstawienie badań nad wyizolowaniem w stanie czystym cereiny B₂ oraz określeniem jej najważniejszych własności fizycznych, chemicznych i biologicznych.

Oznaczanie aktywności

W toku pracy aktywność poszczególnych próbek była oznaczana metodą cylinderkową (6). Jako drobnoustrój wzorcowy stosowany był

* Praca wykonana częściowo na podstawie dotacji Komitetu Biochemicznego Polskiej Akademii Nauk. Praca została zreferowana na zjeździe Pol. Tow. Fizjologicznego w Krakowie w 1954 r. oraz na Międzynarodowym Sympozjum na temat Antybiotyków w Warszawie w lutym 1955 r.

szczep *Shigella shigae* PZH-16. Za jednostkę obrano taką ilość ciała czynnego, która w objętości 1 ml dawała w metodzie cylinderkowej strefę zahamowania wzrostu o średnicy 23 mm.

FERMENTACJA

W niniejszej pracy stosowano opracowaną przez nas (7) pożywkę syntetyczną. Jest to modyfikacja podłoża Andersona M-9. Skład jej jest następujący:

MgSO ₄	0,1 g
Na ₂ HPO ₄ · H ₂ O	6,0 g
KH ₂ PO ₄	3,0 g
NaCl	5,0 g
NH ₄ Cl	1,0 g
MnCl ₂	0,02 g
kw. cytrynowy	2,0 g
glikoza	4,0 g
woda dest.	do 1 l
KOH — do ustawienia pH=7,0.	

Fermentację prowadzono metodą powierzchniową we flaszczkach Roux w temp. 34°. Czas fermentacji wynosił 24 godz. Z dojrzałej hodowli odwirowywano drobnoustroje i otrzymany płyn pofermentacyjny poddawano dalszej przeróbce.

OTRZYMANIE ANTYBIOTYKU SUROWEGO

Antybiotyk praktycznie nie daje się ekstrahować z płynu pofermentacyjnego rozpuszczalnikami: eterem etylowym, eterem naftowym, benzenem, chloroformem, octanem amylovym, n-butalonom.

Ciało czynne wydobywano z hodowli przez adsorpcję na węglu aktywnym. Stosowano 3% węgla technicznego. Ilość ta, jak wynika z wykresu (rys. 1), jest optymalna. W warunkach tych adsorbuje się ok. 95% czynnej substancji. Po odsączeniu i przemyciu wodą węgla usuwano zaadsorbowane na nim ciało czynne przez wypieranie nasyconym roztworem wodnym alkoholu izoamylovego. Stosowano go w objętości równej objętości wyjściowej hodowli. Otrzymywano tą drogą ok. 40 — 50% substancji aktywnej, zawartej w hodowli. Inne substancje eluujące dawały nie lepsze, a przeważnie gorsze wyniki. Kilkakrotne powtarzanie elucji także nie poprawia wyników. Przy pierwszej, jak podano wyżej, uzyskano 40 — 50% substancji czynnej, przy drugiej dalsze 10%, a przy trzeciej zaledwie 2%. Poprawienie wydajności przez

kilkakrotną elucję jest więc nieproporcjonalne do trudności, jakie w dalszym przerobieniu stwarzają duże ilości płynu.

Użycie nasyconego roztworu alkoholu izoamylowego w objętości równej użytej hodowli jest konieczne. Stosując 60% objętości otrzymano tylko 30% wydajności ciała aktywnego.

Otrzymywany roztwór surowego antybiotyku zagęszczono w próżni w temp. pokojowej, po czym w celu usunięcia części ciał barwnych oraz koloidowej zawiesiny węgla poddawano chromatografii przepływowej na włóknistym tlenku glinu. Jednakże w dalszej pracy okazało się to niekonieczne, gdyż w następnych etapach oczyszczania antybiotyku ciała barwne występujące w materiale surowym dadzą się łatwo usunąć.

Zagęszczony w próżni roztwór surowego antybiotyku poddawano dalszemu oczyszczaniu bez uprzedniego osuszania go. Przy zagęszczeniu należy zwracać uwagę na zmiany pH i w miarę potrzeby doprowadzać do wartości 7,0. W środowisku tym antybiotyk jest najtrwalszy. Zalkalizowanie roztworu wpływa szczególnie destrukcyjnie na ciało czynne. Także i przechowywanie roztworu surowego antybiotyku (nawet w lodówce) przez czas dłuższy nie jest wskazane. Obecne w roztworze ciała zanieczyszczające powodują już po kilku dniach przechowywania częściową inaktywację ciała czynnego.

Z 1 litra kultury otrzymuje się roztwór zawierający 500 — 800 mg suchej substancji. Antybiotyk surowy daje w stężeniu 0,12 — 0,25 mg/ml strefę zahamowania o średnicy 23 mm zależnie od aktywności przerabianej kultury.

ROZDZIAŁ PRZECIWPĄDOWY

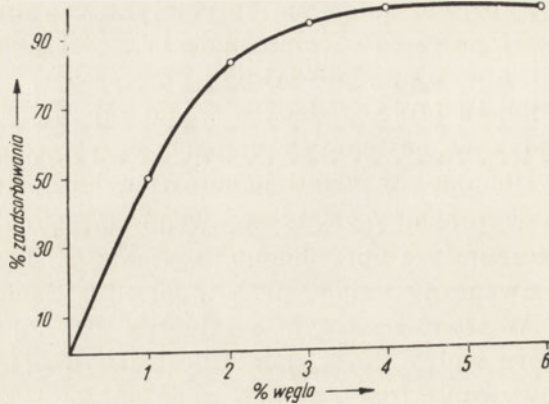
Surowy produkt poddano dalszemu oczyszczaniu stosując metodę rozdziału przeciwprądowego (2). W tym celu posługiwano się dwoma aparatami z elementami szklanymi systemu Craiga (3, 4, 1). Stosowano układ fenol nasycony wodą (faza nieruchoma) i woda nasycona fenolem (faza ruchoma).

Rozdział przeciwprądowy prowadzono w kilku etapach. Na wstępie przeprowadzono rozdział próbny, 33-przejęciowy w celu ogólnego zorientowania się w przebiegu rozdzielania przeciwprądowego i opracowania na tej podstawie właściwej metody postępowania. Wyniki przedstawione są na wykresie 2 (rys. 2).

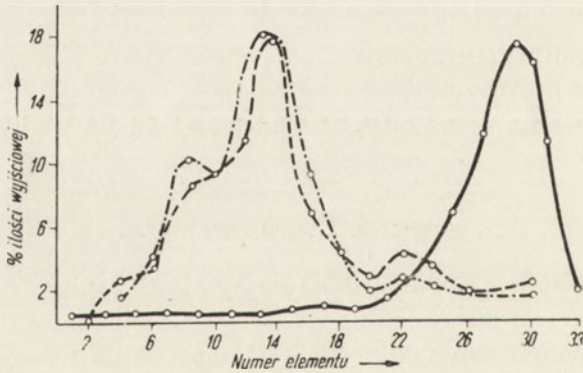
W toku całej pracy krzywe substancji suchej wyznaczano według Craiga i współprac. (5).

Z podanego wykresu jest widoczne, że w badanym preparacie obecna jest jedna główna substancja zanieczyszczająca obok innych ciał

balastowych, występujących w znacznie mniejszych ilościach. Ponadto można wywnioskować z przebiegu krzywej aktywności, że preparat zawiera nie jedno ciało czynne, lecz kilka, w tym jedno występujące w głównej ilości, z maksimum w elementach 13-14. Ponieważ tematem



Rys. 1. Adsorpcja ciała czynnego na węglu aktywnym.



Rys. 2. Rozdział przeciwaprądowy próbny, 33-przejęściowy.

- subst. sucha
- aktywność względem *Shigella shigae*
- · - · - aktywność względem *Proteus OX-19*

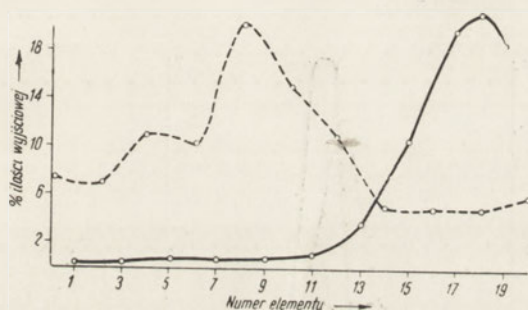
niniejszej pracy jest izolowanie głównego antybiotyku kompleksu antybiotycznego „cereina”, w dalszym postępowaniu nie uwzględniano frakcji odpowiadających pozostałym, występującym w nieznacznym ilościach składnikom tego kompleksu.

Współczynniki rozdziału woda-fenol głównego zanieczyszczenia oraz głównego antybiotyku, wyliczone z położenia maksimum ich krzywych (2, 14), wynoszą odpowiednio 7,2 oraz 0,65. Tak znaczna różnica współ-

czynników rozdziału obu tych substancji pozwala na oddzielenie głównego zanieczyszczenia we wstępnym, niewieloprześciowym rozdziale przeciwaprądowym. Obliczono, że dla osiągnięcia tego celu wystarcza już 20 przejść.

W rozdziale wstępnym stosowano aparat o pojemności elementów wynoszącej po 35 ml każdej fazy. Wyniki rozdziału przedstawione są na wykresie (rys. 3). Podobnie jak poprzednio zaznacza się na nim obecność więcej niż jednej substancji aktywnej.

Do dalszej przeróbki brano zawartość elementów 3-12. Z połączonych frakcji usuwano fenol drogą ekstrakcji eterowej i otrzymany roztwór zagęszczano w próżni. Z 9,0 gramów surowego materiału otrzymywano roztwór zawierający ok. 700 mg substancji suchej. Roztwór o stężeniu 0,048 mg/ml dawał strefę zahamowania o średnicy 23 mm.



Rys. 3. Rozdział przeciwaprądowy wstępny, 20-prześciowy.

— — — subst. sucha

- - - aktywność względem *Shigella shigae*

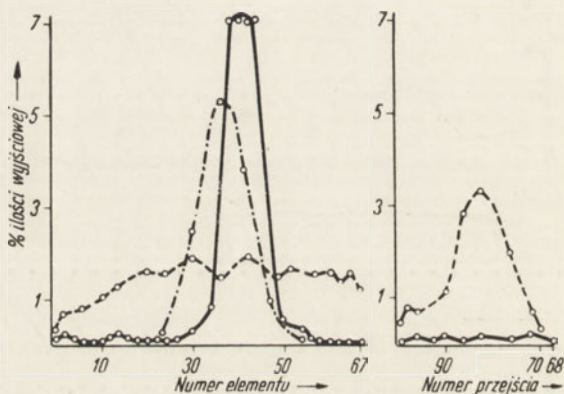
Preparat uzyskano w wyniku wstępnego rozdziału, wolny od głównego zanieczyszczenia zawiera jeszcze szereg ciał balastowych o współczynnikach rozdziału bardzo zbliżonych do substancji aktywnej. Zawiera także obok głównego antybiotyku pozostałe ciała czynne. W celu oddzielenia głównego antybiotyku od tych wszystkich substancji konieczne jest zastosowanie większej ilości przejść. Zastosowano więc 100-prześciowy rozdział przeciwaprądowy powtórzony kilkakrotnie.

Ponieważ aparat, którym dysponowano, nie posiadał dostatecznie dużej ilości elementów, stosowano technikę pojedynczego usuwania ("single withdrawal") (4), polegającą na zbieraniu wychodzących kolejno z ostatniego elementu frakcji. Uzyskane, po zanalizowaniu ich, dane przedstawia się na osobnym wykresie obok głównego wykresu przedstawiającego przebieg krzywych rozprzestrzenienia w poszczególnych elementach aparatu.

Pojemność elementów w aparacie wynosiła po 4,5 ml każdej fazy. Po skończonym rozdziale usuwano fenol i poszczególne frakcje badano

na zawartość substancji suchej i aktywność względem *Shigella shigae*. Wyniki przedstawione są na wykresie (rys. 4). W dalszej pracy przy przerobieniu większych ilości materiału stosowano napełnianie nim dwóch pierwszych elementów przed rozpoczęciem rozdziału. Powoduje to niewielkie przesunięcie krzywej (wykres), natomiast zwiększa dwukrotnie wydajność aparatury.

Przebieg krzywej aktywności, jak też i uzyskane wyniki z badania własności biologicznych różnych frakcji wskazują na obecność czterech antybiotyków. Pierwszy — zawarty w elementach Nr 0-6, drugi w elementach 10-20, trzeci 21-60 i czwarty we frakcjach 68-100. Ostatni antybiotyk jest prawdopodobnie kompleksem kilku ciał czynnych. Poszczególne antybiotyki oznaczono literami licząc od lewej strony krzywej: A, B₁, B₂ i C. Głównym antybiotykiem jest antybiotyk B₂. Nadano mu nazwę „Cereina B₂”.

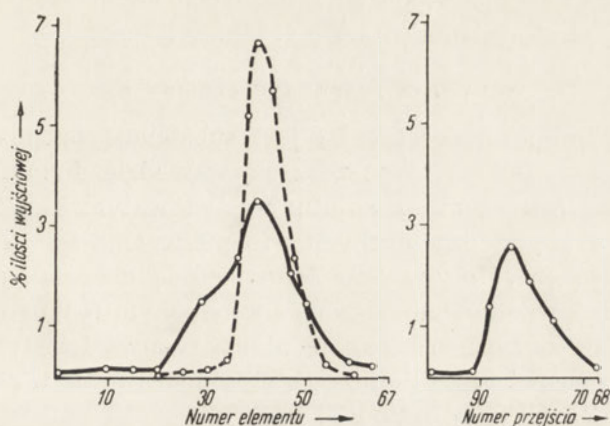


Rys. 4. I rozdziel przeciwprądowy 100-przejściowy.
 ————— aktywność względem *Shigella shigae*
 - - - - - subst. sucha
 - · - · - · aktywność przy napełnianiu materiałem
 wyjściowym dwóch pierwszych elementów

Jak wynika z krzywych, rozdziel 100-przejściowy pozwolił na zupełne rozdzielenie antybiotyków A, B₁ + B₂ oraz C. Rozdzielenie B₁ i B₂ jest tylko częściowe. Ponadto widoczne jest, że interesujący nas antybiotyk B₂ jest nadal jeszcze znacznie zanieczyszczony ciałami obojętnymi. Ciała barwne znajdujące się w materiale mają niewielkie współczynniki rozdzielu i zatrzymują się w pierwszych elementach. Frakcje zawierające B₂ są już zupełnie od nich uwolnione.

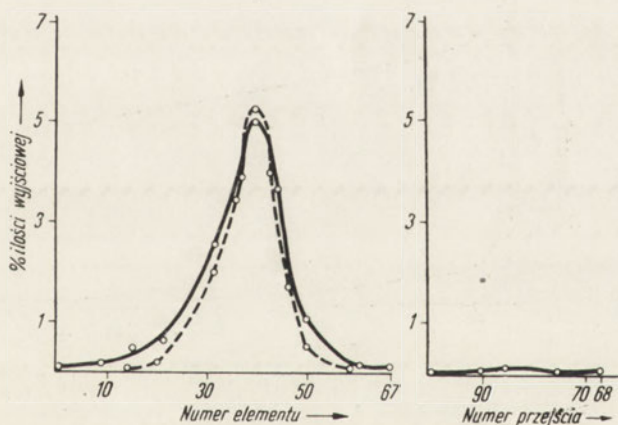
Materiał, znajdujący się we frakcjach zawierających cereinę B₂, został poddany dalszym procesom przeciwprądowym. W tym celu substancję zawartą w elementach Nr 35-50 (lub 27-47 w wypadku napeł-

niania dwóch pierwszych elementów) poddawano ponownemu 100-przejęciowemu rozdziałowi. Krzywe rozprzestrzenienia substancji suchej i aktywności (rys. 5) wskazują na osiągnięcie w tym procesie już dużego



Rys. 5. II. rozdział przeciwrządowy 100-przejęciowy.

— subst. sucha
 - - - aktywność względem *Shigella shigae*



Rys. 6 III. rozdział przeciwrządowy 100-przejęciowy.

— subst. sucha
 - - - aktywność względem *Shigella shigae*

stopnia oczyszczenia. Jednakże dla uzyskania krzywej odpowiadającej substancji jednorodnej konieczne jest poddanie materiału zawartego w elementach 35-50 po raz trzeci 100-przejęciowemu rozdziałowi. Przebieg krzywych przedstawiony jest na wykresie (rys. 6). Przebieg ich pozwala przyjąć, że według kryteriów rozdziału przeciwrządowego uzyskana substancja jest jednorodna.

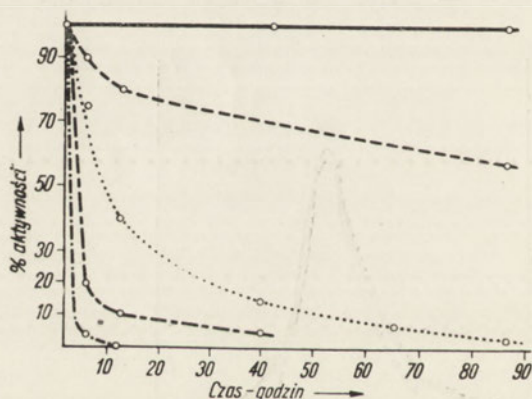
Do dalszych badań własności otrzymanego preparatu wzięto zawartość elementów Nr 32-46. Ilość uzyskiwanego w ten sposób materiału wynosi ok. 2 mg z litra hodowli. W toku całej pracy otrzymano 90 mg antybiotyku. Substancja w stężeniu ok. 0,006 mg/ml daje w metodzie cylinderkowej strefę zahamowania o średnicy 23 mm.

WŁASNOŚCI PREPARATU CEREINY B₂

Otrzymany preparat cereiny B₂ jest substancją bezpostaciową zupełnie bezbarwną. Dobrze rozpuszcza się w wodzie, fenolu nasyconym wodą, metanolu (zwykłym i absolutnym), lodowatym kwasie octowym. Nie rozpuszcza się w organicznych rozpuszczalnikach tłuszczowych. Rozpuszczalność antybiotyku określano metodą chromatografii bibułowej obserwując przesuwanie się plamy w badanym rozpuszczalniku.

Preparat daje pozytywną reakcję ninhydrynową i izatynową. Antybiotyk można osuszać przez liofilizację lub odparowanie w próżni w temperaturze pokojowej. Nie następuje przy tym wcale utrata aktywności.

Roztwór antybiotyku pozostawiany w lodówce traci po miesiącu część aktywności (ok. 30%). Antybiotyk liofilizowany przechowywany



Rys. 7. Wpływ kwasów i zasad na trwałość cereiny B₂.

— kontrola - - - 0,1n H₂SO₄ . . . 0,1n H₂SO₄
 - - - 0,1n NaOH - - - 0,01n NaOH

w lodówce traci po dwóch miesiącach ok. 50% aktywności, po czterech zaś pozostaje już tylko ok. 25% aktywności początkowej.

Roztwory wodne cereiny B₂ nie tracą zupełnie aktywności ogrzewane w ciągu 2 godz. w łaźni wodnej w 100°.

Cereina B₂ łatwo dializuje przez błony kolodionowe.

Jonoforeza bibułowa antybiotyku daje przy pH = 4,5 przesunięcie plamy do katody, przy 8,5 zaś do anody. Przemawia to za prawdopodobną obecnością w cząsteczce antybiotyku grup kwasowej i zasadowej.

Rozcieńczone kwasy i zasady wywierają działanie destrukcyjne na cereinę B₂. Jest ona szczególnie nietrwała w roztworach alkalicznych. Aktywność roztworu antybiotyku w 0,1 N ługu sodowym spada w 34° po 12 godz. prawie do zera. Kwasy wywierają mniej destrukcyjny wpływ (rys. 7).

Trypsyna chem. cz. w stężeniu 2,5 mg/ml nie powoduje inaktywacji cereiny B₂ inkubowanej w 34° w ciągu 24 godz. przy pH = 8,0. Użyty preparat trypsyny trawiał w tych warunkach kazeinę.

Chromatografia bibułowa hydrolizatu kwaśnego otrzymanego preparatu wykazuje obecność kilku, prawdopodobnie pięciu aminokwasów.

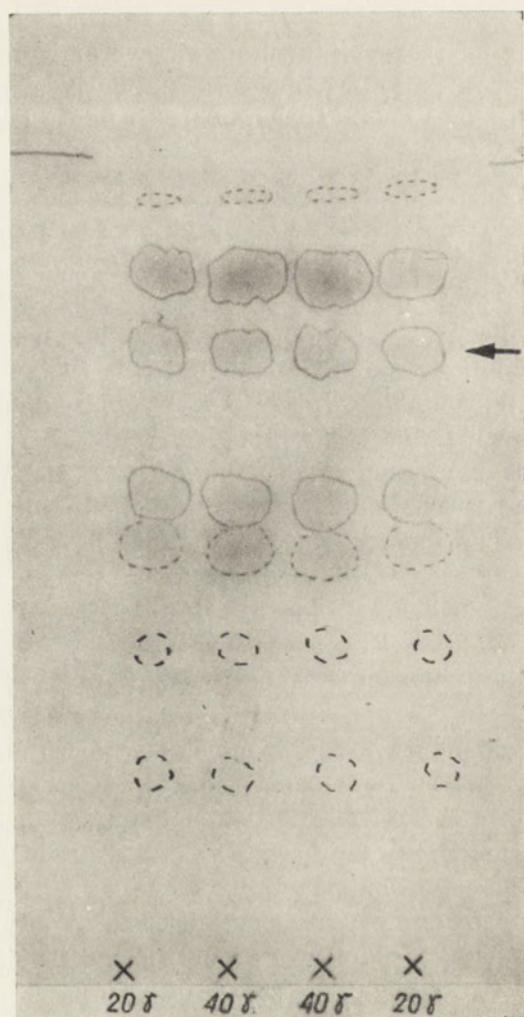
Widmo antybiotycznego działania cereiny B₂ obejmuje przede wszystkim rodzaje: *Shigella*, *Proteus*, *Escherichia*, *Salmonella* i *Serratia*. Do najwrażliwszych należą *Sh. shigae*, *Proteus OX-19* i *HX-19*. Jedna jednostka, dająca ze szczepem *Sh. shigae* PZH-16 strefę o średnicy 23 mm odpowiada 0,006 mg substancji. Badanie metodą rozcieńczeń seryjnych, mające na celu oznaczenie najmniejszego stężenia hamującego, nie dało dodatnich wyników. Szczepy *Sh. shigae* i *Proteus OX-19* rosły w obecności 10 jedn. cereiny B₂ w 1 ml., tj. stężeniu, które w metodzie cylinderkowej daje strefę 33,0 mm średnicy. Wzrost bakterii nie jest w tym wypadku związany z inaktywacją antybiotyku, gdyż w podłożu hodowlanym po 24 godz. inkubacji i pełnym wzroście pałeczek czerwonej wzgl. odmienca stwierdzono 70% pierwotnej ilości cereiny. Również zjawisko wzrostu nie łączy się z opornością badanego szczepu. Drobnoustroje wyizolowane ze wspomnianych hodowli były równie wrażliwe w metodzie cylinderkowej, jak szczepy macierzyste. Zagadnienie to wymaga osobnego opracowania.

Do badań zastosowano również metodę „skośnych płytek” (13). Stężenie hamujące dla *Sh. shigae* wynosi od 0,2 do 0,6 jednostki na ml., *Proteus OX-19* — 0,6 jedn./ml, *HX-19* — 0,45 jedn./ml.

W badaniach toksyczności stosowano test Weigla na wszach (9). Roztwór w stężeniu 5 mg/ml wstrzyknięty doodbytniczo daje wskaźnik 12,4. Odpowiada to *dosis letalis* 50%. Streptomycyna dla wszy jest toksyczna w stężeniu 10 mg/ml, sól sodowa sulfatiazolu 1 — 5 mg/ml. Antybiotyk jest więc dwa razy bardziej toksyczny od streptomycyny, natomiast toksyczność jego jest równa toksyczności soli sodowej sulfatiazolu lub nawet niższa.

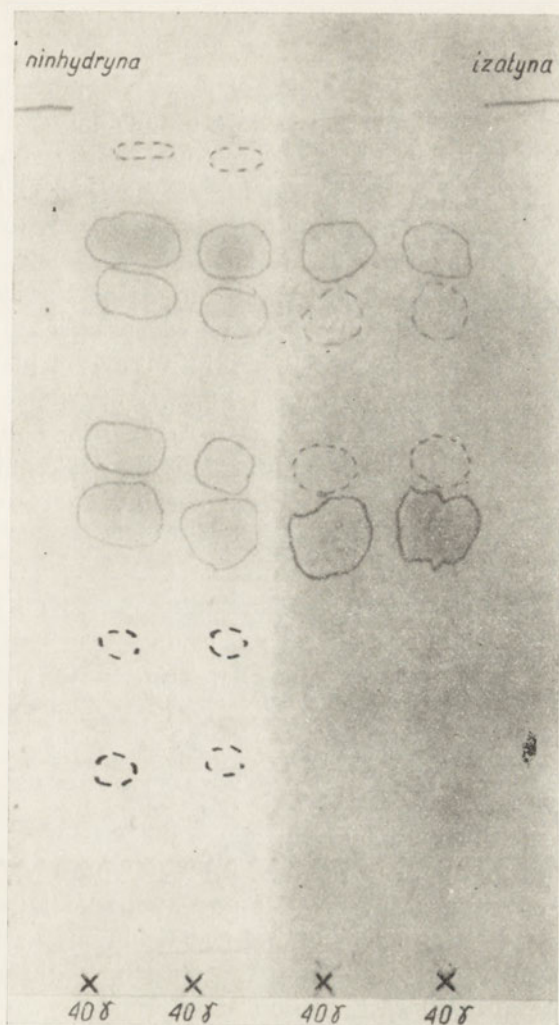
CHROMATOGRAFIA BIBUŁOWA CEREINY B₂

W celu ostatecznego zbadania stopnia czystości otrzymanego antybiotyku zastosowano chromatografię bibułową. Wyniki wykazały niejednorodność materiału.



Rys. 8. Chromatografia bibułowa jednokierunkowa wstępująca preparatu cereiny B₂ Układ III-rzędowy butanol-kwas mrówkowy-stos. wody 695:10:295. Długość drogi frontu 16 cm. Bibuła Whatmana Nr. 1. Barwienie ninhydryną. Plama aktywna oznaczona strzałką

Do badań zastosowano bibułę Whatmana Nr 1. Chromatogramy barwiono ninhydryną oraz izatyną. Przebadano szereg układów rozpuszczalników. Najlepsze wyniki uzyskano przy użyciu mieszanek zawierających w swoim składzie butanol. Najlepszy okazał się układ (11):



Rys. 9. Porównawcze barwienie chromatogramu preparatu cereiny B₂ ninhydryną i izatyną. Sposób wykonania chromatogramu jak przy rys. 8

III-rzędowy butanol-kwas mrówkowy-woda w stosunku objętościowym 695:10:295. W tych warunkach preparat wykazywał, na chromatogramie jednokierunkowym wstępującym barwionym ninhydryną, siedem plam (rys. 8). Barwienie izatyną (12) wykazywało tylko cztery plamy główne, przy czym natężenie ich barwy było mniejsze niż przy ninhydrynie (wyjątek plama niższa). Plam słabszych, widocznych przy barwieniu ninhydrynowym, izatyna nie wykrywa (rys. 9). Podobnie barwie-

nie bromo i nitroizatyną (10) nie dawało rezultatów lepszych niż ninhydryna.

Ciekawe jest, że układ fenol-woda daje w chromatografii bibułowej tylko jedną plamę. Wskazuje to na to, że układ fenol-woda w rozdziale przeciwprądowym doprowadza do określonej mieszanki szeregu substancji, które w tych warunkach zachowują się jak ciało jednorodne. Wyniki te pozwalają także przewidzieć, że całkowite oczyszczenie materiału może być przeprowadzone metodą rozdziału przeciwprądowego, o ile użyje się w miejsce układu fenol-woda układ butanolowo-wodny i zastosuje odpowiednio większą ilość przejść.

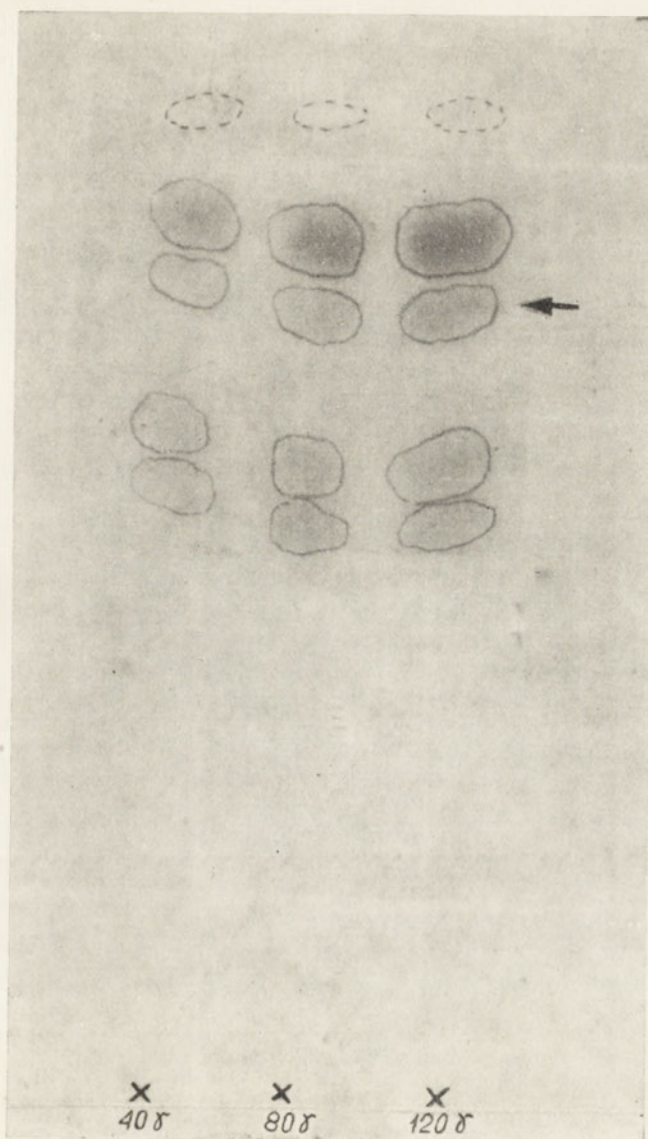
Otrzymane w chromatogramie jednokierunkowym plamy mają wartości R_f : 0,96, 0,86, 0,75, 0,57, 0,52, 0,37, 0,23. Aktywność jest związana wyłącznie z trzecią plamą, tzn. z plamą o $R_f = 0,75$. Żadne inne plamy ani też niezabarwione pola chromatogramu nie wykazują aktywności. Dowodzi to tego, że otrzymany preparat cereiny B_2 zawiera tylko jedno ciało aktywne.

Wartość R_f dla cereiny B_2 jest cechą charakterystyczną. Metoda chromatografii bibułowej przy zastosowaniu opracowanych warunków może więc służyć jako cenne narzędzie do dalszych badań nad cereiną. Najmniejsza ilość preparatu cereiny B_2 , która daje jeszcze widoczną plamę aktywną, wynosi 0,004 mg.

CHROMATOGRAFIA BIBUŁOWA PREPARATYWNA CEREINY B_2

Nie dysponując odpowiednią ilością preparatu oraz nie posiadając dostatecznie dużego aparatu rozdziału przeciwprądowego umożliwiającego dokonanie kilkuset przejść koniecznych dla zupełnego oczyszczenia substancji w układzie butanolowo-wodnym, ostatecznego wyodrębnienia czystej cereiny B_2 dokonano na drodze chromatograficznej. Przeprowadzono chromatografię bibułową preparatywną, stosując bibułę Whatmana Nr 3.

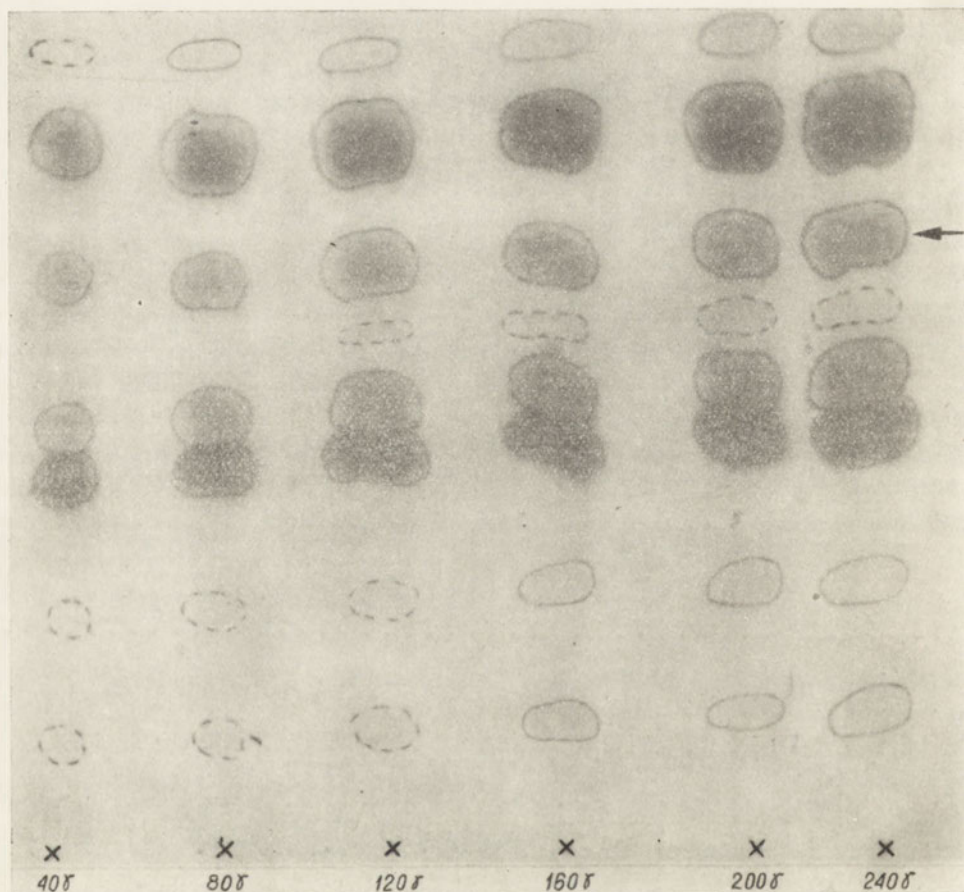
Upřednio podany układ rozpuszczalników jest tutaj niezbyt korzystny, gdyż chociaż na Whatmanie 3 układ plam jest podobny do poprzednio otrzymanego, to jednak wartości R_f plamy czynnej i jej górnego sąsiada są zbyt bliskie (rys. 10). Duży wpływ na zmiany R_f , przede wszystkim plamy aktywnej, ma zawartość kwasu mrówkowego. Zwiększenie ilości kwasu powoduje w znacznym stopniu zwiększenie różnicy R_f plamy aktywnej i jej górnej sąsiadki. Jednakże zbyt duża zawartość kwasu, chociaż wpływa korzystnie na zwiększenie różnic R_f , powoduje powstawanie „ogonów”. Układem o optymalnych własnościach dla celów preparatywnych przy użyciu bibuły Whatmana 3 jest: III-butanol-kwas mrówkowy-woda w stos. objętości 75:5:20. Wartość R_f plamy



Rys. 10. Chromatografia bibułowa jednokierunkowa wstępująca preparatu cereiny B₂ na bibule Whatmana Nr 3 w układzie III-butanol/kwas mrówk./woda w stos. 695:10:295. Plama aktywna oznaczona strzałką

aktywnej jest tutaj niższa niż w układzie poprzednim i wynosi 0,7. Różnice R_f z plamami sąsiednimi są dostatecznie duże, dające dobre odzielenie przy niezbyt dużej drodze rozpuszczalnika. Jednokierunkowy wstępujący chromatogram preparatu cereiny B₂ w takim układzie po-

kazany jest na rys. 11. Są na nim wzrastające ilości nanoszonej substancji. Maksymalne dopuszczalne obciążenie bibuły wynosi 0,24 mg na jeden punkt startowy. Przy takiej ilości naniesionego materiału pojawia się

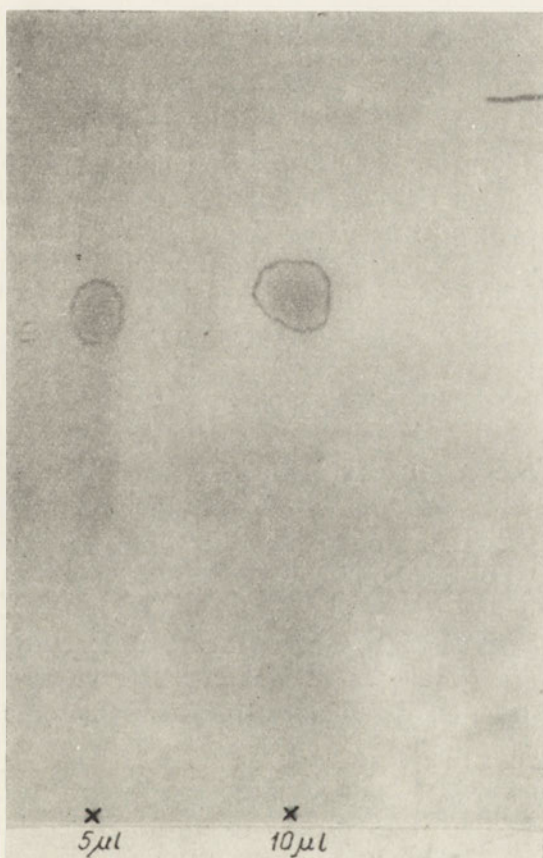


Rys. 11. Chromatografia bibułowa cereiny B₂ w układzie preparatywnym: III-rzędowy butanol-kwas mrówk.-woda w stos. 75:5:20. Papier Whatmana Nr 3. Barwienie ninhydriną. Plama aktywna oznaczona strzałką

słabo widoczna ósma plama tuż poniżej plamy aktywnej. Długość drogi frontu rozpuszczalnika wynosi 21,5 cm.

Chromatografię bibułową preparatywną przeprowadzono w podanych warunkach nanosząc na arkusz w szeregu punktach po 0,24 mg substancji. Położenie plamy aktywnej ustalano przez odcięcie części chromatogramu i zabarwienie go. Następnie wycinano z arkusza paski zawierający plamy aktywne z wszystkich naniesień i eluowano zeń

antybiotyk przez poddanie chromatografii zstępującej, przy użyciu wody jako rozpuszczalnika. Już po zebraniu kilku ml eluatu znajduje się w nim cała zawarta w pasku substancja aktywna. W ten sposób otrzymaliśmy ok. 1 mg czystego antybiotyku. Chromatografia bibułowa takiego materiału w układzie rozpuszczalników, takim jak uprzednio stosowano dla bibuły Whatmana Nr 1, wykazuje obecność tylko jednego składnika (rys. 12).



Rys. 12. Chromatografia bibułowa jednocierunkowa wstępująca czystej cereiny B₂

Aktywność tak otrzymanego materiału jest pięciokrotnie wyższa niż substancji wyjściowej. Preparat użyty do chromatografii dawał w metodzie cylinderkowej strefę zahamowania o średn. 23 mm w stężeniu 0,010 mg/ml. Antybiotyk chromatograficznie czysty daje taką samą strefę już w stężeniu ok. 0,002 mg/ml. Cyfra ta jest przybliżona ze względu na duże trudności przy ważeniu tak małej ilości uzyskanego preparatu.

Otrzymany materiał poddano hydrolizie kwaśnej. Chromatografia bibułowa hydrolizatu wykazuje obecność prawdopodobnie trzech aminokwasów. Badania nad identyfikacją tych aminokwasów są dotychczas nie zakończone.

Na podstawie otrzymanych danych możemy stwierdzić, że cereina B₂ jest niskocząsteczkowym polipeptydem.

Streszczenie

Podano metodę izolowania z kultury szczepu „φ” *B. cereus*, nie opisanego czystego antybiotyku — cereiny B₂. Opisano ważniejsze własności antybiotyku. Fermentację prowadzono metodą powierzchniową na podłożu syntetycznym. Surowy antybiotyk wydobywano przez adsorpcję na węglu aktywnym i następną elucję roztw. alkoholu izoamylowego. Dalsze oczyszczanie przeprowadzono metodą rozdziału przeciwprowadowego, który stosowano w kilku etapach. Pierwszy — rozdział wstępny 20-przejęciowy. Usunięto tu główne zanieczyszczenie. Drugi — rozdział 100-przejęciowy, właściwy. Powtarzano go trzykrotnie wybierając za każdym razem frakcje aktywne. Stwierdzono obecność co najmniej czterech ciał czynnych nazwanych A, B₁, B₂ oraz C. Głównym antybiotykiem jest B₂ (cereina B₂). Osiągnięto tu zupełne oddzielenie cereiny B₂ od pozostałych składników kompleksu antybiotycznego. Uzyskano też daleko posunięte oczyszczenie wymienionego antybiotyku. Otrzymany preparat poddano chromatografii bibułowej. Stwierdzono obecność siedmiu nieaktywnych substancji zanieczyszczających obok jednej substancji czynnej. Wartość R_f antybiotyku w układzie III-butanol-kwas mrówkowy-woda w stosunku 695:10:295 wynosi dla bibuły Whatmana Nr 1 0,75. Opracowano warunki chromatografii preparatywnej na bibule Whatmana Nr 3. Stosując tę technikę otrzymano ok. 1 mg czystego antybiotyku.

Cereina B₂ jest bezbarwnym, bezpostaciowym ciałem, dobrze rozpuszczalnym w wodzie, metanolu, lodowatym kwasie octowym, nierozpuszczalnym w rozpuszczalnikach tłuszczowych. Jest ciepłostała. Dializuje. Daje się osuszać bez utraty aktywności. Nie jest zbyt trwała przy przechowywaniu. Trypsyna jej nie unieczynnia. Kwasy i zasady działają destrukcyjnie. Jest szczególnie wrażliwa na środowisko alkaliczne. Widmo antybiotycznego działania obejmuje rodzaje: *Shigella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Escherichia* i *Serratia*. Szczep *Shigella shigae* PZH-16 w metodzie cylinderkowej daje w stężeniu 0,002 mg/ml strefę zahamowania wzrostu o średnicy 23 mm. Toksyczność cereiny B₂ jest w teście Weigla dwukrotnie wyższa niż streptomycyny.

Hydrolizat cereiny B₂ zawiera aminokwasy. Antybiotyk ten jest niskocząsteczkowym polipeptydem.

LITERATURA

1. Borowski E., *Przemysł Chemiczny* **10**, 503, 1953.
2. Craig L. C., *J. Biol. Chem.* **155**, 519, 1944.
3. Craig L. C., *Fortschritte der chemischen Forschungen* **1**, 312, 1949.
4. Craig L. C., Hausmann W., Ahrens E., Harfenist E., *Anal. Chem.* **23**, 1936, 1951.
5. Craig L. C., Hausmann W., Ahrens E., Harfenist E., *Anal. Chem.* **23**, 1326, 1951.
6. Florey, Chain, Heatley, Jennings, Sanders, Abraham, Florey, *Antibiotics* Oxford Univ. Press. London 1949.

ЭРРАТА

стр.	строка	напечатано	должно быть
495	последняя	B ₂ OT	B ₂ от

Acta Biochimica Polonica Nr. 4 str.—404—405

ИЗОЛЯЦИЯ И СВОЙСТВА ЧИСТОГО ЦЕРЕИНА B₂
АНТИБИОТИКА ШТАММА „Ф”, В. CEREUS

Резюме

Изложен метод изолировки из культуры штамма „Ф” *V. cereus* неопisanного чистого антибиотика — цереина B₂. Описаны главные свойства антибиотика. Брожение проведено было поверхностным методом на синтетической основе. Сырой антибиотик извлекался путем адсорбции на активном угле и последующего промывания раствором изоамилового спирта. Дальнейшая ректификация проводилась методом противоточного распределения, применявшегося в нескольких этапах. В первом, предварительном — 20-переносном — удалена была главная часть засорения. Второй, действительный, 100-переносный повторен был троекратно, причем всякий раз выбирались активные фракции. Обнаружено было не менее 4 активных тел, которые обозначены были А, В₁, В₂ и С. Главным антибиотиком является В₂ (цереин В₂). Достигнуто было полное разделение цереина В₂ОТ

остальных компонентов антибиотического комплекса. Достигнуто было также возможно более тщательное очищение названного антибиотика. Полученный препарат подвергнут был бумажной хроматографии. Обнаружено наличие семи неактивных засоряющих субстанций при одной активной субстанции. R_f антибиотика в системе III бутанол — муравьиная кислота — вода в пропорции 695 : 10 : 295 для Ватманской бумаги № 1 — равняется 0,75. Разработаны были условия препаративной хроматографии на Ватманской бумаге № 3. При применении этой техники получено было около 1 мг чистого антибиотика.

Цереина B_2 — это бесценное, аморфное тело, легко растворимое в воде, в метаноле, в ледяной уксусной кислоте и не растворяющееся в жировых растворителях. Цереин B_2 теплоустойчив, он диализируется.

Цереин B_2 не теряет активности при сушении. Он не сохраняется особенно прочно. Трипсин не лишает его активности. Кислоты и щелочи действуют на него разрушающе. Цереин B_2 особенно реагирует на щелочную среду. Спектр антибиотического действия включает следующие сорта: *Shigella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Escherichia* и *Serratia*.

Штаммы *Shigella shigae* PZH-16 в цилиндрическом методе создают в концентрации 0,002 мг/мл зону задержки роста с диаметром в 23 мм. Токсичность цереина B_2 в опыте Вейгля вдвое сильнее токсичности стрептомицина. Гидролизат цереина B_2 содержит аминокислоты. Этот антибиотик является низкомолекулярным полипептидом.

ISOLATION AND PROPERTIES OF A PURE CERREIN B_2 — AN ANTIBIOTIC SUBSTANCE FROM "φ" STRAIN OF *BACILLUS CEREUS*

S u m m a r y

A method is given of isolating, pure antibiotic substance non described so far, from the culture of φ strain of *Bacillus cereus*. The most important properties of the isolated antibiotic have been described. The fermentation has been carried out by the surface method on synthetic medium. A crude antibiotic has been isolated on the activated charcoal followed by the elution with isoamyl alcohol. The further purification procedure has been based on the counter-current distribution, applied in several steps. In the primary 20-transfer distribution the main impurities have been removed. The actual 100-transfer distribution has been repeated three times with selection of the active fractions each time. The presence of at least, 4 active substances called A, B_1 , B_2 and C have been

proved. The main antibiotic substance involves B₂ (cerein B₂), which has been completely separated from the remaining components of the antibiotic complex, purified to a large extent and examined by paper chromatography. Seven non-active substances impuring the active form have been found. R_f of the antibiotic in butanol-formic acid-water (695:10:295) system amounts to 0,75 for Whatman 1 filter paper. A preparative chromatographic procedure on Whatman 3 has been developed. Using this technique app. 1 mg of a pure antibiotic substance has been obtained.

Cerein B₂ is a colourless, amorphous substance readily soluble in water, methanol, glacial acetic acid, insoluble in fat solvents. It is thermostable, dialisable, can be dried without losing its activity, not very stable on storing. It is not inactivated by trypsin, but it is destroyed by acids and bases, particularly susceptible in the alkaline medium. The antibiotic spectrum involves the following genera: *Shigella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Escherichia* and *Serratia*. *Shigella shiquae* PZH-16 strain in cylinder plate method gives in concentration of 0,002 mg/ml the growth inhibition zone of 23 mm diameter. The toxicity of cerein B₂ examined by the Weigl jest is twice as high as streptomycin. The hydrolisate of B₂ consists of aminoacids. The antibiotic is a low molecular polipeptide.

Otrzymano 23.4.1955.

WŁODZIMIERZ BIELAWSKI

**OZNACZANIE FRAKCJI BIAŁKOWYCH SUROWICY KRWI
METODĄ BIURETOWĄ PO WYSOLENIU SIARCZANEM AMONOWYM
ORAZ ELEKTROFOREZĄ BIBUŁOWĄ**

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

Potrzeba klinicznych analitycznych metod oznaczania białek surowicy krwi i ich frakcji każe zwrócić uwagę na metodę biuretową. Użycie jej w oznaczeniu frakcji białkowych surowicy po wysoleniu siarczanem amonowym może wydatnie zwiększyć zespół łatwych i dokładnych metod chemii klinicznej.

Zadaniem tej pracy było oznaczenie poziomu białka całkowitego i wysoleniowych frakcji białkowych surowicy krwi ludzi zdrowych i chorych metodą biuretową i porównanie tych wyników z wynikami otrzymanymi innymi metodami. Poziom białka całkowitego surowicy krwi oznaczano metodą biuretową (4), metodą Kjeldahla (1,15) i refraktometrycznie (15), natomiast poziom frakcji białkowych, uzyskanych przez wysolenie siarczanem amonowym, porównano z wynikami otrzymanymi na drodze elektroforezy bibułowej. Przeprowadzone doświadczenia stwierdzają celowość stosowania metody biuretowej dla oznaczenia poziomu białka całkowitego oraz frakcji białkowych.

Metody

Badania przeprowadzono na ludziach zdrowych i chorych. Krew pobierano na czczo z żyły łokciowej, unikając zacisku (2). Surowicę, po 2 godz. oddzielano od skrzepu przez dwukrotne wirowanie.

**I. OZNACZENIE BIAŁKA CAŁKOWITEGO I FRAKCJI BIAŁKOWYCH
W SUROWICY KRWI METODĄ BIURETOWĄ****a. Odczynniki**

1. Odczynnik biuretowy według *G o r n a l l a* i współpracowników (4). Odważyć 1,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ i 6,0 g winianu sodowo potasowego

wego ($C_4H_4O_6KNa \cdot 4H_2O$), przenieść do suchej kolby miarowej pojemności 1 l i rozpuścić w około 500 ml wody. Następnie dodać, ciągle mieszając, 300 ml 10% zasady sodowej. Tę ostatnią przygotowujemy z roztworu macierzystego 65 — 70%, wolnego od węglanów. Dopełnić kolbę do 1 l wodą, wymieszać i przelać odczynnik do parafinowanej butelki. Odczynnik ten jest w zasadzie nieograniczenie trwały. Jeżeli jednak w następstwie działania czynników zewnętrznych lub wadliwego sporządzenia odczynnika ukażą się w nim ślady czarnego lub czerwonego strątu musi być ponownie sporządzony.

2. Chlorek sodowy — roztwór 1%.

3. Roztwór siarczanu amonowego nasycony na zimno w temperaturze pokojowej.

4. Roztwór siarczanu amonowego 0,33 nasycony (1 objętość nasyconego siarczanu amonowego + 2 objętości wody).

5. Roztwór siarczanu amonowego 0,50 nasycony (1 objętość nasyconego siarczanu amonowego + 1 objętość wody).

Uwaga: płyny 3, 4, 5, doprowadzamy do pH 7 przez dodanie odpowiedniej ilości zasady amonowej kroplami przy stałej kontroli pH elektrodą szklaną. Płyny te trzeba co pewien czas kontrolować ze względu na możliwość zmiany pH.

b. Oznaczenie poziomu białka całkowitego według Gornalla i współpracowników (4).

Do próbówki odmierzyć 1,0 ml surowicy i dopełnić do 20 ml 1% roztworem chlorku sodowego. Zatkać próbówkę i wymieszać przez odwracanie (unikając wstrząsania!). Odmierzyć 2 ml tego roztworu do próbówki, dodać 8 ml odczynnika biuretowego i zmieszać dokładnie. Odstawić na 30 min. w temperaturze pokojowej. Po upływie tego czasu kolorymetrować w stosunku do próby ślepej (2 ml 1% chlorku sodowego + 8 ml odczynnika biuretowego). Jeżeli używamy fotometru Pulfricha, to oznaczenia dokonujemy przy użyciu filtra S 53 w naczynkach 1 cm; wyniki odczytujemy z krzywej. Jeżeli oznacza się równocześnie i frakcje, to można rozcieńczoną surowicę pozostawić do następnego dnia w temp. 4°C.

c. Oznaczenie poziomu euglobulin według Jagera (9) z tym, że użyto odczynnika biuretowego sporządzonego według Gornalla (4). Do 1 ml surowicy w rurce wirówkowej dodać 0,5 ml nasyconego roztworu siarczanu amonowego, wstrząsając po dodaniu każdego 0,1 ml odczynnika. Osad zazwyczaj znika po wstrząsaniu, aż do chwili dodania 0,3 ml roztworu soli. Probówkę zatkać korkiem i zostawić przez noc w temp. 4°C. Następnie wirować przez 30 min. — 3000 obr./min. Bładożółty, klarowny płyn zlewamy przez odwrócenie rurki wirówkowej dość

szybkim ruchem. Rurkę wirówkową odwróconą ustawiamy na przeciąg kilku minut na bibule. Następnie zbity osad skłócić po dodaniu 3,0 ml 0,33 nasyt. roztworu siarczanu amonowego; wirować ponownie jak wyżej. Klarowny, bezbarwny płyn zlewamy, postępując jak uprzednio. Osad rozpuszczamy w 5 ml 1% roztworu chlorku sodowego przez ostrożne mieszanie lub wprowadzenie bagietki szklanej, unikając tworzenia piany. Odmierzyć 2,0 ml płynu, dodać 8,0 ml odczynnika biuretowego. Dalsze postępowanie takie, jak przy oznaczaniu białka całkowitego.

d. Oznaczenie poziomu globulin. W oparciu o wysolenie globulin siarczanem amonowym i wykonanie próby biuretowej z otrzymanym osadem opracowano następujący sposób postępowania: do 1 ml surowicy dodać kroplami 1,0 ml nasyconego roztworu siarczanu amonowego. Dalsze postępowanie takie jak przy wysalaniu euglobulin z tą różnicą, że po odwirowaniu osadu i zlanii płynu osad skłócić z 3,0 ml 0,5 nasyconego siarczanu amonowego.

Albuminy oznaczano z różnicy według wzoru:

albuminy = białko całkowite - globuliny.

e. Wykreślanie krzywej według G o r n a l l a (4). Odmierzyć 5,0 ml surowicy, uzyskanej z krwi osobnika subiektywnie zdrowego, do kolby miarowej 50 ml i dopełnić do kreski 1% roztworem chlorku sodowego. Do 7 probówek odmierzyć z mikrobiurety kolejno: 0,0; 0,15; 0,30; 0,50; 1,00; 1,50; 1,70 ml rozcieńczonej surowicy i uzupełnić z mikrobiurety roztworem chlorku sodowego do 2,00 ml. Następnie do każdej probówki dodać 8,0 ml odczynnika biuretowego, wymieszać ostrożnie przez odwrócenie; pozostawić przez 30 minut i odczytywać na fotometrze Pulfricha w stosunku do próby ślepej, zaczynając od najmniejszych stężeń.

II. METODA KJELDAHLA (15)

Zamiast mnożnika 6,25 wprowadzono wartość 6,73 według A r m s t r o n g a i współpracowników (1).

III. WSPÓŁCZYNNIK REFRAKcji

Współczynnik refrakcji oznaczano refraktometrem zanurzeniowym Pulfricha w temperaturze 20°C (15).

IV. ELEKTROFOREZA BIBUŁOWA

Rozdziału dokonywano przy pomocy aparatu sporządzonego w naszym Zakładzie na bibule Whatmana Nr 1 o rozmiarach 2 × 40 cm, dając na pasek 0,02 ml surowicy (w postaci 2 kropli umieszczonych

w 2 punktach obok siebie leżących) rozcieńczonej w stosunku 1:3 moderatorem weronalowym. Moderator sporządzono według G r a s s m a n n a i współpracowników (5) o pH 8,6 i mocy jonowej 0,1. Paski umieszczano w komorze wilgotnej i po upływie 30 minut włączano prąd (10). Czas elektroforezy wynosił 16 godzin; przez jeden pasek przepuszczano prąd o napięciu 200 V i natężeniu rzędu 0,5 mA, czyli na 1 cm szerokości 0,25 mA (5, 7, 13). Paski suszono, barwiono czernią amidową 10 B i wmywano według sposobu podanego przez P u ć a r a (13). Po uzyskaniu wybarwionych pasków bibuły, fotografowano je aparatem kliszowym. Po otrzymaniu obrazu na kliszy, odczytywano stopień przepuszczalności światła przez poszczególne frakcje na mikrofotometrze typu MΦ-2. Uzyskane wyniki nanoszono na papier milimetryczny i poszczególne frakcje oznaczano ilościowo planimetrycznie.

Poziom białka całkowitego oznaczano metodą biuretową.

Wyniki doświadczeń

Dla poziomego białka całkowitego oraz frakcji białkowych uzyskanych przez wysolenie siarczanem amonowym, a oznaczonych metodą biuretową, określono średnie odchylenie (dyspersję) na 9 równoległych próbach. Wartości przedstawia tablica 1.

Tablica 1

Białko całkowite	$7,12 \pm 0,12$
Albuminy	$3,99 \pm 0,12$
Globuliny	$3,12 \pm 0,04$
Euglobuliny	$1,77 \pm 0,04$

Średnie odchylenie poziomego białka całkowitego oraz frakcji uzyskanych przez wysolenie siarczanem amonowym — oznaczonych metodą biuretową. Wykonane na 9 próbach tej samej surowicy; wartości wyrażone są wg białka w 100 ml surowicy

Dla określenia normy i wahań dla poszczególnych sposobów postępowania oznaczono średnie wartości oraz średnie odchylenie poziomego białka całkowitego i frakcji białkowych u ludzi zdrowych. Wartości podaje tablica 2.

W zastosowaniu metody biuretowej po wysoleniu siarczanem amonowym należy liczyć się z możliwością wpływu jonu amonowego na barwę odczynu biuretowego. J a g e r i N i c k e r s o n (9) str. 684) podają, że w ich postępowaniu metodycznym jon amonowy nie wywiera istotnego wpływu na nasilenie barwy reakcji biuretowej. Dane te znalazły potwierdzenie w wykonanej przeze mnie kontrolnej serii doświadczeń.

Tablica 2

Srednie wartości oraz średnie odchylenie poziomu białka całkowitego i frakcji białkowych u ludzi zdrowych. Białko całkowite oznaczano metodą Kjeldahla, refraktometrycznie oraz metodą biuretową; frakcje białkowe — metodą biuretową po wysoleniu siarczanem amonowym. Wartości wyrażone w g białka w 100 ml surowicy. W nawiasach podano liczbę badanych osób

Metoda Kjeldahla	Białko całkowite (17)	7,6 ± 0,44
Metoda refraktometryczna	Białko całkowite (19)	7,7 ± 0,44
Metoda biuretowa	Białko całkowite (20)	7,6 ± 0,48
Metoda biuretowa po wysoleniu siarczanem amonowym	Globuliny (20)	2,4 ± 0,26
Metoda biuretowa po wysoleniu siarczanem amonowym	Euglobuliny (20)	1,1 ± 0,16

Powtarzalność wyników i średnie odchylenie dla metody elektroforezy bibułowej przeprowadzono i oznaczono na 10 równoległych próbach tej samej surowicy; uzyskane wyniki przedstawia tablica 3.

Tablica 3

Frakcje	Średnie odchylenie
Albuminy	71,70 ± 2,00
α_1 -Globuliny	2,30 ± 0,40
α_2 -Globuliny	5,50 ± 0,61
β -Globuliny	9,14 ± 0,73
γ -Globuliny	12,20 ± 1,42

Srednie odchylenie dla frakcji białkowych oznaczonych metodą elektroforezy bibułowej. Wykonano na 10 równoległych oznaczeniach tej samej surowicy. Wartości wyrażone w % całości białka oznaczonego metodą biuretową

Poziom poszczególnych frakcji oznaczonych metodą elektroforezy bibułowej w surowicy ludzi zdrowych przedstawia tablica 4.

Porównanie poziomów frakcji białkowych otrzymanych wysoleeniem siarczanem amonowym i oznaczonych metodą biuretową z frakcjami uzyskanymi elektroforezą bibułową surowic ludzi zdrowych przedstawia tablica 5.

Dotychczas przedstawione wyniki dotyczyły surowic ludzi zdrowych. Celem zorientowania się, jak przedstawia się sprawa w przy-

Tablica 4

Fracje białkowe surowicy ludzi zdrowych oznaczone elektroforezą bibułą w dwóch równoległych próbach (I, II). Wartości wyrażone w % całości białka, oznaczonego metodą biuretową

Suro- wice Nr	Białko całkowite w g/100 ml surowicy	Albuminy		α_1 -Glo- buliny		α_2 -Glo- buliny		β -Glo- buliny		γ -Glo- buliny	
		I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
1	7,2	66,3	69,0	3,3	2,7	6,6	6,3	9,6	10,4	14,2	11,6
2	7,3	69,0	71,0	2,4	3,3	6,0	6,2	8,0	7,4	14,2	12,5
3	7,3	69,0	68,0	2,5	2,7	5,5	6,8	8,0	8,1	15,0	15,7
4	7,1	69,2	70,0	2,4	1,8	6,9	7,3	8,4	8,6	13,1	12,2
5	7,6	70,0	70,0	3,0	2,4	4,6	5,2	10,0	9,0	12,6	13,2
6	6,6	70,0	71,0	1,7	1,8	4,2	4,3	8,3	7,1	15,7	15,8
7	7,6	71,0	72,5	2,3	2,0	5,5	4,6	8,1	8,7	13,0	12,2
8	7,8	64,2	65,2	2,6	3,1	5,2	5,8	11,5	10,9	16,2	15,3
średnia		69,0 ±	2,14	2,50 ±	0,51	5,70 ±	0,96	8,90 ±	1,26	13,9 ±	1,54

Tablica 5

Porównanie poziomów frakcji białkowych otrzymanych wysoleniem siarczanem amonowym i oznaczonych metodą biuretową z frakcjami uzyskanymi elektroforezą bibułą surowicy ludzi zdrowych. Wartości wyrażone w g białka w 100 ml surowicy. Białko całkowite oznaczono metodą biuretową

Surowica Nr	Białko całkowite wyr. w g/100 ml surowicy	Albuminy		Globuliny		Euglo- buliny	γ -Glo- buliny
		biureto- wa po wy- soleniu	elektro- foreza	biureto- wa po wy- soleniu	elektro- foreza	biureto- wa po wy- soleniu	elektro- foreza
1	6,6	4,20	4,70	2,40	1,90	1,20	1,05
2	7,6	5,00	5,40	2,60	2,20	1,20	1,00
3	7,3	5,00	5,10	2,30	2,20	0,80	0,98
4	7,2	4,80	4,80	2,40	2,40	0,90	0,98
5	7,8	5,10	5,00	2,70	2,80	1,10	1,20
6	7,6	5,20	5,30	2,40	2,30	1,00	0,95
7	7,1	5,00	5,00	2,10	2,10	0,80	0,95
8	7,3	4,90	5,00	2,40	2,30	1,00	1,10

padkach chorobowych, przeprowadzono badanie porównawcze na surowicach patologicznych. Wyniki przedstawia tablica 6.

Tablica 6

Porównanie poziomu frakcji białkowych otrzymanych wysoleniem siarczanem amonowym i oznaczonych metodą biuretową z frakcjami uzyskanymi elektroforezą białową w surowicach ludzi chorych. Wartości wyrażone w g białka w 100 ml surowicy. Białko całkowite oznaczone metodą biuretową

Surowica Nr	Nazwa jednostki chorobowej	Białko całkowite wyr. w g/100 ml surowicy	Albuminy		Globuliny		Euglobuliny	γ -Globuliny
			biuretowa po wysoleniu	elektroforeza	biuretowa po wysoleniu	elektroforeza	biuretowa po wysoleniu	elektroforeza
1	Vitium cordis Insuff. circulatoria	7,9	3,00	2,90	4,90	5,00	3,10	3,15
2	Endocarditis lenta	7,6	5,30	4,90	2,30	2,70	0,90	0,90
3	Nephroso-nephritis	3,9	1,40	0,50	2,50	3,40	0,70	0,90
4	Schizophrenia**)	7,6	5,60	5,20	2,00	2,40	0,62	0,62
5	Schizophrenia**)	7,4	4,70	4,90	2,70	2,50	1,00	0,80
6	Vitium cordis Insuff. circulatoria	8,6	5,20	4,80	3,40	3,80	2,10	2,30
7	Cirrhosis hepatis	7,8	4,20	4,40	3,60	3,40	2,75	2,50
8	Morbus rheumaticus	9,3	5,90	4,90	3,40	4,40	1,85	1,80
9	Morbus rheumaticus	7,2	4,00	3,40	3,20	3 80	1,60	1,65
10	Status post surrenalectom.	7,4	3,90	3,90	3,50	3,50	1,00	1,40

**) W czasie leczenia largaktylem.

Dyskusja

Znaczenie metody biuretowej dla klinicznego zastosowania jest dziś niemal ogólnie uznane; dzięki swojej prostocie, małej ilości możliwych błędów i prędkości wykonania może być ona uważana za wzór metody klinicznej. Wyrazem tego jest fakt, że znalazła się ona w zbiorze metod standardowych amerykańskiego stowarzyszenia klinicznych chemików (14). Dla oznaczania frakcji białkowych znajdujemy w tym zbiorze wysolenie siarczanem sodowym. Jednak praca J a g e r a i N i c k e r s o n (9) podaje zachęcające wyniki oznaczania frakcji

euglobulinowej, odpowiadającej gamma globulinom elektroforetycznym, przez wysolenie siarczanem amonowym. W obecnej pracy zastosowano wysolenie siarczanem amonowym również i dla całości globulin. Uzyskane wyniki porównano z wynikami elektroforezy bibułowej.

Dla elektroforezy bibułowej jest rzeczą konieczną ściśle określenie warunków postępowania oraz ustalenie wartości normalnych, właściwych dla danej pracowni (11). O potrzebie tego świadczy zestawienie podane w tablicy 7. Tablica ta zawiera podstawowe dla tych badań dane Grassmanna (5) oraz wyniki innych autorów. Jedynie nieliczni z nich podają wartości średnie; większość ogranicza się do podania jednego przykładu elektroforogramu.

Tablica 7

Zestawienie wyników uzyskanych elektroforezą bibułową przez różnych autorów dla frakcji białkowych surowicy ludzi zdrowych

Autor	Liczba przypadków	Mocerator wero-nalowy o pH	Moc jonowa modera-tora	Użyty barwik	Poziom wyrażony w % białka całkowitego			
					Albu-miny	$\alpha_1 + \alpha_2$ Globu-liny	β -Glo-buliny	γ -Glo-buliny
Grassmann (5)	25	8,6	0,10	Czerń amidowa 10 B	61,3	12,2	11,0	15,6
Harald (6)	20	8,6	0,05	„	66,5	12,2	8,5	12,8
Holt (8)	?	8,5	0,045	„	62,5	12,3	8,9	14,5
Pučar (13)	1	8,6	0,048	„	65,4	13,4	8,5	12,8
Ostrowski (12)	1	8,6	0,05	„	52,6	12,6	16,8	18,1
Kemula (10)	1	8,6	0,05	„	54,2	13,1	9,7	23,0
Wyniki własne	8	8,6	0,10	„	69,0	8,2	8,9	13,9

Różnice te, wydaje się, pochodzą stąd, iż zmienienie chociażby jednej czynności czy też odczynnika w tej metodzie powoduje bardzo duże różnice w otrzymanych wynikach.

Porównanie metody biuretovej w połączeniu z wysoleniem oraz metody elektroforetycznej daje różne wyniki dla poszczególnych frakcji. A mianowicie stwierdza się zarówno u ludzi zdrowych, jak i u badanych ludzi chorych dużą zgodność między frakcją euglobulinową uzyskaną przez wysolenie siarczanem amonowym a gamma-globulinami elektroforetycznymi. Wyniki Jagera i Nickerson (9) znalazły więc w pełni potwierdzenie w naszej pracy.

Dla całkowitych globulin istnieje też pewna równoległość u ludzi zdrowych i w wielu przypadkach chorobowych. Jednak brak równoległości w surowicy Nr 3 tablicy 6 jest wystarczającym dowodem rozbieżności pojęć opartych na wysoleniu w porównaniu z pojęciami elektroforetycznymi. Zdanie sobie sprawy ze złożoności frakcji alfa i beta-globulinowej w odróżnieniu od albumin i gamma-globulin czyni zrozumiałym, że zmiany patologiczne mogą dotyczyć poszczególnych składowych części tych złożonych frakcji w rozmaity sposób; ta różnorodność może dać odmienny obraz elektroforetyczny od obrazu uzyskanego wysoleniem.

Dla ścisłego wyrażenia podobieństwa posłużyłem się wyliczeniem prawdopodobieństwa braku istotnej różnicy; w obliczeniu posłużyłem się statystycznymi tablicami F i s h e r a i Y a t e s a (3). Prawdopodobieństwo braku istotnej różnicy w przypadku surowic ludzi zdrowych wynosi dla globulin całkowitych $0,3 > P > 0,2$. Porównanie różnic pomiędzy wynikami uzyskanymi przez wysolenie i elektroforezę bibułową w surowicy ludzi chorych z takimiż różnicami u ludzi zdrowych wykazuje, że euglobuliny odpowiadają z dużą dokładnością gamma-globulinom: $0,8 > P > 0,7$. Natomiast takie samo porównanie w przypadku globulin całkowitych wykazuje, że zachodzą tu różnice: $0,1 > P > 0,05$. Niezgodność w przypadku globulin całkowitych tłumaczymy tym, że białka ludzi chorych różnią się jakościowo od białek normalnych.

Mimo braku zgodności globulinowych frakcji wysoleniowych i elektroforetycznych stosowanie frakcjonowania wysolenionego może dać lekarzowi cenne wyniki. Przecież idzie tu głównie o stwierdzenie odchylenia od stanu normalnego. Zaledwie nieliczne schorzenia dają obraz elektroforetyczny swoisty dla danej choroby. Zarówno frakcjonowanie wysoleniowe, jak i elektroforetyczne ma jako główne zadanie stwierdzenie stanu utrzymania normy lub też istotnego od tej normy odchylenia. Oczywiście jest rzeczą, iż metoda wysoleniowa nie spełnia tych wszystkich warunków, jakie spełnia metoda elektroforezy bibułowej. Nie daje ona bowiem odpowiedzi na to, jak zachowują się pozostałe frakcje białkowe surowicy krwi, co bardzo często może być pomocne dla lekarza. Biorąc jednak pod uwagę to, że oznaczenie białka całkowitego i frakcji białkowych metodą biuretową dla celów praktycznych w większości przypadków jest w zupełności wystarczające, wybór metody wydaje się być celowy. Momentem korzystnym dla tej metody jest jeszcze to, iż wymaga ona w porównaniu z metodą elektroforezy bibułowej odczynników łatwo dostępnych i łatwej w obsłudze aparatury.

Streszczenie

Poziom białka całkowitego oznaczano metodą biuretową, metodą Kjeldahla i refraktometrycznie; poziom frakcji białkowych, uzyskanych przez wysolenie siarczanem amonowym, a oznaczonych metodą biuretową, porównano z wynikami otrzymanymi na drodze elektroforezy bibułowej.

Stwierdzono, że:

1. Euglobuliny odpowiadają gamma-globulinom w przypadkach surowic ludzi zdrowych i chorych.
2. Statystycznie zaznaczają się różnice w globulinach otrzymanych przez wysolenie siarczanem amonowym i elektroforezę bibułową. Metoda wysoleniowa pozwala jednak na uzyskanie danych, mających praktyczne znaczenie dla lekarza.

LITERATURA

1. Armstrong S. H., Budka E., Morrison K. C., Hassan M., *J. Am. Chem. Soc.* **69**, 1747, 1947.
2. Byczkowski St., *Doniesienie na posiedzeniu IV Wydz. P. A. U. w dniu 15.V.1951.*
3. Fisher R. A., Yates F., *Statistical Tables*, Oliver and Boyd, London 1948.
4. Gornall A. G., Bardawill C. J., David M. M., *J. Biol. Chem.* **177**, 751, 1949.
5. Grassmann W., Hannig K., *Z. physiol. Chem.* **290**, 1, 1952.
6. Harald O., Conn M. D., Klatskin G., *Am. J. Med.* **16**, 822, 1954.
7. Hardwicke J., *Biochem. J.* **57**, 166, 1954.
8. Holt C., Voigt K. D., Gaede K., *Biochem. Z.* **323**, 345, 1952.
9. Jager B. V., Margaret Nickerson, *J. Biol. Chem.* **173**, 683, 1948.
10. Kemula W., Bartosiewicz W., *Roczn. Chemii*, **28**, 100, 1954.
11. Mozolowski W., *Postępy Biochemii*, **2**, 8, 1954.
12. Ostrowski W., Mikucki A., *Acta Physiol. Pol.* **3**, 277, 1952.
13. Pučar Z., *Z. physiol. Chem.* **296**, 62, 1954.
14. *Standard methods of Clinical Chemistry* by the Amer. Assoc. Clin. Chem. Vol. I, Editor M. Reiner, strona 88. Academic Press, New York 1953.
15. Zydowo M., *Pol. Tyg. Lek.* **7**, 697, 1952.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ
ПУТЕМ БЮРЕТНОГО АНАЛИЗА ПО ВЫСАЛИВАНИИ
СЕРНОКИСЛЫМ АММИАКОМ И ПУТЕМ ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА
С ПРИМЕНЕНИЕМ ФИЛЬТРАЦИОННОЙ БУМАГИ

Резюме

Количество общего белка определено было путем бюретного метода, методом Кельдаля и при помощи рефрактометра; количество белковых фракций, полученных путем высаливания серноокислым аммиаком и путем бюретного метода, сравнено было с результатами, полученными посредством электрофореза с применением фильтрационной бумаги.

Обнаружено, что:

1) Эвглобулины соответствуют гамма-глобулинам в сыворотке крови как у здоровых, так и у больных людей.

2) Намечаются статистические различия в глобулинах, полученных путем высаливания серноокислым аммиаком и путем электрофореза с применением фильтрационной бумаги. Метод высаливания допускает однако-же получение данных, имеющих для врача практическое значение.

DETERMINATIONS OF THE PROTEIN FRACTIONS OF THE BLOOD SERA BY THE BIURET METHOD, FRACTIONS BEING SALTED OUT WITH AMMONIUM SULPHATE, AND BY THE PAPER ELECTROPHORESIS

Summary

The total protein level has been determined by the biuret, Kjeldahl and refractometric methods. Results obtained with the protein fractions salted out with ammonium sulphate and determined by the biuret method have been compared with paper electrophoresis. The following facts have been proved:

1. Euglobulins correspond to gamma globulins in the sera of healthy and sick subjects.

2. Statistically important differences have been obtained between ammonium sulphate salting and paper electrophoresis. By the „salting out“ method, however, it is possible to get data of practical importance for a physician.

Otrzymano 2.5.1955

L. M. DZIAŁOSZYŃSKI

SIARCZAN 4-NITROKATECHOLU JAKO SUBSTRAT DO OZNACZANIA SULFATAZY ARYLOWEJ

Katedra Fizjologii Zwierząt W. S. R. w Poznaniu

Kierownik Katedry: Lech Działoszyński

D e r r i e n (2), który po raz pierwszy wykazał obecność sulfatazy aryłowej (nazwanej przez niego purpurazą) w wyciągu ze ślimaka — *Murex trunculus*, uczynił to działając wspomnianym wyciągiem na indykan moczu. Pod wpływem sulfatazy z indykanu uwalniał się indoksył, który utleniając się przechodził w indygo. Barwa powstającego indyga świadczyła o obecności sulfatazy. Była to pierwsza metoda jakościowa. N e u b e r g i K u r o n o (5) określali aktywność sulfatazy aryłowej w sposób ilościowy przez grawimetryczne oznaczenie siarczanu wyzwolonego w trakcie enzymatycznej hydrolizy soli potasowej kwasu fenylosiarkowego. Od tego czasu pojawiły się liczne metody ilościowego oznaczania aktywności sulfatazy aryłowej, które głównie polegają na kolorymetrycznym lub spektrofotometrycznym oznaczeniu substancji fenolowej wyzwolonej przez sulfatazę z odpowiednio dobrego substratu. D o d g s o n i S p e n c e r (3) omawiają krytycznie większość tych metod.

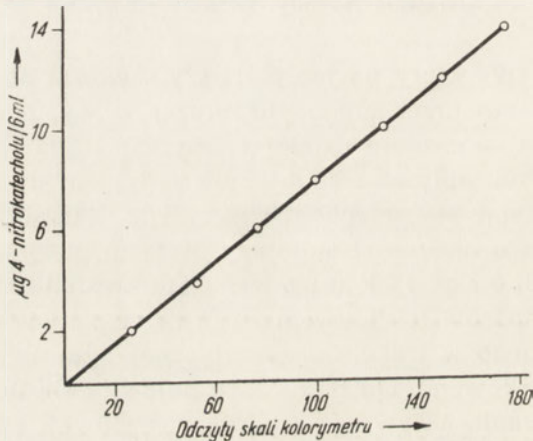
Metoda 4-nitrokatecholowa, w której substratem jest sól potasowa lub dwupotasowa kwasu 2-hydrokso-5-nitrofenylosiarkowego (siarczan nitrokatecholu — SNK), została wprowadzona przez R o b i n s o n a , S m i t h a i W i l l i a m s a (7) w r. 1951. Kolorymetryczne oznaczenie 4-nitrokatecholu wyzwolonego przez sulfatazę aryłową z SNK pozwala na określanie aktywności sulfatazy aryłowej.

Pomimo wypowiedzi R o y a (8) o nieprzydatności tej metody do oznaczania sulfatazy aryłowej w nieoczyszczanych homogenizatach tkanek zwierzęcych, zwłaszcza wątroby, D o d g s o n i S p e n c e r (3) wykazali, że metoda ta może być stosowana do oznaczania sulfatazy aryłowej w tkankach szczura z wyjątkiem wątroby.

Autor obecnej pracy wykazuje, że metoda 4-nitrokatecholowa może być używana, z zachowaniem pewnych warunków, do oznaczania aktywności sulfatazy arylowej w nieoczyszczanych homogenizatach wątroby i innych tkanek myszy.

Metody

W celu oznaczenia aktywności sulfatazy arylowej homogenizowano 0,1 g świeżej tkanki z dodatkiem 0,5 ml buforu octanowego (0,2 M) pH 5,5 przez 5 minut w homogenizatorze szklanym typu tłokowego (6). Homogenizat rozcieńczano do 12,5 ml buforem octanowym, a następnie



Rys. 1. Krzywa kalibracyjna dla 4-nitrokatecholu

dodawano 12,5 ml roztworu (0,001 M) soli dwupotasowej kwasu 2-hydroksy-5-nitrofenylosiarkowego, otrzymanej według postępowania opisanego przez R o y a (8). Tak przygotowaną mieszaninę umieszczano w termostacie (37°C) na 24 godziny, po czym odwirowywano resztki komórkowe, a w klarownym płynie oznaczano ilość wyzwolonego 4-nitrokatecholu w następujący sposób: do 1 ml pobranego płynu dodawano 4 ml wody destylowanej i 1 ml 20% (wag./obj.) NaOH. Roztwór przybierał zabarwienie czerwone o mniejszej lub większej intensywności zależnie od ilości (stężenia) obecnego w nim 4-nitrokatecholu. Po upływie 5 minut od chwili dodania NaOH dokonywano pomiaru natężenia barwy kolorymetrycznie. Stężenie nitrokatecholu określano z krzywej kalibracyjnej przygotowanej dla używanego w tej pracy kolorymetru fotoelektrycznego produkcji francuskiej (Electro-

photometre, P. Meunier). Dla sporządzenia krzywej kalibracyjnej przygotowano kilka roztworów 4-nitrokatecholu, otrzymanego wg metody Bakera (1), o następujących stężeniach: 2, 4, 6, 8, 10, 12 i 14 $\mu\text{g/ml}$. Do 1 ml każdego z tych roztworów dodawano 4 ml wody i 1 ml NaOH (20%). Intensywność otrzymanych zabarwień określano kolorymetrycznie 5 minut po dodaniu NaOH. Rys. 1 przedstawia otrzymaną krzywą.

Używany roztwór substratu zawierał 202 μg siarczanu nitrokatecholu w 1 ml. Po całkowitej hydrolizie roztwór taki zawierałby 100 μg 4-nitrokatecholu w 1 ml. Ponieważ substrat dodawany był zawsze w nadmiarze, nigdy nie dochodziło do całkowitej jego hydrolizy. W takich warunkach ilość wyzwalanego nitrokatecholu była miernikiem aktywności enzymu.

Aktywność sulfatazy aryłowej określano w jednostkach dowolnych, przyjmując jako jednostkę tę ilość enzymu, która wyzwala z nadmiaru substratu 1 μg 4-nitrokatecholu w ciągu 24 godzin, w temp. 37°, przy pH 5,5 w buforze octanowym.

Ilości jednostek sulfatazy aryłowej wyrażaliśmy w odniesieniu do 1 mg mokrej tkanki dzieląc wartość odczytaną z krzywej przez 4, gdyż brany do pomiaru 1 ml mieszaniny reagującej odpowiadał 4 mg tkanki.

Dla zbadania wpływu homogenizatów tkankowych na 4-nitrokatechol dodawano określoną ilość tej substancji do znanej ilości tkanki w homogenizacie i natychmiast oznaczano ilość nitrokatecholu w klarownym płynie po odwirowaniu resztek komórkowych. Do wykonania pomiaru brano 1 ml płynu, dodawano 4 ml wody i 1 ml NaOH (20%), a następnie dokonywano pomiaru kolorymetrycznego. Resztę mieszaniny umieszczano w termostacie na 24 godz. Po upływie tego czasu oznaczano ponownie stężenie 4-nitrokatecholu.

W literaturze są wzmianki o zanikaniu czerwonego zabarwienia anionu 4-nitrokatecholu w roztworach (alkalicznych) homogenizatów tkankowych wołu (8) i szczura (3). Dla zbadania zachowania się czerwonej barwy nitrokatecholu wobec homogenizatów tkanek myszy, z których usunięto resztki tkankowe przez odwirowanie, badano intensywność barwy przez pewien czas od momentu dodania NaOH.

Wyniki

Otrzymane wyniki zestawiono w tablicy 1 i 2 (patrz strona 424 i 425).

(U w a g a: dane o aktywności sulfatazy aryłowej w tkankach myszy znajdują się w pracy — Działoszyński i Zawielak, str. 429).

Tablica 1

Ubytki 4-nitrokatecholu dodanego do homogenizatów tkankowych myszy, szczura i krowy

Zwierzę	Tkanka	μg 4-nitro- katecholu na 1 mg tkanki w miesza- ninie	Stężenie 4-nitrokatecholu $\mu\text{g/ml}$ mieszan.		Ubytek 4-nitro- katecholu (%)
			Przed inkubacją	Po inkubacji 24 godz.	
Mysz	Wątroba	5,0	10,5	10,6	0,0
"	"	2,5	10,5	10,5	0,0
"	"	1,25	10,5	6,9	36,0
"	"	0,5	10,5	3,9	63,0
"	Nerka	2,5	10,5	10,5	0,0
"	Serce	2,5	10,5	10,4	0,0
"	Śledziona	2,5	10,6	10,5	0,0
"	Mózg	2,5	10,5	10,5	0,0
"	Mięsień	2,5	10,5	10,5	0,0
"	Tkanka łącz- napodskórna	2,5	10,5	10,5	0,0
"	Mięsak				
"	Crockera	2,5	10,5	10,4	0,0
Szczur	Wątroba	2,5	9,5	9,5	0,0
"	"	1,25	9,5	8,3	13,0
"	"	0,5	9,5	3,3	62,0
Krowa	"	2,5	10,5	9,0	15,0
"	"	1,25	10,5	7,3	32,0
"	"	0,5	10,5	4,1	63,0

Dyskusja

Dodgson i Spencer (3) wykazali na tkankach szczura, że siarczan nitrokatecholu może być stosowany jako substrat do oznaczania aktywności sulfatazy arylowej w nieoczyszczanych homogenizatach tych tkanek z wyjątkiem wątroby. W tym ostatnim bowiem przypadku 4-nitrokatechol dodany do homogenizatów zanika częściowo prawdopodobnie na skutek redukcji do odpowiedniego aminofenolu (3). W warunkach stosowanych przez wspomnianych autorów ubytek dodanego nitrokatecholu wynosił około 10% po godzinie inkubacji.

Autor niniejszej pracy potwierdził wyniki Dodgsona i Spencera w odniesieniu do wątroby szczura, lecz stwierdził dodatkowo, że % ubytku 4-nitrokatecholu dodanego do homogenizatów wątroby

Tablica 2

Trwałość czerwonego zabarwienia 4-nitrokatecholu w alkalicznym roztworze buforu oraz w alkalicznych roztworach inkubowanych homogenizatów tkankowych pozbawionych resztek komórkowych przez wirowanie

Tkanka	μg 4-nitro- katecholu na mg tkanki	Intensywność zabarwienia jako μg 4-nitrokatecholu w 1 ml mieszaniny po upływie odpowiedniego czasu od dodania NaOH						
		Minuty			Godziny			
		0	15	30	1	1,5	2	24
Bez tkanki	—	10(0)	10(0)	10(0)	10(0)	10(0)	10(0)	8,3(17)
Mysz								
Wątroba	5,0	10(0)	10(0)	10(0)	10(0)	9,8(?)	9,8(2)	4,5(55)
„	2,5	10(0)	10(0)	10(0)	9,9(1)	—	—	2,6(74)
„	1,25	8,3(0)	7,9(4)	7,5(10)	6,2(24)	—	—	1,0(88)
„	0,5	4,5(0)	4,0(11)	4,0(11)	3,7(15)	—	—	1,7(62)
Nerka	2,5	10(0)	10(0)	10(0)	10(0)	—	—	5,0(50)
Serce	2,5	10(0)	10(0)	10(0)	10(0)	—	—	4,5(55)
Mózg	2,5	10(0)	10(0)	10(0)	10(0)	—	—	7,0(30)
Sledziona	2,5	10(0)	10(0)	10(0)	8,3(17)	—	—	3,5(65)
Mięsień	2,5	10(0)	10(0)	10(0)	10(0)	—	—	6,6(44)
Tkanka łączna	2,5	10(0)	10(0)	10(0)	10(0)	—	—	7,6(34)
Mięsak Crockera	2,5	10(0)	10(0)	10(0)	9,3(7)	—	—	2,2(88)
Szczer								
Wątroba	2,5	10(0)	9,8(2)	9,8(2)	8,9(11)	—	—	—
„	1,25	8,3(0)	8,3(0)	6,1(26)	5,6(32)	—	—	—
„	0,5	3,3(0)	3,3(0)	1,7(48)	1,0(73)	—	—	—
Nerka	2,5	10(0)	10(0)	10(0)	9,5(5)	—	—	—
„	0,5	10(0)	10(0)	10(0)	9,2(8)	—	—	—
Krowa								
Wątroba	2,5	9,0(0)	9,0(0)	9,0(0)	9,0(0)	—	—	0,0(100)
„	1,25	8,8(0)	8,6(3)	6,0(33)	6,0(33)	—	—	0,0(100)
„	0,5	5,5(0)	5,2(6)	4,5(18)	4,5(18)	—	—	0,0(100)

Uwaga: cyfry w nawiasach oznaczają % ubytku intensywności czerwonego zabarwienia.

szczura i innych zwierząt jest zależny od stosunku stężenia 4-nitrokatecholu do stężenia tkanki w mieszaninie reagującej. Przy stosunku wynoszącym 1,25 μg 4-nitrokatecholu/mg tkanki (warunki podobne do

warunków Dodgsona i Spencera) następowała utrata około 13% dodanego nitrokatecholu po 24 godz. inkubacji (tablica 1). Gdy stosunek ten wynosił 0,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ tkanki, wówczas utrata nitrokatecholu podniosła się do 62% w tym samym czasie. Jeżeli natomiast stosunek nitrokatecholu do tkanki wynosił 2,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$, wówczas nie spostrzegano ubytku dodanego 4-nitrokatecholu nawet po 24 godz. inkubacji.

Homogenizaty wątrobowe i innych tkanek myszy nie powodowały również ubytku nitrokatecholu przy stosunku stężeń 2,5 μg nitrokatecholu/mg tkanki.

Zaznaczyć należy, że stężenie 4-nitrokatecholu wyzwolonego w trakcie doświadczeń nad aktywnością sulfatazy arylowej w wątrobie utrzymywało się w granicach 2,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ tkanki. Inaczej zachowywały się homogenizaty wątroby wołu. W tym przypadku bowiem nawet przy optymalnym (dla myszy i szczura) stosunku stężeń (2,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$) następowała utrata około 15% dodanego nitrokatecholu po 24 godz. inkubacji.

Obserwacje te wykazują, że tkanka wątrobowa badanych zwierząt może prawdopodobnie, i to w różnym stopniu, zużywać nitrokatechol jako metabolit, lecz widocznie w tak małych ilościach, że ujawnia się to dopiero (w przypadku myszy i szczura) przy stosunkowo dużym stężeniu tkanki w stosunku do stężenia nitrokatecholu. Przy pewnym optymalnym stosunku stężeń zużytkowywanie nitrokatecholu jest minimalne, podczas gdy aktywność sulfatazy arylowej jest wyraźna i może być swobodnie mierzona. Ze względu na dużą aktywność sulfatazy w wątrobie możliwe jest stosowanie w opisanych w tej pracy warunkach jeszcze mniejszych ilości tkanki (np. 0,05 g), przez co zużytkowywanie wyzwolonego nitrokatecholu będzie jeszcze mniejsze. Należy przypuszczać, że inne tkanki myszy poza wątrobą nie posiadają, podobnie jak tkanki szczura (3), zdolności metabolizowania nitrokatecholu.

R o y (8) wspomina o szybkim zanikaniu czerwonej barwy 4-nitrokatecholu w alkalicznym roztworze alkoholowym, z którego wytrącono białka homogenizatu wątrobowego wołu. Dla stabilizacji barwy R o y zaleca stosowanie hydrochinonu i siarczynu sodowego w roztworze alkalicznym.

D o d g s o n i S p e n c e r (3) twierdzą, że czerwone zabarwienie nitrokatecholu w alkalicznym roztworze alkoholowym homogenizatów tkankowych szczura zaczyna zanikać po 10 min. od chwili dodania NaOH.

Autor stwierdził, że czerwone zabarwienie nitrokatecholu w wodnych alkalicznych roztworach homogenizatów tkankowych myszy jest trwałe co najmniej w ciągu 0,5 — 1,0 godziny, jeżeli stosunek stężenia nitro-

katecholu do stężenia tkanki w mieszaninie reagującej wynosił 2,5 µg/mg (tablica 2). Przy stosunku stężeń wynoszącym 5,0 µg/mg zabarwienie zaczynało powoli zanikać dopiero po 1,5 — 2,0 godz.

Ze względu na to, że wykonanie pomiaru kolorymetrycznego zajmuje zaledwie kilka minut, stosowanie postępowania zalecanego przez R o y a było w warunkach stosowanych przez obecnego autora zbyt dobre. Przy mniej korzystnych stosunkach stężeń (np. 1,25 µg nitrokatecholu/mg tkanki) zabarwienie było mniej trwałe i już po 15 min. następował spadek intensywności o 4%, a po 30 min. o 10%. W przypadku wątroby szczura zanik barwy był większy, zwłaszcza wobec większej ilości tkanki. Wątroba wołu również powodowała zanikanie barwy, szczególnie przy mniej korzystnym stosunku stężeń nitrokatecholu do tkanki (np. 1,25 µg/mg).

W alkalicznym roztworze buforu, bez tkanki, zabarwienie 4-nitrokatecholu jest trwałe przez dłuższy czas, lecz i tutaj spostrzeżono ubytek 17% intensywności po 24 godz. stania w temp. pokojowej.

Wyniki osiągnięte w tej pracy co do możliwości stosowania SNK jako substratu do oznaczania sulfatazy aryłowej wątroby zgodne są z wypowiedzią D o d g s o n a, S p e n c e r a i T h o m a s a (4) o warunkach, w jakich użycie tej metody jest możliwe. Z badań tych samych autorów należy wnioskować, że stosowanie SNK jako substratu pozwala na oznaczanie jednej („rozpuszczalnej”) frakcji sulfatazy aryłowej. W wątrobie ssaków występują bowiem dwie sulfatazy aryłowe: jedna „nierozpuszczalna”, o dużym powinowactwie do siarczanu p-nitrofenolu (SNF) i siarczanu p-acetylofenolu (SAF), druga „rozpuszczalna”, o dużym powinowactwie do SNK.

Streszczenie

1. Wykazano, że sól dwupotasowa kwasu 2-hydroksy-5-nitrofenylo-siarkowego może być używana, z zachowaniem pewnych warunków, do oznaczania aktywności sulfatazy aryłowej w homogenizatach wątroby myszy i szczura.

2. Ubytek 4-nitrokatecholu dodanego do homogenizatów wątrobowych jest zależny od stosunku stężenia nitrokatecholu do stężenia tkanki.

3. Szybkość zanikania czerwonej barwy 4-nitrokatecholu w alkalicznych roztworach homogenizatów tkankowych jest zależna od stężenia tkanki w mieszaninie.

LITERATURA

1. Baker W., *J. Chem. Soc.*, 2876, 1932.
2. Derrien M., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 9, 110, 1911.
3. Dodgson K. S. and Spencer B., *Biochem. J.*, 53, 444, 1953.
4. Dodgson K. S., Spencer B. and Thomas J., *Biochem. J.*, 59, 29, 1955.
5. Neuberger C. i Kuroono K., *Biochem. Z.*, 140, 259, 1923.
6. Potter W. R. i Elvehjem C. G., *J. Biol. Chem.*, 114, 495, 1936.
7. Robinson D., Smith J. N. and Williams R. T., *Biochem. J.* 49, LXXIV, 1951.
8. Roy A. B., *Biochem. J.*, 53, 12, 1953.

СУЛЬФАТ 4-НИТРОКАТЕХОЛЯ В КАЧЕСТВЕ СУБСТРАТА
ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ АРИЛОВОЙ СУЛЬФАТАЗЫ

Резюме

1. Подтверждена возможность применения, при соблюдении известных условий, двукалийной соли 2-гидроокиси-5-нитрофенилосерной кислоты при определении активности ариловой сульфатазы в гомогенатах печени мышей и дрыс.

2. Убыль 4-нитрокатехоля, прибавленного к гомогенатам печени зависит от отношения концентрации нитрокатехоля к концентрации ткани.

3. Скорость исчезновения красной окраски 4-нитрокатехоля в щелочных растворах гомогенатов ткани зависит от концентрации ткани в смеси.

NITROCATÉCHOL SULPHATE (NCS) AS SUBSTRATE FOR THE ASSAY OF ARYL
SULPHATASE

Summary

1. It has been shown, that dipotassium 2-hydroksy-5-nitrophenyl sulphate (nitrocatechol sulphate — NCS) may be used, under certain conditions, as substrate for the assay of aryl sulphatase in whole liver homogenates of mouse and rat.

2. The recovery of 4-nitrocatechol added to liver homogenates depends on the ratio of the concentration of nitrocatechol to the concentration of the tissue.

3. The rate of disappearance of the red colour of the 4-nitrocatechol anion in alkaline solutions of tissue homogenates is dependent on the concentration of tissue in the mixture.

Otrzymano 16.5.1955

L. M. DZIAŁOSZYŃSKI I J. ZAWIELAK

SULFATAZA ARYŁOWA MIĘSAKA CROCKERA U MYSZY ORAZ NARZĄDÓW MYSZY OBARCZONYCH TYM NOWOTWOREM

Katedra Fizjologii Zwierząt W. S. R. Poznań
Kierownik Katedry: Lech Działoszyński

Ubiegłe dwudziestolecie było świadkiem dużego postępu na polu enzymologii nowotworów, a zebrane wyniki umożliwiły bliższą charakterystykę tkanki nowotworowej z punktu widzenia aktywności enzymatycznej. Okazało się np., że pod względem jakościowym skład enzymatyczny nowotworów i tkanek normalnych jest taki sam (4 i 5). Stwierdzono jednak szereg różnic ilościowych w aktywności wielu enzymów występujących w nowotworach w porównaniu z aktywnością tych enzymów w tkankach normalnych. Wykazano, że aktywność niektórych enzymów wzrasta w nowotworach, innych znowu maleje, a jeszcze innych nie ulega poważniejszym zmianom (9).

Celem obecnej pracy było poznanie aktywności sulfatazy aryłowej w przeszczepialnym mięsaku Crockera 180 u myszy oraz zbadanie aktywności tego enzymu w narządach myszy obarczonej wspomnianym nowotworem. Sulfataza aryłowa jest enzymem stosunkowo mało jeszcze poznanym, a autorzy obecnej pracy znaleźli tylko jedną wzmiankę o aktywności tego enzymu w nowotworze, a mianowicie w przeszczepialnym mięsaku 39 u szczura (7). Jest rzeczą bardzo prawdopodobną, że sulfataza aryłowa bierze poważny udział w procesach detoksykacyjnych organizmów zwierzęcych przez kierowanie syntezą estrów aryłowych kwasu siarkowego z fenoli powstających podczas przemiany białkowej (2).

Metoda

Do badań opisanych w tej pracy używaliśmy białych myszy doświadczalnych obojga płci z populacji hodowanych przez kilka lat w Katedrze Chemii Organicznej A. M. w Poznaniu.

Mięsak Crockera przeszczepiano przez nacięcie skóry w okolicy krzyżowej i wsunięcie pod skórę kawałka tkanki nowotworowej. Naciętą skórę następnie zeszywano. Po okresie około dwóch tygodni, gdy guz osiągnął wielkość prawie 1/4 wielkości myszy, zwierzęta zabijano przez dekapitację po uprzednim oszołomieniu eterem. W czasie sekcji wycinano cały guz, część tkanki mięśniowej oraz następujące narządy: wątrobę, nerki, śledzionę, serce, tarczycę i mózg. Do badania aktywności sulfatazy aryłowej odważano dokładnie 0,1 g tkanki, a tylko w nielicznych przypadkach mniej, np. gdy cały narząd ważył mniej niż 0,1 g. Pobraną tkankę homogenizowano przez 5 minut z dodatkiem 0,5 ml buforu octanowego pH 5,5 i dalej postępowano w myśl metody opisanej przez D z i a ł o s z y ń s k i e g o (3). W celu uchwycenia ewentualnych zmian w aktywności sulfatazy aryłowej w narządach myszy obarczonych mięsakiem oznaczono również aktywność sulfatazy w wyżej wymienionych narządach oraz w tkance łącznej podskórnej kilku myszy zdrowych. Dane o aktywności sulfatazy aryłowej mięsaka Crockera odnoszono do aktywności enzymu w tkance łącznej, uważanej za tkankę macierzystą mięsaka. Do każdego oznaczenia aktywności sulfatazy brano dwie równoległe próby z każdego narządu jako też i z guza.

Wyniki

Otrzymane wyniki zestawiono w tablicy 1 i 2.

Tablica 1

Aktywność sulfatazy aryłowej mięsaka Crockera oraz tkanek myszy zdrowych i obarczonych mięsakiem

Myszy zdrowe				Myszy obarczone mięsakiem Crockera			
Tkanka	Aktywność sulfatazy jedn./mg tkanki	Ilość oznaczeń	Średnie odchylenie	Tkanka	Aktywność sulfatazy jedn./mg tkanki	Ilość oznaczeń	Średnie odchylenie
Mózg	3,33	12	0,22	Nerka	3,17	22	0,11
Nerka	3,23	12	0,12	Wątroba	3,06	22	0,22
Śledziona	2,87	12	0,10	Mózg	3,03	14	0,20
Wątroba	2,76	12	0,07	Śledziona	3,00	22	0,16
Tarczyca	2,46	6	0,06	Tarczyca	2,53	12	0,13
Serce	1,50	10	0,25	Serce	1,46	16	0,16
Mięsień	0,76	8	0,20	Mięsień	0,70	16	0,14
Tkanka łączna	0,80	12	0,08	m. Crockera	3,10	20	0,30

Tablica 2

Waga śledziony u myszy zdrowych oraz u myszy obarczonych mięsakiem Crockera

Myszy obarczone mięsakiem Crockera			Myszy zdrowe		
Waga myszy g	Waga śledziony g	Waga śledziony w % wagi myszy	Waga myszy g	Waga śledziony g	Waga śledziony w % wagi myszy
25,15	0,33	1,31	25,30	0,11	0,45
30,15	0,28	0,93	21,50	0,06	0,29
23,70	0,24	1,01	19,60	0,13	0,66
32,60	0,28	0,86	18,70	0,06	0,32
25,90	0,35	1,35	21,10	0,05	0,23
Średnio	0,30	1,00	Średnio	0,08	0,40

Dyskusja

Jak wynika z danych zestawionych w tablicy 1, aktywność sulfatazy arylowej mięsaka Crockera wzrosła czterokrotnie w porównaniu z aktywnością tego enzymu w tkance łącznej, z której mięsak się wywodzi. Jeżeli porównamy aktywność sulfatazy arylowej mięsaka Crockera z aktywnością tego enzymu w narządach myszy zdrowej, to zobaczymy, że aktywność mięsaka przewyższa przeszło czterokrotnie aktywność mięśnia szkieletowego, dwukrotnie aktywność serca, nieznacznie aktywność wątroby, śledziony i tarczycy, lecz nie dorównuje aktywności nerek i mózgu. Nerka, mózg, wątroba i śledziona okazały się narządami najbogatszymi w sulfatazę arylową, co potwierdza wyniki Roselfa (8) w stosunku do narządów człowieka i zgodne jest częściowo z danymi dla narządów szczura (1 i 7).

Zaobserwowany duży skok w aktywności sulfatazy arylowej mięsaka, w porównaniu z czynnością tego enzymu w tkance łącznej, można wytłumaczyć wzrostem przemiany białkowej szybko wzrastającego nowotworu, a w związku z tym potrzebą wzmożonego usuwania fenoli powstających wtedy przypuszczalnie w większych ilościach.

Innym zagadnieniem jest wpływ, jaki nowotwór wywiera na tkanki organizmu nieraz bardzo odległe od miejsca wzrostu nowotworu, a zwłaszcza na ich czynność enzymatyczną. Hepatoma np., przeszczepiony pod skórę powoduje 17-krotne obniżenie aktywności katalazy wątroby (6), a mięsak Jensena 20-krotny wzrost fosfatazy kwasów nukleinowych mięśni (10).

Jeśli idzie o wpływ badanego przez nas nowotworu na aktywność sulfatazy aryłowej innych tkanek, to uzyskane wyniki (tablica 1) wykazują tylko nieznaczny wzrost aktywności tego enzymu w wątrobie, śledzionie i tarczycy oraz nieznaczne obniżenie w nerce, sercu, mózgu i mięśniu. Nie stwierdzono żadnych drastycznych zmian aktywności sulfatazy aryłowej w narządach myszy obciążonych mięsakiem Crockera w porównaniu z aktywnością w narządach myszy zdrowych.

Bliższego omówienia wymaga jednak śledziona. Jakkolwiek aktywność omawianego enzymu w śledzionie myszy obciążonych mięsakiem, obliczona na jednostkę wagi tkanki, wzrosła tylko o kilka procent, to jednak całkowita aktywność sulfatazy aryłowej w tym narządzie wzrosła dwa i półkrotnie w porównaniu z aktywnością śledziony myszy zdrowych. Dzieje się to dlatego, że dwa i półkrotnie wzrasta waga śledziony (wyrażona w % wagi zwierzęcia) w porównaniu z wagą śledziony u myszy zdrowych. U myszy normalnych śledziona ważyła przeciętnie 0,08 g, co stanowiło 0,4% wagi całej myszy, podczas gdy u myszy obciążonych mięsakiem Crockera śledziona ważyła przeciętnie 0,3 g, czyli 1,0% wagi myszy (tablica 2). Odchylenia w wadze innych badanych narządów były nieznaczne.

Streszczenie

1. Oznaczono aktywność sulfatazy aryłowej w mięsaku Crockera 180 u myszy oraz w narządach myszy zdrowych i obciążonych mięsakiem.

2. Stwierdzono, że aktywność sulfatazy aryłowej mięsaka Crockera jest czterokrotnie większa niż aktywność tkanki łącznej, uważanej za tkankę macierzystą mięsaka.

3. Aktywność sulfatazy aryłowej, obliczona na jednostkę wagi tkanki, nie uległa poważniejszym zmianom w narządach myszy obciążonych mięsakiem Crockera w porównaniu z aktywnością tego enzymu w narządach myszy zdrowych.

4. Dzięki zwiększeniu się wagi śledziony u myszy obciążonych mięsakiem Crockera aktywność sulfatazy aryłowej całej śledziony wzrosła dwa i półkrotnie w porównaniu z aktywnością w śledzionie myszy zdrowych.

LITERATURA

1. Dodgson K. S., Spencer B. and Thomas J., *Biochem. J.* **53**, 452, 1953.
2. Działoszyński L. M., *Bull. Soc. Ami de Sciences de Poznań XI*, Serie B, 59, 1951.
3. Działoszyński L. M., *Acta Biochim. Pol.* **2**, 421, 1955.

4. Euler H. i Skarżyński B., *Biochemie der Tumoren*, Stuttgart 1942, 53.
5. Greenstein J. P., *Biochemistry of Cancer*, New York 1947, 198.
6. Greenstein J. P., Jenrette W. V. and White J., *Natl. Cancer Inst.* **2**, 283, 1941.
7. Huggins C. and Smith D. R., *J. Biol. Chem.* **170**, 391, 1947.
8. Rosenfeld L., *Biochem. Z.* **157**, 434, 1925.
9. Skarżyński B., *Postępy Biochemii*, **1**, 62, 1953.
10. Wienbeck J., *Z. Physiol. Chem.* **219**, 164, 1933.

АРИЛОВАЯ СУЛЬФАТАЗА САРКОМЫ КРОККЕРА У МЫШЕЙ И В ОРГАНАХ МЫШЕЙ, ПОРАЖЕННЫХ ЭТОЙ ОПУХОЛЬЮ

Резюме

1. Была определена активность ариловой сульфатазы в саркоме Кроккера 180 у мышей, а также и в органах здоровых мышей и мышей пораженных саркомой.

2. Обнаружено, что активность ариловой сульфатазы саркомы Кроккера в четыре раза больше активности соединительной ткани, которую принято считать материнской тканью саркомы.

3. Активность ариловой сульфатазы, вычисленная на единицу веса ткани, в органах мышей, пораженных саркомой Кроккера, не подверглась более значительным изменениям, сравнительно с активностью этого энзима в органах здоровых мышей.

4. Вследствие прибавления веса селезенки мышей, страдающих саркомой Кроккера, активность ариловой сульфатазы всей селезенки возросла в два с половиной раза сравнительно с активностью селезенки здоровых мышей.

ARYLSULPHATASE OF CROCKER'S SARCOMA 180 IN MICE AND IN THE ORGANS OF TUMOR BEARING MICE

S u m m a r y

1. The activity of arylsulphatase has been determined in Crocker's sarcoma 180 and in the organs of healthy and tumor bearing mice.

2. It has been found, that the activity of arylsulphatase of Crocker's sarcoma is about four times greater than that of connective tissue, believed to be the tissue of origin of this tumor.

3. Arylsulphatase activity in the organs of mice bearing Crocker's sarcoma, calculated for unit weight of tissue, did not change significantly as compared with the activity in the organs of healthy mice.

4. Owing to a marked increase of weight of spleen in the mice bearing Crocker's sarcoma, the activity of arylsulphatase of the whole organ increased by 250 per cent as compared with the activity of the spleen in normal mice.

Otrzymano 16.5.1955

JÓZEF HELLER I PRZEMYSŁAW SZAFRAŃSKI

CYKL PENTOZOWY CUKROWCÓW U *MYCOBACTERIUM PHLEI*

Z Zakładu Biochemii P. A. N. w Warszawie

Kierownik prof. dr J. Heller

Pracownia Biochemii Ewolucyjnej

Kierownik prof. dr Irena Mochnacka

Drogi metabolizmu cukrowego w *Mycobacterium* są mało znane. Przyjmuje się na ogół, że u tych drobnoustrojów glikoliza przebiega, jakkolwiek nie zidentyfikowano wszystkich pośrednich produktów tej przemiany (E d s o n, 1951 (4)). Poznanie w ostatnich latach cyklu pentozowego (H o r e c k e r, 1953 (5), R a c k e r, 1954 (8)) wysunęło zagadnienie występowania tej drogi metabolicznej także u *Mycobacterii*. Przemiana pentozowa heksozy idzie przez kwas 6-fosfoglukonowy, 5-fosforybulozę i 5-fosforybozę oraz 7-fosfosedoheptulozę, a następnie przy udziale fosfotriozy i fosfotetrozy odtwarza się częściowo fosfoheksoza. Wykazanie charakterystycznych produktów pośrednich tego cyklu lub wykazanie ich przemiany przez użyte preparaty enzymatyczne czyni prawdopodobnym istnienie tego cyklu w badanym materiale biologicznym.

Przygotowanie preparatów enzymatycznych

Do badań używano szczepu *Mycobacterium phlei* otrzymanego z muzeum Instytutu Gruźlicy w Warszawie. Drobnoustroje hodowano w kolbach Roux przy dostępie powietrza. Bakterie wysiewano na 200 ml porcji pożywki Syma (1949 (9)) zawierającej jako źródło węgla glukozę. Po siedmiu dniach hodowli oddzielano kożuch od płynnej pozostałości za pomocą sączenia przez bibułę. Drobnoustroje przepłukiwano kilkakrotnie na sączku lodowatą wodą. Około 50 g wilgotnej masy bakteryjnej przenoszono do emulgatora typu „Cyklon“ i dodawano 150 ml oziębionego do -10°C acetonu. Emulgator obkładano stałym dwutlenkiem węgla utrzymując w ten sposób niską temperaturę. Bakterie ekstrahowano

przez około 10 minut wyłączając co pewien czas motor. Następnie zawiesinę wirowano przy 5 tys. obr./min. w ciągu 5 minut zważając, aby temperatura roztworu po wirowaniu nie przekraczała 3 do 5°C. Pozostałość po odwirowaniu przenoszono powtórnie do emulgatora i powtarzano zabieg. Po trzykrotnej ekstrakcji acetonem pozostały po odwirowaniu proszek suszono w próżni przez 20 godz. w temp. 1°C. Proszek acetonowy przechowywano w temp. -20°C. Około 2 g otrzymanego proszku rozcierano z 15 ml wody w moździerzyku bakteriologicznym. Czynności te jak i następne przeprowadzano w temp. 2 do 3°C. Po wymieszaniu proszku acetonowego z wodą zawiesinę pozostawiano na 20 minut po czym wirowano przy 6 tys. obr./min. przez 10 minut. Płyn z nad osadu zlewano i dodawano do niego nasyconego roztworu siarczanu amonu do osiągnięcia 0,7 wysycenia. Następnie doprowadzano pH płynu do 7,0 za pomocą 2 N wodorotlenku potasu. Po 15 minutach odwirowywano wytrącone białko przy 5 tys. obr./min. w ciągu 10 minut. Osad rozpuszczano w 5 ml wody i pozostawiano przez 20 godz. w temp. 1°C. Wytrącone w tym czasie białko odwirowywano przy 5 tys. obr./min. w ciągu 5 minut. Płyn z nad osadu zlewano, wysycano ostrożnie stałym siarczanem amonu do nasycenia 0,8 i doprowadzano pH roztworu do 7,0 przy użyciu wodorotlenku potasu. Po 15 min. odwirowywano wytrącone białko przy 3,5 tys. obr./min. w ciągu 20 minut. Osad rozpuszczano w małej ilości wody i uzyskany płyn dializowano przez 2 godz. wobec wody destylowanej w temp. 1°C.

Preparat enzymatyczny ze szpinaku został przygotowany zgodnie z opisem podanym przez Axelroda, Bandurskiego, Greinera i Janga (1953, (1)). Oba preparaty przechowywano w -20°C.

Przemiana pentozowa w szpinaku została dobrze poznana przez wspomnianych autorów, a badania spektrofotometryczne potwierdzone przez chromatografię. Równoległe użycie preparatu enzymatycznego ze szpinaku w przebiegu wszystkich naszych badań pozwoliło na interpretację uzyskanych krzywych spektrofotometrycznych.

OTRZYMANIE ESTRU RYBOZO-5-FOSFOROWEGO (R-5-P)

Fosforybozę otrzymywano z kwasu adenozyotrójfosforowego (ATP), który izolowano z mięśni królika jako sól wapniową metodą Szent-Györgyiego (1947 (10)). Pewne wskazówki odnośnie otrzymywania R-5-P z ATP podaje Long (1955 (6)). Dane te są jednak bardzo ogólne i niewystarczające.

W celu otrzymania fosforybozy hydrolizowano 400 mg czterowodnej soli wapniowej ATP z 5 ml 0,5 N kwasu siarkowego przez 4 godz. 30 min. na wrzącej łaźni wodnej. Następnie dodawano 2 ml 40% octanu baru

i odwirowywano wytrącony osad siarczanu baru. Roztwór alkalizowano do pH 8,5 początkowo 10 N, a następnie 0,1 N wodorotlenkiem sodowym. Wytrącony osad fosforanów odwirowywano. Sól barową fosforybozy wytrącano z roztworu przez dodanie czterokrotnej objętości alkoholu etylowego. Płyn pozostawiano na kilkanaście godzin w temp. 2°C po czym sączono. Otrzymana w ten sposób sól barowa fosforybozy była w znacznym stopniu zanieczyszczona fosforanem baru. W celu dokładniejszego oczyszczenia rozpuszczano otrzymany preparat w 15 ml 0,01 N kwasu solnego i powtórnie wytrącano osad przez dodanie alkoholu. Czystość rekrytalizowanego preparatu wynosiła ok. 70%. Wydajność fosforybozy wahała się ok. 5% teoretycznej. Straty te powstają w ciągu hydrolizy, w czasie której zachodzi odszczepienie trzeciej reszty fosforanowej.

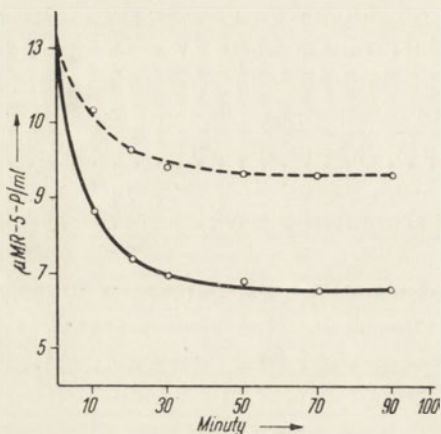
Aby otrzymać wolny ester R-5-P, rozpuszczano sól barową w wodzie i zakwaszano roztwór do pH 3,5 za pomocą 0,1 N kwasu siarkowego. Wytrącony siarczan baru odwirowywano. Do badań enzymatycznych używano soli sodowej fosforybozy otrzymanej przez alkalizację roztworu R-5-P ługiem sodowym. Alkalizację zaczynano 1 N wodorotlenkiem sodu, a następnie doprowadzano pH do 7,6 za pomocą 0,1 N roztworu. Preparat zagęszczano przez odparowanie części wody w próżni. Ester rybozo-5-fosforowy jest dość trwałym związkiem i roztwory jego w stanie zamrożonym służyły nam w ciągu kilku miesięcy.

PRZEMIANY ESTRU RYBOZO-5-FOSFOROWEGO

W pierwszym etapie przebadano szybkość znikania fosforybozy pod wpływem preparatów enzymatycznych z *M. phlei* i ze szpinaku. Do oznaczania rybozy posługiwano się metodą orcynolową (M e j b a u m (7)). Roztwory kolorymetrowano przy użyciu fotometru Pulfricha stosując filtr S66. Wyniki tych doświadczeń przedstawione są na rys. 1. Doświadczenia z obu preparatami w identycznych warunkach wykazały, że szybkość reakcji jest większa w przypadku *M. phlei*. Równowaga pomiędzy fosforybozą i jej produktami rozkładu ustala się zasadniczo po 50 min. inkubacji w 37°C. Przy użyciu preparatów enzymatycznych ze szpinaku reakcja zatrzymywała się po rozkładzie ok. 27% estru R-5-P. W przypadku *Mycobacterium* rozkład fosforybozy sięgał 50%. Zmniejszenie ilości substratu przy zachowaniu tej samej ilości preparatów enzymatycznych nie wpływało na przesunięcie równowagi reakcji.

Celem scharakteryzowania produktów przemiany R-5-P zastosowano metodę D i s c h e g o CyRI (1949 (3)). Polega ona na ogrzewaniu badanego płynu z kwasem siarkowym i następnym dodaniu roztworu chlorowodorku cysteiny. Oznaczenia można wykonywać w kilka minut

po dodaniu cysteiny. Wg Axelroda, Bandurskiego, Greinera i Janga (1953 (1)) metoda ta pozwala oznaczać heptulozę obok glikozy, fruktozy, estru glikozo-6-fosforowego, fruktozo-6-fosforowego, fruktozo-1,6-dwufosforowego, rybozo-5-fosforowego, jak również obok rybozy, rybulozy i fosforanu dwuhydroksyacetonu. Krzywe absorpcyjne produktów przemiany estru



Rys. 1. Zużycie estru rybozo-5-fosforowego:

----- przez preparat ze szpinaku
 ————— przez preparat z *Myc. phlei*

Warunki reakcji: 0,4 ml R-5-P 0,033 M zalkalizowanego do pH 7,6, 0,2 ml buforu weronalowego 0,1 M o pH 7,6, 0,3 ml preparatu enzymatycznego ze szpinaku (lub 0,3 ml. preparatu enzymat. z *M. phlei*) 0,1 ml wody. Mieszaninę inkubowano w 37°C. Do analizy pobierano 0,2 ml mieszaniny enzymatycznej, dodawano 1 ml 10% kwasu trójchlorooctowego i rozcieńczano wodą do 15 ml w kolbce miarowej. W 1 ml rozcieńczonego odciałczu oznaczano pentozę metodą orcyńolową (7)

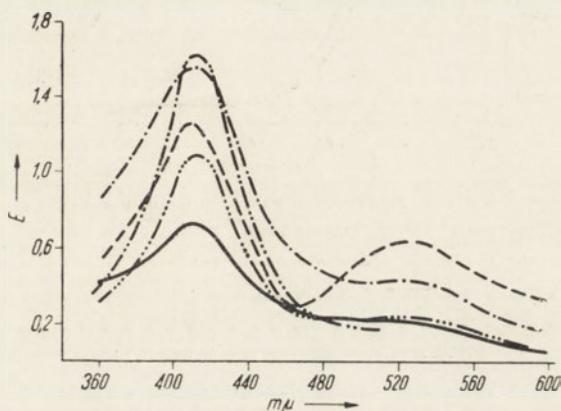
Ilustrują to na rys. 2 dołączone standartowe krzywe glikozy i fruktozy.

W doświadczeniach z *M. phlei* krzywa otrzymana po 90 min. inkubacji mieszaniny wskazywała na powstawanie sedoheptulozy i wyraźnych ilości heksoz. Transaldolaza wykazuje więc w tym preparacie znaczną aktywność i w stosunkowo krótkim czasie umożliwia dalszą przemianę sedoheptulozy. Po 1030 min. znika prawie zupełnie absorpcja przy 520 m μ , rośnie natomiast przy 415 m μ , co wskazuje na zwiększone stę-

cyjne produktów przemiany estru R-5-P są podane na rys. 2 i 3. Oznaczenia przeprowadzono w spektrofotometrze „Unicam”.

Przedstawione na rys. 2 i 3 krzywe obrazują absorpcję ciał barwnych powstałych w reakcji Dischego z produktów przemiany. Reakcję wykonywano przed inkubacją, po upływie 90 min. i po 17 godz. inkubacji w temp. 37°C. Krzywe uzyskane po 90 min. inkubacji mieszaniny posiadają 2 maksima zarówno w przypadku szpinaku, jak i *M. phlei*. Położenie maksimów absorpcji obu krzywych jest identyczne. Wyniki te wskazują, że przemiana R-5-P idzie u *M. phlei* przez te same produkty co dobrze poznana przemiana w szpinaku. Cykl pentozowy w szpinaku został stwierdzony przez szereg autorów, a podobne badania spektrofotometryczne były wykonane przez Axelroda i innych (1953 (1)). Jedno z maksimów absorpcji leży w granicach 520 m μ i odpowiada heptulozie. Maksimum przy 415 m μ zależy od obecności heksoz.

żenie heksoz. Wyniki te są zgodne z badaniami nad zużyciem R-5-P przez preparaty enzymatyczne (rys. 1). Większe zużycie fosforybozy w preparacie z *M. phlei* tłumaczy się większą aktywnością transaldolazy, która usuwa sedoheptulozę i tym samym przesuwa równowagę całej reakcji od pentoz ku heksozom.

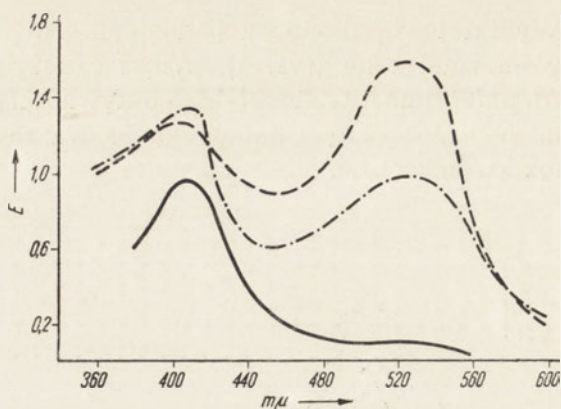


Rys. 2. Krzywe absorpcyjne produktów uzyskanych działaniem preparatu z *M. phlei* na R-5-P.

- po upływie 0,0 min
- 90 min
- · - · - · 1030 „
- standard glikozy
- standard fruktozy

Warunki reakcji: 0,4 ml R-5-P 0,03 M zalkalizowanego do pH 7,6, 0,2 ml buforu weronalowego 0,1 M pH 7,6, 0,3 ml preparatu enzymatycznego z *M. phlei*, 0,1 ml wody. Mieszaninę inkubowano w 37°C. Krzywe absorpcyjne uzyskano przy pomocy reakcji Dischego. Do analizy pobierano 0,15 ml mieszaniny inkubowanej rozcieńczonej wodą do 1 ml. Standardowe krzywe glikozy i fruktozy otrzymano biorąc do oznaczeń po 1 ml roztworów cukrów o stężeniu 200 γ /ml

Mniejsza aktywność transaldolazy w preparacie szpinakowym powoduje, że po 90 min. inkubacji maksimum heksozowe jest niskie, natomiast utrzymuje się wysoka absorpcja sedoheptulozy.



Rys. 3. Krzywe absorpcyjne produktów uzyskanych działaniem preparatów ze szpinaku na R-5-P.

— po upływie 0,0 min.
 - - - " " 90 "
 - · - · " " 1060 "

Warunki reakcji: 0,4 ml R-5-P 0,033 M zalkalizowanego do pH 7,6, 0,2 ml buforu weronalowego 0,1 M pH 7,6, 0,3 ml preparatu enzymatycznego ze szpinaku, 0,1 ml wody. Mieszaninę inkubowano w 37°C. Krzywe otrzymano wykonując reakcję Dischego z 0,4 ml mieszaniny enzymatycznej, rozcieńczonej wodą do 1 ml

Dyskusja

Na możliwości innego spalania glikozy u *Mycobacterium* poza drogą glikolityczną zwróciło uwagę słabe nagromadzenie kwasu pirogronowego pod wpływem arseninu (E d s o n, 1951 (4)). Pewne wyjaśnienia przyniosły prace Y o u m a n s i Y o u m a n s (1953 (11)), którzy stwierdzili, że kwas glukonowy w stężeniu 0,6 do 1% podtrzymuje wzrost zjadliwego szczepu H37Rv. Autorzy ci sugerują, że przemiana kwasu glukonowego biegnie zgodnie ze schematem podanym przez D i c k e n s a (1951 (2)), tzn. przez ketokwas do kwasu pirogronowego. Kwas fosfoglukonowy podawany w stężeniu 0,16 do 4% nie podtrzymywał jednak wzrostu szczepu H37Rv. Wydaje się, że chodzi tu o przenikanie tego związku do komórki bakteryjnej, analogicznie do estrów heksozofosforowych, które nie są zużywane przez nietknięte *Mycobacterie*, są natomiast metabolizowane przez dezintegraty komórkowe (E d s o n, 1951 (4)).

Pentozy, a wśród nich i D-ryboza nie podtrzymują wzrostu szczepu H37Rv (Youmans i Youmans, 1953 (12)). Nie dowodzi to jednak, że spalanie cukrowców nie biegnie poprzez fosfopentozy. Fosforylacja w cyklu zachodzi na etapie heksoz, zatem włączenie pentoz w cykl przemian wymagałoby osobnej pentokinazy.

Wykazanie, że otrzymane przez nas preparaty enzymatyczne metabolizowały fosforybozę do heksoz poprzez tak charakterystyczny dla cyklu pentozonego produkt pośredni jak sedoheptuloza, wskazuje na udział tego cyklu w przemianie *Mycobacterium phlei*. Na przebadanym przez nas odcinku preparaty nasze wykazywały aktywność izomerazy pentozonej, transketolazy i transaldolazy.

Streszczenie

Preparaty enzymatyczne otrzymane z *Mycobacterium phlei* używały 5-fosforybozę. W produktach reakcji stwierdzono spektrofotometrycznie przy użyciu cysteinowej metody Dischego pojawianie się sedoheptulozy i przechodzenie jej w heksozy, a więc czynność izomerazy pentozonej, transketolazy i transaldolazy.

LITERATURA

1. Axelrod B., Bandurski R. S., Greiner C. M. i Jang R., *J. Biol. Chem.*, **202**, 619, 1953.
2. Dickens F., w *The Enzymes* wyd. J. B. Sumner i K. Myrbäck, 1951, Acad. Press. Inc., New York tom II str. 671.
3. Dische Z., Shettles L. B. i Osnos M., *Arch. Biochem.*, **22**, 169, 1949.
4. Edson N. L., *Bacteriological Reviews*, **15**, 3, 1951.
5. Horecker B. L., *Brewers Digest*, **28**, 214, 1953.
6. Long C., *Biochem. J.*, **59**, 322, 1955.
7. Meibaum W., *Z. physiol. Chem.*, **258**, 117, 1939.
8. Racker E., *Adv. Enzym.*, **15**, 141, 1954.
9. Sym E. A., *Przeegląd Epidemiol.*, **3**, 205, 1949.
10. Szent-Györgyi T., *Chemistry of Muscular Contraction*, Acad. Press, New York, 1947.
11. Youmans A. S. i Youmans G. P., *J. Bact.*, **65**, 100, 1953.
12. Youmans G. P. i Youmans A. S., *J. Bact.*, **65**, 92, 1953.

ЦИКЛ ПЕНТОЗНЫЙ САХАРИДОВ У MYCOBACTERIUM PHLEI

Резюме

Фосфорибоза использовалась энзиматическими препаратами, полученными из *Mycobacterium phlei*. В продуктах реакции — спектрофотометрически — посредством цистеинового метода Дише обнаружено

появление седогептулозы и ее превращение в гексозу, а, следовательно, действие изомеразы пентозы, транскетолазы и трансалдолазы.

THE PENTOSE CYCLE OF CARBOHYDRATES IN *MYCOBACTERIUM PHLEI*

S u m m a r y

The enzymatic preparations from *Mycobacterium phlei* utilise phosphoribose. Sadoheptulose and its conversion to hexose has been proved in the reaction product spectrophotometrically by the Dische's cysteine method. In this way the activity of pentose isomerase, transketolase and transaldolase has been demonstrated in the *Mycobacterium* preparation.

Otrzymano 21.6.1955

MARIUSZ ŻYDOWO I ZBIGNIEW KAMIŃSKI

FRAKCJE SUROWICY KRWI U CHORYCH LECZONYCH LARGAKTYLEM

(doniesienie tymczasowe)

Z Zakładu Chemii Fizjologicznej A. M. w Gdańsku

Kierownik; prof. dr W. Mozołowski

Z Państwowego Szpitala dla Nerwowo i Psychicznie Chorych „Srebrzysko” w Gdańsku

Dyrektor: lek. Z. Kamiński

Mimo coraz szerszego zastosowania largaktylu w terapii, głównie w psychiatrycznej (3), zagadnienie jego toksyczności jest nadal różnie oceniane. Brak jest doświadczalnych danych o wpływie largaktylu na szereg procesów ustrojowych. W dotychczasowych doniesieniach (3, 6, 7) nie znaleźliśmy wzmianki o wpływie na białka krwi. Frakcje białkowe surowicy są czułym wskaźnikiem wielu procesów zachodzących we wszystkich narządach ustroju. Wiadomo, że od ilościowego stosunku poszczególnych frakcji zależy w dużym stopniu szybkość opadania krwinek (1, 5, 8), dodatnie tzw. próby czynnościowe wątroby (5, 8) czy też inne odczyny surowicy krwi. Dlatego wydało się nam celowe zbadanie frakcji białkowych surowicy oraz odczynu opadania krwinek u chorych psychicznie leczonych largaktylem.

Opis doświadczeń

Zbadano 20 surowic pochodzących od dziewięciu chorych leczonych largaktylem oraz 4 surowice od psychicznie chorych pozostających w tych samych warunkach, lecz nie przyjmujących largaktylu. Te kontrolne surowice nie wykazywały żadnych zmian w porównaniu z normami dla ludzi zdrowych.

W użyciu były preparaty dwóch firm: „Largactil” Poulenc-Specia i „Megaphen” firmy Bayer. Chorzy otrzymywali początkowo iniekcje leku, a potem largaktyl w tabletkach w dawkach stopniowo zmniejszających się. Krew pobierano na czczo z żyły łokciowej. Z jednej porcji

krwi uzyskiwano po skrzepnięciu i odwirowaniu surowicę, druga służyła do oznaczania szybkości opadania krwinek. W surowicy krwi oznaczano refraktometrycznie w 20°C stężenie białka (współczynniki do obliczania wg (9)) oraz frakcje białkowe przy pomocy elektroforezy bibułowej sposobem i aparaturą opisaną przez Biela w s k i e g o (2). Czas trwania elektroforezy 16 godzin przy napięciu 200 V i natężeniu 0,25 mA na jednostkę. Używano moderatora weronalowego o pH 8,6. Paski barwione były czernią amidową 10 B i fotometrowane po sfotografowaniu. Szybkość opadania krwinek odczytywano przez 2 godziny co 15 minut.

Wyniki

Wszyscy chorzy pozostawali w leczeniu z powodu psychoz schizofrenicznych. Dwóch wypisano jako wyleczonych, u pozostałych siedmiu

Tablica 1

Porównanie frakcji białkowych surowicy oraz odczynu opadania krwinek u chorych leczonych largaktylem w dawkach powyżej 150 mg na dobę, z surowicami prawidłowymi

	Liczba badanych	Białko całkowite g/100 ml	Albuminy %	α_1 -globul. %	α_2 -globul. %	β -globul. %	γ -globul. %	OB	
								po 1 godz.	po 2 godz.
Chorzy leczeni	11	7,7±0,62	59,7±6,5	4,3±1,67	10,5±1,76	10,5±2,65	14,9±4,86	31±23	56±35
Kontrola	12*)	7,5±0,61	68,0±4,3	2,3±0,59	6,1±1,30	9,2±1,85	14,5±3,59	6±4,	14±9
P**)		>0,4 <0,5	>0,001 <0,01	>0,001 <0,01	<0,001	>0,1 <0,2	>0,8 <0,9	>0,001 <0,01	>0,001 <0,01

osiągnięto większą lub mniejszą poprawę. Uzyskane wyniki doświadczalne podzielono na 2 grupy. Do pierwszej zaliczono surowice krwi pochodzące od pacjentów, którzy w dniu badania otrzymywali wyższe dawki largaktylu aniżeli 150 mg na dobę niezależnie od sposobu poda-

*) Kontrole dla frakcji białkowych obejmują 8 przypadków W. Biela w s k i e g o (2) badanych tą samą metodą i na tej samej aparaturze (surowice ludzi zdrowych) oraz 4 przypadki własne surowic chorych psychicznie nie leczonych largaktylem. Kontrole opadania krwinek dotyczą tylko tych ostatnich 4 przypadków.

**) P oznacza prawdopodobieństwo braku istotnej różnicy obliczone z tablic Fishera (4).

nia leku (tablica 1). Druga grupa, to chorzy leczeni, w momencie badania, dawkami niskimi poniżej 150 mg na dobę *per os*.

Statystycznie istotne zmiany we frakcjach białkowych i szybkości opadania krwinek obserwujemy tylko w pierwszej grupie badanych. Wyraźne jest zwiększenie α_1 , a zwłaszcza α_2 -globulin, przy równoczesnym obniżeniu frakcji albuminowej. Jednocześnie wzrasta znacznie szybkość opadania krwinek. Zmian tych nie ma u chorych pozostających w leczeniu małymi dawkami (tablica 2), poza nieznacznym podwyższeniem α_1 -globulin.

Tablica 2

Porównanie frakcji białkowych surowicy oraz odczynu opadania krwinek u chorych leczonych largaktylem w dawkach dziennych *poniżej 150 mg*, z surowicami prawidłowymi

	Liczba badanych	Białko całkowite g/100 ml	Albuminy %	α_1 -globul. %	α_2 -globul. %	β -globul. %	γ -globul. %	OB	
								po 1 godz.	po 2 godz.
Chorzy leczeni	9	7,6±0,28	65,3±6,8	3,3±1,33	6,9±2,18	9,7±3,09	14,6±2,50	6±5	16±12
Kontrola	12*)	7,5±0,61	68,0±4,3	2,3±0,59	6,1±1,30	9,2±1,85	14,5±3,59	6±4	14±9
P**)		>0,7 <0,8	>0,3 <0,4	>0,02 <0,05	>0,3 <0,4	>0,6 <0,7	>0,9	1	>0,7 <0,8

*) Kontrola jak w tablicy 1.

***) Jak w tablicy 1.

Tablica 3

Porównanie frakcji białkowych surowicy krwi tego samego chorego przed rozpoczęciem leczenia (22.IV) na siódmy dzień podawania iniekcji (29.IV) i w czasie podawania tabletek (13.V)

	Białko całkowite g/100 ml	Albuminy %	α_1 -globul. %	α_2 -globul. %	β -globul. %	γ -globul. %	Opadanie krwinek	
							po 1 godz.	po 2 godz.
22.IV	8,1	61,0	2,2	7,1	11,7	18,2	11	27
29.IV	6,7	57,4	7,2	12,0	10,8	12,5	45	80
13.V	7,5	47,3	3,9	10,9	15,7	22,1	28	62

Dalszą ilustracją wpływu largaktylu na frakcje białkowe jest podany w tablicy 3 wynik trzykrotnego badania surowicy jednego chorego: przed rozpoczęciem leczenia, w czasie podawania iniekcji (200 mg na dobę) i następnie w czasie przyjmowania tabletek (375 mg na dobę). Widzimy wyraźny spadek albumin, ze wzrostem α_2 i α_1 -globulin oraz równoczesny wzrost szybkości opadania krwinek.

Krwinki opadały zwykle bardzo szybko w ciągu pierwszych 15 do 45 minut, po czym szybkość stopniowo malała.

Chorzy leczeni tabletkami, a zaliczeni przez nas do pierwszej grupy, otrzymywali uprzednio iniekcje; trudno jest więc w tej chwili powiedzieć, czy sposób podawania leku ma istotny wpływ na zmiany we krwi, widoczne jest jednak, że dawki tabletek niższe od 150 mg na dobę nie powodują tych zmian.

Streszczenie

Badano frakcje surowicy krwi metodą elektroforezy bibułowej oraz odczyn opadania krwinek u chorych, pozostających w leczeniu largaktylem z powodu psychoz schizofrenicznych. U pacjentów, którzy otrzymywali większe dawki od 150 mg na dobę, stwierdzono statystycznie istotny wzrost α_2 i α_1 -globulin, spadek albumin oraz zwiększoną szybkość opadania krwinek. Surowice krwi chorych leczonych niższymi dawkami nie wykazywały zmian.

LITERATURA

1. Barbier J. et Piquet G., *La sédimentation sanguine*, Masson, Paris 1946.
2. Bielański W., *Acta Bioch. Pol.* **2**, 409, 1955.
3. Bilikiewicz T., *Wiadomości lekarskie* **8**, 55, 1955.
4. Fisher R. A., Yates F., *Statistical tables for biological, agricultural and medical research*, Oliver a. Boyd, London 1948.
5. Gutman A. B., *Adv. Prot. Chem.* **4**, 155, 1948.
6. Tarasow G. K., *Zurnal Newropat i Psichiat.* **55**, 296, 1955.
7. Wołowska J., Pytel A., *Pol. Tyg. Lek.*, **10**, 772, 1955.
8. Wuhrmann F., Wunderly Ch., *Die Bluteiweisskörper des Menschen*, Benno Schwabe, Basel 1947.
9. Żydowo M., *Pol. Tyg. Lek.* **7**, 697, 1952.

ФРАКЦИИ СЫВОРОТКИ КРОВИ У БОЛЬНЫХ
ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ ИХ ЛАРГАКТИЛОМ

Резюме

Исследованы были фракции сыворотки крови путем электрофореза с применением фильтрационной бумаги, а также скорость оседания эритроцитов у больных, проходящих курс лечения ларгактилом, ввиду обнаруженных у них шизофренных психозов. У пациентов получавших дозы более чем 150 мг в сутки, обнаружено статистически фактическое увеличение глобулинов α_2 и α_1 убыль альбуминов и повышенная скорость оседания эритроцитов. В сыворотке крови больных, проходящих курс лечения меньшими дозами, изменений не обнаружено.

FRACTIONS OF THE BLOOD SERA OF THE SUBJECTS TREATED WITH
LARGACTIL

Summary

Blood sera of the schizophrenic subjects treated with largactil have been examined by paper electrophoresis and sedimentation rate test of erythrocytes. An increase of α_1 and α_2 globulins has been proved statistically with patients receiving larger doses of largactil i. e. above 150 mg/24 hr. This change has been accompanied by albumin decrease and the increased sedimentation rate of erythrocytes. Sera of the subjects treated with lower doses failed to show any change.

Otrzymano 24.6.1955

SPIS TREŚCI

I. Reifer, Mikrometoda oznaczania kwasu jabłkowego	367
E. Romanowska, Polarograficzna mikrometoda oznaczania potasu w osoczu i surowicy krwi	383
E. Borowski, S. Kryński, Z. Kuryło-Borowska i D. Wasielewska, Izolowanie i własności czystej cereiny B ₂ — antybiotyku szczepu „φ” <i>Bacillus cereus</i>	389
W. Bielański, Oznaczanie frakcji białkowych surowicy krwi metodą biuretową oraz elektroforezą bibulową	409
L. M. Działoszyński, Siarczan 4-nitrokatecholu jako substrat do oznaczania sulfatazy arylowej	421
L. M. Działoszyński i J. Zawielak, Sulfataza arylowa mięsaka Crockera u myszy oraz narządów myszy obarczonych tym nowotworem	429
J. Heller i P. Szafrański, Cykl pentozowy cukrowców u <i>Mycobacterium phlei</i>	435
M. Zydowo i Z. Kamiński, Frakcje surowicy krwi u chorych leczonych largaktylem	443

I N D E K S A U T O R Ó W

B

- Bartosiewicz W., Dżułyńska J., Gajzler R.**, — Fosfatydy we frakcjach białkowych surowicy otrzymanywanych metodami wysalania i wytrącania metalonem 175
- Bielawski W., Żydowo M., Chyrek-Borowska S., Juško J., Manitius A., Niemiro R., Wołowski R.**, — Niektóre zmiany biochemiczne krwi zdrowego człowieka pod wpływem adrenaliny 49
- Borowski E., Kryński S., Kuryło-Borowska Z., Wasielewska D.**, — Izolowanie i własności czystej cereiny B₂ -antybiotyku szczepu „φ“ *Bacillus cereus* 389
- Buchowicz J., Reifer I.**, — Mikrometoda oznaczania alkaloidów tropowych w materiale roślinnym 187

C

- Chyrek-Borowska S.** — patrz Bielawski W., Żydowo M., Juško J., Manitius A., Niemiro R., Wołowski R. 49

D

- Dmochowski A., Drabikowski W.**, — Nukleoproteidy łusek łuszczycy: oznaczenie ilości i badanie składu 9
- Dmochowski A., Sempńska E., Kłysejko L.** — O tak zwanych β -nukleoproteidach w łuskach łuszczycy (*Psoriasis Vulgaris*) 33
- Drabikowski W.** — patrz Dmochowski A. 9
- Działoszyński L. M.**, — Siarczan 4-nitrokatecholu jako substrat do oznaczania sulfatazy arylowej 421
- Działoszyński L. M., Zawielak J.**, — Sulfataza arylowa mięsaka Crockera u myszy oraz narządów myszy obarczonych tym nowotworem 429

G

- Gajzler R.** — patrz Bartosiewicz W., Dżułyńska J., 175
- Głębecki T.** — Metabolizm fosforowy prątką gruźlicy 75
- Gross S., Leyko W.** — Związki adeninowe krwi ludzkiej 155

H

- Heller J., Szafranski P.**, — Cykl pentozowy cukrowców u *Mycobacterium phlei* 435

J

- Janicki J., Pawelkiewicz J.**, — Witamin B_{12p} 329
- Juško J.** — patrz Bielawski W., Żydowo M., Chyrek-Borowska J., Manitius A., Niemiro R., Wołowski R. 49

K

Kamiński S., Supniewski J., Mayer J. , — Syntetyczny D, L — tryptofan	249
Kamiński Z., Żydowo M. — Frakcje surowicy krwi u chorych leczonych larkaktylem	443
Kaniuga B. , — Badania nad strukturą cząsteczkową naturalnego dekstranu ¹	59
Kączkowski J., Reifer I., Rumińska A. , — Wstępne badania nad wpływem żelazcyjanku potasu na plon i zawartość alkaloidów w <i>Datura stramonium</i> L.	315
Klyszejko L. — patrz Dmochowski A., Sempńska E.	33
Kryński S. — patrz Borowski E., Kuryło-Borowska Z., Wasilewska D.	389
Kuryło-Borowska Z. — patrz Borowski E., Kryński S., Wasilewska D.	389

L

Lassota Z. , — Wytwarzanie i zużywanie kwasu cytrynowego przez <i>Mycobacterium phlei</i>	149
Lassota Z. , — Związki fosforowe samorzutnie labilne w kielkach fasoli	223
Leyko W. , — patrz Gross S.	155

M

Manitius A. — patrz Bielawski W., Żydowo M., Chyrek-Borowska S., Juško J., Niemirowski R., Wołowski R.	49
Manitius A. , — Zawartość potasu w surowicy krwi ludzi zdrowych	231
Mayer J. — patrz Kamiński S., Supniewski J.	249
Mejbaum-Katzenellenbogen W. , — Turbidymetryczna mikrometoda oznaczania białek taniną	279
Morawiecki A. , — Hamowanie transforylasy fosfopirogronowej przez adenozynotrójfosforan i pirofosforan	107

N

Niemirowski R. — patrz Bielawski W., Żydowo M., Chyrek-Borowska S., Juško J., Manitius A., Wołowski R.	49
Niemirowski R. , — Zależność zawartości wapnia w surowicy krwi od stężenia białka	213
Niewiarowska A., Skarżyński B., Ostrowski W., Żak Z. , — Połączenia witaminu B ₁₂ z białkami	115
Nowakowska K., Pawelkiewicz J. , — Prekursory biosyntezy nukleotydocyjano-kobalaminy. II. Synteza nowych pochodnych witaminu B ₁₂	259
Noworytko J., Sarnecka-Keller M. , — Zastosowanie izatyny i jej pochodnych w chromatografii bibułowej aminokwasów i peptydów	91

O

Ostrowski W. — patrz Skarżyński B., Niewiarowska A., Żak Z.	115
Ostrowski W. , — Połączenia witaminu B ₁₂ z białkami. III. Badania nad kompleksem cyjanokobalamina-białko (Erytroglobulin) w surowicy krwi	297

P

Pawelkiewicz J. — patrz Nowakowska K.	259
--	-----

Pawelkiewicz J. , — Prekursory biosyntezy nukleotydocyjanokobalamin. III. Wpływ działania aureomycyny na syntezę witaminów grupy B ₁₂ przez bakterie kwasu propionowego	321
Pawelkiewicz J. — patrz Janicki J.	329

R

Reifer I. — patrz Buchowicz J.	187
Reifer I. , — Mikrometoda oznaczania kwasu jabłkowego	367
Reifer I. — patrz Kączkowski J., Rumińska A.	315
Romanowska E. , — Polarograficzna mikrometoda oznaczania potasu w osoczu i surowicy krwi	383
Rumińska A. — patrz Kączkowski J., Reifer I.	315

S

Sarnecka-Keller M. — patrz Noworytko J.	91
Sarnecka-Keller M.	
Sempińska E. , — Badania chromatograficzne hydrolizatów łusek i nukleoproteinów z łusek chorych na łuszczycę	21
Skarżyński B. — patrz Ostrowski W., Niewiarowska A., Żak Z.	115
Supniewski J. — patrz Kamiński S., Mayer J.	249
Szafrański P., Szarkowska L. , — Infiltrowanie drobnoustrojów	199
Szarkowska L. — patrz Szafrański P.	199
Szarkowski J. W. , — Wpływ kwasu octowego na powstawanie kwasu szczawowego w przemianie <i>Mycobacterium phlei</i>	81
Szczepkowski T. , — Nowa metoda wyosabniania i oczyszczania cytochromu	169
Szczepkowski T. W. , — Działanie tlenu azotu na połączenia hematinowe	343
Szot Z. , — Oznaczanie cynku surowicy i krwinek czerwonych	129
Szat Z. , — Zawartość anhidrazy węglanowej i cynku we krwi w stanach zdrowia i choroby	135
Szymona M. , — Powstawanie kwasu pirogronowego w preparacie acetonowym <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	3

T

Tysarowski W. , — Oddychanie <i>Mycobacterium phlei</i>	87
--	----

W

Wasielewska D. — patrz Borowski E., Kryński S., Kuryło-Borowska Z.	389
Wołowski R. — patrz Bielawski W., Żydowo M., Chyrek-Borowska S., Juško J., Manitus A., Niemirow R.	49

Z

Zawielak J. — patrz Działoszyński L. M.	429
Żak Z. — patrz Skarżyński B., Niewiarowska A., Ostrowski W.	115
Żydowo M. — patrz Bielawski W., Chyrek-Borowska S., Juško J., Manitus A., Niemirow R., Wołowski R.	49

I N D E K S R Z E C Z O W Y

A

Adenina: związki w krwi ludzkiej, I. Oznaczenia polarograficzne i spektrofotometryczne we krwi odbiałczonej, Leyko W., Gross S.,	155
Adrenalina: zmiany biochemiczne krwi zdrowego człowieka, III. Wpływ na nieorganiczne jony surowicy, Żydowo M., Bielawski W., Chyrek-Borowska S., Juško J., Manitius A., Niemirowicz R., Wołowski R.,	49
Alkaloidy: tropowe, mikrometoda oznaczania w materiale roślinnym, Reifer I., Buchowicz J.,	187
— — : wstępne badania nad wpływem żelazicyjanku potasu na plon i zawartość w <i>Datura stramonium</i> L., Reifer I., Rumińska A., Kączkowski J.,	315
Aminokwasy: zastosowanie izatyny i jej pochodnych w chromatografii bibułowej, Noworytko J., Sarnecka-Keller M.,	91
Anhydraza węglanowa: zawartość, i cynku we krwi w stanach zdrowia i choroby, Szot Z.	135

B

Bacillus cereus: szczepu „φ”, izolowanie i własności czystej cereiny B ₂ -antybiotyku, Borowski E., Kryński S., Kuryło-Borowska Z. i Wasielewska D.	389
Bakterie: propionowego kwasu, prekursorzy biosyntezy nukleotydocyjanokobalaminy, III. Wpływ działania aureomycyny na syntezę witaminów grupy B ₁₂ , Pawelkiewicz J.,	321
Białko: oznaczanie tanią, turbidymetryczna mikrometoda, Mejbaum-Katzenellenbogen W.,	279

C

Cereina B₂: izolowanie i własności antybiotyku szczepu „φ” <i>Bacillus cereus</i> , Borowski E., Kryński S., Kuryło-Borowska Z., Wasielewska D.	389
Cynk: oznaczanie w surowicy i w krwinkach czerwonych, Szot Z.	129
Cynk: zawartość anhydrazy węglanowej we krwi w stanach zdrowia i choroby, Szot Z.	135
Cytochrom c: nowa metoda wyosabniania i oczyszczania, Szczepkowski T. W.	169
Cytrynowy: kwas, wytwarzanie i zużywanie przez <i>Mycobacterium phlei</i> , Lassota Z.	149

D

Dekstran: badania nad strukturą cząsteczkową, Kaniuga B.,	59
Drobnoustroje: infiltrowanie, Szafranski P., Szarkowska L.,	199

F

Fosfatydy: we frakcjach białkowych surowicy otrzymywanych metodami wysalania i wytrącania metanolem, Dżużyńska J., Bartosiewicz W., Gajzler R.,	175
--	-----

Fosfor: metabolizm prątka gruźlicy, Głębiński T.	73
Fosforowe: związki samorzutnie labilne w kiełkach fasoli, Lassota Z.	223

H

Hematynowe: połączenia, działanie tlenu azotu, Szczepkowski T. W.	343
--	-----

I

Infiltrowanie: drobnoustroje, Szafranski P., Szarkowska L.	199
Izatylna: i pochodne, zastosowanie w chromatografii bibulowej aminokwasów i peptydów, Noworytko J., Sarnecka-Keller M.	91
Izonikotynowy: kwas, wpływ hydrazynu na oddychanie <i>Mycobacterium phlei</i> , Tysarowski W.	87

J

Jabłkowy: kwas, mikrometoda oznaczania, Reifer I.	367
-- : w osoczu i surowicy krwi, polarograficzna mikrometoda oznaczania, Romanowska E.	383

K

Krew: zawartość anhydryzy węglanowej i cynku w stanach zdrowia i choroby, Szot Z.	135
— ludzka: związki adeninowe, I. Oznaczenia polarograficzne i spektrofotometryczne we krwi odbiałzonej, Leyko W., Gross S.	155
Krwinki czerwone: oznaczanie cynku w surowicy, Szot Z.	129

L

Largaktyl: frakcje surowicy krwi, u leczonych chorych, Żydowo M., Kamiński Z.	443
--	-----

Ł

Luszczyca: nukleoproteidy łusek, oznaczanie ilości i badanie składu, Dmochowski A., Drabikowski W.	9
Luszczyca: badanie chromatograficzne hydrolizatów łusek i nukleoproteidów z łusek chorych, Sempłńska E.	21
Luszczyca: (Psoriasis Vulgaris), o tak zwanych β -nukleoproteidach w łuskach, Dmochowski A., Sempłńska E., Kłyszajko L.	33

M

Mycobacterium Tuberculosis: H37Ra, powstawanie kwasu pirogronowego w preparacie acetonowym, Szymona M.	3
— phlei: wpływ kwasu octowego na powstawanie kwasu szczawiowego w przemianie, Szarkowski W. J.	81
— phlei: oddychanie, I. Wpływ hydrazynu kwasu izonikotynowego Tysarowski W.	87
— phlei: wytwarzanie i zużywanie kwasu cytrynowego, Lassota Z.	149
tym nowotworem, Działoszyński L. M., Zawielak J.	429
Surowica: zmiany biochemiczne krwi zdrowego człowieka pod wpływem adrenaliny, III. Wpływ na nieorganiczne jony, Żydowo M., Bielawski W., Chyrek-Borowska S., Juško J., Manitiusz A., Niemiński R., Wołowski R.	49

— : oznaczanie cynku w krwinkach czerwonych, Szot Z.	129
— : fosfatydy we frakcjach białkowych, otrzymywanych metodami wysalania i wytrącania metanolem, Dżułyńska J., Bartosiewicz W., Gajzler R.	175
— : krwi, zawartość potasu u ludzi zdrowych, Manitius A.	231
— : III. Badania nad kompleksem cyjanokobalamina-białko (erytroglobulin). Połączenia witaminu B ₁₂ z białkami, Ostrowski Wł.	297
— : polarograficzna mikrometoda oznaczania potasu w osoczu, Romanowska E.,	383
— : oznaczanie frakcji białkowych metodą biuretową oraz elektroforeza bibułowa, Bielawski W.	409
— : krwi, frakcje u chorych leczonych largaktylem, Zydowo M., i Kamiński Z.	443

T

Tanina: oznaczanie białek, turbidymetryczna mikrometoda, Mejbaum-Katzenellenbogen W.	279
Transforylaza: hamowanie fosfopirogronowej przez adenylozotrójfosforan i pirofosforan, Morawiecki A.	107
Tryptofan: D, L, syntetyczny, Supniewski J., Mayer J., Kamiński S., (i uzupełnienie do pracy w tomie II 1955 r., str. 252—253)	249

W

Wapń: zależność zawartości w surowicy krwi od stężenia białka, Niemirow R.,	213
Witamin B₁₂: połączenia z białkami, II. Rozmieszczenie w strukturach biologicznych, Skarżyński B., Ostrowski W., Niewiarowska A., Żak Z.	115
— : II- synteza nowych pochodnych, prekursorzy biosyntezy nukleotydcyjanokobalaminy, Pawełekiewicz J., Nowakowska K.	259
— : połączenia z białkami, III. Badania nad kompleksem cyjanokobalamina-białko (erytroglobulin) w surowicy krwi, Ostrowski Wł.	297
— : III. Wpływ działania aureomycyny na syntezę, przez bakterie kwasu propionowego. Prekursorzy biosyntezy nukleotydcyjanokobalaminy, Pawełekiewicz J.	321
— B _{12p} Janicki J., Pawełekiewicz J.	329

Z

Żelazocyjanek potasu: wpływ na plon i zawartość alkaloidów w <i>Datura stramonium</i> L., Reifer I., Rumińska A., Kączkowski J.	315
--	-----