

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XVI, 23

SECTIO D

1961

Z Katedry i Zakładu Chemii Ogólnej Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Lublinie
Kierownik: doc. dr Irena Krzeczowska

Irena KRZECZKOWSKA i Teresa WACH

Badanie składu wolnych aminokwasów szczepionki wg Delbeta przy pomocy chromatografii rozdzielczej na bibule

Исследование состава свободных аминокислот вакцины по Делбегу при помощи хроматографии на бумаге

Chromatographic Studies of Free Amino Acids in Delbet's Vaccine

Szczepionka wg Delbeta (*Vaccinum sec. Delbet*) produkowana jest z zawięsin i autolizatów paciorkowców, gronkowca i pałeczek ropy błękitnej. Zawiera ona zabite i odpowiednio rozcieńczone, bulionowe hodowle wyżej wymienionych drobnoustrojów oraz 0,5% fenolu, dodanego w celu konserwacji. Szczepionkę stosuje się w różnych przypadkach miejscowych zakażeń. Celem niniejszej pracy było poznanie składu wolnych aminokwasów szczepionki wg Delbeta.

METODY BADAŃ I MATERIAŁY

Do wykrywania aminokwasów stosowano metodę rozdzielczej chromatografii wstępującej jedno- i dwukierunkowej oraz krążkowej. Identyfikację przeprowadzano 0,1% roztworami aminokwasów:

cystyna	— ZSSR
lizyny chlorowodorek	— Anglia
kwas asparaginowy	— „Lawson” Anglia
argininy chlorowodorek	— „Chemapol” Czechosłowacja
histydyny chlorowodorek	— NRD
glicyna	— „Labor” Wrocław
d,l-seryna	— Carl Roth Karlsruhe
d,l-kwas glutaminowy	— „Fluka” Szwajcaria
d,l-treonina	— B. D. H. Anglia
d,l-alanina	— Merck, Darmstadt
d,l-prolina	— „Light” Anglia
d,l-tyrozyna	— „Fluka” Szwajcaria
d,l-tryptofan	— „Dembach” Niemcy
d,l-metionina	— „Fluka” Szwajcaria

d,l-walina	— „Schuchard” München
d,l-norwalina	— „Fluka” Szwajcaria
d,l-fenylalanina	— (bez bliższych danych)
d,l-leucyna	— „B. D. H.” Anglia
izoleucyna	— (bez bliższych danych)

Badania przeprowadzano na bibule Whatman N 3 i N 1. Do rozwijania chromatogramów używano układów rozpuszczalników: 1) n-bunatol — kwas octowy — woda w stosunku 4:1:1, 2) fenol — woda 7:3 i 3) propanol — woda w stosunku 7:3. Aminokwasy nakraplano mikropipetką o pojemności 0,07 ml lub melanżerem. Chromatogramy wywoływano acetonowym roztworem ninhydryny (ZSSR) o stężeniu 0,15% oraz sprawdzano 0,25% acetonowym roztworem izatyny. Chromatogramy utrwalano termiczną metodą wg Krzeczowskiej (1, 2).

Do badań używano szczepionki wg Delbeta produkcji Krakowskiej Wytwórni Surowic i Szczepionek w Krakowie, większą część badań przeprowadzono ze szczepionką serii 760960.

BADANIA WŁASNE

Szczepionkę z trzech ampulek, o zawartości 2 ml każda, odparowywano do suchości w parownicze kwarcowej, pod promienikami podczerwonymi, parowniczkę ustawiano w odległości 5 cm od lampy w celu uzyskania temp. 60°C. Suchą pozostałość zalewano 5 ml 96% alkoholu etylowego i po bardzo dokładnym parokrotnym przemyciu pozostawiano na 15 minut w spokoju, następnie ciecz zlewano (przez dekantację) do innej parowniczk. Osad przemywano kilkakrotnie wodą podwójnie destylowaną, zlewając za każdym razem ciecz do parowniczk. ze zdekantowanym płynem. Zawartość parowniczk. odparowywano do suchości. Suchą pozostałość rozpuszczano w 1/2—1 ml wody podwójnie destylowanej i nakraplano na bibulę w ilości 0,05 do 1 ml, a następnie rozwijano chromatogram, używając rozpuszczalników o wyżej podanym składzie.



Ryc. 1. Wolne aminokwasy w bulionie stosowanym do hodowli
Free amino acids in meat extract used as culture medium

Przebadano na wolne aminokwasy bulion stosowany do hodowli (ryc. 1), mieszaninę autolizatów gronkowca złocistego i paciorkowców hemolizujących (ryc. 2), pałeczkę ropy błękitnej (ryc. 3) oraz szczepionkę wg Delbeta (ryc. 4). Wyniki badań zebrano w tabeli 1. Wykonywano 10—12 oznaczeń, uzyskując wyniki powtarzalne. Chromatogramy utrwalano metodą termiczną wg Krzeczowskiej (1, 2).

Chromatogram bulionu pokazany jest na ryc. 1.

Ryc. 2 przedstawia chromatogram wolnych aminokwasów mieszaniny autolizatów gronkowca złocistego i paciorkowców hemolizujących.



Ryc. 2. Wolne aminokwasy w autolizacie mieszaniny gronkowca złocistego i paciorkowców hemolizujących

Free amino acids in autolysate of a mixture of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus haemolyticus*

Chromatogram wolnych aminokwasów pałeczki ropy błękitnej jest uwidoczniony na ryc. 3.



Ryc. 3. Skład wolnych aminokwasów pałeczki ropy błękitnej

Free amino acid composition of *Bacterium pyocyaneus*

Na ryc. 4 widzimy chromatogram wolnych aminokwasów w szczepionce wg Delbeta.



Ryc. 4. Skład wolnych aminokwasów w szczepionce wg Delbeta

Free amino acid composition of Delbet's vaccine

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Przebadano na zawartość wolnych aminokwasów szczepionkę wg Delbeta, używając metody chromatografii rozdzielczej na bibule.

Określono skład wolnych aminokwasów: bulionu stosowanego do hodowli, autolizatów mieszaniny gronkowca złocistego i paciorkowców hemolizujących oraz pałeczki ropy błękitnej i porównano ze składem

Tab. 1. Wolne aminokwasy w szczepionce wg Delbeta, w bulionie, mieszaninie autolizatów bakterii gronkowca i paciorkowców oraz pałeczce ropy błękitnej
Free amino acids in Delbet's vaccine meat extract, mixture of autolysates of *Staphylococci* and *Streptococci*, and in *Bacterium pyocyaneus*

Lp.	Nazwa aminokwasu	Bulion	Mieszanina autolizatów gronkowca i paciorkowców	Pałeczka ropy błękitnej	Szczepionka wg Delbeta
1	Cystyna	+	+ -	-	+
2	Lizyna	+	+	-	+
3	Arginina	-	+	+	+
4	Histydyna	+ -	+ -	+	+
5	Kw. asparaginowy	-	-	+	+ -
6	Glicyna	+	+	-	+
7	Seryna	+	+	-	+
8	Kw. glutaminowy	+ -	+	+	+
9	Treonina	+	+	+	+
10	Alanina	+	+	+	+
11	Prolina	-	+ -	+	+
12	Tyrozyna	+	+	+	+
13	Tryptofan	+	+	+	+
14	Metionina	+ -	+ -	-	+ -
15	Walina	+	+	+	+
16	Feniloalanina	-	+	+	+
17	Leucyna	+	+	+	+

Legenda: + = obecność aminokwasu,

- = nieobecny aminokwas,

+ - = aminokwasy występujące na niektórych chromatogramach.

wolnych aminokwasów szczepionki wg Delbeta (tab. 1). Różnicy jakościowej nie wykryto. Na podstawie orientacyjnej oceny natężenia barw poszczególnych aminokwasów z ninhydryną zaobserwowano, że cztery aminokwasy: kwas glutaminowy, alanina, prolina i leucyna występują w znacznie większym stężeniu niż pozostałe aminokwasy.

PIŚMIENNICTWO

1. Krzeczowska I.: Sposób termiczny wywoływania aminokwasów. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Sec. D, **12**, 255—257, 1957.
2. Krzeczowska I.: Termiczny sposób wywoływania aminokwasów (II), Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Sec. D, **14**, 99—107, 1959.

РЕЗЮМЕ

Методом разделительной хроматографии на бумаге авторами произведены исследования свободных аминокислот вакцины по Делбету и затем результаты сопоставлены с составом свободных аминокислот бульона, употребляемого в культуре, автолизата смеси стафилококка золотистого и стрептококков гемолитических, а также синегнойной палочки. Различий в качественном составе не обнаружено.

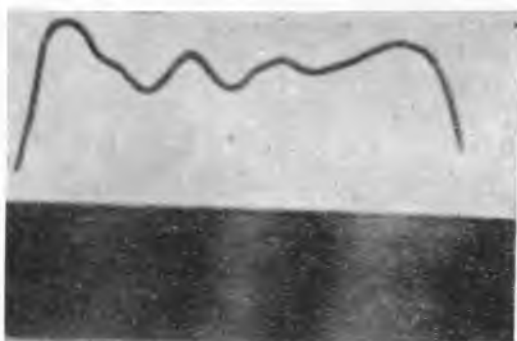
Основываясь на ориентировочной интенсивности окраски пятен аминокислот нингидрином, авторы заметили в вакцине по Делбету более сильную концентрацию четырех аминокислот, а именно: глютаминовой кислоты, аланина, пролина и лейцина в сравнении со всеми остальными.

SUMMARY

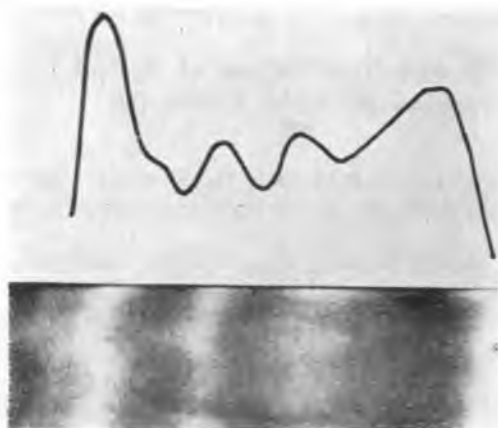
The method of paper chromatography was used for investigating free amino acids in Delbet's vaccine; the results were compared with the composition of free amino acids in the meat extract used as culture medium, in the autolysate of a mixture of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus haemolyticus*, and in the autolysate of *Bacterium pyocyaneus*. No differences in the qualitative composition were found.

Judging from the intensity of the colour reaction of the amino acid spots with ninhydrin, it was noted that glutamic acid, alanine, proline and leucine occur in Delbet's vaccine in higher concentrations than the remaining amino acids.

Biermeri i *Anaemia agastrica megaloblastica* (C. S. ryc. 4). 5) *Myelosis leucemica acuta* oraz *Anaemia secundaria* (K. S. ryc. 5). 6) *Lymphadenitis leucemica chronica* (P. K. ryc. 6) i 7) *Morbus hypertonicus* (K. ryc. 7).



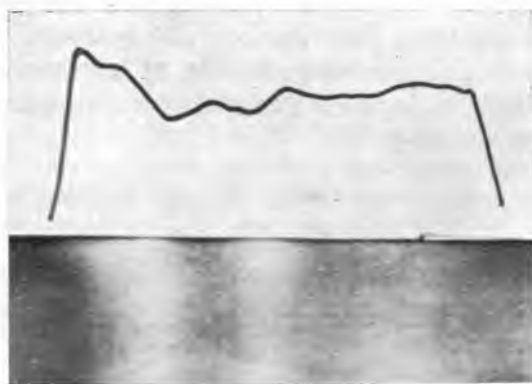
Ryc. 1. Proteinogram i odpowiadająca mu krzywa, surowicy krwi patologicznej *Myelosis leucemica acuta* (O. S.), wykreślone przy pomocy przystawki wg Klimka dołączonej do mikropolarografu wg Heyrovsky'ego



Ryc. 2. Proteinogram i odpowiadająca mu krzywa surowicy patologicznej *Glomerulonephritis chronica* (B. I.)



Ryc. 3. Proteinogram i odpowiadająca mu krzywa surowicy patologicznej *Nephroso-nephritis chronica* (B. J.)



Ryc. 4. Proteinogram i odpowiadająca mu krzywa surowicy patologicznej *Morbus Addisoni-Biermeri* i *Anaemia gastrica megaloblastica* (C. S)



Ryc. 5. Krzywa odpowiadająca surowicy patologicznej *Myelosis leucemica acuta* oraz *Anaemia secundaria* (K. S.)



Ryc. 6. Krzywa odpowiadająca surowicy patologicznej *Lymphadenitis leucemica chronica* (P. K.)



Ryc. 7. Krzywa odpowiadająca surowicy patologicznej *Morbus hypertonicus* (K)

Określenia względnej procentowej zawartości poszczególnych frakcji białkowych surowicy krwi przy pomocy elektroforezy dokonano 1) wg metody kolorymetrycznej barwnego eluatu, 2) wg metody bezpośredniej optycznej rejestracji na papierze światłoczułym. Wyniki uzyskane tymi metodami zebrano w tabeli 1.

Teb. 1. Zestawienie wyników względnej procentowej zawartości poszczególnych frakcji białkowych surowicy krwi uzyskanych metodami: 1) kolorymetryczną, 2) bezpośredniej optycznej rejestracji

A survey of relative percentage content of separate fraction proteins in blood serum, obtained by the methods: 1. colorimetric, 2. of immediate optic record

L.p.	Jednostka chorobowa	Metoda	Albu- miny	G l o b u l i n y			
				α_1	α_2	β	γ
1	<i>Myelosis leucemica acuta</i>	kolorym.	35,11	6,52	12,36	15,14	30,85
		optyczna	35,02	6,97	13,00	15,83	29,80
2	<i>Glomerulonephritis chronica</i>	kolorym.	44,69	5,39	10,33	10,89	28,71
		optyczna	44,40	5,83	11,46	11,50	26,76
3	<i>Nephroso-nephritis chronica</i>	kolorym.	24,95	6,40	26,48	24,85	17,01
		optyczna	26,27	5,13	25,36	26,03	17,23
4	<i>Morbus Addisoni - Biermeri i Anaemia agastrica megaloblastica.</i>	kolorym.	55,60	3,70	8,77	12,63	19,60
		optyczna	53,40	3,47	9,17	14,37	19,63
5	<i>Myelosis leucemica acuta, oraz Anaemia secundaria</i>	kolorym.	52,35	4,70	13,56	15,83	13,56
		optyczna	53,80	4,60	12,30	15,30	13,80
6	<i>Lymphadenitis leucemica chronica.</i>	kolorym.	49,53	5,53	13,47	18,40	19,73
		optyczna	48,63	5,13	12,63	16,20	19,17
7	<i>Morbus hypertonicus.</i>	kolorym.	48,00	8,03	14,70	12,05	17,22
		optyczna	47,10	9,40	13,20	11,40	18,90
Poszczególne liczby są średnią z trzech pomiarów.							

ОМÓWIENIE WYNIKÓW

Różnice między wynikami uzyskanymi tymi dwoma metodami zawierają się w granicach: dla albumin od 0,09 do 2,20‰; dla globulin α_1 od 0,1—1,37‰; dla globulin α_2 od 0,23 do 1,50‰; dla globulin β od 0,40 do 2,20‰ i dla globulin γ od 0,03 do 1,95‰. Szybkość, dokładność i dogodność metody bezpośredniej optycznej rejestracji pozwala sądzić, że będzie ona mogła być używana do badań klinicznych.

Badania dotyczyły tylko przydatności metody i nie upoważniają do wyciągania wniosków diagnostycznych. Niektóre krzywe, wykreślane bezpośrednio na papierze światłoczułym dają podstawę do wnioskowania, że poszczególne frakcje białkowe nie są jednolite. Można sądzić, że dokładniejsze wykonanie przystawki wg Klimka do mikropolarografu wg Heyrovsky'ego powinno dać odpowiedź na to zagadnienie.

WNIOSKI

1. Przystawka wg Klimka zastosowana do mikropolarografu wg Heyrovsky'ego nadaje się do bezpośredniej optycznej rejestracji frakcji białkowych na papierze światłoczułym.

2. Metoda ta jest dokładniejsza, szybsza i oszczędniejsza od metody elucyjnej i nadaje się do celów klinicznych.

PIŚMIENNICTWO

1. Klimek J., Krzeczowska I.: Prosty sposób przystosowania mikropolarografu Heyrovsky'ego do optycznej rejestracji elektroferogramów. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska Sec. D, 15, 117—122, 1960.
2. Krzeczowska I., Klimek J.: Badania nad zastosowaniem do celów klinicznych nowego sposobu optycznej rejestracji frakcji białkowych sыворотки. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska Sec. D, 15, 129—134, 1960.

РЕЗЮМЕ

Проведены дальнейшие исследования над применением приставки по Климеку, приспособленной к микрополярографу Гейровского, для непосредственной оптической регистрации белковых фракций сыворотки крови.

Авторами показано на патологических сыворотках крови, что новый метод вполне пригоден для клинических целей, и является более точным, более скорым, более экономным и более удобным, чем метод элюции; различия в результатах, полученных этими двумя методами не превышали $\pm 2,20\%$.

