Stanovenie kyseliny sialovej chromatografiou na papieri*

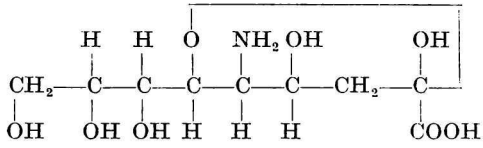
O. MARKOVIČ

Výskumný ústav reumatických chorôb, Piešťany

Na oddeľovanie a stanovenie derivátov kyseliny neuramínovej sa vypracovala chromatografická metóda na papieri. Chromatogramy sa kvantitatívne vyhodnotili priamym premeraním, registráciou kriviek a ich planimetrovaním. Metóda sa použila na stanovenie derivátov kyseliny neuramínovej v krvnom sére.

V poslednom čase sa dostala do popredia biologická dôležitosť skupiny látok označovaných ako „kyselina sialová". Izoláciu uskutočnil r. 1936 G. Blix [1] zo submaxilárneho mucínu.

Pod skupinovým názvom „kyselina sialová" sú zahrnuté acetylované deriváty základnej látky — kyseliny neuramínovej:



kyselina neuramínová

a to kyselina *N*-acetylneuramínová, *N*-glykolylneuramínová a *N,O*-diacetylneuramínová. Nomenklatúra sa ustálila až r. 1957 [2].

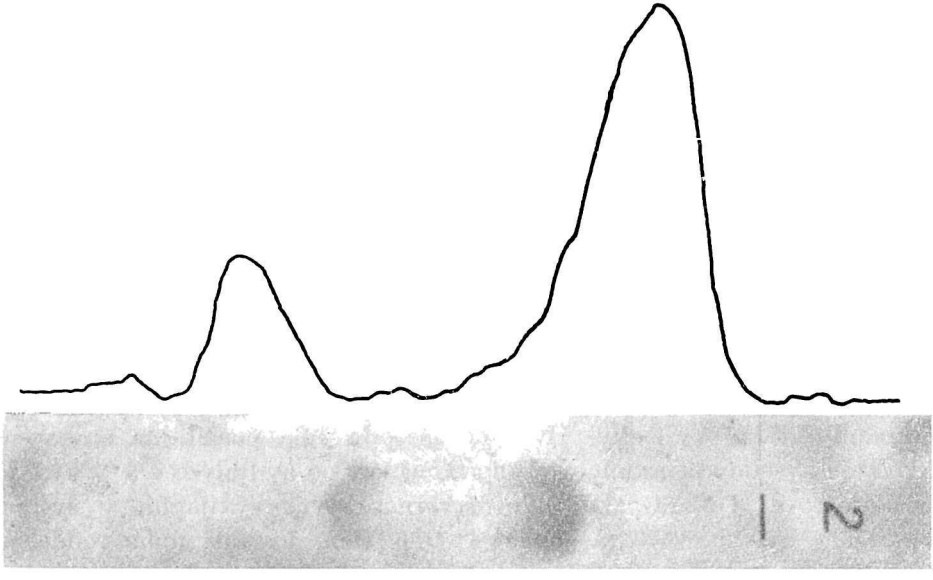
Uvedené látky sa vyskytujú v tkanivách a telových tekutinách viazané na proteíny, glykoproteíny, lipidy a polysacharidy. Vzhľadom na ich dôležitosť sa ukázala potreba ich stanovenia v rozličnom biologickom materiáli. Na stanovenie kyseliny sialovej sú opísané viaceré fotokolorimetrické metódy, ako je metóda s Ehrlichovým činidlom (*p*-dimetylaminobenzaldehydom) [3] s Bialovým činidlom (orcinolom) [4, 5], s rezorcinolom [6], s difenylamínom [7—9] a s kyselinou tiobarbiturovou [10]. Uvedené skúšky nie sú špecifické pre kyselinu sialovú (s výnimkou metódy s kyselinou tiobarbiturovou), pretože obdobné farebné reakcie poskytujú aj mnohé cukry i aminocukry. Na oddelenie derivátov kyseliny neuramínovej navzájom, ako aj od iných zložiek sa s úspechom použila chromatografia na papieri. V literatúre [5, 11—13] sa uvádzajú viaceré systémy rozpúšťadiel: *n*-butanol—kyselina octová—voda 4 1 5,

* Prednesené na Seminári o kvantitatívnych metódach v chromatografii na papieri v Bratislave 25. apríla 1963.

sek-butanol—kyselina octová—voda 4 : 1 : 5, *n*-butanol—pyridín—voda 9 : 5 : 8, *sek*-butanol—acetón—kyselina octová—voda 6 6 3 5, *n*-butanol—*n*-propanol—0,1 N-HCl 1 2 1, etylacetát—kyselina octová—voda 3 1 3. Ako detekčné činidlá použili autori orcinol s kyselinou trichlóroctovou, *p*-dimetylaminobenzaldehyd bez kyseliny trichlóroctovej a s kyselinou trichlóroctovou, naftorezorcinol s kyselinou trichlóroctovou a α-naftol s kyselinou trichlóroctovou. L. Warren [14] uvádza postrek kyselinou tiobarbiturovou.

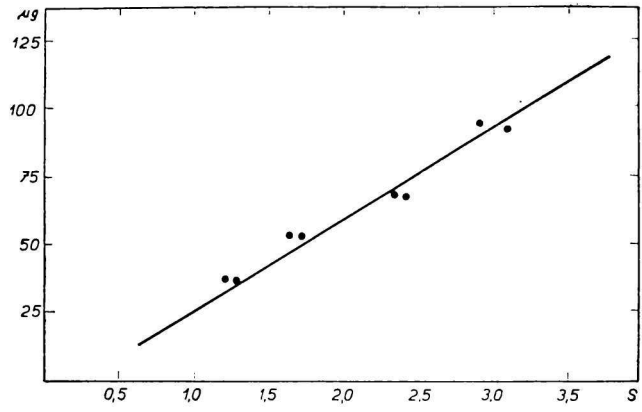
Experimentálna časť

Z uvedených systémov sa najlepšie osvedčil systém *n*-butanol—kyselina octová—voda 4 : 1 : 5 pri opakovanom štvornásobnom vyvíjaní (najmä pri oddeľovaní kyseliny *N*-acetylneuramínovej a *N*-glykolylneuramínovej). Detegovali sme *p*-dimetylaminobenzaldehydom s kyselinou trichlóroctovou [12]. Zafarbenie dosiahlo optimálnu intenzitu 30 hodín po detegovaní a po 20 minútovom zahriatí pri 105 °C. Na kvantitatívne vyhodnotenie sme skúšali použiť L. Svennerholmom [11] opísaný spôsob elúcie oddelených škvŕn z chromatogramu, na ktorom sa detegovali len okraje s nanesenými štandardmi. Vo vodnom eluáte sme kyselinu sialovú stanovovali fotokolorimetricky rezorcinolovou metódou a s lepšími výsledkami difenylamínovou metódou. Podobne ako W. Rzeczycki [13] nedosiahli sme opisovanú presnosť ±3 %. Pre vysoké blankové hodnoty eluátov bolo potrebné papier pred chromatografovaním premývať (0,4 % roztokom $NaHCO_3$ a potom až 10 krát vodou).



Obr. 1. Chromatogram kyseliny *N*-acetylneuramínovej a pravdepodobne kyseliny *N*-glykolylneuramínovej s registračným záznamom (stanovenie v sére).

Lepšie výsledky sme dosiahli pri použití metódy priameho premeriavania detegovaných chromatogramov, nastrihaných na pásiky s jednotlivými nanáškami. (Ako štandard slúžila kyselina sialová od prof. G. Blixa; bola to zmes kyseliny *N*-acetylneuramínovej a pravdepodobne kyseliny *N*-glykolylneuramínovej.) Na premeriavanie chromatogramov (v priesvite) sme používali chromatometer fy Lange so synchrónnym priamopíšúcim zariadením. Získali sme tak krivky, ktoré zodpovedali jednotlivým škvrnám (obr. 1) a ktoré sme planimetrovali. Relatívne údaje planimetra sme vyniesli do grafu závislosti od množstva látky v μg. Graf závislosti relatívnych hodnôt planimetra od množstva kyseliny *N*-acetylneuramínovej v μg (obr. 2) vykazuje lineárny priebeh v rozmedzí 30—100 μg kyseliny *N*-acetylneuramínovej. Pri nanáškach nad 100 μg už body ležali mimo priamky. Uvedená metóda mala pri určovaní variability relatívnu šírku intervalu spoľahlivosti $t = 9{,}64$ % pri $n = 9$.



Obr. 2. Závislosť medzi množstvom kyseliny *N*-acetylneuramínovej a plochou denzitogramov.
Os úsečiek: plocha (*S*) denzitogramu zodpovedajúca škvrne kyseliny *N*-acetylneuramínovej v relatívnych údajoch planimetra.
Os poradníc: zodpovedajúce množstvo kyseliny *N*-acetylneuramínovej v μg.

Diskusia

Pri použití metódy premeriavania chromatogramov v priesvite sme premeriavali i chromatogramy impregnované parafínovým olejom. Výsledky pri porovnaní so štandardmi boli zhodné s výsledkami získanými premeriavaním chromatogramov bez impregnácie. Neosvedčil sa ani spôsob vyhodnocovania kriviek pomocou výšky maxím, pretože pri určovaní kyseliny sialovej v sére nebol tvar škvŕn vždy zhodný so štandardom. Planimetrovanie získaných kriviek a ich vyhodnocovanie z grafu závislosti množstva štandardu od relatívneho údaja planimetra poskytovalo i v prípade pretiahnutých škvŕn reprodukovateľné výsledky. Uvedenú metódu sme použili na stanovenie derivátov kyseliny neuramínovej v krvnom sére po hydrolýze v 5 % kyseline trichlóroctovej [13]. Opakovaným štvornásobným vyvíjaním v systéme *n*-butanol—kyselina octová—voda 4 1 5 sme dosiahli úplné oddelenie derivátov kyseliny neuramínovej.

Ďakujem prof. G. Blixovi za poskytnutie štandardu kyseliny sialovej.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СИАЛОВОЙ КИСЛОТЫ ХРОМАТОГРАФИЕЙ НА БУМАГЕ

О. Маркович

Исследовательский институт ревматических заболеваний,
Пиештяны

Для определения производных неураминовой кислоты хроматографией на бумаге применили четырехкратную обработку хроматограмм системой *н*-бутанол — уксусная кислота—вода 4 1 5, проявление смесью *п*-диметиламинобензалдегида и трихлоруксусной кислоты и оценка была проведена прямым измерением хроматограмм, регистрацией кривых и их планиметрированием. Метод был применен для определения производных неураминовой кислоты в сыворотке крови.

Preložil M. Fedoroňko

BESTIMMUNG DER SIALINSÄURE MITTELS DER PAPIERCHROMATOGRAPHIE

O. Markovič

Forschungsinstitut für rheumatische Krankheiten, Piešťany

Zur Bestimmung von Derivaten der Neuraminsäure mittels der Papierchromatographie wurde eine vierfache Entwicklung der Chromatogramme im System *n*-Butanol—Essigsäure—Wasser (4 : 1 : 5) und die Detektion durch *p*-Dimethylaminobenzaldehyd mit Trichloressigsäure verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels direkter Vermessung der Chromatogramme, durch die Registrierung der Kurven und deren Planimetrieren. Die Methode wurde für die Bestimmung von Derivaten der Neuraminsäure im Blutserum herangezogen.

Preložil M. Liška

LITERATÚRA

1. Blix G., *Z. phys. Chem.* ***240***, 43 (1936).
2. Blix G., Gottschalk A., Klenk E., *Nature* ***179***, 1088 (1957).
3. Werner I., Odin L., *Acta Soc. Med. Uppsal.* ***57***, 230 (1952).
4. Bial M., *Z. klin. Med.* ***50***, 417 (1903).
5. Böhm P., Dauber S., Baumeister L., *Klin. Wschr.* ***32***, 289 (1954).
6. Svennerholm L., *Biochim. Biophys. Acta* ***24***, 604 (1957).
7. Dische Z., *Mikrochemie* ***8***, 4 (1930).
8. Ayala W., Moore L. V., Hess E. L., *J. Clin. Invest.* ***30***, 781 (1951).
9. Hess E. L., Hahn J. W., Ayala W., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* ***91***, 528 (1956).
10. Warren L., *J. Biol. Chem.* ***234***, 1971 (1959).
11. Svennerholm L., *Acta Soc. Med. Uppsal.* ***61***, 75 (1956).
12. Svennerholm E., Svennerholm L., *Nature* ***181***, 1154 (1958).
13. Rzeczycki W., *Acta Biochim. Pol.* ***VI/2***, 171 (1959).
14. Warren L., *Nature* ***186***, 237 (1960).

Do redakcie došlo 14. 5. 1963

Adresa autora:

Inž. Oskar Markovič, prom. farm., Výskumný ústav reumatických chorôb, Piešťany.