

R. RYŚ, L. GORSKI i H. STYCZYŃSKI

**BADANIA NAD POWSTAWANIEM AMONIAKU W ŻWACZU
OWIEC KARMIONYCH RÓŻNYMI DIETAMI**

*Z Instytutu Zootechniki w Krakowie
Kierownik Zakładu: prof. dr Z. Ewy*

W 1891 r. Z u n t z [20] postawił hipotezę, w której przypuszcza, że mikroorganizmy żwacza są zdolne syntetyzować swoje białka z prostych połączeń azotowych, a białko tych mikroorganizmów, trawione w dalszych częściach przewodu pokarmowego przeżuwacza, zostaje przez niego wykorzystane. Od tego czasu ukazało się wiele prac, które poświęcono zagadnieniu częściowego zastąpienia pasz białkowych prostymi połączeniami azotowymi, jak np. mocznikiem. Mocznik jako związek łatwo otrzymywany syntetycznie mógłby mieć w praktyce żywienia duże znaczenie ekonomiczne.

Wykorzystanie mocznika przez bakterie żwacza może przebiegać po uprzednim jego rozłożeniu do amoniaku przez ureazę bakteryjną. W ten sposób bezpośrednim źródłem przyswajalnego azotu dla flory bakteryjnej żwacza jest amoniak. Praca M c D o n a l d a [8], C h a l m e r s a i i n. [4, 5], A n n i s o n i i n. [2], E l - S h a z l e g o [10] i G r a y a i i n. [11] wskazują na to, że amoniak również wytwarza się w żwaczu w warunkach naturalnego żywienia, niekiedy w dość znacznych ilościach. S y m wykazał [19], że mikroflora żwacza jest w stanie przy pomocy enzymów proteolitycznych rozłożyć w żwaczu białka paszy. Dalej M c D o n a l d [8] przedstawił, że u owcy już w 4 godziny po karmieniu 20% azotu kazeinowego zostaje zamienione na amoniak. Według niego azot białkowy, zamieniony w żwaczu na azot amonowy, zostaje znowu wbudowany w białko mikroorganizmów i jako takie jest w dalszych częściach przewodu pokarmowego trawione. W świetle dalszych prac C h a l m e r s a i i n. [4, 5] okazuje się, że nie cały amoniak powstały z kazeiny jest wykorzystywany przez mikroorganizmy żwacza. Autorzy ci wykazali, że jak to już poprzednio słusznie zauważył M c D o n a l d [7], amoniak obecny w żwaczu częściowo przechodzi przez błonę śluzową żwacza do krwio-

biegu. Stwierdzili oni, że zachodzi to nie tylko w przypadku podawania mocznika (Mc Donald), lecz również przy karmieniu paszą złożoną z kazeiny czy mączki rybiej. Ten azot amonowy staje się dla organizmu zwierzęcego bezwartościowy. Dlatego też bilans azotowy brzemiennych owiec o niskim stanie odżywiania wykazał, że kazeina nie zaspokaja zapotrzebowania tych zwierząt na białko [5]. Na podstawie wyników tej pracy autorzy wywnioskowali, że tworzenie się w żwaczu amoniaku z białek może być ważnym czynnikiem decydującym o wartości pokarmowej białek dla zwierząt przeżuwających.

Mc Donald [7] wykazał, że nie cały azot amonowy powstały na skutek proteolizy przechodzi przez błonę śluzową żwacza. Jak wynika z jego dalszej pracy [9], zależy to — jak się wydaje — w dużym stopniu od łatwości, z jaką białko ulega proteolizie. Autor ten wykazał, że przy podawaniu częściowo oczyszczonej diety, w której azot zeiny stanowił 94% całego azotu, została ona w 40-procentach zamieniona na białko mikroorganizmów. Pozostała część zeiny w żwaczu nie uległa zmianie. Nie obserwowano się strat na skutek wchłaniania amoniaku z żwacza. Zeina stosunkowo trudno poddaje się proteolitycznemu działaniu enzymów bakteryjnych w żwaczu. Zatem jest rzeczą prawdopodobną, że przy niskich stężeniach amoniaku w żwaczu, na skutek wolnego przebiegu proteolizy i stosunkowo dużej szybkości wykorzystywania powstającego amoniaku do budowy białka bakteryjnego, nie obserwuje się wchłaniania amoniaku z żwacza do krwi. Świadczyłoby to o pewnej zależności pomiędzy szybkością proteolizy a stopniem wykorzystania przez mikroorganizmy żwacza, powstałego amoniaku.

Przy obecnym stanie badań należy przypuszczać, że nie znamy jeszcze dość dokładnie stosunków panujących w żwaczu. Produkcja amoniaku z mocznika w różnych zestawach paszowych oraz w warunkach naturalnego żywienia, z uwzględnieniem różnych białek, nie jest jeszcze całkowicie poznana. Niniejsze badania mają za zadanie pogłębić wiadomości o powstawaniu amoniaku w żwaczu w przypadku żywienia owiec dietami naturalnymi oraz z dodatkiem mocznika. Pozwoli to nam opracować podstawy do dalszych badań, w których szybkość powstawania i znikania amoniaku z żwacza oraz przechodzenie jego do krwi będą mogły być wskaźnikiem określającym stopień zamiany azotu mocznika na białko bakteryjne, jak również przy jej pomocy będzie można badać czynniki wpływające na rozkład mocznika względnie białek paszowych.

Metody

Badania prowadzono na 4 owcach wagi 40—50 kg z przetoką żwaczową (2 rasy merino-prekoz i 2 rasy cakiel) oraz na 3 owcach z prze-

toką dwunastniczą i żwaczową. W doświadczeniach zastosowano 8 diet. Okres przeddoświadczalny dla każdej diety wynosił 10 dni, po czym następował 3-dniowy okres doświadczalny. Pożywienie podawano w godzinach rannych od 6—10, przy czym niekiedy o godzinie 9.30, czyli na pół godziny przed pobieraniem próbek do oznaczenia podawano białkowy składnik diety (IV dieta). Kazeinę podawano wprost do żwacza, przez przetokę. Paszę dawkowaną opracowano na podstawie tablic Malarskiego [15].

Skład stosowanych diet:

I — dieta (sztuczna) na 1 owcę na dzień wg Loosli [14]

335 g cukru (sacharoza)

532 g skrobi ziemniaczanej

260 g celulozy (w postaci popularnej „ligniny”)

52 g tłuszczu roślinnego (olej rzepakowy)

68 g soli mineralnych

32 g mocznika

Składniki diety w g	II półnatur. z mocznik.	III kontrolna	IV kazeinowa	V zeinowa
siana	500	750	500	500
buraków pastewnych	1000	1000	1000	1000
otrąb pszennych	—	100	—	—
słomy jęczmiennej	400	200	400	200
owśa	—	200	—	—
skrobi ziemniaczanej	115	—	115	—
melasy	230	—	230	—
mielonej kukurydzy	—	—	—	500
kazeiny	—	—	30	—
mocznika	12	—	—	—

VI — dieta ok. 6 kg świeżej trawy (raygrass)

VII — dieta ok. 6 kg zielonej koniczyny

VIII — dieta ok. 2 kg kiszonki.

Po zakończeniu podawania karmy pobierano próbki treści żwacza co godzinę, przez pewien okres czasu, w celu oznaczenia zawartości amoniaku i mocznika. Próbki sączono przez gazę i w przesączu oznaczano amoniak i mocznik metodą Conwaya [6]. Próbki pobrane z kilku miejsc w żwaczu o tej samej godzinie dawały u tej samej owcy prawie identyczne zawartości mocznika i amoniaku. Wobec tego, że podczas karmienia dietami bez dodatku mocznika nie wykazano jego obecności w żwaczu, nie oznaczano w takich przypadkach mocznika w treści żwa-

cza. W czasie doświadczenia oznaczano mocznik i amoniak w krwi pobranej z żyły jarzmowej (*v. jugularis*). Podczas stosowania diety bez dodatku mocznika oznaczenia te przeprowadzano tylko raz w 2 godziny po zakończeniu karmienia. W przypadku diet z dodatkiem mocznika oznaczenie zawartości amoniaku i mocznika w krwi przeprowadzono co dwie godziny. Amoniak w krwi oznaczano nieco zmodyfikowaną metodą Conwaya [6]. Wobec bardzo małych stężeń amoniaku we krwi, w myśl metody Conwaya należy stosować oznaczenie kolorymetryczne za pomocą odczynnika Nesslera. W celu stabilizacji zabarwienia otrzymanego z odczynnikiem Nesslera zastosowano około 2% roztwór gumy arabskiej, który prawdopodobnie działając jako koloid ochronny, przeciwdziała zmętnieniu badanej próbki. Zabarwienie odczytywano w kolorymetrze Pulfricha z przystawką mikro.

Metoda postępowania: w celu wywołania zabarwienia do środkowej komory naczynka dyfuzyjnego Conwaya nalewano 1 ml przygotowanej *ex tempore* mieszaniny 1 ml odczynnika Nesslera, 0,2 ml 2% roztworu gumy arabskiej, 9 ml wody destylowanej wolnej od amoniaku, po czym zaraz kolorymetrowano na grubości warstwy 5 cm, przy filtrze S. 42.

Ograniczony czas karmienia nie zawsze pozwalał owcom na całkowite zjedzenie podanej diety. Wobec tego pozostawały pewne ilości niedojadków, które przeważnie składały się z pasz objętościowych.

W przypadku diety II przeprowadzono również doświadczenie, które miało za zadanie prześledzić proces wchłaniania amoniaku ze żwacza do krwi. Po podaniu pokarmu z mocznikiem pobrano krew z żyły jarzmowej (*v. jugularis*), z żyły żwaczowej (*v. ruminalis*), z żyły wrotnej (*v. portae*) i tętnicy żwaczowej (*a. ruminalis*), po czym oznaczono w pobranych próbkach amoniak i mocznik. Podobne postępowanie przeprowadzono przy karmieniu dietą VI. Pobieranie krwi w tych przypadkach przeprowadzono w narkozie ewipanowej.

W celu przybliżonego zbadania przemian podawanego mocznika przeprowadzono jeszcze doświadczenie na owcach z przetoką żwacza i dwunastnicy. Tym zwierzętom podawano dietę II i co 15 minut oznaczano zawartość amoniaku i mocznika w treści pokarmowej żwacza i dwunastnicy.

Omówienie wyników

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy przedstawiono w tablicach i graficznie. W wykresach i w tablicach poszczególne wartości są średnią wyników z 3 dni doświadczenia dla danej owcy, o tym samym czasie. Na takie uproszczenie można było sobie pozwolić, ponieważ wyniki w po-

szczególnych dniach zbytnio nie odbiegały od siebie. Na przykład tablica 1 przedstawia wyniki zawartości amoniaku w żwaczu przez 3 dni doświadczenia podczas karmienia dietą II w przypadku owcy Nr 1. Można przyjąć, że średnia tych 3 grup wyników będzie z dość dużą dokładnością przedstawiała przeciętny przebieg tworzenia się amoniaku dla danej owcy i diety.

Tablica 1
mg % N amonowego w żwaczu — dieta II — owca nr 1

o godzinie	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
dzień doświadczenia													
1	42,0	39,9	32,2	27,3	22,4	19,5	18,8	16,8	14,3	13,3	12,4	13,3	16,6
2	38,2	36,9	37,7	32,8	25,7	23,3	21,0	19,7	21,1	18,7	15,4	16,2	17,5
3	41,6	37,7	36,2	28,8	25,0	21,2	21,1	18,2	16,8	16,3	16,2	14,3	15,7
średnia	40,6	38,2	35,6	29,9	24,5	21,3	20,3	18,2	17,4	16,1	14,7	14,7	16,6

AMONIAK W ZWACZU

Tablice 1—8 przedstawiają tworzenie się amoniaku w żwaczu owiec po podaniu pokarmu, w zależności od czasu. Na tablicy 2 można obserwować tworzenie się amoniaku, podczas podawania diety sztucznej z mocznikiem, jako jedynym źródłem azotu. Obserwuje się tutaj różnice indywidualne, np. u owcy nr 4, gdzie jest stosunkowo niska zawartość amoniaku w żwaczu. Prawdopodobnie jest to spowodowane zjedaniem mniejszej ilości paszy, na skutek niekorzystnego smaku diety złożonej z mocznika, celulozy (w postaci „ligniny”), oleju i cukru. U owcy tej obserwowano dość znaczne ilości niedojadków. Jest rzeczą zrozumiałą, że mniejsza ilość zjedzonego mocznika pociąga za sobą mniejsze stężenie amoniaku w żwaczu.

Tablica 2
mg % N amonowego w żwaczu — dieta I — średnie wyników z 3 dni

o godzinie	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
owca nr 1	5,6	77,5	87,0	48,0	44,9	17,5	17,7	12,3	7,0	5,6	2,8
2	5,2	47,9	45,0	34,9	30,8	26,1	15,6	15,7	2,1	0,9	2,5
3	3,2	33,6	55,7	48,3	38,7	33,1	23,4	15,8	9,2	5,5	2,8
4	2,8	10,8	13,1	18,9	36,8	28,3	4,3	3,3	2,5	2,8	3,4

Tablica 3 przedstawia tworzenie się amoniaku w żwaczu podczas karmienia dietą II. O godzinie 10 występuje maksymalne stężenie amoniaku, po czym ulega ono, w miarę upływu czasu, obniżeniu. Wg tablicy

Tablica 3
mg % N amonowego w żwaczu — dieta II — średnie wyników z 3 dni

o godzinie	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
owca nr 1	41,6	37,7	36,2	29,8	25,0	21,2	21,2	18,2	16,8	16,5	16,5	14,5	15,0
2	41,1	29,3	23,6	21,2	11,8	10,1	9,0	8,8	7,7	6,7	7,0	7,9	9,3
3	31,3	28,1	21,4	20,0	16,3	13,2	14,8	11,8	12,1	12,9	11,4	11,3	13,0
4	38,7	25,7	16,2	10,8	9,7	8,3	6,7	8,0	8,7	9,4	10,4	5,8	7,5

Tablica 4
mg % N amonowego — dieta II — średnie wyników z 3 dni

o godzinie	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
owca nr 1	17,9	16,2	18,4	18,4	15,0	12,7	9,8	8,1	5,9	5,3	5,8	5,3	6,1
2	9,8	8,6	9,4	8,1	7,7	4,8	3,6	2,2	2,1	1,5	2,9	2,6	3,5

4 podczas karmienia dietą kontrolną widać, że produkcja amoniaku nie jest wysoka. Na podstawie prac Mc Donald'a [8], Chalmers'a [4, 5] i innych [10] należy przypuszczać, że obserwowany w doświadczeniu amoniak powstaje z białka pasz. Maksymalne stężenie amoniaku w żwaczu obserwuje się około godziny 13. W tym czasie widocznie mikroorganizmy w żwaczu wykazują największą działalność proteolityczną. Od godziny 14 obserwuje się zdecydowany spadek stężenia amoniaku w żwaczu. Ogółem stosunkowo niskie stężenie amoniaku w żwaczu należy przypisać małej proteolizie białek, pochodzących w przypadku omawianej diety, głównie z siana. Siano posiadając wysuszone ściany komórkowe i białko protoplazmy pozbawione wody, nie poddaje się prawdopodobnie tak łatwo proteolitycznemu działaniu bakterii żwacza, jak białko protoplazmy świeżej tkanki roślinnej.

Tablica 5
mg % N amonowego — dieta IV — średnie wyników z 3 dni

o godzinie	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
owca nr 1	15,1	12,3	9,1	7,2	7,3	7,1	3,4	4,9	4,6	3,6	3,1	3,8	4,4
2	16,8	14,7	15,2	11,0	7,6	7,3	5,2	5,5	5,5	4,4	3,7	3,2	2,8
3	14,7	20,5	23,4	22,5	17,2	13,4	9,2	7,9	7,6	6,3	6,4	7,2	7,0
4	15,7	15,5	13,3	11,6	7,7	6,6	3,5	4,2	3,4	3,4	3,4	4,2	5,2

Tablica 5 wykazuje, że dieta kazeinowa również nie wywołuje zwiększonej produkcji amoniaku w żwaczu. Jest to sprzeczne z obserwacją Mc Donald'a [8] i Chalmers'a [5]. Należy jednak podkreślić, że

używana w doświadczeniu kazeina kwaśna była bardzo twarda, o pewnej zawartości zjełczałego tłuszczu. W rezultacie tego, bardzo trudno pęczniała w wodzie. W tych warunkach bakteryjny rozkład kazeiny przebiegał opornie i w żwaczu powstawał amoniak w niewielkich ilościach.

Tablica 6

mg % N amonowego — dieta V — średnie wyników z 3 dni

o godzinie	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
owca nr 1	12,9	10,9	6,2	3,7	2,7	2,8	2,2	1,7	1,7	2,4	2,3	1,2	1,6
2	15,1	15,7	9,8	4,9	2,3	1,4	0,9	0,9	0,6	1,1	1,0	0,5	1,3
3	11,2	11,8	7,9	2,3	5,0	1,5	1,0	1,2	1,1	1,4	1,4	1,7	2,3
4	13,4	12,3	10,1	3,7	3,1	1,6	0,9	1,0	1,1	1,4	1,4	2,0	3,5

Tablica 6 reprezentuje stężenie amoniaku w przypadku żywienia kukurydzą, w której białkiem jest zeina. Wobec trudnej rozpuszczalności w wodzie, zeina ciężko poddaje się proteolizie. W przypadku tej diety obserwuje się najniższą produkcję amoniaku, co jest zgodne z badaniami McDonalda [8]. Już około godziny 13 stężenie amoniaku w żwaczu jest znikome.

Tablica 7

mg % N azotu amonowego — dieta VI — średnie wyników z 3 dni

o godzinie	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
owca nr 1	27,8	23,5	15,8	11,2	7,7	6,4	6,5	5,6	7,2	8,2	9,2	10,6	12,0
2	18,1	18,3	10,4	11,0	8,9	12,1	14,5	13,5	14,8	18,1	18,1	20,1	22,0
3	28,7	28,5	21,1	17,6	15,6	15,0	13,7	12,1	12,2	12,1	12,5	14,0	14,7
4	25,4	18,8	12,8	9,9	6,1	6,9	8,1	8,9	8,9	9,3	9,5	10,6	11,3

Tablica 7 przedstawia powstawanie amoniaku podczas karmienia dietą VI tj. zieloną trawą. Obserwuje się w tym przypadku wyższą produkcję amoniaku niż w poprzednich dietach naturalnych. Można to przypisać większej i szybszej proteolizie białek paszy. Najwyższą produkcję amoniaku w żwaczu obserwuje się podczas karmienia zieloną koniczyną (tablica 8).

Obserwowana na tablicy 7 anormalność w powstawaniu amoniaku u owcy nr 2 jest prawdopodobnie wywołana chorobą owcy, która zachorowała w czasie doświadczenia. Należy zatem przypuszczać, że stan chorobowy zwierzęcia wywołuje równoczesną zmianę w procesach zachodzących w żwaczu.

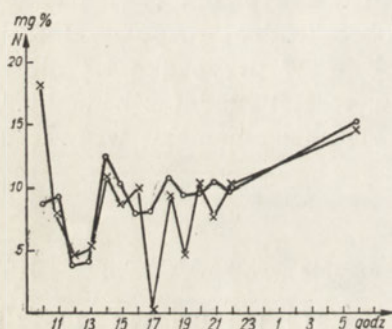
Tablica 8

mg % N amonowego — dieta VII (koniczyna) — średnie wyników z 3 dni

o godzinie	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	8	9	10
											rano nast. dnia		
owca nr 1	46,2	33,6	28,4	23,8	15,9	9,8	6,5	6,1	6,1	7,0	13,5	12,6	11,7
2	46,5	38,3	37,9	37,9	22,8	14,0	8,4	6,1	5,6	5,6	15,8	15,9	14,9
3	61,6	57,8	59,7	46,7	33,1	35,5	24,5	22,0	—	16,3	14,9	11,7	13,1
4	47,6	38,7	36,4	28,9	22,8	16,3	10,2	8,4	7,9	8,4	13,1	13,1	12,6

Uwaga: na następny dzień zwierzęta pokarmu nie otrzymały.

Dla lepszego przedstawienia powstawania amoniaku przy karmieniu paszą zieloną, podajemy na rys. 1 krzywe, które ilustrują powstawanie amoniaku w żwacu, podczas całodniowego karmienia zieloną trawą



Rys. 1. NH_3 w żwacu
dieta VI (zielona trawa) karmienie
całodzienne
owca nr 1 ○—○—
owca nr 4 ×—×—

(raygrass). Widać wyraźnie, że po każdym pobraniu pokarmu zwiększa się stężenie amoniaku w żwacu.

Przy karmieniu dietą VII (tabl. 8) spotyka się stężenie amoniaku tego samego rzędu, jakie obserwuje się podczas podawania diet z mocznikiem (tabl. 3). Jest to prawdopodobnie wynikiem tego, że koniczyna jest bardzo bogata w łatwo strawne białko i dlatego rozkład białek przebiega w szybszym stopniu. Z drugiej strony warto podkreślić fakt, że tak wysokie stężenia amoniaku w żwacu występują w warunkach naturalnych. Należy stąd wnioskować, że dodatek mocznika do paszy, wywołujący podobne stężenia amoniaku jak pasza naturalna, nie może być fizjologicznie szkodliwy. Jest to zgodne z badaniami nad toksycznością mocznika, które wykazały, że dodatek 2—3% mocznika do paszy nie wywołuje zaburzeń w organizmie zwierzęcia [17].

Tablica 9 obrazuje stężenie amoniaku w żwacu podczas karmienia dietą VIII, tj. kiszonką. Tutaj produkcja amoniaku jest także wyższa niż w przypadku diet, w skład których wchodzi siano czy kukurydza. Jed-

Tablica 9

mg % azotu amonowego — dieta VIII (kiszzonka) — średnie wyników z 3 dni

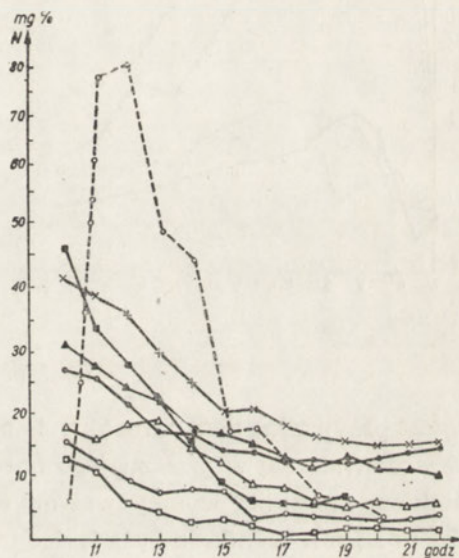
o godzinie	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
owca nr 1	31,6	27,3	24,6	22,0	16,4	16,8	15,2	13,1	12,5	12,8	11,9	11,8	10,9
2	33,3	30,0	24,0	19,9	19,3	16,2	12,0	11,7	10,7	9,7	9,6	9,1	12,3
3	35,7	31,8	23,7	16,4	17,6	15,5	12,6	11,2	9,9	10,2	9,4	8,3	9,3
4	34,0	30,0	26,0	23,8	21,9	15,9	12,7	12,0	7,8	8,7	9,5	8,9	9,4

nakże nie spotyka się wartości obserwowanych podczas podawania świeżej koniczyny. Jest to prawdopodobnie spowodowane stosunkowo małą ilością podawanej kiszonki. Jednakże tutaj dość duża ilość powstałego amoniaku w żwaczu wskazuje na nasilenie procesów proteolitycznych

Rys. 2. NH_3 w żwaczu przy różnych dietach

owca nr 1

- dieta I ○ --- ○ ---
 „ II × --- × ---
 „ III △ --- △ ---
 „ IV ○ --- ○ ---
 „ V □ --- □ ---
 „ VI ● --- ● ---
 „ VII ■ --- ■ ---
 „ VIII ▲ --- ▲ ---

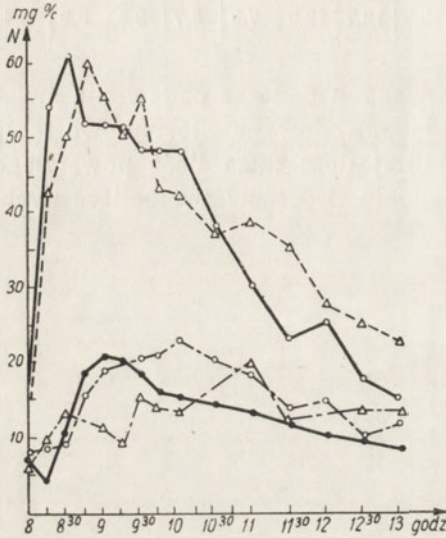


Rys. 2 ilustruje przebieg krzywych tworzenia się amoniaku dla wszystkich stosowanych diet w przypadku owcy nr 1. Obserwuje się wyraźnie, że pasze posiadające białko trudniej rozpuszczalne w wodzie czy to na skutek własności chemicznych (zeina) czy na skutek zmian fizycznych, produkują amoniak w mniejszym stopniu. Zawartość amoniaku w żwaczu przy diecie I dla owcy nr 1 nie reprezentuje przeciętnych wartości dla wszystkich owiec doświadczalnych.

AMONIAK W DWUNASTNICY

Rys. 3 przedstawia stężenie amoniaku równocześnie w żwaczu i dwunastnicy podczas karmienia dietą II. Stężenie amoniaku w żwaczu jest

znacznie wyższe niż w dwunastnicy. Po zakończeniu karmienia stężenie amoniaku w dwunastnicy ustala się na pewnej wysokości. Wykres ten wskazuje, że wbrew sugestiom G o r b a c z j o w e j [12] mocznik względnie powstały z niego amoniak przechodzą jedynie w małym stopniu do niższych partii przewodu pokarmowego.

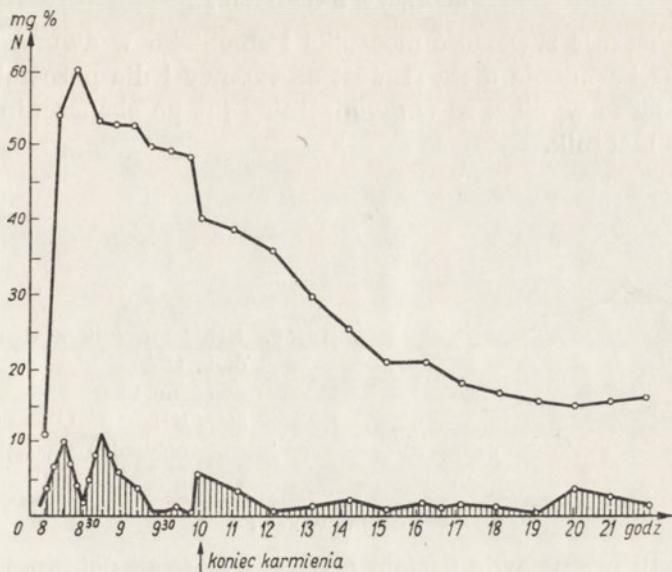


Rys. 3. NH_3 w żwaczku i dwunastnicy dieta II (mocznik)

owca nr 1 żwacz ○—○—
 „ „ 2 „ △---△---
 owca nr 1 dwunastnica ○---○---
 „ „ 2 „ △---△---
 „ „ 3 „ ●—●—

MOCZNIK W ŻWACZU

W przypadku diet naturalnych bez dodatku mocznika praktycznie nie obserwowano się w żwaczku jego obecności. Podczas stosowania diet z dodatkiem mocznika występował on w żwaczku w pewnych ilościach. Przy diecie II, jak wynika z rys. 4, dodany mocznik prawie natychmiast ulega rozłożeniu do amoniaku. Obserwowane w czasie karmienia zawartości mocznika w żwaczku są bardzo niskie. Rys. 4 odnosi się do owcy nr 1, podobnie przedstawiają się dane dla owiec nr 2 i 3. Inaczej zachowuje się mocznik podany z dietą I zestawioną sztucznie. Rys. 5 przedstawia zachowanie się amoniaku i mocznika w przypadku diety I dla owcy nr 1. Należy zaznaczyć, że pokarm zaczęto podawać o godz. 6 rano. Prawie do godz. 13 utrzymują się w żwaczku znaczne ilości mocznika. U pozostałych owiec, również jeszcze o tej porze, obserwowano się dość znaczne ilości mocznika. Wskazuje to na osłabienie procesów ureolitycznych w żwaczku. Prawdopodobnie jest to spowodowane niekorzystnym dla rozwoju mikroflory żwacza zestawem sztucznej diety I.

Rys. 4. NH_3 i mocznik w żwaczu

owca nr 1

dieta II

stęż. NH_3

○ — ○ —

„ mocznika

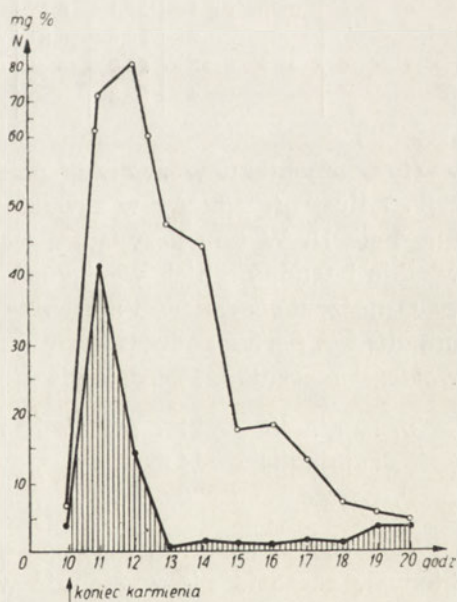
○ ||| ○ |||

Rys. 5. NH_3 i mocznik w żwaczu
dieta I (sztuczna z mocznikiem)
owca nr 1stęż. NH_3

○ — ○ —

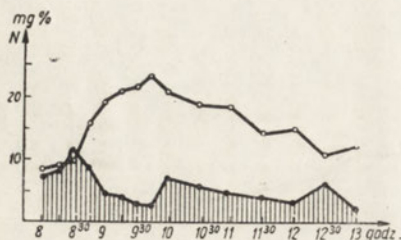
„ mocznika

● ||| ● |||



MOCZNIK W DWUNASTNICY

Rys. 6 obrazuje zawartość mocznika i amoniaku w dwunastnicy owcy nr 1 podczas karmienia dietą II. Jest on typowy i dla pozostałych owiec. Z wykresu jasno wynika, że w dwunastnicy już po skończeniu karmienia jest obecny mocznik.



Rys. 6. NH_3 i mocznik w dwunastnicy
dieta II
owca nr 1
stęż. NH_3 ○ — ○ —
„ mocznika ● ■■■■ ● ■■■■

MOCZNIK W KRWI

Tablica 10 przedstawia poziom mocznika w krwi pobranej z *vena jugularis* o godz. 13, tj. w 3 godziny po zakończeniu karmienia. Na tablicy jest widoczne, że w przypadku diet, w których obserwowano wysoką za-

Tablica 10

Mocznik w krwi pobranej z żyły jarzmowej o godz. 13, mg % N

dieta	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
owca nr 1	25,1	6,1	8,2	5,1	17,6	22,5	22,9
2	22,6	6,8	7,9	5,0	19,8	22,7	23,8
3	22,7	—	9,6	4,2	21,3	23,3	22,9
4	22,3	—	8,8	8,7	20,1	26,1	23,0

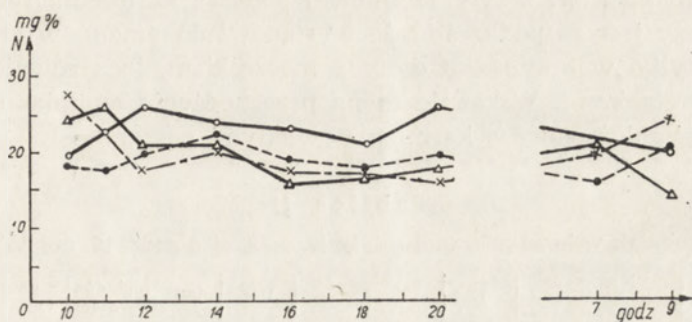
wartość amoniaku w żwacu, poziom mocznika w krwi jest wyższy. Rys. 7 ilustruje zmiany w zawartości mocznika w krwi podczas karmienia dietą II. W tym przypadku wahania w zawartości mocznika są niewielkie i trudno z nich wyciągnąć jakieś wnioski.

Oznaczenie zawartości mocznika w krwi pobranej z *v. ruminalis*, *a. ruminalis* i *v. portae* podczas karmienia dietą VI wskazują na różnice w zawartości mocznika. Przedstawia się to następująco:

<i>v. ruminalis</i>	21,7 mg % N	mocznikowego
<i>a. ruminalis</i>	14,5	„ „ „ „
<i>v. portae</i>	20,5	„ „ „ „

Jest rzeczą ciekawą, dlaczego w przypadku karmienia dietą zieloną, kiedy w zasadzie nie występuje w żwacu mocznik, obserwuje się róż-

nice w stężeniu mocznika w krwi. Wskazywałyoby to na istnienie pewnych mechanizmów na odcinku między żwaczem a wątrobą, które posiadałyby zdolność natychmiastowej zamiany amoniaku do mocznika. Świadczy o tym różnica w zawartości mocznika w krwi pobranej z tętnicy i żyły żwaczowej.



Rys. 7. Mocznik w krwi z żyły jarzmowej dieta II

owca nr 1 ○ — ○ — ○
 „ 2 △ — △ — △
 „ 3 ● - - ● - - ●
 „ 4 × - - × - - ×

AMONIAK W KRWI

Badania Mc Donald'a [7] i Chalmers'a i innych [5] wykazały, że u przeżuwaczy, powstały w żwaczu amoniak przenika do krwioobiegu. Najwyższe stężenie amoniaku w krwi obserwuje się w próbce pobranej z żyły żwaczowej. Badano zawartość amoniaku w krwi z *v. ruminalis*, *v. portae* i *v. jugularis* przy karmieniu dietą II i IV i uzyskano następujące wyniki:

przy diecie II

<i>v. ruminalis</i>	0,9	mg	%	N	amonowego
<i>v. portae</i>	0,63	„	„	„	„
<i>v. jugularis</i>	0,22	„	„	„	„

przy diecie VI (świeża trawa)

<i>v. ruminalis</i>	0,32	mg	%	N	amonowego
<i>a. ruminalis</i>	0,03	„	„	„	„
<i>v. portae</i>	0,3	„	„	„	„
<i>v. jugularis</i>	0,16	„	„	„	„
w żwaczu	23	„	„	„	„

Z przytoczonych wyników widać wyraźnie, że najwyższe stężenie amoniaku w krwi występuje w żyły żwaczowej. W krwi obwodowej pobra-

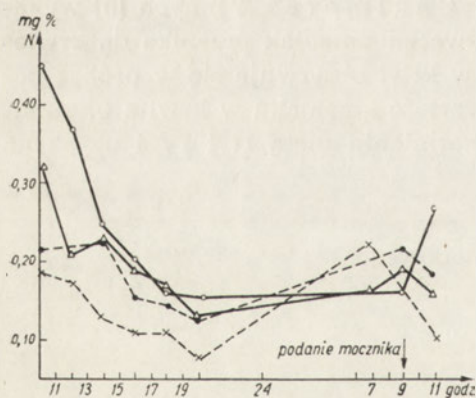
nej z żyły jarzmowej zawartość amoniaku ulega obniżeniu. Dzieje się to na skutek wychwytywania amoniaku przez tkankę wątroby i zamiany jego na mocznik albo na skutek mieszania się krwi z żyły żwaczowej z krwią obwodową. Wobec tego, że krew z żyły jarzmowej w pewnym stopniu odzwierciedla przechodzenie amoniaku z żwacza do krwi, badano poziom amoniaku krwi z żyły jarzmowej podczas karmienia różnymi dietami. Należy jeszcze podkreślić, że występowanie amonu w krwi występuje nie tylko w przypadku diety z mocznikiem, lecz również podczas spasanania zielonkami. Wskazuje to na przechodzenie amoniaku z żwacza do krwi, również podczas karmienia zielonymi paszami.

Tablica 11

Amoniak w krwi pobranej z żyły jarzmowej o godz. 12, mg % N

dieta	II	IV	VI	VII	VIII	głodówka po dziecie VII
owca nr 1	0,48	0,04	0,12	0,19	0,17	—
2	0,21	0,06	0,13	0,18	0,11	—
3	0,23	0,04	0,13	0,17	0,10	0,17
4	0,18	0,03	0,10	0,12	0,16	0,16

Tabl. 11 ilustruje zawartość N amonowego w przypadku różnych diet. Widać z niej, że podobnie jak w przypadku mocznika, ze wzrostem stę-



Rys. 8. Amoniak w krwi (średnie z 3 dni)

dieta II

- owca nr 1 ○ — ○
 „ 2 △ — △
 „ 3 ● — ●
 „ 4 × — ×

żenia amonu w żwaczu wzrasta zawartość amonu w krwi obwodowej. W przypadku diet nie zamieszczonych na tablicy, amoniaku w krwi nie stwierdzono. Rys. 8 przedstawia poziom azotu amonowego w krwi podczas podawania diety II. Zawartość azotu amonowego w krwi w tym przypadku ulega stosunkowo małym wahaniom. W niektórych przypadkach obserwuje się wzrost stężenia amoniaku w krwi podczas karmienia.

Z tych obserwacji wynika, że również białko pasz zielonych na skutek stosunkowo szybkiej proteolizy jest przez organizm przeżuwacza w pewnym stopniu niewykorzystane. Należy zaznaczyć, że przechodzenie azotu amonowego w tym przypadku zachodzi już przy niskiej zawartości azotu amonowego w żwaczu (23% mg^{0/0}). Jak z tablicy 8 wynika, obserwowane stężenia azotu amonowego w żwaczu owiec karmionych paszami zielonymi są często znacznie wyższe. W takich momentach można oczekiwać, że przenikanie amoniaku z żwacza do krwi przebiega w znacznie wyższym stopniu.

PRZEMIANY MOCZNIKA W PRZEWODZIE POKARMOWYM

Na podstawie omówionych wyżej wyników można prześledzić los mocznika podanego owcy w paszy. Najbardziej interesującą rzeczą jest, w jakim stopniu mocznik jest wykorzystany do budowy białka bakteryjnego. W naszym przypadku postaramy się przeprowadzić próbę bardzo schematycznego bilansu podanego azotu mocznikowego.

Przedstawia się on w sposób następujący: z paszą diety II podano 12 g mocznika. Maksymalne stężenie amoniaku w żwaczu wynosi około 60 mg % N, co odpowiada, przyjmując pojemność żwacza około 10 l, mniej więcej 6000 mg N. Przeliczając ten azot na mocznik otrzymujemy mniej więcej 12 g mocznika. O godz. 13 stężenie amoniaku w żwaczu wynosi około 20 mg % N, co stanowi 1/3 pierwotnej wartości, czyli mniej więcej 4 g mocznika. Reszta tego azotu mogła przejść z żwacza do krwiobiegu, podnosząc stężenie amoniaku i mocznika w krwi obwodowej, część mogła przejść do niższych partii przewodu pokarmowego, a część mogła ulec zamianie na azot białkowy, na skutek działalności mikroflory żwacza. Przeciętny wzrost amonu w dwunastnicy wynosi około 15 mg % w stosunku do pozycji wyjściowej (rys. 6).

Uwzględniając obserwacje S t y c z y ń s k i e g o [18] można przyjąć, że w okresie 5 godzin od początku karmienia przechodzi mniej więcej 3 litry treści pokarmowej do dwunastnicy. Odpowiada to około 1 g mocznika, co stanowi mniej więcej 8% podanego z pokarmem mocznika. Zatem 12 g minus 4 g (tj. pozostałość w żwaczu) i minus 1 g (tj. część, która przeszła do dwunastnicy) wynosi 7g. Ilość ta została częściowo wchłonięta ze żwacza, częściowo została zamieniona na białko mikroorganizmów. Na pytanie, jaka ilość azotu amonowego uległa wchłonięciu z żwacza do krwi, można odpowiedzieć na podstawie obserwacji zawartości mocznika i amoniaku w krwi. Z tabl. 10 możemy wnioskować, że wzrost zawartości mocznika w krwi w przypadku diety II wynosił 15 mg % N, co odpowiada 1 g mocznika, przyjmując w przypadku owcy obecność w naczyniach 3 litrów krwi. Obserwowany wzrost amoniaku w krwi, mniej więcej 0,2 mg % N, stanowi bardzo nikły procent całości rozpatrywanego azotu.

Odpowiada to mniej więcej 0,12 g mocznika. W myśl przytoczonych powyżej rozważań, zresztą bardzo niedokładnych, można by pozostałe 6,99 g mocznika uważać za zamienione na białko przy współudziale mikroflory żwacza. Ta wartość jednak wydaje się być za wysoka, ponieważ nie uwzględniono w tym pobieżnym bilansie mocznika przechodzącego z krwi do moczu. Na pewno jest to ilość poważna. Niestety obserwacji takich nie przeprowadzono. W każdym razie z tych przybliżonych obliczeń wynika, że pewna ilość N mocznika znika z przemian mocznik-amoniak i jest to prawdopodobnie wynikiem syntezy białek bakteryjnych. Do podobnych wniosków syntezy białka z mocznika doszli także inni badacze, którzy jednak udowodnili to na drodze czy to bilansu azotu [13], czy obserwacji wzrostu azotu białkowego w żwaczu podczas karmienia dietą z dodatkiem mocznika [1], czy też przez obserwacje produktywności zwierząt karmionych dodatkiem mocznika [16].

Autorzy dziękują prof. dr W. M o z o ł o w s k i e m u za wskazówki udzielone przy opanowaniu metody C o n w a y a.

Streszczenie

1. Wykazano, że stężenia amoniaku w żwaczu owiec są wyższe w przypadku zielonych pasz soczystych i w przypadku diet z dodatkiem mocznika niż w przypadku takich pasz, jak siano, kukurydza, owies i inne.

2. Zawartość amoniaku w treści żwacza w przypadku skarmiania diety z dodatkiem mocznika i w przypadku zielonek były podobne.

3. Potwierdzono obserwacje innych autorów [5, 7] o przechodzeniu amoniaku z żwacza do krwiobiegu.

4. Wykazano, że przechodzenie amoniaku z żwacza do krwi zachodzi również podczas karmienia zielonkami.

5. Wykazano, że wyższej zawartości amoniaku w żwaczu odpowiada wyższa zawartość amonu i mocznika w krwi.

6. Na podstawie schematycznego bilansu azotu podawanego z dietą mocznika wykazano, że pewna część tego azotu znika z przemian mocznik-amoniak na odcinku żwacz-dwunastnica, co tłumaczy się wykorzystaniem tego azotu do budowy białka bakteryjnego.

LITERATURA

- [1] Agrawala P., Duncan W., Huffman F. J., *J. Nutrition* **49**, 29, 1953.
- [2] Annison E. F., Chalmers M., Marschall S. B., Syngé R. L., *J. Agric. Sci.* **44**, 270, 1954.
- [3] Arias C., Burreugh's W., Gerlach P., Benthke R. M., *J. Anim. Sci.* **10**, 683, 1951.

- [4] Chalmers M. T., Syngge R. L. M., *J. Agric. Sci.* **44**, 263, 1954.
- [5] Chalmers M. T., Cuthberston D. P., Syngge R. L., *J. Agric. Sci.* **44**, 254, 1954.
- [6] Conway E. J., *Micro-diffusion analysis and volumetric error*, Crosby Lockwood-London 1947.
- [7] McDonald I. W., *Biochem. J.* **42**, 584, 1948.
- [8] McDonald I. W., *Biochem. J.* **51**, 86, 1952.
- [9] McDonald I. W., *Biochem. J.* **56**, 120, 1954.
- [10] El-Shazly K., *Biochem. J.* **51**, 640, 1952.
- [11] Gray F. V., Pilgrim A. F., *Nature* **178**, 94, 1956.
- [12] Gorbaczjowa A. P., Leonowicz W. W., Bogdanowa J. M., *Trudy Wsiesojuznogo Nauczno-Issledowatielskogo Instituta Ziwtotnowodstwa* **18**, 1950.
- [13] Harris L. E., Mitschall H. H., *J. Nutrition* **22**, 167, 1941.
- [14] Loosli J. K., Williams H. H., Thomas W. E., Perris F. H., Maynard L. A., *Science* **110**, 144, 1944.
- [15] Malarski H., *Wskazówki dla układania dawek pokarmowych*, Warszawa 1954, PIWRiL, wyd. II.
- [16] Owen E. C., Smith I. A. B., Wright N. C., *Biochem. J.* **37**, 44, 1943.
- [17] Repp W. W., Hale W. H., Cheng E. W., Burreughs W., *J. Anim. Sci.* **1**, 118, 1955.
- [18] Styczyński H., w druku.
- [19] Sym F. A., *Acta Biol. Exp.* **12**, 192, 1938.
- [20] Zuntz N., *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **49**, 483, 1891, wg poz. 8.

ИССЛЕДОВАНИЯ ОБРАЗОВАНИЯ АММИАКА В РУБЦЕ ОВЕЦ, СОДЕРЖИМЫХ НА РАЗНЫХ ДИЭТАХ

Резюме

1. Исследования показали, что концентрации аммиака в рубце овец в случае сочных зеленых кормов и в случае диеты с прибавкой мочевины являются более высокими, чем в случае таких кормов, как сено, кукуруза, овес и др.

2. Содержание аммиака в содержимом рубца в случаях применения диеты с мочевиной и в случаях зеленых кормов было сходным.

3. Исследования подтвердили наблюдения других авторов [5], [7] относительно перехода аммиака из рубца в кровообращение.

4. Исследования показали, что переход аммиака из рубца в кровь происходит также во время кормления зелеными кормами.

5. Показано, что высшему содержанию аммиака в рубце соответствует более высокое содержание аммония и мочевины в крови.

6. На основании схематического баланса азота, вводимого при диете с мочевиной установлено, что известная часть этого азота исчезает из обмена мочевино-аммиак на отрезке рубец-двенадцатиперстная кишка, что объясняется использованием этого азота для построения бактериального белка.

STUDIES ON THE FORMATION OF AMMONIA IN THE RUMEN OF SHEEP
FED WITH VARIOUS DIETS

S u m m a r y

1. It has been shown, that the concentrations of ammonia in the rumen of sheep were higher following feeding with green succulent fodder and with rations with supplemental urea than with hay, corn, oats, etc.

2. The ammonia contents of the rumen, by fed with supplemental urea or with green fodder, were similar.

3. The observations of other authors [5, 7] concerning the passage of ammonia from rumen in blood circulation were confirmed.

4. It was shown, that the passage of ammonia from rumen in the blood-circulation occurs also by feeding with green fodder.

5. It was demonstrated, that higher ammonia contents in rumen are associated with higher contents of ammonia and urea in blood.

6. On the ground of schematic nitrogen balance of supplemental urea in diet it was shown, that certain part of urea nitrogen disappeared between rumen and duodenum, which is explained by the fact that it was used by bacteria in rumen for protein synthesis.

Otrzymano 27.12.1956 r.

I. REIFER i S. NIZIOŁEK

KOLORYMETRYCZNA MIKROMETODA OZNACZANIA ALKALOIDÓW W NASIONACH ŁUBINU

Zakład Biochemii S.G.G.W. w Warszawie

Kierownik: prof. dr I. Reifer

Wstęp

W ostatnich latach coraz częściej stosowane są metody oznaczania alkaloidów przy użyciu wskaźników barwnych. Metody te opierają się na tworzeniu związków zasad alkaloidowych ze wskaźnikami w organicznych rozpuszczalnikach. Reakcja ta stanowi jedną z najczulszych metod oznaczania zasad azotowych.

W 1940 r. Prudhomme [11] opracował kolorymetryczną metodę oznaczania zasad chininowych, opartą na reakcji tych alkaloidów z eozyną. Lehman i Aitken [9] w 1942 r. wykryli podobną reakcję między N-metylo-4-fenyl-4-karboetoksypiperidyną (demerol) i błękitem metylenowym. Marshall i Rogers [10] w 1945 r. przystosowali reakcję z błękitem bromotymolowym do oznaczania alkaloidów kory chinowej, a Brodie i Udenfriend [3] wprowadzili do metody oznaczania tych alkaloidów w płazmie i moczu, w miejsce błękitu bromotymolowego, oranż metylowy. Gettler i Sunshine [6] zmodyfikowali reakcję z oranżem metylowym i przystosowali ją do ilościowego oznaczania alkaloidów w organizmie ludzkim, np. nikotyny.

Według El Darawy i Tompesta [4] koniecznymi warunkami użycia danego wskaźnika do kolorymetrycznego oznaczania alkaloidów są: a) kwaśny odczyn roztworu wskaźnika, b) dobra rozpuszczalność w organicznych rozpuszczalnikach, c) wskaźnik powinien reagować z zasadą alkaloidową stechiometrycznie, dając sól dobrze rozpuszczalną w organicznych rozpuszczalnikach, d) alkaloid powinien być dobrze rozpuszczalny w organicznych rozpuszczalnikach, e) rozpuszczalnik organiczny powinien się bardzo słabo mieszać z wodą i mieć możliwie wysoki punkt wrzenia.

Poza wyżej wymienionymi do kolorymetrycznego oznaczania alkaloidów mogą być używane i inne wskaźniki, jak np. purpura bromokrezolowa, błękit bromofenolowy, zieleń bromokrezolowa, żółcień metanilowa. W rozpuszczalnikach organicznych, np. benzenie, dwuchlorku etylenu, eterze, wymienione wskaźniki dają z alkaloidami barwne związki.

Stwierdzono, że alkaloidy łubinowe jako wolne zasady dają reakcję z oranżem metylowym. Powstający związek jest dobrze rozpuszczalny w chloroformie. Reakcję tę wykorzystano w niniejszej pracy do opracowania kolorymetrycznej mikrometody oznaczania czterech podstawowych alkaloidów łubinowych.

Głównymi alkaloidami łubinu żółtego (*L. luteus*) są: lupinina i sparteina, a łubinu białego (*L. albus*) i wąskolistnego (*L. angustifolius*) są: lupanina i hydroksylupanina. Według niektórych autorów [8], [14] obok wymienionych mogą występować w łubinach w mniejszych ilościach jeszcze inne alkaloidy, którymi nie zajmowano się ze względu na brak ich charakterystyki.

Część doświadczalna

Zasada metody. Metoda polega na ilościowym wyekstrahowaniu alkaloidów z materiału łubinowego i oznaczeniu w otrzymanym wyciągu sumy oraz jednego z dwu alkaloidów po ich rozdzieleniu. Do kolorymetrycznego oznaczenia wykorzystuje się stechiometryczną reakcję między oranżem metylowym a zasadami alkaloidowymi w roztworze chloroformowym. Po dodaniu zakwaszonego etanolu oznacza się stężenie oranżu metylowego, a pośrednio alkaloidów.

1. ODCZYNNIKI

1) Około 5 N wodorotlenek sodowy, 2) eter naftowy (p. wrz. 30—60° oczyszczony i przedestyłowany znad bezw. chlorku wapnia), 3) chloroform (oczyszczony i przedestyłowany znad bezw. chlorku wapnia), 4) roztwór oranżu metylowego: (a) 500 mg oranżu metylowego rozpuszcza się w 100 ml wody, ogrzewając 20 min. w temp. 40° i po ostudzeniu sączy, (b) nasycony roztwór kwasu borowego. Odczynnik a i b zmieszać w stosunku 1 : 1, 5) zakwaszony etanol: 2 ml stęż. H_2SO_4 w 100 ml bezwodnego etanolu, 6) nasycony roztwór węglanu sodowego.

W pracy posługiwano się lupinina firmą Merck, siarczanem sparteiny ($BH_2SO_4 \cdot 5H_2O$) CEFARM—Warszawa; lupaninę ($B \cdot HCl \cdot 2H_2O$ o t. t. 127°) i hydroksylupaninę ($B \cdot 2HCl \cdot 2H_2O$ o t. t. 272°) wyizolowano w naszej pracowni z nasion łubinu wąskolistnego.

2. OZNACZANIE ALKALOIDÓW W CZYSTYCH ROZTWORACH I WYCIĄGACH ŁUBINOWYCH

Oznaczenie lupininy albo lupaniny w oczyszczonych wyciągach łubinowych wymaga uprzedniego oddzielenia ich od alkaloidów towarzyszących (patrz. str. 172 i 176).

Wykonanie. Do suchego rozdzielacza o poj. 100 ml pipetuje się 5 ml wodnego roztworu alkaloidów, 0,2 ml wodorotlenku sodowego, 5 ml chloroformu i silnie wytrząsa w ciągu ok. 1 min. Po rozdzieleniu fazę chloroformową zbiera się przez mały sącdek z waty do cylindra miarowego z doszlifowanym korkiem. Ekstrakcję za pomocą 5 ml chloroformu powtarza się 3 razy, zbiera się razem fazy chloroformowe, po czym uzupełnia się chloroformem do 20 ml, miesza i przenosi do drugiego rozdzielacza. Wyciąg chloroformowy nie powinien zawierać wody. Następnie dodaje się 0,2 ml roztworu oranżu metylowego i wytrząsa przez ok. 3 min. i pozostawia na chwilę dla oddzielenia się wolnego oranżu metylowego. Przenosi się całość lub część barwnego roztworu chloroformowego (bez oranżu metylowego) do suchej probówki wirówkowej i wiruje w ciągu ok. 1 min. przy 2000 obr./min., w celu dokładnego oddzielenia niezwiązane go oranżu metylowego. Odmierza się suchą pipetą 5 ml roztworu chloroformowego do suchej probówki kolorymetrycznej i dodaje 1 ml zakwaszonego etanolu. Intensywność zabarwienia odczytuje się w fotokolorymetrze przy zielonym filtrze wobec próby ślepej zawierającej tylko odczynniki. Ślepą próbę wykonuje się w ten sam sposób, jak i próbę pełną, używając wody zamiast badanego roztworu. Przy czystych odczynnikach, a zwłaszcza chloroformie, ślepa daje 100% przepuszczalności.

W tablicach 1, 2, 3, 4 zestawiono wyniki otrzymane dla czystych roztworów alkaloidów w przeliczeniu na wolne zasady. W oznaczeniach na czystych roztworach, w rubryce „zawartość alkaloidów”, podana jest ilość alkaloidów w 5 ml kolorymetrowanego roztworu chloroformowego. Dla każdego z podanych poziomów wykonano kilkanaście pełnych oznaczeń. Ze względu na dużą zgodność otrzymanych wyników dla uproszczenia podajemy średnie arytmetyczne ekstynkcji.

Dla zestawionych wyników w tablicach 1—4, wyliczono przeciętne odchylenie od średniej arytmetycznej na 1 μg alkaloidu. Przeciętne odchylenie od średniej arytmetycznej, wyrażone w % na 1 μg alkaloidu wyliczono jako współczynnik regresji odchyłeń w % w stosunku do stężenia alkaloidu. Przytoczone współczynniki korelacji (m) określają stopień zaufania do odpowiadającego mu przeciętnego odchylenia. Odchylenie przeciętne wynosi dla: sparteiny: -0,09 ($m = 0,61$), lupininy: -0,045 ($m = 0,22$), lupaniny: -0,137 ($m = 0,58$), hydroksylupaniny -0,068 ($m = 0,48$). Oznacza to, że przyrost stężenia alkaloidu o 1 μg w kie-

Tablica 1

Wyniki oznaczeń sparteiny w czystych roztworach

μg sparteiny w 5 ml	$\log I_0/I$ (średnia)	Ekstynkcja 1 μg sparteiny w 1 ml
22,2	0,538	0,121
16,7	0,415	0,124
13,3	0,347	0,130
11,1	0,289	0,130
6,7	0,177	0,132
5,5	0,145	0,132
2,8	0,071	0,127
1,4	0,036	0,129

Tablica 2

Wyniki oznaczeń lupininy w czystych roztworach

μg lupininy w 5 ml	$\log I_0/I$ (średnia)	Ekstynkcja 1 μg lupininy w 1 ml
18,8	0,527	0,140
12,5	0,390	0,156
9,4	0,297	0,158
6,3	0,204	0,162
4,7	0,152	0,162
2,4	0,078	0,162
1,2	0,039	0,162

Tablica 3

Wyniki oznaczeń lupaniny w czystych roztworach

μg lupaniny w 5 ml	$\log I_0/I$ (średnia)	Ekstynkcja dla 1 μg lupaniny w 1 ml
29,0	0,557	0,096
14,9	0,317	0,109
7,2	0,160	0,111
5,8	0,128	0,110
3,6	0,080	0,111
2,9	0,063	0,109
1,8	0,030	0,108

runku od niskich stężeń do wyższych (w podanych granicach) powoduje obniżenie średniego błędu, dla sparteiny o 0,09%, lupininy o 0,045% itd.

Tablica 4

Wyniki oznaczeń hydroksylupaniny w czystych roztworach

μg hydroksylupa- niny w 5 ml	$\log I_0/I$ (średnia)	Ekstynkcja dla 1 μg hydroksylupaniny w 1 ml
18,6	0,328	0,088
14,9	0,293	0,098
9,3	0,184	0,099
7,4	0,148	0,100
4,6	0,092	0,100
2,3	0,048	0,104
1,2	0,025	0,104

W tablicach 1—4 podano również ekstynkcję dla 1 μg alkaloidu w 1 ml. Z danych tych wynika, że są one zgodne z prawem Beera-Lamberta w granicach stężeń: sparteina i lupinina w zakresie od 0,2 do 2,6 μg , lupanina i hydroksylupanina od 0,2 do 3,0 μg w 1 ml roztworu chloroformowego.

3. EKSTRAKCYJA ALKALOIDÓW Z ŁUBINU

Najistotniejszym momentem przy oznaczaniu alkaloidów w materiale łubinowym jest prawidłowe przeprowadzenie ekstrakcji i oczyszczanie badanego wyciągu. W literaturze można spotkać wiele metod ekstrakcji i oczyszczania wyciągów. Podkreśla się [2, 7, 12, 13] duże znaczenie właściwego rozdrobnienia badanego materiału, ponieważ alkaloidy gromadzą się głównie w wakuolach komórek i mechaniczne ich zniszczenie umożliwi ilościowe wymycie alkaloidów. W naszej pracowni nasiona łubinu mielono na młynku typu „Junior laboratory mill”, a następnie przesiewano przez sito o średnicy oczek 0,075 mm.

Znane są dwa typy ekstrakcji alkaloidów. Jeden rodzaj to kwaśna ekstrakcja wodna lub alkoholowa, która obecnie jest mało stosowana ze względu na trudności całkowitego wymycia alkaloidów. Drugi rodzaj to alkaliczna ekstrakcja chloroformem, eterem lub ich mieszaniną w różnych stosunkach. Do alkalizacji bywają stosowane: wodorotlenek sodowy i potasowy, węgiel sodowy i amoniak.

Ze względu na rozpuszczalność alkaloidów zarówno w wodzie (z wyjątkiem sparteiny), jak i organicznych rozpuszczalnikach, materiał przed ekstrakcją należy odvodnić. W tym celu bywa stosowany gips, bezwodny węgiel sodu, bezwodny siarczan sodu, ziemia krzemkowa. Wie w i ó r o w s k i i B r a t e k [14] stwierdzili, że użycie gipsu, bezwodnego siarczanu sodowego oraz węglanu sodowego powoduje adsorpcję części alkaloidów, których nie można wyekstrahować chloroformem. W pracy naszej nad ekstrakcją alkaloidów łubinowych potwierdzono adsorpcyjne własności bezwodnego węglanu sodowego; wielkość adsorpcji zależy od ilości

użytego węglanu do osuszenia. Uzyskane wyniki zestawiono w tabelicy 5. Spadek wydajności ekstrakcji alkaloidów, przy zwiększeniu ilości użytego węglanu sodu z 1,5 do 5 g, wynosi około 30%, przy mniejszych ilościach węglanu adsorpcja jest niewielka.

Tabelica 5

Wpływ bezw. węglanu sodowego na ekstrakcję alkaloidów z łubinu wąskolistnego

Ilość użytego węglanu sodowego w gramach	Wyniki oznaczeń w $\log I_0/I$	
	I próba	II próba
1,5	0,244; 0,252; 0,256	0,229; 0,233; 0,233
3,0	0,248; 0,248; 0,244	0,248; 0,252; 0,248
5,0	0,171; 0,171; 0,180	0,177; 0,180; 0,187

Osuszony materiał poddaje się ekstrakcji, którą można przeprowadzić w kolumnach ekstrakcyjnych lub przez mechaniczne wytrząsanie z rozpuszczalnikami organicznymi. Ze względu na prostsze i szybsze wykonanie przyjęto ekstrakcję przez półgodzinne mechaniczne wytrząsanie z chloroformem. Przeprowadzono porównanie ekstrakcji metodą opisaną przez Wiewiórowskiego i Bratek [14] z ekstrakcją opisaną w niniejszej pracy. Otrzymane wyniki zestawiono w tabelicy 6, wskazując one, że nie ma praktycznie żadnych różnic w wydajności ekstrakcji alkaloidów między tymi dwiema metodami.

Tabelica 6

Ekstrakcja alkaloidów z łubinu wąskolistnego różnymi metodami

Próbki	Wyniki oznaczeń w $\log I_0/I$	
	ekstrakcja metodą kolumnową	ekstrakcja metodą opisaną
I	0,301; 0,310	0,301; 0,310
II	0,301; 0,310	0,293; 0,301
III	0,319; 0,310	0,305; 0,305

Otrzymany wyciąg chloroformowy zawiera oprócz alkaloidów duże ilości zanieczyszczeń, jak tłuszcze, barwniki, glikozydy, węglowodany i inne [2], które należy usunąć przed oznaczaniem alkaloidów. W pracy nad oczyszczaniem wyciągów łubinowych stwierdzono, że jednorazowe oczyszczanie, stosowane przez wielu autorów, jest niewystarczające. Wyniki zestawione w tabelicy 7 potwierdzają konieczność dwukrotnego oczyszczania wyciągów. Trzykrotne nie zmienia już uzyskiwanych wyników.

Tablica 7

Wyniki oznaczeń alkaloidów w zależności od oczyszczenia wyciągu chloroformowego

Oczyszczanie	Ekstrakcja metodą opisaną wyżej			Ekstrakcja metodą kolumnową		
	Wyniki oznaczeń log I ₀ /I	średnia	różnica w % ^o *)	Wyniki oznaczeń log I ₀ /I	średnia	różnica w % ^o *)
Bezpośrednio	0,301; 0,310	0,305	—	0,301; 0,310	0,305	—
1 ×	0,301; 0,310	0,305	0,0	0,297; 0,293	0,295	— 3,3
2 ×	0,252; 0,252	0,252	— 17,4	0,237; 0,237	0,237	— 19,7
3 ×	0,260; 0,252	0,256	— 16,1	0,244; 0,244	0,244	— 18,0
Bezpośrednio	0,301; 0,293	0,297	—	0,301; 0,310	0,305	—
1 ×	0,297; 0,293	0,295	— 0,7	0,297; 0,293	0,295	— 3,3
2 ×	0,248; 0,252	0,250	— 15,3	0,244; 0,240	0,242	— 18,0
3 ×	0,252; 0,252	0,252	— 14,6	0,240; 0,240	0,240	— 18,7

*) W odniesieniu do bezpośredniego oznaczenia

Wykonanie. 0,5 g przesianej mąki łubinowej rozciera się z 0,7 ml stęż. amoniaku w moździerzu o średn. ok. 6 cm przez 30 min. (z przerwami). Następnie dodaje się porcjami odpowiednią ilość ziemi krzemkowej (ok. 1 g), uprzednio wyprażonej przez 3 godz. w tem. 250^o i uciera do otrzymania sypkiego, optycznie suchego proszku, który przenosi się do suchego cylindra na 50 ml z korkiem szczelnie doszlifowanym. Moździerz wyciera się niewielką ilością ziemi krzemkowej i dołącza do cylindra. Do cylindra dodaje się 30 ml chloroformu, przemywając porcjami moździerz i lejek, a następnie wytrząsa się na wytrząsarce przez 30 min. Zawartość cylindra przenosi się na nuczę G₃ i sączy do próbówki przy pomocy pompy wodnej.

Wyciąg chloroformowy z próbówki przenosi się do kolby stożkowej o poj. 100 ml, a cylinder i osad na nuczcy przemywa się 3 porcjami chloroformu o objętościach 10, 5 i 5 ml. Do kolbki dodaje się 2 ml ok. 0,1 N kwasu solnego i całkowicie oddestylowuje chloroform na łaźni wodnej. Pozostałość w kolbce, która zawiera chlorowodorki alkaloidów oraz różne zanieczyszczenia, rozpuszcza się w 10 ml eteru naftowego i przenosi ilościowo do rozdzielacza z krótką nóżką. Kolbkę przemywa się 5 ml eteru naftowego, 5 ml ok. 0,1 N kwasu solnego i ok. 10 ml wody. Zawartość rozdzielacza wytrząsa się i fazę wodną przenosi do kolby miarowej o poj. 25 lub 50 ml (jeżeli roztwór jest mętny, sączy się). Eter w rozdzielaczu ekstrahuje się jeszcze dwukrotnie po 5 ml kwasu solnego. Połączone wyciągi uzupełnia się wodą do kreski i powtórnie oczyszcza. W tym celu do rozdzielacza odmierza się 2 ml kwaśnego wyciągu, alkalizuje 1 ml roztworu wodorotlenku sodowego i ekstrahuje czterema porcjami chloroformu (10, 10, 5 i 5 ml). Wyciągi chloroformowe zbiera się do rozdzielacza

i ekstrahuje czterokrotnie alkaloidy do 0,1 N kwasu solnego, w podany niżej sposób.

Do rozdzielacza, zawierającego chloroformowy wyciąg alkaloidów, dodaje się 10 ml 0,1 N kwasu solnego i wytrząsa w ciągu ok. 1 min. Fazę chloroformową przenosi się do drugiego rozdzielacza, a kwaśny wyciąg do kolby miarowej o poj. 200 ml (w przypadku łubinów gorzkich rozcieńcza się np. po pierwszym oczyszczeniu do 25 ml i po drugim do 200 lub 250 ml). Chloroform w drugim rozdzielaczu ekstrahuje się ponownie 10 ml kwasu i fazę chloroformową przenosi z powrotem do pierwszego rozdzielacza, a kwaśny wyciąg alkaloidów do kolby miarowej itd. Zawartość kolby uzupełnia się wodą i otrzymany roztwór nadaje się bezpośrednio do analizy. W przypadku łubinów zawierających małe ilości alkaloidów można chloroform ekstrahować czterema porcjami po 5 ml kwasu i uzupełnić do 25 ml.

A. Oznaczanie alkaloidów łubinu żółtego

1. ROZDZIELENIE LUPININY OD SPARTEINY

Metoda ta oparta jest na różnicach w rozpuszczalności sparteiny i lupininy w eterze naftowym. Ilościowy rozdział tych alkaloidów otrzymuje się przy zachowaniu stosunku objętościowego wody do eteru naftowego równego 6 : 1. W czasie ekstrakcji alkalicznego roztworu wodnego alkaloidów za pomocą eteru naftowego sparteina przechodzi do eteru, lupinina pozostaje w roztworze wodnym, który służy do oznaczeń. Przy mniejszych ilościach wody lupinina także częściowo przechodzi do eteru naftowego.

W y k o n a n i e. Do rozdzielacza z krótką nóżką o poj. 100 ml odmierza się określoną objętość, np. 5 ml, wodnego roztworu alkaloidów. Następnie dodaje się tyle wody, aby łączna objętość wynosiła ok. 30 ml, alkaliczuje 1 ml ługu sodowego, dodaje 5 ml eteru naftowego i silnie wytrząsa w ciągu ok. 2 min. Pozostawia na ok. 5 min. dla dokładnego rozdzielania się i fazę wodną (lupininę) przenosi się do drugiego suchego rozdzielacza. Do pierwszego rozdzielacza, zawierającego fazę eterową, dodaje się ok. 5 ml wody, przemywa rozdzielacz przez lekkie wymieszanie, pozostawia na ok. 2 min. i fazę wodną przenosi do drugiego rozdzielacza. Należy uważać, aby do rozdzielacza z lupininą nie przedostał się eter zawierający sparteinę. Do rozdzielacza zawierającego alkaliczny roztwór wodny lupininy dodaje się 5 ml chloroformu i postępuje, jak podano na str. 167 (**W y k o n a n i e**). Próbę ślepą odczynnikową wykonuje się w ten sam sposób z wodą zamiast badanym roztworem. W tablicy 8 podano wyniki otrzymane dla mieszanin czystych roztworów lupininy i sparteiny. Wyniki wykazują, że otrzymano ilościowy rozdział lupininy od sparteiny.

Tablica 8

Wyniki oznaczeń lupininy obok sparteiny w czystych roztworach

Zawartość alkaloidów w 5 ml		Wyniki oznaczeń log I ₀ /I	Średnia	Wykryto lupininy μg
lupinina μg	sparteina μg			
1,2	1,4	0,041; 0,041	0,041	1,2
1,2	11,1	0,041; 0,043	0,042	1,3
2,4	5,5	0,075; 0,079	0,077	2,4
9,4	11,1	0,293; 0,293	0,293	9,2
4,7	5,5	0,152; 0,148	0,150	4,7

$$\text{Obliczenie: } \mu\text{g lupininy} = \frac{E}{K} a$$

(E — odczytana ekstynkcja, K — ekstynkcja dla 1 μg lupininy w 1 ml, która dla kolorymetru Leitza filtr D wynosi 0,160 (tabl. 2), a — wyliczona objętość końcowa badanego wyciągu w ml).

Dla przekonania się czy rzeczywiście cała ilość lupininy pozostaje w wodzie, zaś cała ilość sparteiny przechodzi do eteru naftowego, przeprowadzono próby na standardowych roztworach jednego z alkaloidów. Alkaliczne roztwory wodne ekstrahowano eterem naftowym, a następnie chloroformem. W przypadku użycia roztworów lupininy stwierdzono, że cała zawartość alkaloidu pozostaje w wodzie i po przeprowadzeniu do chloroformu można ją wykazać ilościowo, jak to widać w tablicy 9.

Tablica 9

Wyniki oznaczeń lupininy dla czystych roztworów, po przeprowadzeniu rozdzielania eterem naftowym

μg lupininy w 5 ml	Wyniki oznaczeń log I ₀ /I	Średnia	Wykryto lupininy μg	% wykrytej lupininy
1,2	0,041; 0,039	0,040	1,2	100,0
2,4	0,073; 0,076	0,075	2,3	95,8
4,7	0,152; 0,148	0,150	4,7	100,0
9,4	0,293; 0,297	0,295	9,2	97,9
12,5	0,387; 0,382	0,385	12,0	96,0

Przy użyciu roztworów sparteiny (próbki zawierające od 1 do 20 μg) całość przechodzi do eteru naftowego i w chloroformie użytym do ekstrakcji z wody nie odnajdujemy zupełnie alkaloidu.

2. OZNACZANIE SUMY LUPINY I SPARTEINY

Oznaczenie sumy alkaloidów potrzebne jest do wyliczenia ilości sparteiny w badanym roztworze. W tym celu do suchego rozdzielacza daje się odpowiednią ilość (np. 5 ml) wodnego roztworu alkaloidów, alkalizuje 0,2 ml wodorotlenku sodowego i wykonuje oznaczenie w sposób podany na str. 167. Uzyskane wyniki dla sumy alkaloidów podano w tabl. 10, błąd ich nie przekracza 4%. Obliczenie: $\mu\text{g sparteiny} = \frac{Es - El}{K} \cdot a$ (Es — odczytana ekstynkcja dla sumy, El — odczytana ekstynkcja dla lupiny, K — ekstynkcja dla 1 μg sparteiny w 1 ml (tabl. 1), która dla kolorymetru Leitza, filtr D, wynosi 0,130, a — wyliczona objętość końcowa badanego wyciągu w ml).

Tablica 10

Wyniki oznaczeń sumy lupiny i sparteiny

Zawartość alkaloidów w 5 ml		Oznaczenie sumy $\log I_0/I$ (średnia)	Oznaczenie lupiny $\log I_0/I$ (średnia)	$\log I_0/I$ dla sparteiny	Wykryto sparteiny μg	Wykryto lupiny μg
sparteina μg	lupinina μg					
1,4	1,2	0,076	0,039	0,037	1,4	1,2
5,5	2,4	0,213	0,073	0,140	5,4	2,3
2,8	4,7	0,220	0,147	0,073	2,8	4,6
5,5	4,7	0,289	0,152	0,137	5,3	4,7

W tablicy 11 zestawiono wyniki oznaczeń zawartości alkaloidów w nasionach łubinów żółtych. W ekstraktach z łubinu, zrobionych jak podano w niniejszej pracy, porównano naszą metodę oznaczania z metodą Reifera i Możejko [12], wyniki podano w tabl. 11.

Tablica 11

Zawartość alkaloidów w nasionach łubinów żółtych

Próba	% alkaloidów wg metody Reifera i Możejko [12]	% alkaloidów wg opisanej metody			Lupinina/sparteiny	Różnica w %% w porównaniu z metodą Reifera i Możejko
		sparteina	lupinina	suma		
nr 1	0,746	0,288	0,493	0,781	1/0,58	+ 4,4
nr 2	0,663	0,238	0,437	0,678	1/0,54	+ 1,8
nr 3	0,934	0,196	0,665	0,861	1/0,29	+ 7,9

B. Oznaczenie alkaloidów łubinu białego i wąskolistnego

1. ROZDZIELENIE LUPANINY OD HYDROKSYLUPANINY

Metoda rozdziału oparta jest na różnicy w rozpuszczalności lupaniny i hydroksylupaniny w eterze naftowym, wobec małej objętości nasyconego węgla sodowego. Lupanina jako dobrze rozpuszczalna przechodzi w czasie ekstrakcji do eteru naftowego, a hydroksylupanina pozostaje w roztworze węgla sodowego.

Wykonanie. Do suchego rozdzielacza odmierza się 5 lub 10 ml wodnego roztworu alkaloidów, alkalizuje 0,5 ml wodorotlenku sodowego i ekstrahuje czterokrotnie chloroformem w ilościach po 5 ml. Fazy chloroformowe zbiera się przez sączek z waty do kolbki stożkowej ze szlifem na 50 ml. Chloroform oddestylowuje się na łaźni wodnej do obj. ok. 1,5 ml. Resztę chloroformu odparowuje się przy pomocy prądu ciepłego powietrza, aż do całkowitego pozbycia się śladów chloroformu.

Do suchej pozostałości w kolbce (lupanina i hydroksylupanina) dodaje się ok. 0,2 ml nasyconego roztworu węgla sodowego, 10 ml eteru naftowego, zamyka kolbkę i silnie wytrząsa w ciągu ok. 2 min. Pozostawia na ok. 1 min. dla oddzielenia się roztworu węgla od eteru i sączy fazę eterową do suchej kolbki stożkowej na 50 ml, uważając, aby nie przelać węgla na sączek. Sączek przygotowuje się z dwu warstw lekko ubitej waty w nóżce i na dnie lejka. Ekstrakcję powtarza się jeszcze dwa razy, używając kolejno 10 i 5 ml eteru. Wszystkie trzy wyciągi eterowe zbiera się do kolbki. Sączka nie należy wyciskać, mogłoby to bowiem powodować przejście do kolbki śladów roztworu węgla zawierającego hydroksylupaninę.

Eter oddestylowuje się na łaźni wodnej, pozostawiając w kolbce parę kropel. Łaźnię wodną odstawia się, kolbkę wyciera się z wody i odłącza od chłodnicy. Resztę eteru odpędza się na zimno przy pomocy dmuchawki. W kolbce po odpędzeniu eteru nie powinno być śladów węgla. Do ostudzonej kolbki dodaje się dokładnie 10 ml chloroformu splukując nim dokładnie ścianki i roztwór przenosi ilościowo do suchego rozdzielacza. Kolbkę przemywa się dwukrotnie, dokładnie po 5 ml chloroformu, przenosi do rozdzielacza, dodaje 0,2 ml oranżu metylowego i postępuje, jak podano na str. 167. Próbę ślełą wykonuje się w ten sam sposób jak i pełną, używając wodę zamiast roztworu alkaloidów.

W tablicy 12 zestawione są wyniki oznaczeń lupaniny obok hydroksylupaniny w czystych roztworach alkaloidów. Z tablicy tej wynika, że błąd oznaczenia lupaniny obok hydroksylupaniny nie przekracza 4%. Obliczenie:

$$\mu\text{g} = \frac{E}{K} a \quad (K \text{ dla } 1 \mu\text{g} \text{ lupaniny w } 1 \text{ ml wynosi } 0,110 \text{ (tabl. 3)}).$$

Tablica 12

Wyniki oznaczeń lupakaniny obok hydroksylupakaniny w czystych roztworach

μg alkaloidów w 5 ml		Wyniki oznaczeń $\log I_0/I$	Średnia	Wykryto lupakaniny μg
lupakanina	hydroksy- lupakanina			
2,9	18,5	0,068; 0,066	0,067	3,0
14,5	4,6	0,319; 0,310	0,314	14,3
7,2	9,2	0,158; 0,155	0,157	7,1

W tablicy 13 podano wyniki oznaczeń, które dowodzą, że lupakanina ilościowo przechodzi do eteru naftowego. Takie same doświadczenia wykonane z roztworami hydroksylupakaniny wykazały, że alkaloid ten pozostaje ilościowo w roztworze węglanu sodowego i nie można go wykazać we frakcji eteru naftowego.

Tablica 13

Wyniki oznaczeń lupakaniny w czystych roztworach z zastosowaniem metody rozdziału

μg lupakaniny w 5 ml	Wyniki oznaczeń $\log I_0/I$	Średnia	μg wykrytej lupakaniny
2,9	0,063; 0,063	0,063	2,9
3,6	0,081; 0,076	0,079	3,6
7,2	0,158; 0,155	0,156	7,1
14,5	0,314; 0,314	0,314	14,3

2. OZNACZENIE SUMY LUPANINY I HYDROKSYLUPANINY

Do wyliczenia zawartości hydroksylupakaniny oznacza się sumę alkaloidów, jak podano na str. 167, pkt. 2. Obliczenie: μg hydroksylupakaniny $= \frac{Es - El}{K} a$ (Es — ekstynkcja dla sumy, El — ekstynkcja dla lupakaniny, K — ekstynkcja dla 1 μg hydroksylupakaniny w 1 ml (tabl. 4), która dla flitru D kolorymetru Leitza wynosi 0,1000, a — końcowa objętość wyciągu w ml).

W tablicy 14 zestawiono wyniki oznaczeń w czystych roztworach sumy alkaloidów oraz samej lupakaniny, a także wyliczenie ilości hydroksylupakaniny. Jak widać, wartości otrzymane dla hydroksylupakaniny zgodne są z ilościami użytymi do analizy.

Tablica 14

Wyniki oznaczeń w czystych roztworach sumy alkaloidów oraz samej lupaniny i wyliczenie ilości hydroksylupaniny

μg alkaloidów w 5 ml		Oznaczenie sumy $\log I_0/I$ (średnia)	Oznaczenie lupaniny $\log I_0 I$ (średnia)	$\log I_0/I$ dla hydro- ksylupaniny	Wykryto lupaniny μg	Wykryto hydroksy- lupaniny μg
lupanina	hydroksy- lupanina					
2,9	9,2	0,242	0,062	0,180	2,8	9,0
7,2	4,6	0,254	0,162	0,092	7,4	4,6
5,8	7,4	0,268	0,124	0,144	5,7	7,2
7,2	3,7	0,232	0,158	0,074	7,2	3,7

W tablicy 15 zestawiono wyniki oznaczeń alkaloidów w nasionach łubinów białych i wąskolistnych. Opisaną metodę porównano na materiale łubinowym z metodą Reifera i Możejko. [12], z tym że ekstrakcję i rozdzielanie lupaniny od hydroksylupaniny przeprowadzono w sposób opisany w niniejszej pracy.

Tablica 15

Zawartość alkaloidów w nasionach łubinów białych i wąskolistnych

Próba	% alkaloidów wg metody Reifera i Możejko [12]	% alkaloidów wg opisanej metody			Lupa- nina/hy- droksy- lupaniny	Różnica w %% w porównaniu z metodą Reifera i Możejko [12]
		lupanina	hydro- ksylupa- nina	suma		
nr 1	1,929	1,054	0,760	1,814	1/0,72	-6,0
nr 2	1,737	1,062	0,640	1,680	1/0,60	-3,2
nr 3	2,184	1,484	0,728	2,212	1/0,49	+1,0
nr 4	1,637	1,149	0,480	1,629	1/0,42	-0,5
nr 5	1,703	1,266	0,256	1,522	1/0,20	-10,0

3. Obliczenie wyników

Przykład. Do analizy użyto 0,5 g mąki łubinowej. Wyciąg wodny rozcieńczono ogółem do 1250 ml (po pierwszym oczyszczeniu do 25 ml, i z tego 5 ml do drugiego oczyszczenia rozcieńczono do 250 ml), do analizy pobrano 10 ml i wyekstrahowano alkaloidy do 20 ml chloroformu. Końcowa objętość badanego wyciągu wynosi więc 2500 ml. W 1 ml znaleziono 0,988 μg lupininy i 0,577 μg sparteiny.

$$\% \text{ alkaloidu} = \frac{b \cdot a}{c \cdot 10000},$$

b — μg alkaloidu w 1 ml chloroformu, a — wyliczona końcowa objętość wyciągu w ml, c — odważka materiału w gramach.

$$\% \text{ lupininy} = \frac{0,988 \cdot 2500}{0,5 \cdot 10000} = 0,494; \quad \% \text{ sparteiny} = \frac{0,577 \cdot 2500}{0,5 \cdot 10000} = 0,288,$$

skąd procentowa zawartość obydwu alkaloidów wynosi 0,782.

Dyskusja

Znane dotychczas metody ilościowego oznaczania alkaloidów łubinowych opierają się na oznaczeniu sumy lub jednego z dwu alkaloidów (najczęściej przez wytrącanie) w obecności drugiego. Takie postępowanie metodyczne może być źródłem pewnych błędów. W metodach oznaczania sumy dla wyliczenia ilości alkaloidów przyjmuje się raczej umowne współczynniki przeliczeniowe, oparte na stałym stosunku ilościowym dwu alkaloidów. Wartość tych współczynników jest problematyczna, że względu na znane nam duże wahania w zawartości poszczególnych alkaloidów. Na przykład w łubinach białych i wąskolistnych stosunek lupaniny do hydroksylupaniny może się wahać w granicach od 1 : 1 do 5 : 1, a nawet więcej. Również oznaczanie jednego z dwu alkaloidów w obecności drugiego, przez stosowanie specyficznych odczynników wytrącających, może pociągać za sobą pewne błędy, ze względu na wytrącanie się w różnym stopniu alkaloidu towarzyszącego.

Opracowana przez nas metoda pozwala na rozdzielenie alkaloidów i następnie oddzielne oznaczenie jednego z alkaloidów. Ilościowe rozdzielenie alkaloidów oparte jest na ich różnej rozpuszczalności w eterze naftowym i wodzie. Oddzielenie lupininy od sparteiny przez ekstrakcję sparteiny z wody do eteru naftowego jest szybkie i proste. Następnie w roztworze wodnym oznacza się lupininę. Zawartość sparteiny wylicza się z różnicy ekstynkcji dla sumy i lupininy.

Próby rozdzielania lupaniny od hydroksylupaniny w roztworze wodnym nie powiodły się. Również okazało się bezowocnym poszukiwanie odpowiednich adsorbentów i rozpuszczalników. Do opracowania metody rozdziału wykorzystano zaobserwowany przez nas fakt różnego zachowania się tych alkaloidów w stosunku do eteru naftowego, wobec małej objętości nasyconego roztworu węglanu sodowego. Lupanina w tych warunkach rozpuszcza się w eterze naftowym i jest całkowicie ekstrahowana, a hydroksylupanina pozostaje w roztworze węglanu.

Stwierdzono duży wpływ sposobu otrzymywania wyciągów na wyniki. Najbardziej odpowiednim czynnikiem do osuszania materiału jest ziemia krzemkowa, ze względu na brak własności adsorpcyjnych alkaloidów łubinowych. Użycie do osuszania bezwodnego węglanu sodowego jest niewskazane, ponieważ powstają straty alkaloidów w procesie eks-

trakcji. W niektórych metodach oznaczenie alkaloidów przeprowadza się na nieoczyszczonych lub też tylko jednokrotnie oczyszczonych wyciągach łubinowych. Na podstawie uzyskanych przez nas wyników (tabl. 7) należy stwierdzić, że postępowanie takie daje błędy dochodzące przy stosowaniu naszej metody do 20%. Okazało się, że dla otrzymania poprawnych wyników należy dwukrotnie oczyszczać wyciągi łubinowe. Dalsze oczyszczanie nie zmienia już uzyskiwanych wyników.

Opracowana przez nas metoda jest szybka i prosta w wykonaniu. Wymaga małej ilości podstawowych i łatwo dostępnych odczynników. Na wyniki oznaczeń mogą mieć wpływ tylko czystość eteru naftowego i chloroformu. Szczególnie dokładnie należy oczyścić chloroform od alkoholu etylowego. Nasza mikrometoda charakteryzuje się dużą czułością (pozwała na oznaczenie alkaloidów w roztworach wodnych o stężeniu do 0,0001%) oraz powtarzalnością wyników. Może być przydatna szczególnie do oznaczania alkaloidów w łubinach słodkich. W porównaniu z innymi metodami nie wymaga użycia dużych ilości badanego materiału.

Streszczenie

1. Opisano kolorymetryczną metodę mikrooznaczania czterech alkaloidów łubinowych, tj. lupininy i sparteiny w *L. luteus*, oraz lupaniny i hydroksylupaniny w *L. albus* i *L. angustifolius*.

2. Kolorymetryczne oznaczanie alkaloidów oparte jest na stechiometrycznej reakcji między alkaloidami i oranżem metylowym w roztworze chloroformu. Po zakwaszeniu oznacza się stężenie oranżu metylowego i pośrednio alkaloidów.

3. Alkaloidy ekstrahuje się do chloroformu z alkalicznego, osuszonego przy pomocy ziemi okrzemkowej, materiału łubinowego.

4. Opracowana metoda pozwala oznaczać lupininę i sparteinę w granicach od 0,2 do 2,6 μg , lupaninę i hydroksylupaninę od 0,2 do 3,0 μg , w 1 ml końcowego roztworu.

5. Błąd metody nie przekracza 5%.

LITERATURA

- [1] Barbacki S., *Łubin*, PWRiL, Warszawa, 1952.
- [2] Bauer K. H., *Die organische Analyse*, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig, 1950.
- [3] Brodie B. B. und Udenfriend S., cyt. za [6].
- [4] El Darawy Z. I., Tompestt S. L., *Analyst* **81**, 601, 1956.
- [5] Galinovsky F., *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe* **8**, 245, 1951.
- [6] Gettler A. O., Sunshine I., *Anal. Chem.* **23**, 779, 1951.
- [7] Henry Th., A., *Plant Alkaloids*, J. & A. Churchill Ltd, London, 1949.

- [8] Van der Kuy A., *Bijdrage tot de Kemis van alkaloïde vorming Bij enkele species van het genus lupinus*, S-Gravenhage 1956. Dysertacja.
- [9] Lehman R. A., Aitken T., cyt. za [6].
- [10] Marshall P. B., Rogers E. W., cyt. za [6].
- [11] Prudhomme R. O., cyt. za [6].
- [12] Reifer I., Możejko M., *Acta Biochim. Polon.* 1, 197, 1954.
- [13] Wierzchowski Z., Obuchowska I., *Roczniki Nauk Rolniczych* 61, 159, 1952.
- [14] Wiewiórowski M., Bratek M. D., *Acta Soc. Bot. Poloniae* 26, 129, 1957.

КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МИКРОМЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЛКАЛОИДОВ В СЕМЕНАХ ЛЮПИНА

Резюме

1. Описан колориметрический метод микроопределения четырех люпиновых алкалоидов, а именно: лупинина и спартеина в *L. luteus*, а также лупанина и оксилупанина в *L. albus* и *L. angustifolius*.

2. Колориметрическое определение алкалоидов опирается на стехиометрической реакции между алкалоидами и метилоранжем в растворе хлороформа. После ацидификации определяется концентрация метилоранжа и посредствомным путем алкалоидов.

3. Алкалоиды экстрагируются в хлороформ из щелочного, просушенного при помощи инфузорной земли, люпинового материала.

4. Разработанный метод позволяет определять лупинин и спартеин в пределах от 0,2 до 2,6 μg , лупанин и оксилупанин от 0,2 до 3,0 μg в 1 мл конечного раствора.

5. Погрешность метода не превышает 5%.

A COLORIMETRIC MICRODETERMINATION OF ALKALOIDS IN LUPINE SEEDS

Summary

1. A colorimetric microdetermination of lupine and sparteine in *L. luteus* and of lupanine and hydroxylupanine in *L. albus* and *L. angustifolius* has been described.

2. The method depends upon the reaction between the alkaloid bases and methyl orange in chloroform. On acidification the concentration of the indicator and thus indirectly of the alkaloids is determined.

3. The alkaloids of the alkalisied, with infusorial earth thoroughly dried plant material are extracted into chloroform.

4. The method permits to determine lupinine and sparteine within the limits of 0.2 — 2.6 μg , lupanine and hydroxylupanine between 0.2 — 3.0 μg per 1 ml of the final solution.

5. The error of the method does not exceed 5%.

Otrzymano 6.3. 1957 r.

E. GAŚSIOR

ZASTOSOWANIE AMIN ALIFATYCZNYCH DO ELUCJI AMINOKWASÓW Z KATIONITÓW O GRUPACH FUNKCYJNYCH SULFONOWEJ I FENOLOWEJ

Z Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Lublinie

Kierownik Zakładu: prof. dr J. Opieńska-Blauth

Odsalanie płynów biologicznych w analizie chromatograficznej aminokwasów najlepiej przeprowadzać przy zastosowaniu żywic jonowymiennych. Przy użyciu do tych celów elektrodializy lub dializy występują straty niektórych aminokwasów, a szczególnie argininy. Do najczęściej stosowanych syntetycznych żywic jonowymiennych należą kationity silnie kwaśne, polistyrenowe o czynnej grupie sulfonowej. Adsorbują one na kolumnie obok kationów nieorganicznych wszystkie aminokwasy, przy czym te ostatnie udaje się następnie wyeluować amoniakiem. Wymiennik kationowy polistyrenowy pod nazwą „Zeo-Karb 225” stosowali Prior i Whitehead [8] do analizy aminokwasów w płynie mózgo-rdzeniowym, a Noworytko i Sarnecka - Keller [5] do analogicznych badań w moczu. Awapara i Sato [1] używali natomiast do odsalania moczu silnie zasadowy anionit „Dowex 2”. Roberts i współp. [9] w badaniach nad przemianą pośrednią drobnoustrojów posługiwali się w celu odsalania pożywek mineralnych kationitem „Dowex 50” i anionitem „Dowex 2”. W przeciwieństwie do żywic polistyrenowych kationity z dwiema grupami funkcjonalnymi: sulfonową i fenolową adsorbują tak silnie aminokwasy zasadowe, że eluują się one tylko częściowo amoniakiem, a arginina nie daje się eluować zupełnie [6, 7, 11]. W pracy niniejszej do elucji aminokwasów zasadowych z kolumny napełnionej żywicą zawierającą dwie grupy funkcyjne (SO_3H , - OH) zastosowano z pomyslnym rezultatem aminy alifatyczne.

Część doświadczalna

Do badań użyto kationitu sulfofenolowego (produkcji angielskiej o nieznanym nazwie, znajdującego się w handlu). Kolumny napełniano wymiennikiem uprzednio zmielonym, o średnicy ziarna 0,060—0,075 mm. Kationit przemywano kolejno 2N HCl, 2N NH₄OH oraz 5—10 % roztworami etyloaminy i dwuetyloaminy. Do regeneracji kolumny używano 2N HCl. Zdolność wymienną oznaczano wg Tatura i Nowakowskiego [10]. Analiza eluatów mieszanin aminokwasowych (ze szczególnym uwzględnieniem wszystkich aminokwasów zasadowych i cyklicznych) z kolumn z Dowex 50, Zeo-Karb 225 i kationitu sulfofenolowego wykazała, że argininy nie odzyskuje się jedynie z kationu sulfofenolowego podczas elucji przy pomocy 0,1—2N amoniaku. Doświadczenia te potwierdziły wyniki badań innych autorów.

Na podstawie przeglądu stałych dysocjacji (K_B) i punktów wrzenia amin alifatycznych (tablica 1) podjęto próby użycia ich jako silniejszych zasad w miejsce amoniaku. Duża ilość przeprowadzonych doświadczeń wykazała, że aminy nie niszczą struktury kationitu. Do elucji aminokwa-

Tablica 1

Stałe dysocjacji (K_B) i temp. wrzenia amin alifatycznych

Nazwa związku	K_B	Temp. wrzenia
Metyloamina	$5 \cdot 10^{-4}$	— 6,5
Dwumetyloamina	$7,4 \cdot 10^{-4}$	7,4
Trójmetyloamina	$0,74 \cdot 10^{-4}$	3,5
Etyloamina	$5,6 \cdot 10^{-4}$	16,6
Dwuetyloamina	$12,5 \cdot 10^{-4}$	56
Trójetyloamina	$6,4 \cdot 10^{-4}$	89,5
n-Propyloamina	$4,7 \cdot 10^{-4}$	48,7
Izopropyloamina	$5,3 \cdot 10^{-4}$	34
Amoniak	$1,8 \cdot 10^{-5}$	—

(wg. Jenkinsa i Hartunga [4])

sów użyto etyloaminy (f-my BDH Laboratory Reagent-Anglia) i dwuetyloaminy (f-my Light-Anglia), związków o dużej stałej dysocjacji i o względnie niskiej temperaturze wrzenia, a co za tym idzie łatwych do odparowania. Na kolumnę wysokości 30 cm i średnicy 1 cm wprowadzano próbkę aminokwasów o zawartości 0,8 mg N-aminowego, zawierającej ponadto około 50—100 mg soli (NaCl, MgSO₄, KH₂PO₄). Przemywano 25 ml

wody destylowanej, a następnie eluowano: (1) 50—55 ml 2N amoniaku celem wymycia wszystkich aminokwasów z wyjątkiem argininy, a następnie 25 ml 5—10% roztworami aminy pierwszorzędowej lub drugorzędowej do elucji argininy; (2) 50—60 ml 5—10% roztworami amin celem elucji wszystkich aminokwasów w tym i argininy; (3) 50—60 ml mieszanki 1N, amoniaku zawierającego 5% aminy pierwszorzędowej celem elucji wszystkich aminokwasów.

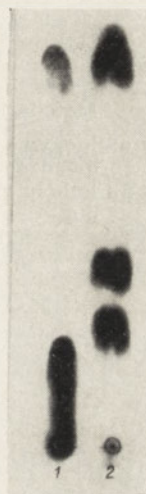


Chromatogram I

Mieszanina aminokwasów wprowadzona na kolumny zawierała: Asp, Glu, Gly, Ala, Arg.

1. Eluowano amoniakiem (brak Arg).
2. Eluowano mieszanką amoniaku i aminy pierwszorzędowej.

Chromatografowano w układzie fenol-woda w atmosferze amoniaku.



Chromatogram II

Pożywka powzrostowa *Mycobacterium phlei*. 1. nieodsolona, 2. odsolona, widoczne aminokwasy: Asp, Glu, Ala.

Najpraktyczniejszy wydaje się być 2 i 3 sposób elucji. Pierwszą porcję wycieku w ilości około 10 ml odrzucano, pozostałą zaś odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze nie przewyższającej 40° do suchości, rozpuszczano w 2 ml wody destylowanej i odparowywano ponownie. Czynność tę powtarzano trzykrotnie celem całkowitego usunięcia amoniaku i aminy z eluatu. Przy pomocy chromatografii bibułowej badano skład aminokwasowy wycieku. Zamieszczony chromatogram I przedstawia dwie jednakowe próbki aminokwasów, z których: 1) eluowano z kolumny amoniakiem, zaś 2) mieszaniną amoniaku i aminy pierwszorzędowej.

Zbadano, czy nową metodą elucji odzyskuje się ilościowo wprowadzone na kolumnę aminokwasy. W tym celu przeprowadzono ilościowe oznaczenie azotu aminowego metodą Van Slyke'a [3], natomiast aminokwasy oznaczano na spektrofotometrze „Unicam” przy długości fali 530 m μ po uprzednim rozdziale chromatograficznym i elucji metanolem plam aminokwasowych wywoływanych metodą Barrolliera [2]. Oznaczenia ilościowe wskazują na całkowitą elucję podaną wyżej metodą (tablica 2).

Tablica 2
Ilościowe oznaczanie wprowadzonych na kolumnę aminokwasów

Nr próbki	Metoda Barrolliera		Metoda Van Slyke'a	
	ilość aminokwasów wprowadzonych na kolumnę w mg	ilość aminokwasów oznaczona w wycieku z kolumny w mg	ilość N-aminowego wprowadzona na kolumnę w mg	ilość N-aminowego oznaczona w wycieku w mg
1	2	2	0,8	0,75
2	3	2,8	0,8	0,81
3	5	5,3	0,8	0,78
4	10	10,4	—	—
5	20	18,9	—	—

Napotkano na pewną trudność przy odzyskiwaniu całkowitej ilości tauryny wprowadzonej na kolumnę kationitu sulfonolowego. Tauryna wiązana jest przez wymiennik kationowy w minimalnym stopniu, znaczna jej część przechodzi razem z anionami do wycieku przy przemywaniu kolumny wodą. Wydaje się, że zmiana stałych dysocjacji grup funkcyjnych tauryny przez zmianę pH próbki wprowadzonej na kolumnę może dać dobre wyniki, o ile nie wchodzi tu w grę wzajemne oddziaływanie grup sulfonowych tauryny i kationitu. Zagadnienie to wymaga dokładniejszego przebadania. Podobne zjawisko zaobserwowały Noworytko i Sarnicka-Keller [5] posługując się kationitem Zeo-Karb 225.

Celem wykazania praktycznej przydatności powyższej metody odsalano przesącz kilkudniowej hodowli *Mycobacterium phlei* rosnącej na pożywce płynnej DGK¹. Pożywkę po odwirowaniu bakterii zagęszczano parokrotnie, a następnie wprowadzono 5 ml przesączu na kolumnę. Eluat odparowywano do suchości i rozpuszczano w 1 ml wody destylowanej.

¹ Skład pożywki DGK, według Syma: Glukoza 10 g, kwas glutaminowy 5 g, kwas cytrynowy 2 g, KH₂PO₄ 0,5 g, MgSO₄ · 7 H₂O 0,5 g, ZnSO₄ · 7 H₂O 0,02 g, cytrynian żelazowo-amonowy 0,04 g. Rozpuścić w wodzie, doprowadzić do pH 7,4 i dopełnić wodą do 1 litra.

25 μ l próbkę nakraplano na bibułę Whatman Nr 1 i rozwijano chromatogram w układzie fenol-woda. Zamieszczony chromatogram 2 przedstawia próbkę przed odsoleniem i po odsoleniu. Widoczny jest wpływ soli na rozdział aminokwasów o niskim R_f , wyrażający się tworzeniem jednej dużej plamy przesuwającej się nieznacznie z miejsca nakropienia.

Zastosowanie amin alifatycznych pozwoliło wykorzystać żywice sulfo-fenolowe do odsalania płynów biologicznych przy odzyskiwaniu wszystkich aminokwasów łącznie z zasadowymi, które jak wiadomo z prac Partridge'a i Westalla [6, 7, 11] oraz własnych doświadczeń, nie eluowały się roztworami amoniaku. Łatwość odparowania amin podnosi wartość praktyczną powyższej metody.

Streszczenie

Do elucji wszystkich aminokwasów łącznie z zasadowymi z kolumny napełnionej kationitem o grupach funkcyjnych: sulfonowej i fenolowej użyto aminy alifatyczne.

LITERATURA

- [1] Awapara J., Sato Y., *Clin. Chim. Acta*, **1**, 75, 1956.
- [2] Barrollier J., *Naturwiss.*, **42**, 416, 1955.
- [3] Brzeski W., Kaniuga Z., *Gazometryczne oznaczanie N-aminowego, Ćwiczenia z Biochemii Roślin*, PWN Warszawa-Poznań 1956.
- [4] Jenkins G. L., Hartung W. H., *The Chemistry of Organic Medicinal Products*, New York 1947.
- [5] Noworytko J., Sarnecka-Keller M., *Acta Biochim. Pol.* **3**, 309, 1956.
- [6] Partridge S. M., Westall R. G., *Biochem. J.* **44**, 418, 1949.
- [7] Partridge S. M., *Biochem. J.* **44**, 521, 1949.
- [8] Prior A. P., Whiteheade T. P., *Nature* **172**, 358, 1953.
- [9] Roberts R. B., Abelson P. H., Cowie D. B., Bolton E. T., Britten R. J., *Studies of Biosynthesis in E. coli*, Washington 1955.
- [10] Tatur H., Nowakowski W., *Jonity -- Teoria i zastosowanie w przemyśle*, PWT Warszawa 1955.
- [11] Westall R. G., *Biochem. J.* **52**, 638, 1952.

ПРИМЕНЕНИЕ АЛИФАТИЧЕСКИХ АМИНОВ К ЭЛЮИРОВАНИЮ АМИНОКИСЛОТ ИЗ КАТИОНИТОВ, ОБЛАДАЮЩИХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫМИ СУЛЬФОНОВОЙ И ФЕНОЛЬНОЙ ГРУППАМИ

Резюме

С целью элюировать все, включая основные, аминокислоты из колонки, наполненной катионитом с функциональными сульфоновой и фенольной группами, были использованы алифатические амины.

APPLICATION OF ALIPHATIC AMINES TO THE ELUTION OF AMINO ACIDS
FROM CATIONIC EXCHANGE RESINS WITH SULPHONIC AND PHENOLIC
FUNCTIONAL GROUPS

S u m m a r y

Aliphatic amines have been applied to the elution of all amino acids, including basic ones from columns charged with cationic exchange resins containing the sulphonic and phenolic functional groups.

Otrzymano 22. 3. 1957 r.

JACQUELINE KRZEMICKA

**17-KETOSTERYDY I 17-HYDROKSYSTERYDY W MOCZU LUDZI,
KRÓLIKÓW I SZCZURÓW****I. CHROMOGENY ZIMMERMANNNA W EKSTRAKTACH MOCZOWYCH
PRZED I PO UTLENIENIU KWASEM CHROMOWYM***Z Instytutu Onkologii w Gliwicach**Zakład Biologii Nowotworów**Kierownik: prof. dr K. Dux*

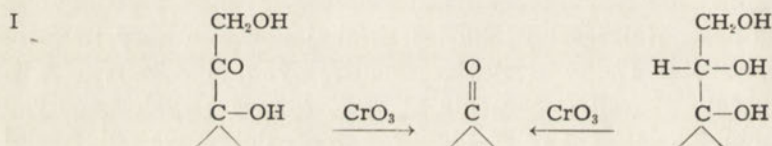
Wielkie postępy poczynione w ciągu ostatnich lat w dziedzinie biochemii sterydów pozwalają już zrozumieć zależności istniejące pomiędzy hormonami kory nadnercza i ich metabolitami moczowymi i co za tym idzie, w jakim stopniu badanie metabolitów odzwierciedla aktywność gruczołów.

U człowieka badania nad metabolitami moczowymi były przedmiotem bardzo licznych prac. Najczęściej jako test funkcjonowania kory nadnercza służą oznaczenia 17-ketosterydów neutralnych i kortykoidów. U zwierząt laboratoryjnych oznaczenie sterydów moczowych napotyka na poważne trudności. Istnieją tylko nieliczne prace dotyczące najczęściej wydalania 17-ketosterydów u królika [11, 12, 18]. Zaledwie kilku autorów próbowało śledzić przemianę sterydów u szczura [19, 20, 21] oraz u myszy [17]. Bardzo niedawno wprowadzono pewne niewielkie zmiany do metod oznaczania kortykoidów moczowych celem przystosowania ich do badań nad świnkami morskimi [14, 22]. Wyniki tych prac są często sprzeczne, co przypuszczalnie jest spowodowane niedostateczną swoistością metod opracowanych dla badań nad sterydami organizmu ludzkiego. W przypadku moczu zwierzęcego należy bowiem pracować na ilościach często nikłych, w obecności wielkiej ilości zanieczyszczeń, które łatwo wywierają wpływ na reakcje barwne będące podstawą metod mikroanalizy.

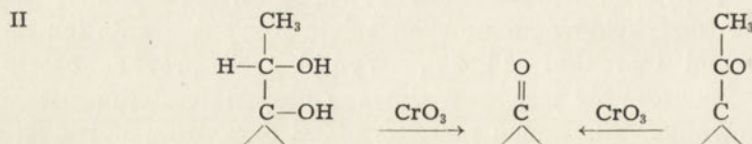
Analiza fizjologiczna powinna zawierać z jednej strony badanie jakościowe metabolitów, z drugiej zaś strony ich oznaczenie globalne. Ana-

liza jakościowa jest możliwa tylko na drodze chromatograficznej. Metoda chromatograficzna na bibule wg Busha [8] została już przystosowana do rozdzielania kortykoidów moczowych psa [4]. Mikrochromatografia kolumnowa na tlenku glinu wyodrębnia szereg frakcji 17-ketosterydów u szczura, eliminując równocześnie większą część pigmentów brunatnych, silnie polarnych¹.

Problem oznaczenia ilościowego polega na oznaczeniu jak największej ilości metabolitów kory nadnercza przy użyciu metody wystarczająco swoistej. Metoda ostatnio opisana przez Wilsona i Fairbanka [27] wydała się nam najwłaściwsza dla małych zwierząt laboratoryjnych z następujących powodów: po pierwsze, uwzględnia ona wielką różnorodność sterydów; po drugie autorzy zauważyli, że substancje chromogeniczne wpływające na reakcję barwną zdawały się zanikać w trakcie utleniania. Wilson i Fairbank oparli się na działaniu kwasu chromowego, który przekształca liczne 17-hydroksysterydy w 17-ketosterydy, które to związki można następnie oznaczyć ilościowo przy pomocy reakcji Zimmernana [28]. 17-ketosterydy, istniejące w ekstrakcie nieutlenionym, są przekształcane w dwu- lub trójketony, w zależności od tego, czy posiadają grupę hydroksylową w pozycji C₃ lub w pozycji C₃ i C₁₁. Praca Wilsona i Fairbanka polegała na zbadaniu wartości chromogenicznej produktów utleniania czystych sterydów w reakcji Zimmernana. W serii sterydów C₂₁ metoda ta oznacza wszystkie 17-21-dwuhydroksyketony i 17-20-21-triole. W poniższym schemacie reakcji pokazujemy tylko boczny łańcuch tych związków.



17-20-diole i 17-hydroksy-20-ketony w serii pregnanu i allopregnanu (wzór II) są również ilościowo przekształcone w 17-ketosterydy



W serii sterydów C₁₉ metoda utleniania pozwala na oznaczenie testosteronu i androstan-3β-17β-diolu. Oznaczenia dokonane na mieszkankach o składzie nieznanym dają przybliżoną wartość sumy 17-hydroksysterydów i 17-ketosterydów. Wyniki wyraża się jako androsteron utleniony.

¹ Praca w toku.

W niniejszej pracy postawiliśmy sobie następujące zadania:

a) sprawdzić, czy metoda Wilsona i Fairbanka da się zastosować do surowych ekstraktów z moczu ludzkiego,

b) w przypadku uzyskania pozytywnej odpowiedzi na pytanie zawarte w punkcie „a”, spróbować przystosować tę metodę do ekstraktów z moczu małych zwierząt laboratoryjnych.

Część doświadczalna

Próbki moczu ludzi, królików i szczurów zbierano przez 24 godziny bez stosowania substancji przeciwnilnych. Hydrolizy i ekstrakcje dokonywano w przeciągu 3 godzin po zebraniu moczu. Zwierzęta były umieszczone w klatkach metabolicznych, z których odbiera się osobno kał i mocz. Celem zapobieżenia ewentualnemu zanieczyszczeniu moczu, żywność podawano królikom przy pomocy żłobu umieszczonego na zewnątrz klatki w ten sposób, że tylko głowa miała do niego dostęp. Szczury karmiono przy pomocy sondy żołądkowej trzy razy dziennie. Próby przeprowadzano na dwóch królikach samicach w wieku około 12 miesięcy i na sześciu szczurach samczkach w wieku około 6 miesięcy.

METODA

1) Przygotowanie ekstraktów. Z ośmiu próbek moczu ludzkiego przygotowano 2 rodzaje ekstraktów. I: ekstrakty surowe zawierające całość 17-ketosterydów obojętnych, otrzymane po hydrolizie kwasem solnym na gorąco. Stosowano metodę Bondera [5] (metoda Drekslera zmodyfikowana). II: ekstrakty surowe zawierające „Kortykoidy” otrzymane przez hydrolizę na zimno w pH 1. Stosowano metodę Smitha i Melingera [23] nieznacznie przez nas zmodyfikowaną². Z moczu zwierzęcego przygotowano tylko ekstrakty typu I. Po hydrolizie kwasem solnym na gorąco ekstrakty obfitują w substancje chromogeniczne brunatne, pracowano więc w warunkach najbardziej niesprzyjających. Tok postępowania był następujący: mocz sączono przez watę szklaną, mocz królika poddawano następnie odwirowaniu, otrzymując obfity osad mineralny. Hydrolizę prowadzono w kolbie ze szfilem pod chłodnicą zwrotną w spokojnym wrzeniu w obecności stężonego kwasu solnego (15% obj./obj.). Hydrolizat chłodzono natychmiast wodą bieżącą. Z uwagi na to, że mocz zwierzęcy jest bardzo gęsty i tworzy z łatwością emulsję z eterem, stosowano kolumny ekstrakcyjne typu kolumn używanych przez Jaya-

² Jako rozpuszczalnika zamiast butanolu stosowanego przez Smitha użyto chloroformu oczyszczonego przy pomocy benzydyny i wprowadzono dodatkowo oczyszczanie węglanem potasu.

le'a [16] do ekstrakcji fenolosterydów. Stosowano eter w stosunku objętościowym 1 : 1 i 10 przejść przez kolumnę. Ekstrakt eterowy przemycano 3 razy 1/5 swojej objętości 2N NaOH, przy czym roztwór ługu sodowego używany do trzeciego przemycia zawierał ponadto szczyptę podsiarcznanu sodu, następnie trzy razy wodą destylowaną, używając każdorazowo jedną objętość wody na dziesięć objętości ekstraktu. Po przemyciu ekstrakt suszono nad siarczanem sodu i odparowywano w eksykatorze. Mocz zbierany przez 24 godziny z 6 szczurów mieszano, następnie hydrolizowano i ekstrahowano tak samo jak mocz króliczy.

2) Oznaczenie 17-ketosterydów obojętnych. Stosowano metodę opisaną przez B o n d e r. Rozdzielanie frakcji ketonowych prowadzono wedle tej samej metody, przy użyciu odczynnika „T” Girarda (chlorek trójmetylo-acetylo-hydrazyno-amoniowy)³.

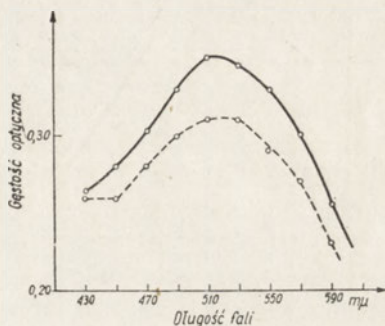
3) Oznaczenie 17-ketosterydów po utlenieniu kwasem chromowym. Zarówno utlenienie jak i mikroanalizę 17-ketosterydów wykonywano według metody opisanej przez W i l s o n a i F a i r b a n k s a, z tą tylko różnicą, że roztwór alkoholowy KOH sporządzano bezpośrednio przed użyciem stosując alkohol oczyszczony na *m*-fenylenodwuaminie i dwa razy rektyfikowany. Ekstrakty do utlenienia przygotowano w sposób następujący: ekstrakt suchy rozpuszczano w takiej objętości oczyszczonego alkoholu bezwodnego, aby około 20 μ g sterydów przypadało na objętość alkoholu zawartą w granicach 0,1 — 0,01 ml. Następnie wprowadzono do probówek takie ilości roztworu, które by zawierały trochę mniej niż 20 μ g sterydów i odparowywano do sucha, przepuszczając ponad powierzchnią cieczy w probówkach strumień powietrza i w końcu suszono w próżni nad P₂O₅. Równolegle pobierano z tego samego roztworu próbki dla oznaczenia 17-ketosterydów metodą B o n d e r o w e j i dla oddzielenia frakcji ketonowych, o ile to było konieczne. Oznaczenia spektrofotometryczne reakcji Z i m m e r m a n n a prowadzono przy użyciu spektrofotometru Coleman Junior model 6. Stosowano probówki Coleman 6-304 B (średnica 19 mm). Bezpośrednio po utlenieniu próbkę rozcieńczano do 8 ml alkoholem 96% dwukrotnie rektyfikowanym, po czym odczytywano adsorpcję światła kolejno w następujących długościach fali: 510, 530, 550, 570, 590, 490, 470, 450, 430 $m\mu$.

WYNIKI

1) Ekstrakty z moczu ludzkiego. Należy tu przede wszystkim zaznaczyć, że reakcja Z i m m e r m a n n a przeprowadzona na ekstrakcie poddanym utlenieniu kwasem chromowym daje piękne za-

³ Odczynnik „T” otrzymano preparatywnie metodą klasyczną opisaną m. in. przez B o n d e r [5].

barwienie czerwono-fioletowe bez śladów barwy brunatno-pomarańczowej, tak w przypadku ekstraktu typu I jak i II. Badania spektrofotometryczne ekstraktów typu I, tj. po hydrolizie kwasem solnym na gorąco, dają krzywą posiadającą maksimum odpowiadające długości fali 510—530 $m\mu$. To samo maksimum wykazuje badanie spektrofotometryczne wykonane na czystym androsteronie krystalicznym utlenionym w tych samych warunkach. Rys. 1 pokazuje zadowalającą równoległość dwu krzywych. Fairbanks i Wilson podają optymalną długość fali 530—550 $m\mu$. Ponieważ jednak we wszystkich naszych doświadczeniach otrzymaliśmy maksimum przy fali 510—530 $m\mu$, wybraliśmy tę długość fali, aby otrzymać jak największą dokładność i swoistość. W tabeli 1 podajemy kilka wyników ilościowych na ekstraktach I przy równoległym oznaczeniu 17-ketosterydów obecnych w moczu (metoda Bonderovej) i 17-ketosterydów otrzymanych przez utlenianie (metoda Wilsona i Fairbanks'a).



Rys. 1. Widma absorpcyjne chromogenów Zimmermanna ekstraktu I z moczu ludzkiego i czystego androsteronu po utlenieniu kwasem chromowym

- — ○ 20 μg androsteron utleniony
 ○ — — ○ 15,5 μg ekstrakt I utleniony

W przypadku moczu nr 1 i nr 26 różnice 2,92 mg i 2,75 mg odpowiadają 17-hydroksysterydom odpornym na hydrolizę kwasem solnym na gorąco. Zdarza się jednak, że różnica ta nie występuje albo jest nawet ujemna (mocz nr 6). Wilson i Fairbanks pracując na mieszkankach sterydów C_{19} znaleźli również przypadki, gdzie różnica była ujemna i tłum-

Tabela 1

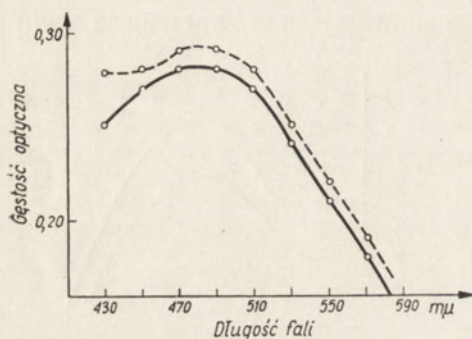
Chromogeny Zimmermanna ekstraktu I z moczu ludzkiego przed i po utlenieniu kwasem chromowym

Mocz nr	17-ketosterydy w ekstrakcie I.	
	bez utlenienia*)	po utlenieniu**)
1	6,08	9,00
6	14,80	12,50
15	15,30	15,00
26	7,25	9,00

*) Wyrażone jako androsteron w mg/24 godz.

***) Wyrażone jako androsteron utleniony w mg/24 godz.

czą to zjawisko w sposób następujący: utlenienie kwasem chromowym eliminuje ketony C_{20} , które w metodzie klasycznej zwiększają wyniki oznaczeń 17-ketosterydów, poza tym może nastąpić zniszczenie substancji chromogenicznych nieswoistych. W przypadku moczu nr 6 zaobserwowano, że stosunek gęstości optycznych $430\text{ m}\mu$ i $520\text{ m}\mu$ wynosił przeszło



Rys. 2. Widma absorpcyjne chromogenów Zimmermanna ekstraktu III z moczu ludzkiego i czystego androsteronu po utlenieniu kwasem chromowym

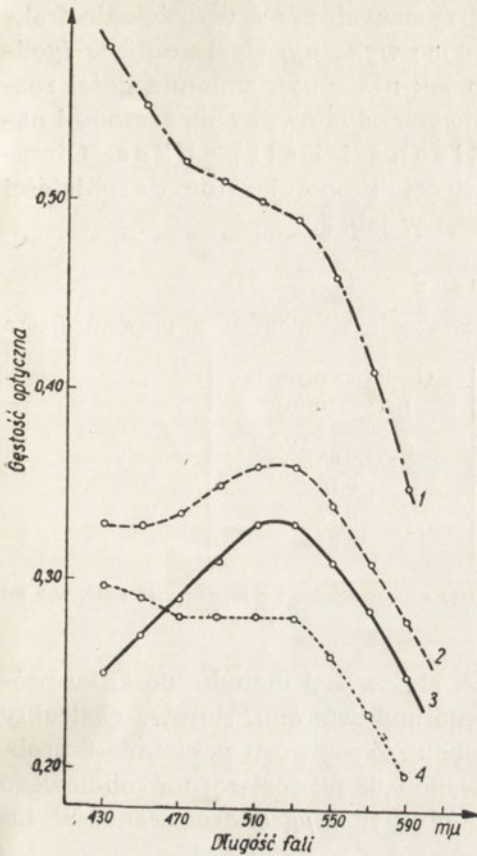
- — ○ 15 μg androsteron utleniony
 ○ - - ○ 17 μg ekstrakt II utleniony

0,9, co wskazywało na obecność substancji chromogenicznych. Po oczyszczeniu odczynnikiem Girarda otrzymano tylko 8,50 mg/24 godz. 17-ketosterydów. Reakcja Zimmermanna przeprowadzona po utlenieniu dała zabarwienie fioletowe bez odcienia brunatno-pomarańczowego, jak to miało miejsce bez utlenienia.

Na ekstraktach II, tj. na ekstraktach zawierających kortykoidy, wykonywano również równoległe reakcje Zimmermanna z utlenieniem kwasem chromowym i bez utlenienia. Bez utlenienia reakcja dawała zabarwienie z odcieniem pomarańczowym i bez widma charakterystycznego. Po utlenieniu otrzymano piękne zabarwienie fioletowe i krzywą spektrofotometryczną bardzo zbliżoną do krzywej czystego hormonu (rys. 2). Oznaczenia przeprowadzone na kilku moczach normalnych wahają się w granicach 2—3 mg/24 godz.

2) Ekstrakty z moczu królików. Reakcja Zimmermanna wykonana na surowych ekstraktach z moczu królika daje zawsze zabarwienie brunatno-pomarańczowe. Krzywa spektrofotometryczna wygina się cokolwiek w pobliżu długości fali $520\text{ m}\mu$, co wyklucza jakąkolwiek możliwość oznaczeń w tych warunkach (patrz krzywa 1 rys. 3). Absorpcja pozostaje wysoka w krótkich długościach fali; we frakcji tej znajdują się jeszcze substancje chromogeniczne nieswoiste. Jeżeli natomiast poddaje się surowe ekstrakty utlenieniu kwasem chromowym, reakcja Zimmermanna nie daje już żadnych śladów brunatnych. Krzywa spektrofotometryczna (krzywa 2 rys. 3) jest niemal równoległa do krzywej androsteronu (krzywa 3 rys. 3). Również frakcje ketonowe poddane utlenieniu kwasem chromowym tracą swoje substancje chromogeniczne nie dając przez to wyników niższych. Krzywa spektrofotometryczna posiada wierzchołek wyraźniejszy i upodabnia się do krzywej czystego hormonu (rys. 4).

http://rcin.org.pl



Rys. 4. Widma absorpcyjne chromogenów Zimmermanna ekstraktów ketonowych z moczu królika, przed i po utlenieniu

- — — ○ frakcja ketonowa utleniona
○ — — ○ frakcja ketonowa nie utleniona

Rys. 3. Widma absorpcyjne chromogenów Zimmermanna w ekstraktach moczowych królika

1. ○ — — ○ ekstrakt surowy
2. ○ — — ○ ekstrakt surowy utleniony : 22 μg
3. ○ — — ○ androsteron utleniony : 20 μg
4. ○ — — ○ ekstrakt ketonowy

Tabela 2

Porównanie chromogenów Zimmermanna ekstraktów ketonowych i ekstraktów surowych utlenionych u królika

Mocz nr	17-ketosterydy oczyszczone odczynnikiem „T” Girarda*)	17-ketosterydy przy utlenieniu kwasem chromowym**)
13	0,875	1,550
19	0,720	2,000
21	0,785	1,900

*) mg/24 godz. wyrażone jako androsteron

**) mg/24 godz. wyrażone jako androsteron utleniony

W tabeli 2 podajemy wyniki oznaczeń 17-ketosterydów na ekstraktach oczyszczonych odczynnikiem „T” Girarda i na ekstraktach surowych podanych utlenieniu kwasem chromowym. Wyniki otrzymane po utlenieniu

są dwukrotnie wyższe od wyników otrzymanych przez wydzielenie frakcji ketonowej. Surowe ekstrakty utlenione wykazują wystarczającą zgodność z prawem Beera, co sprawdzono jak następuje: zmienne ilości roztworu alkoholowego ekstraktów moczowych odparowywano, suszono i następnie utleniano według metody Wilsona i Fairbanka. Otrzymane gęstości optyczne są mniej więcej proporcjonalne do objętości roztworu alkoholowego, co uwidoczniło w tab. 3.

Tabela 3

Zgodność reakcji barwnej ekstraktów moczowych utlenionych z prawem Beera

Objętość roztworu*) alkoholowego ekstraktu w ml	Gęstość optyczna przy 510 m μ
0,02	0,05
0,04	0,10
0,06	0,17
0,08	0,21

*) Roztwór alkoholowy otrzymano rozpuszczając surowy ekstrakt z moczu z 48 godz. w 5 ml alkoholu bezwodnego.

Celem przekontrolowania wierności stosowanej metody, do kilku próbek moczu dodano znane ilości czystego androsteronu. Surowe ekstrakty z 48 godzin rozpuszczano w 5 ml alkoholu. Z roztworu pobierano 2 próbki po 0,03 ml. Do jednej próbki dodawano 0,02 ml roztworu alkoholowego androsteronu o stężeniu 0,025% (wag./obj.) tj. 5 μ g androsteronu. W tabeli 4 ujęto otrzymane wyniki.

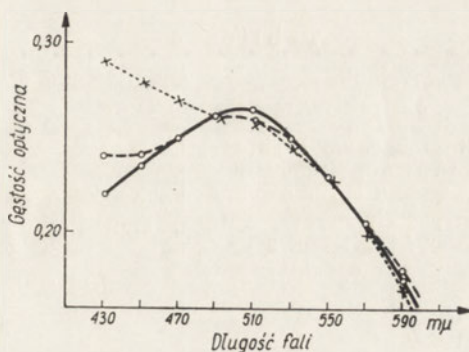
Tabela 4

Kontrola odnalezionych znanych ilości czystego androsteronu dodanych do surowych ekstraktów moczowych królika

Chromogeny Zimmer- manna po utlenieniu kwasem chromowym		% odnalezionego androsteronu
ekstrakt surowy: μ g	ekstrakt z doda- tkiem 5 μ g androsteronu	
24	29	100
12,5	17,5	100
18	21,8	76

3) Ekstrakty z moczu szczurów. Reakcja Zimmermanna wykonana bezpośrednio na ekstraktach surowych daje tylko zabarwienie żółto-pomarańczowe nie posiadające żadnego znaczenia. Te same ekstrakty poddane utlenieniu kwasem chromowym reagują w reak-

cji Zimmermanna dając piękne zabarwienie czerwono-fioletowe. Badanie spektrofotometryczne daje w tych warunkach krzywą, której wierzchołek jest wprawdzie lekko przesunięty w kierunku krótszych długości fali (490—510 m μ), lecz bardzo zbliżoną do krzywej androsteronu utlenionego (rys. 5). Oznaczenie 17-ketosterydów wykonane na surowych



Rys. 5. Widma absorpcyjne chromogenów Zimmermanna ekstraktów moczowych szczura

×-----× ekstrakt surowy
 ○-----○ 15 μ g androsteron utleniony
 ○-----○ 14 μ g ekstrakt surowy utleniony

ekstraktach po utlenieniu kwasem chromowym daje wyniki bardzo wysokie w porównaniu z wynikami uzyskanymi przez wykonanie reakcji Zimmermanna na frakcji ketonowej. Rezultaty porównawcze przedstawiono w tab. 5. Należy tu zaznaczyć, że pigmenty czerwone zawarte

Tabela 5

Chromogeny Zimmermanna we frakcji ketonowej moczu szczurów z 24 godzin i w surowym ekstrakcie utlenionym kwasem chromowym

Mocz nr	17-ketosterydy*) ketonowe bez utlenienia	17-ketosterydy**) po utlenieniu kw. chromowym
2	—	82
3	—	63
4	—	105
67	26	86
89	18	77

*) Wyrażone jako androsteron μ g/24 godz.

**) Wyrażone jako androsteron utleniony μ g/24 godz.

w suchych ekstraktach odbarwiły się podczas utlenienia. Pozostało tylko zabarwienie żółto-zielone środowiska utleniającego.

Ponadto wykonano próby odnalezienia czystego androsteronu dodanego do 2 surowych ekstraktów z moczu 12 szczurów, zbieranego przez 34 godziny, rozpuszczonych w 5 ml alkoholu, z których pobrano po 2 próbki po 0,05 ml. Do jednej z próbek każdego ekstraktu dodano 5 μg czystego androsteronu. Otrzymane wyniki ujęto w tab. 6.

Tablica 6

Kontrola odnalezienia znanych ilości czystego androsteronu dodanych do surowych ekstraktów moczowych szczura

Chromogeny Zimmermanna po utlenieniu kwasem chromowym		% odnalezionego androsteronu
ekstrakt surowy: μg	ekstrakt z dodatkiem 5 μg androsteronu	
13	17	80
11	15,5	90

Omówienie wyników

Doświadczenia wykonane na moczu ludzkim wykazują możliwość ilościowego oznaczenia 17-ketosterydów i 17-hydroksysterydów bezpośrednio na surowych ekstraktach. Stosuje się w tym celu reakcję Zimmermanna w połączeniu z działaniem kwasu chromowego. Badania spektrofotometryczne zabarwień otrzymanych na ekstraktach poddanych dwóm różnym hydrolizom daje widmo bardzo zbliżone do widma czystego androsteronu o maximum w pasmie 510—530 $m\mu$. Test Wilsona i Fairbanksa odpowiada zasadniczym wymogom stawianym metodom klinicznym oznaczania hormonów [6] i wydaje się dobrym narzędziem w rękach endokrynologów. Z drugiej strony metoda ta pozwala oznaczyć bardzo dużą ilość metabolitów kory nadnercza. Kortykosterydy jak 17-hydroksy-11-dezoksykortykosteron, kortyzon i kortykosteron, które już same posiadają grupy hydroksylowe na C_{17} , oraz androgeny kory nadnercza, jak andrenosteron i dehydroizoandrosteron, ulegają przemianie w sterydy moczowe, z których przeważająca ilość posiada grupę hydroksylową na C_{17} . Voigt i współpracownicy [26] zestawili listę sterydów moczowych pochodzących z kory nadnercza, wyodrębnionych i zidentyfikowanych metodą chromatografii, 18 spośród nich posiada funkcję hydroksylową na C_{17} podlegającą utlenieniu kwasem chromowym, a więc reaguje w teście Wilsona i Fairbanksa.

Jednakowoż wypada zaznaczyć, że Huisin't Veld i Lampe Hintzen [15], którzy zastosowali ostatnio w swoim laboratorium me-

tość oznaczania globalnego 17-hydroksykortykosterydów opracowaną przez Brooksa i Norymberskiego [7], doszli do wniosku, że metoda ta, jakkolwiek zadowolająca z punktu widzenia chemicznego, posiada tylko ograniczoną wartość dla badań klinicznych.

Trudności napotymane w oznaczaniu sterydów moczowych małych gryzoni wydają się częściowo rozwiązane przez zastosowanie metody Wilsona i Fairbanksa. Trudności te polegają przede wszystkim na:

1. Obecność licznych pigmentów i chromogenów nieswoistych. Środki na ogół stosowane celem usunięcia tych substancji, takie jak wydzielenie frakcji ketonowej odczynnikami Girarda, formułki korygujące otrzymane wyniki [1, 24], ekstrakcja zabarwienia końcowego za pomocą chloroformu [9], zawodzą już wobec moczu ludzkiego i okazują się zupełnie bezwartościowe w odniesieniu do moczu zwierzęcego. Oczyszczanie odczynnikami Girarda, które się najczęściej stosuje, tylko częściowo eliminuje nieswoiste substancje chromogeniczne. Reakcja Zimmermanna wykonana na frakcjach ketonowych daje zabarwienie różowo-pomarańczowe o wysokich wartościach absorpcji w długościach fal 410—430 $m\mu$ bez wyraźnego, charakterystycznego wierzchołka (najczęściej zauważa się tylko spłaszczenia około 510—530 $m\mu$). U obu rodzajów zbadanych gryzoni surowe ekstrakty moczowe utlenione według metody Wilsona i Fairbanksa dają w reakcji Zimmermanna piękne zabarwienie fioletowe. Krzywe spektrofotometryczne, których charakterystyczne maksimum znajduje się w paśmie 510—530 $m\mu$, są niemal równoległe do krzywych czystego androsteronu utlenionego. Problem chromogenów brunatnych wpływających na reakcję Zimmermanna wydaje się więc całkowicie rozwiązany przez zastosowanie procesu utleniania. Appleby i współpracownicy [2], którzy opracowali metodę analityczną opartą na utlenieniu 17-hydroksysterydów bizmutynianem sodu, zauważyli również zanik chromogenów brunatnych w ich doświadczeniach nad moczem ludzkim.

2. Ilości sterydów wydzielonych w moczu są bardzo niskie. Doświadczenia wykonane na szczurach i na myszach przy użyciu izotopów promieniotwórczych [13] wskazały na żółć jako na główną drogę wydzielania hormonów sterydowych. Stosowanie metody Fairbanksa i Wilsona ma podwójną zaletę: metoda ta jest bardzo czuła i równocześnie pozwala uniknąć frakcjonowania odczynnikami Girarda, które stanowi zawsze źródło strat substancji ketonowych. Nawet dla bardzo małych ilości sterydów 17-ketogenicznych, w granicach 5—10 μg , krzywa spektrofotometryczna posiada jeszcze charakterystyczny wierzchołek i jest bardzo zbliżona do krzywej czystego hormonu. Rezultaty są korzystniejsze od tych, które otrzymał Charollais [10] przez „uczulenie” reakcji Zim-

mermanna przez zastosowanie eteru jednometylowego glikolu etylenowego w celu oznaczenia 17-ketosterydów u świnki morskiej.

3. Nieznajomość procesów degradacji sterydów u tych gatunków utrudnia stosowanie klasycznych metod oznaczeń. Podczas gdy u człowieka bardzo liczne metabolity moczowe zostały wyodrębnione i rozpoznane, u gryzoni tylko Burstein [22] zidentyfikował hydroksykortyzon w moczu świnki morskiej. Pomimo nieznajomości metabolitów moczowych u gryzoni wydaje się, że test Wilsona i Fairbanksa powinien z wystarczającą wiernością obrazować funkcję kory nadnercza.

Rezultaty ilościowe otrzymane na ekstraktach z moczu królika i szczura należy uzupełnić następującymi uwagami. Ponieważ hydrolizę prowadzono w temperaturze wrzenia w ciągu 10 minut w obecności kwasu solnego 15% (obj./obj.), sterydy posiadające boczny łańcuch 17-21-on uległy zniszczeniu. Tymczasem różnica pomiędzy oznaczeniem 17-ketosterydów neutralnych metodą klasyczną i testem Wilsona i Fairbanksa jest bardzo poważna. Różnica ta odpowiada 17-hydroksysterydom odpornym na hydrolizę kwasem solnym na gorąco i przekształconym w 17-ketosterydy w procesie utleniania chromowego. Należy z tego wnioskować, że metabolizm niektórych sterydów jest zupełnie różny u człowieka i u obu gatunków gryzoni. Vennig cytuje doświadczenia porównawcze [25] metabolizmu testosteronu u człowieka i u królika, z których wynika, że podczas gdy u królika 21% tego hormonu przechodzi w sterydy nieketonowe: etiocholan-3 α , 17 α -diol oraz androstan-3 β , 17 β -diol (oba te metabolity przekształcają się ilościowo w 17-ketosterydy przez utlenienie chromowe), to u człowieka tylko 3% wprowadzonego hormonu odnajdują się we frakcji nieketonowej sterydów moczowych. Oprócz 17-hydroksysterydów C₁₉ również sterydy C₂₁ mogą wpływać na różnicę pomiędzy obu testami. Jest rzeczą wiadomą, że 21-deoksy-17-20-ketosterydy są bardzo odporne na hydrolizę kwasem solnym na gorąco [2]. Skądinąd Bauer i Karl [3] z moczu ludzkiego patologicznego poddanego tej samej hydrolizie wydzielili drogą chromatografii na tlenku glinu duże ilości sterydów C₂₁.

Jakkolwiek metoda Wilsona i Fairbanksa pozwala oznaczyć u człowieka i u małych zwierząt laboratoryjnych, oprócz dwóch zasadniczych rodzin 17-ketosterydów i kortykoidów, wiele różnych metabolitów kory nadnercza, nie może ona jednak dać wiernego obrazu funkcji kory nadnercza. Nie pozwala bowiem odróżnić metabolitów kory nadnercza od metabolitów pochodzenia jądrowego ani od pochodnych 17-hydroksyprogesteronu. Dlatego też metoda ta, jakkolwiek całkowicie zadowolająca z punktu widzenia chemicznego, powinna być jeszcze poddana kontrolom statystycznym i fizjologicznym.

Streszczenie

Test Wilsona i Fairbanksa: utlenianie kwasem chromowym połączone z reakcją Zimmermanna, zastosowano do ekstraktów moczowych człowieka, królika i szczura. U tych trzech gatunków utlenienie kwasem chromowym pozwala uzyskać w reakcji Zimmermanna zabarwienia, których widma absorpcyjne są bardzo zbliżone do widma androsteronu utlenionego. W szczególności u zwierząt laboratoryjnych, u których chromogeny nieswoiste stanowiły bardzo ciężki problem, działanie kwasem chromowym pozwala zastosować reakcję Zimmermanna do surowych ekstraktów moczowych.

Poza tym test Wilsona i Fairbanksa pozwolił stwierdzić obecność wielkich ilości 17-hydroksysterydów w moczu królika i szczura. Sterydy te są odporne na działanie kwasu solnego na gorąco.

Ponieważ przeważna ilość metabolitów moczowych hormonów kory nadnercza posiada funkcję hydroksylową w C₁₇, test ten powinien również stanowić dobry sprawdzian funkcji kory nadnercza.

LITERATURA

- [1] Allen W. M., *J. Clin. Endocrin.* **10**, 71, 1950.
- [2] Appleby J. I., Gibson G., Norymberski I. K., Stubbs R. D., *Biochem. J.* **60**, 453, 1955.
- [3] Bauer J., Karl J., *Zeitsch. Ges. Exp. Med.* **125**, 14, 1955.
- [4] Bekaert T., Vermeulen A., *Ann. Endocrin.* **15**, 946, 1954.
- [5] Bonder F., *Post. Higieny i Med. Dośw.* **6**, 211, 1953.
- [6] Borth R., *Coll. Endocrin. Found. Ciba* **II**, 1952.
- [7] Books G. J., Norymberski J. K., *Biochem. J.* **55**, 371, 1953.
- [8] Bush E., *Biochem. J.* **50**, 370, 1952.
- [9] Cahen R. L., Salter W. I., *J. Biol. Chem.* **152**, 489, 1944.
- [10] Charollais E. J., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **37**, 2, 1955.
- [11] Davis C. T., Slater C. R., Krichesky B., *Endocrinology* **44**, 83, 1949.
- [12] De Konig J., Krichewski B., Glass S. J., *Proc. Soc. Biol. Med.* **68**, 321, 1948.
- [13] Grady H. J., Elliott W. H., *J. Biol. Chem.* **195**, 755, 1952.
- [14] Grant W. Liddle, *Endocrinology* **55**, 5, 1954.
- [15] Huis in't Veld L. G., Lampe Hintzen D. A. V. M., *Ann. Endocrin.* **2**, 17, 1956.
- [16] Jayle M. F., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **32**, 1067, 1950.
- [17] Karnofsky D. A., *Cancer Research* **4**, 772, 1944.
- [18] Kimeidorf D., *Am. J. Physiol.* **152**, 615, 1948.
- [19] Koller M., De Giuseppe L., *Bull. Soc. Ital. Biol. Sperm.* **39**, 40, 1953.
- [20] Kowalewski K., Bastenie P. A., Drzewicka H., *C. R. Soc. Biol.* **145**, 769, 1951.
- [21] Lampton A. K., Miller I., *J. Urol.* **68**, 497, 1941.
- [22] Shlomo Burstein, *Endocrinology* **50**, 412, 1952.

- [23] Smith R. S., Mellinger R. C., *J. Clin Endocrin. Metal.* **14**, 330, 1954.
 [24] Talbot N. B., Butler A. M., Mac Lachlan E. A., Jones R. N.,
J. Biol. Chem. **143**, 211, 1942.
 [25] Venning H., *Coll. Endocrin. Ciba Foundation* **2**, 1952.
 [26] Voigt K. D., Schroeder W., Beckmann I., *Acta Endocrin.*
18, 325, 1955.
 [27] Wilson H., Fairbanks R., *Arch. Biochem. Biophys.* **54**, 440, 1955.
 [28] Zimmermann W., *Z. Physiol. Chem.* **233**, 281, 1935.

17-КЕТОСТЕРИДЫ И 17-ОКСИСТЕРИДЫ В МОЧЕ ЧЕЛОВЕКА, КРОЛИКА И КРЫСЫ

1. ХРОМОГЕНЫ ЦИММЕРМАННА В МОЧЕВЫХ ЭКСТРАКТАХ ДО И ПОСЛЕ ОКИСЛЕНИЯ ХРОМОВОЙ КИСЛОТОЙ

Резюме

Тест Вильсона и Фербанка: окисление хромовой кислотой в соединении с реакцией Циммерманна — применили к мочевым экстрактам человека, кролика и крысы. У этих трех видов окисление хромовой кислотой позволяет получить в реакции Циммерманна окрашивания, абсорбционные спектры которых весьма приближены к спектру окисленного андростерона. В особенности у лабораторных животных, у которых неспецифические хромогены представляли собою весьма трудную проблему, воздействие хромовой кислотой разрешает применить реакции Циммерманна к сырым мочевым экстрактам.

Кроме того, тест Вильсона и Фербанка позволил констатировать наличие больших количеств 17-оксистеридов в моче кролика и крысы. Эти стериды являются стойкими на действие горячей соляной кислоты.

Так как преобладающее количество мочевых метаболитов гормонов коры надпочечника обладает гидроксильной функцией в C₁₇, то этот тест должен являться хорошим критерием функции коры надпочечника.

LES 17-KÉTOSTÉROÏDES ET 17-HYDROXYSTÉROÏDES DE L'URINE CHEZ L'HOMME, LE LAPIN ET LE RAT

I. LES CHROMOGÈNES DE ZIMMERMANN DANS LES EXTRACTS D'URINE AVANT ET APRÈS L'OXIDATION D'ACIDE CHROMIQUE

Résumé

Le test de Wilson et Fairbanks: oxydation chromique combinée à la réaction de Zimmermann, a été appliqué aux extraits urinaires chez l'homme, le lapin et le rat. Chez les trois espèces l'oxydation chromique permet d'obtenir dans la réaction de Zimmermann des colorations dont les spectres d'absorption sont très proches du spectre

de l'androsterone oxydée. Chez les animaux, en particulier, où se posait avec acuité le problème des chromogènes non spécifiques, l'action de l'acide chromique rend la réaction de Z i m m e r m a n n applicable aux extraits bruts des urines.

Le test de W i l s o n et F a i r b a n k s a permis de déceler la présence de grandes quantités de 17-hydroxystéroïdes dans les urines de lapin et du rat. Ces 17-hydroxystéroïdes résistent à une hydrolyse chlorhydrique à chaud.

Un grand nombre de métabolites urinaires des hormones cortico-surrénales possédant une fonction hydroxyle en C₁₇ ce test devrait en outre constituer un bon index de la fonction surrénale.

Otrzymano 29.4. 1957 r.

J. PAWEŁKIEWICZ i K. ZODROW

BADANIA NAD BIOSYNTEZĄ ZWIĄZKÓW KOBALAMINOWYCH**2. MECHANIZM POWSTAWANIA KOBALAMIN U *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE****

Z Katedry Biochemii (kierownik: doc. dr J. Pawełekiewicz) i Katedry Mikrobiologii Rolnej (kierownik: doc. dr J. Duda) Wyższej Szkoły Rolniczej w Poznaniu

Niedawno wykazano w naszych pracowniach, że maczugowce błonicy posiadają zdolność syntezy kobalamin [7]. W ostatnich badaniach zajęto się charakterystyką i identyfikacją kobalamin wytwarzanych przez *C. diphtheriae* (szcep nr 44, Kolekcja Państwowego Zakładu Higieny, Warszawa) [8]. Metodą elektroforezy bibułowej w 0,5N CH₃COOH rozdzielono związki kobalaminowe na 4 frakcje: elektroobojętą frakcję I oraz zasadowe frakcje II, III i IV. Frakcje II i III zidentyfikowano jako pseudowitamin B₁₂ (adeninocyjanokobalamina, adeninocyjanokobamid) i czynnik A (2-metyloadeninocyjanokobalamina, 2-metyloadeninocyjanokobamid). Frakcja IV okazała się karboksylową pochodną czynnika B (witaminu B_{12p}, etiokobalaminy, korfinoamidu), zaś elektroobojętą frakcja I przedstawiała mieszaninę złożoną z co najmniej 4 różnych związków z przewagą dwóch kobalamin [8].

Już we wstępnych doświadczeniach zauważono, że stosunek poszczególnych frakcji kobalaminowych biosyntetyzowanych przez badany szcep maczugowca zmienia się regularnie w czasie hodowli drobnoustroju. Ta znaczna liczba związków kobalaminowych wytwarzanych w ilościach tego samego rzędu przez jeden szcep, jak również obserwowane jakościowo zmiany w występowaniu poszczególnych frakcji budziły nadzieję, że badając szczegółowo ilościowe zmiany w pojawieniu się poszczególnych związków kobalaminowych w czasie hodowli będzie można wnikać w mechanizm ich powstawania w komórkach badanego mikroorganizmu.

W pracy niniejszej podajemy wyniki doświadczenia, w którym ilościowo oznaczano stężenia czterech dających się rozdzielić elektroforetycznie

*) Część 1. J. P a w e ł k i e w i c z, *Acta Biochim. Pol.*, 3, 581, 1956.

frakcji w trzech terminach hodowli, a mianowicie po 24, 46 i 71 godzinach. Analiza tych wyników, jak również przeprowadzona równocześnie bliższa charakterystyka elektroobojętniej frakcji I pozwoliły wydedukować przypuszczalny mechanizm biosyntezy związków kobalaminowych u *Corynebacterium diphtheriae*.

Część doświadczalna

1. ILOŚCIOWE OZNACZENIE FRAKCJI KOBALAMINOWYCH I-IV W CZASIE HODOWLI *C. DIPHTHERIAE*

Oznaczenia ilościowe wykonywano metodą spektrofotometryczną mierząc gęstość optyczną sumy wszystkich wytworzonych kobalamin (D), a następnie oznaczając stosunek stężeń poszczególnych frakcji ilościowo wyeluuowanych z rozwiniętych jonoforogramów. Wszystkie pomiary spektrofotometryczne dokonano na aparacie Unicam S. P. 500 dla fali o długości 580 m μ , po przekształceniu kobalamin w ich formy dwucyjanowe. Sposób ten pozwolił określić ilości poszczególnych kobalamin w mikromolach, także kobalamin o nieznannej strukturze, na zasadzie następującego rozumowania.

Wielokrotnie stwierdzono na przykładzie różnych kobalamin, że widma absorpcyjne ich pochodnych dwucyjanowych prawie nie różnią się od siebie, zwłaszcza dla fal w zakresie 360—590 m μ , z maksimami przy 368, 540 i 580 m μ . Stwierdzono dalej, że stosunek absorpcji dla maksimów przy 368 i 580 m μ jest również niezależny od rodzaju badanej kobalaminy. I tak dla formy dwucyjanowej witaminu B₁₂ $d_{368}/d_{580} = 3,01$, a dla witaminu B_{12p} (czynnika B) wynosi on 3,03. Spostrzeżenia te świadczą, że układy chromoforowe pochodnych dwucyjanowych różnych kobalamin są całkowicie lub prawie identyczne, a zatem wartości liczbowe ich molowych współczynników ekstynkcji powinny być jednakowe. Na podstawie takiego założenia przyjęto wartość molowego współczynnika ekstynkcji (580 m μ) = 10 707. Wartość tę obliczono ze znanego ciężaru cząsteczkowego witaminu B₁₂ (1355,3 — C₆₃H₈₈O₁₄N₁₄PCo) i znanego współczynnika ekstynkcji E_{1%^{1cm}} (580 m μ) = 79 formy dwucyjanowej witaminu B₁₂. Stężenie badanych kobalamin w mikromolach/ml obliczano według wzoru:

$$c = \frac{d_{580}}{10,707} \mu\text{M/ml},$$

gdzie d_{580} oznacza gęstość optyczną dla fali 580 m μ .

Doświadczenia przeprowadzono w 36 kolbach zawierających po 170 ml pożywki. Po 24, 46 i 71 godzinach hodowli zdejmowano z trzęsawki po 12 kolb, odwirowywano komórki maczugowca, po czym wyodrębniano z nich

kobalaminy według metody uprzednio opisanej [8]. W cytowanej pracy podano również metodę hodowli *Corynebacterium diphtheriae*. Uzyskane koncentraty uzupełniano wodą do określonej objętości (v) i następnie oznaczano w nich sumę zawartych kobalamin. W tym celu z koncentratu pobierano ok. 5 ml roztworu, zadawano go kryształkiem NaCN, dokładnie mieszano i po 2 godzinach mierzono gęstość optyczną D dla fali 580 $m\mu$. Pozostałą część roztworu zagęszczano pod zmniejszonym ciśnieniem i nanoszono w formie wąskiego paska na bibułę Whatman nr 3 (o szerokości ok. 12 cm) i kobalaminy rozdzielano jonoforetycznie metodą Holdswortha [4] w 2N CH_3COOH . Po wysuszeniu rozwiniętego jonoforogramu wycinano z niego pasy frakcji kobalaminowych (I—IV), ilościowo ekstrahowano je wodą, odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem do sucha, po czym rozpuszczano w określonej objętości wody, zadawano kryształkiem NaCN i analogicznie jak przy oznaczaniu sumy kobalamin mierzono gęstość optyczną po 2 godzinach (otrzymywano wartości d'_1, d'_2, d'_3, d'_4) dla fali o długości 580 $m\mu$ [6]. Z pomiarów $d'_1 \dots d'_4$ sprawdzonych do jednakowej objętości próby, obliczano stosunki:

$$k_2 = \frac{d'_2}{d'_1}, \quad k_3 = \frac{d'_3}{d'_1} \quad \text{i} \quad k_4 = \frac{d'_4}{d'_1}.$$

Pamiętając, że D jest sumą gęstości optycznych poszczególnych frakcji kobalaminowych

$$D = d_1 + d_2 + d_3 + d_4 \quad \text{i} \quad \text{że} \quad \frac{d'_2}{d'_1} = \frac{d_2}{d_1} \text{ itd.},$$

otrzymamy:

$$D = d_1 (1 + k_2 + k_3 + k_4),$$

skąd możemy obliczyć zgodnie z prawem Beera stężenia poszczególnych kobalamin w koncentracie:

$$c_1 = \frac{D}{(1 + k_2 + k_3 + k_4)} \mu\text{M/ml},$$

$$c_2 = \frac{Dk_2}{(1 + k_2 + k_3 + k_4)} \mu\text{M/ml} \quad \text{itd.}$$

Uwzględniając dalej objętość v koncentratu możemy obliczyć ilości poszczególnych frakcji kobalaminowych w mikromolach.

W jednym z przeprowadzonych doświadczeń otrzymano np. $v = 40$ ml koncentratu o gęstości optycznej $D = 0,700$. Wartości d' (w przeliczeniu na jednakową objętość 10 ml) wynosiły odpowiednio: $d'_1 = 0,264$, $d'_2 = 0,082$, $d'_3 = 0,078$ i $d'_4 = 0,239$. Stąd obliczono $k_2 = 0,31$, $k_3 = 0,29$ i $k_4 = 0,90$. Ilość np. frakcji II (pseudowitaminu B_{12}) wynosiła w próbie (o objętości 1220 ml):

$$c_2 = \frac{0,700 \cdot 40 \cdot 0,31}{10,707 (1 + 0,31 + 0,29 + 0,90)} = 0,324 \mu\text{M}$$

a w przeliczeniu na 1 litr kultury: 0,266 $\mu\text{M/l}$.

Wyniki doświadczenia są zestawione w tablicy 1.

Tablica 1

Ilości kobalamin biosyntetyzowanych przez *C. diphtheriae* (szczep nr 44, Kolekcja Państwowego Zakładu Higieny, Warszawa) w mikromolach na litr i ich skład procentowy w czasie przebiegu hodowli

Fracja kobalaminowa	Czas hodowli w godzinach					
	24		46		71	
	μM	%	μM	%	μM	%
I	0,118	100	0,843	45,2	0,614	39,9
II (adeninocyjano- kobalamina)	ślady	—	0,266	14,2	0,191	12,4
III (2-metyloadenino- cyjanokobalamina)	ślady	—	0,218	11,7	0,178	11,6
IV	0	—	0,537	28,8	0,556	36,1
suma kobalamin	0,118		1,864		1,539	

2. CHARAKTERYSTYKA FRAKCJI I *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE*

Dla bliższego poznania przypuszczalnego mechanizmu biosyntezy kobalamin u *C. diphtheriae* konieczna była pełniejsza charakterystyka frakcji I. Już w poprzedniej publikacji [8] stwierdzono metodami chromatografii bibułowej, że frakcja ta nie jest jednorodna i składa się co najmniej z 4 substancji z przewagą 2 kobalamin. Na podstawie badań elektroforetycznych przy pH 2,2 i 6,5 wyrażono również poprzednio przypuszczenie, że kobalaminy tej frakcji mogą być różnymi beznukleotydowymi estrami fosforowymi witaminu B_{12p} (czynnika B) [8]. Niedawno Friedrich i Bernhauer [2] opierając się na wcześniejszych pracach Bamanna i innych dotyczących katalitycznej hydrolizy estrów fosforowych, opracowali selektywną metodę hydrolizy nukleotydocyjanokobalamin z oderwaniem nukleozydu i kwasu fosforowego oraz z utworzeniem czynnika B (witaminu B_{12p}). Metoda Friedricha i Bernhauera polega na katalitycznym hydrolitycznym działaniu wodorotlenku cerawego przy pH ok. 5 w obecności cyjanków przyspieszających

tę reakcję. Dla sprawdzenia, czy kobalaminy frakcji I są istotnie estrami kwasu fosforowego, frakcję tę poddano omówionej katalitycznej hydrolizie, po czym przebadano powstałą kobalaminę.

W tym celu 0,5 ml roztworu frakcji I zawierającej ok. 2 mg kobalamin zadano 0,5 ml ok. 0,3 M roztworu $CeCl_3$, 0,5 ml 1 N NaOH i 1 kroplą 3% NaCN zobojętnionego uprzednio kwasem siarkowym. Mieszanina posiadała pH ok. 5,5. Roztwór ten zatopiono w rurce szklanej i ogrzewano na wrzącej łaźni wodnej w ciągu 20 minut. Po ostudzeniu próby rozcieńczano ją wodą do objętości 30 ml, odwirowywano osad $Ce(OH)_2$ i z klarownego płynu ekstrahowano kobalaminy roztworem krezolu w chloroformie (mieszanina izomerycznych krezoli i chloroformu, 1:1, v/v). Z ekstraktu krezolowego przenoszono kobalaminy do wody po dodaniu do niego $1/2$ obj. chloroformu i $1/2$ obj. n-butanolu [6]. Po usunięciu śladów krezoli i butanolu przy pomocy ekstrakcji chloroformem, wodny roztwór odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem do małej objętości i zagęszczony roztwór kobalamin użyto do badań jonoforetycznych i chromatograficznych. Za pomocą obydwu metod wykazano, że w wyniku opisanej hydrolizy z niejednorodnej frakcji I uzyskano jednorodną kobalaminę, nie dającą się oddzielić od witaminu B_{12p} (czynnika B). Badania jonoforetyczne przeprowadzono przy pH 2,7 (0,5 N CH_3COOH z dodatkiem 0,015% NaCN) i pH 6,5 (0,05 M bufor fosforanowy z dodatkiem 0,015% NaCN). W metodach chromatograficznych stosowano następujące układy rozpuszczalników:

a) nasycony wodą sek-butanol z dodatkiem 1% (v/v) kwasu octowego i z dodatkiem śladów cyjanków [5],

b) nasycony wodą sek-butanol z dodatkiem 1% (v/v) 25% amoniaku i z dodatkiem śladów cyjanków [5],

c) n-butanol : propanol-2 : woda : kwas octowy (10 : 6,5 : 10 : 0,1) z dodatkiem śladów NaCN,

d) jak podano pod c). Rozpuszczalnik wysycony $KClO_4$,

i e) nasycony wodą sek-butanol. Rozpuszczalnik wysycony $KClO_4$ z dodatkiem śladów NaCN [3].

Chromatografowano na bibule Whatman nr 1 metodą wstępującą dla rozpuszczalników a), b) i e) lub spływową dla rozpuszczalników c) i d).

3. Dyskusja wyników

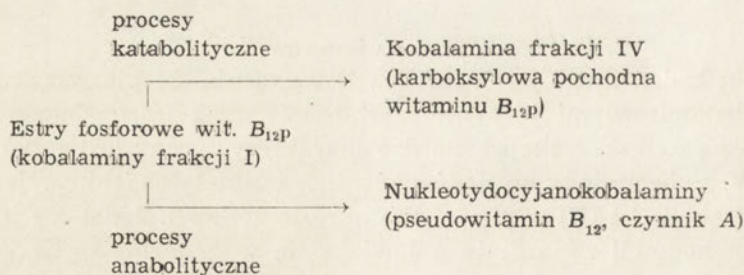
Wyniki badań ilościowych (tablica 1) wykazują, że pierwszymi związkami kobalaminowymi biosyntetyzowanymi przez *Corynebacterium diphtheriae* są związki frakcji I. Bardzo charakterystyczny jest zupełny brak frakcji IV, a obecność tylko śladów adenino- i 2-metyloadeninocobalaminy (frakcji II i III) w pierwszym okresie hodowli. Jednakże już po 46 godzinach hodowli związki te pojawiają się w znaczniejszych ilościach.

Po dalszych 25 godzinach hodowli procentowa zawartość adenino- i 2-metyloadeninocyjanokobalaminy praktycznie nie zmienia się, gdy tymczasem zawartość kobalaminy IV silnie wzrasta w tym czasie (z 28,8% do 36,1%) na niekorzyść kobalaminy frakcji I. Procentowa zawartość ostatnich kobalaminy maleje z 45,2% do 39,9%.

Z danych tych wydaje się prawdopodobne, że kobalamina IV (karboksylowa pochodna czynnika B) jest produktem rozkładu kobalaminy zawartej we frakcji I. Przypuszczać także należy, że kobalaminy frakcji I są również związkami wyjściowymi dla syntezy nukleotydocyjanokobalaminy (frakcji II i III).

Z uprzednio opublikowanych danych [8] wynika, że frakcja I składa się z 4 kobalaminy z przewagą dwóch związków, przy czym żaden z nich nie zawiera ugrupowania nukleotydowego. Elektroobojętny charakter tych związków przy pH 2,7, a kwaśny przy pH 6,5 wskazywał, że zawierają one jedną dobrze dysocjującą grupę kwasową. W pracy niniejszej wykazano, że grupą tą jest grupa kwasu fosforowego, ponieważ katalityczna hydroliza tych związków w obecności wodorotlenku cerawego prowadziła do powstania tylko jednego związku, a mianowicie do witaminu B_{12p} (czynnika B). A zatem wszystkie kobalaminy frakcji I muszą być fosforowymi estrami witaminu B_{12p} . Cztery różne kobalaminy frakcji I mogą więc przedstawiać: kwas etiokobalaminofosforowy (kwas korfinoamidofosforowy), kwasy 2'- lub 3'-rybozoetiokobalaminofosforowe (kobamid i jego izomer) czy wreszcie kwasy mono- lub polifosforybozoetiokobalaminofosforowe. Bliższa identyfikacja tych związków nie była możliwa ze względu na szczupłość posiadanego materiału.

Dane przedstawione w tej pracy wskazują, że biosynteza pełnych kobalaminy, tj. zawierających ugrupowanie nukleotydowe, zachodzi w komórkach *C. diphtheriae* przez stadium fosforowych estrów witaminu B_{12p} (czynnika B). Nadmiar estrów fosforowych nie przekształcających się w nukleotydocyjanokobalaminy ulega rozkładowi z odszczepieniem kwasu fosforowego i hydrolizą jednej (lub więcej) grupy amidowej. Zależności te obrazuje schemat:



Trzeba tu zaznaczyć, że Dellweg, Becher i Bernhauer [1] pierwsi wyrazili przypuszczenie, że biosynteza witaminu B_{12} zachodzi przez fosforowe pochodne czynnika B, ponieważ pochodne nukleozydowa i nukleotydowa 5,6-dwumetylobenzimidazolu są trudniej biosyntetycznie wykorzystywane przez *E. coli* do syntezy witaminu B_{12} niż sam dwumetylobenzimidazol. W pracy naszej uzyskaliśmy po raz pierwszy dowody eksperymentalne przemawiające za takim mechanizmem biosyntezy nukleotydocyjanokobalamin.

Streszczenie

1. Przedstawiono wyniki ilościowych oznaczeń poszczególnych kobalamin syntetyzowanych przez *Corynebacterium diphtheriae*. Zbadano zmiany stężeń czterech rozdzielających się jonoforetycznie kobalamin w czasie hodowli drobnoustroju. Na podstawie uzyskanych danych stwierdzono, że pierwszymi produktami biosyntezy związków kobalaminowych u *C. diphtheriae* są beznukleotydowe i elektroobojętne (przy pH 2,7) pochodne zawarte we frakcji I.

2. Wszystkie kobalaminy frakcji I poddane katalitycznej hydrolizie w obecności wodorotlenku cerawego przechodzą ilościowo w witamin B_{12p} (czynnik B).

3. Przedyskutowano prawdopodobny mechanizm powstawania kobalamin u *Corynebacterium diphtheriae*.

LITERATURA

- [1] Dellweg H., Becher E., Bernhauer K., *Biochem. Z.* **327**, 422, 1956.
- [2] Friedrich W., Bernhauer K., *Chem. Ber.* **89**, 2507, 1956.
- [3] Friedrich W., Bernhauer K., *Mikrochimica Acta*, 134, 1956.
- [4] Holdsworth E. S., *Nature*, **171**, 148, 1953.
- [5] Kon S. K., *Biochem. Soc. Symp.*, No. **13**, 36, 1955.
- [6] Pawełkiewicz J., Nowakowska K., *Acta Biochim. Pol.* **2**, 259, 1955.
- [7] Pawełkiewicz J., Zodrow K., *Acta Microbiol. Pol.* **5**, 319, 1956.
- [8] Pawełkiewicz J., Zodrow K., *Acta Microbiol. Pol.*, 1957, w druku.

ИССЛЕДОВАНИЯ ПО БИОСИНТЕЗУ КОБАЛАМИНОВЫХ СОЕДИНЕНИИ 2. МЕХАНИЗМ ОБРАЗОВАНИЯ КОБАЛАМИНОВ У *CORYNEBACTERIUM DIPHThERIAE*

Резюме

1. Представлены результаты количественных определений отдельных кобаламинов синтезированных *Corynebacterium diphtheriae*. Ис-

следовали изменения концентраций четырех разделяющихся путем ионофореза, кобаламинов в течение культивирования микроорганизмов. На основании полученных данных констатировали, что первыми продуктами биосинтеза кобаламиновых соединений у *Corynebacterium diphtheriae* являются безнуклеотидные и электронейтральные (при pH=2,7) производные, заключающиеся во фракции I.

2. Все кобаламины фракции I, подверженные каталитическому гидролизу в присутствии гидрата закиси церия, переходят количественно в витамин B_{12p} (фактор B).

3. Продискутирован вероятный механизм образования кобаламинов у *Corynebacterium diphtheriae*.

STUDIES ON THE BIOSYNTHESIS OF COBALAMIN COMPOUNDS

2. MECHANISM OF FORMATION OF COBALAMINS BY *CORYNEBACTERIUM DIPHThERIAE*

S u m m a r y

1. Results of quantitative determinations of cobalamins biosynthesised by *Corynebacterium diphtheriae* (strain No. 44, P.Z.H., Warszawa) have been presented. Concentration changes, during growth of this micro-organism, of four ionophoretically separated cobalamins have been investigated. The present experiments showed that the first products of the biosynthesis are ionophoretically neutral (at pH 2,7) and nucleotideless cobalamin compounds of the fraction I.

2. All cobalamins of the fraction I catalytically hydrolysed in the presence of $Ce(OH)_3$ give as the end products the factor B (vitamin B_{12p}) only.

3. The possible mechanism of the biosynthesis of cobalamins in *Corynebacterium diphtheriae* cells is discussed.

Otrzymano 21.5.1957 r.