

## WARBURGOV APARAT\*

M. VANDEKAR i ELSA REINER

*Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb*

*(Primljeno 25. VI 1962)*

Prikaz sadržava opis i teoriju Warburgova aparata. U drugom dijelu opširnije su iznijete praktičke upute za rad kao i primjer kalibracije aparata i mjerenja aktivnosti enzima.

Manometrijske metode zauzimaju značajno mjesto među biološkim metodama zahvaljujući u prvom redu činjenici da one omogućuju mjerenje *brzine* biokemijskih reakcija s velikom preciznošću, a da pri tom iziskuju vrlo male količine biološkog materijala. Smatramo ih najprikladnijim metodama za praćenje kemijskih, biokemijskih i fotokemijskih reakcija pri kojima se razvija ili apsorbira određeni plin. Manometrijske su metode nenadomjestive pri određivanju apsorpcije kisika ili evolucije ugljičnog dioksida tkivnih rezova, izoliranih stanica ili njezinih frakcija i bile su od odlučnog značenja za razjašnjenje mehanizma staničnog disanja. Njihova se primjena proširila i na reakcije pri kojima dolazi do stvaranja ili nestajanja određene kiseline ili lužine, a to se može pratiti u prisustvu bikarbonatnog pufera. Bikarbonatni pufer nalazi se u ekvilibriju s plinskom smjesom koja sadržava ugljični dioksid, i stvaranje određene količine kiseline izazvat će evoluciju odgovarajuće količine CO<sub>2</sub>. Na taj način mogu se manometrijskim metodom proučavati mnoge hidrolitične reakcije, kao npr. katalitični raspad kolinskih estera u prisustvu kolinesteraza.

Postoje tri glavna tipa manometra:

1. Kod prvog se tipa plin drži u posudi pod *stalnim tlakom*, prilagođujući tekućinu u graduiranoj cijevi koja je spojena s posudom, a promjena volumena se očitava sa cijevi. Na takvom principu baziran je Haldaneov aparat za analizu plina.

\* Ovo je prvi članak iz serije prikaza o pojedinim metodama na području medicine rada i toksikologije koji će se od broja do broja objavljivati s ciljem da koriste praksi i pri rješavanju složenih analitičkih problema.

2. Kod drugog je tipa posuda pričvršćena na jedan kraj manometra, a drugi je kraj U-cijevi otvoren i komunicira sa zrakom. Tekućina u cijevi se prilagođava tako da održava *konstantan volumen* plina, a očitava se promjena pritiska. Iz očitane promjene pritiska na manometru lako se izračuna količina stvorenog ili apsorbiranog plina. Taj tip manometra poznat je kao Warburgov manometar, jer su ga Warburg i njegovi suradnici mnogo upotrebljavali, premda zasluga u prvom redu pripada Barcroftu i Haldaneu.

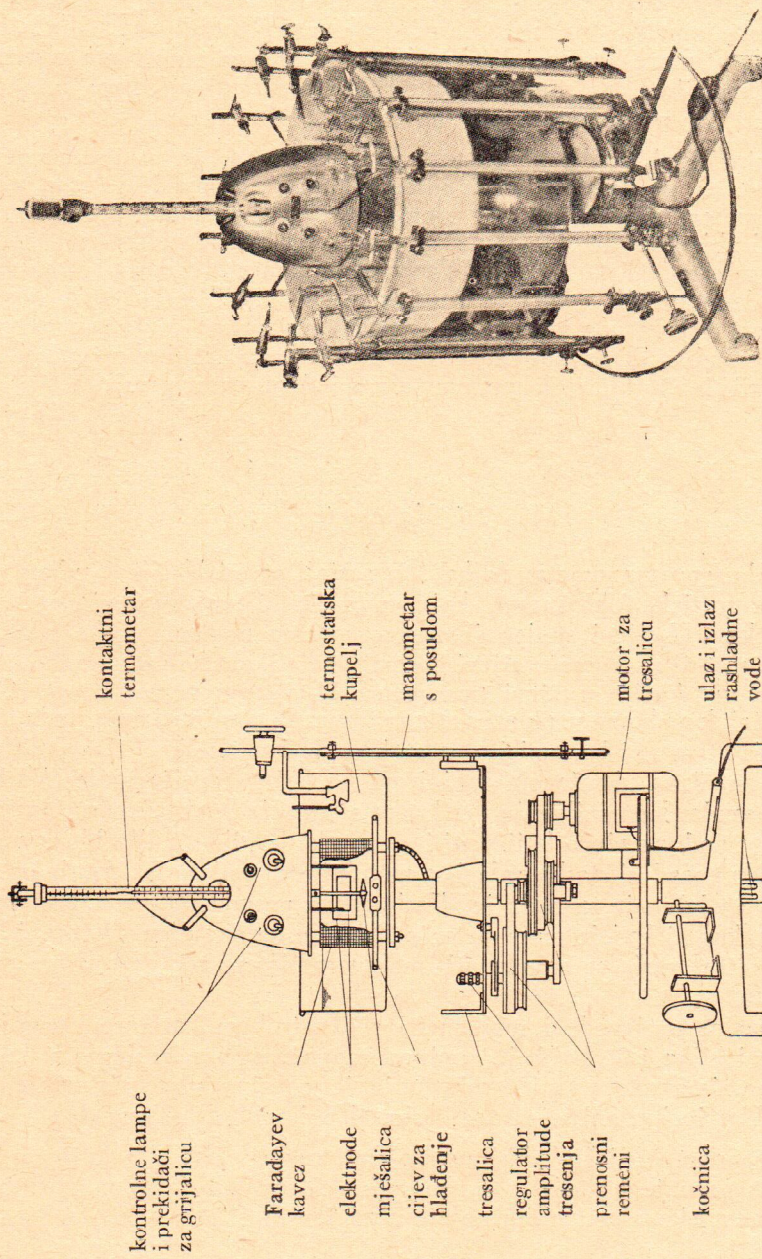
3. Treći tip manometra naziva se *diferencijalni tip* manometra. On ne radi ni pri stalnom pritisku, ni pri stalnom volumenu, već se oboje u isto vrijeme mijenja. Kod tog je oblika drugi kraj manometarske cijevi pričvršćen za drugu posudu sličnu prvoj, za razliku od Warburgova tipa gdje je drugi kraj otvoren, tj. u komunikaciji sa zrakom. Time se postizava eliminacija grešaka nastalih uslijed malenih promjena temperature itd. Taj tip manometra poznat je kao Barcroftov tip, jer ga je on usavršio, premda je taj isti princip prethodno koristio Warburg za druge svrhe.

U Toksikološkom odjelu Instituta služimo se već niz godina Warburgovom manometrijskom metodom. Ona nam služi pri proučavanju *mehanizma djelovanja otrova* kad *in vitro* istražujemo učinak određenih otrova na biološke sisteme (tkivne rezove, frakcije stanica, izolirane enzimске sisteme i sl.) ili u studiju *metabolizma otrova* kad pratimo razgradnju otrova u prisustvu određenih bioloških sistema. Warburgova manometrijska metoda pokazala se nenadomjestivom u proučavanju kinetike inhibicije kolinesteraza organofosforinim spojevima, kao i pri određivanju reaktivatorske moći reaktivatora inhibirane kolinesteraze. Ta se metoda uvodi u sve više laboratorija u našoj zemlji.

Svrha je ovog prikaza da u prvom redu posluži kao priručnik onima koji se koriste ili namjeravaju koristiti tom metodom. Zbog toga će pojedina poglavlja, a napose ona koja se odnose na praktične upute za rad, sadržavati pojedinosti koje će biti možda suviše onima koji već imaju neko iskustvo s tom ili kojom drugom manometrijskom metodom. Prikaz smo pisali na osnovu vrlo korisnih stranih priručnika (1, 2, 3) kao i na osnovu vlastitih iskustava,<sup>1</sup> i cjelokupnu materiju podijelili na ova poglavlja:

1. Opis
2. Teorija
3. Kalibracija
4. Praktične upute za rad
5. Primjer kemijske kalibracije
6. Primjer mjerenja aktivnosti kolinesteraze

<sup>1</sup> Prije pet godina obradili smo sličnu materiju u obliku skripata, a u sklopu »Seminara iz toksikologije organofosforinih spojeva«, s ograničenom nakladom.



Sl. 1.1 - Warburgov aparat (model U, firme B. Braun, Zap. Njemačka)

## 1. OPIS

Warburgov aparat sastoji se iz manometra, Warburgove posude, termostatske kupelji i tresalice. Za praćenje specijalnih biokemijskih reakcija aparat može biti snabdjeven sistemom za uvođenje plina, sistemom rasvjetnih tijela (za studij fotokemijskih reakcija), ili, npr., uređajem za električno podraživanje tkivnih rezova (4).

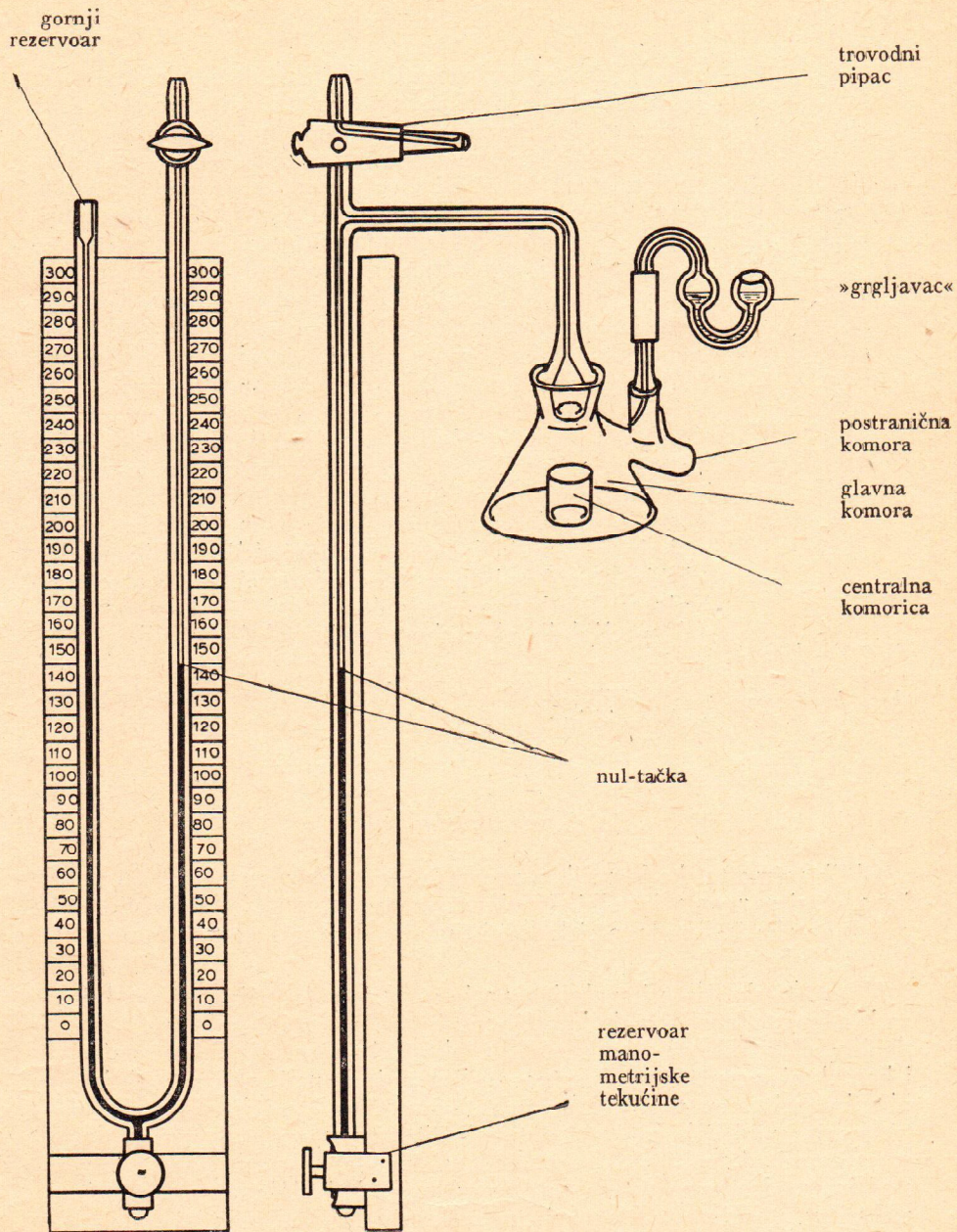
Originalni oblik Warburgova aparata sadržavao je po 6 manometara sa svake strane pačetrovinaste vodene kupelji. Svaka je posuda oscilirala u malom luku vertikalnog promjera, a jedan je motor pokretao mješalicu i obje tresalice. Posljednjih godina izvršen je veliki broj modifikacija aparata. Cirkularni tip Warburgova aparata (slika 1.1) ima okruglu vodenu kupelj, u koju se uronjava 14 ili više Warburgovih posuda. Prednost cirkularnog aparata je u tome što zauzima znatno manje prostora, a budući da se manometri mogu okretati po želji oko kupelji, možemo vršiti očitavanja svih manometara s jednog radnog mjesta.

### 1.1 Manometar

Warburgov manometar (slika 1.2) sastoji se od U-cijevi uskog unutarnjeg presjeka (oko  $1 \text{ mm}^2$ ), koje su vertikalni krakovi dugi oko 30 cm. Donji kraj U-cijevi spojen je s rezervoarom manometrijske tekućine, koji se sastoji od gumene cijevi opremljene vijkom kojim možemo podešiti razinu tekućine u cijevi manometra. U-cijev manometra pričvršćena je na stalak na kome se nalazi skala graduirana u milimetrima. Jedan kraj cijevi je otvoren i komunicira sa zrakom, a drugi se kraj dva puta prečija i završava ubrušenom spojnicom na koju se pričvršćuje Warburgova posuda. Komunikaciju tog kraka s atmosferom možemo uspostaviti preko provodnog pipca koji služi i za uvođenje plina u Warburgovu posudu. Na pozadini stalka nalazi se metalni nastavak koji pristaje na tresalicu, a udešen je tako da je Warburgova posuda potpuno uronjena u vodenu kupelj kad je manometar pričvršćen na tresalicu. Otvoreni krak manometra može se završavati malim proširenjem – gornjim rezervoarom.

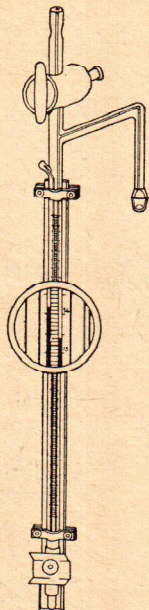
Danas se proizvode i manometri s dvostrukom kapilalom namjesto U-cijevi (slika 1.3), kojih je prednost mogućnost preciznijeg očitavanja, znatno veća čvrstoća i lakše rukovanje, jer zauzimaju znatno manje prostora. U principu oni se ne razlikuju od opisanog klasičnog tipa.

Kao manometrijsku tekućinu možemo upotrijebiti bilo koju vodenu otopinu poznate gustoće, a po mogućnosti obojenu. Sastav i priprema manometrijske tekućine opisana je u poglavlju 4.1.



Sl. 1.2 - Klasični oblik Warburgova manometra s Warburgovom posudom

## 1.2 Warburgova posuda



Sl. 1.3 - Manometar s dvostrukom kapilarnom

U Warburgovoj posudi odvija se kemijska reakcija koju možemo, po želji, započeti, na nju utjecati ili je prekinuti prelijevanjem reakcione smjese iz postranične u glavnu komoru. Ona se, u pravilu, sastoji od glavne komore i jedne ili više postraničnih komora (slika 1.4a). Glavni otvor Warburgove posude služi za dodavanje Warburgovih komponenata, a ujedno se preko njega posuda učvršćuje na ubrušenu spojnicu manometra (slika 1.2). Postranična komora je snabdjevena manjim otvorom kroz koji se u nju dodaju reakcione komponente. Taj otvor zatvara se ubrušenim čepom. Taj čep može biti snabdjeven ventilom kroz koji izlazi plin za vrijeme uvođenja plina u posudu. Postranična komora takvog je oblika da se njezin sadržaj u toku tresenja ne prelijeva u glavnu komoru. Za mjerenje respiracije biološkog materijala glavna komora posude snabdjevena je centralnom komoricom (slike 1.2 i 1.4) u koju se stavlja lužina radi apsorpcije ugljičnog dioksida. Pored opisanog standardnog oblika upotrebljavaju se Warburgove posude složenijih oblika, zavisno od specijalnih eksperimentalnih zahtjeva (slike 1.4 b, c, d).

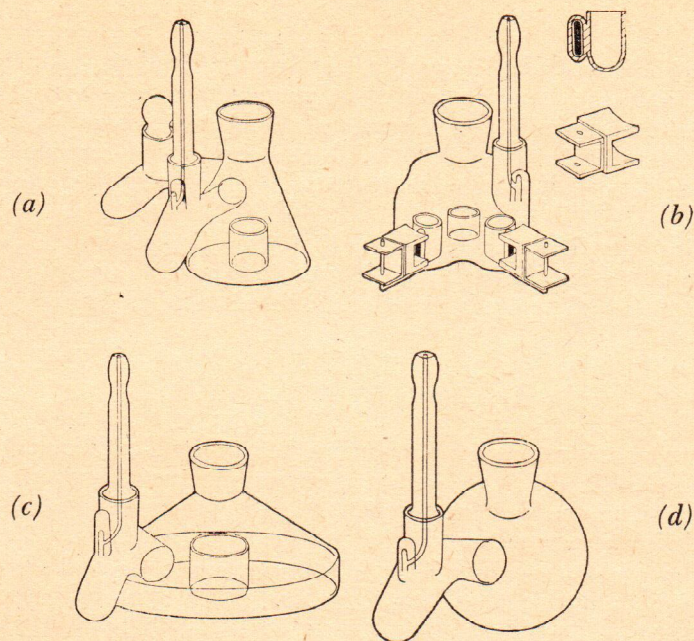
Manometar čini s Warburgovom posudom funkcionalnu cjelinu.

## 1.3 Termostatska kupelj

Oblik termostatske kupelji, a prema tome i volumen vode koju sadržava, varira prema izvedbi Warburgova aparata. Pačetvorinasti oblik sadržava oko 80 l vode, a cirkularni tipovi sadržavaju znatno manje volumene (oko 10 l).

Termostatska kupelj snabdjevena je uređajem za grijanje i uređajem za hlađenje. Zagrijavanje kupelji zasniva se u pravilu na sistemu ugrađenih električnih grijalica različitih jakosti, koje su priključene na relej i kontaktni termometar. Početno zagrijavanje kupelji vrši se maksimalnim intenzitetom, a za održavanje temperature na željenoj visini potrebno je empirijski podesiti optimalni intenzitet grijanja. Drugi način zagrijavanja kupelji vrši se pomoću elektroda. U termostatsku kupelj stavlja se određena količina natrijeva klorida koji daje kupelji potrebnu električnu vodljivost. Elektrode se napajaju izmjeničnom strujom.

Za održavanje temperature niže od sobne, kod nekih je aparata predviđen uređaj za hlađenje. On se sastoji od spiralnih metalnih cijevi,



Sl. 1.4 – Neki tipovi Warburgovih posuda: (a) posuda sa dvije postranične komore i centralnom komoricom za lužinu, (b) posuda sa dvije čašice fiksirane magnetom, (c) posuda koja omogućuje veliku kontaktnu površinu između plinske i tekuće faze i (d) posuda za rad s velikim volumenima tekuće faze

kroz koje protječe vodovodna voda ili koja druga tekućina prethodno hladena u niskotemperaturnom termostatu.

Miješanje vode u termostatskoj kupelji vrši se bilo mješalicom ili vodenom pumpom.

Kod velikih se vodenih kupelji održava postojanost temperature, u pravilu, lakše nego kod onih s malim volumenima, ali je, s druge strane, teže postići izjednačenu temperaturu u svim dijelovima kupelji, koja treba biti unutar  $0,05^{\circ}\text{C}$ . Značenje tih dvaju faktora razmotrit ćemo u poglavlju 4.9. Cirkularni tip Warburgova aparata prikazan na slici 1.1 tako je tehnički usavršen, da unatoč relativno malom volumenu vode varijacije temperature kupelji iznose – prema specifikaciji proizvođača – svega  $\pm 0,05^{\circ}\text{C}$ .

U termostatsku kupelj uronjene su Warburgove posude, ali ne i manometarska kapilara. Pretpostavlja se, međutim, da se temperatura plinske faze u dijelu manometra do 0-tačke ne razlikuje mnogo od temperature Warburgove posude. Ta aproksimacija je dopuštena s obzirom na relativno veoma mali volumen tog dijela plinske faze.

### 1.4 Tresalica

Zavisno od konstrukcije aparata tresalice su izvedene tako da omogućuju zajedničko tresenje bilo svih manometara (cirkularni tip), ili odvojeno tresenje dviju grupa manometara sa svake strane vodene kupelji (pačetvorinasti oblik). Kod nekih se aparata vrši zasebno tresenje manometara, tako da se oni mogu za vrijeme očitavanja individualno zaustavljati.

Tresalica omogućuje jednoliko mućkanje reakcione smjese u Warburgovim posudama, kako bi se osiguralo brzo uspostavljanje ravnoteže plinova između tekuće i plinske faze. Brzina tresenja i amplituda mogu se regulirati.<sup>2</sup>

## 2. TEORIJA APARATA

Warburgov aparat radi na principu konstantnog volumena. Mjerenjem promjene pritiska pri konstantnom volumenu i konstantnoj temperaturi izračuna se količina oslobođenog ili apsorbiranog plina u toku neke reakcije na osnovu plinske jednadžbe.

Već smo u opisu spomenuli da Warburgova posuda čini s manometrom funkcionalnu cjelinu. Ukupni volumen Warburgove posude i dijela manometra do nul-tačke ( $v_u$ ) sastoji se od volumena plinske faze ( $v_p$ ) i volumena tekuće faze ( $v_t$ ):

$$v_u = v_p + v_t \quad (2.1)$$

Pretpostavimo da se u Warburgovoj posudi nalazi reakciona smjesa u kojoj se oslobađa neki plin. Tekuća faza mora biti zasićena tim plinom i zato plinsku fazu – dijelom ili u cijelosti – treba sačinjavati taj plin.

Početna količina plina u plinskoj fazi određena je ovim izrazom:

$$a_1 = v_p \cdot \frac{273}{T} \cdot \frac{P-p}{P_0} \quad (2.2)$$

gdje je  $P$  početni pritisak u posudi,  $p$  je parcijalni pritisak vodene pare,  $T$  je apsolutna temperatura, a  $P_0$  je normalni pritisak.

Početna količina otopljenog plina u tekućoj fazi iznosi:

$$b_1 = v_t \cdot \alpha \cdot \frac{P-p}{P_0} \quad (2.3)$$

gdje je  $\alpha$  topljivost plina.

<sup>2</sup> Važno je za određeni reakcioni sistem unaprijed utvrditi minimalnu potrebnu brzinu tresenja i zatim je treba podesiti na onu brzinu koja isključuje utjecaj brzine tresenja na brzinu reakcije koju mjerimo.



Ako se u toku reakcije oslobodi količina plina  $x$ , a volumen plinske faze ostaje isti, poveća se pritisak u posudi za  $h$  mm manometrijske tekućine. Krajnja količina plina u plinskoj fazi prema tome iznosi:

$$a_2 = v_p \cdot \frac{273}{T} \cdot \frac{P - p + h}{P_0} \quad (2.4)$$

a krajnja količina otopljenog plina:

$$b_2 = v_t \cdot \alpha \cdot \frac{P - p + h}{P_0} \quad (2.5)$$

Količina oslobođenog plina  $x$  jednaka je razlici početne i krajnje količine tog plina u plinskoj i tekućoj fazi:

$$x = (a_2 + b_2) - (a_1 + b_1) \quad (2.6)$$

ili, uvrštavanjem jednadžbi 2.2 do 2.5:

$$x = h \cdot \left( \frac{v_p \cdot \frac{273}{T} + v_t \cdot \alpha}{P_0} \right) \quad (2.7)$$

Izraz u zagradi je konstantan za određeni plin, temperaturu, volumen tekuće faze i volumen plinske faze i zove se *konstanta Warburgove posude*:

$$k = \frac{v_p \cdot \frac{273}{T} + v_t \cdot \alpha}{P_0} \quad (2.8)$$

Poznaje li se konstanta Warburgove posude može se mjerenjem promjene pritiska  $h$  izračunati količina oslobođenog plina  $x$  u toku neke reakcije:

$$x = k \cdot h \quad (2.9)$$

Teorija Warburgova aparata vrijedi jednako radi li se o reakciji pri kojoj se plin oslobađa ili apsorbira, s time da je uobičajeno predznake za količinu plina  $x$  i promjenu tlaka  $h$  u prvom slučaju označiti pozitivno, a u drugom slučaju negativno.

Teorija aparata vrijedi jednako i onda ako je uz reagirajući plin u Warburgovoj posudi prisutan i koji drugi plin. Tako se, na primjer, može mjeriti potrošak kisika nekog tkiva, iako je u Warburgovoj posudi zrak a ne samo kisik. Budući da količina dušika u toku reakcije ostaje nepromijenjena, parcijalni tlak dušika ostaje isti, a ne mijenja se ni količina dušika u tekućoj fazi. Jedino se mijenja parcijalni tlak reagirajućeg plina, u ovom slučaju kisika, za iznos od  $h$  mm manometrijske tekućine. Prema tome, prisustvo dušika ne utječe na vrijednost

konstante Warburgove posude. To objašnjava i zašto se topljivost  $\alpha$  u jednadžbama odnosi na reagirajući plin, a ne na sve plinove prisutne u Warburgovoj posudi.

### 3. KALIBRACIJA APARATA

Kalibracijom aparata određuje se konstanta Warburgove posude,  $k$ , a to je količina plina u mikrolitrima, koja uzrokuje pri konstantnom volumenu i konstantnoj temperaturi promjenu pritiska od 1 mm manometrijske tekućine. Konstanta posude može se odrediti na tri načina.

#### 3.1 Kalibracija živom

Kod kalibracije živom izračunava se konstanta Warburgove posude iz jednadžbe 2.8. U toj jednadžbi su vrijednosti  $T$  i  $v_t$  zadane eksperimentalnim uvjetima, a topljivost plina  $\alpha$  pri određenoj temperaturi saznaje se iz odgovarajućih fizikalnih tablica. Tablica 3.1 prikazuje topljivost plinova (pri različitim temperaturama) koji se najčešće koriste. Potrebno je, prema tome, odrediti samo vrijednosti  $P_o$  i  $v_p$ .

Tablica 3.1

*Topljivost plinova (prema Dixonu (1) i Umbreitu i sur. (2))\**

Temperatura (°C)	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub>	CO	N <sub>2</sub>
10	0,038	1,194	0,020	—	0,020
15	0,034	1,019	0,019	—	0,018
20	0,031	0,878	0,018	0,023	0,015
25	0,028	0,759	0,018	0,021	0,014
30	0,026	0,665	0,017	0,020	0,013
35	0,024	0,592	0,017	0,019	0,013
37	0,024	0,567	0,017	0,018	0,012
40	0,023	0,530	0,016	0,018	0,012

\* Topljivost ( $\alpha$ ) je iskazana kao mililitri plina (pri NTT) otopljeni u ml vode pri 1 atm.

Pri 38° C  $\alpha_{CO}$  iznosi 0,55 za vodu, 0,537 za Ringerovu otopinu, 0,517 za Ringerovu otopinu koja sadržava 0,3 NHCl, 0,51 za serum.

Kod određivanja normalnog pritiska  $P_o$  u milimetrima manometrijske tekućine izmjeri se gustoća manometrijske tekućine  $D$  uobičajenim fizikalnim metodama, a  $P_o$  se zatim izračuna iz jednadžbe

$$P_o = \frac{760 \cdot 13,60}{D} \quad (3.1)$$

Volumen plinske faze  $v_p$  dobije se iz razlike ukupnog volumena i volumena tekuće faze (jednadžba 2.1). Ukupni volumen izmjeri se tako da se Warburgova posuda i dio manometra do nul-tačke ispune živom.

Najprikladniji način punjenja manometra i posude živom je ovaj: učini se oznaka na cijevi manometra oko 2 cm iznad ubrušene spojnice na koju se pričvršćuje posuda. Prazni manometar se okrene, trovodni pipac zatvori i kroz ubrušenu spojnicu manometra nalije se živa tako da ispunjava cijev manometra od nul-tačke do učinjene oznake. Živa se tada ispusti u posudu za vaganje. Manometar se vrati u normalni položaj, Warburgova posuda se ispuni živom i pričvrsti na manometar. Količinu žive podesimo tako da upravo doseže načinjenu oznaku na cijevi manometra, kada je posuda dobro fiksirana uz manometar. Ta živa se zatim doda prvoj količini žive u posudi za vaganje, izmjeri se temperatura, pa se ukupna količina izvaže.

Poznavajući tako težinu žive i njezinu gustoću pri temperaturi kalibracije, izračuna se traženi volumen  $v_u$ .

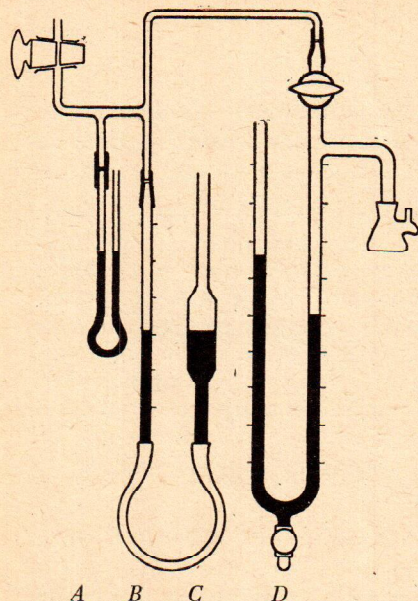
Ako ne upotrebljavamo Warburgove posude i manometre u fiksnim kombinacijama već želimo da se svaka posuda može koristiti sa bilo kojim manometrom, treba odvojeno kalibrirati Warburgovu posudu i dio manometra do nul-tačke. Prema Dickensu (5) zasebna se kalibracija provodi uz pomoć jedne dodatne Warburgove posude s ubrušenim čepom, na kojoj se nalazi kratki nastavak kapilare, slične onoj na manometru aparata. Ta dodatna posuda služi kao piknometar. Volumen tog piknometra (a) odredi se pomoću žive na uobičajeni način. Zatim se izmjeri volumen svakog manometra u kombinaciji s tim piknometrom (b) i volumen svake posude u kombinaciji s ubrušenim čepom piknometra (c). Za bilo koju kombinaciju posude i manometra ukupni volumen prema tome iznosi:

$$v_u = c + b - a \quad (3.2)$$

### 3.2 Münzer-Neumannova metoda

Princip te metode sastoji se u mjerenju promjene pritiska u Warburgovoj posudi, koju uzrokuje dodatak poznatog volumena nekog plina, na primjer zraka, pri konstantnoj temperaturi. Takvim mjerenjem određuje se ukupni volumen plinske i tekuće faze  $v_u$  pa se na osnovu jednadžbe 2.8 za određene eksperimentalne uvjete izračuna konstanta  $k$ .

Za provođenje te kalibracije treba imati dodatni uređaj (shematski prikazan na slici 3.1). Taj uređaj sastoji se iz manometra (A), kalibrirane pipete (B) i posude za niveliranje (C). Uređaj se priključuje iznad



Sl. 3.1 - Shematski prikaz za kalibraciju Münzer-Neumanovom metodom. Za tumačenje vidi tekst

Traženi volumen  $v_u$  iznosi:

$$v_u = \frac{v_x \cdot P}{h} \quad (3.3)$$

gdje je  $P$  atmosferski pritisak u mm manometrijske tekućine.

Kalibracija aparata može se, dakako, provesti i tako da se poznati volumen plina oduzme iz Warburgove posude, namjesto da se dodaje, kao što je naprijed opisano.

### 3.3 Kemijska metoda

Kemijska metoda se sastoji u evoluciji ili apsorpciji poznate količine  $x$  nekog plina kemijskom reakcijom u Warburgovoj posudi. Mjerenjem promjene tlaka  $h$  u Warburgovoj posudi uzrokovane tom kemijskom reakcijom, izračuna se konstanta posude iz jednadžbe 2.9.

Konstanta posude za ugljični dioksid dobiva se evolucijom ugljičnog dioksida pri reakciji natrijeva bikarbonata i jake kiseline. Konstanta za kisik određuje se evolucijom kisika u reakciji vodikova superoksida i kalijeva permanganata ili apsorpcijom kisika na cisteinu u prisustvu ferosulfata. Konstanta za dušik dobije se miješanjem alkalne otopine hidrazina s otopinom kalijeva dijodata. (Ta konstanta je praktički iden-

trovodnog pipca (T) Warburgova manometra (D). Warburgova posuda je priključena na Warburgov manometar i ona je u toku kalibracije prazna.

Kalibrirana pipeta nalazi se u termostatskoj kupelji kao i Warburgova posuda. Trovodni pipac se okrene tako da spaja plinsku fazu Warburgove posude s kalibriranom pipetom. U tom položaju izmjeri se tlak na otvorenom kraku Warburgova manometra i uravnoteži dodatni manometar uz pomoć posude za niveliranje. Zatim se podizanjem posude za niveliranje uvede određena količina plina u Warburgovu posudu i pipac  $T$  se zatvori. Nakon podizanja manometrijske tekućine u zatvorenom kraku manometra  $D$  do prvobitne razine očita se povećanja tlaka  $h$  na otvorenom kraku. Zatim ponovo uravnotežujemo dodatni manometar s posudom za niveliranje i očitamo na kalibriranoj pipeti volumen plina  $v_x$ , koji smo unijeli u Warburgovu posudu.

tična konstanti za kisik.) U svim navedenim reakcijama jedan je reaktant prisutan u suvišku, a drugi je reaktant standardiziran.

Prednost kemijske metode nad ostalim metodama je u tome što se ta kalibracija provodi pod eksperimentalnim uvjetima pri kojima se izvode i sami pokusi. Tom metodom u isto vrijeme provjeravamo ispravnost aparata (brtvljenje, termostatska kontrola itd.) kao i tačnost i svladavanje tehnike rada. U pravilu kalibraciju ponavljamo 3 puta i dobivene konstante se moraju podudarati unutar 1–2%.

U poglavlju 5 je detaljno opisan postupak određivanja konstante Warburgove posude za ugljični dioksid pri 37° C.

### 3.4 Konstanta Warburgove posude i njezino preračunavanje za različite eksperimentalne uvjete

Konstanta Warburgove posude je faktor kojim množimo promjenu pritiska u posudi (izraženu u mm manometrijske tekućine) da bismo dobili količinu plina (izraženu u  $\mu\text{l}$  pod normalnim uvjetima), a koji se u toku reakcije – pod određenim eksperimentalnim uvjetima – razvio ili potrošio. Iz prethodnog poglavlja smo vidjeli da konstantu Warburgove posude određujemo kalibracijskim postupkom i da se ona odnosi na Warburgovu posudu i dio manometra do nul-tačke.

Vrijednost  $k$  je konstantna za zadani skup eksperimentalnih uvjeta i mijenja se samo onda kad se ti uvjeti mijenjaju. Ako se služimo istim Warburgovim posudama pri različitim eksperimentalnim uvjetima (najčešće variramo volumen tekuće faze ili koristimo drugi plin), izračunava se za svaki skup novih uvjeta konstanta na osnovu jednadžbi iznesenih u teoriji aparata.

Pri određivanju konstante kalibracijom sa živom ili Münzer-Neumannovom metodom, određuje se ukupni volumen plinske i tekuće faze  $v_u$ , a konstanta se izračunava na osnovu jednadžbe 2.8. Kod tih metoda kalibracije nema, prema tome, teškoća pri izračunavanju konstanta za bilo koje eksperimentalne uvjete, jer se samo odgovarajuće vrijednosti  $v_t$ ,  $v_p$  i  $\alpha$  uvrste u jednadžbu. Kod određivanja konstante kemijskom metodom dobije se direktno konstanta  $k$ . Zbog toga za preračunavanje konstanta koje vrijede za druge uvjete treba najprije izračunati  $v_p$  iz jednadžbe 2.8 prema uvjetima pri kojima je kalibracija vršena. Poznavajući tako  $v_p$  i  $v_t$ , uvrste se u jednadžbu 2.8 novi eksperimentalni uvjeti i izračuna se nova konstanta.

Pored takvog načina preračunavanja konstanta ima niz pojednostavljenih metoda, osobito ako se radi o promjeni samo jednog od uvjeta rada. Postoji relativno jednostavan odnos između konstanta koje se odnose na različite volumene tekuće i plinske faze. Iskažemo li promjenu volumena tekuće faze od 1 ml sa  $\Delta$  ml iz jednadžbe 2.8, proizlazi da je:

$$\Delta \text{ ml} = k' - k = \frac{(v_p - 1000) \frac{273}{T} + a(v_t + 1000)}{P_o} - \frac{v_p \frac{273}{T} + a v_t}{P_o} \quad (3.4)$$

$k'$  se odnosi na posudu sa 1 ml tekućine više.

Prcuređenjem ta jednadžba prelazi u:

$$\Delta \text{ ml} = \frac{-1000 \frac{273}{T} + 1000 \cdot a}{P_o} \quad (3.5)$$

Prema tome  $\Delta \text{ ml}$  je nezavisan od  $v_p$  i  $v_t$  i zavisi samo od  $a$  i  $T$ . U tabelici 3.2 navedene su vrijednosti  $\Delta \text{ ml}$  za kisik i ugljični dioksid pri različitim temperaturama.

Tablica 3.2  
Vrijednosti  $\Delta_{ml}$  za kisik i ugljični dioksid (2)

Temperatura (°C)	$\Delta \text{ ml O}_2$	$\Delta \text{ ml CO}_2$
20	-0,090	-0,005
28	-0,088	-0,020
33	-0,087	-0,026
37	-0,086	-0,031
43	-0,084	-0,037

Za svako povećanje volumena tekuće faze u iznosu od 1 ml umanjuje se konstanta Warburgove posude za tabeliranu vrijednost.

Konstruirani su i različiti nomogrami koji služe za izračunavanje konstante odnosno njihovo međusobno preračunavanje (6). U pravilu, za korištenje tih nomograma treba poznavati ukupni volumen  $v_u$  i volumen tekuće faze  $v_t$ .

#### 4. PRAKTIČNE UPUTE ZA RAD

##### 4.1 Priprema manometrijske tekućine

Najčešće se upotrebljava manometrijska tekućina ovog sastava (Brodicova otopina):

23 g NaCl  
5 g natrijeva holeata (Merck)  
u 500 ml H<sub>2</sub>O  
Gustoća = 1,033  
P<sub>o</sub> = 10.000<sup>3</sup>

<sup>3</sup> Vidi jednadžbu 3.1

Toj otopini dodaje se Evanovo plavilo (200 mg/l) ili kiseli fuksin. Mogu se upotrijebiti i druge boje, no pri izboru treba biti oprezan, jer neke od njih su nestabilne i rastvaraju se u manometru.

Krebs (7) je opisao modifikaciju za pripremanje manometrijske tekućine koja ima neke prednosti. Žučne soli, koje je predložio Brodie, zamijenjene su neionskim deterdžentom »alkilaril-polietoksietanolnog tipa«. Manometrijska tekućina, koju je opisao Krebs, ima također specifičnu težinu 1,033 pri 20° C i ovog je sastava:

NaBr (anhidrični)	44 g
Stergene (ili Lissapol N)	1 g
Evanovo plavilo	0.3 g
H <sub>2</sub> O	do 1000 ml

Ako otopinu treba filtrirati, upotrijebit ćemo filter od sintrovanog stakla, jer papir za filtriranje uklanja, zbog adsorpcije, dio boje.

#### 4.2 Punjenje manometra

Za vrijeme *punjenja* držimo manometar u vodoravnom ili lagano kosom položaju. Gumeni rezervoar punimo pomoću kapaljke sve dotle dok se manometrijska tekućina ne pojavi u kapilarama manometra. Pri punjenju treba nastojati da u rezervoaru zaostane što manje zraka (pjenе). Ispunjeni rezervoar zatvaramo staklenim čepom i zatim pritiskom prsta s različitih strana na gumu rezervoara istiskujemo zrak do posljednjeg mjehurića. Dobro punjeni manometar je onaj kojemu možemo mijenjanjem pritiska na rezervoar – a kad su oba kraka manometra otvorena – podesiti manometrijsku tekućinu od 0–300 mm.

*Dodavanje* tekućine manometru može se vršiti kroz otvoreni krak manometra, ali prije treba lijevi stupac manometrijske tekućine – zatvarajući spoj sa zrakom na desnom kraku – dovesti do gornjeg rezervoara. To se smije činiti samo onda ako je gornji rezervoar manometra potpuno čist. Ne preporučuje se dodavati ili vaditi manometrijsku tekućinu pomoću injekcione igle i štrcaljke probadanjem gumenog rezervoara, jer starenjem gume probodena mjesta počinju propuštati manometrijsku tekućinu.

#### 4.3 Uklanjanje mjehurića iz kapilare manometra

Ako je stupac manometrijske tekućine u manometru prekinut zračnim mjehurićima, možemo ga ponovo sastaviti na taj način da prstom *naglo* komprimiramo gumeni rezervoar manometra i zatim *polagano* popuštamo pritisak. Ponavljajući ovaj postupak više puta, zračni se mjehurići dignu na površinu manometrijske tekućine.

#### 4.4 Čišćenje manometara

Zaostajanje manometrijske tekućine uz stijenku manometra ukazuje na onečišćenje kapilare na tom mjestu. Masnoća ili druga nečistoća u manometru uzrokuje pogrešna očitavanja, i zbog toga pri svakoj sumnji na onečišćenje manometra treba taj manometar temeljito očistiti.

Masnoću ćemo lako ukloniti iz manometra ovim postupkom: manometar se isprazni i na mjesto gumenog rezervoara stavimo gumenu cijev koja je spojena s vodenom sisaljkom. Kroz oba kraka manometra prosisava se naizmjenice aceton na taj način da jedan kraj uronjavamo u posudu s acetonom, a drugi krak u isto vrijeme začepimo prstom. Nakon acetona prosisavamo kroz manometar destiliranu vodu i najposlije pustimo da se kapilare manometra osuše strujom zraka. Ako se radi o onečišćenju koje ne možemo ukloniti na taj način, manometre treba skinuti sa stalka i ostaviti uronjene 24 sata u krom-sumpornoj kiselini ili u lužnatoj otopini kalijeva permanganata.

Manometre treba prati barem dva puta na godinu, a jedamput na godinu treba izmijeniti gumene rezervoare na svim manometrima.

#### 4.5 Čišćenje Warburgovih posuda

Warburgove posude moraju biti besprijekorno čiste. Postoje mnoge metode za čišćenje manometrijskog posuda, i njihov će izbor zavisi o reakciji i tipu biološkog sistema koji želimo proučavati. Homogenizirano tkivo često je osjetljivo na onečišćenje metalima, a, s druge strane, bakterijske su suspenzije obično neosjetljive na male količine metala, ali su izrazito osjetljive na tragove vitamina ili drugih organskih supstancija. Pri upotrebi masnih preparata posude moramo temeljito prati organskim otapalom. Ako je na dnu posude zaostala masna prevlaka može se desiti da lužina spuzne iz centralne komorice. U mnogim će slučajevima ispiranje vrućom vodom biti dovoljno za uklanjanje masnoća.

Opisat ćemo nekoliko metoda čišćenja, od kojih pri radu preparatima kolinesteraze, kao i u radu s mitokondrijima i tkivnim rezovima, najviše koristimo posljednju metodu, tj. metodu čišćenja sumpornom kiselinom.

##### *Bikromatska metoda*

a) Stavi Warburgove posude u benzin (bez olova!) da se skine masnoća ili ukloni masnoću pamučnom krpicom nakvašnom u benzin.

b) Peri vodom.

c) Stavi posude na 12 do 24 sata u otopinu za čišćenje. (Otopina za čišćenje: otopi 63 g natrijeva (ili kalijeva) bikromata grijanjem u 35 ml vode. Dodaj koncentriranu  $H_2SO_4$  do jedne litre.)



d) Odstrani otopinu za čišćenje vodom, peri u destiliranoj vodi barem 6 puta. Neki stavljaju Warburgovu posudu u razrijeđenu NaOH (5 g/l) pošto su uklonili glavninu kromne kiseline, a prije ispiranja destiliranom vodom.

#### *Metoda dušičnom kiselinom*

a) Stavi Warburgove posude u benzin na 30 minuta da se ukloni masnoća, ili to učini krpicom nakvašenom u benzinu.

b) Peri vodom.

c) Stavi posude u smjesu jednakih dijelova koncentrirane  $H_2SO_4$  i  $HNO_3$  u staklenoj posudi. Grij ovu mješavinu 30 do 60 minuta u digestoru. Hladi.

d) Ukloni kiselinu, peri nekoliko puta destiliranom vodom.

#### *Metoda deterdžentnim sredstvima*

a) Ukloni masnoću krpicom nakvašenom u bezinu.

b) Peri vodom.

c) Uroni Warburgove posude u plitku posudu koja sadržava jednu žlicu deterdženta na 4–5 l vode. Kuhaj oprezno 15 minuta. Predugo grijanje ili kuhanje ubrzava izjedanje Warburgovih posuda. Pogodna kupelj za čišćenje predstavlja cilindrična staklena posuda s bakrenom spiralom uronjenom u otopinu deterdženta; kupelj se grije parom koja prolazi kroz spiralu. Uronjene posudice mogu se grijati i u autoklavu.

d) Isperi nekoliko puta destiliranom vodom.

#### *Metoda sumpornom kiselinom*

a) Isperi Warburgove posude što vrelijom tekućom vodom.

b) Stavi posude u pocakljenu zdjelu u kojoj se nalaze 3–4 žlice sapunskog praška na 1 litru vode. Kuhaj oprezno 15 minuta.

c) Isperi dobro vrućom vodom.

d) Ispuni zasebno svaku posudu koncentriranom  $H_2SO_4$  u koju je dodana 1 žličica kalijeva permanganata na 200 ml kiseline (budi oprezan pri dodavanju permanganata u kiselinu!). Warburgove posude ispunjivaj kiselinom do brušenog grla i ostavi kiselinu u posudi 1–2 minute. (Čepove Warburgovih posuda ne uronjavamo u kiselinu, već ih nakon kuhanja u sapunskom prašku ispiramo vrelom, a zatim destiliranom vodom.)

e) Vrati kiselinu u bocu i isperi posude vrućom tekućom vodom. Ista se kiselina može upotrijebiti nekoliko puta, sve dok ne promijeni boju iz tamnozeleno u smeđu.

f) Ispalahni posude 3 puta destiliranom vodom, ocijedi i izvrnute složi na papir za filtriranje u košaricu. Ostavi sušiti preko noći ili u sušioniku na  $110^\circ C$ .

#### 4.6 Podmazivanje

Za podmazivanje ubrušenih spojnica manometara na koje se priključuju Warburgove posude, kao i za podmazivanje čepova koji zatvaraju postranične komore, upotrebljavaju se maziva koja služe za brtvljenje (anhidrični lanolin ili smjesa vazelina i parafinskog ulja). Ako je temperatura kupelji iznad sobne temperature treba 1–2 minute nakon uronjavanja Warburgovih posuda u termostatsku kupelj ponovo učvrstiti sve spojeve koji treba da brtve, tj. spoj između manometra i posude i čep na postraničnoj komori Warburgove posude.

Mazivo za podmazivanje trovodnog pipca na manometru mora biti takvo da u isto vrijeme i brtvi i omogućuje klizanje. U tu svrhu dobro će nam poslužiti maziva koja se upotrebljavaju za birete.

#### 4.7 Uvođenje plina u Warburgove posude

U mnogim pokusima sačinjava plinsku fazu umjesto zraka drugi plin ili smjesa plinova. Za te slučajeve Warburgov aparat je snabdjeven podesnim sistemom kojim se preko gumenih cijevi, a preko trovodnog pipca na manometru, uvodi plin u Warburgovu posudu. Uvođenje plina u pravilu vršimo već kad se Warburgove posude nalaze uronjene u vodenu kupelj, a upotrebom višestrukih cijevi čitava serija posuda ispunjava se željenim plinom odjednom. Pri tom je tresalica u pogonu. Plin izlazi iz Warburgove posude kroz čep postranične komore koji je opskrbljen pipcem, i samo u određenom položaju čepa taj pipac je otvoren. Da bismo mogli provjeriti da plin zaista struji kroz sve posudice, stavljamo na čep postranične komore hidraulični ventil («grgljivac») (slika 1.2). Rezervoare tog ventila ispunjavamo vodom, tako da mjehurići plina koji se javljaju pokazuju da plin struji kroz Warburgovu posudu. Potrebno je da proteče oko 1 litra plina kroz Warburgovu posudu, da bi se sav zrak sa sigurnošću istisnuo iz posude.

Kada dulje vremensko razdoblje koristimo određenu smjesu plinova, najbolje je raditi sa čeličnim bocama koje sadržavaju tu smjesu pod određenim pritiskom.<sup>4</sup> Male količine smjese plinova mogu se pripremiti u začepljenim bocama, puneći posude vodom i istiskujući mjerene količine vode plinovima po želji. Smjesa plinova istiskuje se zatim iz boce vodom i provodi kroz Warburgove posude. Ako smjesa plinova sadržava CO<sub>2</sub>, upotreba vode za istiskivanje plina promijenit će sastav plin-

<sup>4</sup> Mnoge smjese plinova, koje koristimo u radu s Warburgovim paratom, kod nas se ne proizvode. Za određivanje aktivnosti kolinesteraze pripremamo smjesu ugljičnog dioksida i dušika (5% CO<sub>2</sub> + 95% N<sub>2</sub>) na ovaj način: čeličnu bocu ispunimo sa CO<sub>2</sub> do 5 atm. pretakanjem iz druge boce u kojoj imamo CO<sub>2</sub> pod većim pritiskom. Na tih 5 atm. CO<sub>2</sub> damo u postrojenju koje puni boce dušikom nadopuniti bocu do 100 atm. dušikom. Scholländerovom metodom provjeravamo zatim koncentraciju CO<sub>2</sub> u našoj smjesi. Na sličan način mogu se proizvesti i druge smjese.

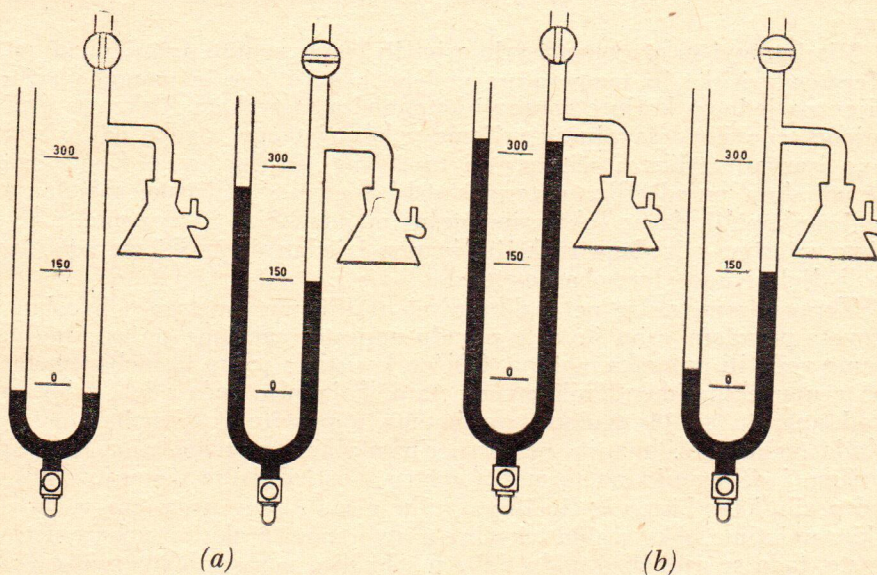
ske smjese, ako voda nije prije toga bila zasićena sa  $\text{CO}_2$  pri određenom  $\text{CO}_2$  pritisku.

Uvođenje plina u Warburgove posude vršimo pod tlakom od približno 200 mm manometrijske tekućine, i ono traje obično 5 minuta. Po završenom uvođenju plina zatvara se trovodni pipac manometra i ventil na čepu postranične komore. U isto vrijeme možemo podesiti manometrijsku tekućinu tako da iskoristimo što veći dio skale na manometru za očitavanja (vidi poglavlje 4.8).

#### 4.8 Nul-tačka i očitavanje pritiska pošto je manometrijska tekućina prešla graduiranu skalu

Za nul-tačku dobro je izabrati onu koja će omogućiti maksimalno iskorištenje graduirane skale. Kad mjerimo potrošak plina prikladna je tačka na 250 mm, a kad mjerimo evoluciju plina prikladna je tačka na 50 mm. Jasno je da kalibracija manometra mora uvijek biti vršena do nul-tačke, tj. u prvom slučaju do 250 mm, a u drugom do 50 mm skale.

Budući da je mnogo jednostavnije vršiti kalibraciju samo za jednu nul-tačku, služimo se Cohenovom metodom koja omogućuje iskorištenje cijele skale manometra za oba slučaja, tj. pri mjerenju potroška kao i evolucije plina, a da se pri tom nul-tačka nalazi na sredini kraka (na 150 mm). Ta metoda shematski je prikazana na slici 4.1. Za mjerenje



Sl. 4.1 – Podešavanje manometrijske tekućine za maksimalno iskorištenje graduirane skale pri pokusima apsorpcije (a) i evolucije (b) plina

potroška plina spustimo manometrijsku tekućinu do blizu dna skale, pri čemu je trovodni pipac otvoren. Trovodni pipac zatim zatvorimo i podešavanjem manometrijske tekućine na nul-tačku u zatvorenom kraku porast će tekućina u otvorenom kraku manometra do blizu vrha graduirane skale. Za mjerenje *evolucije* plina vršimo obratni postupak: s otvorenim trovodnim pipcem dignemo manometrijsku tekućinu do blizu vrha graduirane skale. Trovodni pipac zatvorimo, a podešavanjem manometrijske tekućine na nul-tačku spustit će se tekućina u otvorenom kraku do blizu dna skale.

Ako unatoč gornjem postupku – zbog velike količine apsorbiranog odnosno stvorenog plina u toku reakcije – nivo manometrijske tekućine pređe graduiranu skalu, možemo Voglerovim postupkom (8) očitati pritisak u posudi na ovaj način: manometrijsku tekućinu podešimo tako da se stupac u otvorenom kraku nalazi na skali. Time se tekućina u zatvorenom kraku udaljila od nul-tačke za  $e$  milimetara. Zabilježimo očitavanje na otvorenom kraku ( $h_1$ ). Zatim podešimo manometrijsku tekućinu u zatvorenom kraku na udaljenost od  $2e$  milimetra od nul-tačke i zabilježimo očitavanje ( $h_2$ ) na otvorenom kraku. Razliku  $h_1 - h_2$  dodamo (pri razvijanju plina) odnosno oduzmemo (pri apsorpciji plina) očitavanju  $h_1$  da bismo dobili stvarni pritisak u Warburgovoj posudi, tj. onaj kad bi manometrijska tekućina u zatvorenom kraku bila na nul-tački.

#### 4.9 Značenje i funkcija termobarometra

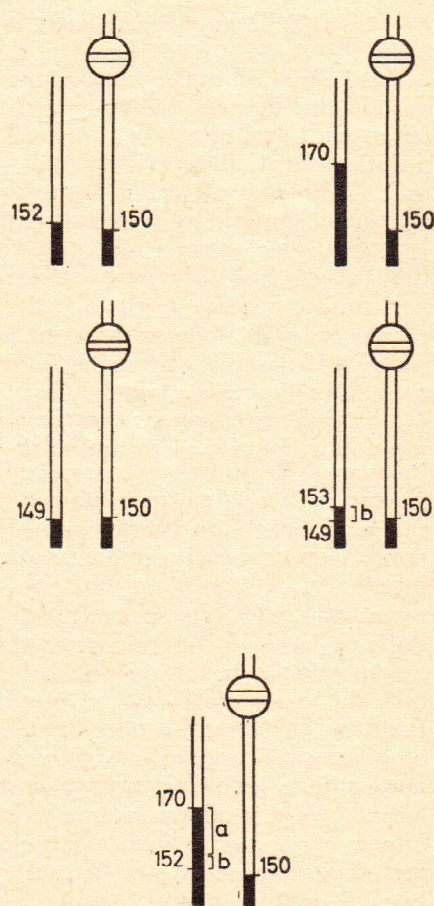
Warburgovi su manometri vrlo osjetljivi na neznatne promjene atmosferskog pritiska ili temperature vodene kupelji, jer je manometarska cijev na jednom kraju otvorena i komunicira sa zrakom. Takve se promjene redovito dešavaju za vrijeme pokusa i mogu u roku od jednog sata izazvati razlike u očitavanju od 15–20 mm, ili čak i više. Zbog toga je potrebno, pored efikasne termostatske kontrole i efikasnog miješanja vodene kupelji, da uz »eksperimentalne manometre«, tj. manometre kojima mjerimo određenu reakciju, imamo i jedan dopunski manometar, koji djeluje kao »termobarometar«.

Termobarometar se ne razlikuje od ostalih manometara s Warburgovom posudom, osim što se u posudu umjesto reakcione smjese stavlja samo voda ili puferska otopina. Obično koristimo jedan termobarometar za grupu eksperimentalnih manometara, koja nije veća od 6, tako da kod aparata sa 14 manometara imamo u pravilu 2 termobarometra. Kada vršimo očitavanja na eksperimentalnim manometrima, uvijek vršimo i očitavanja na termobarometru. Posljednje se očitavanje odbija od prvih, kako bismo isključili pogreške nastale zbog promjena u vanjskim uvjetima. Ako razina tekućine u otvorenom kraku termobarometra raste, tada se radi ili o padu tlaka u sobi ili o porastu temperature vodene kupelji. Pad razine manometrijske tekućine u termobarometru uzrokovan je obrnutim učincima.

Jasno je da nije potrebno poznavati kontante ovog manometra, jer je promjena tlaka izazvana promjenom temperature jednog zatvorenog plinskog volumena jednaka za bilo kakav volumen Warburgove posude. Isto tako, budući da svaka promjena u atmosferskom pritisku djeluje jednako na otvorenom kraku svih manometara, sve će promjene utjecati na očitavanje svih instrumenata na isti način, makar su njihove Warburgove posude različitog volumena.

Slika 4.2 ilustrira funkciju termobarometra. Početno očitavanje na eksperimentalnom barometru iznosilo je 152 mm, a na termobarometru 149 mm. Deset minuta kasnije očitavanje na eksperimentalnom barometru iznosilo je 170 mm, a na termobarometru 153 mm. Porast tlaka u termobarometru (b) bio je uzrokovan ili povećanjem temperature vodene kupelji, ili padom atmosferskog pritiska. Porast tlaka na eksperimentalnom barometru imao je dva uzroka: razvijanje plina u Warburgovoj posudi (a) i promjenu temperature kupelji i atmosferskog pritiska (b). Prema tome, porast očitavanja na termobarometru se odbija od zapaženog porasta tlaka u eksperimentalnom barometru. Pri pokusima gdje mjerimo apsorpciju plina vršit ćemo korekciju u obrnutom smislu.

Dva faktora su od velikog značenja za rad Warburgova aparata u odnosu na vodenu kupelj i njezinu termostatsku kontrolu: prvi je održavanje temperature na željenoj tački, a drugi je održavanje jednolike temperature unutar cijele kupelji. Navest ćemo dva primjera iz kojih se vidi da je drugi faktor, tj. efikasno miješanje vode u kupelji pače važniji od prvog: pretpostavimo da je u cijeloj kupelji temperatura *jednoliko rasprostranjena*, ali ona za vrijeme pokusa opada za  $1^{\circ}\text{C}$  ispod zadane temperature. Termobarometar je reagirao na ovu promjenu temperature i glavna pogreška izračunanog rezultata proizaći će zbog upotrebe pogrešnog faktora za Warburgovu posudu. Konstanta War-



Sl. 4.2 - Shematski prikaz upotrebe termobarometra.  
Za tumačenje vidi tekst

burgove posude je, naime, funkcija temperature, ali pogreška će biti relativno malena, jer pri padu temperature od npr. 28° C na 27° C konstanta na O<sub>2</sub> se mijenja svega za 0,3%. Pretpostavimo drugi slučaj. Temperatura kupelji nije jednoliko rasprostranjena i razlika u temperaturi termobarometra i eksperimentalne Warburgove posude iznosi 1° C. Zbog te razlike u temperaturi eksperimentalni manometar će pokazati pritisak koji je uvećan odnosno umanjen za toliko koliko odgovara količini od 33 μl plina na svakih 10 ml plinske faze. Takav artefakt unosi veoma veliku pogrešku u konačni rezultat.

#### 4.10 Dodavanje reakcionih komponentata u toku pokusa

Za dodavanje reakcionih komponentata u toku pokusa Warburgove su posude snabdjevene sa jednom, dvije ili više postraničnih komora. Pre-takanjem tekućine iz postranične komore u glavnu možemo po želji započeti, utjecati ili prekinuti reakciju koja se zbiva u Warburgovoj posudi. Pošto smo materijal iz postranične posude prelili, potrebno je postraničnu komoru još 2–3 puta isprati sadržajem glavne komore prelijevanjem amo-tamo, i na kraju vratimo sav sadržaj u glavnu komoru. Bez takvog ispiranja ne postiže se kvantitativan prenos materijala iz postranične komore u glavnu. Pri vađenju manometra iz kupelji treba prstom začepiti otvoreni kraj manometra. Time ćemo spriječiti da kontrakcija ili širenje plina zbog promjene temperature usiše odnosno potisne manometrijsku tekućinu.

Postraničnu komoru ne smijemo ispuniti tekućinom do kraja. U komoru kapaciteta od 1 ml najbolje je dodavati 0,5 ml ili manje sadržaja. Radimo li Warburgovim posudama malog volumena, ne treba stavljati u postraničnu komoru volumene veće od 0,25 ml. Na taj ćemo način spriječiti neželjeno prerano prelijevanje sadržaja u glavnu komoru, a pored toga omogućit ćemo da se brže postigne ravnoteža između plinske i vodene faze u postraničnoj komori. Desi li se da te dvije faze nisu u ravnoteži, naglo će se evoluirati ili apsorbirati plin pri prelijevanju sadržaja postranične komore u glavnu.

Isto tako, dobro je prilagoditi sastav otopine u postraničnoj komori tako da se ona razlikuje od otopine u glavnoj komori samo u jednom faktoru. Tako npr. za određivanje aktivnosti kolinesteraze pripremamo otopine supstrata (kojima punimo postraničnu komoru) u bikarbonatnom puferu jednakog sastava onome u kojem je suspendiran preparat kolinesteraze u glavnoj komori. Isto tako pripremaju se i otopine inhibitora, u pravilu, u bikarbonatnom puferu jednakog sastava. Prema tome, dodavanje supstrata ili inhibitora enzimu koji se nalazi u glavnoj komori mijenja sastav otopine u glavnoj komori samo za jednu komponentu.

Posudicama koje nemaju dovoljan broj postraničnih komora mogu se dodati »Keilinove čašice« koje pomoću male kvačice od stakla ili pla-

tinske žice povješamo na rub centralne komorice. Opreznim potresanjem one se mogu otkvačiti s ruba, i na taj će se način sadržaj čašice izliti u glavnu komoru. Dixon je opisao mogućnost dodavanja više reakcionih komponenata, koristeći dvije »Keilinove čašice« s kukama različite dužine: pri manje doziranom potresanju izvrnut će se ona s kraćom kukom, a tek kod jačeg potresanja druga.

Pri pokusima u kojima želimo utjecati na reakciju a da pri tom ne moramo vaditi manometar s Warburgovom posudom iz kupelji radi prelijevanja sadržaja, koristimo Warburgove posude snabdjevene magnetom, a umjesto postranične komore u glavnoj se komori nalazi staklena čašica s utaljenom željeznom kotvom (slika 1.4 b). Povlačenjem klopca odstranjuje se magnet i čašica se prelijeva zbog trešnje manometra.

Često želimo punjenje Warburgovih posuda – napose ako se radi o nestabilnom enzimskom preparatu ili nestabilnoj kojoj drugoj komponenti – izvršiti u što kraćem vremenskom roku. U tom slučaju služimo se tuberkulinskom pipetom (slika 5.1), koja omogućuje brzo pipetiranje određene količine enzimskog preparata u Warburgovu posudu. Tuberkulinska pipeta pokazala se naročito podesnom u radu s viskoznom materijalom, kao što je krv, homogenati tkiva i sl. Kalibracija i rad s tuberkulinskom pipetom opisani su u poglavlju 5.

## 5. PRIMJER KEMIJSKE KALIBRACIJE

U ovom primjeru opisat ćemo određivanje konstante Warburgove posude za ugljični dioksid (9) pri 37° C i za volumen tekuće faze od 2,0 ml. Dobivenu konstantu možemo izravno primijeniti za izračunavanje rezultata mjerenja aktivnosti kolinesteraze i drugih enzima ako su uvjeti ove kalibracije i uvjeti mjerenja aktivnosti enzima jednaki. Za druge uvjete rada ili drugi plin treba preračunati dobivenu konstantu na način opisan u poglavlju 3.4.

### 5.1 Princip metode

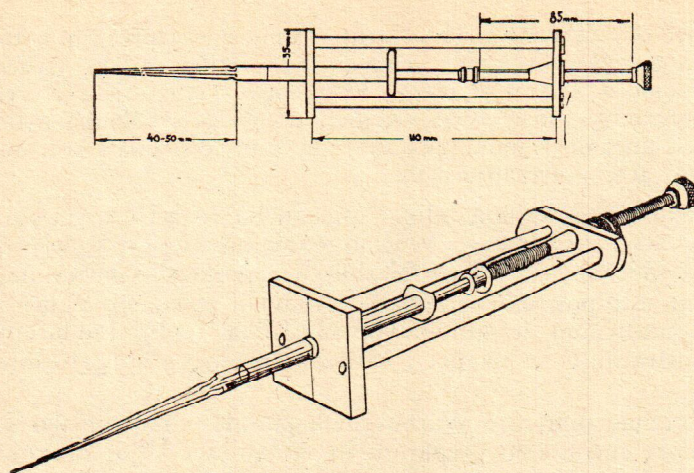
Dodavanjem poznate količine sumporne kiseline bikarbonatnom puferu kojega ima u suvišku, izluči se iz pufera poznata količina ugljičnog dioksida koju mjerimo.

### 5.2 Materijal

Bikarbonatni pufer:  $\text{NaHCO}_3$  (0,0357 M);  $\text{NaCl}$  (0,164 M)

Plinska smjesa:  $\text{CO}_2$  (5 vol.%) ;  $\text{N}_2$  (95 vol.%).

Kiselina: standardizirana  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0,05 N).



Sl. 5.1 - Tuberkulinska pipeta

Mikropipeta volumena 0,200 ml. Namjesto mikropipete može služiti kalibrirana tuberkulinska pipeta (slika 5.1), koja se sastoji od metalnog okvira s vijkom pričvršćenim na tuberkulinsku pipetu. Tuberkulinska pipeta je produžena na vrhu staklenom kapilarom, koja je na kraju zašiljena. Metalni vijak se namjesti tako da pipeta prima 0,2 ml tekućine. Tačan volumen tekućine se odredi vaganjem vode koju sadržava tuberkulinska pipeta (to ponavljamo 3-5 puta). Poznajemo li gustoću vode pri temperaturi vaganja izračunamo volumen. Kod upotrebe pipete treba paziti da u pipetu ne uđu mjehurići zraka i zbog toga pri prenošenju sadržaja pipete u Warburgovu posudu vrh pipete treba uroniti u tekućinu.

### 5.3 Postupak

U glavnu komoru Warburgove posude odmjeri se 1,8 ml bikarbonatnog pufera, a u postraničnu komoru 0,2 ml sumporne kiseline. Zatim se u posudu uvodi plinska smjesa 5 min., i za to vrijeme je tresalica aparata u pogonu. Nakon završenog uvođenja plinske smjese i uspostavljanja toplinske ravnoteže (10 min.) izmjerimo pritisak u posudama koje kalibriramo i u termobarometru. Mjerenje pritiska ponavlja se 4 puta u razmacima od 5 min. U tim razmacima tresalica aparata je u pogonu. Zatim prelijemo kiselinu iz postranične u glavnu komoru, pa ponovo 4 puta očitamo pritisak.<sup>5</sup> Razlika aritmetičkih sredina prvih i drugih

<sup>5</sup> Očitavanja se moraju nakon korekcije termobarometrom među sobom dobro podudarati. U protivnom slučaju nije postignut termoekvilibrij ili manometar nedovoljno brtvi.



očitanja je vrijednost  $h$  u jednadžbi 2.9. Vrijednost  $x$  u istoj jednadžbi dobijemo ovako:

$$x = c \cdot v \cdot v' \quad (5.1)$$

gdje je  $c$  normalitet sumporne kiseline,  $v$  je volumen kiseline u posudi iskazan u mikrolitrima, a  $v'$  je volumen ugljičnog dioksida u mikrolitrima pod normalnim uvjetima, koji odgovara  $\mu\text{l}$  1 N sumporne kiseline.

Tablica 5.1  
Kemijaska kalibracija Warburgove posude.  
(Izvadak iz laboratorijskog dnevnika)

	Očitavanja na manometru kojeg posudu kalibriramo (mm)	Očitavanja na termobarometru (mm)
prije dodavanja $\text{H}_2\text{SO}_4$	102 102	149
	103 102	150 —1
	103 101	151 —2
	104 101	152 —3
aritmetička sredina: 101,5		
nakon dodavanja $\text{H}_2\text{SO}_4$	207 202	154 —5
	208 202	155 —6
	208 202	155 —6
	209 203	155 —6
aritmetička sredina: 202,3		

$$h = 202,3 - 101,5 = 100,8$$

Za ilustraciju smo u tablici 5.1 prikazali izvod iz laboratorijskog dnevnika kalibracije jedne Warburgove posude. U prvoj koloni navedena su očitavanja pritiska posude koju kalibriramo; u koloni pored nje ta su očitavanja korigirana na osnovi promjena pritiska u termobarometru. Korekcije se vrše prema prvom očitavanju termobarometra. Predznak »minus« u drugoj koloni termobarometra označuje da tu vrijednost treba odbiti. (Da je pritisak u termobarometru padao, vršili bismo pribrajanje.)

Standardiziranjem sumporne kiseline odredili smo njezin normalitet ( $c = 0,05312$ ), a kalibracijom tuberkulinske pipete odredili smo njezin volumen ( $v = 204,9 \mu\text{l}$ ).  $v'$  je dobiven na ovaj način: 1000 ml 1N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ekvivalentno je sa 44,010 g  $\text{CO}_2$ . Volumen jednog mola  $\text{CO}_2$  pri normalnim uvjetima iznosi:

$$\frac{44,010}{1,9768} = 22,263 \text{ l}$$

gdje je nazivnik gustoća CO<sub>2</sub>. Odavde izlazi da je

$$1 \mu\text{l } 1\text{N H}_2\text{SO}_4 \cdot 22,263 \mu\text{l CO}_2 \text{ pri NTT}$$

a to je upravo *v'*. Uvrštavanjem u jednadžbu 5.1 dobije se

$$x = 0,0313 \cdot 204,9 \cdot 22,263 = 242,36$$

pa prema tome konstanta Warburgove posude iznosi (jedin. 2.9):

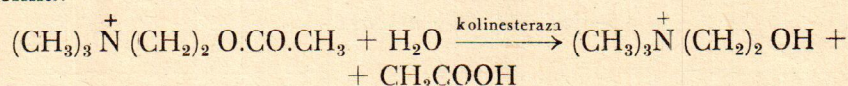
$$k = \frac{x}{h} = \frac{242,36}{100,8} = 2,409$$

## 6. PRIMJER ODREĐIVANJA AKTIVNOSTI KOLINESTERAZA

Opisat ćemo određivanje aktivnosti serumske kolinesteraze prema acetilkolinu kao supstratu pri 37° C i pH 7,7. Pregled metoda određivanja aktivnosti kolinesteraze objavljen je u jednom ranijem broju ovog časopisa (12).

### 6.1 Princip metode

Hidrolizom supstrata kolinesteraze nastaje kiselina i ester. Ako je supstrat kolinesteraze acetilkolin, nastaje hidrolizom kolin i octena kiselina:



Enzimsku hidrolizu mjerimo u bikarbonatnom puferu zasićenom ugljičnim dioksidom i zbog toga će se u toku reakcije oslobađati ugljični dioksid. Količina oslobođenog ugljičnog dioksida proporcionalna je količini hidroliziranog supstrata.

Na toj reakciji zasniva se manometrijska metoda određivanja aktivnosti kolinesteraze, koju je razradio Ammon (10) a modificirali Aldridge i Davison (11).

### 6.2 Materijal

Pufer: NaHCO<sub>3</sub> (0,0357 M); NaCl (0,164 M); MgCl<sub>2</sub> (0,04 M)

Plinska smjesa: CO<sub>2</sub> (5 vol.%) ; N<sub>2</sub> (95 vol.%)

Supstrat: acetilkolin klorid (0,0276 M) otopljen u puferu.<sup>6</sup>

<sup>6</sup> Otapanjem jedne ampule acetilkolinklorida od 0,1 g u 2 ml pufera dobijemo gore navedenu molarnu koncentraciju.

Preparat kolinesteraze: 20% otopina defibriniranog konjskog seruma u puferu.

### 6.3 Postupak

U glavnu komoru Warburgove posude odmjerimo 1,6 ml pufera i 0,2 ml preparata kolinesteraze, a u postraničnu komoru 0,2 ml supstrata. Zatim se u posudu uvodi plinska smjesa 5 min., za koje vrijeme je tresalica aparata u pogonu. Nakon uspostavljanja toplinske ravnoteže prelijemo supstrat iz postranične komore u glavnu. Očitavanja započinjemo 10 min. kasnije – pošto se uspostavio potrebnii ekvilibrij. U pravilu vršimo očitavanja svakih 5 min. u ukupnom vremenskom periodu od pola sata. U intervalima između mjerenja tresalica aparata je u pogonu.

### 6.4 Izračunavanje aktivnosti enzima

Ako su eksperimentalni uvjeti takvi da je količina oslobođenog ugljičnog dioksida (a ta odgovara povećanju tlaka u Warburgovoj posudi  $h$ ) linearna funkcija vremena  $t$ , tada se reakcija može prikazati pravcem koji prolazi ishodištem:

$$h = b \cdot t \quad (6.1)$$

Budući da je aktivnost enzima definirana kao količina hidroliziranog supstrata u jedinici vremena, njegova aktivnost odgovara nagibu pravca  $b$  u jednadžbi 6.1. Ako je razlika

$$t_2 - t_1 = t_3 - t_2 = t_4 - t_3 = \dots = \Delta t$$

a broj mjerenja  $n$  paran, nagib pravca koji prolazi ishodištem je definiran na osnovu skraćene regresijske analize pravca ovom jednadžbom (13, 14):

$$\text{za } n = 2 \quad b = \frac{h_2 - h_1}{\Delta t} \quad (6.2)$$

$$\text{za } n = 4 \quad b = \frac{3(h_4 - h_1) + (h_3 - h_2)}{\Delta t (3^2 + 1^2)} \quad (6.3)$$

$$\text{za } n = 6 \quad b = \frac{5(h_6 - h_1) + 3(h_5 - h_2) + (h_4 - h_3)}{\Delta t (5^2 + 3^2 + 1^2)} \quad (6.4)$$

i tako redom.

Izračunavanjem nagiba pravca  $b$  dobivamo aktivnost kolinesteraze iskazanu u *milimetrima* manometrijske tekućine na minutu. Kako bismo aktivnost iskazali u *mikrolitrima* na minutu treba dobiveni rezultat  $b$  pomnožiti s konstantom Warburgove posude. Tako izračunana aktiv-



Tablica 6.1  
 Određivanje aktivnosti kolinesteraze  
 (Izvadak iz laboratorijskog dnevnika)

Vrijeme očitavanja (min.)	Očitavanja na eksperimentalnom manometru (mm)			Očitavanja na termobarometru (mm)	
0	135			158	
5	149	15	15	157	+1
10	163	14	29	157	0
15	177	16	45	155	+2
20	192	14	59	156	-1
25	208	15	74	157	-1
30	222	15	99	156	+1

Aktivnost kolinesteraze, iskazana u  $\mu\text{l CO}_2/\text{min}$ , iznosi:

$$b \cdot k = 3,251 \cdot 1,879 = 6,109 \mu\text{l CO}_2/\text{min}$$

a aktivnost kolinesteraze iskazana u  $\mu\text{l CO}_2/\text{min/ml}$  seruma iznosi:

$$\frac{6,109}{0,04} = 15,28 \mu\text{l CO}_2/\text{min/ml seruma.}$$

#### Literatura

1. Dixon, M.: Manometric Methods, University Press, Cambridge, 1951.
2. Umbreit, W. W., Burris, R. H. i Stauffer, J. F.: Manometric Techniques, Burgess Publishing Co., Minneapolis, 1957.
3. Lasker, H.: Manometry u Long C: Biochemists' Handbook, E. & F. N. Spon Ltd., London, 1961.
4. McIlwain, H.: Biochemistry and the Central Nervous System, J. & A. Churchill Ltd., London, 1959.
5. Dickens, F.: Volume Calibration of Apparatus with Standard Ground Joints, Especially Warburg Manometers, Biochem. J., 48 (1951) 385.
6. Dixon, M.: Improved Nomograms for Manometer Constants, Biochem. J., 48 (1951) 575.
7. Krebs, H. A.: Improved Manometric Fluid, Biochem. J., 48 (1951) 240.
8. Uogler, K. G.: J. Gen. Physiol., 26 (1942) 103, cit. (2).
9. Aldridge, W. N.: Usmeno saopćenje.
10. Ammon, R.: Die Fermentative Spaltung des Acetylcholins, Arch. ges. Physiol., 233 (1933) 486.
11. Aldridge, W. N. i Davison, A. N.: The Inhibition of Erythrocyte Cholinesterase by Tri-esters of Phosphoric Acid, Biochem. J., 51 (1952) 62.

12. *Reiner, Elsa*: Kolinesteraze. Biokemijske karakteristike i metode odredivanja aktivnosti, Arh. hig. rada, 9 (1958) 25.
13. *Aldridge, W. N., Berry, W. K. i Davies, D. R.*: Simplified Calculation, Suitable for Routine Use, of Linear Regression, Nature, 164 (1949) 925.
14. *Youden, W. J.*: Statistical Methods for Chemists, J. Wiley & Sons, Inc., London-New York, 1951.

*Summary*

WARBURG APPARATUS

The description and theory as well as methods of calibration of the Warburg apparatus are given. The review includes a detailed description of laboratory techniques and an example of calibration of the apparatus and determination of the enzyme activity.

*Institut for Medical Research  
incorporating the Institute of Industrial Hygiene,  
Zagreb*

*Received for publication  
June, 25, 1962.*