

Хийе ИВАНОВА, Юта ВИЙЛЬ

## МЕТОД АНАЛИЗА ФОСФОРНЫХ ЭФИРОВ САХАРОВ И ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ В РАСТЕНИЯХ

Фосфорные эфиры (ФЭ) сахаров и органических кислот являются важными промежуточными продуктами фотосинтетического метаболизма. Скорость их обмена и величина фондов изменяются при регуляции физиологических процессов в ответ на изменение внешних условий или при переходе от одного этапа онтогенеза к другому. Поэтому знание этих показателей необходимо для понимания биохимических механизмов регуляционных процессов. Однако разделение и определение концентраций ФЭ часто затруднено из-за дефицитности материалов и аппаратуры или невозможности соблюдения техники безопасности. Описан целый ряд модификаций колоночной хроматографии ФЭ (Bartlett, 1959; Atkins, Canvin, 1971; Heldt и др., 1978; Giersch, 1979; Heldt и др., 1980; Redgwell, 1980). Для проведения успешного разделения необходимы четкий режим хроматографирования, поддерживаемый специальной аппаратурой, и длительное время анализа. Например, анализ ФЭ на смоле типа Дауэкс 1×8 или АГ-1×8 длится 32 ч (Lilley и др., 1977; Heldt и др., 1980). При отсутствии возможности проведения параллельного анализа нескольких проб, в эксперименте, включающем 6 вариантов, разрыв между обработкой первого и последнего будет 160 часов. Хранение проб перед хроматографированием уже в течение нескольких дней может изменить содержание некоторых ФЭ, например, дигидроксиацетонфосфата. Таким образом, варианты одного опыта, проанализированные одновременно, могут оказаться не сравнимыми между собой.

Нашей целью было найти максимально надежный и доступный способ разделения <sup>14</sup>C меченых ФЭ в растительном материале, не требующий дефицитных химикатов и аппаратуры и позволяющий одновременный анализ большого числа вариантов.

В настоящей работе описывается сравнительно простой метод разделения ФЭ на ионообменной колонке с дополнительным хроматографированием углеродных остатков некоторых фракций после дефосфорирования. Метод был нами применен при изучении образования промежуточных продуктов фотосинтетической ассимиляции углерода.

**Колоночная хроматография на анионите.** Разделение ФЭ проводили на колонках Дауэкс 1×8 (100—200 меш, в хлоридной форме). Использовали стеклянные колонки длиной 18 см и диаметром 1 см. Пробу (объем 5—7 мл, рН 7) переносили в колонку, промывали дистиллированной водой для выведения несвязанных на анионите веществ и элюировали ступенчатым градиентом соляной кислоты по следующему режиму:

Раствор	Вода	HCl					
		0,01 н.	0,02 н.	0,04 н.	0,1 н.	0,16 н.	0,2 н.
Объем, мл	100	300	300	300	100	200	100

Для регенерации колонку промывали 2 н. соляной кислотой и затем

бидистиллированной водой до отсутствия хлоридного иона в элюате.

Элюирующий раствор накачивали многоканальным перистальтическим насосом (тип 315, Польша), конструкция которого предотвращает контакт раствора с металлическими деталями и загрязнение колонки ионами металла, и позволяет работать параллельно на нескольких колонках. Скорость тока  $4 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$ , время элюирования около 6 ч. Фракции собирали по 20 мл. Сбор по объему позволяет пренебрегать небольшими колебаниями в скорости протока элюирующего раствора. Если в распоряжении исследователя нет достаточного количества коллекторов, то в случае 6—8 колонок сбор фракций можно осуществлять вручную.

**Хроматография аутентных веществ.** Для идентификации ФЭ исследуемой смеси сперва определяли зоны выхода соответствующих аутентных нерадиоактивных соединений из колонки при данном режиме элюции. Для этого в колонку по одному вводили глюкозо-1-фосфат, глюкозо-6-фосфат, фруктозо-6-фосфат, фруктозо-1,6-дифосфат, рибозо-5-фосфат, 3-фосфоглицериновую кислоту, фосфоенолпириновинную кислоту (все продукты фирмы «Reanal», Венгрия), дигидроксиацетонфосфат («Boehringer Mannheim», ФРГ) и рибулозо-1,5-дифосфат («Sigma», США). Для обнаружения идентификаторов в элюате использовали цветные реакции молибдатом аммония (для неорганического фосфата и для ФЭ после гидролиза), орцином (для пентозофосфатов) и антроном (для гексозофосфатов).

Результаты хроматографии аутентных ФЭ приведены на рис. 1. Видно, что исследованные пентозо- и гексозомонофосфаты выходят в одной и той же зоне. Хорошо разделяются фосфоглицериновая кислота, дигидроксиацетонфосфат и рибулозо-1,5-дифосфат. Зоны фосфоенолпиривата и фруктозодифосфата не отделяются друг от друга полностью, но это небольшое совпадение не мешает их отдельному определению после колоночной хроматографии.

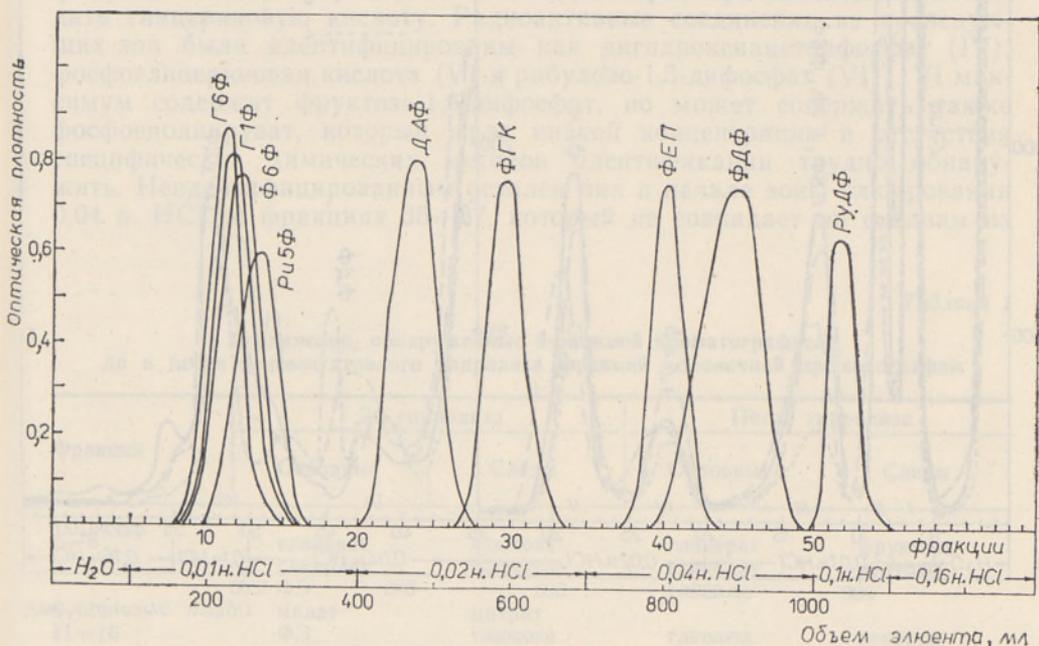


Рис. 1. Хроматограмма аутентных фосфорных эфиров. Г6Ф — глюкозо-6-фосфат, Г1Ф — глюкозо-1-фосфат, Ф6Ф — фруктозо-6-фосфат, Ри5Ф — рибозо-5-фосфат, ДАФ — дигидроксиацетонфосфат, ФГК — 3-фосфоглицерат, ФЕП — фосфоенолпириват, ФДФ — фруктозо-1,6-дифосфат, РудФ — рибулозо-1,5-дифосфат.

Разделение  $^{14}\text{C}$  меченых продуктов фотосинтеза. Исследуемый экстракт из листьев фасоли готовили по методике, описанной ранее (Viil и др., 1977). Листья фиксировали кипячением в 80% этаноле и экстрагировали затем 80% и 20% этанолом, дистиллированной водой и подкисленным 96% этанолом при температуре 80°C. Экстракт высушивали (экстракт в подкисленном этаноле отдельно от других), осадок растворяли в дистиллированной воде, центрифугировали и перед введением в колонку нейтрализовали при помощи  $\text{NH}_4\text{OH}$  до pH 7.

На рис. 2 приводятся хроматограммы продуктов 11-минутного фотосинтеза в 0,03%  $^{14}\text{CO}_2$  при разных концентрациях кислорода и интенсивностях света. Расположение меченых продуктов во фракциях определяли по наличию радиоактивности. Определенную пробу (0,5 мл) с каждой фракции измеряли жидкостным сцинтилляционным методом, но можно использовать и любой другой метод измерения радиоактивности, поскольку при сушении элюирующий растворитель полностью улетучивается, не оставляя осадка солей, могущих вызывать самопоглощение  $\beta$ -частиц в препарате.

Как видно из рис. 2, часть меченых соединений не связывается с аннионом и выходит с промывной водой. При элюции соляной кислотой обнаруживается 7 четких максимумов радиоактивности (I—VII), расположение которых совпадает с местами выхода некоторых аутентичных ФЭ.

Фракции каждой отдельной радиоактивной зоны объединяли, высушивали, растворяли в 1 мл дистиллированной воде и исследовали двумерной бумажной хроматографией. Растворителями в первом направ-

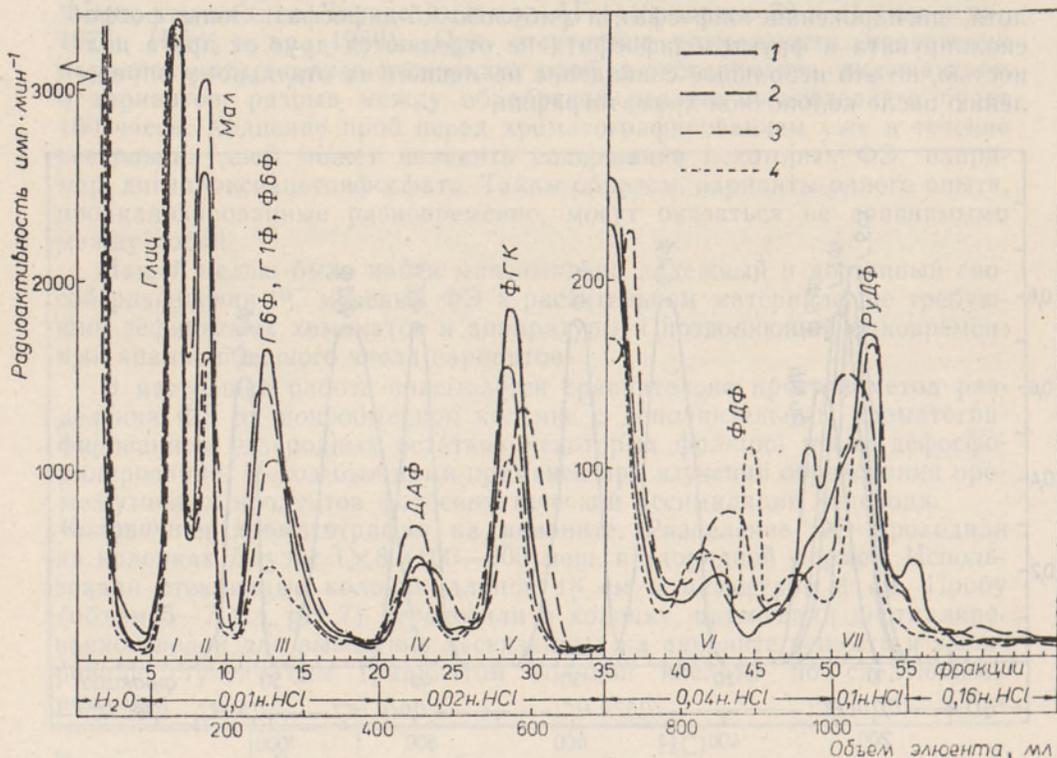


Рис. 2. Хроматограмма разделения продуктов 11-минутного стационарного фотосинтеза в 0,03%  $^{14}\text{CO}_2$  при различных концентрациях кислорода и интенсивностях света: 1 — 21%  $\text{O}_2$ , 30 мВт·см $^{-2}$ ; 2 — 1,5%  $\text{O}_2$ , 30 мВт·см $^{-2}$ ; 3 — 21%  $\text{O}_2$ , 3 мВт·см $^{-2}$ ; 4 — 1,5%  $\text{O}_2$ , 3 мВт·см $^{-2}$ .

Глиц — глицерат, Мал — малат, другие обозначения см. рис. 1.

лении служили этанол—аммиак—вода (80:4:16), во втором — *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (37:7,5:25). Расположение меченых соединений на хроматограмме обнаружили при радиоавтографии. Часть из каждого исследуемого раствора, содержащего ФЭ, гидролизировали ферментативно фосфатазой. Использовали кислую фосфатазу из пшеничных отрубей («Reanal»), время гидролиза 24 ч. Полученную смесь органических кислот и сахарных остатков хроматографировали двумерно или одномерно растворителем второго направления дважды. После первого пропускания хроматограмму сушили и снова хроматографировали в том же растворителе.

Бумажной хроматографией были обнаружены основные меченые соединения, содержащиеся в промывной воде — сахароза, глюкоза, фруктоза, глицин, серин и аланин. При элюции соляной кислотой из колонки постепенно выходят связанные с анионитом соединения — ФЭ и органические кислоты, но во фракциях ФЭ были обнаружены также следы глюкозы и фруктозы. По-видимому, в течение обработки перед рехроматографированием часть ФЭ дефосфорилируется.

Результаты изучения бумажной хроматографией соединений из отдельных радиоактивных зон, полученные разделением меченых продуктов фотосинтеза на колонке (табл. 1, рис. 2) сравнивали с хроматограммой аутентичных ФЭ (рис. 1) и определяли соответствие ФЭ и органических кислот этих зон. I максимум содержит основную часть меченых органических кислот — глицерат и гликолат, а также эфир глюкозы, не являющийся глюкозомонофосфатом. Кинетика включения метки в остаток глюкозы указывает, что это соединение активно участвует в фотосинтетическом метаболизме. Возможно, это УДФ- или АДФ-глюкоза. Из других органических кислот довольно хорошо отделяется малат (II). Основными соединениями пика III являются глюкозо-1-фосфат, глюкозо-6-фосфат и фруктозо-6-фосфат. Кроме гексозомонофосфатов, пик III содержит небольшие количества пентозомонофосфатов и неидентифицированный ФЭ, который при разложении может дать глицериновую кислоту. Радиоактивные соединения из последующих зон были идентифицированы как дигидроксиацетонфосфат (IV), фосфоглицериновая кислота (V) и рибулозо-1,5-дифосфат (VII). VI максимум содержит фруктозо-1,6-дифосфат, но может содержать также фосфоенолпируват, который из-за низкой концентрации и отсутствия специфических химических методов идентификации трудно обнаружить. Неидентифицированным остался пик в начале зоны элюирования 0,04 н. HCl во фракциях 35—37, который не совпадает ни с одним из

Таблица 1

Соединения, обнаруженные бумажной хроматографией до и после ферментативного гидролиза фракций колоночной хроматографии

Фракции	До гидролиза		После гидролиза	
	Основные	Следы	Основные	Следы
6—8	глицерат гликолат ФЭ	глюкоза фруктоза	глицерат гликолат глюкоза	фруктоза пентозы
9—11	малат	цитрат		
11—16	ФЭ	глюкоза фруктоза глицерат	глюкоза фруктоза глицерат	пентозы глицерат
21—25	ФЭ			
27—32	ФЭ		глицерат	
41—43		ФЭ		фруктоза
51—54		ФЭ		глицерат

пиков исследуемых аутентных веществ. Возможно также, что это какой-нибудь продукт разложения связанных на колонке веществ, выходящий при изменении концентрации элюирующего раствора. На некоторых аналогичных хроматограммах (не приведенных здесь) этот пик мало заметен.

Как видно, при хроматографировании на колонке фосфоглицериновая кислота, дигидроксиацетонфосфат, фруктозо-1,6-дифосфат, рибулозо-1,5-дифосфат и малат разделяются сразу в индивидуальном виде. Если необходимо отдельно определить соединения, содержащиеся в I и III зонах, их надо дополнительно разделить другими методами. Для этого можно предложить способ, использованный для идентификации ФЭ в элюатах — рехроматографирование на бумаге сахарных остатков ФЭ после ферментативного гидролиза смеси веществ. Более целесообразно и удобно хроматографировать повторно в одном направлении (растворитель *n*-бутанол—уксусная кислота—вода 37:7,5:25), поскольку таким способом хорошо разделяются содержащиеся в гидролизатах сахара и органические кислоты.

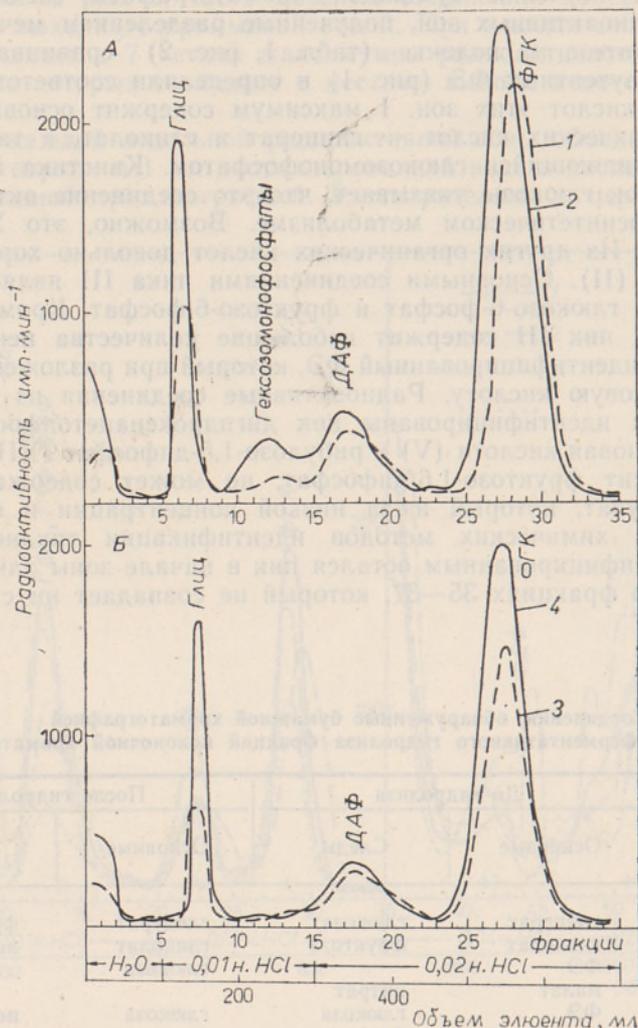


Рис. 3. Хроматограммы разделения продуктов кратковременных экспозиций в  $^{14}\text{CO}_2$ . Экспозиция после стационарного фотосинтеза на воздухе при насыщенном свете: А — на свете ( $35 \text{ мВт} \cdot \text{см}^{-2}$ ) в  $0,9\%$   $^{14}\text{CO}_2$   $0,5 \text{ с}$  (1) и  $1 \text{ с}$  (2); Б — в темноте в  $0,9\%$   $^{14}\text{CO}_2$   $0,5 \text{ с}$  (3) и  $2 \text{ с}$  (4).

Включение  $^{14}\text{CO}_2$  в различные продукты фотосинтеза в листьях фасоли при кратковременных экспозициях

Соединение	Включение $^{14}\text{C}$							
	на свету				в темноте			
	0,5 с		1,0 с		0,5 с		2,0 с	
	нг атом С · дм <sup>-2</sup>	% от общей радиоактивности	нг атом С · дм <sup>-2</sup>	% от общей радиоактивности	нг атом С · дм <sup>-2</sup>	% от общей радиоактивности	нг атом С · дм <sup>-2</sup>	% от общей радиоактивности
Фосфоглицериновая кислота	259	67	291	59	178	64	236	65
Дигидроксиацетон-фосфат	52	13	63	13	47	17	43	12
Глицериновая кислота (глицерат)	50	13	74	15	42	15	58	16
Гексозомонофосфаты	12	3	37	8	—	—	—	—
Сахара и аминокислоты	16	4	25	5	12	4	28	8

З а м е ч а н и е : условия экспонирования см. рис. 3.

При очень коротких экспозициях в  $^{14}\text{CO}_2$  метка включается только в ограниченное число соединений. Наш метод разделения такой простой смеси на колонке дает особенно хорошие результаты. Для примера на рис. 3 приведены хроматограммы некоторых 0,5—2-секундных экспозиций. Листья экспонировали в 0,9%  $^{14}\text{CO}_2$  на свету или в темноте после стационарного фотосинтеза на воздухе при насыщенном свете. Из результатов видно, что главные меченые продукты — фосфоглицериновая кислота, дигидроксиацетонфосфат, глицериновая кислота и при экспонировании на свету гексозомонофосфаты, очень хорошо разделяются (рис. 3, табл. 2).

**Выход колонки.** Одним из показателей применимости данной методики колоночной хроматографии при количественном анализе является выход введенных соединений из колонки. В наших опытах выход всегда превышал 90%, что можно считать удовлетворительным (табл. 3). Чтобы убедиться, очищается ли смола от радиоактивных продуктов в течение элюции полностью, измеряли радиоактивность регенерирующего раствора (2 н. HCl, объем 300 мл). Оказалось, что радиоактивность регенерирующего раствора не превышает 0,5% от введенной в колонку общей радиоактивности. При исследовании продуктов фотосинтеза большое значение имеет также то, не подвергается ли рибулозо-1,5-

Таблица 3

## Выход меченых соединений из колонки

№ опыта	Радиоактивность, имп · мин <sup>-1</sup>		
	В колонку	Из колонки	Выход, %
1	2291	2058	89,8
2	3004	2816	93,7
3	3744	3450	92,1
4	4281	4166	97,3
5	143	133	93,0
6	180	167	92,7
7	91	87	95,6
8	133	124	93,2

дифосфат, один из самых лабильных ФЭ, разрушению при хроматографии. Для проверки этого через колонку пропускали определенное количество рибулозодифосфата. В зоне элюирования был обнаружен один пик 0,1 н. соляной кислоты (рис. 1). Количественное определение дало выход рибулозодифосфата более 80%.

**Заключение.** Описанный метод колоночной хроматографии позволяет разделить первичные продукты фотосинтеза. Если их образование оценивается по включению метки из  $^{14}\text{CO}_2$ , то в случае кратковременных экспозиций (продолжительностью до нескольких секунд) рехроматографирование отдельных зон, элюированных из колонок, не требуется. При более длительных экспозициях, когда среди продуктов фиксации  $^{14}\text{CO}_2$  существенное значение имеют гексозофосфаты и нефосфорилированные соединения, требуется их дополнительное разделение. Это можно сделать при помощи одномерной бумажной хроматографии.

Описанный метод технически несложен и применим для проведения параллельного анализа материала с большим количеством вариантов.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Atkins, C. A., Canvin, D. T. Analysis of  $^{14}\text{C}$ -labelled acidic photosynthetic products by ion-exchange chromatography. — *Photosynthetica*, 1971, 5, N 4, 314—351.
- Bartlett, G. R. Methods for the isolation of glycolytic intermediates by column chromatography with ion-exchange resin. — *J. Biol. Chem.*, 1959, 234, N 3, 459—465.
- Giersch, C. Quantitative high-performance liquid chromatographic analysis of  $^{14}\text{C}$ -labelled photosynthetic intermediates in isolated intact chloroplasts. — *J. Chromatogr.*, 1979, 172, 153—161.
- Heldt, H. W., Chon, C. J., Lilley, R. McC., Portis, A. The role of fructose- and sedoheptulosebiphosphatase in the control of  $\text{CO}_2$  fixation. Evidence from the effects of  $\text{Mg}^{++}$  concentration, pH and  $\text{H}_2\text{O}_2$ . — In: *Proc. 4th Int. Congr. Photosynth.*, 1977. London, 1978, 469—478.
- Heldt, H. W., Portis, A. R., Lilley, R. McC., Mosbach A., Chon, C. J. Assay of nucleotides and other phosphate-containing compounds in isolated chloroplasts by ion exchange chromatography. — *Anal. Biochem.*, 1980, 101, No 2, 274—287.
- Lilley, R. McC., Chon, C. J., Mosbach, A., Heldt, H. W. The distribution of metabolites between spinach chloroplasts and medium during photosynthesis in vitro. — *Biochem. Biophys. Acta*, 1977, 460, N 2, 259—272.
- Redgwell, R. J. Fractionation of plant extracts using ion-exchange Sephadex. — *Anal. Biochem.*, 1980, 107, N 1, 44—50.
- Viiil, J., Laisk, A., Oja, V., Pärnik, T. Enhancement of photosynthesis caused by oxygen under saturating irradiance and high  $\text{CO}_2$  concentration. — *Photosynthetica*, 1977, 11, N 3, 251—259.

Институт экспериментальной биологии  
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию  
12/XII 1984

Hiie IVANOVA, Juta VIII

#### MEETOD SUHKRUTE JA ORGAANILISTE HAPETE FOSFORESTRITE ANALÜÜSIKS TAIMEDES

On kirjeldatud tehniliselt lihtsat meetodit  $^{14}\text{C}$ -märgitud fosforestrite eraldamiseks taimsest ekstraktist kromatograafiliselt Dowex 1×8 (Cl<sup>-</sup>vormis) kolonnil atmelises HCl gradiendis. Heksoosfosfaate sisaldavad fraktsioonid defosforiülitakse ja lahutatakse täiendavalt paberchromatograafiliselt. Meetod on kasutatav fotosünteesi esmasproduktide uurimisel.

Hiie IVANOVA, Juta VIII

#### A METHOD FOR ANALYSIS OF ORGANIC PHOSPHATES IN PLANTS

A method for separating  $^{14}\text{C}$  labelled organic phosphates from leaf extract is described. Organic phosphates are eluted from Dowex 1×8 (chloride) ion-exchange resin column in the stepwise HCl gradient. Fractions containing hexose phosphates are additionally separated after enzymatic dephosphorylation by paper chromatography. The method can be applied for investigating primary products of photosynthesis.