

STANOVENIE AKTÍVNEHO CHLÓRU A JEHO STABILITA V CHLÓROVANOM VAJEČNOM ALBUMÍNE

J. VAŠÁTKO, E. STANKOVIČ

Oddelenie glycidov a biochémie Chemického ústavu Slovenskej akadémie vied v Bratislave

Cross, Bevan a Briggs [1] zistili už r. 1908, že chlórovaním proteínu viaže sa určité množstvo chlóru v aktívnej forme. Teóriu väzby chlóru v proteínoch podáva Dakin [2], ktorý vyskúšal aj baktericídne pôsobenie niektorých chlóraminov na rozličných mikroboch. O pôsobení voľného chlóru alebo alkalického chlórnanu je v literatúre uvedených viac prác, v ktorých sa sledovala celková oxydácia substrátu (Engfeldt [3], Salkowski [4], Wright [5], Vandavelde [6—9], Lieben [10], Norman [11], Wright [12]), dezaminácia a dekarboxylácia (Gehrmann, Remmer [13], Bartmann, Gehrmann, Remmer [14], Schormüller, Ballschmieter [15]).

V tejto práci opisujeme stanovenie aktívneho chlóru a jeho stabilitu v chlórovanom vaječnom albumíne. Sledujeme preto i závislosť ubúdania chlóru od času a od teploty, ako aj vplyv alkality na jeho stanovenie.

I. Experimentálna časť

1. Chlórovanie substrátu

10 % suspenzia vaječného albumínu vo vode s obsahom substrátu 100 g sa chlórovala zavedením chlóru z bomby. Rýchlosť zavádzania chlóru bola 2 bubliny za 1 sekundu. Doba chlórovania bola 8 a 16 hodín.

Chlórovaný substrát po 8 hodinovom chlórovaní sa rozdelil:

a) na chlórovaný substrát premytý, uložený v otvorenej Petriho miske pri laboratórnej teplote;

b) na chlórovaný substrát premytý, vzduchotesne uzavretý v prachovnici za vlhkého stavu pri laboratórnej teplote;

c) na chlórovaný substrát nepremytý, uložený v otvorenej Petriho miske.

Chlórovaný vaječný albumín sa po 16 hodinovom chlórovaní premyl a uložil v otvorenej Petriho miske pri 5 °C.

Substrát sa chlóroval až nad hranicu bodu premeny.

Substrát chlórovaný 8 hodín sa premyl hneď po chlórovaní, kým substrát chlórovaný 16 hodín ostal ešte 10 dní za účelom dokonalejšieho chlórovania vzduchotesne uzavretý v suspenzii, ktorá obsahovala ďalej reagujúci voľný chlór. Po 10 dňoch zostávala v suspenzii už len približne jedna tretina celkového voľného chlóru, teda dochádzalo ešte k ďalšiemu dodatočnému chlórovaniu substrátu.

2. Stanovenie aktívneho chlóru

100 mg substrátu sa rozpustilo v 100 ml destilovanej vody zalkalizovanej prídavkom 200 mg tuhého KOH. Potom sa roztok okyslil pridaním 3 ml koncentrovanej kyseliny soľnej. Aktívny chlór sa stanovoval jodometricky titráciou vylúčeného jódu 0,1 N tiosíranom sodným.

Množstvo aktívneho chlóru v preparáte sme sledovali niekoľko mesiacov. Výsledky sú zhrnuté v tab. 1 a 2 a sú zobrazené na diagrame 1.

Tabuľka 1

Ubúdanie obsahu aktívneho chlóru v chlórovanom vaječnom albumíne
Doba chlórovania 8 hodín

Chlórovaný vaječný albumín premytý, uložený v otvorenej Petriho miske		Chlórovaný vaječný albumín premytý, uzavretý za vlhkého stavu		Chlórovaný vaječný albumín nepremytý, uložený v otvorenej Petriho miske	
Doba uloženia v dňoch	Množstvo aktívneho chlóru v %	Doba uloženia v dňoch	Množstvo aktívneho chlóru v %	Doba uloženia v dňoch	Množstvo aktívneho chlóru v %
10	2,46	10	1,28	10	0,32
17	2,30	17	1,06	18	0,28
35	2,24	63	0,38	63	0,16
56	1,70	—	—	—	—
78	1,33	—	—	—	—
120	0,97	—	—	—	—
150	0,91	—	—	—	—
198	0,68	198	0,00	198	0,00

Tabuľka 2

Ubúdanie obsahu aktívneho chlóru v chlórovanom vaječnom albumíne
Doba chlórovania 16 hodín, doba dochlórovania v suspenzii 10 dní

Chlórovaný vaječný albumín premytý, uložený v Petriho miske pri 5 °C	
Doba uloženia v dňoch	Množstvo aktívneho chlóru v %
15	5,03
22	5,00
63	4,94
155	4,87

Zistili sme, že vo filtráte dochádza postupne ku strate aktívneho chlóru: po 18 hodinách ostáva už len 75 %, po 43 hodinách 45 % a po 12 dňoch 22 % pôvodného aktívneho chlóru, prítomného v prvom podiele zachyteného filtrátu. Ubúdanie aktívneho chlóru bolo približne rovnaké v obidvoch prípadoch chlórovania substrátu za rôznu dobu. K unikaniu voľného chlóru nemohlo dôjsť, lebo nádoba po usehovaní filtrátu bola vzduchotesne uzavretá. Filtrát po niekoľkých dňoch nadobudol tmavočervené až hnedé zafarbenie.

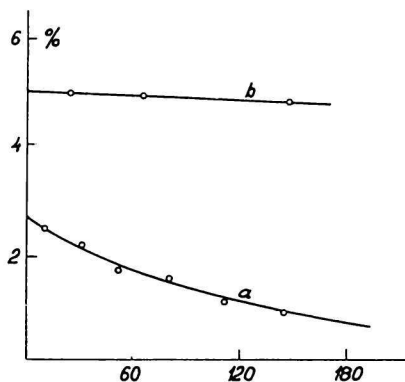


Diagram 1. Ubúdanie obsahu aktívneho chlóru v chlórovanom vaječnom albumíne.

na úsečke: doba uskladnenia — počet dní
na poradnici: množstvo aktívneho chlóru v albumíne v %

a — množstvo aktívneho chlóru v albumíne chlórovanom 8 hodín, *b* — množstvo aktívneho chlóru v albumíne chlórovanom 16 hodín (doba dochlórovania 10 dní).

3. Stanovenie straty aktívneho chlóru účinkom zvýšenej teploty

Množstvo aktívneho chlóru v suchom chlórovanom albumíne poklesne pri teplote 100 °C po dvoch hodinách až na nulovú hodnotu. Strata aktívneho chlóru po zahriatí na 60 °C je oveľa menšia. V tab. 3 a na diagrame 2 uvádzame výsledky pokusov meraných pri 60 °C.

Tabuľka 3

Ubúdanie obsahu aktívneho chlóru vo vaječnom albumíne chlórovanom pri 60 °C

Doba zahrievania v hodinách	Množstvo aktívneho chlóru v %
0	4,98
2	4,02
4	3,58
6	3,20
24	2,87
48	2,12
98	1,67

Na výsledky stanovenia aktívneho chlóru má vplyv aj doba, za ktorú sa chlórovaný albumín nachádza v roztoku hydroxydu draselného. V tab. 4 sú uvedené výsledky straty aktívneho chlóru po rozpustení substrátu chlórovaného vaječného albumínu v alkalickom roztoku.

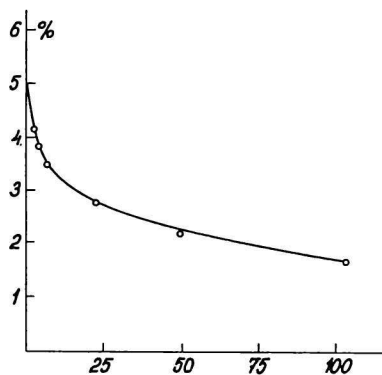


Diagram 2. Ubúdanie obsahu aktívneho chlóru vo vaječnom albumíne chlórovanom pri 60 °C.
na úsečke: doba zahriatia v hodinách
na poradnici: množstvo aktívneho chlóru v albumíne v

Stanovenie množstva aktívneho chlóru je ovplyvnené aj koncentráciou pridaného KOH. Závislosť množstva aktívneho chlóru po pridaní 300, 600 a 900 mg tuhého KOH je v tab. 5.

Tabuľka 4

Ubúdanie obsahu aktívneho chlóru v chlórovanom vaječnom albumíne po jeho rozpustení v alkalickom prostredí

Doba rozpustenia v hodinách	Množstvo aktívneho chlóru v %
0	0,91
6	0,52
24	0,39

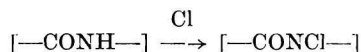
Tabuľka 5

Ubúdanie obsahu aktívneho chlóru v chlórovanom vaječnom albumíne pri rôznej koncentrácii roztoku KOH ako rozpúšťadla

mg KOH/100 ml H ₂ O	Množstvo aktívneho chlóru v %
300	4,95
600	4,29
900	3,76

II. Diskusia

Podľa výsledkov uvedených v experimentálnej časti dochádza pri chlórovaní proteínu ku vzniku zlúčenín s obsahom aktívneho chlóru. Usudzujeme, podobne ako Dakin [2], že tento aktívny chlór je viazaný na dusíku polypeptidických reťazcov:



Množstvo aktívneho chlóru, ako to vyplýva z výsledkov experimentálnej časti tejto práce, časom ubúda. Substrát v otvorenej Petriho miske stráca aktívny chlór oveľa pomalšie než substrát vzdychotesne uzavretý za vlhkého stavu. V obidvoch prípadoch prebieha, pravda, ďalšie chlórovanie substrátu, pri ktorom aktívny chlór viazaný na polypeptidických reťazcoch ďalej oxýduje, resp. chlórjuje jednotlivé skupiny aminokyselín pospájané polypeptidickými väzbami. Avšak v prípade vzdychotesne uzavretého vlhkého albumínu podmienky ďalšej oxýdácie, resp. chlorácie sú oveľa viac podporované prítomnosťou vody v substráte.

Množstvo aktívneho chlóru v nepremytom chlórovanom vaječnom albumíne je podstatne menšie než v premytom albumíne. Pravdepodobne ide o dodatočnú ďalšiu oxýdáciu, resp. chloráciu štiepných produktov vytvorených pri chlórovaní, ktoré sa premývaním neodstránili, ale ostali v nerozpustnom podiele.

Albumín chlórovaný 16 hodín s menej intenzívnym dochlórovaním v suspenzii ešte počas 10 dní po premytí stráca aktívny chlór oveľa pomalšie. Ide tu o dokonalejšie chlórovanie celého substrátu, ako aj štiepných produktov.

Štiepne produkty albumínu sú príčinou rýchlejšej straty aktívneho chlóru aj vo filtráte.

Zahriatím vysušeného chlórovaného albumínu na 100 °C dochádza k rýchlejšej strate aktívneho chlóru. Tento jav vysvetľujeme chemickou zmenou stavu substrátu a zmenenými podmienkami jeho oxýdácie, resp. chlorácie pri tejto teplote. Predpokladáme, že sa tu určitý podiel chlóru zúčastňuje na substitučnej reakcii. Zmenené podmienky procesu chlórovania jestvujú aj pri zvyšovaní alkality v reakčnom prostredí, ktoré podporuje oxýdáciu, resp. chloráciu substrátu, takže časť aktívneho chlóru sa stráca.

Súhrn

Vykonalí sme chloráciu vaječného albumínu účinkom voľného chlóru vo vodnom prostredí. Stanovili sme množstvo aktívneho chlóru v chlórovanom, premytom a vysušenom substráte za rôznu dobu po chlorácii. Zistili sme, že množstvo aktívneho chlóru po niekoľkých mesiacoch sa znižuje. Toto množstvo sa znižuje i zvýšením teploty, ako aj zvýšením alkality reakčného prostredia.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОГО ХЛОРА И ЕГО СТАБИЛЬНОСТИ В ХЛОРИРОВАННОМ ЯИЧНОМ АЛЬБУМИНЕ

И. ВАШАТКО, Л. СТАНКОВИЧ

Отдел глицидов и биохимии Химического института Словацкой Академии Наук

Выводы

Мы провели хлорирование яичного альбумина действием свободного хлора в водной среде. Далее мы определили количество активного хлора в хлорированном, промытом и высушенном субстрате в течении разных промежутков времени после хлорирования. Было обнаружено, что количество активного хлора после нескольких месяцев уменьшается незначительно. Количество активного хлора также уменьшается при повышении температуры и щелочности реакционной среды.

Поступило в редакцию 21. 5. 1959 г.

BESTIMMUNG DES AKTIVEN CHLORS UND DESSEN STABILITÄT IM CHLORIERTEN EIWEISSALBUMIN

J. VAŠÁTKO, E. STANKOVIČ

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

Zusammenfassung

Die Autoren führten die Chlorierung von Eiweissalbumin durch Einwirkung freien Chlors im wässrigen Milieu durch. Sie bestimmten sodann die Menge aktiven Chlors im chlorierten, ausgewaschenen und getrockneten Substrat in verschiedenen Zeitabständen nach der Chlorierung. Dabei wurde festgestellt, dass sich die Menge aktiven Chlors nach einer Dauer von einigen Monaten langsam verringert. Die Menge aktiven Chlors nimmt ebenfalls durch Erhöhung der Temperatur und weiterhin der Alkalität des Reaktionsmilieus ab.

In die Redaktion eingelangt den 21. 5. 1959

LITERATÚRA

1. Cross C. F., Bevan E. J., Briggs J. F., Chem. Ztg. 32, 369 (1908). — 2. Dakin H. D., Brit. Med. J. 2, 809 (1915). — 3. Engfeldt N. O., Z. physiol. Chem. 121, 18 (1922). — 4. Salkowski E., Biochem. Z. 136, 169 (1923). — 5. Wright N. Ch., Biochem. J. 20, 524 (1926). — 6. Vandeveldel Alb. J. J., Rec. trav. chim. 45, 825 (1926). — 7. Vandeveldel Alb. J. J., Rec. trav. chim. 46, 133 (1927). — 8. Vandeveldel Alb. J. J., Rec. trav. chim. 46, 590 (1927). — 9. Vandeveldel Alb. J. J., Rec. trav. chim. 47, 458 (1928). — 10. Lieben F., Bauminger B., Biochem. Z. 261, 387 (1933).
11. Norman M. F., Biochem. J. 30, 484 (1936). — 12. Wright N. Ch., Biochem. J. 30, 1661 (1936). — 13. Gehrman K., Remmer H., Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol. 215, 342 (1952). — 14. Bartmann K., Gehrman K., Remmer H., Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol. 215, 433 (1952). — 15. Schormüller J., Ballschmieter H., Deutsch. Lebensm. Rundschau 48, 136 (1952).

Došlo do redakcie 21. 5. 1959

Adresa autorov:

Akademik Jozef Vašátko, prom. biochemik Ludovít Stankovič, Bratislava, Kollárovo nám. 2, Chemický pavilón.