

Istituto di Chimica Biologica dell'Università di Roma

Separazione cromatografica e determinazione di derivati purinici ed esteri fosforici di importanza biologica *

di

Paolo Cerletti e Clara Fronticelli

I metodi da noi descritti (1) per la separazione mediante cromatografia su carta di miscugli di nucleotidi e nucleosidi derivati dalla adenina e ipoxantina e delle corrispondenti purine, e per la determinazione quantitativa dei composti separati, hanno permesso la ricerca quantitativa e qualitativa di questi composti in vari organi e tessuti (2), ed hanno trovato applicazione in studi di enzimologia (3,4).

Nel corso di alcune ricerche si è presentata la necessità di risolvere miscugli più complessi contenenti oltre a nucleotidi, coenzimi e intermedi del metabolismo glicidico.

In questo articolo vengono descritte tecniche che permettono la separazione cromatografica su carta di miscugli di nucleotidi, dei piridin-nucleotidi e nicotinamide, flavine, esosi e pentosi di interesse biologico.

Parte sperimentale

MATERIALI

ATP, ADP, AMP, ITP, IDP, IMP, DPN, TPN (**), guanina, guanina (Sigma). Adenosina, adenina (Light and Co.). Inosina, ipoxantina (Fluka). Nicotinamide, riboflavina (Hoff-

* Comunicación 6-8 a las V Jornadas Bioquímicas Latinas, Barcelona, mayo 1959.

** Le abbreviazioni usate nel presente articolo sono :

ATP = adenosintrifosfato ; ADP = adenosindifosfato ; AMP = adenosinmonofosfato ; ITP = inosintrifosfato ; IDP = inosindifosfato ; IMP = inosinmonofosfato ; TPN = trifosfopiridin nucleotide ; DPN = difosfopiridin nucleotide ; FAD = flavin-adenin dinucleotide ; FMN = flavin mononucleotide ; TCA = acido tricloroacetico.

man La Roche). FAD preparato secondo CERLETTI e SILIPRANDI (5), FMN secondo VISCONTINI e coll. (6).

Metodi e risultati

CROMATOGRAFIA UNIDIMENSIONALE

Per le separazioni unidimensionali sono impiegati come solventi :

- 1) propanolo, acido tricloroacetico 100 %, NH_3 22° Bé, H_2O (75 : 5 : 0,5 : 19,5)
ovvero
- 2) propanolo, etanolo 95°, acido formico 26 Bé, NH_3 22° Bé, H_2O (43 : 21 : 6 : 0,5 : 29,5).

Il miscuglio contenente non più di 0,2 μmoli di ciascun composto viene applicato a 6 cm da una delle estremità di una striscia di carta Munktell CHR 100, e la cromatografia viene sviluppata per via discendente per 14-16 ore a 18-20°C.

Dopo aver asciugato il cromatogramma a temperatura ambiente, i derivati purinici e della nicotamide vengono evidenziati in luce ultravioletta con lampada Minerallight filtro SL 2537 (Ultraviolet Products South Pasadena California) ed appaiono come macchie opache blu-viola ; la sola guanosina dà una fluorescenza azzurro opaca. Le flavine si rendono evidenti per la loro fluorescenza gialla in luce U.V. della stessa lampada, ed ancor meglio impiegando il filtro SL 3660.

I fosfati sono localizzati spruzzando la carta con una soluzione di molibdato d'ammonio 1.25 % in H_2SO_4 0.5 N, seguita, dopo aver lasciato asciugare il cromatogramma, da una soluzione allo 0.5 % di acido ascorbico in H_2O , approntata al momento dell'uso. I due reagenti devono essere preparati e conservati in recipienti di vetro paraffinati.

L'ortofosfato inorganico si manifesta dopo pochi minuti come una macchia azzurra, mentre il pirofosfato inorganico sviluppa in circa 1 h 30' un colore blu intenso. Gli esteri fosforici danno luogo in tempi più lunghi ad una colorazione azzurra la cui comparsa può essere accelerata riscaldando modicamente il cromatogramma.

I composti contenenti riboso vengono evidenziati spruzzando una soluzione di orcinolo al 2 % in 85 parti HCl 2 N e 10 parti etanolo 95 %.

Gli esosi vengono evidenziati spruzzando AgNO_3 0.1 M in NH_4OH 5M e scaldando poi a 100° C per 5-30' ovvero spruzzando una soluzione di pansidina cloridrato al 3 % in butanolo contenente tracce di SnCl_2 .

Dovendo spruzzare reagenti diversi si fanno correre parallelamente su uno stesso foglio diverse aliquote dello stesso campione. Il foglio viene poi tagliato e ciascuno dei cromatogrammi così ottenuti viene utilizzato per determinare un tipo di composti; un cromatogramma non spruzzato viene utilizzato per l'eluzione e la determinazione quantitativa.

Le separazioni ottenute sono riportate in fig. 1.

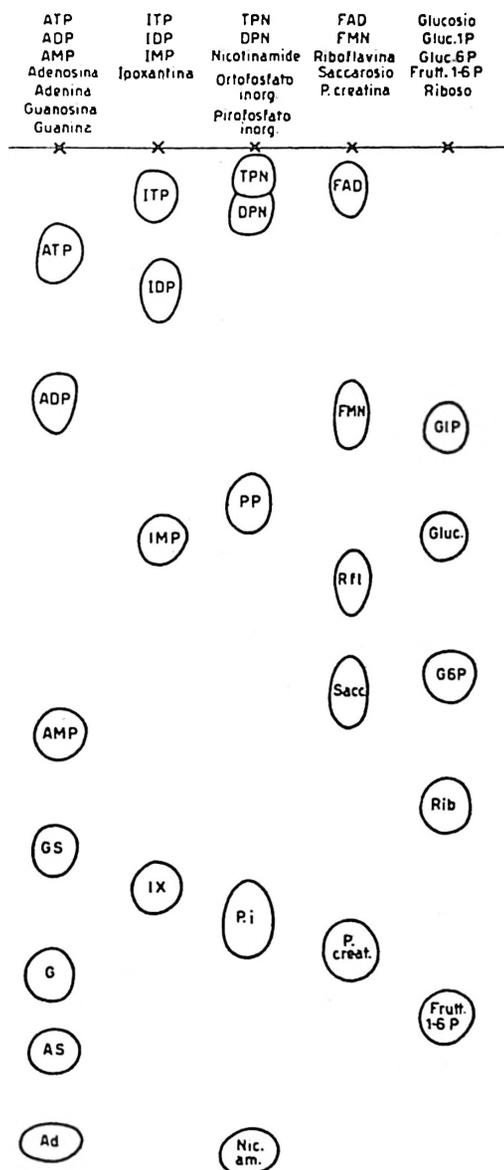


FIG. 1. — Separazione per cromatografia discendente di miscele di nucleotidi, coenzimi, flavine e intermedi del metabolismo glicidico. Solvente n. propanolo, TCA 100 %, NH₃ 22 B \acute{e} , H₂O (75 : 5 : 0,5 : 19,5) Carta Munktell CHR 100. Corsa 12-14 h a 16-18°C. Per le altre condizioni sperimentali e per l'evidenziazione delle macchie v. testo.

CROMATOGRAFIA BIDIMENSIONALE

La tecnica bidimensionale viene utilizzata per ottenere una risoluzione completa di miscele dei nucleotidi polifosfati adenosinici ed inosinici. Al solvente 2 già descritto, si fa seguire $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturo, isopropanolo, H_2O (79 : 3 : 18).

DETERMINAZIONE QUANTITATIVA

Esperienze eseguite con sostanze pure hanno dimostrato che non si ha idrolisi dei composti durante la separazione cromatografica. La determinazione quantitativa può quindi venire eseguita dopo eluzione delle macchie (7) con H_2O alla velocità di 0.5 ml/ora. 5 ml sono sufficienti per ottenere un recupero completo.

I calcoli sono eseguiti confrontando con i valori ottenuti sugli eluati di quantità note delle sostanze da determinare, cromatografate parallelamente ai campioni incogniti.

Se il cromatogramma viene sviluppato col solvente 2, la determinazione dei derivati purinici può essere eseguita mediante misurazioni della densità ottica dell'eluato nell'ultravioletto all'opportuna lunghezza d'onda, procedimento che non può venire impiegato se si è usato il solvente 1 che contiene TCA. In questo modo è possibile ottenere la determinazione separata dei nucleotidi inosinici ed adenosinici anche senza ricorrere alla cromatografia bidimensionale: si misura a 240 e a 265 $\text{m}\mu$ la densità ottica dell'eluato di un'area di cromatogramma contenente un nucleotide inosinico ed uno adenosinico; dato che il coefficiente di estinzione molare a 240 $\text{m}\mu$ è più elevato per i derivati dell'ipoxantina che per quelli della adenina, mentre l'opposto si verifica a 265 $\text{m}\mu$, è possibile risalire alla concentrazione dei due composti nella soluzione. La determinazione del riboso secondo ALBAUM e UMBREIT (8) permette un controllo della quantità totale di nucleotidi.

APPLICAZIONE A MATERIALE BIOLOGICO

I risultati ottenuti con miscugli di sostanze pure in soluzione acquosa sono stati confermati con quantità note di sostanze aggiunte a omogenati di tessuto in cui le attività enzimatiche erano state inattivate. Si sono riprodotte le separazioni descritte ed i recuperi sono stati quantitativi.

Discussione

I metodi descritti permettono la risoluzione di miscele abbastanza complesse ed hanno già trovato utile impiego in ricerche di enzimologia (9).

Le separazioni sono egualmente buone nei due solventi. Nel solvente 1 le macchie dei nucleotidi polifosfati sono leggermente più compatte e quindi più nettamente separate, nel solvente 2 è possibile però evidenziare in luce U.V. quantità più piccole dei vari composti. Nella determinazione dopo eluzione passano interferire impurezze della carta o quelle dovute alla preparazione di tessuto impiegato.

La reazione dell'orcinolo è tuttavia assai scarsamente sensibile alle interferenze suddette per cui i risultati che si ottengono nella determinazione dei composti contenenti ribosio sono costanti e riproducibili. E' comunque conveniente eluire aree di confronto non contenenti la sostanza da determinare.

Per la valutazione delle possibili interferenze si può procedere anche come segue: per ogni sostanza incognita si cromatografa un campione di confronto noto, in due aliquote di cui una a contenuto doppio dell'altra (St e $\frac{St}{2}$). La densità ot-

tica dell'eluato di St sottratta a due volte la densità ottica dell'eluato di $\frac{St}{2}$ darà la densità ottica «di fondo» dovuta ad

impurità della carta. Sottraendo questo valore alla densità ottica dell'eluato di St si avrà la densità ottica «corretta» di St : questo dato viene utilizzato per calcolare la concentrazione degli eluati incogniti, confrontandolo con le densità ottiche degli stessi, corrette per la lettura «di fondo».

Riassunto

Mediante cromatografia uni e bidimensionali su carta Munntell CHR 100 si è ottenuta la separazione di miscugli di nucleotidi e nucleosidi derivati dalla adenina e dalla ipoxantina e delle corrispondenti basi puriniche, dei piridin dinucleotidi, nicotamide, flavine, e di zuccheri di interesse biologico. Si descrivono metodi per la identificazione e per la determinazione quantitativa dei composti separati. Le tecniche descritte sono applicabili a materiale biologico.

Summary

Chromatographic separation and determination of biologically important purine derivatives and phosphoric esters.

The separation of mixtures of nucleotides, coenzymes, flavins, and sugars of biological interest has been obtained by descending paper chromatography. Methods are described for the identification and quantitative determination of the separated compounds. The procedures described can be applied to the analysis of tissue extracts.

Bibliografia

- (1) CERLETTI, P., IPATA, P. L. and SILIPRANDI, N. : *Anal Chim. Acta.*, **16**, 548, 1957.
- (2) CERLETTI, P., FRONTICELLI, C. and LAUTRICELLA, E. : *Chim Clin. Acta*, **4** 309, 1959.
- (3) CERLETTI, P., IPATA, P. L. and TANCREDI, G. : *Bioch. Bioph. Acta* **34**, 539, 1959.
- (4) CERLETTI, P., FRONTICELLI, C. e BUCCI, E. : *Atti dell'Acc. Naz. dei Lincei-Rendiconti Classe Scienze Fis. mat. nat.*, **25**, 543, 1958.
- (5) CERLETTI, P., and SILIPRANDI, N. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **76**, 214 1958.
- (6) VISCONTINI, M., EBNOETHER, G., und KARRER, P. : *Helv. Chim. Acta*, **35**, 457, 1952.
- (7) BRIMLEY, R. C., and BARRET, F. C. : *Practical Chromatography*, Chapman and Hall Ltd. London, pag. 37, 1953.
- (8) ALBAUM, H. G., and UMBREIT, W. W. : *J. Biol. Chem.*, **167**, 369, 1947.
- (9) CERLETTI, P., BUCCI, E. e IPATA, P. L. : *Atti delle V Giornate Biochimiche Latine*, Barcellona 1959, in corso di stampa.