

STANOVENIE AMONIAKU V AMÓNNYCH SOLIACH ZA PRÍTOMNOSTI MOČOVINY POMOCOU $\text{Cd}(\text{OH})_2$

UPRAVENÁ METÓDA NA STANOVENIE AKTIVITY ENZÝMOV

D. PRÍSTAVKA, V. KRČMÉRY

Katedra analytickej chémie Slovenskej vysokej školy technickej v Bratislave

Podrobná znalosť enzymatických procesov u mikroorganizmov má veľký význam pre posúdenie virulencie a najmä patogenity niektorých baktérií. Preto štúdium aktivity rozličných enzýmov u mikroorganizmov sa v posledných rokoch stalo predmetom širokého záujmu mikrobiológov a biochemikov. Z dôvodov riešenia a zvládnutia tejto problematiky sa v odbore enzymatickej biochémie hľadajú nové presnejšie analytické metódy, ktoré by vyhoveli súčasnej snahe po adekvátnom vystihnutí a pochopení životných dejov jednotlivých typov mikróbov.

Predmetom skúmania sa stala najmä ureáza, ktorú sa podarilo ako prvý enzým pripraviť v kryštalickom stave v mimobunkovej forme (Sumner 1929).

Preparáty ureázy sa pripravujú zo živočíšnych orgánov a z rastlinných semien, najmä zo sójových bôbov a už dlhší čas sa používajú v biochémii napr. pri klinických vyšetrovaníach a stanoveníach urey v moči a v krvi.

Pri laboratórnom vyšetrovaní baktérií sa predovšetkým stanovuje ureázová aktivita, aby sa zistilo, či je v nich tento enzým prítomný, a aby sa objasnil charakter ich dusíkového metabolizmu. V niektorých prípadoch sa aktivita ureázy stanovuje aj z dôvodov diferenciacie jednotlivých skupín mikróbov v rámci toho istého druhu. Poslednú problematiku študovali a aktivitu ureázy u brucel stanovovali F. Nižňanský a V. Krčméry [5], pracovníci Štátneho vedeckého veterinárneho ústavu v Bratislave.

Pri štúdiu a stanovení ureázovej aktivity u brucel sa narazilo na značné ťažkosti, lebo pri preskúšaní publikovaných metód sa prišlo na to, že tieto metódy boli vypracované zväčša za účelom stanovenia titra rozličných preparátov ureázy používaných prevažne pri spomenutých klinických vyšetrovaníach. Stanovenie ureázovej aktivity u mikroorganizmov týmito metódami nie je spoľahlivé, lebo v tomto prípade ide o veľmi malé množstvá enzýmu, pri akých sa reakcia podľa zákona účinku má veľmi spomaľuje.

Stanovenie ureázovej aktivity dosiaľ známymi metódami je založené na schopnosti ureázy rozkladať močovinu, ktorá sa v bunke hromadí ako produkt bielkovinového metabolizmu, pričom primárne vzniká karbamát amónny, ktorý sa ďalej štiepi na amoniak a uhličitan amónny. Celkový amoniak sa potom po pridaní silného lúhu vydestiluje a stanoví titračne alebo kolorimetricky. Exaktné stanovenie amoniaku vytvoreného ureázou sa však komplikuje tým, že močovina, ktorá je v reakčnom prostredí vo veľkom nadbytku,

v silne alkalickom prostredí sa za tepla rozkladá za vzniku biuretu a amoniaku. Vzhľadom na to, že nie všetok stanovený amoniak je výsledkom činnosti mikroorganizmov, tieto metódy neposkytujú spoľahlivé výsledky. Slepý pokus nemožno v tomto prípade použiť na korigovanie výsledkov, lebo sú tu celkom iné podmienky, než aké sú v reakčnom prostredí.

Z vyskúšaných metód najlepšie sa nám osvedčila titračná metóda, ktorú vypracovali van Slyke a Archibald [2] a ktorú pre brucely modifikovali Warnerová a Sandersová [1]. Táto metóda poskytuje porovnateľné výsledky, ak sa presne dodržia pracovné podmienky. Avšak aj malá odchýlka od pracovného postupu nápadne skresľuje výsledky, lebo rozklad močoviny silným lúhom veľmi závisí od koncentrácie použitého lúhu a od doby jeho pôsobenia na močovinu.

Z ďalších metód sme vyskúšali metódu K. Slavíka a J. Smetanu [3], ktorá poskytuje správne výsledky za neprítomnosti močoviny. V opačnom prípade amoniak vzniká aj účinkom nasýteného uhličitanu na močovinu, ktorý sa používa na vytlačenie amoniaku. Metóda je spojená aj s ťažkosťou technického rázu, ktorá záleží v odpadávaní sklenej vaty z tyčinky, na ktorú sa zachytáva unikajúci amoniak.

Rinehartovu metódu [4], pri ktorej sa amoniak vytláča alkalickým lúhom, možno bezpečne použiť len za neprítomnosti močoviny.

Vyskúšali sme aj jednoduchú alkali-acidimetrickú metódu, ktorá však nezachytáva všetok amoniak.

Po vyšetrení všetkých okolností, ktoré nepriaznivo ovplyvňujú stanovenie amoniaku, pokúsili sme sa vypracovať novú metódu, ktorá by sa aj pre tieto prípady dala bezpečne použiť a pritom by bola čo najmenej zaťažovaná experimentálnymi chybami. Išlo nám najmä o to, aby sme zabránili rozkladu močoviny a búrlivému varu reakčnej zmesi počas destilovania amoniaku. Obidva problémy sa nám podarilo vyriešiť tým, že sme na vytlačenie amoniaku z amónnych solí použili hydroxyd kademnatý.

Biologickú časť pokusov pri skúšaní novej metódy sme nenehali a objekty sme si pripravovali podľa osvedčeného návodu, ktorý ďalej v krátkosti opisujeme aj s návodom na stanovenie amoniaku.

Pracovný postup

Naočkovaný kmeň brucel po preskúšaní na S-formu tryptaflavínovým testom sa 48 hodín inkubuje na šikmom agare. Potom sa porast spláchnie 5 ml tryptozového roztoku (0,05 % tryptozopepton Difco, 0,5 % NaCl) a hustota suspenzie sa štandardizuje na Langeho fotometri na 50 % svetelnú transmisiu. Z bunkovej suspenzie sa 1 ml odpipetuje do 100 ml Erlenmeyerovej banky, v ktorej je 5 ml 3,6 % močoviny vo fosfátovom tlmivom roztoku o pH 6,8 a 0,5 ml 10 % vaječného albumínu. Albumín sa pridáva na ochranu enzýmu voči čiastočnej inaktivácii v prítomnosti značnej koncentrácie urey a stôp iónov ťažkých kovov. Takto pripravená reakčná zmes sa 30 minút inkubuje vo vodnom kúpeli pri teplote 20 °C. Potom sa obsah banky kvantitatívne preleje do destilačnej banky, v kto-

Výsledky merania ureázovej aktivity metódou Sanders-Warnerovou

kmeň č.	spotreba ml 0,02 N-H ₂ SO ₄	slepý pokus	čistá spotreba
1	3,55	1,50	2,05
2	2,45	1,50	0,95
3	2,10	1,50	0,60
4	2,50	1,40	0,90
5	1,75	1,40	0,35
6	6,70	1,40	5,30
7	6,80	1,10	5,70
8	3,30	1,10	2,20
9	3,70	2,90	0,80
10	6,0	2,90	3,10
11	5,30	2,90	2,40

Výsledky merania ureázovej aktivity našou metódou

kmeň č.	spotreba ml· 0,02 N-H ₂ SO ₄	slepý pokus	čistá spotreba
1	2,45	0,35	2,10
2	0,90	0,20	0,70
3	0,80	0,35	0,45
4	1,25	0,20	1,05
5	0,50	0,20	0,30
6	5,90	0,20	5,70
7	6,05	0,35	5,70
8	2,40	0,35	2,05
9	1,05	0,20	0,85
10	3,25	0,20	3,05
11	2,45	0,20	2,25

Výsledky pri stanovení amoniaku našou novou metódou v štandardných roztokoch

NH ₃ štandard	zistené	
0,5 mg	{	0,486 mg
		0,494 mg
		0,504 mg
		0,509 mg
0,75 mg	0,748 mg	
1,0 mg	1,102 mg	
1,0 mg	{	1,061 mg
		0,944 mg

rej sa predtým uvedie do váru 10 ml ca 5 % hydroxydu kademnatého a 20 ml destilovanej vody. Destilačná banka sa okamžite zapojí cez chladič na predlohu, v ktorej je 10 ml 0,02 N-H₂SO₄. Destiluje sa presne 5 minút a nespotrebovaná kyselina sa titruje 0,02 N-KOH na metylčerveň.

Súčasne s každou skúškou sme robili aj slepý pokus, pričom spotreba 0,02 N kyseliny sírovej bola maximálne 0,35 ml. Pri ostatných metódach sa na slepý pokus spotrebovalo minimálne 1,1 ml uvedenej kyseliny a pri malom odchylení od pracovného postupu spotreba rapidne stúpala a dosahovala až 3 ml. Pri stanovení amoniaku v štandardnom roztoku výsledky nevybočovali z hraníc pozorovacích chýb.

Potrebný hydroxyd kademnatý sme pripravovali z octanu kademnatého zrážaním hydroxydom draselným a dokonalým premytím zrazeniny horúcou vodou. Hydroxyd kademnatý je dostatočne silnou zásadou na vytlačenie amoniaku a počas krátkeho destilovania amoniaku močovinu neatakuje. Rozklad močoviny nastáva až po deväťminútovom varení. Používanie hydroxydu kademnatého má aj tú výhodu, že pridávaný albumín sa ihneď vyvločkuje, var je pokojný a roztok počas destilovania nepení. Presnú koncentráciu používanej emulzie možno stanoviť spätnou titráciou na metylčerveň alebo potenciometricky za použitia antimónovej a kalomelovej elektródy.

Сúhrн

Amoniak sa za prítomnosti močoviny vytlačí z amónnych solí hydroxydom kademnatým a unikajúci amoniak sa chytá do predlohy s 0,02 N-H₂SO₄. Nespotrebovaná kyselina sa titruje späť 0,02 N-KOH na metylčerveň. Hydroxyd kademnatý, ktorý sa používa v ca 5 % emulzii, vytlačí amoniak kvantitatívne a močovinu počas destilovania amoniaku nerozkladá. Rozklad močoviny nastáva až po deväťminútovom varení. Var počas destilovania amoniaku je pokojný, roztok nepení a pridaný albumín sa ihneď vyvločkuje. Výsledky slepých pokusov sa pohybujú pod hodnotou 0,35 ml 0,02 N-H₂SO₄ a pri stanovení amoniaku v štandardných roztokoch výsledky nevybočujú z hraníc pozorovacích chýb.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АММИАКА В АММОНИЕВЫХ СОЛЯХ В ПРИСУТСТВИИ МОЧЕВИНЫ ПРИ ПОМОЩИ Cd(OH)₂

Д. ПРИСТАВКА, В. КРЧМЕРИ

Кафедра аналитической химии Словацкой высшей технической школы в Братиславе

Выводы

Аммиак в присутствии мочевины вытесняется гидроокисью кадмия и поглощается 0,02 N-H₂SO₄. Пребыточная кислота оттитровывается 0,02 N-KOH на метиловую краску. Пребыточная кислота оттитровывается 0,02 N-KOH на метиловую красную. Гидроокись кадмия, которая применяется прибл. как 5 % эмульсия, вытесняет аммиак без остатка, при чем мочевина в течении дистилляции не разлагается. Разложение мочевины наступает только после 9 минутного кипячения. Кипячение, во время дистилляции аммиака, является спокойным, раствор не пенится и приданный альбумин сейчас же появляется в хлопьях. Результаты холостых опытов находятся под значениями 0,35 мл. 0,02 N-H₂SO₄ а при определении аммиака в стандартных растворах результаты не выходят из пределов ошибок наблюдения.

Поступило в редакцию 24. X. 1955 г.

AMMONIAKBESTIMMUNG IN AMMONIUMSALZEN MITTELS
 $\text{Cd}(\text{OH})_2$ IN GEGENWART VON HARNSTOFF

D. PRÍSTAVKA, V. KRČMÉRY

Lehrstuhl für analytische Chemie an der Slowakischen Technischen Hochschule in
Bratislava

Zusammenfassung

In Gegenwart von Harnstoff wird aus Ammoniums Salzen durch Kadmiumhydroxyd Ammoniak verdrängt. Dieses entweichende Ammoniak wird in einer Vorlage in 0,02 N- H_2SO_4 aufgefangen. Die nicht verbrauchte Säure wird mit 0,02 N-KOH gegen Methylrot als Indikator zurücktitriert. Kadmiumhydroxyd, welches in etwa 5 % Emulsion angewendet wird, verdrängt Ammoniak quantitativ und der Harnstoff zersetzt sich während der Destillation des Ammoniaks nicht. Eine Zersetzung des Harnstoffs tritt erst nach einem neunminütigen Kochen ein. Das Sieden während der Ammoniakdestillation verläuft ruhig, die Lösung schäumt nicht und das zugesetzte Albumin flockt sofort aus. Die Ergebnisse von Blindversuchen bewegen sich unterhalb des Wertes 0,35 ml 0,02 N- H_2SO_4 und bei der Ammoniakbestimmung in Standardlösungen überschreiten die Ergebnisse nicht die Grenzen der beobachteten Fehler.

In die Redaktion eingelangt den 24. X. 1955

LITERATÚRA

1. Sanders E., Warner J., *J. Bact.* 62, 591 n (1951). 2. Van Slyke D., Archibald R. M., *J. biol. Chem.* 154, 623—642 (1944). 3. Slavík K., Smetana J., *Chem. Listy* 46, 648 (1952). 4. Rinehart a spol., *Arch. Biochem.* 2, 163—174 (1942—1943). 5. Nižňanský F., Krčméry V., *Príspevok k ureázovej a katalázovej aktivite brucelových kmeňov* (v tlači).

Došlo do redakcie 24. X. 1955