

ANNALES  
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA  
LUBLIN — POLONIA

VOL. XVI, 25

SECTIO D

1961

---

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

Jerzy ISKIERKO i Irena KRZECZKOWSKA

**Badania nad zastosowaniem zawiesiny fosforanu miedziowego do ilościowego oznaczania d-glikozaminy**

**Исследования по применению взвеси фосфорнокислой меди для количественного определения d-глюкозамина**

**Studies on the Application of Copper Phosphate Suspension for Quantitative Determination of d-Glicosamine**

Ledderhose przeprowadził hydrolizę kwaśną chityny i po raz pierwszy w roku 1876 otrzymał chlorowoderek glikozaminy wg Popowicza (4). Glikozamina, podobnie jak i inne aminocukry, wchodzi w skład różnych substancji o ważnych funkcjach biologicznych jak np. heparyna, kwas hyaluronowy, mukopolisacharydy, hormony gonadotropowe, woski mykobakterii, jak również w skład pewnych antygenów bakteryjnych. Równoległe do badań nad metabolizmem glikozaminy rozwijały się metody ilościowego oznaczania tego związku. Mandel i Neuberg (2) zastosowali do tego celu barwną reakcję, jaką daje glikozamina z orczyną i HCl po uprzednim zadziałaniu na nią podchlorynem sodu. Hurlley i Wootton wykorzystali do oznaczeń ilościowych glikozaminy alloksan dający purpurowe zabarwienie. Glikozaminę oznacza się również w postaci alfa-naftylouretanu d-glikozaminy otrzymanego przez zadanie chlorowodorkiem alfa-naftyloizocjanianu w rozcieńczonym NaOH (1).

W badaniach naszych przeprowadzono obserwacje nad możliwościami zastosowania zawiesiny fosforanu miedziowego wg Pope-Stevensa do ilościowego oznaczania d-glikozaminy.

BADANIA WŁASNE

Badanie zdolności kompleksotwórczej d-glikozaminy z jonami miedziowymi.

Do badań użyto wzorcowego roztworu chlorowodoru glikozaminy zawierającego 2 mg d-glikozaminy w 1 ml roztworu. Pierwszym zagadnieniem było stwierdzenie czy chlorowoderek d-glikozaminy posiada

zdolność do kompleksowania z jonami miedziowymi, pochodzącymi z zawiesiny fosforanu miedziowego wg P o p e - S t e v e n s a (3), w środowisku słabo kwaśnym przy pH 5—6, obojętnym i zasadowym przy pH 8,5—9,5.

Chlorowodorek d-glikozaminy posiada w roztworze wodnym odczyn słabo kwaśny o pH 5,3, bezpośrednio więc bez dodatkowego zakwaszania można było do badanych prób o zawartości 1—10 ml wzorca dodać 30 ml zawiesiny fosforanu miedziowego i dopełnić wodą destylowaną do 50 ml. Dalsze próby, zawierające taką samą ilość wzorca zobojętniano 0,01 n NaOH do pH 7, lub alkalizowano do pH 9—9,5, a następnie kompleksowano w ten sam sposób jak podano wyżej. Jednocześnie wykonano również „ślepa” próbę. Analizy wykonywano w cylinderkach miarowych na 100 ml. Kompleksowanie przeprowadzano w ciągu 10 minut, wytrząsając próby z zawiesiną fosforanu miedziowego przez 2—3 minuty, następnie sączono je.

Przesącze posiadały zabarwienie niebieskie z widocznym uintensywnianiem się barwy wzorca w miarę wzrostu stężenia d-glikozaminy użytej do analizy. Przesącz „ślepej” próby był bezbarwny. Zabarwienie przesącza nasuwało przypuszczenie o kompleksowaniu miedzi przez d-glikozaminę oraz o tworzeniu się rozpuszczalnego kompleksu o barwie niebieskiej. To przypuszczenie potwierdzono, rozbijając kompleks lodowatym kwasem octowym, co uwidaczniało się odbarwieniem przesącza. Wydzieloną miedź oznaczano ilościowo, metodą jodometryczną. Wyniki zestawiono w tabeli 1.

Tab. 1. Oznaczanie jodometryczne skompleksowanej miedzi przez d-glikozaminę w środowisku zasadowym i obojętnym

Iodometric determination of copper bound in a complex by d-glicosamine in alkaline and neutral media

Lp.	Glikozamina użyta do analizy w mg	Ilość ml ściśle 0,01 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ zużyta na zmiareczkowanie wydzielonego przez jony miedziowe wolnego jodu			
		Kompleksowanie w środowisku zasadowym ml 0,01 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	Ilość mg skompleksowanego jonu miedziowego	Kompleksowanie w środowisku obojętnym ml 0,01 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	Ilość mg skompleksowanego jonu miedziowego
1	3,330	0,95	0,6022	1,0	0,6357
2	6,660	1,5	0,9535	2,0	1,2714
3	9,990	2,8	1,7800	2,8	1,7800
4	1,332	3,2	2,0342	3,8	2,5150
5	1,665	4,6	2,9212	3,8	2,5150

Następnie sprawdzono czy utleniona d-glikozamina będzie również kompleksowała z jonami miedziowymi, pochodzącymi z fosforanu miedziowego. W tym celu wzorzec glikozaminy utleniano przy pomocy 30%  $H_2O_2$ . Nadmiar nie rozłożonego nadtlenu wodoru rozkładano przez ogrzewanie na łaźni wodnej. Utlenioną d-glikozaminę kompleksowano analogicznie jak d-glikozaminę nie utlenioną. Niebieskie zabarwienie przesącza wskazywało na tworzenie się kompleksu miedzi z utlenioną d-glikozaminą. Potwierdzono to przez ilościowe jodometryczne oznaczenie miedzi a wyniki zestawiono w tabeli 2.

Tab. 2. Oznaczenie jodometryczne skompleksowanej miedzi przez utlenioną d-glikozaminę w środowisku zasadowym i obojętnym  
Iodometric determination of copper bound in a complex by oxidized d-glicosamine in alkaline and neutral media

Lp.	Glikozamina użyta do analizy w mg	Ilość ml ściśle 0,01 n $Na_2S_2O_3$ zużyta na zmiareczkowanie wydzielonego przez jony miedziowe wolnego jodu			
		Kompleksowanie w środowisku zasadowym ml 0,01 n $Na_2S_2O_3$	Ilość mg skompleksowanego jonu miedziowego	Kompleksowanie w środowisku obojętnym ml 0,01 n $Na_2S_2O_3$	Ilość mg skompleksowanego jonu miedziowego
1	3,33	0,95	0,6022	0,7	0,4450
2	6,66	1,5	0,9535	1,6	0,9545
3	9,99	3,2	2,0342	2,1	1,2814
4	1,332	3,2	2,0342	2,6	1,6528
5	1,665	4,3	2,7435	3,2	2,0342

Zauważono, że natężenie niebieskiej barwy przesącza zawierającego niebieski kompleks uintensywniało się wraz ze wzrostem stężenia glikozaminy. Obserwacja ta posłużyła do ilościowego oznaczenia skompleksowanej glikozaminy wg metody kolorymetrycznej w fotometrze Pulfricha przy użyciu filtra nr 5. Wzrost ekstynkcji w pewnych granicach stężeń glikozaminy był prostoliniowy (tabela 3).

Zę względu na nieduże różnice ekstynkcji kompleksów miedzi z glikozaminą przeprowadzono próbę oznaczania skompleksowanej miedzi przy pomocy dwuetylo-dwutio-karbaminianu sodu. Do analizy użyto utlenionego wzorca d-glikozaminy. Nie uzyskano jednak wyników powtarzalnych i proporcjonalnych do stężenia d-glikozaminy. Przypuszczalnie było to powodem tworzenia się koloidalnej zawiesiny po zadaniu badanej analizy dwuetylo-dwutio-karbaminianu sodu. Z tych powodów zaniechano dalszych prób.

Zaobserwowano, że kompleks miedzi z d-glikozaminą jest nietrwały i po pewnym czasie ulega rozbiciu, co uwidaczniało się odbarwianiem kompleksu, mętnieniem roztworu, który przybierał przy tym barwę zieloną, charakterystyczną dla jonów miedzi jednowartościowej. Po pewnym czasie roztwór z koloru zgnięzielonego przechodził w rdzawo-ceglasty i następnie osiadał na dnie naczynia tlenek miedziawy. Reakcję tę znacznie przyspieszało ogrzanie przesączu zawierającego kompleks na łaźni wodnej oraz środowisko zasadowe. Przez ogrzanie osiąga się również szybszą koagulację i opadanie osadu  $\text{Cu}_2\text{O}$ .

Tab. 3. Ekstynkcje uzyskane w fotometrze Pulfricha przy zastosowaniu filtra dla niebieskich kompleksów jonów miedziowych z d-glikozaminą w środowisku zasadowym  
Extinctions obtained in Pulfrich's photometer with filter for blue complexes of copric ions with d-glicosamine in alkaline medium

Lp.	Glikozamina użyta do kompleksowania w mg	Ekstynkcja przesączu zawierającego niebieski kompleks d-glikozaminy z jonami miedziowymi
1	4	0,05
2	8	0,09
3	12	0,16
4	16	0,19
5	20	0,22

Szybkość rozkładu kompleksu jest zależna od stężenia skompleksowanej d-glikozaminy. Im większe jest stężenie skompleksowanej d-glikozaminy, tym szybciej rozkłada się kompleks.

Poczynione obserwacje wykorzystano do opracowania ilościowej metody oznaczania d-glikozaminy. Reakcja kompleksowania jonów miedziowych z d-glikozaminą w wyżej podanych warunkach zachodzi ilościowo.

#### OPIS METODY

Do miarowych 100 ml cylinderków ze szlifami pobierano 1, 2, 3, 4 i 5 ml 2% wzorca. Pobraną ilość wzorca rozcieńczano wodą destylowaną do 10 ml i alkalinizowano 3—5 kroplami 1 n NaOH, osiągając pH roztworu 8,7—9,0. Następnie dodawano 30 ml zawiesiny fosforanu miedziowego, przygotowanego wg Pope-Stevensa i dopełniano do 50 ml wodą destylowaną. Po wytrząśnięciu analizy i pięć-minutowym odstawieniu sączono do 100 ml erlenmajerek. Jednocześnie w ten sposób przeprowadzono „ślepa” próbę.

Do przesączu przechodził rozpuszczalny kompleks d-glikozaminy, co uwidaczniało się zabarwieniem niebieskim, pogłębiającym się wraz ze wzrostem stężenia wzorca. Przesącz „ślepej” próby był bezbarwny. Cały zebrany do kolbki przesącz

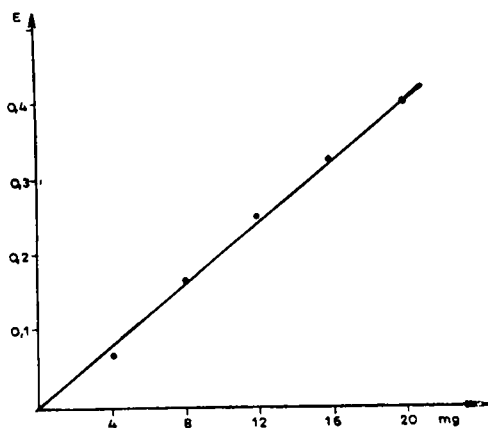
ogrzewano przez 30 minut na wrzącej łaźni wodnej. Podczas ogrzewania w pierwszym stadium przesącze mętniały i przybierały zabarwienie zielonkawe przechodzące w rdzawoceglaste od wytrącającego się tlenku miedziawego. Następnie kolbki pozostawiano na przeciąg 30 minut celem opadnięcia osadu  $\text{Cu}_2\text{O}$ . Optycznie można

Tab. 4. Ekstynkcje uzyskane dla siarczanu amoniakalno-miedziowego uzyskanego przy oznaczaniu d-glikozaminy wg opracowanej metody

Extinctions for ammonia cupric sulphate obtained during determination of d-glicosamine by the authors' method

Lp.	Glikozamina użyta do analizy w mg	Ekstynkcje kompleksów uzyskanych w metodzie Kręczkowskiej—Iskierko oznaczenia d-glikozaminy
1	4	0,065
2	8	0,165
3	12	2,250
4	16	0,325
5	20	0,400

było dostrzec różnice w ilości wytrąconego tlenku miedziawego wraz z postępującym wzrostem d-glikozaminy użytej do analizy. Osad ten odwirowywano i rozpuszczano w 5 ml 50%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Dodawano przy tym kroplę 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  celem utlenienia miedzi z jedno do dwuwartościowej. Polepszało to również rozpuszczalność  $\text{Cu}_2\text{O}$ . Uzyskany bezbarwny roztwór zadawano 25 ml stężonej zasady amonowej.



Ryc. 1.

Pod wpływem dodanej zasady roztwór przybierał ciemnoniebieskie zabarwienie od wytworzonego kompleksu amoniakalnego siarczanu miedzi to jest od siarczanu tetra lub heksa amoniakomiedziowego. Kompleks ten rozcieńczano wodą destylowaną do 50 ml i oznaczano ekstynkcje w fotometrze Pulfricha, stosując żółty filtr S 47. Otrzymane wyniki zestawiono w tabeli 4.

Prostolinijną zależność ekstynkcji od stężenia d-glikozaminy ilustruje również załączona ryc. 1.

## OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI.

W przedstawionej pracy wykazano zdolność do kompleksowania d-glikozaminy w środowisku słabo kwaśnym, obojętnym i zasadowym z jonami miedziowymi pochodzącymi z zawiesiny  $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ . Do kompleksowania d-glikozaminy zarówno utlenionej, jak i nieutlenionej użyto zawiesiny fosforanu miedziowego wg Pope - Stevensa stosowanego do ilościowego oznaczania azotu alfa aminowego aminokwasów. Z oznaczeń jodometrycznych skompleksowanego jonu miedziowego wynika, że na jeden związany gramo-jon miedziowy przypadają dwie gramocząsteczki d-glikozaminy. Teoretycznie obliczono, że 3,33 mg d-glikozaminy powinno wiązać 0,5913 mg gramo-jonu miedziowego a wg oznaczeń jodometrycznych uzyskano wynik 0,6022 mg miedzi. Prawdopodobnie wiązanie miedzi zachodzi semipolarnie poprzez wolny bok elektronowy azotu grupy aminowej glikozaminy i jonowo poprzez tlen grupy karboksylowej przy węglu szóstym d-glikozaminy pochodzącej z utlenienia d-glikozaminy. Wytworzony kompleks nie utlenionej d-glikozaminy jest nietrwały i skompleksowana miedź wchodzi w reakcję z grupą aldehydową d-glikozaminy. Jon miedziowy zredukowany jest do jonu miedziawego, przy czym grupa aldehydowa utlenia się do grupy karboksylowej, czego potwierdzeniem jest odbarwienie się niebieskiego kompleksu i tworzenie zielonkawego osadu, charakterystycznego dla związków miedzi jednowartościowej. W następnym stadium tworzy się ceglasty osad tlenku miedziawego. Szybkość rozpadu kompleksu i redukcja związanego jonu miedziowego jest proporcjonalna do stężenia skompleksowanej d-glikozaminy.

Nietrwałość wytworzonego kompleksu nie pozwala na jodometryczne oznaczenie d-glikozaminy metodą pośrednią na podstawie ilości związanej miedzi, oznaczonej jodometrycznie. Uniemożliwia to zachodząca reakcja oksyredox między związanym jonem a grupą aldehydową d-glikozaminy. Zredukowana miedź do jednowartościowej nie może być już oznaczona jodometrycznie, stąd przy oznaczeniach jodometrycznych były obniżone wyniki. D-glikozamina z jonami miedziowymi kompleksuje ilościowo, świadczy o tym fakt wzrostu ekstynkcji wytworzonego kompleksu wraz ze wzrostem d-glikozaminy użytej do analizy. Potwierdza to również opracowana metoda oparta na redukcji związanego przez d-glikozaminę jonu miedziowego do tlenku miedziawego.

Rozpuszczony w kwasie siarkowym tlenek miedziawy po utlenieniu perhydrolem do jonu miedziowego i przeprowadzeniu w amoniakalny kompleks wykazywał prostoliniwną zależność wzrostu ekstynkcji od stężenia użytej do analizy d-glikozaminy.

## PIŚMIENNICTWO

1. Balstein T. Handbuch der Organischen Chemie. 31: 169—170. Berlin, 1938.
2. Mandel W.: Ilościowe oznaczenie d-glikozaminy. Biochem. Z. 71, 218—219, 1916.
3. Pope C. G., Stevens M. P.: Oznaczenie azotu aminowego metodą miedziową. Biochem. J, 33, 1070—1075, 1939.
4. Popowicz J.: Aminocukry. Postępy Biochem. 6, 287—299, 1960.

## РЕЗЮМЕ

В настоящей работе авторами показана способность d-глюкозоамина к образованию комплексного соединения с ионами меди, имеющимися во взвеси фосфорнокислой меди по Pope-Stevens'у. На один грамм-ион меди приходятся две грамм-молекулы связанного d-глюкозоамина. Образованное комплексное соединение непрочно и подвергается распаду. Связанный в комплексном соединении ион меди вступает во вторичную реакцию с альдегидной группой d-глюкозоамина. Теперь наступает восстановление медного иона до медистого, о чем свидетельствует изменение синей окраски комплексного соединения в зеленую.

Параллельно с увеличением концентрации d-глюкозоамина, взятого для анализа, становится более интенсивной синяя окраска образованного комплексного соединения меди. Этот факт проявляется в пропорциональном увеличении экстинкции наряду с ростом концентрации d-глюкозоамина.

Авторами разработан косвенный метод количественного определения d-глюкозоамина, основанный на колориметрическом определении меди, связанной количественно в комплексном соединении с d-глюкозоамином.

## SUMMARY

The authors demonstrated the ability of d-glicosamine to form complexes with copper ions deriving from copper phosphate suspension according to Pope-Stevens. One gram-ion of copper needs two gram-particles of bound d-glicosamine. The complex thus formed is labile and undergoes decomposition. The cupric ion bound in the complex combines in a secondary reaction with the aldehyde group of d-glicosamine. The cupric ion is then reduced to the cuprous ion, which is evidenced by a change of the colour of the complex, passing from blue to green.

Along with the increase of the concentration of d-glicosamine used for analysis, the blue colour of the copper complex becomes more intense. This fact is evidenced by an increase of the extinction, proportional to the increase of the concentration of d-glicosamine.

The authors developed an indirect method of quantitative determination of d-glicosamine, based on colorimetric determination of copper quantitatively bound in a complex by d-glicosamine.