Uproszczona metoda wyizolowania t. zw. glutationu z nasion grochu (*Pisum sativum*).

(A simplified method for the isolation of the so called glutathione from the pea (*Pisum sativum*).

Napisał

ANTONI KOZŁOWSKI.

Zastosowanie rozcieńzonego acetonu do wyciągania glutationu z drożdży (1) zapewniło tak dużą ekonomję pracy, materiału i czasu, że ponętnem stało się wypróbowanie owej metody w wyizolowaniu podobnej substancji, zawartej w nasionach grochu. Usiłowania, w tym celu podjęte w 1926 roku (2), napotkały na duże trudności wskutek stosowania kwasu fosforowolframowego, który strąca nie tylko zanieczyszczenia, lecz także cystynę i którego usunięcie z roztworu wymaga użycia wodorotlenku baru, rozkładającego dość łatwo cysteinę; prócz tego, wyciąganie gorącą wodą pociąga za sobą nie tylko rozkład cysteiny, lecz także wprowadza nadmiar zanieczyszczeń, utrudniających pracę.

Rozcieńczony aceton, rozpuszczając tłuszcze i fosfatydy, ułatwia dyfuzję licznych związków nazewnątrż komórki, dzięki czemu uprzednie rozdrabnianie tkanki i używanie wyższej temperatury jest zbędne. Materiał roślinny suchy powinien być poddany uprzednio pęcznieniu w wodzie; w każdym przypadku należy uwzględnić zawartość wody w tkance i ilość wody dodanej. Zależnie bowiem od stopnia rozcieńczenia acetonu, skład ekstraktu będzie rozmaity; 40% aceton przeprowadza w ekstrakt tłuszcze, fosfatydy, monosacharydy, sole kwasów organicznych i mineralnych, aminokwasy, pewne barwiki, białka etc. Roztwory takie jednych związków służą równocześnie za rozpuszczalniki dla innych składników treści komórki, które same przez się są trudno rozpuszczalne w czystym acetonie wzgl. w czystej wodzie.

Dla wyciągnięcia cysteiny z nasion grochu użyto acetonu w takiej ilości, by jego zawartość w ekstrakcie nie przekraczała 40%. Metoda stosowana przy drożdżach uległa tu pewnej modyfikacji; dla strącenia bowiem cysteiny grochu zapomocą tlenku miedziawego okazało się niezbędnem uprzednie usunięcie pewnych zanieczyszczeń, które utrudniały strącenie pożądanego związku; w tym celu użyto octanu ołowiu dla strącenia cysteiny z ekstraktu acetonowego, jak i następnie dla usunięcia niektórych zanieczyszczeń z roztworu cystyny. (Możliwe, że zastosowanie siarczanu rtęci do strącenia ekstraktu uprościłoby pracę).

Preparat glutationu otrzymanego z grochu jest pod względem chemicznym nieco odmiennym od tegoż z drożdży. Problem jednak ten wymaga jeszcze dalszych badań. Autor, będąc zmuszonym do przerwania dotyczących studjów, podaje tu tylko metodę, która może okazać się pożyteczną w ręku biologa, interesującego się daną kwestją.

Przebieg pracy:

2.5 kg dojrzałych nasion grochu polnego zadano 4 l wody i pozostawiono w temperaturze pokojowej przez 24 godzin. Następnie dodano mieszaniny złożonej z 2.5 l acetonu i 1 l wody; materiał mieszano kilkakrotnie w ciągu 12 godzin; brunatny ekstrakt strącono 15% roztworem obojętnego octanu ołowiu (około 120 cm³). Osad odcentryfugowano, przepłukano 50% acetonem na filtrze Buchnera i rozłożono 5% kwasem siarkowym. Filtrat po siarczanie ołowiu uwolniono od kwasu siarkowego węglanem baru, zobojętniono kwaśnym węglanem potasu i mieszano prądem powietrza, aż do zupełnego odwodornienia cysteiny. Płyn ten strącono octanem ołowiu; osad odcentryfugowano; płyn z nad osadu uwolniono od ołowiu rozcieńczonym kwasem siarkowym; dodano tego ostatniego do ilości jego w płynie około 25%. W miarę następnego dodawania tlenku miedziawego występowała coraz to silniejsza barwa żółto-zielona; płyn taki potrząsano przez kilka minut i pozostawiono w spokoju; skoro tylko pojawił się na powierzchni płynu biały nalot pełzający na ścianę kolby, odfiltrowano nadmiar zbrunatniałego tlenku metalu; filtrat mieszano prądem powietrza, aż do wytworzenia się białego osadu i pozostawiono w temperaturze niskiej na przeciąg kilkunastu godzin. Wytworzony osad odwirowano, przepłukano wodą do reakcji obojętnej i rozłożono siarkowodorem. Filtrat po siarczku miedzi uwolniono od siarkowodoru prądem powietrza, zobojętniono kwaśnym węglanem potasu i mieszano prądem powietrza aż do zupełnego od-

wodornienia cysteiny, poczem wpuszczano go kroplami do zimnej mieszaniny alkoholu i eteru; z czasem wytworzył się biały, ziarnisty osad.

Tak otrzymana substancja, w ilości około 0·1 gm, ma liczne cechy odwornionego glutationu drożdży; w odróżnieniu od tego ostatniego, odczepia łatwo cystynę pod działaniem bakterji lub rozcieńczonego kwasu solnego.

Summary.

2·5 kg of peas were soaked in 4 l of water for 24 hours, and afterwards treated with a mixture of 2·5 l of acetone and of 1 l of water for 12 hours; the extract was precipitated with lead acetate; the precipitate was decomposed by sulphuric acid; the filtrate was neutralised and aerated until all cysteine was oxidised; the impurities were precipitated by lead acetate, and separated by centrifuging. The supernatant liquid was freed from lead by sulphuric acid, and treated with cuprous oxide. An excess of this latter was filtered off; the filtrate was aerated and kept in the cold room for several hours. The white precipitate was centrifugend off and decomposed by sulphurhydrogen; the solution, freed from sulphurhydrogen, was neutralised, aerated and poured into a mixture of alcohol and ether.

Thus a granular substance was obtained that showed some properties of the glutathione of yeast.

Literatura.

1. Kozłowski, A. Acta Soc. Bot. Poloniae, 1930, 7, 87.
2. Kozłowski, A. Biochem. J., 1926, 20, 1346.