

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XVI, 28

SECTIO D

1961

Z Katedry i Zakładu Chemii Ogólnej Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Lublinie
Kierownik: doc. dr Irena Krzeczowska

Irena KRZECZKOWSKA i Tadeusz NIEZGODA

**Badania nad przemianą węglowodanową w płynnej hodowli laseczki
tężca. I**

**Исследования углеводного обмена в жидкой культуре
палочки столбняка. I**

**Investigations on Carbohydrate Metabolism in Liquid Culture of the
Tetanus Bacillus. I**

Chromatograficzna analiza węglowodanów po raz pierwszy została systematycznie opracowana przez Partridge w r. 1948 (7). Następnie pojawiło się szereg prac i krótkich doniesień z tego zakresu (między innymi 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8), ale z powodu dużych trudności w doborze odpowiednich rozpuszczalników oraz czułych wywoływaczy dotąd metodyka chromatograficznej analizy cukrów jest opracowana znacznie gorzej niż aminokwasów.

Podjęte przez nas badania nad przemianą węglowodanową w płynnej hodowli laseczki tężca wymagały dokładnego opracowania metody wykrywania i identyfikowania cukrów, co skłoniło nas do poświęcenia I części pracy badaniom metodycznym. Na pierwszy plan wysunięto zagadnienia: 1) Ustalenie warunków w których uzyskiwane chromatogramy będą się najkorzystniej kształtowały. 2) Oznaczenie wartości R_f cukrów w przyjętych warunkach doświadczalnych. 3) Opracowanie odpowiednich warunków do rozdziłu cukrów o zbliżonych R_f .

Badano jakość otrzymanych plam, wartość R_f i możliwość rozdziłu w zależności od różnych czynników: rodzaju stosowanej techniki chromatograficznej, wielkości kamery, gatunku bibuły, używanego układu rozpuszczalników, stężenia badanych roztworów, temperatury, substancji towarzyszących, czasu spływu, odczynnika wywołującego oraz sposobu i temperatury wywołania.

METODY I MATERIAŁY

Metody chromatograficzne używane w badaniach

Badania przeprowadzono metodą rozdzielczej chromatografii bibułowej, używając technik: a) wstępującej wprowadzonej przez Williamsa i Kirby (9), b) spływowej (zstępującej) oraz c) krążkowej zmodyfikowanej przez Zimmermanna i Nehringa (10).

a) Chromatografię wstępującą przeprowadzano w szklanym akwarium lub eksykatorze nakrytym szklanym dzwonem. Rozpuszczalnik umieszczano w płytce Petriego. Arkusze bibuły zwijano w kształcie walca (brzezi zeszywano).

b) Jako kamera przy technice spływowej służył szklany cylinder o średnicy 10 cm i wysokości 45 cm z obsadzonym u góry naczynkiem z rozpuszczalnikiem oraz szafka drewniana, oszklona, o wymiarach 32 x 50 x 56 cm. W górnej części oszklonej kamery umieszczona była szklana rynienka sporządzona z rury z wyciętą wzdłuż szczeliną. Obok rury, równolegle do niej, umieszczono bagietki szklane, służące do podtrzymywania zanurzonego w rynience i zwieszającego się arkusza (lub pasków) bibuły. Bibułę zanurzoną w rynience przytrzymywano płytkami szklanymi (szkiełkami przedmiotowymi) wsuniętymi do szczeliny.

c) Do chromatografii krążkowej używano eksykatora o średnicy 25 cm lub płytek Petriego nakrytych dwoma szklanymi szybkami, z których dolna posiadała w środku otwór o średnicy 0,5 cm.

Bibuła chromatograficzna

Do badań używano bibuły Whatman N 1, 2, 3, 4.

Sposób nakropienia

Nakraplano równocześnie 9—10 prób. Odległość między miejscami nakropienia 2—2,5 cm, od brzegów bocznych 3 cm, a od końca bibuły 4 cm. Substancje наносono pasmowo na linię startu mikropipetką o pojemności 31 μ l. W czasie nakraplania suszono bibułę suszarką fryzjerską (Fön); po rozwinięciu chromatogram rozwieszano w pozycji pionowej i suszono w temp. pokojowej.

Układy rozpuszczalników

Do rozwijania chromatogramów używano następujące układy rozpuszczalników:

- 1) n-propanol-pirydyna-benzen-wersenian sodu 0,5% w stosunkach objętościowych: a) 50:20:20:10, b) 50:20:15:10, c) 50:20:10:10, d) 50:20:5:10, e) 50:20:0:10, f) 30:30:20:20, g) 30:30:30:10, h) 40:20:30:10, i) 40:20:30:20;
- 2) n-butanol-pirydyna-woda w stosunku: 45:25:20;
- 3) octan etylu-pirydyna-woda w stosunku obj. 5:1:5;
- 4) n-propanol-amoniak ($d = 0,88$) -wersenian sodu 0,5% w stosunku obj. 60:30:10.

Wywoływanie rozwiniętych chromatogramów oraz sposób wywoływania

Do wywoływania używano odczynników:

- 1) anilinowego: 1 m roztwór aniliny w etanolu i 1 n roztwór kwasu szczawioowego.
- 2) rezorcynowego: 1% roztwór rezorcyny w etanolu i 0,2 n kwas solny w stosunku obj. 1:1.
- 3) amoniakalnego roztworu azotanu srebra: 0,1 n AgNO_3 oraz 5 n roztwór NH_4OH w stosunku obj. 1:1. W celu uniknięcia zaciemnienia tła bibuły, po wywołaniu wymywano bibułę 0,02 m roztworem tiosiarczanu sodu, a później krótko wodą. Odczynniki do sporządzania rozpuszczalników świeżo destylowano. Chromatogramy wywoływano przez zanurzenie, po wysuszeniu w temp. pokojowej, ogrzewano w suszarce z termoregulatorem w ciągu 5—10 minut w temp. 95—100°C.

Substancje i odczynniki używane w pracy

Wzorce sporządzano z 0,5% roztworów następujących chemicznie czystych węglowodanów: laktoza, cellobioza, maltoza, sacharoza, galaktoza, glukoza, fruktoza, mannoza, arabinoza, ksyloza, riboza. Nakraplano różne ilości płynów wzorcowych. Wywoływacze sporządzano z chemicznie czystych odczynników, rozpuszczając je w wodzie redestylowanej.

BADANIA WŁASNE

W badaniach stosowano techniki: 1) wstępującą, 2) spływową (zstępującą) i 3) krążkową. W dwóch pierwszych nakraplano na jednym arkuszu 9 prób jednocześnie. Aby i przy metodzie krążkowej wytworzyć identyczne warunki ustawiano 9 płytek Petriego, pokrytych dwoma szybkami szklanymi jedna na drugiej, obciążano najwyższą i przykrywano szklanym dzwonem, uszczelniając bardzo dokładnie cały aparat. Dolna szybka przykrywająca płytkę Petriego posiadała w środku otwór o średnicy 0,5 cm. Między dwie płytki wkładano kwadrat bibuły z umocowanym w środku paseczkiem bibuły w ten sposób, aby przechodził on przez otwór w dolnej płytce i zanurzał się w rozpuszczalniku znajdującym się w szkiełku wagowym wewnątrz płytki Petriego.

Równoczesne rozwijanie w tych samych warunkach 9 nakroplonych chromatogramów trzema różnymi technikami pozwalało na badania porównawcze i ułatwiało ustalenie wpływu różnych czynników na wartość R_F .

1) Wpływ techniki chromatograficznej na wartość R_F . Wartości R_F uzyskane trzema różnymi technikami zestawione są w tabeli 1 oraz pokazane na ryc. 1, 2, 3.

Tab. 1. Wpływ techniki chromatograficznej na wartość R_F
Influence of chromatography technique on R_F values

Lp.	Nazwa cukru	R_F przy chromatografii		
		wstępującej	spływowej	krążkowej
1	Laktoza	0,079	0,210	0,155
2	Cellobioza	0,107	0,280	0,185
3	Maltoza	0,126	0,299	0,210
4	Sacharoza	0,196	0,363	0,232
5	Galaktoza	0,272	0,398	0,299
6	Glukoza	0,338	0,459	0,321
7	Fruktoza	0,393	0,522	0,338
8	Mannoza	0,405	0,531	0,336
9	Arabinoza	0,405	0,522	0,341
10	Ksyloza	0,472	0,577	0,359
11	Riboza	0,551	0,612	0,413

Podane liczby są średnimi z 5—8 wyników. Warunki doświadczalne: Temp. 18°C. Stężenie roztworów 0,5%. Bibuła — Whatman N. 3. Ilość substancji nakroplonej 31 μ l. Układ rozpuszczalnika: n-propanol-pirydyna-benzenwersenian sodu 0,5%, w stosunku obj. 50:20:20:10. Czas spływu dla techniki wstępującej 24—25 godz.; dla techniki spływowej 12—14 godz.; dla krążkowej 3—4 godzin.



Ryc. 1. Wpływ metody chromatograficznej wstępującej na wartość R_F
Influence of ascending chromatography method on the R_F value



Ryc. 2. Wpływ metody sływowej (zstępującej) na wartość R_F
Influence of descending method on the R_F value

2) Wpływ wielkości kamery na wartość R_F . Doświadczenie wykonywano w kamerach o różnej wielkości. Zastosowano technikę wstępującą. Wyniki podano w tabeli 2 oraz na ryc 1, 4, 6 i 7.

3) Wpływ bibuły na wartość R_F . Oznaczano R_F na bibule Whatman N 1, N 2, N 3 i N 4 stosując technikę wstępującą. Wartości R_F (średnie z 3 do 9 pomiarów) zestawiono w tabeli 3.

4) Wpływ układu rozpuszczalnika na wartość R_F (technika wstępująca). Oznaczano wartości R_F dla układów rozpuszczalników:

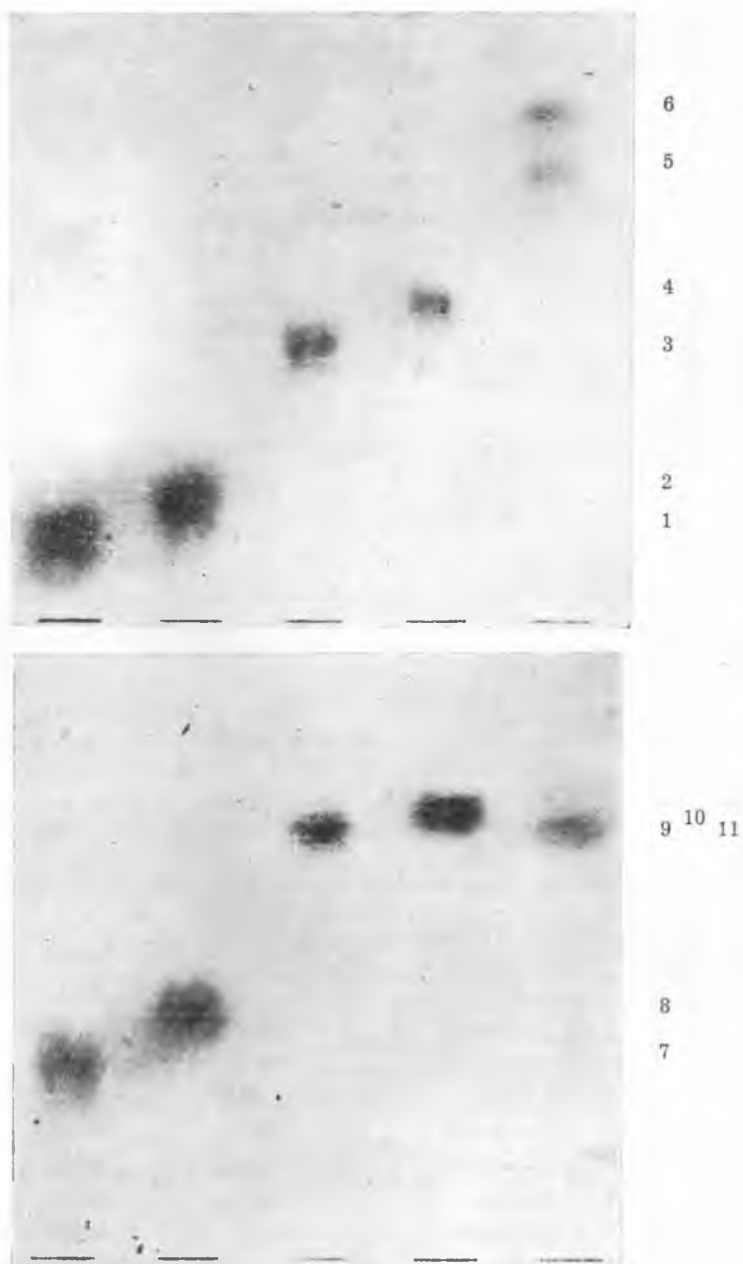


Ryc. 3. Wpływ metody krążkowej na wartość R_F (nakropiono cukry: cellobiozę, galaktozę, fruktozę (na rycinie nie widać) i ksylozę
Influence of disc method on the R_F value (studied sugars: cellobiose, galactose, fructose (not to be seen in the Figure), and xylose)

Tab. 2. Wpływ wielkości kamery na wartość R_F . (Doświadczenia przeprowadzono techniką wstępującą)
Influence of size of camera on R_F values (ascending technique)

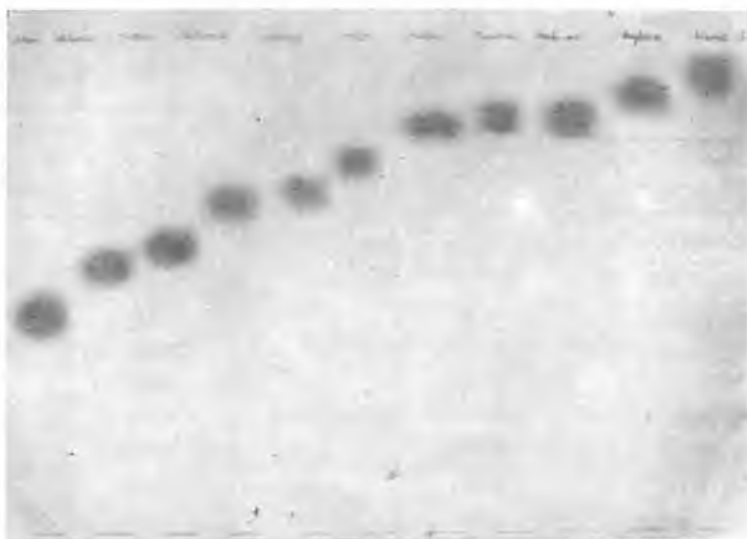
Lp.	Nazwa cukru	Kamera duża	Kamera mała
1	Laktoza	0,079	0,107
2	Cellobioza	0,107	0,144
3	Maltoza	0,126	0,200
4	Sacharoza	0,196	0,235
5	Galaktoza	0,272	0,334
6	Gluchoza	0,338	0,374
7	Fruktoza	0,393	0,507
8	Mannoza	0,405	0,512
9	Arabinoza	0,405	0,528
10	Ksyloza	0,472	0,545
11	Riboza	0,551	0,620

Liczby są średnie z 3 do 9 pomiarów. Warunki doświadczalne jak w tabeli 1.

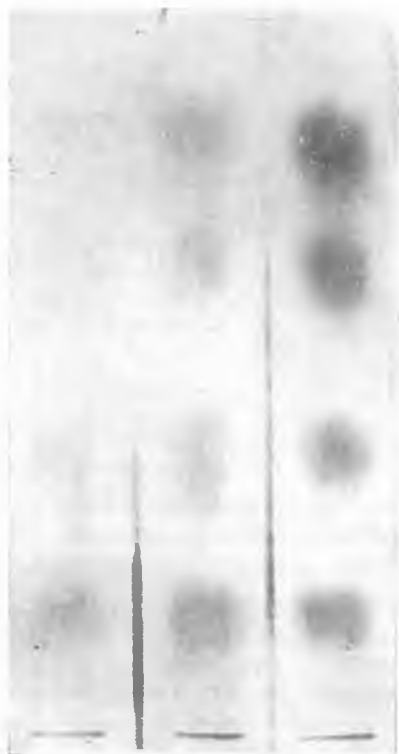


Ryc. 4. Nakroplone cukry: 1 — laktoza, 2 — cellobioza, 3 — galaktoza, 4 — glukoza, 5 — ksyloza, 6 — riboza, 7 — maltoza, 8 — sacharoza, 9 — mannoza, 10 — arabinoza, 11 — fruktoza

Studied sugars: 1 — lactose, 2 — cellobiose, 3 — galactose, 4 — glucose, 5 — xylose, 6 — ribose, 7 — maltose, 8 — saccharose, 9 — mannose, 10 — arabinose, 11 — fructose



Ryc. 5. Wpływ układu rozpuszczalnika na wartość R_f . Na ryc. chromatogram z rozpuszczalnikiem: n-propanol-pirydyna-woda w stosunku (50:20:10)
 Influence of solvent system on R_f values. Figure shows chromatogram obtained with the solvent system: n-propanol-pyridine-water (50:20:10)



Ryc. 6. Wpływ stężenia na wartość R_f i kształtowanie się plam (nakroplono: laktozę, sacharozę, glukozę i arabinozę)
 Influence of concentration on R_f values and on formation of spots (studied sugars: lactose, saccharose, glucose and arabinose)

1) n-propanol-pirydyna-benzen-wersenian sodu 0,5% (w stosunkach objętościowych):
 a) 50:20:20:10, b) 50:20:15:10, c) 50:20:10:10,
 d) 50:20:5:10, e) 50:20:0:10.

2) n-butanol-pirydyna-woda (45:25:20) obj.

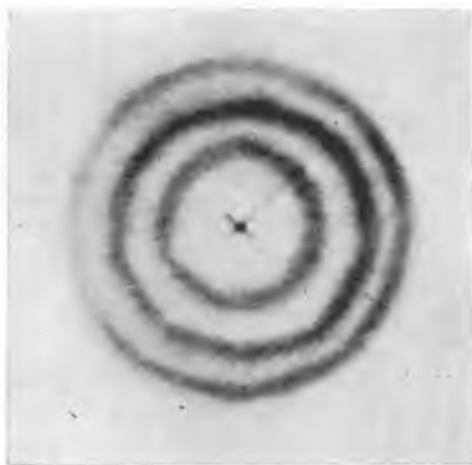
3) octan etylu-pirydyna-woda (5:1:5) obj.
 Tabela 4 oraz ryc. 1 i 5 ilustrują część uzyskanych wyników.

Tab. 3. Wpływ gatunku bibuły na wartość R_F . (Badania przeprowadzono techniką wstępującą)

Influence of kind of filter paper on R_F values (ascending technique)

Lp.	Nazwa cukru	Bibuła Whatman			
		N 1	N 2	N 3	N 4
1	Laktoza	0,103	0,106	0,079	0,103
2	Cellobioza	0,135	0,140	0,107	0,156
3	Maltoza	0,175	0,157	0,126	0,173
4	Sacharoza	0,226	0,210	0,196	0,250
5	Galaktoza	0,296	0,272	0,272	0,319
6	Glukoza	0,362	0,330	0,338	0,375
7	Fruktoza	0,416	0,347	0,393	0,428
8	Mannoza	0,426	0,392	0,405	0,461
9	Arabinoza	0,424	0,400	0,405	0,459
10	Ksyloza	0,495	0,470	0,472	0,504
11	Riboza	0,559	0,532	0,551	0,574

Liczby są średnie z 3 do 9 pomiarów. Warunki doświadczalne jak w tabeli 1.



Ryc. 7. Wpływ temperatury na wartość R_F . Chromatogram uzyskany w temp. 6°C
Influence of temperature on R_F values. Chromatogram obtained at 6°C

5) Wpływ ilości nakropionej substancji na wartość R_F . R_F badano nakraplając różne ilości mieszaniny 11 cukrów. Chromatogram rozwijano metodą wstępującą. Wyniki zawiera tabela 5 i ryc. 6.

6) Wpływ temperatury na wartość R_F . Badania przeprowadzono w temp. 6°C, 18°C i 30°C. Chromatogramy rozwijano metodą krążkową, nakraplając po 3—4 cukrów na każdy krążek. Wyniki pomieszczono w tabeli 6 oraz ryc. 7 i 8.



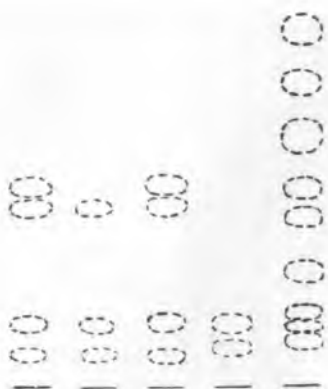
Ryc. 8. Wpływ temperatury na wartości R_F . Chromatogram uzyskany w temp. 18°C
 Influence of temperature on R_F values. Chromatogram obtained at 18°C

Tab. 4. Wpływ układu rozpuszczalnika na wartość R_F
 (Metoda wstępująca. Cukry nakraplane pojedynczo)

Influence of solvent system on R_F values (ascending method, sugars placed separately on filter paper)

Lp.	Nazwa cukru	Rozpuszczalniki						
		1-a	1-b	1-c	1-d	1-e	2	3
		50 : 20 : 20 : 10	50 : 20 : 15 : 10	50 : 20 : 10 : 10	50 : 20 : 5 : 10	50 : 20 : 0 : 10	45 : 25 : 20	5 : 1 : 5
1	Laktoza	0,079	0,099	0,120	0,146	0,207	0,276	0,007
2	Cellobioza	0,107	0,137	0,163	0,191	0,271	0,343	0,008
3	Maltoza	0,126	0,168	0,196	0,222	0,311	0,368	0,009
4	Sacharoza	0,196	0,204	0,268	0,314	0,411	0,425	0,024
5	Galaktoza	0,242	0,313	0,344	0,388	0,474	0,460	0,049
6	Glukoza	0,338	0,358	0,400	0,442	0,537	0,499	0,062
7	Fruktoza	0,393	0,423	0,478	0,510	0,584	0,527	0,093
8	Mannoza	0,405	0,442	5,488	0,517	0,597	0,534	0,088
9	Arabinoza	0,405	0,454	0,488	0,518	0,589	0,588	0,112
10	Ksyloza	0,472	0,506	0,558	0,583	0,641	0,588	0,166
11	Riboza	0,551	0,583	0,619	0,637	0,688	0,629	0,287

Liczby są średnie z 3 do 9 pomiarów. Warunki doświadczalne jak w tabeli 1.

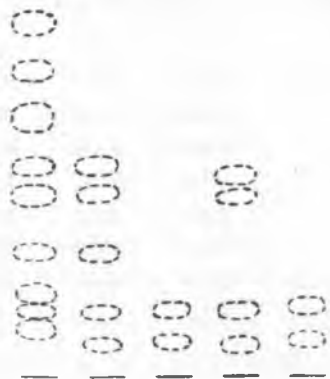


Ryc. 9. Chromatogram podłoża i przesączu płynnej hodowli laseczki tężca (seria 93 i 94). Z prawej strony sztuczna mieszanina cukrów
 Chromatogram of substratum and filtrate of liquid culture of the *tetanus bacillus* (series 93 and 94). On the right: artificial mixture of sugars

Tab. 5. Wpływ ilości nakropionej substancji na wartość R_F
 Influence of quantity of studied substance on R_F values

Lp.	Nazwa cukru	Ilość mieszaniny w μ l			
		31	62	93	124
1	Laktoza	0,097	0,085	0,083	0,083
2	Cellobioza	0,122	0,119	0,115	0,122
3	Maltoza	0,142	0,128	0,125	0,142
4	Sacharoza	0,218	0,196	0,201	0,188
5	Galaktoza	0,275	0,266	0,261	0,289
6	Glukoza	0,330	0,328	0,319	0,310
7	Fruktoza	0,397	0,393	0,385	0,393
8	Mannoza	0,403	0,396	0,393	0,401
9	Arabinoza	0,415	0,406	0,408	0,401
10	Ksyloza	0,468	0,466	0,475	0,491
11	Riboza	0,539	0,532	0,546	0,550

Liczby są średnimi z dwóch do trzech wyników. Warunki doświadczalne jak w tabeli 1. Technika: chromatografia wstępująca. Nakraplano mieszaninę 11 cukrów.



Ryc. 10. Chromatogram podłoża i przesączu płynnej hodowli laseczki tężca (seria 105 i 108)

Chromatogram of substratum and filtrate of liquid culture of the *tetanus bacillus* (series 105 and 108)

Tab. 6. Wpływ temperatury na wartość R_F
Influence of temperature on R_F values

Lp.	Nazwa cukru	Temperatura		
		6°C	18°C	30°C
1	Laktoza	0,143	0,155	0,158
2	Cellobioza	0,151	0,185	0,197
3	Maltoza	0,159	0,210	0,215
4	Sacharoza	0,220	0,232	0,242
5	Galaktoza	0,231	0,239	0,268
6	Glukoza	0,290	0,321	0,337
7	Fruktoza	0,300	0,338	0,341
8	Mannoza	0,305	0,336	0,345
9	Arabinoza	0,312	0,341	0,363
10	Ksyloza	0,348	0,359	0,421
11	Riboza	0,400	0,413	0,500

Liczby są średnie z 9 pomiarów przy temp. 6°C, z 5 przy temp. 18°C i 30°C. Technika krążkowa. Nakraplano na krążek po 3—4 cukry. Warunki jak w tabeli 1.

7) Wpływ substancji towarzyszących na wartość R_F . Obliczono wartości R_F dla poszczególnych cukrów, nakraplając je 1) pojedynczo, 2) w mieszaninie złożonej z 11 cukrów, 3) w mieszaninie z dodatkiem — 5% HCl, 4) z dodatkiem 5% NaOH, 5) z 5% NaCl i 6) z 5% $BaCl_2 \cdot 2H_2O$. Stosowano metodę wstępującą. Wyniki podano w tabeli 7.

8) Wywoływacze, sposób i temperatura wywoływania. Użyto trzech odczynników do wywoływania: 1) anilinowego, uzyskując dla wszystkich cukrów plamy barwy brązowej, 2) rezorcynowego, pozwalającego na rozpoznanie fruktozy i sacharozy, których plamy mają czerwony odcień brązu, podczas gdy pozostałe cukry dają barwę szaro-brązową, 3) amoniakalnego roztworu azotanu srebra dającego brązowe plamy. Wywoływano chromatogramy przez zanurzenie, następnie suszono je w temperaturze pokojowej, a po wysuszeniu ogrzewano w suszarce.

9) Rozdzielanie cukrów. Badano możliwość rozdzielenia cukrów z mieszanin złożonych od 2 do 11 różnych cukrów. Wyniki zebrano w tabelach 1 i 7 (ryc. 1, 8).

Do rozdzielania najlepiej się nadawał, użyty po raz pierwszy, rozpuszczalnik złożony z 4 składników: n-propanol-pirydyna-benzen-wersenian sodu 0,5% w stosunku objętościowym 50:20:20:10. Słabo rozdziela się cellobioza od maltozy, zaś jedną plamę dają: fruktoza, mannoza i arabinoza. Wszystkie pozostałe cukry rozdzieliły się dobrze. Należy zaznaczyć, że uzyskane plamy fruktozy przy użyciu wyżej podanego układu rozpuszczalnika oraz anilinowego wywoływacza wychodzą bardzo słabo; wywoływacz rezorcynowy pozwala na zidentyfikowanie fruktozy we wspólnej plamie dzięki jej odrębnej barwie.

Tab. 7. Wpływ substancji towarzyszących na wartość R_f
 Influence of accompanying substances on R_f values

Lp.	Nazwa cukru	bez dodatku, pojedyncze	bez dodatku, mieszaniny cukrów	Substancje towarzyszące			
				HCl	NaOH	NaCl	BaCl ₂ · 2H ₂ O
1	Laktoza	0,079	0,098	0,083	0,083	0,057	0,092
2	Cellobioza	0,107	0,122	0,101	0,099	0,080	0,124
3	Maltoza	0,126	0,142	0,122	0,181	0,083	0,141
4	Sacharoza	0,196	0,218	0,234	0,268	0,181	0,207
5	Galaktoza	0,242	0,275	0,255	0,268	0,286	0,279
6	Glukoza	0,338	0,330	0,326	0,298	0,319	0,345
7	Fruktoza	0,393	0,397	0,390	0,378	0,387	0,405
8	Mannoza	0,405	0,403	0,391	0,388	0,388	0,423
9	Arabinoza	0,405	0,415	0,411	0,383	0,390	0,433
10	Ksyloza	0,472	0,468	0,491	0,463	0,482	0,504
11	Riboza	0,551	0,539	0,541	0,516	0,539	0,568

Liczby są średnie z 9 wyników. Technika wstępująca. Warunki doświadczalne jak w tabeli 1.

W celu rozdzielenia fruktozy, mannozy i arabinozy wycinano kawałki bibuły, w których znajdowały się razem te węglowodany, przenoszono na inny pasek bibuły i chromatografowano innym rozpuszczalnikiem (fenol nasycony wodą lub fenol-amoniak), używano również techniki dwukierunkowej oraz stosowano: a) wielokrotne rozwijanie chromatogramów, b) ząbkowanie końca bibuły (Partridge 1952), c) zapewniano ciągły spływ rozpuszczalnika przez dotknięcie końca bibuły do płytki szklanej, ustawionej na dnie kamery pod kątem 45° do podstawy (modyfikacja własna oparta na metodzie stosowanej przez Jemieljanową i współpracowników (4).

10) Zastosowanie opracowanej metody do wykrycia cukrów w próbnym chromatogramie podłoża i przesączu płynnej hodowli laseczki tężca.

Przeprowadzono próbną analizę chromatograficzną podłoża i przesączu płynnej hodowli laseczki tężca. Na uzyskanych chromatogramie zidentyfikowano kilka cukrów (ryc. 9, 10). Badanie przemiany węglowodanowej będzie tematem II części pracy.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Głównym celem powyżej opisanych badań było opracowanie metody chromatograficznej umożliwiającej pracę nad przemianą węglowodanową płynnej hodowli laseczki tężca. W pierwszym rzędzie chodziło o ustalenie warunków, w których uzyskiwane chromatogramy będą się najkorzystniej kształtowały. Na kształt plam wpływało stężenie substancji nakraplanej, najlepiej ukształtowane plamy uzyskiwano przy nanoszeniu

30—40 μ l co pokrywa się ze spostrzeżeniami innych autorów (Błok (1), R a c z y ń s k i (8)). Przy dużym stężeniu węglowodanów, plamy były niekształtne, trochę rozmyte, a przy mniejszych, zwłaszcza przy wybranym przez nas rozpuszczalniku i wywoływaczu, plama fruktozy zniknęła. Chcąc uzyskać pożądane stężenie, używano roztworów 0,5%, nakraplając je w różnych ilościach.

Drugim czynnikiem wpływającym na ukształtowanie się plam i wielkość współczynnika R_F był rodzaj używanej techniki chromatograficznej. Z tab. 1 wynika, że największe R_F uzyskuje się przy chromatografii spływowej a z ryc. 1, 4 i 5, że najkształtniejsze plamy osiąga się przy stosowaniu techniki wstępującej. Dużą rolę odgrywało wysycenie kamery (patrz. tab. 2). R_F uzyskiwane w małej kamerze były większe niż w dużej, a plamy kształtniejsze. Spostrzeżenia te pokrywały się z wynikami O p i e ń s k i e j - B l a u t h i współpracowników (6). Kamery należy uszczelniać bardzo dokładnie.

Podstawowym czynnikiem wpływającym zarówno na jakość plam, jak i na R_F jest bibuła filtracyjna, używana do chromatografii. Chromatogramy o najlepszej jakości uzyskiwano na bibule Whatman N 3 i N 1. Plamy na bibule Whatman N 3, która jest znacznie grubsza, były kształtniejsze i łatwiej na tej bibule oznaczało się R_F . Natomiast dla celów elucji oraz przy przenoszeniu mieszaniny cukrów z jednej bibuły na drugą, lepszą okazała się bibuła Whatman N 1. Natężenie barwy było na tej bibule większe. Na bibule Whatman N 2 uzyskiwano plamy dobre, ale rozdział słabszy niż na N 1 i 3. Bibuła Whatman N 4 dała plamy rozmyte. Badane przez nas gatunki bibuły filtracyjnej krajowej nie nadawały się do użytku, zamiast plam uzyskiwano smugi rozmazane na całej długości drogi substancji. Czas spływu również wpływał na kształt i jakość plam. Lepsze wyniki dawało rozwijanie chromatogramu z mniejszą szybkością.

Największą trudność przedstawiało dobranie odpowiedniego rozpuszczalnika. Używane zwykle rozpuszczalniki butanowe dawały małe R_F co powodowało słaby rozdział cukrów. Przebadano szereg rozpuszczalników: 2-składnikowe: fenol-woda, fenol-amoniak, 3-składnikowe: n-butanol-pirydyna-woda w stos. obj. 45:25:20, octan etylu-pirydyna-woda w stos. obj. 5:1:5, n-propanol-amoniak-wersenian sodu 0,5% w stos. obj. 60:30:10, 4-składnikowy po raz pierwszy wprowadzony, n-propanol-pirydyna-benzen-wersenian sodu 0,5% w stosunkach obj.: a) 50:20:20:10, b) 50:20:15:10, c) 50:20:10:10, d) 50:20:5:10, e) 50:20:0:10, f) 30:30:20:20, g) 30:30:30:10, h) 40:20:30:10, i) 40:20:30:20. Część wyników została podana w tab. 4. W tabeli tej zamieszczono tylko dane odnoszące się do rozpuszczalników dających dobrze ukształtowane plamy. Przy wyborze układu zwrócono uwagę na różnicę wielkości R_F poszczególnych

cukrów oraz na jakość plam, a więc na zwartość i różnicę między końcem plamy jednego i początkiem plamy następnego cukru.

Wybrano rozpuszczalnik: propanol-pirydyna-benzen-wersenian sodu 0,5% (w stos. obj. 50:20:20:10), który wprawdzie posiadał różnicę R_F skrajnych cukrów mniejszą niż rozpuszczalniki o takim samym składzie tylko o różnych stosunkach, ale jakość plam uzyskiwanych była znacznie lepsza, dzięki czemu wzajemne odległości plam były większe, a rozdział cukrów lepszy. W czasie badań zaobserwowano, że: 1) dodatek wersenianu wpływał na lepsze ukształtowanie się plam (bez wersenianu sodu plamy były rozmyte), 2) zmniejszenie ilości benzenu wpływało korzystnie na wzrost R_F , ale niekorzystnie na jakość plam, 3) rozpuszczalnik butanolowy dawał plamy ładne, ale rozdział bardzo słaby, 4) najgorszy rozdział w naszych warunkach dał rozpuszczalnik octan etylu-pirydyna-woda, i 5) dało się zaobserwować pewne różnice w zachowaniu poszczególnych cukrów przy tych samych układach rozpuszczalników. Jedne cukry dawały plamy dobrze ukształtowane, inne ogony i R_F u jednych cukrów powiększał się u innych zmniejszał w porównaniu z R_F uzyskanymi przy wybranym rozpuszczalniku.

Przy naszym rozpuszczalniku nie rozdzielały się cukry: fruktoza, arabinoza i mannoza oraz słabo rozdzielała się cellobioza i maltoza, pozostałe rozdzielały się dobrze. Jakość plam przy wybranym rozpuszczalniku, zwłaszcza przy niezbyt wielkich stężeniach roztworów, dla wszystkich cukrów była dobra. Przy innych układach rozpuszczalników niektóre cukry dawały plamy rozmyte lub z ogonami.

Wyniki dotyczące badania wpływu stężenia substancji na wartość R_F (tab. 5) wykazywały, w małych granicach stężeń wyraźnie, na brak takiego wpływu. Uzyskane różnice w wartościach R_F znajdowały się w granicach błędów doświadczalnych.

Wyniki dotyczące wpływu temperatury na wartość R_F podano w tab. 6; widoczny jest wzrost R_F w zależności od wzrostu temperatury od 6°C do 30°C.

Zbyt mała ilość doświadczeń i mały zakres stężeń substancji towarzyszących przy badaniu ich wpływu na wartość R_F nie upoważnia do wyciągania wniosków. Rozszerzanie badań było zbędne, ponieważ jakość uzyskiwanych plam (rozmyte, zniekształcone) wskazała na konieczność usuwania wszelkich soli i zanieczyszczeń z materiału biologicznego przed jego nakropieniem.

Należy nadmienić, że u niektórych cukrów daje się zauważyć pewne różnice w wartości R_F przy nakrapianiu ich pojedynczo i w mieszaninach złożonych z 11 cukrów (kolumna 1, 2 — tab. 7).

Wywoływano chromatogramy, jak podano wyżej, przez zanurzenie, które okazało się znacznie lepsze, ponieważ przy dużych rozmiarach

chromatogramów równomierne opryskiwanie stawało się rzeczą niemożliwą. Ujemną stroną wywoływacza anilinowego i amoniakalnego azotanu srebra była jednakowa dla wszystkich cukrów brązowa barwa plam. Pluszem tego ostatniego wywoływacza jest możliwość uzyskania plam kontrastowych z jasnym tłem. Wywoływacz rezorcynowy, nazwany przez R a c z y ń s k i e g o (8) odczynnikiem uniwersalnym pozwala na łatwe wykrycie fruktozy i sacharozy, ponieważ mają one odrębną barwę czerwono-brązową. To stanowi wielką dogodność wobec słabej intensywności plam, jakie daje fruktoza z odczynnikiem anilinowym. Czułość wywoływaczy dla cukrów jest mała, zauważono jej zmienność w zależności od gatunku bibuły (grubości), rodzaju rozpuszczalnika i obecności substancji towarzyszących..

W naszych warunkach doświadczalnych nie rozdzielały się cukry: fruktoza, mannoza i arabinoza. Należało więc uzyskać ich rozdział na innej drodze. Opierając się na wynikach podanych przez R a c z y ń s k i e g o (R_F dla mannozy 0,39, dla fruktozy 0,45, dla arabinozy 0,52) (8), w celu rozdzielenia tych trzech węglowodanów wycinano bibułę w miejscu właściwym i przenoszono wyeluwowane cukry na inny arkusz bibuły, rozwijając rozpuszczalnikiem: fenol nasycony wodą. Rozdział uzyskano. Prócz tego stosowano chromatografię dwukierunkową, używając przy rozwijaniu chromatogramu w jednym kierunku rozpuszczalnika wybranego, a w drugim roztworu fenol-woda. Słabszy efekt uzyskiwano przy stosowaniu długotrwałego przepuszczania rozpuszczalnika: a) zmodyfikowaną metodą ciąglego usuwania rozpuszczalnika przepływającego przez chromatogram (4), b) zakańczanie arkusza bibuły ząbkami w celu łatwiejszego spływu (P a r t r i d g e, 1952). Opisana metoda rozdziału węglowodanów zostanie zastosowana w II cz. pracy, do badań nad przemianą węglowodanową płynnej hodowli laseczki tężca. Próbnny chromatogram, uzyskany bez oczyszczania materiału, pozwala na identyfikowanie występujących na nim cukrów (ryc. 9 i ryc. 10).

WNIOSKI

1) Do badań nad cukrami nadają się trzy metody chromatograficzne: wstępująca, spływowa, krążkowa.

2) Do badań jakościowych dobra jest bibuła Whatman N 3.

3) Najkorzystniej kształtują się plamy i uzyskuje się najlepszy rozdział przy użyciu rozpuszczalnika o składzie: n-propanol-pirydyna-benzen-wersenian sodu 0,5% w stosunku objętościowym 50:20:20:10.

4) Do rozdziału fruktozy, mannozy i arabinozy należy używać chromatografii dwukierunkowej, lub chromatografować wyeluwowane cukry przy użyciu rozpuszczalnika fenol-woda.

5) Stężenie badanych węglowodanów nie wpływa w sposób widoczny na wartość R_F .

6) Materiał biologiczny należy przed nakraplaniem oczyszczać w celu uzyskania kształtnych plam.

7) W celu zidentyfikowania cukrów należy używać nie jednego, lecz kilku wywoływaczy.

8) Chromatogramy najlepiej wywoływać przez zanurzenie.

PIŚMIENNICTWO

1. Block R. J.: Paper Chromatography. A Laboratory Manual 78—91, 1952.
2. Forsyth W. G. C.: Color Reagents for the Paper Chromatography of Sugars. *Nature* 161, 239—240, 1948.
3. Forsyth W. G. C., Wembley D. M.: A Method for Studying the Carbohydrate Metabolism of Microorganisms. *Nature* 162, 150—151, 1948.
4. Jemieljanowa J. Z., Batrakowa T. A.: Nowy metod kaliczestwienno-go określenia reducirujuszczich sacharow w drewnianych gidrolizatach i w sulfitynych szczelokach pri pomosci chromatografii na bumagie. *Ž. Anal. Chim.* 14, 142—147, 1958.
5. Jermyn M. A., Isherwood F. A.: Improved Separation of Sugars on a Paper Partition Chromatogram. *Biochim. J.* 44, 402—407, 1949.
6. Opieńska-Blauth J., Drozdowski E., Kański M.: Chromatografia bibułowa i jej zastosowanie do analizy cukrowców. *Annal. Univ. Mariae Curie-Skłodowska Sec. D.* 6, 27—54, 1951.
7. Partridge S. M., Westall R. G.: Filter Paper Partition Chromatography of Sugars I. *Biochem. J.* 42, 238—250, 1948.
8. Raczinskij W. W., Kniaziatowa E. J., Krawcowa B. E.: Metodika połączenia i koliczestwienno-go analiza bumaznoj chromatografii sacharow. *Biochim.* 17, 551—556, 1952.
9. Williams R. T., Kirby H.: Paper Chromatography Using Capillary Ascent. *Sciences.* 107, 481—483, 1948.
10. Zimmermann G., Nehring K.: Ring Paper Chromatography by the Drop Method. *Angew. Chem.* 63, 556—557, 1951.

РЕЗЮМЕ

Авторами проведены методические исследования над разделительной хроматографией углеводов с целью разработки наиболее удобного метода для анализа продуктов углеводного обмена в жидкой культуре палочки столбняка.

На основании проведенных исследований для опытов были выбраны:

1) бумага Whatman № 3 и № 1

2) первый раз примененная смесь растворителей: n-пропанол — пиридин — бензол — версен (0,5⁰%) в отношении 50:20:20:10.

Для двумерной хроматографии в качестве второго растворителя был употреблен фенол, насыщенный водой.

3) Проявители: анилин, резорцин, а также аммиачное азотно-кислое серебро.

Авторами определены коэффициенты R_f для 11 сахаров, а также разделены углеводы на пробной хроматограмме сахаров в жидкой культуре палочки столбняка.

Рис. 1. Влияние восходящего хроматографического метода на величину R_f .

Рис. 2. Влияние нисходящего хроматографического метода на величину R_f .

Рис. 3. Влияние радиального метода на величину R_f ; нанесены капли на сахара: целлобиозу, галактозу, фруктозу (на рис. не видна) и ксилозу.

Рис. 4. Нанесены капли на сахара: 1) лактозу, 2) целлобиозу, 3) галактозу, 4) глюкозу, 5) ксилозу, 6) рибозу, 7) мальтозу, 8) сахарозу, 9) маннозу, 10) арабинозу и 11) фруктозу.

Рис. 5. Влияние системы растворителей на величину R_f . На рисунке хроматограмма с системой растворителей: n-пропанол — вода в отношении 50:20:10.

Рис. 6. Влияние концентрации на величину R_f и формирование пятен (нанесены капли на: лактозу, сахарозу, глюкозу и арабинозу).

Рис. 7. Влияние температуры на величину R_f . Хроматограмма получена при температуре 6°C.

Рис. 8. Влияние температуры на величину R_f . Хроматограмма получена при температуре 18°C.

Рис. 9. Хроматограмма субстрата и фильтрата жидкой культуры палочки столбняка (серии 93 и 94). На правой стороне искусственная смесь сахаридов.

Рис. 10. Хроматограмма субстрата и фильтра жидкой культуры палочки столбняка (серии 105 и 109).

S U M M A R Y

The authors carried out partition chromatography investigations aimed at finding a convenient method of analysing the products of carbohydrate metabolism in liquid cultures of the *tetanus bacillus*.

After preliminary experiments, the authors chose:

1. filter paper Whatman No 3 and No. 1.
2. Solvent system: n-propanol-pyridine-benzene-sodium versenate 0.5% (50:20:20:10), used for the first time. For two dimensional chromatography, phenol saturated with water was used as second solvent.
3. Detectors: aniline, resorcin and ammonia silver nitrate.

The coefficients R_f were determined for 11 sugars, and carbohydrates were partitioned in a test chromatogram of sugars obtained from liquid cultures of the *tetanus bacillus*.

