

J. OPIEŃSKA-BLAUTH i I. MADECKA-BORKOWSKA

## ROZDZIELANIE CUKROWCÓW

### O ZBLIŻONYM WSPÓŁCZYNNIKU $R_F$ Z MIESZANIN METODĄ CHROMATOGRAFII BIBUŁOWEJ.

(Zakład Chemii Fizjologicznej Wydz. Lek. Akad. Medycznej w Lublinie.  
Kierownik Zakładu — Prof. Dr J. Opieńska-Blauth).

Badania nasze nad mechanizmem przemiany węglowodanów u *E. coli* (1) wykazały, że metody stosowane przez nas nie zawsze pozwalały na dokładną interpretację wyników oznaczeń produktów przemiany. Zastosowanie w metodyce badań chromatografii bibułowej wydało się nam dla naszych celów szczególnie korzystne i uzasadnione.

Metody stosowane ogólnie dla oznaczania cukrowców redukujących, Hagedorna—Jensena, Bertranda czy też polarymetryczna nie pozwalają nam na różniczkowanie poszczególnych cukrowców.

W szczególności dla zamierzonych przez nas badań przemiany oligosacharydów u *E. coli* zastosowanie chromatografii bibułowej było korzystne i celowe.

Jednak nasze dotychczasowe prace metodyczne nad rozdzieleniem cukrowców z mieszanin metodą chromatograficzną (2) nie dały całkowicie pomyślnych wyników. W szczególności rozdzielenie cukrowców o zbliżonym współczynniku  $R_F$  jak glukozy, galaktozy, laktozy budziło duże trudności.

W układzie rozpuszczalników fenol-woda nie uzyskaliśmy w żadnym wypadku rozdzielenia powyższych cukrowców.

Rozdzielenie zostało osiągnięte dopiero przy zastosowaniu chromatografii dwukierunkowej w dwu układach fenol-woda i n-butanol, kwas octowy-woda, względnie w układzie trój-

składnikowym fenol-woda-alkohol izoamyłowy na bardzo długich paskach papieru (powyżej 70 cm.), przy czasie spływu około 50 godzin.

Oba te sposoby nastęrczały dużo trudności technicznych przy wykonaniu i nie nadawały się dla celów badań masowych.

Znalezienie odpowiedniego układu rozpuszczalników, któryby nam pozwolił rozdzielić glukozę, galaktozę i laktozę stanowiło jeden z celów naszej pracy.

Drugą trudność stanowiła w naszych warunkach obecność soli mineralnych w materiale biologicznym i pożywkach syntetycznych dla bakterii. Sole mineralne dają bowiem przy wywoływaniu plam na bibule, amoniakalnym roztworem azotanu srebra ciemne plamy, podobne do plam pochodzących od cukrowców. Odsalanie badanego materiału wydaje się konieczne.

By uniknąć tej procedury znanej nam już z piśmiennictwa chromatograficznego (3) zależało nam na zastosowaniu takiej reakcji dla cukrowców, w której sole mineralne nie będą dawały plam z odczynnikiem wywołującym.

Wynalezienie takiej reakcji, dostosowanie jej do naszych celów stanowiło drugie zagadnienie powyższej pracy.

#### C z ę ś ć d o ś w i a d c z a l n a .

Do oryginalnej metody Consdena, Gordona i Martina (4) wprowadziliśmy szereg modyfikacji uwzględnionych częściowo już w naszych poprzednich pracach (3, 2).

Kamerę chromatograficzną stanowiła szafka o wymiarach  $60 \times 61 \times 35$  cm, szklana w oprawie drewnianej. Ściany szklane podwójne z warstwą powietrza. Ze względu na prawidłowe nasycanie pasków bibuły przed spływem, nalewanie fazy ruchomej do rynienki odbywało się przez otwór boczny w szafce.

Na dnie kamery były umieszczone płytki Petriego z fazą nieruchomą wodną, nasyconą rozpuszczalnikiem zastosowanym do fazy ruchomej.

Bibuła Whatmana Nr 1. Wahania temperatury w czasie spływu od 1—3°. Krople wielkości 3—5 mikrol.

Stężenie cukrowców : 0.01—1%.

## Wywoływanie plam cukrowców na bibule.

Po wielu próbach i doświadczeniach wstępnych z szeregiem odczynników dających barwne plamy na bibule z redukującymi cukrowcami, zainteresowaliśmy się odczynnikiem benzydynam Taubera, którego skład był następujący:

Benzydyna	0.5 g
alkohol absolutny	80 ml.
kwask octowy lodowaty	20 ml.

Odczynnik ten służy na ogół do wykrywania pentoz. Powstające w reakcji pochodne furfurołu dają barwne plamy. Z heksozami otrzymuje się zabarwienie brunatne. Dwucukrowce redukujące zachowują się względem tego odczynnika jak heksozy. Odczynnik ten był zastosowany po raz pierwszy w metodzie chromatografii bibułowej przez Horrocks'a (5). Po przeprowadzeniu szeregu prób stwierdziliśmy, że odczynnik ten z wszechmiar nadaje się dla naszych celów. Znacznie czulszy od amoniakalnego roztworu azotanu srebra: przy pomocy niego możemy wykryć glukozę w 1 kropli roztworu 0,01%, co odpowiada 0,4 mikrogr. badanej substancji.

Ponadto, odczynnik benzydynam ma tę wyższość nad amoniakalnym roztworem azotanu srebra, że może być stosowany do materiału zawierającego sole mineralne. Sole mineralne bowiem, jak to zaznaczyliśmy na wstępie, dają ciemne plamy z amoniakalnym azotanem srebra. Przy zastosowaniu odczynnika benzydynamowego sole mineralne pozostają bez żadnego wpływu.

W szczególności, składniki mineralne pożywki Kosera, stosowanej przez nas do hodowli *E. coli*, jak chlorek sodowy, fosforany I rzędowy amonowy i drugorzędowy potasowy, siarczan magnezowy, zachowują się obojętnie w stosunku do testu benzydynamowego. Natomiast odczynnik benzydynam daje z wszystkimi redukującymi cukrowcami plamy brunatne, trwałe. Intensywność i wielkość plamy pozostają w zależności od stężenia badanej substancji. Kwas glukuronowy daje charakterystyczną pod względem zabarwienia plamę rdzawą. Wszystkie przeprowadzone przez nas próby pozwoliły stwierdzić wyższość testu benzydynamowego nad testem z amoniakalnym roztworem azotanu srebra. Dlatego ten sposób wywoływania plam cukrowców

redukujących na bibule był stosowany przez nas we wszystkich doświadczeniach. Test benzydynowy sprawdziliśmy na czystych roztworach cukrowców: glukozy, galaktozy, mannozy, fruktozy, ksylozy, laktozy, maltozy, hydrolizatu sacharozy, kwasu glukuronowego, glukozaminy.

Z badań przeprowadzonych w roztworach zawierających różne stężenia glukozy daje się zauważyć wyraźnie, że zabarwienie od ciemno brunatnego do jasno żółtego i jego intensywność pozostaje w związku z stężeniem cukrowca w roztworze. Wydaje się słusznym twierdzenie, że ocena ilościowa z intensywności barwy plamy jest możliwa. Czułość testu benzydynowego przewyższa znacznie test z amoniakalnym roztworem azotanu srebra. Jedna kropla roztworu 0.01% glukozy daje jeszcze wyraźne, żółte zabarwienie. Dla laktozy i galaktozy czułość testu jest niższa. Plama występuje dopiero przy 1 kropli 0.03% roztworu.

Przy wywoływaniu amoniakalnym roztworem azotanu srebra występuje plama dopiero przy jednej kropli 0,1% roztworu.

Po przeprowadzaniu powyższych badań i oceny testu benzydynowego zajęliśmy się wyszukaniem odpowiedniego układu rozpuszczalników, któryby nam pozwolił rozdzielić cukrowce o zbliżonym współczynniku  $R_F$ , a w szczególności laktozę, glukozę i galaktozę.

Według danych Partridge'a (6), który przeprowadzał oznaczenia współczynnika  $R_F$  dla cukrowców w układzie fenol-woda-amoniak-cjanowodór i naszych (2) w układzie fenol-woda.

Partridge	Opieńska-Drozdowski
$R_F$ średnie	$R_F$ średnie
glukoza 0,39	0,37
galaktoza 0,44	0,42
Laktoza 0.36	0.34

należy przewidzieć, że rozdzielenie laktozy od glukozy nie da się przeprowadzić w tym układzie, natomiast rozdzielenie galaktozy od glukozy wydawałoby się możliwe.

W rzeczywistości, szereg doświadczeń naszych przeprowadzonych w układzie fenol-woda (przeszło 30) z mieszaniną laktozy, glukozy i galaktozy znajdujących się w roztworach w różnych stężeniach nie dał rozdzielania. Wszystkie chromato-

gramy wykazują plamy duże, niekształtne, rozlane. Nawet przedłużenie czasu spływu do 40 godzin nie doprowadziło do rozdzielania.

Doświadczenia były przeprowadzane z roztworami czystych cukrowców i ich mieszanin w stężeniach od 0,01 do 0,6%, przy różnych czasach spływu czoła fazy ruchomej po bibule. Przy dłuższych czasach spływu, w celu uniknięcia spływu poniżej końca paska bibuły, zakładaliśmy u wylotu pasków harmonijki z bibuły.

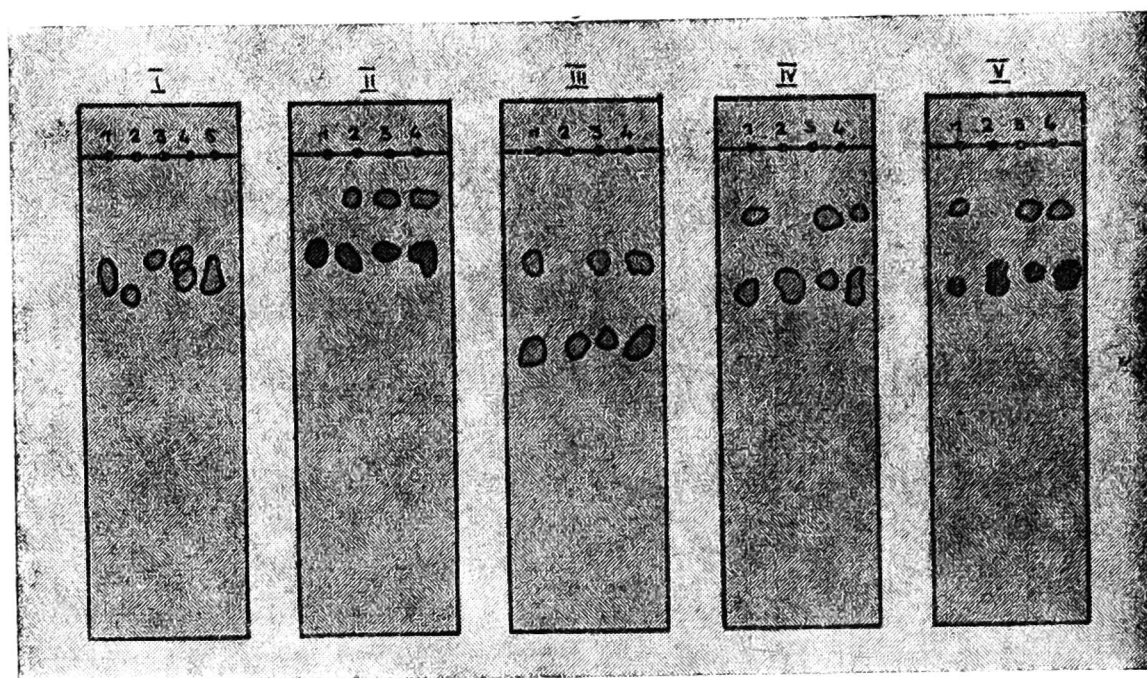
Badania były przeprowadzane w warunkach ustabilizowanych pod względem typu kamery (rodzaj i wymiary) czasu nasycania pasków bibuły przed spływem, wielkości kropli, temperatury spływu i gatunku bibuły (Whatman Nr 1).

Chromatogram Nr I daje nam obraz plam laktozy, glukozy i galaktozy, zlewających się w jedną całość.

Niepomyślne wyniki naszych prób w układzie fenol—woda stały się bodźcem dla szukania innych lepszych układów faz. W 5 następnych doświadczeniach zastosowaliśmy układ n-butanol-kwas octowy-woda. Jak to wykazuje chromatogram II udaje się w tym układzie rozdzielić laktozę od obu pozostałych cukrowców, natomiast glukoza i galaktoza w dalszym ciągu pozostają nierozdzielone.

Następne doświadczenia zostały przeprowadzone w układzie n-butanol-pirydyna-woda w stosunku 2 : 1 : 2. Isherwood stosował do rozdzielania galaktozy i glukozy układ składający się z octanu etylowego, wody i pirydyny. W nowym układzie nie uzyskujemy wprawdzie pełnego rozdzielania, jednak jak to widzimy w chromatogramach III, IV, V i VI daje się zauważyć tendencja do rozdzielania, wynikająca z kształtu plam. Próby nasze były przeprowadzane przy różnych czasach spływu.

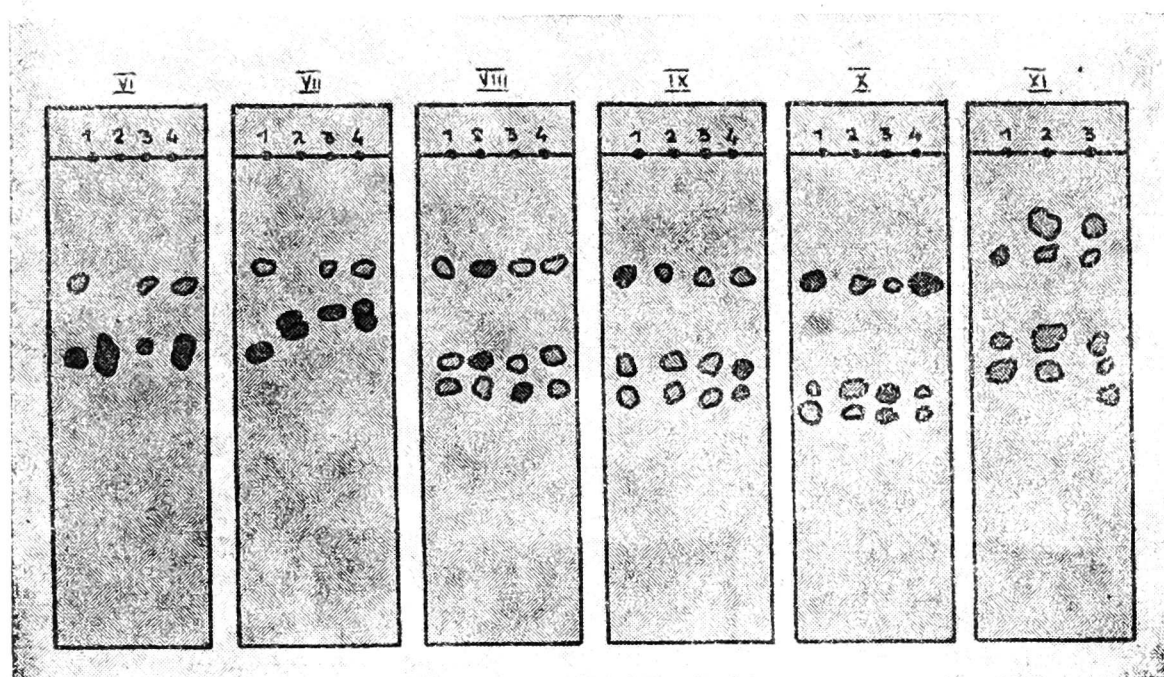
W doświadczeniu Nr IV zastosowaliśmy oczyszczanie bibuły z śladów metali ciężkich przy pomocy przemywania pasków bibuły w alkoholowym roztworze 8-oksychinoliny i czystego alkoholu. Jednak zabieg ten jak to stwierdziliśmy później wielokrotnie, nie odgrywał w naszych doświadczeniach żadnej roli, natomiast często stawał się przyczyną zniszczenia cennej bibuły.



Ryc. 1.

Tekst do chromatogramów

Chromatogram Nr	I	II	III
Kropla 1 . . . . .	glukoza 0.6 <sup>o</sup> / <sub>o</sub>	glukoza 1 <sup>o</sup> / <sub>o</sub> galaktoza 1 <sup>o</sup> / <sub>o</sub>	glukoza 0.6 <sup>o</sup> / <sub>o</sub> laktoza 0.6 <sup>o</sup> / <sub>o</sub>
„ 2 . . . . .	galaktoza 0.6 <sup>o</sup> / <sub>o</sub>	glukoza 1 <sup>o</sup> / <sub>o</sub> laktoza 1 <sup>o</sup> / <sub>o</sub>	glukoza 0.6 <sup>o</sup> / <sub>o</sub> galaktoza 0.6 <sup>o</sup> / <sub>o</sub>
„ 3 . . . . .	laktoza 0.6 <sup>o</sup> / <sub>o</sub>	galaktoza 1 <sup>o</sup> / <sub>o</sub> laktoza 1 <sup>o</sup> / <sub>o</sub>	galaktoza 0.6 <sup>o</sup> / <sub>o</sub> laktoza 0.6 <sup>o</sup> / <sub>o</sub>
„ 4 . . . . .	galaktoza 0.6 <sup>o</sup> / <sub>o</sub> laktoza 0.6 <sup>o</sup> / <sub>o</sub>	glukoza 1 <sup>o</sup> / <sub>o</sub> galaktoza 1 <sup>o</sup> / <sub>o</sub> laktoza 1 <sup>o</sup> / <sub>o</sub>	glukoza 0.6 <sup>o</sup> / <sub>o</sub> galaktoza 0.6 <sup>o</sup> / <sub>o</sub> laktoza 0.6 <sup>o</sup> / <sub>o</sub>
„ 5 . . . . .	glukoza 0.6 <sup>o</sup> / <sub>o</sub> galaktoza 0.6 <sup>o</sup> / <sub>o</sub> laktoza 0.6 <sup>o</sup> / <sub>o</sub>		
Układ: . . . . .	fenol 50 woda 50	butanol 35 kw. octowy 15 woda 50	butanol 40 pirydyna 20 woda 40
Bibuła . . . . .	Whatman Nr 1	Whatman Nr 1	Whatman Nr 1
Oczyszczanie bibuły . . . . .	—	—	—
Nasywanie bibuły . . . . .	12 godz.	12 godz.	12 godz.
Czas spływu . . . . .	20 godz.	20 godz.	27 godz.
Temperatura kamery . . . . .	18°C	19°C.	20.5°C.
Długość paska . . . . .	45 cm	45 cm.	45 cm + harmo- nijka
Wywoływanie . . . . .	benzydyna	benzydyna	benzydyna
Czas wywoływania . . . . .	10 min.	10 min.	10 min.
Temperatura „ „ . . . . .	105°C.	105°C.	105°C.



Ryc. 2.

## Tekst do chromatogramów

Chromatogram Nr	IV	V	VI
Kropla 1 . . . . .	glukoza 0.6 <sup>o</sup> / <sub>o</sub> laktoza 0.6 <sup>o</sup> / <sub>o</sub>	glukoza 1 <sup>o</sup> / <sub>o</sub> laktoza 1 <sup>o</sup> / <sub>o</sub>	glukoza 1 <sup>o</sup> / <sub>o</sub> laktoza 1 <sup>o</sup> / <sub>o</sub>
„ 2 . . . . .	glukoza 0.6 <sup>o</sup> / <sub>o</sub> galaktoza 0.6 <sup>o</sup> / <sub>o</sub>	glukoza 1 <sup>o</sup> / <sub>o</sub> galaktoza 1 <sup>o</sup> / <sub>o</sub>	glukoza 1 <sup>o</sup> / <sub>o</sub> galaktoza 1 <sup>o</sup> / <sub>o</sub>
„ 3 . . . . .	galaktoza 0.6 <sup>o</sup> / <sub>o</sub> laktoza 0.6 <sup>o</sup> / <sub>o</sub>	laktoza 1 <sup>o</sup> / <sub>o</sub> galaktoza 1 <sup>o</sup> / <sub>o</sub>	galaktoza 1 <sup>o</sup> / <sub>o</sub> laktoza 1 <sup>o</sup> / <sub>o</sub>
„ 4 . . . . .	glukoza 0.6 <sup>o</sup> / <sub>o</sub> galaktoza 0.6 <sup>o</sup> / <sub>o</sub> laktoza 0.6 <sup>o</sup> / <sub>o</sub>	glukoza 1 <sup>o</sup> / <sub>o</sub> galaktoza 1 <sup>o</sup> / <sub>o</sub> laktoza 1 <sup>o</sup> / <sub>o</sub>	glukoza 1 <sup>o</sup> / <sub>o</sub> galaktoza 1 <sup>o</sup> / <sub>o</sub> laktoza 1 <sup>o</sup> / <sub>o</sub>
Układ . . . . .	butanol 40 pirydyna 20 woda 40	butanol 40 pirydyna 20 woda 40	butanol 40 pirydyna 20 woda 40
Bibuła . . . . .	Whatman Nr 1	Whatman Nr 1	Whatman Nr 1
Oczyszcz. bibuły . . . . .	8-oksychinolina i alkohol	—	—
Nasyc. bibuły . . . . .	12 godz.	12 godz.	12 godz.
Czas spływu . . . . .	12 godz.	12 godz.	27 godz.
Temp. kamery . . . . .	19°C.	19°C.	20,5°C.
Długość paska . . . . .	45 cm.	45 cm	45 cm + harmo- nijka
Wywołanie . . . . .	benzydyna	benzydyna	benzydyna
Czas wywołania . . . . .	10 min.	10 min.	10 min.
Temperatura „ „ . . . . .	105°C.	105°C.	105°C.

Mimo niezupełnego rozdzielania osiągnięte wyniki pozwalały przypuszczać, że pirydyna w mieszaninie z butanolem i wodą stanowi korzystny dla nas układ. Zastosowaliśmy ten układ w nieco zmienionych stosunkach ilościowych. Zwiększyliśmy zawartość butanolu i pirydyny na niekorzyść wody. Pierwsze już doświadczenie w tym układzie, przy normalnym czasie spływu (chromatogram VII), dało już zupełnie wyraźny odgraniczenie plam glukozy od galaktozy. Laktoza oddzielała się zupełnie wyraźnie.

W następnych doświadczeniach przy przedłużonym czasie spływu do 42 godzin osiągnęliśmy rozdzielanie zupełne. W chro-

## Tekst do chromatogramów

Chromatogram Nr	VII	VIII	IX
Kropla 1 . . . . .	glukoza 1% laktoza 1%	glukoza 0.3% galaktoza 0.3% laktoza 0.3% poż. Kosera	glukoza 0.1% galaktoza 0.1% laktoza 0.6% poż. Kosera
„ 2 . . . . .	glukoza 1% galaktoza 1%	glukoza 0.1% galaktoza 0.1% laktoza 0.6% poż. Kosera	glukoza 0.1% galaktoza 0.3% laktoza 0.3% poż. Kosera
„ 3 . . . . .	galaktoza 1% laktoza 1%	glukoza 0.6% galaktoza 0.3% laktoza 0.1% poż. Kosera	glukoza 0.3% galaktoza 0.1% laktoza 0.3% poż. Kosera
„ 4 . . . . .	glukoza 1% galaktoza 1% laktoza 1%	glukoza 0.3% galaktoza 0.1% laktoza 0.3% poż. Kosera	glukoza 0.6% galaktoza 0.6% laktoza 0.1% poż. Kosera
Układ:	butanol 45 pirydyna 25 woda 30	butanol 45 pirydyna 25 woda 40	butanol 45 pirydyna 25 woda 40
Bibuła . . . . .	Whatman Nr 1	Whatman Nr 1	Whatman Nr 1
Oczyszczanie bibuły . . . . .	—	—	—
Nasywanie bibuły . . . . .	12 godz.	12 godz.	12 godz.
Czas spływu . . . . .	22,5 godz.	42 godz.	42 godz.
Temperatura kamery . . . . .	21°C.	17°C.	17°C.
Długość paska . . . . .	45 cm + harmo- nijka	60 cm + harmo- nijka	60 cm + harmo- nijka
Wywoływanie . . . . .	benzydyna	benzydyna	benzydyna
Czas wywoływania . . . . .	10 min.	10 min.	10 min.
Temperatura „ „ . . . . .	105°C.	105°C.	105°C.



matogramie (VIII) znaczne przesunięcie plam glukozy i galaktozy od laktozy.

Odległość między plamami laktozy i glukozy wynosi 8 cm., a odległość między glukozą a galaktozą 2.5 cm.

Chromatogramy VIII, IX i X obok rozdzielenia tych trzech cukrowców wskazują nam jeszcze na coś innego; mianowicie

### Tekst do chromatogramów

Chromatogram Nr	X	XI	XII
Kropla 1 . . . . .	kw. mlekowy	laktoza 0.6%	kw. glukuronowy
. . . . .	laktoza 0.6%	galaktoza 0.6%	glukoza 0.6%
. . . . .	glukoza 0.3%	glukoza 0.6%	glukozamina
. . . . .	galaktoza 0.1%		
. . . . .	poż. Koseira		
„ 2 . . . . .	kw. mrówkowy	kw. glukuronowy	laktoza 0.6%
. . . . .	laktoza 0.3%	laktoza 0.6%	glukozamina
. . . . .	glukoza 0.1%	galaktoza 0.6%	glukoza 0.6%
. . . . .	galaktoza 0.3%	glukoza 0.6%	galaktoza 0.6%
. . . . .	poż. Koseira		
„ 3 . . . . .	kw. octowy	kw. glukuronowy	glukoza 0.6%
. . . . .	laktoza 0.1%	laktoza 0.6%	fruktoza 0.6%
. . . . .	glukoza 0.6%	galaktoza 0.6%	mannoza 0.6%
. . . . .	galaktoza 0.6%	glukoza 0.6%	
. . . . .	poż. Koseira	fruktoza 0.6%	
„ 4 . . . . .	kw. cytrynowy		
. . . . .	laktoza 0.6%		
. . . . .	glukoza 0.1%		
. . . . .	galaktoza 0.1%		
. . . . .	poż. Koseira		
Układ: . . . . .	butanol 45	butanol 45	butanol 45
. . . . .	pirydyna 25	pirydyna 25	pirydyna 25
. . . . .	woda 40	woda 40	woda 40
Bibuła . . . . .	Whatman Nr 1	Whatman Nr 1	Whatman Nr 1
Oczyszczanie bibuły .	kw. octowy 2 n. i woda redest.	—	—
Nasycanie bibuły . .	12 godz.	12 godz.	12 godz.
Czas spływu . . . . .	50 godz.	40 godz.	24 godz.
Temperatura kamery .	19°C.	18°C.	19°C.
Długość paska . . . .	60 cm.	60 cm + harmo- nijka	60 cm + harmo- nijka
Wywoływanie . . . . .	benzydyna	benzydyna	benzydyna
Czas wywoływania . .	10 min.	10 min.	10 min.
Temperatura „ „ . . .	105°C.	105°C.	105°C.

CHROMATOGRFIA BIBULOWA - ROZDZIELANIE LAKTOZY, GLUKOZY, GALAKTOZY I																
S.M. PARTRIDGE					J. OPIEŃSKA - BLAETH					J. MADECKA						
R.G. WESTALL					R.F.					R.F.						
UKŁAD :					UKŁAD :					UKŁAD :						
					CZAS SPĘWU					CZAS SPĘWU						
					LAKTOZA					LAKTOZA						
					GLUKOZA					GLUKOZA						
					GALAKTOZA					GALAKTOZA						
FENOL (NH <sub>3</sub> , HCM) WODA					0,38	0,39	0,44	-	50	0,308	0,345	0,410	20	50	50	20
S-KOLLIDYNA					0,24	0,39	0,34	-	35 15 50	0,103	0,210	0,190	20	BUTANOL KW. OCTOWY WODA	20	
n-BUTANOL KW. OCTOWY WODA					40 10 50	0,09	0,19	0,16	-	40 20 40	0,145	0,295	0,245	12	BUTANOL PIRYDYNA WODA	12
n-BUTANOL ETANOL WODA					45 5 49	0,06	0,105	0,09	-	45 25 30	0,087	0,19	0,15	20	BUTANOL PIRYDYNA WODA	20
n-BUTANOL NH <sub>3</sub>					0,00	0,07	0,06	-	45 25 40	0,145	0,360	0,310	42	BUTANOL PIRYDYNA WODA	42	
KW. IZOMASEOWY					0,07	0,13	0,14	-								
METYLO-ETYLOKETON					0,00	0,025	0,015	-								
WYWOŁYWACZ : AMONIAKALNY AZOTAN SREBRA					WYWOŁYWACZ : BENZYDYNA											

CHROMATOGRAMA BIBULOWA - ROZDZIELANIE LAKTOZY, GLUKOZY : GALAKTOZY II										
M. A. JERMYN					J. OPIŃSKA-BLAUTH					
F. A. JSHERWOOD					J. MADECKA					
UKŁAD:	ODLEGŁOŚĆ OD MIEJSC STARTU - DO ŚRODKÓW PŁAM		CZAS SPRYMU	ODLEGŁOŚĆ OD MIEJSC STARTU - DO ŚRODKÓW PŁAM		UKŁAD:	ODLEGŁOŚĆ OD MIEJSC STARTU - DO ŚRODKÓW PŁAM		CZAS SPRYMU	
	GLUKOZA	GALAKTOZA		LAKTOZA	GALAKTOZA		LAKTOZA	GALAKTOZA		
3-tygł. AMYLOWY ALKOHOL WODA KW. OCTOWY	4,6	4,1	20 GODZ.	50	50	FENOL WODA	9,7	11,2	13,4	20 GODZ.
CHLOROFORM WODA KW. OCTOWY	4,7	4,6	20 GODZ.	35 15 50	35 15 50	n-BUTANOL KW. OCTOWY WODA	4,0	8,7	8,0	20 GODZ.
OCTAN ETYLOWY WODA METANOL	3,2	3,1	-	40 20 40	40 20 40	n-BUTANOL PIRYDYNA WODA	5,2	10,1	8,1	12 GODZ.
OCTAN ETYLOWY WODA PIRYDYNA	26,0 RF 0,28	20,9 RF 0,235	-	45 25 30	45 25 30	n-BUTANOL PIRYDYNA WODA	7,5	11,7	10,1	20 GODZ.
OCTAN ETYLOWY WODA KW. OCTOWY	14,3 RF 0,17	12,4 RF 0,14	-	45 25 40	45 25 40	n-BUTANOL PIRYDYNA WODA	7,0	17,2	15,0	42 GODZ.
OCTAN ETYLOWY DIOKSAN WODA	20,8	17,7	-							
WYWOŁYWACZ : AMONIAKALNY AZOTAN SREBRA					WYWOŁYWACZ : BENZYDYNA					

składniki pożywki Koseira, chlorki, fosforany I rzędowy amonowy i drugorzędowy potasowy, siarczan magnezu są bez wpływu na chromatogram cukrowców, same nie dają plam i nie zmieniają plam cukrowców.

Różnice w intensywności zabarwienia plam są proporcjonalne do różnic w stężeniach i pozwalają na przybliżoną ocenę ilościową.

Na chromatogramie XI wykazaliśmy rozdzielenie obok trzech wyżej wymienionych cukrowców kwasu glukuronowego i fruktozy.

Następnych kilka doświadczeń przeprowadzonych w tym samym układzie z glukozą, galaktozą, laktozą, glukozaminą, kwasem glukurowym, mannozą i fruktozą wykazuje, że i przy krótkim czasie spływu (24 godzinach) (Chromatogram XII) następuje ich rozdzielenie.

Jak widzimy z tych doświadczeń glukozamina oddziela się wyraźnie od innych cukrowców.

### D y s k u s j a i w n i o s k i.

Metoda chromatograficzna może stanowić jedną z najlepszych metod do badań przemian enzymatycznych w wyciągach tkankowych, komórkowych i w komórkach *in vivo*.

Dla stwierdzenia produktów pośrednich w przemianie węglowodanowej metoda chromatograficzna może dać szczególnie dobre usługi. Przy pomocy metody chromatograficznej możemy wyróżnić poszczególne cukrowce i ich pochodne w jednej kropli materiału biologicznego, czego nie możemy uzyskać przy pomocy innych mikrometod.

Aby metoda chromatograficzna mogła być zastosowana do zamierzonych przez nas badań nad przemianą oligosacharydów u *E. coli* trzeba było przeprowadzić studia wstępne nad chromatografią cukrowców. Klasyczny test wywoławczy z amoniakalnym roztworem azotanu srebra stosowany przez Partridge'a nie odpowiada naszym wymaganiom. Natomiast test benzydynowy Taubera wypróbowany przez nas dla szeregu cukrowców oddzielnie i w mieszaninie, w obecności związków mineralnych, występujących w materiale biologicznym, wykazuje duże zalety w zestawieniu z testem srebrowym.

Przede wszystkim test jest dziesięciokrotnie czulszy od testu srebowego. Test ten nadaje się do orientacyjnej oceny ilościowej. Stopniowe bowiem przejście od zabarwienia brunatnego do żółtego jest proporcjonalne do zmian w stężeniach.

W końcu doniosłe znaczenie ma dla nas niezależność testu od towarzyszących soli mineralnych. Sole mineralne bowiem nie dają plam na bibule tak, jak to jest z odczynnikiem srebowym.

W końcu zaznaczyć należy, że plamy otrzymane z benzyny są trwałe i doskonale kontrastują z jasnym tłem bibuły.

Rozdzielanie cukrowców budzi czasem poważne trudności ze względu na zbliżoną wartość współczynników  $R_F$ . W szczególności rozdzielenie galaktozy od glukozy jest specjalnie trudne.

Partridg'e, Westall (6), Isherwood, Jermyn (7) i inni badacze wypróbowali szereg układów dla cukrowców. Osiągnięte przez nich pozytywne rezultaty odnosiły się do takich układów, których składniki były dla nas niedostępne.

Jak wykazują tablice porównawcze I i II z układów stosowanych przez Partridge'a i Westll'a dla laktozy, glukozy i galaktozy układ fenol-woda (amoniak, cjanowodór) może nadawać się do rozdzielania galaktozy i glukozy, lecz jak wiemy na podstawie naszych wielu doświadczeń, mieszanina laktozy, glukozy i galaktozy daje zawsze w tych warunkach jedną wielką nierozdzielającą się plamę.

Układ butanol-kwas octowy-woda doprowadza tylko do rozdzielania laktozy, natomiast glukoza i galaktoza pozostają nierozdzielone.

To samo możemy powiedzieć o innych układach, stosowanych przez powyższych autorów. Sądząc z współczynników  $R_F$  laktozy = 0.24, glukozy = 0.39, galaktozy = 0.34, jedynie układ s-kolidyny może ewentualnie doprowadzić do rozdzielania wszystkich trzech cukrowców.

Autorzy nie podają bliżej warunków doświadczalnych, szczególnie czasu spływu ani też wyników otrzymywanych z mieszanin. Jermyn i Isherwood (tablica II) podają dla glukozy i galaktozy wartości współczynników  $R_F$ , w niektórych tylko wypadkach, przeważnie stosują do porównania odległości od miejsc startu do środków plam w szeregu różnych układów. Jak

widzimy z 5 układów przez nich stosowanych, w których skład wchodziły:

- alkohol amyłowy woda i kwas octowy,
- chloroform, woda i kwas octowy,
- octan etylowy woda i kwas octowy,
- octan etylowy, dioksan i woda,

jedynie tylko układ składający się:

- z octanu etylowego, wody i pirydyny,

na je płamy dla glukozy i galaktozy, w odległościach, pozwalających przypuszczać, że nastąpi rozdzielanie. Warunki doświadczalne nie są dokładnie określone, ponadto nie wiemy jakie wyniki otrzymanoby z mieszaniną trzech cukrowców mianowicie laktozy, glukozy i galaktozy. W naszych studiach mieliśmy jeszcze i tę trudność, że tylko niewiele rozpuszczalników organicznych mieliśmy do wyboru.

Celem naszym było znalezienie takiego układu, w którym bez trudności w normalnych warunkach doświadczalnych dałoby się osiągnąć rozdzielanie laktozy, glukozy i galaktozy z mieszaniny.

Układy fenol-woda, butanol-kwas octowy-woda, nie dały rezultatu. W pierwszym wymienionym przez nas układzie rozdzielania nie było zupełnie. W drugim układzie butanol-kwas octowy-woda rozdziela się wyraźnie laktoza, natomiast glukoza i galaktoza pozostają nierozdzielone. Widzimy tu jeszcze jedno ciekawe zjawisko, stwierdzone już przez innych badaczy, że o ile w układzie fenol-woda galaktoza wykazuje wyższy współczynnik  $R_F$  od glukozy, to w innych układach jest odwrotnie.

Dopiero w układzie butanol-pirydyna-woda, jak to widzimy z naszych chromatogramów, rozdzielanie wszystkich trzech cukrowców wydawało się możliwe.

Po szeregu doświadczeń próbnych udało się nam opracować proporcje poszczególnych składników, warunki spływu (czas) odpowiednie dla uzyskania rozdzielania.

Chromatogram XII wykazuje, że w układzie butanol-pirydyna-woda w stosunku 4 : 25 : 40 nawet przy 20 godzinach czasu spływu uzyskujemy rozdzielanie laktozy, glukozy, galaktozy, fruktozy, glukozaminy i kwasu glukuronowego. Jak wi-

dzimy z pomiarów odległości między środkami plam rozdzielanie możliwe jest dopiero przy 2 cm.

Z doświadczeń naszych i innych wynika, że wartości współczynnika  $R_F$  pozostają niezmiennie tylko w ściśle określonych warunkach doświadczalnych. Powołujemy się na wyniki w naszej poprzedniej pracy, gdzie stwierdziliśmy, że na wartości  $R_F$  wpływa, oprócz wielkości i rodzaju kamery, gatunku bibuły, przede wszystkim układ rozpuszczalników. Przy odpowiednim doborze układu rozpuszczalników możemy kierować przesunięciem plam w pożądanym kierunku.

W tych próbach, w których czas spływu wynosi około 40—50 godzin, czoło fazy ruchomej spływa poza koniec bibuły, względnie zwilża harmonijkę z bibuły, przytwierdzoną do końca paska, nie widzimy sposobu obliczenia współczynnika  $R_F$ .

Należy w tych wypadkach zastąpić  $R_F$  innymi wielkościami stałymi w danych warunkach doświadczalnych.

Nie znajdujemy w piśmiennictwie bliższych danych w jaki sposób należy oznaczyć  $R_F$  przy przedłużonym czasie spływu, gdy front cieczy przesunie się poza koniec paska bibuły. Nasze próby wprowadzenia na miejsce wartości  $Y$  (odległości od miejsca startu do linii spływu frontu cieczy) długości paska bibuły, albo zastąpienie współczynników  $R_F$  odległościami od miejsca startu do środków plam, względnie wprowadzeniem na miejsce wartości  $Y$  czasu spływu, nie dały zadawalających wyników. Zagadnienie to pozostaje jeszcze otwarte do dalszej dyskusji i prób doświadczalnych.

### S t r e s z c z e n i e.

Zamierzona przez nas praca nad przemianą dwucukrowców u *Escherichia coli* przy pomocy chromatografii bibułowej wymagała przeprowadzenia szeregu prób w celu rozdzielania laktozy, glukozy i galaktozy. Po wielu niezadawalających doświadczeniach w układach: fenol-woda, fenol-woda-kwas octowy, n-butanol-woda, n-butanol-woda-kwas octowy, dobre wyniki rozdzielania tych cukrowców otrzymano dopiero w oryginalnym, opracowanym przez nas układzie n-butanol-pirydyna-woda we wzajemnym stosunku objętościowym 45 : 25 : 40. Układ ten nadaje się ponadto dla rozdzielania arabinozy, ksylozy, fruktozy, kwasu glukuronowego i glukozaminy.

Przy zastosowaniu do wywoływania plam odczynnika benzydynowego (roztwór benzydyny w absolutnym etanolu z dodatkiem kwasu octowego lodowatego), uzyskano znaczne zwiększenie czułości w porównaniu z używanym przed tym amoniakalnym roztworem azotanu srebra. W ten sposób można wykryć jeszcze 0,2 mikrograma glukozy w 1 kropli badanego roztworu.

Dalszą korzyścią płynącą ze stosowania tego odczynnika jest jego niewrażliwość na obecność elektrolitów w badanym roztworze, które nie pojawiają na chromatogramach w postaci dodatkowych plam. Wprowadzenie opisanych modyfikacji pozwala wykrywać cukrowce o zbliżonym  $R_F$  z mieszanin, bez uciekania się do znacznie dłużej trwającej i mniej oszczędnej chromatografii dwukierunkowej.

#### PIŚMIENNICTWO.

1. Opieńska-Blauth J., Kański M., Stobińska L., (1949) Ann. U. M. C. S. Lublin Polonia, Sectio D, Vol. IV. 4, (70).
2. Drozdowski E., Opieńska-Blauth J., Kański M. (w druku).
3. Opieńska-Blauth J., Kański M. (w druku)
4. Consden R., Gordon A. H., Martin A. J. P. (1944) Biochem. J., 38, 244.
5. Horrocks R. H. (1949) Nature 164, 444.
6. Partridge S. M. Westall R. G. (1948) Biochem. J., 42, 238.
7. Jermyn M. A., Isherwood F. A. (1949) Biochem. J., 44, 402.

#### S u m m a r y.

The proposed work on the metabolism of disaccharides in *E. coli* by partition paper chromatography required a series of experiments in order to separate lactose, dextrose and galactose. After many unsatisfactory attempts with such systems as phenol-water, n-butanol-water-acetic acid, good results have been obtained in separating these disaccharides with a method of our own n-butanol-pyridine-water used in proportion 45 : 25 : 40.

This system may be applied to the separation of arabinose, xylose, fructose, glucuronic acid and glucosamine.

By employing the benzidine reagent (alcoholic solution



with addition of glacial acid) for the detection of spots it was possible to rise the sensibility in comparison with the formerly used ammoniacal silver nitrate solution.

In this way one is able to reveal as little as 0,2 microgr. of dextrose in 1 drop of an unknown solution.

An other advantage resulting from use of this reagent is its insensibility on the presence of electrolites (in a given solution) that otherwise could appear in chromatograms as different additional spots.

The introduction of the above mentionel modification allows to reveal carbohydrates which possess a similar  $R_F$  without recourse to the more time consuming and less economic two-dimensional chromatography.