

ŠTÚDIUM HARDEN—YOUNGOVHO EFEKTU (III) PAPIEROVÁ CHROMATOGRAFIA FOSFOREČNÝCH ESTEROV CUKROV

KAROL TOMÁŠEK

Katedra technickej mikrobiológie a biochémie Chemickej fakulty
Slovenskej vysokej školy technickej v Bratislave

Od roku 1949, keď Hanes a Isherwood [1] prvýkrát stanovovali fosforečné estery cukr v (FEC) chromatograficky, bola metodika na určovanie týchto látok široko rozpracovaná [2, 3, 4, 5, 6, 7]. V princípe všetky metódy oddeľujú FEC chromatograficky na papieri, hydrolyzujú ich chemicky alebo enzymaticky a identifikujú ich fosforečnú alebo cukornú zložku. Metodika je veľmi komplikovaná a nebola na prvýkrát vypracovaná.

Hanes a Isherwood [1] navrhli sedem rozpúšťadlových sústav a molybdénové detekčné činidlo. Škvrny FEC vyvolávali teplom (85 °C) a sírovodíkom. Benson a spolupracovníci [2] identifikovali FEC pomocou označeného uhlíka a navrhli benzidínové detekčné činidlo. S označeným uhlíkom pracoval aj Charalampous [3]. Eggleston [4] používal rádioaktívny fosfor. Bandurski a Axelrod [5] využili na oddelenie FEC výhody dvojrozmerovej chromatografie. Škvrny FEC vyvolávali UV-svetlom o vlnovej dĺžke 2537 Å. Doman a Kagan [2] a neskoršie Fletcher a Malpress [6] vypracovali metódu enzymatickej hydrolyzy FEC alkalicou črevnou fosfatázou. Wade a Morgan [7] použili ako detekčné činidlo zmes FeCl_3 a kyseliny sulfosalicylovej. FEC sa objavili ako biele škvrny na fialovom pozadí. Niektorí autori, napr. Dulberg [8], pre obťažnosť neodporúčajú stanovovať FEC chromatograficky priamo, ale hydrolyzujú ich za štandardných podmienok a vzniknuté cukry stanovujú chromatograficky.

Rozpúšťadlové sústavy navrhnuté v priebehu vývoja metodík väčšinou obsahujú buď silnú kyselinu, alebo zásadu [1, 2, 4, 5, 9, 10, 11, 12]. Pri papierovej chromatografii FEC často spôsobuje ťažkosti aj úprava papiera [1, 2, 4, 13, 14] a dokonalé nasýtenie papiera v komore [1, 5].

Z mnohých uvádzaných metód a spôsobov úpravy, ktoré sme preskúšali, vybrali sme najvhodnejšiu pre naše podmienky a v podrobnostiach sme ju upravili. Vypracovanú metódu sme použili na stanovenie kontroly čistoty FEC a sledovanie Harden—Youngovho efektu.

Experimentálna časť

Úprava vzoriek

Čisté vzorky FEC sme pripravili metódou uvedenou v [15]. Fruktozo-6-fosfát sme pripravili hydrolyzou fruktozo-1,6-difosfátu v N-HCl pri 100 °C trvajúcou 5 minút. Anorganický fosforečnan a zvyšok fruktozo-1,6-difosfátu sme odstránili zrážaním octanom bárnatým. Po odfiltrovaní zrazeniny sme k filtrátu pridali 4 objemy etanolu a vy-zrážanú bárnatú soľ sme odfiltrovali, premyli alkoholom a vysušili v exsíkátore.

Bárnaté soli FEC sa rozpúšťali v $n\text{-HCl}$ a ióny Ba^{2+} sa zrážali Na_2SO_4 [15]. Sodné alebo draselné soli FEC sa rozpúšťali v destilovanej vode. Pri vzorkách z prirodzeného materiálu sa bielkoviny vyzrážali rovnakým objemom 10 % kyseliny trichlóroctovej. Niekedy sa vzorky rozdeľovali aj na frakcie podľa Umbreita [16].

Výber a úprava papiera

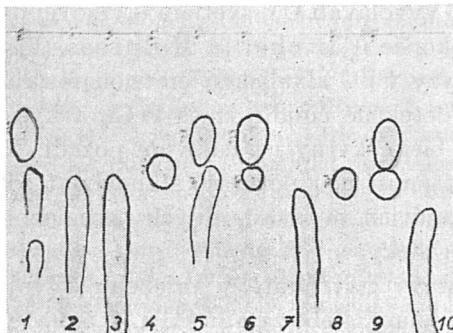
Najčastejšie sme používali papier Whatman 1.

Pred chromatografovaním FEC treba papier zbaviť všetkých nečistôt, ktoré spôsobujú na chromatograme poruchy (šmuhy a škvrny na štarte) a sťažujú i oddeľovanie. Preskúšali sme rozličné v literatúre opísané úpravy papiera [1, 2, 4, 13, 14].

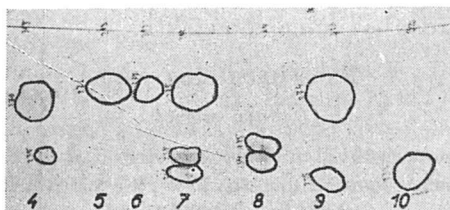
Najlepšie sa však osvedčil tento postup: Do veľkej smaltovanej a vyparafinovanej misy sme naliali 5 litrov $n\text{-HCl}$. 10–15 papierov sme premývali naraz po dobu 36 hodín. Premývanie sme urýchlili dvoma miešačkami. Potom sme papier tak dlho premývali destilovanou vodou, až kým odtekajúca voda bola neutrálna a nereagovala s AgNO_3 . Papier sme vysušili pri teplote miestnosti, načo sme ho hladili horúcou žehličkou cez dva filtračné papiere.

Dobré výsledky sme dosiahli aj s papierom, ktorým sa nechalo pretekať rozpúšťadlo. Po dokonalom vysušení papiera sa nanašali vzorky.

Obr. 1 a 2 ukazujú rozdiely v premytom a nepremytom papieri, na ktoré sa nanašali rovnaké vzorky.



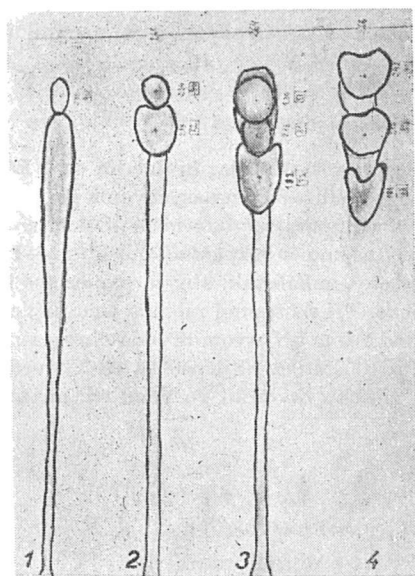
Obr. 1. Chromatogram 12. Rozpúšťadlová zmes kyslá, papier Whatman 1, nepremývaný, doba vyvíjania 7 hod. Vzorky 1, 8 = F-1,6-dP a znečistený G-6-P; 2 = G-1-P + F-1,6-dP + znečistený G-6-P; 3 = F-1,6-dP; 4, 7, 9 = G-1-P + F-1,6-dP; 5, 6 = G-1-P.



Obr. 2. Chromatogram 2. Rozpúšťadlová zmes zásaditá, papier Whatman 1, premývaný $n\text{-HCl}$, doba vyvíjania 17 hod. Vzorky 4–10 ako pri obr. 1.

Nanášanie vzoriek

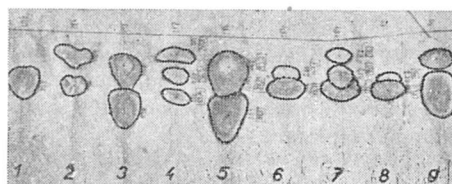
Najvhodnejšie je nanášať vzorku o 0,1 M koncentrácii a v množstve 3 μ l, pričom priemer škvrny má byť 0,8 cm. Vzdialenosť medzi jednotlivými vzorkami bola 3 cm. Obr. 3 ukazuje, ako závisí zdarilosť chromatogramu od koncentrácie nanášananej látky. Pri vzorkách o vysokej koncentrácii vznikajú aj na premytom papieri šmuhy a škvrny na štarte.



Obr. 3. Chromatogram 1. Rozpúšťadlová zmes zásaditá, papier Whatman 1, premyvaný N-HCl, doba vyvíjania 24 hod. Vzorky 1, 2 = F-1,6-dP; 3 = F-1,6-dP + G-1-P o vysokej koncentrácii (nasýtený roztok); 4 = F-1,6-dP + G-1-P o nižšej koncentrácii. Všetky vzorky sa nanášali štyri razy.

Rozpúšťadlové sústavy

V sklených zabrúsených trubiciach bola preskúšaná väčšina z 22 v literatúre opísaných rozpúšťadlových sústav. Najvýhodnejšou sa ukázala kyslá sústava metanol : HCOOH : voda = 80 : 15 : 5 a zásaditá sústava metanol : NH₄OH (šp. v. 0,9015) : voda = 60 : 10 : 30. Čelo kyslého rozpúšťadla dosiahlo vzdialenosť 35 cm pri vzostupnej technike na papieri Whatman 1 za 7 hod. V chromatografických trubiciach urazilo čelo



Obr. 4. Chromatogram 3. Rozpúšťadlová zmes zásaditá, papier Whatman 1, premyvaný N-HCl, doba vyvíjania 17 hod. Vzorky 1, 2, 3, 7, 8, 9 = G-1-P + F-1,6-dP; 1, 3, 7, 9 = nanášané vo veľkých koncentráciách, F-1,6-dP bol znečistený F-6-P (stredná škvrna vo vzorkách 2, 8, 9). Vo vzorkách 4, 5, 6 = neprečistený F-1,6-dP.

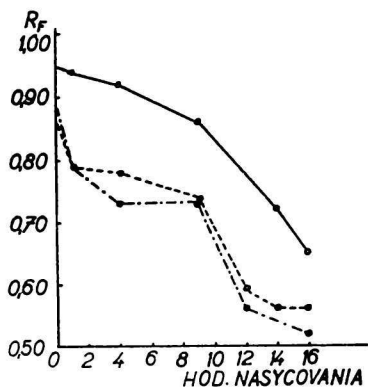
kyslého rozpúšťadla dráhu 30 cm za 1½ hod., kým čelo zásaditého rozpúšťadla tú istú dráhu za 2 hod. Pri kruhovej chromatografii sa vzdialenosť 7 cm dosiahla za 3 hod., pri kyslom rozpúšťadle za 1½ hod.

Techniky s rozličným smerom toku pohyblivej fázy

Vo veľkých chromatografických skrinách sa používala vzostupná a zostupná technika. Pri vzostupnej technike sa papier stočil do kotúča tak, aby okraje k sebe nepriliehali a čelo postupovalo rovnomerne. Okraje papiera sa voľne zošivali. Kotúč sa nitami zavesil na tyčinku a jeho spodný okraj sa po nasýtení papiera v komore ponoril do Petriho misky s rozpúšťadlom. V chromatografických trubiciach sa používala zostupná technika, medzi dvoma Petriho miskami kruhová technika.

Nasycovanie papiera v komore, teplota pri vyvíjaní

Ak nie je komora a papier dobre nasýtený parami rozpúšťadla, hromadia sa FEC pri čele rozpúšťadla (pozri obr. 4). Z grafu 1 vidieť, že s predlžovaním nasycovania papiera v komore sa znižujú R_F hodnoty. Preto sme pri vzostupnej metóde nechali skrútený a zošíty chromatografický papier visieť nad Petriho miskou s rozpúšťadlom. Po 12—16 hod. sme tyčinku, na ktorej bol kotúč papiera zavesený, znížili tak, aby sa papier spodným okrajom ponoril do rozpúšťadla v Petriho miske. Pri zostupnej metóde sme papier zavesili do žliabku. Po nasýtení papiera (12—16 hod.) sme po otvorení veka chromatografickej komory opatrne naliali do žliabku 100 ml rozpúšťadla. Najlepšie sa však osvedčilo po nasýtení papiera pripúšťať rozpúšťadlo do žliabku otvorom vo veku chromatografickej komory.



Graf 1.

— glukopyranóza 1-fosfát
 - - - anorganický fosforečnan
 - . - . - fruktofuranóza 1,6-difosfát

Nasýtenie papiera urýchľuje aj postup čela rozpúšťadla. Chromatogram 15 bol nasycovaný 12 hod., čelo kyslého rozpúšťadla dosiahlo vzdialenosť 360 mm za 7 hod., chromatogram, ktorý sa nasycoval 36 hod., urazil vzdialenosť 400 mm za 5½ hod.

Pri vyvíjaní sa dodržiavala teplota 21—23 °C.

Detekcia

Hoci sa vyskúšali najrozličnejšie spôsoby detekcie — aj s alkalickou červnou fosfatázou pripravenou podľa Schmidta a Thannhausera [17], Domana a Kagana [2], najčastejšie sa postupovalo takto: Vysušený chromatogram sa postriekal roztokom nasledujúceho zloženia (v množstve 2 ml na 100 cm²): 5 ml 60 % kyseliny chloristej

+ 10 ml N-HCl + 25 ml 4 % roztoku molybdéanu amónneho sa doplní vodou do 100 ml.

Potom sa papier vysušil pri teplote miestnosti a 15 minút sa ožaroval UV-svetlom bez použitia filtra. Organické fosforečnany sa objavili ako modré škvrny, kým anorganické ako žlté škvrny.

Bielenie chromatogramu

Po čase chromatogram zmodrie, preto sa musí podklad vybieliť. Chromatogramy sme bielili roztokom kyseliny askorbovej [18], redukujúcim roztokom podľa Charalampousa [3] i metódou Bandurského a Axelroda [5]. Najlepšie sa však osvedčil tento postup: Do Petriho misky sa nalial koncentrovaný NH_4OH . Asi týždeň starý chromatogram sa položil na Petriho misku a ponechal sa tak dlho, pokiaľ sa podklad nevybielil. Tak sa postupovalo z miesta na miesto cez celý papier.

Vyhodnocovanie chromatogramov

V tab. 1 sú uvedené R_F a P_K hodnoty FEC, dosiahnuté zostupnou technikou v zásaditej rozpúšťadlovej sústave.

Tabuľka 1

Hodnoty R_F a P_K anorganického fosforečnanu, ako aj niektorých FEC, dosiahnuté zostupnou technikou v rozpúšťadle metanol : NH_4OH (šp. v. = 0,9015) : voda = 60 : 10 : 30

	R_F	P_K
Anorganický fosforečnan	0,56	100
Fruktofuranóza-1,6-difosfát	0,52	92
Glukopyranóza-1-fosfát	0,65	120
Fruktofuranóza-6-fosfát	0,62	117

Treba zdôrazniť, že aj keď pri vývoji metodiky (zdokonalovanie nasycovania papiera, premývanie papiera atď.) sa R_F hodnoty značne menili, hodnoty P_K zostávali v podstate rovnaké.

$$P_K = \frac{\text{vzdialenosť škvrny od štartu} \times 100}{\text{vzdialenosť anorganického fosforečnanu od štartu}}$$

Preto je výhodné pri papierovej chromatografii FEC používať na vyhodnocovanie hodnoty P_K , keďže lepšie charakterizujú jednotlivé FEC.

Súhrn

Preskúšala sa väčšina metód opísaných v literatúre na oddelenie fosforečných esterov cukrov na papieri a na ich identifikáciu. Z nich sme vybrali a upravili najvýhodnejšiu metódu, ktorá sa najlepšie osvedčila pre kontrolu čistoty fosforečných esterov cukrov a na sledovanie Harden—Youngovho efektu.

ИЗУЧЕНИЕ ХАРДЕН—ЮНГОВОГО ЭФФЕКТА (III) БУМАЖНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ФОСФОРНЫХ ЭФИРОВ САХАРОВ

КАРОЛ ТОМАШЕК

Кафедра технической микробиологии и биохимии Химического факультета Словацкой высшей технической школы в Братиславе

Выводы

Была исследована большая часть методов, описанных в литературе для разделения фосфорных эфиров сахаров на бумаге и для их идентификации. Из них был выбран наивыгоднейший метод, который больше всего годился для контроля чистоты фосфорных эфиров сахаров и для изучения Харден—Юнгового эффекта.

Поступило в редакцию 18. 7. 1956 г.

STUDIUM DES HARDEN—YOUNG-EFFEKTS (III) PAPIERCHROMATOGRAPHIE VON PHOSPHORSÄUREESTERN VON ZUCKER

KAROL TOMÁŠEK

Lehrstuhl für technische Mikrobiologie und Biochemie der Chemischen Fakultät an der Slowakischen Technischen Hochschule in Bratislava

Zusammenfassung

Der Autor überprüfte die Mehrzahl der in der Literatur beschriebenen Methoden für die Trennung von Phosphorsäureestern von Zucker mittels der Papierchromatographie und für ihre Identifizierung. Aus diesen Methoden wurde die vorteilhafteste ausgewählt und modifiziert, d. h. jene, die sich am besten für die Reinheitskontrolle von Phosphorsäureestern von Zucker und für die Beobachtung des Harden—Young-Effekts bewährt hat.

In die Redaktion eingelangt den 18. 7. 1956

LITERATÚRA

1. Hanes C. S., Isherwood F. A., *Nature* 164, 1007 (1949). — 2. Doman N. G., Kagan Z. S., *Biochimija* 17, 719 (1952). — 3. Charalampous F. C., Mueller G. C., *J. biol. Chem.* 201 (1953). — 4. Eggleston L. V., Hems R., *Biochem. J.* 52, 156 (1952). — 5. Bandurski R. S., Axelrod B., *J. biol. Chem.* 193, 405 (1951). — 6. Fletcher E., Malpress F. H., *Nature* 171, 838 (1953). — 7. Wade H. E., Morgan D. M., *Nature* 171, 529 (1953). — 8. Dulberg J., Roesler W. G., Sanders T. H., Brewer C. R., *J. biol. Chem.* 194, 199 (1952). — 9. Ganguli N. C., *Naturwissenschaften* 40, 24, 624 (1953). — 10. Mortimer D. C., *Can. J. Chem.* 30, 624 (1953).
11. Burrows S., Grylls F. S. M., Harrison J. S., *Nature* 170, 4332, 800 (1952). — 12. Block R. J., Durrum E. L., Zweig G., *A manual paper chromatography and paper electrophoresis*, New York 1955. — 13. Guérin J., *J. Bull. Soc. chim. biol.* 36, 1453 (1954). — 14. Dierick W., Stock J., Vandedriesche L., *Naturwissenschaften* 43, 82 (1956). — 15. Tomášek K., *Diplomová práca*, Katedra technickej mikrobiológie a biochémie Chemickej fakulty SVŠT, Bratislava 1956. — 16. Umbreit W. W., Burris R. R., Stauffer J. R., *Manometričeskije metody izučeniya tkanevovo obmena*, Moskva 1951. — 17. Schmidt G., Thannhauser S. J., *J. biol. Chem.* 149, 369 (1943). — 18. Leuthardt F., Wolf H. P., *Helv. chim. Acta* 37, 1732 (1954).

Došlo do redakcie 18. 7. 1956