
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

FRANCA SERAFINI CESSI, LUCIO MONTANARO

**Separazione cromatografica dell'acido
3-fosfoglicerico dall'omogenato di fegato di cavia
incubato in vitro**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 32 (1962), n.6, p.
1011–1017.*

Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1962_8_32_6_1011_0i

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Patologia. — *Separazione cromatografica dell'acido 3-fosfoglicerico dall'omogenato di fegato di cavia incubato in vitro.* Nota di FRANCA SERAFINI CESSI e LUCIO MONTANARO (*), presentata (**) dal Corrisp. G. FAVILLI.

Nel corso di uno studio sull'incorporazione del fosfato inorganico, marcato con P^{32} , nei composti fosforati acido solubili del fegato di cavia, *in vivo* e *in vitro*, ci siamo proposti di ottenere la separazione cromatografica dell'acido 3-fosfoglicerico (3-PGA) dagli altri componenti acido solubili.

La separazione cromatografica del 3-PGA da altri intermedi della glicolisi fu messa a punto da Khym e Cohn [7] su Dowex 2 (cloruro), mediante eluizione combinata di borato ed acido cloridrico: ma nel metodo originale l'acido fosfoglicerico viene solo in parte separato dall'ADP.

Recentemente Bartlett [2], con doppia cromatografia su Dowex 1×8 prima in forma di cloruro e poi in forma di formiato è riuscito ad isolare il 3-PGA da altri intermedi del ciclo di Embden-Meyerhof negli eritrociti, dove, per la prevalenza del ciclo glicolitico su quello ossidativo, questo composto si accumula in maniera ponderabile.

Da parte nostra è stato osservato che nell'estratto acido del fegato di cavia non si ritrovano quantità misurabili di 3-PGA ma che tale composto viene accumulato durante l'incubazione in aerobiosi dell'omogenato totale di fegato in presenza di substrati attivanti il ciclo ossidativo, di saccarosio e di fosfati.

METODICA E RISULTATI.

L'omogenato di fegato di cavia, ottenuto secondo la tecnica di Potter [9], era posto ad incubare in aerobiosi in un substrato della seguente composizione:

saccarosio	0,25	M
fumarato di potassio	0,00146	M
piruvato di potassio	0,005	M
glutamato di potassio	0,005	M
cloruro di magnesio	0,003	M
fosfato monopotassico + fosfato dipotassico pH 7,2	0,005	M

Ad esso, dopo 10 minuti di equilibrio a $30^{\circ}C$, erano aggiunti $50 \mu C$ di P^{32} (sale sodico) diluito in 0,1 ml del substrato, a pH 7,2. Il tempo di incubazione con il fosfato marcato era di 30 minuti. La reazione era interrotta con acido

(*) Istituto di Patologia dell'Università di Bologna.

(**) Nella seduta del 12 giugno 1962.

perclorico. L'estratto, liberato per centrifugazione dal precipitato proteico, era neutralizzato con KOH e, una volta chiarificato per sedimentazione del perclorato potassico, era pronto per la cromatografia.

In una colonna di Amberlite 400 (1 × 12 cm) in forma di formiato erano fatti assorbire i composti acido solubili corrispondenti a circa 5 grammi

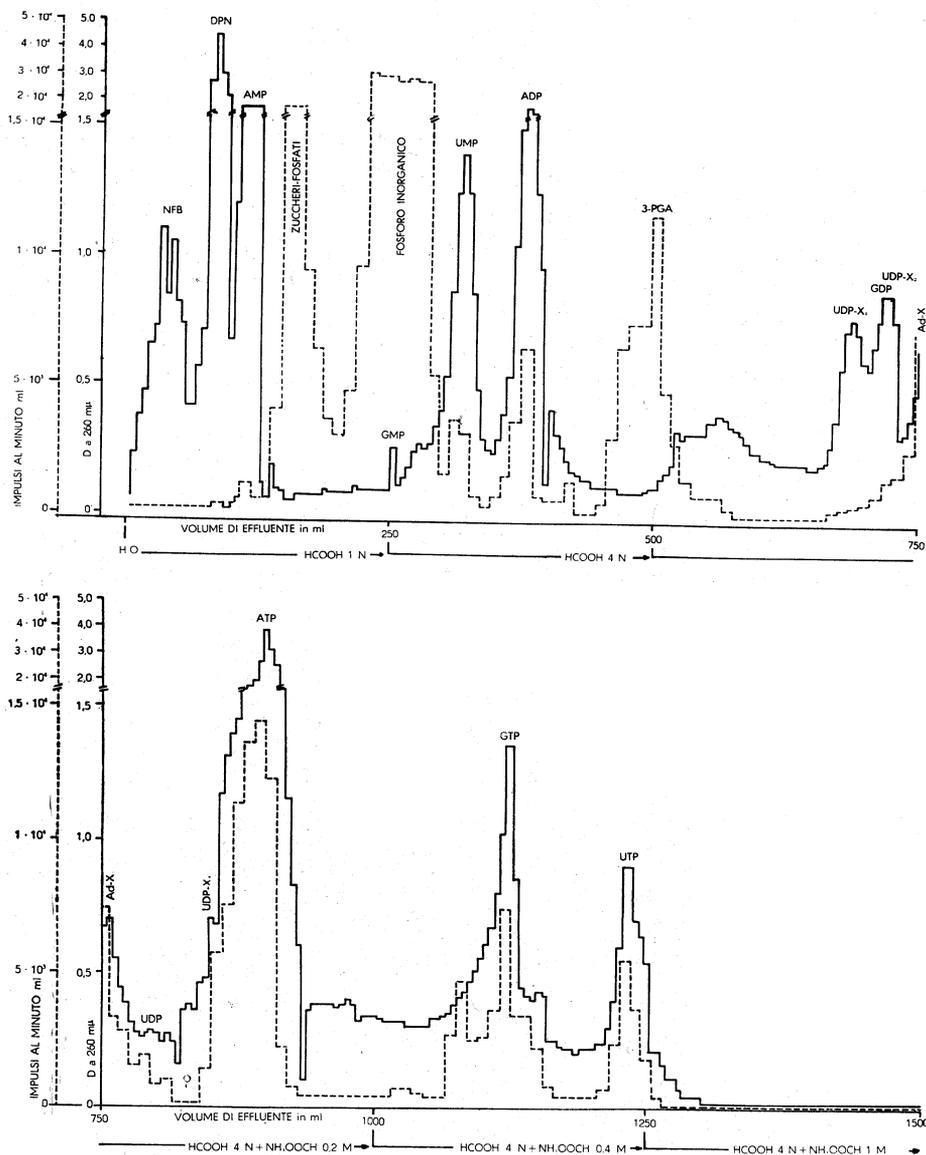


Fig. 1. - Cromatografia della frazione acido solubile dell'omogenato di fegato incubato in presenza di fosfato marcato con P³².

La linea intiera esprime la densità ottica a 260 mμ per 1 ml di ciascuna frazione eluita; quella tratteggiata il numero di impulsi al minuto per ml, misurato con un contatore di Geiger-Muller a bicchiere. Sono state usate le seguenti abbreviazioni: AMP, ADP, ATP: Acido adenosin-mono-di-tri-fosforico; Ad-X: adenosin-fosfati non identificati; DPN: difosfopiridinucleotide; GMP, GDP, GTP: Acido guanidin-mono-di-trifosforico; NFB: nucleosidi e basi libere; 3-PGA: ac. 3-fosfoglicerico; UMP, UDP, UTP: acido uridin-mono-di-trifosforico; UDPX₁, UDPX₂, UDPX₃ rispettivamente uridin-difosfato-acetil esosamina, uridin-difosfato-glucosio, uridin-difosfato-acido glucuronico.

di fegato fresco. Il flusso era regolato a ml 0,2 al minuto ed erano raccolte frazioni di 5 ml. Di ogni frazione si leggeva la densità ottica alle lunghezze d'onda di 260 e 275 m μ con lo spettrofotometro Beckmann mod. DU e si misurava la radioattività con il contatore di Geiger-Muller a bicchiere.

Il grafico riportato indica l'andamento della cromatografia (ved. fig. 1). Rispetto al metodo di Hurlbert e coll. [6], al quale ci siamo riferiti, abbiamo preferito aumentare il numero ed il volume degli eluenti; le variazioni di concentrazione degli eluenti erano ottenute con l'apparecchio di Bock e Nan Sing Ling [3], con il quale si ottiene un gradiente lineare.

a) *Identificazione dell'acido 3-fosfoglicerico.*

Abbiamo determinato, nel sistema cromatografico da noi adottato, il punto di eluizione di un campione di 3-PGA puro (fornito dalla BDH): esso viene eluito dall'acido formico 4 N, tra la fine del secondo e l'inizio del terzo eluente, in corrispondenza delle frazioni 95-105.

I limiti inferiore e superiore di concentrazione dell'eluente capace di spostare il composto in esame si potevano determinare applicando la seguente equazione [3]:

$$C = C_2 - (C_2 - C_1) \left(1 - \frac{v}{V} \right)$$

dove C = la concentrazione dell'eluente nel punto in questione, C₁ e C₂ rappresentano le concentrazioni degli eluenti rispettivamente nel miscelatore e nel recipiente di rifornimento dell'apparato realizzante l'incremento di concentrazione a gradiente continuo; V è il volume totale degli eluenti e v è il volume del liquido effluito. Si è calcolato che i limiti di molarità entro i quali è eluito il 3-PGA sono: acido formico 3,70 N (fine del 2° eluente) e acido formico 4 N + formiato d'ammonio 0,01 M (inizio del 3° eluente).

Nella cromatografia dell'estratto totale dei composti acido solubili dell'incubato di fegato, in questo stesso punto, è stato osservato un picco di radioattività senza un corrispondente significativo assorbimento nell'ultravioletto (ved. fig. 1). Non è presente in questa frazione fosfato inorganico né pirofosfato.

Il composto fosforato presente in questa frazione è stato identificato come acido 3-fosfoglicerico in base ad una reazione colorimetrica caratteristica (quella che il 3-PGA dà con l'acido cromotropico) ed in base al comportamento cromatografico su carta. Le prove sono state condotte dopo liofilizzazione del materiale, per allontanare l'acido formico che interferisce con i metodi di determinazione.

La reazione colorimetrica dell'acido cromotropico, descritta da Bartlett [2], è risultata positiva e lo spettro nel visibile era sovrapponibile a quello osservato per la reazione colorimetrica del 3-PGA puro di controllo. Le determinazioni quantitative erano fatte in base alla densità ottica a 690 m μ , dopo aver calcolato il coefficiente di estinzione molare di una soluzione titolata di 3-PGA.

L'analisi del fosforo, eseguita con il micrometodo di Martin e Doty [8], ha dimostrato la resistenza all'idrolisi acida del composto, il quale è risultato stabile anche dopo idrolisi in acido cloridrico 1 N per 180 minuti a 100° C. Il contenuto in fosforo fu determinato dopo incenerimento in H₂SO₄ 10 N a 140° C per 4 ore.

Nella Tabella I viene indicato il contenuto in acido 3-fosfoglicerico determinato con la reazione dell'acido cromotropico, ed il contenuto in fosforo dello stesso campione, determinato dopo incenerimento. Si dà anche il valore dell'ATP separato dalla stessa cromatografia, determinato con il coefficiente di estinzione molare a 258 m μ e con la determinazione del fosforo β e γ dopo idrolisi per 18 minuti in acido solforico normale.

TABELLA I.

Contenuto di 3-PGA e di ATP nell'omogenato di fegato di cavia incubato in vitro in presenza di P³² e di substrati attivanti il ciclo ossidativo.

I valori sono espressi in μ mole/g di tessuto epatico. L'attività specifica del fosforo stabile del 3-PGA e dei due fosfori labili dell'ATP è espressa come numero di impulsi al minuto per microgrammo di fosforo.

	3-PGA	ATP
Determinazione spettrofotometrica ⁽¹⁾	0,54	1,60
Determinazione in base al contenuto di P	0,68	1,60
Attività Specifica	140	195

(1) La determinazione è stata eseguita in base al coefficiente di estinzione molare, rispettivamente a 690 m μ (dopo reazione con ac. cromotropico) per il 3-PGA, e a 258 m μ per l'ATP.

La differenza riscontrata tra il valore di 3-PGA determinato con il metodo dell'acido cromotropico, e quello determinato con l'esame del contenuto in fosforo, dopo incenerimento del campione, va attribuita alla presenza, nella frazione cromatografica, di un altro composto fosforato, da noi non ancora identificato, e separabile dall'acido 3-fosfoglicerico mediante cromatografia su carta.

b) Cromatografia su carta.

Il comportamento cromatografico su carta del composto eluito dalla cromatografia su Amberlite 400 dei composti acido solubili dell'omogenato di fegato di cavia, è stato confrontato con quello del 3-PGA, sale di bario, triidrato, puro, fornito dalla BDH.

La cromatografia su carta era quella di tipo bidimensionale, ed è stata eseguita avendo presente la tecnica descritta da Bandurski e Axelrod [1], modificata con un diverso solvente acido che permette una migliore e più specifica risoluzione del 3-PGA da altri intermedi della glicolisi e dal fosforo inorganico (Eggleston [4]).

Era usata carta Whatmann n. 2, 28×28 cm; la soluzione in esame conteneva una quantità di 3-PGA non superiore a $0,4 \mu$ mole e veniva applicata su una superficie circolare del diametro di circa 0,5 cm. I solventi usati erano i seguenti:

1° solvente, acido: Etere isopropilico: Ac. formico 90% = 9 : 6;

2° solvente, basico: Metanolo: Ammoniaca: Acqua = 60 : 10 : 30

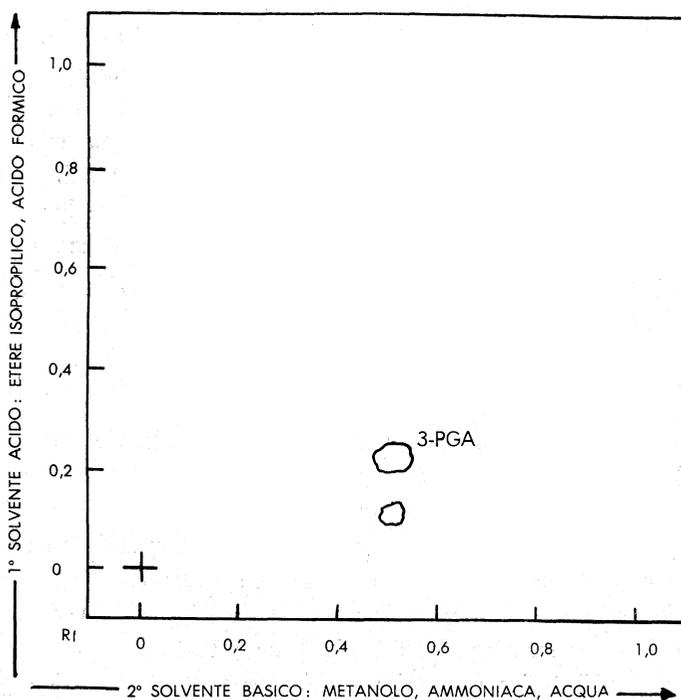


Fig. 2. - Cromatogramma bidimensionale su carta della frazione 3-PGA separata dalla cromatografia su colonna. La frazione è costituita principalmente da 3-PGA ed in piccola proporzione da un altro composto fosforato.

che hanno percorso la carta in senso ascendente ed in direzioni rispettivamente ortogonali. La cromatografia veniva eseguita in una stanza termostatica a 2° C. Per eliminare completamente l'acido formico del primo sviluppo si lasciava asciugare la carta a pressione ridotta in presenza di NaOH, e, egualmente, dopo il secondo sviluppo, in presenza di acido bórico, per eliminare completamente l'ammoniaca.

Per localizzare la macchia del composto in esame e del 3-PGA puro di controllo è stato usato il reagente di Hanes ed Isherwood [5].

La cromatografia del 3-PGA di controllo (decaionizzato con resina Amberlite IR 120 (H⁺)) ci ha permesso di calcolare gli Rf della macchia, unica, del composto standard: Rf acido 0,21; Rf basico 0,49.

La cromatografia della soluzione del composto in esame, marcato con P³² ha dimostrato la presenza di una macchia ben evidente e con colore blu assai intenso con Rf acido 0,21 e basico 0,49: valori corrispondenti quindi, a quelli del 3-PGA standard; ed un'altra macchia, più piccola e meno intensamente colorata, con Rf acido 0,11 ed Rf basico 0,49 (ved. fig. 2).

L'esatta corrispondenza del comportamento cromatografico del composto da noi identificato come 3-PGA con quello del 3-PGA standard si è potuta evidenziare usando il primo composto (marcato, per incorporazione *in vitro*, con P³²) come « tracciante » del secondo. È stata infatti eseguita una cromatografia bidimensionale su carta di una soluzione contenente circa 0,4 μ mole di 3-PGA standard ed una piccola quantità, non rivelabile con metodo colorimetrico, di 3-PGA marcato con P³², con una attività specifica di 140 impulsi al minuto per microgrammo di fosforo. L'esame autoradiografico della carta cromatografica ha dimostrato, in una lastra sviluppata dopo 7 giorni di esposizione, che la radioattività era localizzata in corrispondenza della macchia di 3-PGA standard (Rf acido 0,21, Rf basico 0,49).

CONCLUSIONI.

Queste osservazioni documentano come durante la separazione cromatografica su Amberlite 400 in forma di formiato dei composti acido solubili del fegato di cavia è possibile separare con buona risoluzione l'acido 3-fosfoglicerico, il quale appare accumularsi in quantità apprezzabile durante l'incubazione in aerobiosi dell'omogenato totale dell'organo.

Il 3-PGA viene spostato, quando si usino gli eluenti secondo un gradiente di concentrazione lineare, tra l'acido formico 3,70 N (fine del 2° eluente) e l'acido formico 4 N + formiato d'ammonio 0,01 M (inizio del 3° eluente).

La risoluzione da altri composti fosforati è abbastanza soddisfacente da permettere la determinazione dell'attività specifica del composto.

Questo accumulo di acido 3-fosfoglicerico può essere interpretato come conseguenza di un orientamento in senso resintetico delle tappe del ciclo di Embden-Meyerhof. Nel caso dell'incubazione in aerobiosi dell'omogenato di fegato di cavia nel mezzo prima descritto è stato da noi osservato un accumulo delle forme più ricche di energia dei nucleotidi adenilici (AMP/ATP = 0,07; ADP/ATP = 0,29; valori medi da quattro esperimenti), a confronto dei valori osservati in esperimenti di incorporazione *in vivo* del fosfato marcato nei nucleotidi adenilici del fegato (AMP/ATP = 1,26; ADP/ATP = 1,53; valori medi da quattro esperimenti). Il grande eccesso di legami fosforici energetici, e la grande disponibilità nel mezzo di incubazione di piruvato e

di altri composti facilmente convertibili in piruvato possono spostare l'equilibrio delle reazioni nel senso di una resintesi di carboidrati a partire dall'acido piruvico (processo che, nella tappa piruvato \longrightarrow fosfoenolpiruvato, richiede appunto energia).

Conforta questa nostra opinione l'aver rilevato che durante l'incubazione dell'omogenato di fegato di cavia, in un mezzo contenente solo cloruri di potassio e di magnesio, fosfati di potassio e saccarosio, non si verifica l'accumulo di quantità determinabili di acido 3-fosfoglicerico.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] R. S. BANDURSKI, B. AXELROD, « J. Biol. Chem. », 193, 405 (1951).
- [2] G. R. BARTLETT, « J. Biol. Chem. », 234, 459 (1959).
- [3] R. M. BOCK, LING NAN-SING, « Anal. Chem. », 26, 1543 (1954).
- [4] L. V. EGGLESTON, R. HEMS, « Biochem. J. », 52, 156 (1952).
- [5] C. S. HANES, F. A. ISHERWOOD, « Nature », 164, 1107 (1949).
- [6] R. B. HURLBERT, H. SCHMITZ, A. F. BRUMM, V. R. POTTER, « J. Biol. Chem. », 209, 23 (1954).
- [7] J. X. KHYM, W. E. COHN, « J. Am. Chem. Soc. », 75, 1153 (1953).
- [8] J. B. MARTIN, D. M. DOTY, « Anal. Chem. », 21, 965 (1949).
- [9] V. R. POTTER, *The homogenate technique*, in: W. W. UMBREIT, R. H. BURRIS, J. F. STAUFFER, *Manometric techniques*, Burgess Publ. Co., Minneapolis 1959.