

P Ž O V O D N Ě O Z N Ā M E N I A**PRÍSPEVOK K DETEKCIÍ FOSFOREČNÝCH ESTEROV NA PAPIEROVÝCH CHROMATOGRAMOCH**

LADISLAV MACHO

Endokrinologický ústav Slovenskej akadémie vied v Bratislave

Detekcia esterov kyseliny fosforečnej sa zakladá na tvorbe komplexu anorganického fosfátu s molybdénanom amónnym. Tento fosfomolybdénanový komplex sa redukčnými činidlami môže zmeniť na intenzívne modrú zlúčeninu („molybdénová modrá“ [1]). Organické estery kyseliny fosforečnej musia byť pred detekciou rozštiepené a musí byť uvoľnený anorganický fosfát. To sa robí na papieri buď hydrolýzou v kyslom prostredí za tepla [2], alebo enzymatickým rozštiepením fosfatázami [3, 4, 5]. Citlivosť detekčných metód sa vo všeobecnosti udáva 0,5 μg [4], 3 μg [6] a 0,15 μg [3].

Zvýšenie citlivosti a kontrastnosti detekcie fosforečných esterov sme dosiahli použitím chloridu cínatého ako redukčného činidla. Pretože vodný roztok chloridu cínatého spôsobuje rozplývanie škvŕn, rýchle tmavnutie pozadia, vyžaduje zdĺhavé sušenie a je nestály, rozpúšťame SnCl_2 v éteri.

Detekciu uskutočňujeme takto: Papier po vyvíjaní vyberieme z chromatografickej komory, sušíme v prúde vzduchu pri izbovej teplote a neskôr zahrejeme na 80 °C, aby sa odstránili zvyšky rozpúšťadiel. Potom ho veľmi jemne postriekame kyslým molybdénanovým činidlom podľa Hanesa a Isherwooda [2], zahrievame 7 minút pri teplote 85 °C, aby nastala hydrolýza organických esterov. Nato postriekame chromatografický papier 0,2 % čerstvým roztokom SnCl_2 v éteri a slabozahrejeme 10—30 sekúnd do odparenia éteru. Fosforečné estery sa objavia v podobe intenzívne modrých škvŕn na pozadí so žltomodrastým nádychom. Odtieň modrej farby sa mení podľa pôvodu uvoľneného fosforu [2, 7]. Kým voľný anorganický fosfát dáva škvŕny zelenomodrej farby, organické fosforečné estery sa objavia ako jasnomodro sfarbené škvŕny. Pozadie sa stáva postupne viac modrým, ale škvŕny ostávajú viditeľné.

Ak sa chromatogram postriekal veľkým nadbytkom molybdénanového činidla, SnCl_2 ako silné redukčné činidlo spôsobí redukcii molybdénanu na modré zlúčeniny molybdénu a tým intenzívne zmodranie pozadia. Tomuto možno zabrániť oxidáciou chloridu cínatého a premenou molybdénanu na žlté až bezfarebné molybdénanové komplexy bohaté na kyslík tak, že chromatogram postriekame nadbytkom 3 % peroxydu vodíka p. a. a sušíme pri izbovej teplote. Fosforečné estery sa potom objavia ako modré škvŕny na úplne bielom pozadí. Chromatogram treba rýchle pozorovať a fotografovať, pretože postupom času škvŕny vyblednú (nevymiznú však úplne) a pozadie dostáva žltý nádych. Nevymyté stopy molybdénanu po niekoľkých dňoch opäť spôsobujú zmodranie pozadia, ale nový postrek 3 % peroxydom vybieli

pozadie a modré škvrny fosforečných esterov, aj keď menej intenzívne, znovu sa objavia.

Metóda je veľmi citlivá a možno ňou detegovať až $0,02 \mu\text{g}$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Je samozrejme, že použité reagentie nesmú obsahovať fosfor, arzén a SiO_3^{2-} , ktorých prítomnosť by mohla skresliť výsledok.

Naše skúsenosti s inými metódami detekcie esterov kyseliny fosforečnej ukázali, že metódy, pri ktorých sa používa ultrafialové svetlo, sú technicky náročnejšie a vyžadujú dlhšie osvetľovanie na detekciu ťažšie hydrolyzovateľných esterov, kým metódy s kyselinou askorbovou spôsobovali rozplývanie škvŕn. Naproti tomu naša metóda je jednoduchá, ľahko prístupná a dobre sa osvedčila pri detekcii organických esterov kyseliny fosforečnej z biologického materiálu (krv, extrakty z tkanív).

Súhrn

V práci sa opisuje nový spôsob detekcie esterov kyseliny fosforečnej na papierových chromatogramoch za použitia chloridu cínatého ako redukčného činidla.

ЗАМЕТКА К ДЕТЕКЦИИ ФОСФОРНЫХ ЭФИРОВ НА БУМАЖНЫХ ХРОМАТОГРАММАХ

ЛАДИСЛАВ МАХО

Эндокринологический институт Словацкой Академии Наук
в Bratislave

Выводы

Был описан новый способ детекции эфиров фосфорной кислоты на бумажных хроматограммах при применении хлористого олова, как восстанавливающего вещества.

Поступило в редакцию 18. 7. 1956 г.

BEITRAG ZUR DETEKTION VON ESTERN DER PHOSPHORSÄURE AUF PAPIERCHROMATOGRAMMEN

LADISLAV MACHO

Endokrinologisches Institut an der Slowakischen Akademie der Wissenschaften
in Bratislava

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird ein neues Verfahren der Detektion von Estern der Phosphorsäure auf Papierchromatogrammen unter Verwendung von Zinn(II)-chlorid als Reduktionsmittel beschrieben.

In die Redaktion eingelangt den 18. 7. 1956

LITERATÚRA

1. Hamsík A., *Lékařská chemie. Praktikum*, Praha 1949. — 2. Hanes C. S., Isherwood F. A., *Nature (London)* *164*, 1107 (1949). — 3. Doman H. G., Kagan C. E., *Biochimija* *17*, 719 (1953). — 4. Fletcher E., Malpress F. H., *Nature (London)* *171*, 838 (1953). — 5. Schmidt, *J. biol. Chem.* *149*, 369 (1943). — 6. Benson A. A., Barsham J. A., Colvin M., Goedale T. C., Haas V. A., Steph W., *J. am. chem. Soc.* *72*, 1710 (1950). — 7. Bandurski R. S., Axelrod B., *J. biol. Chem.* *193*, 405 (1951).

Došlo do redakcie 18. 7. 1956