

Katedra i Zakład Chemii Ogólnej. Wydział Lekarski. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: doc. dr hab. Stanisław Biliński

Janusz KLIMEK

**Próba zwiększenia dokładności oraz uproszczenia techniki
oznaczania azotu aminowego metodą miedziową Pope-Stevensa**

Попытка увеличения точности и упрощения техники обозначения аминowego азота медным методом Поп-Стивенса

An Attempt at Increasing Accuracy and at Simplification of the Technique of Amino Nitrogen Determination by the Copper Method of Pope-Stevens

Określenie azotu aminowego techniką Pope-Stevensa ma zwolenników, lecz i też przeciwników (4). Jedni widzą łatwość adaptacji tej metody w pracowniach nie posiadających szerokiego asortymentu odczynników, drudzy zarzucają jej małą dokładność oraz pracochłonność. W naszej pracy postanowiono, nie naruszając strony chemicznej metody, udoskonalić technikę oznaczania azotu aminowego wg Pope-Stevensa poprzez zwiększenie dokładności oraz zmniejszenie czasu przeznaczanego na wykonanie próby. Przedstawiona praca jest kontynuacją wstępnych spostrzeżeń, wysuniętych przy okazji oznaczania grup aminowych w przesączach hodowli i antygenach *Cl. tetani* (2, 3).

MATERIAŁY I METODY

Do określenia azotu aminowego wykorzystano miedziową metodę Pope-Stevensa (5) oraz roztwór wzorcowy glicyny (0,60 mg N aminowego/ml). Zawiesinę ortofosforanu miedziowego sporządzano bezpośrednio przed użyciem mieszając roztwory — I, II i III w stosunku objętościowym 1:2:2. Roztwór I — 27,3 g $\text{Cu Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, woda destylowana do 1.000 ml; Roztwór II — 64,5 g Na_3PO_4 , 7,2 g NaOH, woda destylowana do 1.000 ml; Roztwór III — bufor boranowy 57,2 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$, 1.500 ml wody destylowanej, 100 ml N HCl, woda destylowana do 2.000 ml.

Do oddzielenia kompleksu miedziowego rozpuszczalnego od nierozpuszczalnego stosowano filtry bibułowe o średnicy 7 cm „Filtrak” Nr 389, oraz wirówkę (Laborfug—Węgry) 2.000 obr/min. Wszystkie odczynniki zastosowane w naszej pracy odpowiadały normom ch. cz. i były krajowej produkcji.

BADANIA WŁASNE

Do próbki wirówkowej wprowadzono 1 ml wodnego roztworu wzorcowego glicyny (0,60 mg N aminowego/ml) i 5 ml zawiesiny ortofosforanu sodu. Po 15 minutach wirowano przy 2.000 obr/min. przez 10 minut. 2 ml klarownego roztworu przenoszono do oddzielnego naczynia zakwaszono 2 ml CH_3COOH (lod), po czym dodawano nadmiar KJ i miareczkowano 0,01 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ wobec skrobi. Drogą rachunkową wyznaczono ilość azotu aminowego w przeliczeniu na 1 ml roztworu wzorcowego. Otrzymane wyniki dla 20 identycznych próbek przedstawiono w tab. 1 (rubr. A).

Tab. 1. Azot aminowy w mg/ml określony metodą Pope-Stevensa; A — technika wirowania, B — technika sączenia
Amino nitrogen in mg/ml determined by the method of Pope-Stevens; A — rotation technique, B — filtration technique

n	A	B
1	0,5992	0,5046
2	0,6020	0,5937
3	0,5936	0,5937
4	0,5964	0,6431
5	0,5880	0,6036
6	0,5908	0,5937
7	0,5880	0,6036
8	0,5964	0,5145
9	0,5824	0,6431
10	0,5880	0,6530
11	0,5936	0,6233
12	0,5908	0,5640
13	0,5880	0,5739
14	0,5964	0,5541
15	0,5964	0,5442
16	0,5796	0,5739
17	0,5992	0,5541
18	0,5852	0,5442
19	0,5992	0,5640
20	0,5992	0,5145
średnia	0,5926	0,5778
błąd standardowy	0,0061	0,0312
błąd względny %	1,049	5,403

W ten sam sposób wykonano próby wg oryginalnej metody Pope-Stevensa. W tym celu do 1 ml wzorcowego roztworu glicyny dodawano 5 ml zawiesiny ortofosforanu miedziowego. Po 15 minutach osad odsączano przy pomocy ilościowego sączka bibulowego. Przesącz miareczkowano j.w. w 0,01 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Otrzymane wyniki zestawiono w tab. 1 (rubr. B). W dolnej części tab. 1 pomieszczono średnią,

błąd standardowy, oraz błąd względny (1), oddzielnie dla: techniki wirowania — A i sączenia — B. Drogą rachunku statystycznego (test t-Studenta) (6), wyznaczono t (2, 16) i stwierdzono, że jest większe od wartości krytycznej (2,024) odczytanej z tablic.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Przeprowadzone badania nad metodą Pope - Stevensa wskazują, że błąd standardowy oznaczenia w technice wirowania jest mniejszy niż w przypadku sączenia przez bibułę. Również na korzyść wirowania przemawia średnia oznaczeń, która jest wyższa od średniej uzyskanej przy sączeniu. Można sądzić, że w pierwszym przypadku straty powstałe w czasie doświadczenia są niższe niż w drugim, co jak wiadomo ma zasadnicze znaczenie w ocenie każdej metody — w tym wypadku wprowadzonej modyfikacji.

Na podstawie testu t-Studenta wykazano, że t jest większe od wartości krytycznej. Z tego wynika, że zmniejszenie błędu względnego do 1% w zmodyfikowanej technice ma charakter systematyczny, a nie przypadkowy. Upoważnia to stosować opracowaną technikę na równi z innymi (4), co przy użyciu ogólnie dostępnych odczynników w metodzie Pope - Stevensa ma duże znaczenie i w wielu przypadkach może decydować o jej dodatkowych walorach. W razie konieczności wykonania dużej ilości oznaczeń, jak to ma miejsce przy badaniu materiału biologicznego, wprowadzone uproszczenia pozwalają skrócić szereg czynności. Znalazło to już potwierdzenie przy oznaczaniu azotu aminowego w przesączach hodowli *Cl. tetani* (2) oraz w białkach antygenowych *Cl. tetani* (3), jednakże bez podania oceny, przeprowadzonej modyfikacji, którą przedstawiono dopiero w obecnej pracy.

PIŚMIENNICTWO

1. Dobrowolski J.: *Chemia Analityczna*, 234—235, PZWL, Warszawa 1961.
2. Klimek J.: *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Sec. D*, **20**, 35, Lublin 1965.
3. Klimek J.: *Exp. Med. Microbiol.* **21**, 152, 1969.
4. Opieńska-Blaut J., Prasał Z.: *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Sec. D*, **15**, 117, Lublin 1959.
5. Pope C., Stevens M.: *Biochem. J.*, **33**, 1070, 1939.
6. Rokosz A.: *Wiadomości Chem.*, **10**, 27, 1959.

РЕЗЮМЕ

Обозначение аминного азота методом Поп-Стивенса дает хорошие результаты, когда для определения растворимого комплекса применяется вместо фильтрования ротация. Констатировано, что относительная ошибка единичного обозначения не превышает 1%. Модификация с успехом применялась при исследованиях белковых антигенов.

SUMMARY

The determination of amino nitrogen by the method of Pope-Stevens gave good results when rotation was used for the separation of soluble complex instead of filtration. It was stated that the relative error of single determination did not exceed 1%. The modification was applied to the investigations of protein antigens.