



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

206 971

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavná priorita

(22) Prihlášené 26 09 79

(21) PV 6485-79

(51) Int. Cl.³ C 07 H 3/06

(40) Zverejnené 15 09 80

(45) Vydané 01 11 83

(75)

Autor vynálezu BÍLIK VOJTECH RNDr. CSc., BRATISLAVA, ZEMEK JURAJ ing. CSc., LEDNICA,
BABOR KAROL ing. CSc. a SANDTNEROVÁ ROZÁLIA RNDr., BRATISLAVA

(54) Spôsob izolácie (U-¹⁴C)maltooligosacharidov z hydrolyzátov (U-¹⁴C) α -glukánov

1

Podstata vynálezu spočíva v tom, že nižšie maltooligosacharidy - maltóza až maltootkóza - sa po prevedení na odpovedajúce 4-nitrofenylhydrazóny veľmi účinne rozdeľujú chromatografiou na papieri.

Preparatívne rozdelenie maltooligosacharidov sa uskutočňuje na stĺpci aktívneho uhlia pri vhodnom menení gradientu elučného systému voda - etanol (R. L. Whistler, D. F. Durso; J. Am. Chem. Soc. 72, 677 (1950); ibid. 74, 5140 (1952)), resp. na stĺpci Bio-Gel P-2 elúciou vodou (M. John, G. Trenel, H. Dellweg; J. Chromatogr. 42, 476 (1969)) alebo iónome- niča XE 200 (J. F. Deaton; Ger. Offen. 2725964, CA. 88, 63494b (1978)). Kvalitatívny dôkaz, prípadne stanovenie maltooligosacharidov je tiež založené na ich vzájomnom rozdelení papie- rovou chromatografiou (J. Staněk, M. Červný, J. Pacák; Oligosacharidy, p. 328, Nakl. ČSAV, Praha 1962; H. Bender; Carbohydr. Res. 65, 85 (1978); K. Umeki, K. Kainuma; J. Chromatogr. 150, 242 (1978)). Rýchlu informáciu o zložení zmesi oligosacharidov typu α -glukánov posky- tuje chromatografia na tenkej vrstve celulózy (R. Spitschan; J. Chromatogr. 61, 169 (1971)), kremeliny (F. W. Collins, K. R. Chandorkar; J. Chromatogr. 56, 163 (1971)), silikagelu (D. Nurok, A. Zlatkis; Carbohydr. Res. 65, 265 (1978)), resp. zmesi silikagelu a kremeliny (C. T. Mansfield, H. G. McElroy Jr.; Anal. Chem. 43, 586 (1971)). Výhodou navrhovaného spô- sobu izolácie maltooligosacharidov oproti uvedeným chromatografickým deleniám je, že malto- oligosacharidy vo forme ich 4-nitrofenylhydrazónov sa chromatografiou na papieri vysoko účin- ne navzájom rozdeľujú.

208 971

Podstata vynálezu spočíva v tom, že maltooligosacharidy sa s 4-nitrofenylhydrazínom v metanol-vodnom roztoku konvertujú na odpovedajúce 4-nitrofenylhydrazóny, ktoré sa chromatografiou na papieri rozdelia a z izolovaných hydrazónov sa známym postupom napr. reakciou s benzaldehydom uvoľnia príslušné maltooligosacharidy.

Technické prevedenie izolácie maltooligosacharidov je veľmi jednoduché a získané jednotlivé maltooligosacharidy vykazujú vysoký stupeň čistoty.

Príklad

Vodorozpustný ($U-^{14}C$) α -glukán (10 μ Ci; glukán izolovaný z rias *Chlorella* sp., produkt Ústavu pre výskum, výrobu a využitie rádioizotópov, Praha), prípadne riedený neznáčeným glukánom (50 mg; glykogén z ustríc, produkt JT Baker Chemical Co.) sa dá do vody (2 ml), do ktorej sa súčasne pridá imobilizovaná α -amyláza (ex saliva) na celulóзовom nosiči (5 mg; 4 až 8 U/mg, pripravená podľa J. Zemek, J. Augustín; Čs. vynález 189472 (1978)) a reakčná zmes sa nechá stáť pri teplote 20 až 25 °C po dobu 3 až 5 dní. Imobilizovaný enzým sa odfiltruje, k filtrátu sa pridá 2 % metanolvý roztok 4-nitrofenylhydrazínu (4 ml) a zmes sa zahrieva 7 hodín pri 60 °C. Reakčná zmes sa naniesie na chromatografický papier (46 x 56 cm, Whatman No 1) a chromatografuje elučným systémom 1-butanol-etanol-voda (5 : 1 : 4 V/V) pri teplote 20 až 25 °C po dobu 24 až 30 hodín. Pohyblivosť jednotlivých 4-nitrofenylhydrazónov maltooligosacharidov je uvedená v tabuľke 1 (pri dostatočných koncentráciách jednotlivých hydrazónov je možné pozorovať im odpovedajúce jasnožlté zóny na chromatograme).

Tabuľka 1

Pohyblivosť 4-nitrofenylhydrazónov sacharidov pri chromatografii na papieri

4-nitrofenylhydrazón	$R^*)$	$R^{**})$
glukózy	1,00	3,43
maltózy	0,63	2,00
maltotriózy	0,43	1,50
maltotetraózy	0,30	1,00
maltopentaózy	0,18	0,62
maltohexaózy	0,11	0,39
maltoheptaózy	0,06	0,21
maltooktaózy	0,035	0,12
4-nitrofenylhydrazín	1,60	5,49

$^*)$ vzťahované na pohyblivosť 4-nitrofenylhydrazónu D-glukózy,

$^{**})$ vzťahované na pohyblivosť D-glukózy

Z chromatografického papiera sa jednotlivé zóny 4-nitrofenylhydrazónov vystrihnú (z pôvodnej rádioaktivity ($U-^{14}C$) α -glukánu je v zóne 4-nitrofenylhydrazónu maltózy

29 až 34 %, maltotriózy 19 až 22 %, maltotetraózy 10 až 13 % a maltopentaózy 10 až 12 % aktivity), zalejú vodou (10 ml) a po pol hodinovom státi pri teplote miestnosti sa ku každej frakcii pridá metanol (1 ml) a benzaldehyd (1 ml) a zmes sa udržiava pri teplote 60 °C 15 hodín. Potom sa roztok prefiltruje, filtrát zahustí za zníženého tlaku (teplota kúpeľa do 40 °C), destilačný zvyšok sa nanesie na chromatografický papier a chromatografuje elučným systémom 1-butanol-etanol-voda pri teplote miestnosti 5 až 6 dní, čím sa získa osobitne čistý jednotlivý maltooligosacharid (ca 50 % aktivity pôvodného fenyldiazónu).

Maltotrióza ako aj ďalšie oligosacharidy maltóзовého radu sú dôležitými substrátmi pre biochemické a histochemické vyšetrenia, a to jednak v oblasti priemyselnej mikrobiológie (sledovanie kvasných procesov), v klinickej biochémií a histochémií (stanovenie aktivít amylolytických enzýmov a ich lokalizácia) a v základnom výskume chémie a biochémií sacharidov. Použitie ^{14}C -značkových substrátov umožňuje rozpracovanie mikrometodík vhodných pre analýzu biologického materiálu odobraného v obmedzenom množstve (napr. k diagnostike vrodených porúch metabolizmu glykogénu).

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob izolácie ($\text{U-}^{14}\text{C}$) maltooligosacharidov z hydrolyzátov ($\text{U-}^{14}\text{C}$) α -glukánov, vyznačujúci sa tým, že maltooligosacharidy sa prevedú v metanol-vodnom roztoku s 4-nitrofenylhydrazínom na odpovedajúce 4-nitrofenylhydrazóny maltooligosacharidov, ktoré sa rozdelia papierovou chromatografiou a z izolovaných hydrazónov sa jednotlivé sacharidy uvoľnia známym spôsobom, výhodne reakciou s benzaldehyd.