

Z Zakładu Chemii Ogólnej Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Lublinie
Kierownik: zast. prof. dr Irena Krzeczowska

Irena KRZECZKOWSKA i Jerzy ISKIERKO

**Chromatograficzne badanie składu wolnych
aminokwasów szczepionek *Neurovaccin* i *Neofilamina***

**Хроматографическое исследование состава свободных
аминокислот содержащихся в сыворотках *Neurovaccin* и *Neofilamina***

**Chromatographic Investigations of Free Amino-acids in the Vaccines
Neurovaccin and *Neofilamina***

Materiałem wyjściowym do otrzymywania szczepionki: *Neurovaccin* — są autolizaty szczepów neurotropowych paciorkowców hemolizujących i gronkowca złocistego. Autolizaty bakterii otrzymuje się przez posiewy wymienionych bakterii na podłożu Todd-Hewitta. W szczepionce produkcji Lubelskiej Wytwórni Surowic i Szczepionek autolizaty gronkowca złocistego i paciorkowców są mieszane ze sobą, odpowiednio rozcieńczane 0,85% roztworem NaCl do stężeń: 1/5, 1/10, 1/15, 1/20, 1/25, 1/50 i konserwowane 0,3% fenolem.

W *Neurovaccinie* obok czynnych substancji komórkowych, wydzielanych do podłoża podczas wzrostu i autolizy komórek bakteryjnych, znajdują się wolne aminokwasy pochodzące z podłoża.

Neofilamina jest szczepionką bakteryjną zawierającą zabite drobno-ustroje takie jak: gronkowiec złocisty, paciorkowce hemolizujące i zieleniejące, paciorkowce kałowe (enterokoki), pałeczki okrężnicy i dwóinki Neissera (rzeźączki). Znajdują się w niej również lipoidy pochodzące z żółci bydlęcej i pepton.

Jako podłoż do hodowli produkcyjnych używa się pożywek stałych i płynnych w zależności od szczepu bakteryjnego.

Znajdujące się w *Neofilaminie* wolne aminokwasy pochodzą ze składników podłoża: peptonu angielskiego i żółci bydlęcej.

Celem niniejszej pracy było:

1. Poznanie składu wolnych aminokwasów:
 - a) znajdujących się w szczepionkach: *Neurovaccin* i *Neoflamina*,
 - b) zawartych w autolizatach gronkowca złocistego i paciorkowców hemolizujących,
 - c) wchodzących w skład podłoża.
2. Wykazanie zmian występujących podczas inkubacji.

METODY BADAŃ I MATERIAŁY

Materiał doświadczalny otrzymano z Lubeńskiej Wytwórni Surowic i Szczepionek.

Do wykrywania aminokwasów stosowano metody chromatografii bibułowej krążkowej i dwukierunkowej. Do badań używano bibuły Whatman N 3 oraz Whatman N 1. Badane substancje nakraplano w ilości 0,1 ml. Do identyfikacji sporządzano 0,1% roztwory aminokwasów.

Stosowano następujące układy rozpuszczalników:

- 1) n-butanol — kwas octowy — woda w stosunku 4 : 1 : 1
- 2) propanol — woda w stosunku 7 : 3
- 3) fenol — woda w stosunku 7 : 3

Wywoływano chromatogramy acetonowym roztworem ninhydryny o stężeniu 0,15%, acetonowym roztworem izatyny o stężeniu 0,25% oraz nową metodą termicznego wywołania i utrwalania aminokwasów wprowadzoną przez Krzeczowską Irenę (*Annales UMCS Sec. D. Vol. XII. 16, str. 255, 1957*).

BADANIA WŁASNE

I. *Neurovaccin*

Szczepionkę z ampułek o zawartości 1 ml i rozcieńczeniach 1/5, 1/10, 1/15, 1/20, 1/25 i 1/50, w ilości 5 do 10 ml w zależności od rozcieńczenia, odparowywano w parownicze do suchości pod promienikami podczerwonymi, umieszczając parowniczkę w odległości 5—6 cm od lampy w celu otrzymania temperatury około 60°C. Suchą pozostałość zalewano 5 ml alkoholu etylowego i po bardzo dokładnym, parokrotnym przemyciu pozostawiano na 15 minut w spokoju, po czym etanol z rozpuszczonymi w nim aminokwasami zlewano przez dekantację do innej parowniczkii i odparowywano do suchości. Osad rozpuszczano w 1/2—1 ml wody redestylowanej i nakraplano na bibułę w ilości 0,05 ml lub 0,1 ml.

Ryc. 1 przedstawia jeden z chromatogramów uzyskanych przy pomocy chromatografii krążkowej.

Ryc. 2 przedstawia chromatogram uzyskany z badania wyciągu serc wołowych.

Uzyskane chromatogramy — metodą chromatografii bibułowej krążkowej przedstawia ryc. 3; zestawienie składu wolnych aminokwasów wyciągu serc wołowych, podłoża Todd-Hewitta i *Neurovacciny* podane są w tabeli I.

Tabela I

Zestawienie składu wolnych aminokwasów szczepionki *Neurovaccin*, podłoża Hewitta i wyciągu z serc wołowych

L. p.	Aminokwas	Wyciąg z serc wołowych	Podłoże Hewitta	Szczepionka <i>Neurovaccin</i>
1	Cystyna	?	—	+—
2	Lizyna	+	+	++
3	Arginina	+—	+	+
4	Histydyna	+—	+	+—
5	Kwas asparaginowy	—	+—	+—
6	Glikokol	++	—	++
7	Seryna	+	+	+
8	Kwas glutaminowy	+	+	+
9	Treonina	—	+	+
10	Alanina	++	++	++
11	Prolina	?	?	—
12	Tyrozyna	—	+—	+—
13	Tryptofan	+	++	++
14	Metionina	—	—	—
15	Walina	+	+	+
16	Feniloalanina	—	+	+
17	Leucyna, izoleucyna	+	++	+

++	aminokwasy występujące we wszystkich chromatogramach w większych stężeniach
+	aminokwasy występujące w mniejszych stężeniach
+—	aminokwasy nie występujące na niektórych chromatogramach
—	aminokwasy nie były wykryte
?	aminokwasy, których obecność budziła wątpliwość

II. *Neoflamina*

Technika wykonania taka, jak przy szczepionce *Neurovaccin*.

Ryc. 4 przedstawia jeden z chromatogramów uzyskanych techniką chromatografii bibułowej krążkowej.

Ryc. 5 przedstawia chromatogram wolnych aminokwasów uzyskany z badania żółci bydłowej.

Ryc. 6 przedstawia chromatogram krążkowy wolnych aminokwasów wykrytych w bulionie króliczym.

Ryc. 7 przedstawia chromatogram wolnych aminokwasów autolizatu gronkowca złocistego, zaś ryc. 8 chromatogram wolnych aminokwasów autolizatu paciorkowców hemolizujących. Na ryc. 9 pokazano chromatogram wolnych aminokwasów autolizatu gronkowca złocistego i paciorkowców hemolizujących (stosunek 1 : 1).

Tabela II

Zestawienie składu wolnych aminokwasów szczepionki *Neoflamina*, żółci bydłowej i bulionu króliczego

L. p.	Aminokwas	Żółć bydłowa	Bulion króliczy	Szczepionka <i>Neoflamina</i>
1	Cystyna	+—	+	+—
2	Lizyna	++	++	++
3	Arginina	+	—	+
5	Histydyna	+—	+—	+—
5	Kwas asparaginowy	—	—	—
6	Glikokol	+	+	+
7	Seryna	+	+	+
8	Kwas glutaminowy	++	?	+
9	Treonina	+	+	+
10	Alanina	+	++	+
11	Prolina	—	—	—
12	Tyrozyna	+	+	+
13	Tryptofan	+—	+	++
14	Metionina	—	+—	—
15	Walina	+	+	+
16	Feniloalanina	+—	—	+
17	Leucyna, izoleucyna	+	+	+

++ aminokwasy występujące we wszystkich chromatogramach w większych stężeniach
 + aminokwasy występujące w mniejszych stężeniach
 +— aminokwasy nie występujące na niektórych chromatogramach
 — aminokwasy nie były wykryte
 ? aminokwasy, których obecność budziła wątpliwość

Zestawienie składu wolnych aminokwasów zółci bydłej, bulionu króliczego i *Neoflaminy* podane jest w tabeli II.

Tabela III podaje wykaz wolnych aminokwasów w autolizatach gronkowca złocistego i paciorkowców hemolizujących.

Tabela III

Wolne aminokwasy w autolizatach gronkowca złocistego i paciorkowców hemolizujących

L. p.	Aminokwas	Aminokwas w autolizacie gronkowca złocistego i paciorkowców hemolizujących
1	Cystyna	+—
2	Lizyna	++
3	Arginina	+
4	Histydyna	+—
5	Kwas asparaginowy	—
6	Glikokol	+
7	Seryna	+
8	Kwas glutaminowy	+
9	Treonina	+
10	Alanina	++
11	Prolina	?
12	Tyrozyna	+
13	Tryptofan	++
14	Metionina	+—
15	Walina	++
16	Feniloalanina	+
17	Leucyna, izoleucyna	++
++ aminokwasy występujące we wszystkich chromatogramach w większych stężeniach + aminokwasy występujące w mniejszych stężeniach +— aminokwasy nie występujące na niektórych chromatogramach — aminokwasy nie były wykryte ? aminokwasy, których obecność budziła wątpliwość		

WYNIKI BADAŃ I WNIOSKI

1. Przebadano na zawartość wolnych aminokwasów szczepionki *Neurovaccin* i *Neoflamina*.

2. Określono skład wolnych aminokwasów podłoży bakteryjnych używanych do hodowli bakterii (podłoże Todd-Hewitta i bulion króliczy).

3. Określono wolne aminokwasy składników podłoży: peptonu angielskiego, wyciągu z serc wołowych i żółci bydłej.

4. Porównano skład wolnych aminokwasów podłoża Todd-Hewitta z autolizatami wyhodowanych na nim bakterii.

5. Określenie składu aminokwasowego szczepionek bakteryjnych wymagało określenia źródeł, z których one pochodzą i w tym celu przebadano podłoża bakteryjne oraz autolizaty, z których przez rozcieńczenie płynem fizjologicznym otrzymuje się szczepionki. Przebadanie autolizatów było konieczne w celu zorientowania się czy w nich pojawiają się nowe aminokwasy pochodzące z komórek (ulegających autolizie) a nie występujące w podłożach bakteryjnych.

6. Nie znaleziono różnic w składzie wolnych aminokwasów między podłożem Todd-Hewitta a autolizatami bakteryjnymi. Na podstawie oceny orientacyjnej natężenia barw poszczególnych aminokwasów, wydaje się, że lizyna, alanina, tryptofan, walina i leucyna występują w większych ilościach od innych aminokwasów.

РЕЗЮМЕ

В первой части работы автором произведены исследования относительно состава свободных аминокислот, находящихся в сыворотке „Neurovaccin”, которая представляет собой стерильный, частичный автолизат нескольких видов микроорганизмов, обладающих невротропными свойствами. Затем автор сравнивает состав свободных аминокислот:

- 1) экстракта из воловиных сердец
- 2) субстрата Todd-Hewitta
- 3) сыворотки „Neurovaccin”

Во второй части работы автор определил состав свободных аминокислот сыворотки „Neoflamina”, применяемой, кроме многих других случаев, для лечения воспалительных состояний придатков матки, а также сопоставил состав свободных аминокислот сыворотки с составом субстрата, состоящего из скотской жёлчи и кроличьего бульона.

Автором представлен также состав свободных аминокислот, выступающих в автолизатах гемолизирующих стрептококки и золотистого

стафилококка и сопоставлен с составом свободных аминокислот в субстратах и сыворотке.

Качественные различия в составе субстрата, бактериальных автолизаторов и сывороток не выступают, наблюдались однако некоторые количественные различия.

В автолизаторах можно заметить более сильную концентрацию, чем в субстратах таких аминокислот как лизин, аланин, триптофан, валин и лейцин.

S U M M A R Y

The first part of the paper deals with investigations on free amino-acids in the vaccine called „Neurovaccin”, which is a sterile, partial autolysate of some species of microbes possessing neurotropic properties.

There was compared the amino-acid composition of 1. extract of ox hearts, 2. the Todd-Hewitt medium, 3. „Neurovaccin”.

In the second part of the paper the free amino-acid composition of „Neoflamina” has been determined. This vaccine is used, among others, in the treatment of inflammatory states of uterine adnexa. Here also comparison has been made between the free amino-acid composition of the vaccine and that of the medium made of ox-gall and rabbit broth.

There is also given the free amino-acid composition of the *Streptococcus haemolyticus* and *Staphylococcus aureus* autolysates, and compared with the free amino-acid composition of the media and the vaccine.

There were found no qualitative differences in the composition of media, bacterial autolysates and vaccines, but there were noticed some quantitative changes.

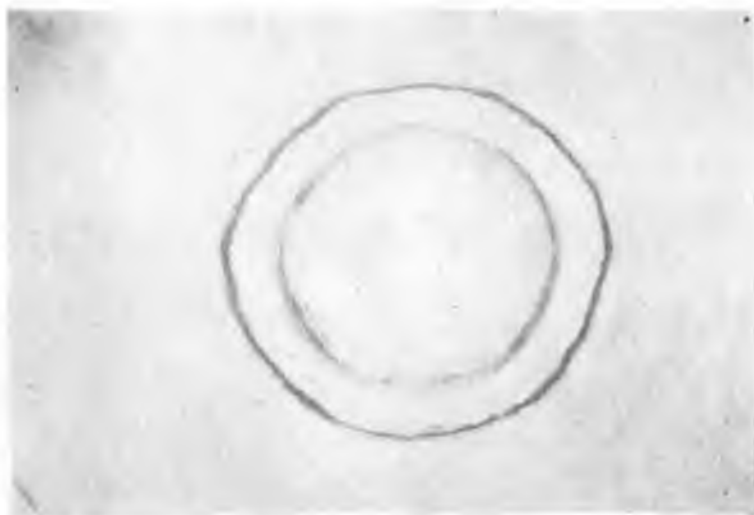
In comparison with the medium, there can be observed a greater concentration of such amino-acids as lysine, alanin, tryptophan, valin, and leucine.



Ryc. 1a. Chromatogram składu wolnych aminokwasów szczepionki *Neurovaccin* (rozc. 1 : 5)



Ryc. 1b. Chromatogram składu wolnych aminokwasów szczepionki *Neurovaccin* (rozc. 1 : 10)



Ryc. 2. Chromatogram wyciągu z serc wołowych



Ryc. 3. Wolne aminokwasy w podłożu Todd-Hewitta



Ryc. 4. Chromatogram składu wolnych aminokwasów szczepionki *Neoflamin*



Ryc. 5. Wolne aminokwasy w żółci bydlęcej



Ryc. 6. Chromatogram składu aminokwasowego bulionu króliczego



Ryc. 7. Wolne aminokwasy autolizatu gronkowca



Ryc. 8. Wolne aminokwasy autolizatu paciorkowca



Ryc. 9. Wolne aminokwasy w autolizacji mieszaniny paciorkowców i gronkowca

