

До методики визначення каталази в тканинах.

Е. Я. Рашба.

Біохемічний інститут академії наук УСРР (директор — акад. О. В. Палладін).

Більша частина методів для визначення каталази в тканинах ґрунтується на вимірянні кількості кисню, виділеного при розкладі каталазою водень-пероксиду. А втім газометричне визначення має деякі незручності: треба мати відповідний евідіометр, важко поставити паралельні експерименти при великому числі одночасних визначень. Крім того, у звичайних апаратах не береться до уваги чималий об'єм (у колбочці і відвідній трубці) до початку відліку в евідіометричній бюретці, що дає деяку помилку.

Метод А. Н. Баха, який точністю не поступається газометричному методу, значно спрощує роботу. А тому, на пропозицію акад. О. В. Палладіна, ми опрацювали методику визначення каталази в тканинах за цим способом.

Ця методика, яка потребує для визначення всього $2\frac{1}{2}$ — 3 години при одночасному визначенні в кількох тканинах (зручно 6 — 8 наважок одночасно), вживається в нашому інституті багатьма співробітниками; вона цілком виправдала себе на практиці завдяки своїй простоті, відсутності спеціального устаткування, швидкості і точності роботи.

Принцип методу полягає у виготованні водного екстракту органу і в дальшому визначенні кількості водень-пероксиду, зруйнованого певним об'ємом цього екстракту. Ця кількість визначається титруванням надвишку водень-пероксиду $1/10$ N перманганатом.

Попередні зауваження. Різні органи однієї тварини мають різну каталазну активність.

Тканина печінки, приміром, містить каталази приблизно в 100 разів більше, ніж м'яз, і в 150 разів більше, ніж мозок. Однакові органи різних тварин мають таксамо різну каталазну активність. Наприклад, для м'язів кролика для визначення потрібно 5 куб. см екстракту, здобутого екстракцією м'яза стократною кількістю екстрагуючого розчину (в даному разі 5 куб. см екстракту відповідають 50 мг м'яза); для м'язів щура — приблизно та сама кількість, для м'язів морської свинки 1 куб. см розведеного в 2 рази такого екстракту, тобто 5 мг м'яза; для білих м'язів курки для визначення потрібно 5 куб. см десятикратного екстракту (відповідає 500 мг м'яза), для червоних м'язів курки — 5 куб. см 50-кратного екстракту (тобто 100 мг м'яза) і т. д. Варіюючи наважку (від 50 до 500 мг), об'єм вживаних для розведення мірних колбочок (50 — 250 куб. см) і взятю для визначення кількість кубічних сантиметрів екстракту тканини (1 — 5 куб. см), легко здобути відповідну кількість каталази в екстракті і пристосувати вказану методику до тканини будьякого органу.

Далі ми описуємо перебіг визначення при розведеннях, які відповідають дослідженню каталази в м'язах кролика.

Екстракт виготовляють при охолодженні матеріалу льодом, щоб запобігти дії антикаталази; можна таксамо застосовувати розведення алкоголем 1:1 000 або 1:5 000, але охолодження дає кращі результати. Для прикладу подаємо один з протоколів.

М'яз щура вагою 170 г (протокол 10 грудня).
Muscle de rat pesant 170 gr (procès-verbal du 10 décembre).

Екстрагування м'яза Extraction du muscle	Каталаза при розведенні до 7 куб. см Action de la catalase, dilution jusqu'à 7 cc.	Розкладено 1/10 N H ₂ O ₂ свіжої речовини в куб. см H ₂ O ₂ 1/10 N décomposé 1 gr de substance fraîche
алкоголем у воді 1:1 000 на льоду	1) алкоголем 1:1 000 1) par l'alcool à 1:1 000	407,5
par l'alcool dilué d'eau 1:1 000 dans la glace	2) водою 2) par l'eau	407,5
	3) 1/10 N CH ₃ COONa 3) par CH ₃ COONa 1/10 N	525,0
1/10 N CH ₃ COONa на льоду (Р _н = 7,5)	1) алкоголем 1:1 000 1) par l'alcool à 1:1 000	945,0
par CH ₃ COONa 1/10 N dans la glace (Р _н = 7,5)	2) водою 2) par l'eau	1225,0
	3) 1/10 N CH ₃ COONa 3) par CH ₃ COONa 1/10 N	662,0

Розведення ми робили свіжо приготованим 1/10 N розчином натрію ацетату (Р_н = 7,0 — 7,2), який цілком замінює, за нашими дослідженнями, дорожчий і важчий для приготування фосфатний буфер, що застосовує більшість авторів. Подаємо тут один з протоколів.

М'яз щура вагою 150 г (протокол 17 грудня).
Muscle de rat pesant 150 gr (procès-verbal du 17 décembre).

Екстрагування м'яза Extraction du muscle	Каталаза при розведенні до 7 куб. см Action de la catalase, dilution jusqu'à 7 cc.	Розкладено 1/10 N H ₂ O ₂ свіжої речовини в куб. см H ₂ O ₂ 1/10 N décomposé 1 gr de substance fraîche
фосфатним буфером Р _н = 7,16	водою	320,0
par un buffer phosphaté Р _н = 7,16	par l'eau	
фосфатним буфером Р _н = 5,9	водою	58,7
par un buffer phosphate Р _н = 5,9	par l'eau	
1/10 N CH ₃ COONa Р _н = 7,0	водою	320,0
CH ₃ COONa 1/10 N Р _н = 7,0	par l'eau	

Процес визначення. На торсійній вазі відважують точно 500 мг м'яза, розтирають в охолодженій на льоду ступці з 3 куб. см розчину CH_3COONa і кварцовим піском, додають 20 куб. см розчину CH_3COONa і залишають на 1 годину екстрагуватися на льоду. Потім кількісно переводять вміст ступки в центрофужну пробірку на 50 куб. см і змивають туди ж залишки з стінок ступки 2—3 куб. см того ж розчину CH_3COONa . Центрофугують 7—10 хвилин і зливають центрофугат у мірчу колбочку на 50 куб. см, яка стоїть на льоду; потім промивають осад 10 куб. см розчину CH_3COONa , центрофугують 2—3 хвилини і центрофугат зливають в ту саму мірчу колбочку. Цю операцію повторюють два рази. При цьому екстрагується 96—98% каталази.

Потім мірчу колбочку доливають розчином CH_3COONa до позначки, збовтують і наливають для визначення по 5 куб. см цього екстракту у дві Ерленмейєрівські колбочки на 50 куб. см. У кожен з них додають по 3 куб. см води і точно 2 куб. см 1% водень-пероксиду (1 куб. см пергідролу Merck на 29 куб. см води). При такому розведенні до загального об'єму в 7 куб. см молярність розчину водень-пероксиду дорівнює приблизно 0,1 м; за даними деяких авторів така концентрація не пригнічує діяння каталази. Залишають стояти при кімнатній температурі точно 30 хвилин, доливають у кожен колбочку по 3 куб. см 10% розчину сульфатної кислоти для інактивації каталази і титрують 1/10 N перманганатом залишений нерозкладеним водень-пероксид до появи ясного жовтого забарвлення, яке не зникає протягом однієї хвилини.

Для контролю слід брати:

- 1) 5 куб. см екстракту, 2 куб. см води (прокипілі одну хвилину для інактивації каталази), 2 куб. см водень-пероксиду;
- 2) 2 куб. см водень-пероксиду і 7 куб. см води;
- 3) 5 куб. см екстракту і 2 куб. см води.

Контролі ставлять одночасно з експериментом. На титрування контролю (3) має бути витрачено не більше як 2 краплини перманганату, в противному разі треба додати витрачену на титрування кількість його до кількості, витраченої на титрування контролю (2).

Розрахунок. Кожен кубічний сантиметр 1/10 N перманганату відповідає 1 куб. см 1/10 N водень-пероксиду. А тому, якщо на титрування контрольної порції витрачено 11 куб. см 1/10 N перманганату, то в цій порції міститься 11 куб. см 1/10 N водень-пероксиду і т. д.

У дослідній порції частина водень-пероксиду розкладена каталазою, а тому на титрування цієї порції менше буде витрачено перманганату. Частина, розкладена каталазою, становитиме різницю між витраченим на титрування контрольної порції числом кубічних сантиметрів перманганату і числом, витраченим на титрування дослідної порції. А тому, відімаючи з першого числа друге, матимемо кількість кубічних сантиметрів 1/10 N водень-пероксиду, розкладеного каталазою.

Цю кількість переобчислюють на 1 г свіжої або сухої речовини тканини. Якщо ж бажано виразити активність каталази в міліграмах зруйнованого водень-пероксиду, то помножують це число на 1,7, бо 1 куб. см 1/10 N водень-пероксиду містить 1,7 мг її.

Бажано, щоб кількість розкладеного водень-пероксиду дорівнювала 6-7 куб. см, тобто 60-70% усієї його кількості, взятої для визначення (2 куб. см 1% пергідролу Merck відповідають приблизно 11,6 куб. см 1/10 N H_2O_2 , тобто на титрування контролю має бути витрачено приблизно 11,6 куб. см 1/10 N перманганату). При вживанні водень-пероксиду невідомого походження слід перевірити ацидиметрично після розкладу його перманганатом, чи не міститься в ньому кислоти, бо пероксид, в якому міститься кислота, для визначення не придатний, а потім приготувати з нього таке розведення, щоб на титрування 2 куб. см його потрібно було 11—12 куб. см 1/10 N перманганату.

Література

- Гагарина и Янковский — Лабораторная практика, 6, 20, 1927.
Балаховский — Микрхимический анализ крови, стор. 33 и 283, 1932.

К методике определения каталазы в тканях.

Е. Я. Рашба.

Биохимический институт Академии наук УССР (директор — акад. А. В. Палладин)

Автором разработана методика определения каталазы в тканях методом А. Н. Баха, ввиду неудобства применявшегося до сих пор для тканей газометрического метода. Методика значительно упрощает и ускоряет работу, не уступая по точности газометрическому методу.

Принцип предлагаемого метода состоит в изготовлении водного экстракта ткани и в последующем определении количества перекиси водорода, разложенной определенным объемом этого экстракта, перманганометрическим титрованием избытка перекиси водорода.

Легко подобрать подходящее для определения в любой ткани реагента, варьируя навеску ткани или объем мерной посуды.

Здесь описано определение каталазы в мышцах кролика. Экстрагирование производится $\frac{1}{10}$ N CH_3COONa на льду для предупреждения действия антикаталазы.

Отвешенную на торсионных весах точную навеску в 500 мг мышца растирают в стоящей на льду ступке с 3 куб. см $\frac{1}{10}$ N CH_3COONa и кварцевым песком, прибавляют 20 куб. см $\frac{1}{10}$ N CH_3COONa и оставляют экстрагироваться 1 час. Затем переводят содержимое ступки в центрифужную пробирку на 50 куб. см и центрифугируют 7—10 минут; затем центрифугат сливают в стоящую на льду мерную колбочку на 50 куб. см и осадок дважды промывают 10 куб. см $\frac{1}{10}$ N CH_3COONa , каждый раз центрифугируя по 2—3 минуты и сливая в ту же колбочку. Затем колбочку с экстрактом доливают раствором CH_3COONa до метки и взбалтывают.

Экстракт наливают по 5 куб. см в Эрленмейровские колбочки емкостью на 50 куб. см; в каждую прибавляют по 3 куб. см воды и точно 2 куб. см 1% перекиси водорода. Оставляют стоять при комнатной температуре ровно 30 минут; затем в каждую колбочку прибавляют для инактивизации каталазы 3 куб. см 10% H_2SO_4 и титруют $\frac{1}{10}$ N перманганатом оставшийся неразложенным избыток перекиси до появления светлорозового окрашивания.

Контроль.

- 1) Экстракт плюс вода, прокипяченные 1 минуту, плюс перекись водорода;
- 2) вода плюс перекись водорода;
- 3) экстракт плюс вода.

Расчет обычный: разность между количеством $\frac{1}{10}$ N KMnO_4 , ушедшим на титрование контроля и ушедшим на титрование опыта, деленная на

количество $\frac{1}{10}$ N перекиси водорода, разложенной данным объемом экстракта. Количество это пересчитывают на 1 г свежего или сухого веса ткани.

Все определение при 6—8 навесках продолжается $2\frac{1}{2}$ —3 часа.

Sur les méthodes de détermination de la catalase dans les tissus.

E. J. Raschba.

*Institut de biochimie de l'Académie des Sciences d'Ukraine
(directeur — A. V. Palladine, membre d'Académie).*

L'auteur a élaboré une méthode de détermination de la catalase dans les tissus d'après le procédé de A. N. Bach, dans le but de la substituer à la méthode gazométrique, qui avait été employée jusqu'ici pour les tissus et qui présente certains inconvénients. La nouvelle méthode rend le travail beaucoup plus facile et plus rapide sans le céder en exactitude au procédé gazométrique.

La méthode proposée consiste à préparer un extrait aqueux du tissu et à évaluer au moyen du titrage permanganatométrique de l'excédent d'eau oxygénée, la quantité de celle-ci, décomposée par un volume donné de cet extrait.

La dilution qui convient au genre donné de tissu est facilement établie, en variant la pesée du tissu, ou la capacité du récipient servant de mesure.

Dans ce travail l'auteur fait part de ses expériences, relatives à la détermination de la catalase dans les muscles du lapin. L'extraction est faite au moyen de $\text{CH}_3\text{COONa} - \frac{1}{10}$ N à la glacière, afin de prévenir l'action de l'anticatalase.

On broie dans un mortier, entouré de glace, 500 gr. de tissu, pesés sur une balance à torsion, avec 3 cc. de $\text{CH}_3\text{COONa} (\frac{1}{10}\text{N})$ et du sable de quartz, on ajoute 20 cc. de $\text{CH}_3\text{COONa} (\frac{1}{10}\text{N})$ et on laisse extraire pendant 1 heure. Ensuite le contenu du mortier est porté dans une éprouvette rotative de 50 cc. et centrifugé pendant 7—10 minutes, après quoi on verse toute la masse dans un verre gradué de 50 cc. de capacité; le sédiment est lavé à deux reprises dans 10 cc. de $\text{CH}_3\text{COONa} (\frac{1}{10}\text{N})$ centrifugé chaque fois pendant 2-3 minutes et reversé dans le même verre. Ensuite on remplit le verre de $\text{CH}_3\text{COONa} (\frac{1}{10}\text{N})$ jusqu'au repère et on agite le contenu.

On verse l'extrait dans des verres Erlenmeyer de 50 cc. de capacité, par doses de 5 cc. dans chaque verre, on y ajoute 3 cc. d'eau et 2 cc. exactement d'eau oxygénée à 1% et on laisse reposer pendant 30 minutes à la température de laboratoire; ensuite on ajoute dans chaque verre 3 cc. de H_2SO_4 à 10 p. c. pour inactiver la catalase et on titre avec du permanganate $\frac{1}{10}\text{N}$ l'excédent non décomposé d'eau oxygénée jusqu'à une coloration rose-clair.

Contrôle.

1. Extrait + eau, ébullition pendant 1 minute + eau oxygénée.
2. Eau + eau oxygénée.
3. Extrait + eau.

Le calcul est fait comme d'usage: la différence entre la quantité de KMnO_4 $1/10\text{N}$ dépensée pour le titrage du contrôle et celle, dépensée pour le titrage de l'expérience, donne la quantité d'eau oxygénée $1/10\text{N}$, décomposée par le volume donné d'extrait. Cette quantité est ensuite rapportée à 1 g de tissu frais ou séché.

Toute l'expérience avec 6–8 pesées dure de 2,5 à 3 heures.

~~К-4489~~

П48783

Экспериментальная Медицина

Шестьдесятый журнал



№ 6

Червень
juin

1936

La médecine
expérimentale

Держмедгизав