

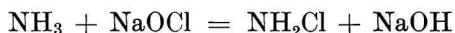
kolu, alanínu a cystínu, ako aj ich zmesí zistil, že pôvodné množstvo chlóru pridané do roztoku v prítomnosti stúpajúcej koncentrácie aminokyselín rýchle ubúda. Úbytok chlóru stanovil, podobne ako N. Engfeld [7], z rozdielu jodometrického stanovenia pôvodne pridaného množstva NaOCl a NaOCl v prítomnosti aminokyselín. Po dosiahnutí určitej koncentrácie aminokyselín (približne $\frac{1}{3}$ koncentrácie chlóru) množstvo chlóru však náhle — po dosiahnutí určitého bodu závislého od pH — začalo stúpať. Autor predpokladal, že stúpanie je zapríčinené tvorbou chlóraminov, ktoré majú chlór viazaný vo forme aktívnej, dávajúcej pozitívny výsledok pri jodometrickom stanovení.

Rozklad glycínu pôsobením NaOCl opisuje M. Norman [10]. Zistil, že na oxydáciu glycín spotrebuje 4,5 mólov. Optimum pH pri oxydácii je 7—9.

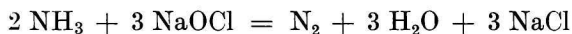
Otázkou dekarboxylácie a odštiepenia dusíka sa experimentálne zaoberali H. Herken a J. Schunk [11]. Zistili manometricky, že väčšina nimi vyskúšaných aminokyselín uvoľňuje 1 mól CO_2 . Glycín, kyselina asparágová, arginín, tyrozín a tryptofán uvoľnili 2 móly CO_2 . K odštiepeniu dusíka nedochádzalo jedine v prípade arginínu a tryptofánu. Svoje pokusy vykonali pri pH 6,3, takže k unikaniu odštiepeného NH_3 nemohlo dôjsť.

M. J. Taras [12] r. 1953 meral množstvo chlóru spotrebované jednotlivými aminokyselinami a niektorými inými dusíkatými látkami po 1 hodine a po 24 hod. pôsobenia chlórovej vody. Sledoval ďalej jednak zníženie množstva celkového dusíka, ku ktorému pri pôsobení chlórovej vody dochádzalo, a jednak aminodusíka. Zistil, že v mnohých prípadoch použitých aminokyselín došlo k skoro úplnému zníženiu aminodusíka, kým celkový dusík ostával viac alebo menej v prípade použitých látok v roztoku.

Ako sme už uviedli (K. Langheld [5, 6]), pri pôsobení alkalického roztoku NaOCl na α -aminokyseliny dochádza k ich dezaminácii. Uvoľnený NH_3 reaguje ďalej s NaOCl pri mólovom pomere NH_3 k NaOCl 1 : 1 za vzniku monochlór-aminu (F. Raschig [13]):



Pri prebytku NaOCl dochádza k uvoľneniu dusíka:



C. F. Cross, E. J. Bevan a J. F. Briggs [14] ešte r. 1908 zistili, že bielkoviny sú schopné viazať určité množstvo chlóru vo forme aktívnej.

Teóriu väzby chlóru v proteínoch podal H. D. Dakin [15]. Vyskúšal aj baktericídne pôsobenie niektorých chlóraminov na rôznych mikróboch. Pozdejšie N. Engfeldt [7] vyskúšal — podobne ako s aminokyselinami — pôsobenie alkalického roztoku NaOCl na niektoré bielkoviny metódou ním už uvedenou. Podobne aj N. Wright [8, 9] aplikoval svoj metodický postup zisťovania chlóraminov glycínu, alanínu a cystínu na bielkoviny a dosiahol

podobné výsledky ako s aminokyselinami. M. J. Taras [12] zistil, že pôsobením chlórovej vody na bielkoviny uvoľňuje sa len menšie množstvo tak celkového dusíka, ako aj aminodusíka.

Otázkou odštiepenia CO_2 a N_2 pôsobením alkalického chlórnanu na dipeptidy, tripeptidy a bielkoviny sa zaoberalo niekoľko autorov (H. Herken, J. Schunk [11], K. Gehrmann, H. Remmer [16], K. Bartmann, K. Gehrmann, H. Remmer [17], J. Schormüller, H. Ballschmieter [18]). Z týchto pokusov vyplýva, že množstvo odštiepeného dusíka a CO_2 závisí od pH, od času pôsobenia na substrát a od pomeru množstva NaOCl k substrátu.

Podobne ako NaOCl reaguje v mnohých prípadoch aj chlóramin-T. N. O. Engfeldt [19] zistil, že α -aminokyseliny poskytujú pôsobením chlóraminu-T príslušné aldehydy. Tak isto dochádza aj k ich dezaminácii a dekarboxylácii, ako aj k dezaminácii dipeptidov (P. P. Cohen [20], P. Cristol, C. Benezech, J. Llory, P. Cristol [21]).

V našej práci sme vyskúšali za podmienok uvedených v experimentálnej časti pôsobenie chlórovej vody a NaOCl na aminokyseliny, vaječný albumín a γ -globulín. Pri pokusoch s aminokyselinami sme vyskúšali aj pri pôsobení NaOCl podiel oxydačný a chloračný. Táto práca je doplnkom k výsledkom mnohých iných autorov, ktorí sa zaoberali podobnou problematikou. Najväčšiu pozornosť sme venovali oxydačnému a chloračnému pôsobeniu NaOCl pri pH 8 až 10, pretože toto rozmedzie je vyznačené v prípade chlorácie saturačného kalu. V ďalšej našej práci sa zameriame na určovanie niektorých medziproduktov vznikajúcich v priebehu oxydácie a chlorácie opísaných aminokyselín a bielkovín.

Experimentálna časť

Chlorácia aminokyselín sa vykonala:

1. chlórovou vodou pri teplote 40°C za a) 3 hodiny, b) 6 hodín,
 2. chlórnanom sodným:
 - a) pri pH 8,0, pri 20°C za 5 hodín pôsobenia. Stanovila sa celková spotreba NaOCl a podiel chloračný;
 - b) pri pH 9,0, pri 20°C za 24 hodín pôsobenia. Stanovila sa celková spotreba NaOCl ;
 - c) pri pH 9,3. Pokusy sme vykonali:
 - a) pri 40°C za 3 a 6 hodín pôsobenia. Stanovili sme celkovú spotrebu NaOCl ;
 - β) pri 60°C za 24 hodín pôsobenia. Stanovili sme celkovú spotrebu NaOCl a podiel chloračný;
 - d) pri pH 10,0 za laboratórnej teploty za 24 hodín pôsobenia. Stanovila sa celková spotreba NaOCl a podiel chloračný;
 - e) pri pH 13,0 (prostredie 0,1 N-NaOH) za 24 hodín pôsobenia. Pokusy sa vykonali:
 - a) pri 20°C ;
 - β) pri 60°C . Stanovili sme celkovú spotrebu NaOCl .
- Výsledky jednotlivých pokusov sú uvedené v tab. 1—7.

Tabuľka 1

Oxydácia aminokyselín chlórovou vodou

T = 40 °C

Aminokyseliny	Množstvo 0,01 mol. roztoku aminokyselín v ml	Množstvo 0,1 N roztoku kyseliny chlórnej v ml	Ekvivalentný pomer kyseliny chlórnej k ami- nokyselinám	Spotreba kyseliny chlórnej v ekviva- lentoč	
				3 hod.	6 hod.
Glycín	2,5	5	20 : 1	1,8	2,0
Alanín	2,5	5	20 : 1	3,6	4,0
Kyselina α -amino- maslová	2,5	5	20 : 1	3,8	4,2
Norleucín	2,5	5	20 : 1	4,0	4,5
Izoleucín	2,5	5	20 : 1	4,0	4,5
Serín	2,5	5	20 : 1	3,9	4,5
Treonín	2,5	5	20 : 1	3,9	4,1
Cysteín	2,5	5	20 : 1	10,6	11,5
Cystín	2,5	5	20 : 1	17,5	18,1
Metionín	2,5	5	20 : 1	8,4	8,8
Kyselina aspará- gová	2,5	5	20 : 1	9,0	9,5
Kyselina gluta- mínová	2,5	5	20 : 1	3,6	3,8
Ornitín	2,5	5	20 : 1	3,5	4,8
Lyzín	2,5	5	20 : 1	4,3	4,7
Arginín	2,5	5	20 : 1	4,3	5,0
Fenylalanín	2,5	5	20 : 1	4,8	5,3
Tyrozín	2,5	5	20 : 1	16,0	16,5
Histidín	2,5	5	20 : 1	13,1	14,7
Tryptofán	2,5	10	40 : 1	14,2	19,9
Prolín	2,5	5	20 : 1	2,4	2,8
Hydroxyprolín	2,5	5	20 : 1	2,2	2,6

Tabuľka 2

Pôsobenie NaOCl na aminokyseliny pri pH 8,0

T = 20 °C

Aminokyseliny	Množstvo 0,01 mol. roztoku amino- kyselín v ml	Množstvo 0,1 N roz- toku NaOCl v ml	Ekvivalent- ný pomer NaOCl k amino- kyselinám	Celková spo- treba NaOCl v ekvivalen- toch po 5 hod.	Spotreba chlóru v ekviva- lentoč	Pomer spotreby chlóru k cel- kovej spo- trebe NaOCl
Glycín	1	2	20 : 1	10,0	0,6	0,06
Alanín	1	2	20 : 1	3,5	0,7	0,20
Kyselina α -aminomaslová	1	2	20 : 1	2,9	0,7	0,24
Norleucín	1	2	20 : 1	3,0	0,8	0,27
Izoleucín	1	2	20 : 1	3,7	1,0	0,27
Serín	1	2	20 : 1	8,2	1,2	0,15
Treonín	1	2	20 : 1	10,8	2,1	0,19
Cysteín	1	2	20 : 1	11,0	2,2	0,20
Cystín	1	4	40 : 1	21,7	4,2	0,19
Metionín	1	2	20 : 1	9,5	2,0	0,21
Kyselina asparágová	1	2	20 : 1	9,7	4,6	0,47
Kyselina glutamínová	1	2	20 : 1	5,3	1,7	0,32
Ornitín	1	2	20 : 1	10,9	1,3	0,12
Lyzín	1	2	20 : 1	7,7	1,6	0,21
Arginín	1	4	40 : 1	11,7	1,5	0,12
Fenylalanín	1	2	20 : 1	5,9	0,6	0,10
Tyrozín	1	4	40 : 1	19,9	4,5	0,23
Histidín	1	4	40 : 1	18,9	3,8	0,18
Tryptofán	1	4	40 : 1	23,5	4,1	0,17
Prolín	1	2	20 : 1	5,2	1,4	0,26
Hydroxyprolín	1	2	20 : 1	11,0	3,8	0,35

Tabuľka 3

P6sobenie NaOCl na aminokyseliny pri pH 9,0

T = 20 °C

Aminokyseliny	Množstvo 0,01 mol. roz- toku amino- kyselín v ml	Množstvo 0,1 N roztoku NaOCl v ml	Ekvivalentný pomer NaOCl k amino- kyselinám	Spotreba NaOCl v ekvivalentoch po 24 hod.
Glycín	1	2	20 : 1	10,1
Alanín	1	2	20 : 1	5,6
Kyselina α -amino- maslová	1	2	20 : 1	5,1
Norleucín	1	2	20 : 1	4,5
Izoleucín	1	2	20 : 1	4,5
Serín	1	2	20 : 1	7,8
Treonín	1	2	20 : 1	13,7
Cysteín	1	2	20 : 1	11,9
Cystín	1	4	40 : 1	23,1
Metionín	1	4	40 : 1	10,7
Kyselina asparágová	1	2	20 : 1	10,9
Kyselina glutamínová	1	2	20 : 1	5,3
Ornitín	1	2	20 : 1	12,2
Lyzín	1	2	20 : 1	9,9
Arginín	1	4	40 : 1	16,7
Fenylalanín	1	2	20 : 1	6,1
Tyrozín	1	4	40 : 1	23,2
Histidín	1	4	40 : 1	20,4
Tryptofán	1	4	40 : 1	26,7
Prolín	1	2	20 : 1	12,5
Hydroxyprolín	1	2	20 : 1	14,6

Tabuľka 4

Pôsobenie NaOCl na aminokyseliny

pH = 9,3, T = 40 °C

Aminokyseliny	Množstvo 0,01 mol. roztoku aminokyselín v ml	Množstvo 0,1 N roztoku NaOCl v ml	Ekvivalentný pomer NaOCl k aminokyse- linám	Spotreba NaOCl v ekvivalentoch	
				3 hod.	6 hod.
Glycín	2,5	5	20 : 1	9,8	11,0
Alanín	2,5	5	20 : 1	6,5	6,7
Kyselina α -amino- maslová	2,5	5	20 : 1	6,9	7,0
Norleucín	2,5	5	20 : 1	6,5	6,7
Izoleucín	2,5	5	20 : 1	6,6	6,7
Serín	2,5	5	20 : 1	7,4	7,6
Treonín	2,5	5	20 : 1	10,5	10,4
Cystein	2,5	5	20 : 1	12,7	13,0
Cystín	2,5	10	40 : 1	28,0	28,6
Metionín	2,5	5	20 : 1	11,9	12,3
Kyselina gluta- mínová	2,5	5	20 : 1	5,0	5,1
Kyselina asparágová	2,5	5	20 : 1	9,8	10,1
Ornitín	2,5	7,5	30 : 1	14,3	14,3
Lyzín	2,5	7,5	30 : 1	11,4	12,0
Arginín	2,5	7,5	30 : 1	16,7	17,4
Fenylalanín	2,5	5	20 : 1	7,6	8,1
Tyrozín	2,5	7,5	30 : 1	19,6	19,0
Histidín	2,5	7,5	30 : 1	19,8	20,1
Tryptofán	2,5	10	40 : 1	26,4	27,9
Prolín	2,5	5	20 : 1	12,2	12,6
Hydroxyprolín	2,5	5	20 : 1	13,7	13,9

Tabuľka 5

P6sobenie NaOCl na aminokyseliny

pH = 9,3, T = 60 °C

Aminokyseliny	Množstvo 0,01 mol. roztoku amino- kyselín v ml	Množstvo 0,1 N roz- toku NaOCl v ml	Ekvivalent- ný pomer NaOCl k amino- kyselinám	Celková spo- treba NaOCl v ekvivalen- toch po 24 h.	Spotreba chl6ru v ekviva- lentoach	Pomer spotreby chl6ru k cel- kovej spo- trebe NaOCl
Glyc6in	1	4	40 : 1	11,1	0,2	0,02
Alan6in	1	4	40 : 1	6,5	1,5	0,23
Kyselina z-aminomaslov6a	1	4	40 : 1	6,8	2,0	0,29
Norleuc6in	1	4	40 : 1	6,5	0,9	0,14
Izoleuc6in	1	4	40 : 1	6,5	0,0	0,00
Ser6in	1	4	40 : 1	8,6	1,6	0,19
Treon6in	1	4	40 : 1	16,3	3,8	0,24
Cyste6in	1	4	40 : 1	15,3	1,9	0,13
Cyst6in	1	4	40 : 1	30,7	3,4	0,11
Metion6in	1	4	40 : 1	15,3	1,5	0,10
Kyselina aspar6gov6a	1	4	40 : 1	18,1	1,0	0,06
Kyselina glutam6inov6a	1	4	40 : 1	5,5	0,8	0,14
Ornit6in	1	4	40 : 1	18,9	0,5	0,03
Lyz6in	1	4	40 : 1	16,0	0,3	0,02
Argin6in	1	4	40 : 1	24,9	1,0	0,04
Fenylalan6in	1	4	40 : 1	15,8	0,5	0,03
Tyroz6in	1	4	40 : 1	32,7	2,4	0,07
Histid6in	1	4	40 : 1	24,3	1,6	0,07
Tryptof6an	1	4	40 : 1	33,8	4,3	0,13
Prol6in	1	4	40 : 1	17,2	1,1	0,06
Hydroxyprol6in	1	4	40 : 1	19,7	4,4	0,23

Tabuľka 6

Pôsobenie NaOCl na aminokyseliny

pH = 10,0, T = 20 °C

Aminokyseliny	Množstvo 0,01 mol. roztoku amino- kyselín v ml	Množstvo 0,1 N roz- toku NaOCl v ml	Ekvivalent- ný pomer NaOCl k amino- kyselinám	Celková spo- treba NaOCl v ekvivalen- toch po 24 h.	Spotreba chlóru v ekviva- lentoč	Pomer spotreby chlóru k cel- kovej spo- trebe NaOCl
Glycín	1	2	20 : 1	10,1	0,6	0,06
Alanín	1	2	20 : 1	7,0	2,3	0,33
Kyselina α -aminomaslová	1	2	20 : 1	5,6	1,4	0,25
Norleucín	1	2	20 : 1	4,5	0,4	0,09
Izoleucín	1	2	20 : 1	4,5	0,4	0,09
Serín	1	2	20 : 1	7,8	1,1	0,14
Treonín	1	2	20 : 1	14,7	5,0	0,34
Cysteín	1	2	20 : 1	12,9	2,7	0,21
Cystín	1	4	40 : 1	24,1	5,5	0,23
Metionín	1	4	40 : 1	11,2	2,4	0,21
Kyselina asparágová	1	2	20 : 1	10,9	4,3	0,39
Kyselina glutamínová	1	2	20 : 1	5,3	0,6	0,11
Ornitín	1	2	20 : 1	12,4	2,4	0,19
Lyzín	1	2	20 : 1	10,2	3,2	0,31
Arginín	1	4	40 : 1	19,9	3,8	0,19
Fenylalanín	1	2	20 : 1	6,2	0,8	0,13
Tyrozín	1	4	40 : 1	24,1	3,9	0,16
Histidín	1	4	40 : 1	22,2	5,0	0,23
Tryptofán	1	4	40 : 1	27,5	4,9	0,18
Prolín	1	2	20 : 1	12,4	2,0	0,16
Hydroxyprolín	1	2	20 : 1	14,1	4,1	0,29

Tabuľka 7

Pôsobenie NaOCl na aminokyseliny

pH = 13, T = 20 °C a 60 °C

Aminokyseliny	Množstvo 0,01 mol. roztoku aminokyselín v ml	Množstvo 0,1 N roztoku NaOCl v ml	Ekvivalentný pomer NaOCl k aminokyse- linám	Spotreba NaOCl v ekvivalentoch	
				20 °C	60 °C
Glycín	1	4	40 : 1	3,3	4,0
Alanín	1	4	40 : 1	2,2	3,5
Kyselina α -amino- maslová	1	4	40 : 1	5,7	7,7
Norleucín	1	4	40 : 1	5,7	7,2
Izoleucín	1	4	40 : 1	5,9	8,7
Serín	1	4	40 : 1	2,3	3,3
Treonín	1	4	40 : 1	2,2	4,9
Cysteín	1	4	40 : 1	10,0	10,2
Cystín	1	4	40 : 1	18,3	23,9
Metionín	1	4	40 : 1	10,0	10,0
Kyselina aspará- gová	1	4	40 : 1	6,3	7,3
Kyselina gluta- mínová	1	4	40 : 1	5,8	8,8
Ornitín	1	4	40 : 1	6,8	13,2
Lyzín	1	4	40 : 1	6,6	12,1
Arginín	1	4	40 : 1	11,3	19,6
Fenylalanín	1	4	40 : 1	5,6	10,2
Tyrozín	1	4	40 : 1	6,9	19,4
Histidín	1	4	40 : 1	9,7	14,4
Tryptofán	1	4	40 : 1	19,0	27,7
Prolín	1	4	40 : 1	7,0	10,7
Hydroxyprolín	1	4	40 : 1	10,1	14,1

1. Stanovenie celkovej spotreby chlórovej vody a chlórnanu sodného potrebného na rozklad aminokyselín

Princíp

Celková spotreba chlórovej vody a NaOCl na rozklad aminokyselín sa stanovila z rozdielu pôvodne pridaného množstva a množstva stanoveného po pôsobení na aminokyseliny. Stanovenie sa vykonalo jodometrickou titráciou, pridaním známeho množstva KJ, po okyslení vzoriek H_2SO_4 , titráciou vylúčeného jódu 0,1 N roztokom $Na_2S_2O_3$.

Pracovný postup

K 30 ml Robinsonovho tlmivého roztoku o uvedenom rozsahu pH sa pridalo 1 ml 0,01 mol. roztoku aminokyseliny a 2 ml, resp. 4 ml (označené v jednotlivých prípadoch v tabuľkách 1—7) 0,1 N roztoku chlórovej vody, resp. roztoku NaOCl. Vzorky sa ďalej nechali inkubovať pri teplotách a za doby uvedené v tých istých tabuľkách. Ku každému spôsobu spracovania vzoriek sa pripravili kontrolné pokusy bez obsahu aminokyselín. Titrácia nespotrebovanej chlórovej vody, resp. NaOCl sa vykonala jodometricky po pridaní 5 ml 0,1 N roztoku KJ a po okyslení 1 ml konc. H_2SO_4 titráciou 0,1 N- $Na_2S_2O_3$. Rozdiel medzi spotrebou chlórovej vody, resp. NaOCl pri kontrolných pokusoch bez obsahu aminokyselín a medzi nezreagovaným množstvom chlórovej vody, resp. NaOCl sa bral ako celková spotreba na rozklad jednotlivých aminokyselín.

Poznámky

Titračia nezreagovaného NaOCl 0,1 N- $Na_2S_2O_3$ sa vykonala pomaly, pretože jód uvoľnený z KJ sa v malom prebytku KJ ťažšie rozpúšťa.

Inkubácia aminokyselín pri pôsobení chlórovej vody sa vykonala vo vzduchotesne uzavretých bankách, aby nedošlo k unikaniu chlóru. Nenašli sme rozdiel pri jodometrickom stanovení nezreagovaného NaOCl v bankách uzavretých a odkrytých.

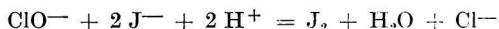
2. Stanovenie podielu chlorácie aminokyselín

Princíp

Celkový priebeh chlorácie organických zlúčenín, teda aj aminokyselín môžeme znázorňovať takto:

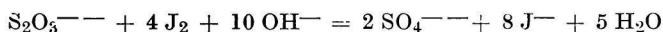


V tomto prípade dochádza teda k väzbe organickej látky s chlórrom. Chlór viazaný na organickú zlúčeninu s $AgNO_3$ nereaguje. Oproti tomu chlór v NaOCl pri jodometrickom stanovení po pridaní KJ prejde podľa rovnice



na chlorid reagujúci s $AgNO_3$. Z rozdielu chloridov kontrolného pokusu bez aminokyselín a chloridov prítomných po chlorácii aminokyselín zistíme chlór viazaný v organických látkach. Z pomeru úbytku chloridov k celkovému úbytku NaOCl potrebného na rozklad aminokyselín je daný podiel chlorácie jednotlivých aminokyselín.

Pri jodometrickom stanovení, pri titrácii uvoľneného jódu z KJ s $Na_2S_2O_3$ však jód prejde podľa rovnice



na jodid reagujúci aj s $AgNO_3$. Pri potenciometrickej titrácii teda chloridy sa stanovujú vedľa jodidov.

Pracovný postup

Najprv sa vykonalo jodometrické stanovenie nezreagovaného NaOCl spôsobom opísaným pri stanovení celkovej spotreby chlórovej vody a NaOCl potrebných na rozklad aminokyselín. Pritom titrácia vylúčeného jódu z KJ sa vykonala 0,1 N roztokom $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ presne do ekvivalentného bodu. Stanovenie chloridov vedľa jodidov sa vykonalo s tými istými vzorkami argentometricky potenciometrickou titráciou za použitia kalomelovej a striebornej elektródy.

Poznámky

Pri chlorácii organických látok vznikajú aj chlúrované produkty, pri ktorých viazaný chlór možno jodometricky stanoviť, napr. chloridy mastných kyselín. Tieto však pri chlorácii aminokyselín za uvedených podmienok nevznikajú, pretože na ich vznik je potrebná chlorácia v bezvodom prostredí.

Pretitrovanie vzoriek roztokom $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ nie je prípustné, pretože dvojmocná síra reaguje s AgNO_3 , čo má za následok väčšiu spotrebu AgNO_3 .

3. Chlúrovanie vaječného albumínu a γ -globulínu s NaOCl

Chlúrovanie sa vykonalo v závislosti:

1. od rôzneho pomeru pridaného alkalického chlórnanu k proteínu (tab. 8);
2. od času pôsobenia NaOCl (tab. 9);
3. od teploty (tab. 10);
4. od pH (tab. 11).

Tabuľka 8

Pôsobenie NaOCl na bielkoviny
pH = 9,3, T = 40 °C

Druh	Množstvo mg	Doba pôsobenia min.	Spotreba NaOCl v mg pri pomere k proteínu			
			2 : 1	5 : 1	10 : 1	20 : 1
Vaječný albumín	2	40	1,60	2,07	2,46	3,24
γ -Globulín	2	40	1,56	2,46	2,79	3,61

Tabuľka 9

Pôsobenie NaOCl na bielkoviny
pH = 9,3, T = 40 °C

Množstvo γ -globulínu mg	Množstvo NaOCl mg	Spotreba NaOCl mg	Reakčná doba v hodinách
2	40	3,5	3
2	40	5,03	6
2	40	5,21	9
2	40	5,62	13
2	40	6,22	27

Tabuľka 10

Pôsobenie NaOCl na bielkoviny
pH = 9,3, T = 95 °C

Množstvo γ -globulínu mg	Množstvo NaOCl mg	Reakčná doba v hodinách	Spotreba NaOCl mg
2	40	2	6,81
2	40	4	8,49
2	40	6	8,56

Tabuľka 11
Pôsobenie NaOCl na bielkoviny
pH = 9,3 a 13,0

Druh	Množstvo v mg	Množstvo NaOCl v mg	pH	Doba pôso- benia v hod.	Spotreba NaOCl v mg	
					20 °C	60 °C
Vaječný albumín	2	40	9,3	24	4,98	5,74
Vaječný albumín	2	40	13,0	24	4,24	4,32
γ -Globulín	2	40	9,3	24	5,28	7,52
γ -Globulín	2	40	13,0	24	4,16	3,80

Princíp

Princíp vykonania pokusu je podobný ako v prípade aminokyselín.

Pracovný postup

K 30 ml Robinsonovho tlmivého roztoku o pH 9,4 sa pridalo 2 ml 0,1 %-ného roztoku vaječného albumínu a γ -globulínu a stúpajúce množstvo 0,1 %-ného roztoku NaOCl (uvedené v tab. 8). Ku každému spôsobu spracovania vzoriek sa pripravili kontrolné pokusy bez obsahu aminokyselín. Vzorky sa inkubovali za dobu a pri teplote uvedenej v tab. 8—11. Nezreagované množstvo NaOCl sa stanovilo jodometricky, titráciou jódu vylúčeného z KJ 0,1 N roztokom $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Rozdiel medzi množstvom NaOCl pri kontrolných pokusoch a medzi nezreagovaným množstvom NaOCl sa bral ako celková spotreba na rozklad bielkovín.

Poznámky

Vykonalí sme aj pokus na stanovenie podielu chlorácie spomenutých bielkovín. Aplikácia metodiky uvedenej pri stanovení podielu chlorácie aminokyselín však nedala spoľahlivé výsledky pre neporovnateľné paralelné skúšky a v niektorých prípadoch pre vyššiu spotrebu AgNO_3 v prípade pridania bielkovín v porovnaní s kontrolným pokusom bez pridania bielkovín. Kvalitatívne však možno posúdiť, že chlorácia substrátu je oveľa menšia než jeho oxydácia.

Jednotlivé použité aminokyseliny, ako aj sušený vaječný albumín dodala Lachema. γ -Globulín poskytol Onkologický ústav v Bratislave.

0,1 N roztok NaOCl sa pripravil zavedením chlóru z bomby do 0,2 N roztoku NaOH za chladenia ľadovým kúpeľom. Požadovaný faktor sa kontroloval jodometrickým stanovením, t. j. titráciou jódu vylúčeného z KJ 0,1 N roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

Aminokyseliny nerozpustné vo vode sa rozpustili v 0,01 N roztoku NaOH; podobne sa rozpustil aj vaječný albumín a γ -globulín. Pracovalo sa vždy s čerstvo pripravenými roztokmi.

Diskusia

Zo zistených experimentálnych výsledkov uvedených v tabuľkách vyplýva, že oxydácia, resp. chlorácia aminokyselín a bielkovín závisí od pH, teploty a času pôsobenia NaOCl, resp. chlórovej vody; v prípade chlorácie bielkovín závisí aj od pomeru množstva NaOCl k proteínu.

Usudzujeme, že pH má vplyv jednak na začiatočnú fázu oxydácie amino-

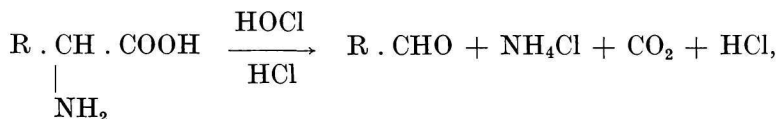
kyselín, t. j. na vznik aldehydu za odštiepenia CO_2 a NH_3 , jednak na ďalšiu rýchlosť oxydácie, resp. chlorácie. Pri pH v kyslej oblasti, ako to napr. vyplýva z porovnania výsledkov uvedených v tab. 1 s výsledkami uvedenými v tab. 2—7, rozklad aminokyselín sa v jednotlivých prípadoch viac alebo menej znižuje.

V kyslom prostredí dochádza však aj k substitúcii vodíkov v aminoskupine chlóróm, ako to dokazujú pokusy M. J. Tarasa [22], ďalej P. M. Litvinenka a V. S. Rozovského [23] s niektorými dusíkatými látkami s obsahom aminoskupiny. Spomínaní autori nenašli voľný aktívny chlór po pridaní týchto látok do roztoku chlórovej vody. Chlór však bol viazaný naďalej vo forme aktívnej, teda ako chlórámín, dávajúci pozitívny výsledok pri jodometrickom stanovení. Podobne N. Ch. Wright [9] ešte r. 1936 zistil pri pôsobení chlóru na glycín a cystín, že v kyslom prostredí vznikajú chlórámíny, kým v zásaditom prostredí dochádza k oxydácii, teda k dekarboxylácii a k dezaminácii.

Z týchto výsledkov citovaných autorov vyplýva, že stabilita chlórámínov pri nízkom pH je oveľa vyššia ako pri vysokom pH. Potvrdzujú to aj pokusy, pri ktorých sa stanovil voľný aktívny chlór súbežne s celkovým aktívnym chlóróm pri pôsobení chlórovej vody na aminokyseliny, pri rôznom pomere chlórovej vody k aminokyselinám a za rôznu dobu pôsobenia chlórovej vody na aminokyseliny (Stankovič [24]). Vo všetkých prípadoch použitých aminokyselín množstvo celkového aktívneho chlóru bolo vyššie ako množstvo voľného aktívneho chlóru, čo potvrdzuje väčšiu stabilitu chlórámínov v kyslom prostredí.

Predsa však k oxydácii aminokyselín na aldehyd za dekarboxylácie a dezaminácie dochádza aj v kyslom prostredí, čo vyplýva z mólovej spotreby chlórovej vody pri aminokyselinách uvedených v tab. 1, najmä pri jednoduchých alifatických aminokyselinách. Pri týchto aminokyselinách je totiž ťažko predstaviť si iný priebeh oxydácie ako vznik aldehydu. Pravda, pri ďalších aminokyselinách priebeh ostatných reakcií v kyslom prostredí môže byť nezávislý od dekarboxylácie a dezaminácie.

Nižšia spotreba chlórovej vody na oxydáciu aminokyselín vyplýva ďalej aj zo vzniku chloridu amónneho z odštiepeného NH_3 :



ktorý ako to zistil C. W. Crane, J. Forrest, O. Stephenson a W. A. Waters [25], je voči chlorácii v kyslom prostredí odolnejší. NH_3 teda v tomto prípade sa pomalšie oxyduje ďalej na dusík, z čoho vyplýva znížená spotreba oxydačného činidla.

V silne alkalickom prostredí pri pH 13 (tab. 7) celková spotreba NaOCl na rozklad aminokyselín je znovu nižšia. Vyplýva to zo skutočnosti, že v silnejšom alkalickom prostredí dochádza k unikaniu odštiepeného NH_3 z roztoku, ktorý sa nestačí prítomným NaOCl oxydovať na dusík. Okrem toho musíme však počítať aj s iným priebehom niektorých reakcií, resp. so spomalením niektorých reakcií prebiehajúcich za optimálneho pH. Vyriešenie otázky očakávame od ďalšieho výskumu v tomto smere.

Vplyv teploty na celkový rozklad aminokyselín je jednoznačný: spotreba NaOCl sa zvyšuje, t. j. rozklad aminokyselín je hlbší. Chloráciu však vo väčšine prípadov zvyšujúca teplota nepodporuje, ako to vyplýva z porovnania chloračného podielu jednotlivých aminokyselín uvedených v tab. 2, 5 a 6. Usudzujeme, že to súvisí s ďalšou oxydáciou chlорованých medziproduktov za súčasného uvoľnenia chlóru z organickej väzby.

V práci pokračujeme za účelom overenia niektorých predpokladov medziproduktov a konečných produktov vytvorených za podmienok rozkladu opísaných aminokyselín a bielkovín.

Súhrn

Vyskúšali sme pôsobenie chlórovej vody na aminokyseliny a pôsobenie chlórnanu sodného na aminokyseliny a bielkoviny. Sledoval sa vplyv pH, teploty a času ich pôsobenia na aminokyseliny. Pri pokusoch s bielkovinami bol vyskúšaný aj vplyv pomeru množstva NaOCl k proteínu na ich rozklad. Ďalej bol vyskúšaný za rôznych podmienok oxydačný a chloračný podiel pôsobenia NaOCl na aminokyseliny. V pokusoch pokračujeme.

ДЕЙСТВИЕ ХЛОРИРУЮЩЕГО ПРОЦЕССА НА АМИНОКИСЛОТЫ И ПРОТЕИНЫ (I) ОКИСЛЕНИЕ И ХЛОРИРОВАНИЕ АМИНОКИСЛОТ И ПРОТЕИНОВ

Л. СТАНКОВИЧ, И. ВАШАТКО

Отдел глицидов и биохимии Химического института
Словацкой академии наук в Братиславе

Выводы

В работе было исследовано действие хлорной воды на аминокислоты и действие хлорноватистокислого натрия на аминокислоты и белки. Наблюдалось влияние pH, температуры и времени их действия на аминокислоты. При опытах с белками было исследовано также влияние отношения количества NaOCl к протеину на их разложение. Далее была исследована ступень действия NaOCl на аминокислоты при разных условиях. Авторы продолжают в своих исследованиях далее.

Поступило в редакцию 22. 10. 1959 г.

WIRKUNG DES CHLORIERUNGSPROZESSES AUF AMINOSÄUREN
UND PROTEINE (I)
OXYDATION UND CHLORIERUNG VON AMINOSÄUREN
UND PROTEINEN

E. STANKOVIČ, J. VAŠÁTKO

Abteilung Glycide und Biochemie des Chemischen Instituts an der Slowakischen Akademie
der Wissenschaften in Bratislava

Zusammenfassung

Die Autoren untersuchten die Einwirkung von Chlorwasser auf Aminosäuren und die Einwirkung von Natriumhypochlorit auf Aminosäuren und Eiweissstoffe. Es wurde der Einfluss des pH, der Temperatur und der Dauer der Einwirkung dieser Chlorierungsmittel auf Aminosäuren untersucht. Bei den Versuchen mit Eiweissstoffen wurde auch der Einfluss des Verhältnisses der NaOCl-Menge zum Protein auf deren Zersetzung untersucht. Weiter wurde der oxydative und chlorierende Anteil der Einwirkung von NaOCl auf Aminosäuren unter verschiedenartigen Bedingungen untersucht. Diese Versuche werden fortgesetzt.

In die Redaktion eingelangt den 22. 10. 1959

LITERATÚRA

1. Vašátko J., Križan V. Chem. zvesti 7, 299 (1953). — 2. Vašátko J., Z. Zuckerind. 7, 544 (1957). — 3. Vašátko J., Z. Zuckerind. 8, 23 (1958). — 4. Vašátko J., Stankovič L., Chem. zvesti 13, 817 (1959). — 5. Langheld K., Chem. Ber. 42, 332 (1909). — 6. Langheld K., Chem. Ber. 42, 2360 (1909). — 7. Engfeldt N. O., Z. physiol. Chem. 121, 18 (1922). — 8. Wright N. Ch., Biochem. J. 20, 524 (1926). — 9. Wright N. Ch., Biochem. J. 30, 1661 (1936). — 10. Norman M. F., Biochem. J. 30, 184 (1936).
11. Herken H., Schunk J., Arch. expl. Path. Pharmakol. 206, 102 (1949). — 12. Taras M. J., J. Am. Water Works Assoc. 45, 47 (1953). — 13. Raschig F., Chem. Ber. 40, 4580 (1907). — 14. Cross C. F., Bevan E. J., Briggs J. F., Chem. Ztg. 32, 369 (1908). — 15. Dakin H. D., Brit. Med. J. 2, 809 (1915). — 16. Gehrman K., Remmer H., Arch. expl. Path. Pharmakol. 215, 342 (1952). — 17. Bartmann K., Gehrman K., Remmer H., Arch. expl. Path. Pharmakol. 215, 433 (1952). — 18. Schormüller J., Ballschmieter H., Deutsch. Lebensm. Rundschau 48, 136 (1952). — 19. Engfeldt N. O., Z. physiol. Chem. 126, 1 (1923). — 20. Cohen P. P., J. Biol. Chem. 136, 572 (1940).
21. Cristol P., Benezech C., Llory J., Cristol P., Bull. soc. chim. biol. 33, 78 (1951). — 22. Taras M. J., J. Am. Water Works Assoc. 38, 1146 (1946). — 23. Litvinenko P. M., Rozovskij V. S., Gigena i sanit. 1, 52 (1954). — 24. Stankovič L., Chem. zvesti 14, 275 (1960). — 25. Crane C. W., Forrest J., Stephenson O., Waters Wm. A., J. Chem. Soc. 827 (1946).

Do redakcie došlo 22. 10. 1959

Adresa autorov:

Prom. chemik Ludovít Stankovič, Bratislava, Mlynské nivy 37, Chemický ústav SAV.
Akademik Jozef Vašátko, Bratislava, Kollárovo nám. 2, Chemický pavilón SVŠT.