

Szénhidrátok papírkromatográfiája*

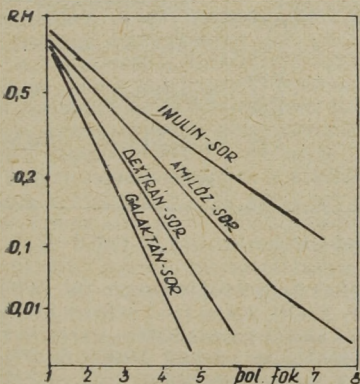
TÓTH MIHÁLY

Budapesti Műszaki Egyetem Mezőgazdasági Kémiai Technológiai Tanszék

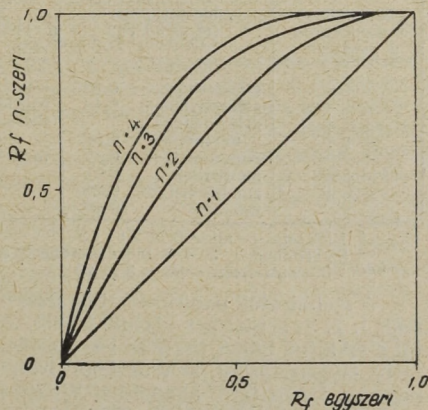
Érkezett: 1966, április 27.

Valamely szénhidrát-elegy kvalitatív vagy kvantitatív papírkromatográfiás analizésére az ismert futtatási technikák egyaránt alkalmasak. Így alkalmazhatók a felszálló, leszálló, vízszintes, spirális vagy körpapír technikák, esetleg ezek kombinációja. Egyszerű kivitelükből eredően legelterjedtebbek a fel- és leszálló technikák.

A szénhidrátoknak a papíron való elmozdulása is molekulanagyság, szerkezet és oldószerfüggő. Általános elvként fogadható el, hogy a furanózformában levő szénhidrátok R_f -je nagyobb a piranózokénál, a monoszaharidok gyorsabbak az oligoszaharidoknál. Oligoszaharidoknál az R_f -érték függ a kötéstípustól és a polimerizációs foktól is. (1. ábra)



1. ábra. Oligoszacharidok R_M -értékeinek polimerizációs-fok függése



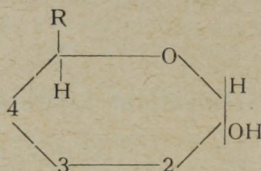
2. ábra. R_f -érték számítása ismételt futtatásnál

Oligoszaharidoknál a monoszaharid egységek száma mellett döntőbb a kötéstípus szerepe. Így pl. 1,4-diszaharidok gyorsabban vándorolnak, mint az 1,6-diszaharidok. Hatással van az elmozdulás sebességére az esetleges szubsztitúció is. Így pl. aldohexózok 6-os hidroxiljének metilézése 50%-kal növeli az R_f -et.

Azonos alapvázú szénhidrátok R_f -értékeinek szerkezetfüggését az 1. táblázat szemlélteti. Az 1. táblázat vízszintes soraiból az azonos konfiguráció mellett változtatott szubsztitúció, függőleges soraiból azonos szubsztitúció mellett a konfigurációnak az elmozdulásra gyakorolt hatása olvasható le (oldószer: etilacetát- piridin- víz 2 : 1 : 2 elegye).

* A II. Élelmiszervegyész Anktét keretében 1966. április 6-án elhangzott előadás (Szerk.)

Alapváz:



Hidroxilok konfigurációja a gyűrűn**	Aldopentózok (R = -H)	Aldohexózok (R = -CH ₂ OH)	Aldoheptózok (R = -CHOH·CH ₂ OH)
+++	Ribóz 0,33	allóz 0,22	
++-	arabinóz 0,23	altróz 0,27	
+ - +	xilóz 0,28	glükóz 0,195	D-gala-L-glükóz 0,16
+ - -	lixóz 0,30	mannóz 0,24	D-gala-L-mannóz 0,21
- + +		glükóz 0,23	D-glüko-D-gülöz 0,19
- + -		idóz 0,31	
- - +		galaktóz 0,175	D-gülo-L-galaktóz 0,14
			D-manno-D-galak-tóz 0,15
			D-gülo-L-talóz 0,23
- - -		talóz 0,285	
Hidroxilok konfigurációja a gyűrűn**	Aldometilózok (R = -CH ₃)	Ketohexózok (-H C ₁ -en = -CH ₂ OH)	Aldohexuronsavak*** (R = -COOH)
+++	allometilóz 0,36	allulóz 0,30	
++-	altrometilóz 0,45	fruktóz 0,24	glükuronsav 0,15
+ - +	glükometilóz 0,36	szorbóz 0,24	
+ - -	ükometilóz 0,38		
- + -	mannometilóz 0,38	tagatóz 0,27	mannuronsav 0,18
- + +	idometilóz 0,51		
- - +	galaktometilóz 0,265		galakturonsav 0,13
- - -	talometilóz 0,48		

* Etilacetát-piridin-víz = 2 : 1 : 2

** Sorrendben 2, 3, 4-es hidroxilcsoport, a gyűrű síkja felett (+), ill. alatt (-).

*** Etilacetát-ecetsav-víz = 3 : 1 : 3

A szénhidrátok papírkromatografálásánál az ismert papírtípusok (pl. Whatman 1, 2, 3; Schleicher - Schüll 2040b, 2071, 2043b, 2045a stb.) néhány kivételtől eltekintve külön tisztítás vagy előkezelés nélkül használhatók. Gyors kvalitatív elválasztáshoz a Whatman 1-es, a Schleicher - Schüll 2040b és 2045a papírok, kvantitatív analízisnél Whatman 3, Schleicher - Schüll 2071 és 2043b papírok az alkalmasabbak. Whatman 1 és 3-as, valamint Schleicher - Schüll 2043b papírokkal majdnem minden szénhidrát-papírkromatográfias feladat megoldható.

Papírjainkat különös gonddal kell tárolni és kezelni. Gyűrött, törött vagy kikopott, sőt poros, ujjlenyomatot papír kellemetlen meglepetéseket okozhat mind az egyszerű futtatásnál, mind a reprodukálандó sorozatoknál, a kvantitatív elválasztásról és kiértékelésről nem is szólva.

Az egy pontba felvihető anyag mennyisége elsősorban a papír kapacitásától függ és általában 50 - 500 mikrogramm komponensenként. Kimutathatók 1 - 5 gamma cukrot tartalmazó foltok is, de szükség lehet 5 - 10 mg felvitelére is, olyankor, ha pl. adott szénhidrát mellett kis mennyiségben jelenlevő kísérőket is szeretnénk meghatározni. Jó példa erre a keményítõhidrolizátum, vagy glükóz savas reverzátumának papírkromatográfias vizsgálata. Mindkét esetben meg lehetõsen nagymennyiségû glükóz mellett kell több, kis mennyiségben jelen-

levő di- és oligoszaharidot elválasztani. Sajnos, ha a papír kapacitását túlzottan megterheljük, elkenődik a folt, elfedve vele a kísérőket is. Az említett példák esetében, ha más papírra való áttérés nem segít, a glükóz leerjesztésével, vagy más módszerrel való eltávolításával lehet megpróbálkozni.

A folt elkenődése különösen gyakori a cukorsavak esetében. Ez esetben a futtató oldószer aciditásának növelésével javíthatunk a problémán.

A kromatografálni kívánt szénhidrátok gyakran előzetes előkészítést kívánnak. Ezek leggyakrabban extrakció, hidrolízis, sómentesítés, enzimes kezelés, bepárlás vagy hígítás és céljuk minden esetben, hogy eredményükként a vizsgálandó cukrok 0,1 – 1%-os vizes, vagy piridines, vagy 50 – 80% alkoholt tartalmazó oldatban legyenek. Híg, vagy nehezen elpárolható oldószeres oldat a felvitelt időben elnyújtja, vagy megnehezíti. (Pl. 0,1 ml vizes oldat pontszerű felvitelle Whatman 1-es papírra 20 – 40 percet is igénybevesz.)

Kismennyiségű tömény oldatok felvitelénél mikropipetta vagy Agla-mikrofecskendő használatát javasolja a szakirodalom, de ezek igen jól helyettesíthetők az olcsóbb és könnyebben beszerezhető, vörösvérsejtek számlálásakor alkalmazott orvosi pipettákkal, vagy az ugyancsak orvosi célra gyártott ún. tuberkulin-fecskendőkkel, ha megfelelő kis átmérőjű tűt erősítünk rájuk.

A felvitelnél sokan előszeretettel alkalmaznak melegre állított hajszárítót is, meggyorsítva ezáltal a folt száradását. Az óvatos melegítés valóban megengedhető, de tapasztalataink szerint nehéz megtalálni a szénhidrát szempontjából a meleg és túl meleg közötti határt, s a melegítés vagy degradációhoz, vagy a cukor és a papír anyaga közt létrejövő tisztázatlan kapcsolatokhoz vezet. A degradáció veszélyessége kézenfekvő, az utóbbi effektus pedig a felvitt anyag egy részének a startponton való visszamaradásához vezethet.

A szénhidrátok futtatására számos két- és háromkomponensű oldószerrendszer ismert, amelyek jól alkalmazhatók mono- és oligoszaharidok, valamint ezek származékainak futtatásához. Ezek mindegyike lényegében egy kis viszkozitású, vízzel elegyedő komponensből és vízből, valamint egy, a vízfelvételt növelő komponensből áll. Az egyes oldószerrendszereket a szakirodalom megfelelő mélységben ismerteti, s kiválasztásukhoz is segítséget nyújt. Csoportosításuk sokféle lehet, ezek közül egy, pl. a kémhatás alapján történő csoportosítás. Ennek alapján az oldószerrendszerek savas, alkálikus vagy semleges kémhatásúak lehetnek. Mono- és oligoszaharidok elválasztására általában mind alkalmasak; cukorsavak futtatásához a savas rendszerek, míg dezoxicukrok, laktonok és cukoranhidridek elválasztásához inkább az alkálikus rendszerek megfelelőbbek.

A futtatási idő szobahőmérsékleten az alkalmazott technikától és a papír méreteitől függően néhány órától több napig tarthat. Éppen az említett keményítőhidrolízis és reverziótermékek vizsgálatánál olyan oldószeres biztosították a legjobb elválást, amelyekkel 120 – 170, sőt 480 órás futtatásokra volt szükség. (Oldószeres: etilacetát-piridin-víz = 8 : 2 : 1; n-propanol-etilacetát-víz = 7 : 1 : 2 és amilalkohol-denaturáltszesz-víz = 54,2 : 25,4 : 20,3). Ilyen hosszú futtatási időnél egy újabb, eddig nem említett probléma merülhet fel, s ez az állandó hőmérsékletbiztosítása, különösen akkor, ha pl. a nappali és éjszakai hőmérsékletkülönbségek nagyok. Ilyenkor magasabb hőmérsékleten telítődik a kád légtere az oldószer gőzeivel, s éjjel a lehűléssel együtt lekondenzál. Lekondenzál, de nemcsak az edény falára, hanem a papírra is, és elfolyást, front-torzulást okoz.

Előfordulhat, hogy többnapos futtatás esetén sem megfelelő az elválasztás. Ilyenkor segíthet a kétdimenziós, a túlfolytatásos, esetleg az ismételt futtatásos technika alkalmazása.

Leszálló technikánál alkalmazott túlfolytatásos futtatásnál az oldószer – miután elérte a kromatogram-papír alját, – lecesegetni hagyjuk. Ilyenkor elő-

fordulhat, hogy a papír alján az oldószer felgyülemlik és csak a papír legmélyében fekvő sarkán, esetleg hibás pontján csepeg le. Ennek eredményeként eltorzulhatnak és összefolyhatnak az egyes zónák. A jelenséget a papír aljának „cakkozásával” kerülhetjük el. Minél sűrűbb a cakkozás, annál egyenletesebben csepeg le az oldószer. Ilyenkor természetesen sor kerülhet néhány gyorsan futó, ezért a túlfolyatásnál a papírról leluálódó komponens „feláldozásával”. Ezeket természetesen rövidebb ideig tartó futtatással identifikálhatjuk, vagy a lecsöpögő oldószerrel együtt felfogva, bepárlás után meghatározhatjuk. Mivel az oldószerfront elmozdulása a túlfolyatásos futtatásnál nem mérhető le, az egyes foltok elmozdulását valamely ismert R_f -ű komponensre vonatkoztatva célszerű megadni.

Az ismételt futtatást megfelelően nagy R_f -ű, de egymáshoz közeleső, összeolvadó foltok szétválasztására használjuk. Ismételt futtatásnál, miután az oldószerfront vagy túlfolyatással kombinált technika esetén a leggyorsabban haladó folt a papír aljához ért, a papírt megszáritjuk és újra futtatjuk. Ezt többször is meg lehet ismételni. Az ismételt futtatás hatására az egyes foltok hossza a futtatás irányában megrövidül, sőt az elkenődés is csökkenthető. Az ismétlések időtartama lehet azonos, vagy különböző. Azonos időtartamokra bontásnál a kívánt elmozduláshoz az egyszerű futtatásnál szükséges időhöz annyszor adjuk hozzá az oldószerfrontnak a papír aljáig való futásának az idejét, ahányszor ismétlünk, s ezt az összydőt bontjuk fel az ismétlések számának megfelelően egyenlő részekre. Természetesen végezhetők az ismétlések úgy is, hogy először úgy futtatunk, mint ismétlések nélkül futtatnánk, s ezt követően az ismétléseknél csak a papír aljáig futtatjuk az oldószert.

A módszer előnye, hogy a nagyobb R_f -ű foltok is a papíron maradnak, s a foltok is koncentráltabbak lesznek, ami főként kvantitatív kiértékelésnél jelent előnyt. Az előnyökkel szemben a módszer idő- és munkaigényessége jelentkezik hátrányként. Ismételt futtatásnál az R_f -értékeket vagy valamely ismertebb komponensre lehet megadni, vagy Matthias módszerével kiszámítani. (2. ábra).

Kvantitatív kiértékelésnél a papíron szétvált szénhidrátokat valamilyen reagens segítségével tesszük láthatóvá. Az előhívás a szénhidrátok vagy származékuk valamely csoportjának színreakciója alapján történik. Legelterjedtebbek az ammóniás ezüstnitrát, az alkálikus difeniltetrazoliumklorid, a nátriumperjodattartalmú hívók, valamint a különböző fenolos és amintartalmú reagensok.

A részletes ismertetés helyett itt is a szakirodalomra szeretnék utalni, amelyből adott feladathoz mindig a legmegfelelőbbet, mondhatni a legjobban „tetszőt” választhatjuk ki. Többségükben nagy érzékenyséű, 1–5 gamma cukor kimutatására is alkalmas reagensok.

Ha kvantitatív kiértékelést akarunk végezni, felvitel és futtatás előtt célszerű kimosni a papírt. Ezt végezhetjük pl. vízzel vagy éppen a futtató oldószerral. Futtatás után, a kiértékelésnél úgy járhatunk el, hogy valamilyen módszerrel (pl. párhuzamosan kezelt kontrollcsíkok előhívásával) előhívás nélkül lokalizáljuk az egyes komponenseket, majd a kromatogramot keresztben csíkokra vágva, eluáljuk az egyes foltokat. Az eluátum ezután tetszőleges szénhidrát mikromódszerrel határozható meg. Természetesen vakpróbát is kell végezni, egy üres papírreszt eluálva. Kontrollcsíkokat célszerűen a főmező mindkét oldalán futtatunk, s még így is csak elferdült front esetén tudjuk előhívás nélkül helyesen felválni fő-kromatogramunkat. Rendszertelen frontorzulás esetén gyakorlatilag újra lehet kezdeni a futtatást. A kvantitatív kiértékelés végezhető elució nélkül is, ha a papírkromatogramot előhívás után paraffinolajjal impregnáljuk, légtelenítjük, majd fotodenzitometrálljuk. A módszer lényegesen egyszerűbb, gyorsabb, de sajnos pontosatlanabb is, mint az elució eljárások, éppen az előhívás és preparálás miatt.

Külön figyelmet érdemelnek a radioaktív izotópos módszerek. Radiometriás eljárásnál vagy maguk az elválasztandó anyagok aktívak vagy a papírra felvitel előtt keverjük hozzájuk a jelzett vegyületeket; esetleg inaktív vegyületeket futtatva, utólag, neutron besugárással tesszük aktívvá azokat. Izotópok alkalmazásakor a papírkromatografálás technikája lényegében változatlan marad, a kiértékelésnél viszont új, kvantitatív értékelési lehetőségeket kapunk. Legelterjedtebbek az autoradiográfiás, a Geiger-Müller számlálócsöves és szcintillációs módszerek.

Autoradiografálásnál a kiértékelendő kromatogramot sötétben röntgen-filmmel takarjuk le, és üveglappal vagy más nehezekkel rögzítjük. Kémiai expozíció elkerülése céljából vékony cellofán vagy műanyagfóliát is lehet tenni a film és a papír közé, de ez lágyszugárzók esetében a fólia sugáradszorpciója miatt kerülendő.

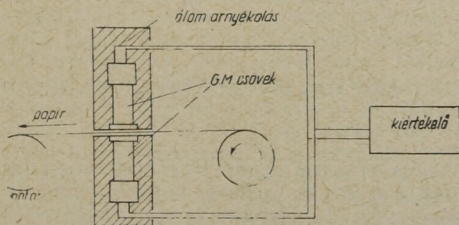
Az expozíció ideje a felvitt aktivitástól függ, általában 10^7 impulzus/cm² nagyságrendű. A szénhidrátoknál leggyakrabban alkalmazott izotópok a C¹⁴, H³, O¹⁸ és P³². Ezeknél kb. 6 napos expozícióval, 0,005 mikro-curie a kimutatható alsó határa. Nagyobb aktivitások néhányórás expozícióval is kimutathatók.

Az exponált és előhívott filmek vizuálisan vagy denzitometrállással értékelhetők ki. Természetesen kvantitatív értékelésnél teljesen azonos módon kell kezelni az egyes negatívokat. A módszer nagy előnye, hogy pl. elégtelen szétválás esetén a kromatogram tovább futtatható, mint azt pl. radioaktív bioszintézis útján nyert cukorkeverékek szétválasztásánál számtalanszor meg is tettük.

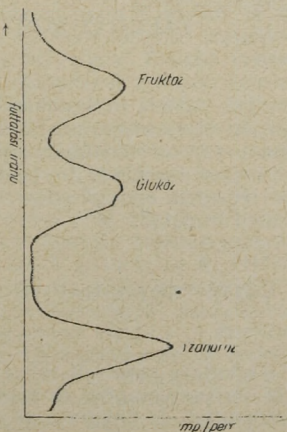
A Geiger-Müller számlálócsöves kiértékelőknél (3. ábra) a vizsgálandó kromatogramot végablakos vagy átáramlásos GM-csővek ablaka előtt húzzuk el.

Shakaszos, kézi elhúzásnál a percnkénti beütésszámváltozást mérjük, míg ha a kromatogramot szinkronmotorral mozgatjuk, a kapott impulzusok írószerkezetre vihetők át, amely kirajzolja a foltok aktivitáseloszlását. A felrajzolt maximumok vonal alatti integrálja planimétrálással megállapítható és az ablak, a papír és a műszerpapír elmozdulását, valamint a hatásfokot figyelembevevő faktorokkal való beszorzás után kapjuk a foltok aktivitását.

Ilyen berendezést egyszerűen összeállítani, mint azt mi is megtettük, és kb. 2 éve nemcsak kutatómunkánkban, hanem vegyészhallgatóink laboratóriumi gyakorlatainál is sikeresen használjuk. (4. ábra).



3. ábra. Radiokromatogramm-kiértékelő vázlata



4. ábra. Radiokromatogram aktivitáseloszlási görbéje fruktóz, glükóz, szaharóz elegyének elválasztása után

Radiokromatogram foltjait egyébként eluálhatjuk egyenként is, és vagy beszárítás után, vagy folyadékfázisban mérhetjük aktivitásukat. Utóbbi esetben a mérést vagy mérülő GM-csővel, vagy folyadékszintillációs módszerrel végezzük. A folyadékszintillációs módszernél a radioaktív cukoreluátumot, setleg közvetlenül a kivágott kromatogramcsikot speciális szintillátoroldattal együtt egy kis edénykébe helyezzük, s a keletkező felvillanásokat árammá alakítva mérhetjük a bevitt anyag aktivitását. Ilyen mérőberendezés is működik tanszékünkön, és főleg igen kis aktivitások észlelésére igen jól alkalmazható. Maga az eluálást követő aktivitásmérés különösen előnyös olyan esetekben, ahol az eluátumot más célra is fel akarjuk használni.

БУМАЖНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ УГЛЕВОДОВ

M. Tom

Автор сообщает условия бумажной хроматографии углеводов. Обсуждает действие структуры углеводов и техники хроматографии на элюацию. В рамках нисходящего растворения подробно сообщает повторный, переливной и радиохроматографический метод.

PAPIERCHROMATOGRAPHIE VON KOHLENHYDRATEN

M. Tóth

Verfasser bespricht die bei der Papierchromatographie von Kohlenhydraten zu beachtenden Gesichtspunkte. Er behandelt den Einfluss der Struktur und der chromatographischen Technik auf die Eluierung der Kohlenhydrate. Bei der absteigenden Methode erörtert er die wiederholte, die ausfließende sowie die radiochromatographische Methode eingehender.

PAPER CHROMATOGRAPHY OF CARBOHYDRATES

M. Tóth

The aspects to be taken into account in the paper chromatographic investigation of carbohydrates are described by the author. Also the effect of the structure of carbohydrates and of the chromatographic technique on the elution process is discussed. In connection with the descendent running technique, the repeated and overflow methods and radiochromatographic method are treated in detail.

LA CHROMOTOGRAPHIE AU PAPIER DES HYDRATES DE CARBONE

M. Tóth

L'auteur passe en revue les points de vue à prendre en considération quant à la chromatographie au papier des hydrates de carbone. Il traite l'effet de la constitution de l'hydrate de carbone et de la technique de la chromatographie sur l'évaluation. En parlant de la méthode descendante il donne des détails concernant les méthodes à répétition et à débordement, et aussi la méthode radiochromatographique.