

KÜLÖNLENYOMAT

A

# KÍSÉRLETES ORVOSTUDOMÁNY

C. FOLYÓIRATBÓL

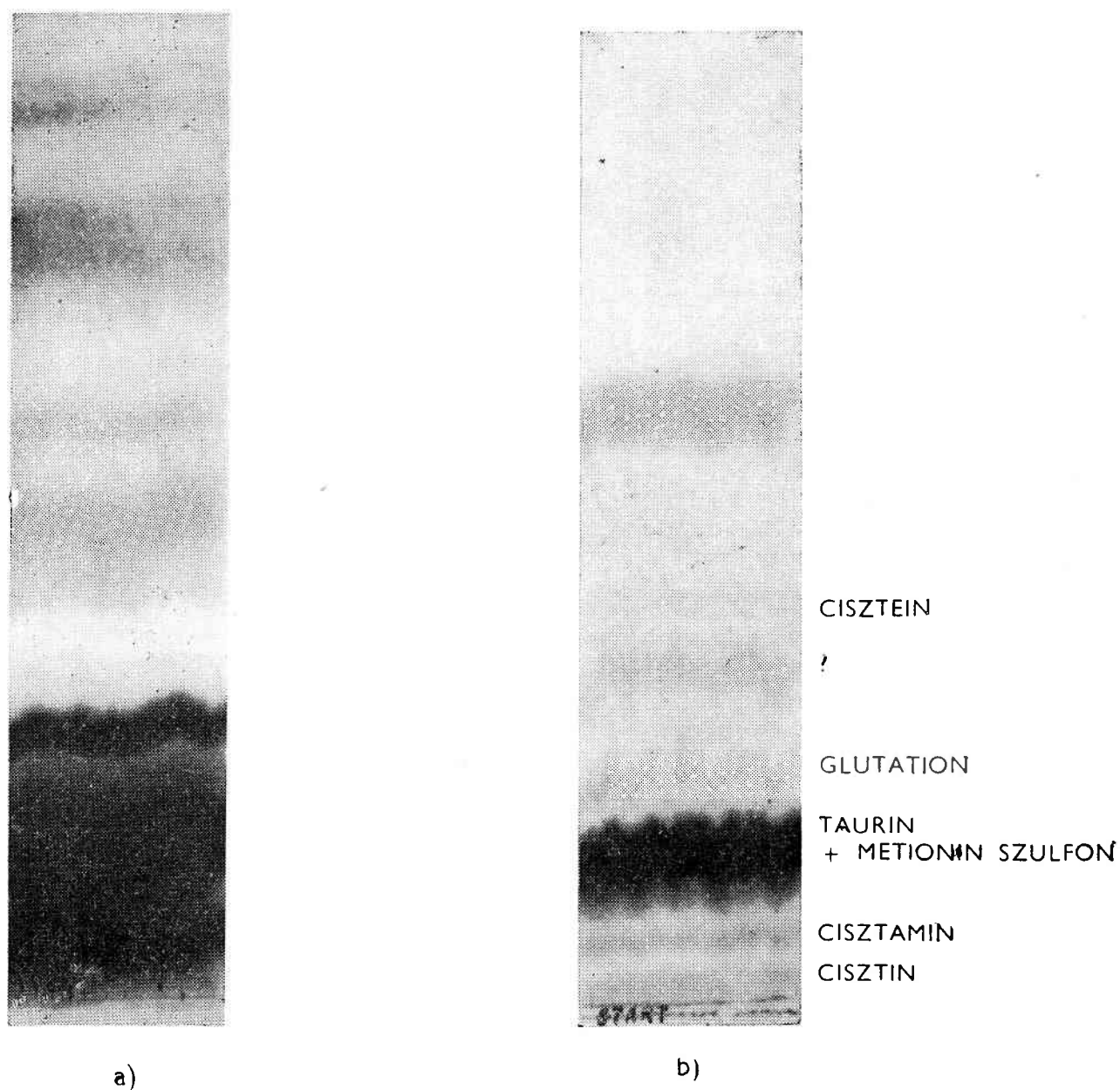
1963 45,

## **$S^{35}$ -tel jelzett metionin anyagcseretermékeinek rádiokromatográfiás analízise kapcsán nyert tapasztalatok**

SZÁNTAY JÁNOS, K. ALANIA VALERIA és URAY ZOLTÁN

Közlésre érkezett: 1963. március 2-án

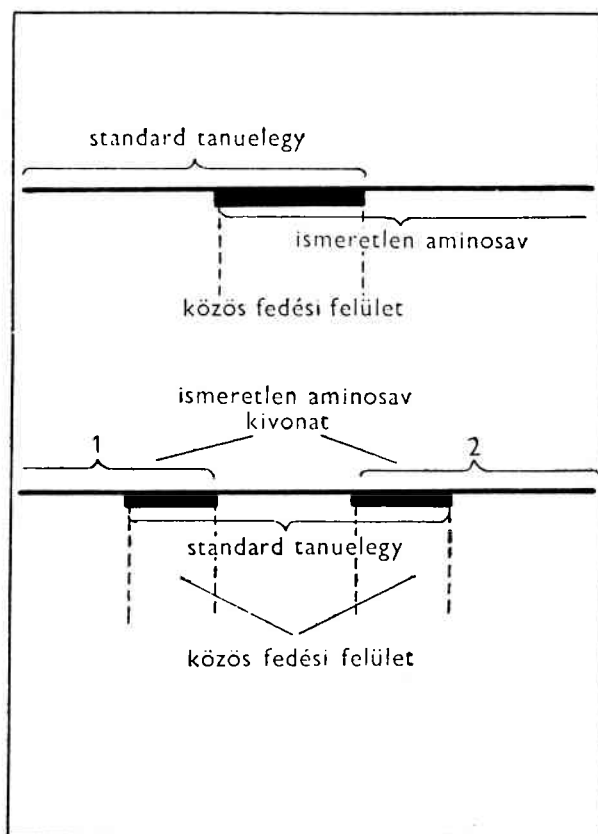
Az aminosavak minden kétséget kizáró azonosítása a kromatogrammon ninhidrines, vagy egyéb általános aminosavreagenssel történő előhívás után, sok gyakorlat mellett is, a nehéz analitikai feladatok közé tartozik. Az azonosításra használt Rf értékeket számos fiziko-kémiai paraméter befolyásolja, melyek jelentősen korlátozzák ezen értékek analitikai jelentőségét. *Consdén* szerint az Rf értékeket hét tényező befolyásolja döntően (3). Ezek közül az



1. ábra. Metionin  $S^{35}$  intraperitonidális injeciálása után 24 órán át gyűjtött patkányvizeletből Amberlit I. R. 120 gyantával kivont aminosavak és aminek kromatogramma ninhidrines előhívás után (a) és ugyanazon kromatogramm  $S^{35}$  tartalmú aminosavainak és aminjeinek autoradiogramma (b) Futtatási feltételek: Használt szűrőpapír: Watman 1 Oldószerkelegy: *n*-butanol, deszt. víz, hangyasav, etilalkohol (40:40:10:2) Felsőálló futtatás

azonosítás szempontjából a legtöbb problémát az aminosavak emelkedő koncentrációjának, valamint az analizálandó elegyben jelenlevő kísérő anyagoknak és szennyeződéseknek az  $R_f$  értékekre gyakorolt hatása jelenti.

Ez kézenfekvő megállapítás, ugyanis biológiai eredetű szabad aminosav-kivonatok esetében, függetlenül a kivonási módszertől, az összehasonlításra használt tiszta aminosavelegy koncentrációs és tisztasági körülményei nem valósíthatók meg. Emiatt az analizálandó, ismeretlen összetételű aminosavelegy és a tanuelegy aminosavjainak az  $R_f$  értékei különbözőek lesznek (6, 7). Az aminosavak kromatográfiás analizise kapcsán felmerült analitikai problémák megoldására különböző szerzők számos azonosítási eljárást írtak le (5, 9), melyek azonban az ilyenértelmű kutatásokat távolról sem zárták le.

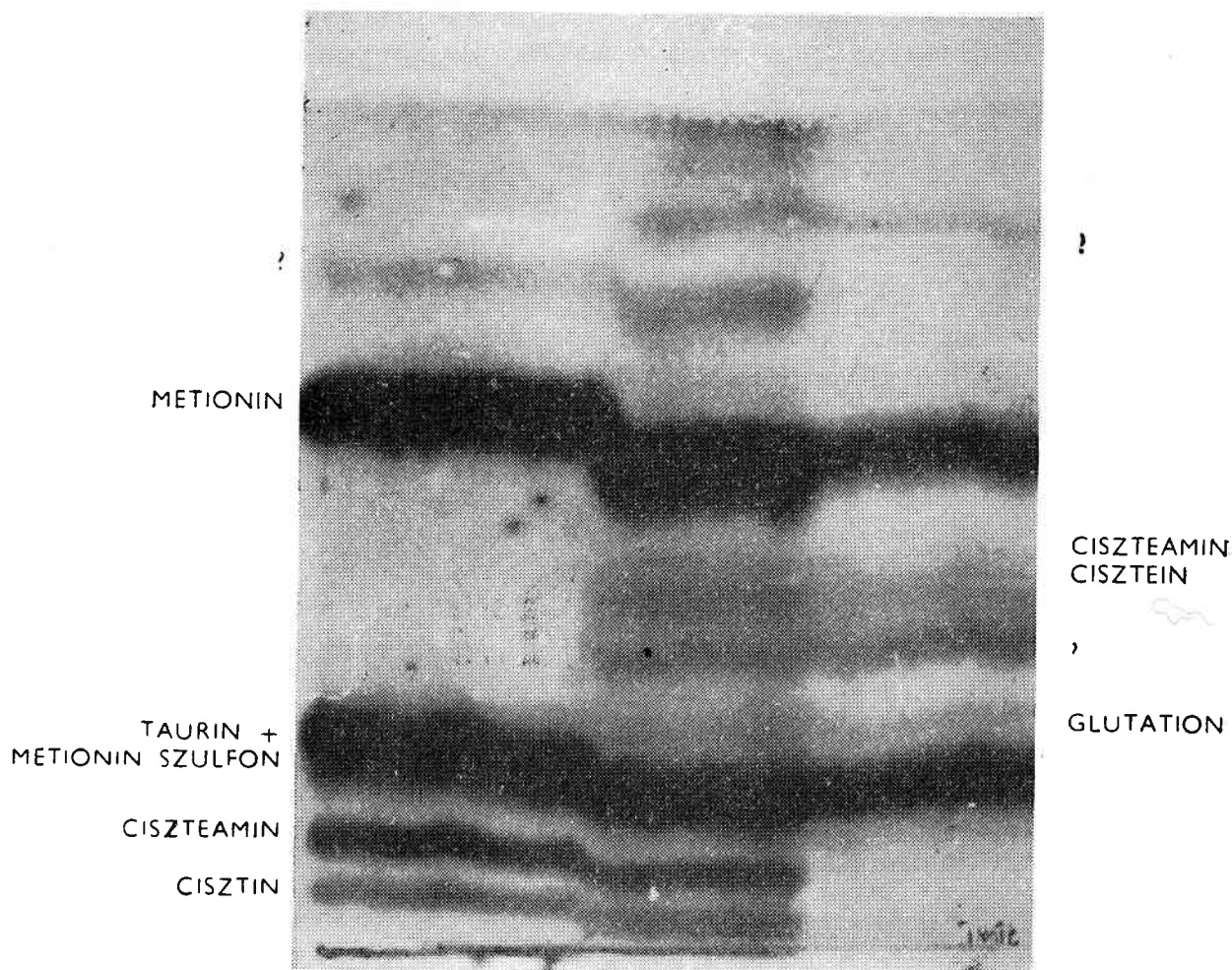


2. ábra. Az ismert tanuelegy és az analizálandó aminosav kivonat felviteli technikája  
a) analizálandó aminosav kivonat esetén b) két analizálandó aminosav esetén

Természetesen ezen megállapítások még fokozottabb mértékben érvényesek radioaktív elemekkel jelzett aminosavak anyagcseretermékeinek rádiónkromatográfiás analizésére. Ugyanis biológiai anyagcsere kísérletek esetében a radioaktív izotóppal jelzett aminosavak, vagy egyéb radioaktív anyagok mennyiségének bevitelét az emberi vagy állati szervezetbe e vegyületek sugárhatása megszabja és korlátozza. Ennek következtében az inaktív komponensek mellett a radioaktív izotóppal jelzett anyagcseretermékek igen kis mennyiségben jelennek meg. Ennek a demonstrálására a következő kísérleti példát hozzuk fel: patkánynál  $0,5 \mu\text{C}/\text{testsúly g}$  dózisú metionin S—35 intraperitoniális injeciálása után 24 órás gyűjtött vizeletből Amberlit I. R. 120 ioncserélő gyanta segítségével kivontuk úgy az aktív, mint az inaktív aminosavakat és amineket (2). Ahhoz, hogy röntgenfilmmel kontaktusban az aktív komponensek elfogadható időn belül (10—30 nap) megfelelő autoradiogramot adjanak, olyan nagymennyiségű aminosav kivonatot kellett a szűrőpapírra felvinni, mely az alkalmazott oldószer használata mellett lehetetlenné tette az inaktív aminosavak unidimenzionális szétválasztását (6). Ettől függetlenül a S—35-el

jelzett amin- és aminosav jellegű anyagcsere termékek élesen elhatárolt sávok formájában jelentkeztek az autoradiogrammon (1. sz. ábra).

Az 1. ábrán bemutatott kromatogramm és a róla készített autoradiogramm a fent elmondottakon kívül világosan bizonyítja, hogy a kéntartalmú aminosavak anyagcseréjéből származó mikrokomponensek az inaktív aminosav kivonatok klasszikus kromatografálása esetén az általánosan használt kimutatási eljárások mellett észlelhetők és beleolvadnak a hasonló Rf értékkel rendelkező magasabb koncentrációjú aminosavakba. Ily módon ezen mikro-



3. ábra. Metionin  $S^{38}$  intraperitoneális injicciója után 24 órán át gyűjtött patkányvizeletből Amberlit I. R. 120 gyantával kivont  $S^{35}$  tartalmú aminek és aminosavakból készített radiokromatogramm a 2. sz. ábrán feltüntetett módszerrel kromatografálva. Futtatási feltételek: lásd 1. ábra.

komponensek, bár a kéntartalmú aminosavak szempontjából igen nagy jelentőséggel bírnak, a klasszikus kromatográfiai módszerek kisebb érzékenysége miatt nem tájékoztatják a kutatót ezen változások dinamikájáról.

Nyitott kérdés maradt tehát az anyagcsere folyamatok kapcsán képződött  $S^{35}$  tartalmú aminosavak és aminoszármazékok azonosítása, ugyanis ezeknek az Rf értékei a magas inaktív aminosav koncentráció miatt jelentős módon lecsökkentek, a tiszta tanuelegyként alkalmazott aktív  $S^{35}$ -öt tartalmazó aminosavak és aminek Rf értékeihez viszonyítva.

A kérdést egy előbbi dolgozat keretében oldottuk meg, az ismert tanuelegyet és a vizsgálandó kivonatot a 2. ábra szerint kromatografálva (7).

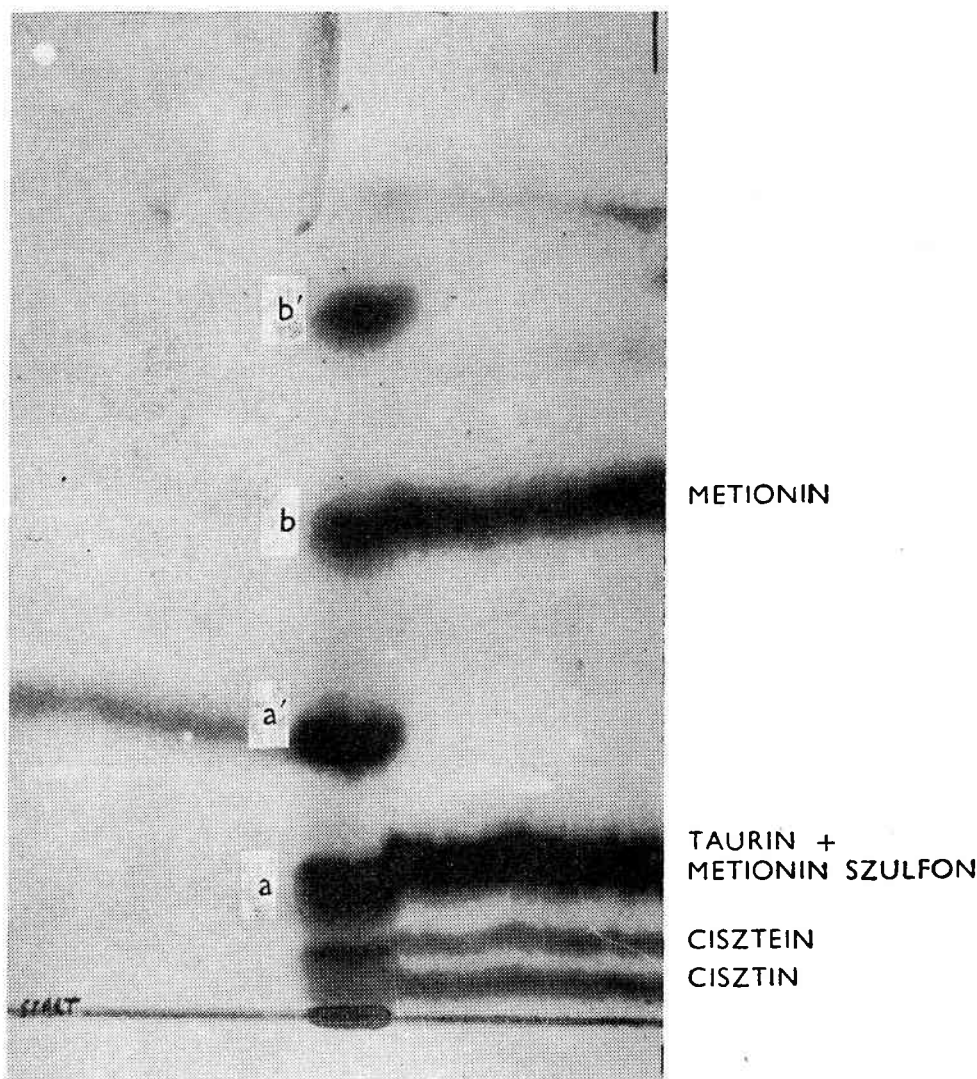
Ezzel a módszerrel patkányvizeletből Amberlit IR 120 ioncserélő gyantával kivont  $S^{35}$  tartalmú aminosavak és aminok kromatográfiai analízise kapcsán a 3. ábrán látható autoradiogramot kaptuk.

Kétséget kizáróan megállapítható, hogy a már említett okok miatt.

analizált kivonat  $S^{35}$  tartalmú aminosavainak és aminjeinek az  $R_f$  értékei a tanuelegy azonos  $S^{35}$  tartalmú komponenseihez viszonyítva erősen lecsökkennek. Ettől függetlenül az azonos aminosavak és aminek sávjainak összefolyása révén az azonosítás nem jelent semmi nehézséget.

Az eddig felsorolt nehézségeken kívül az inaktív aminosavak minőségi és mennyiségi analizisét zavaró problémákkal a szakirodalom bőven foglalkozik (1, 4, 5, 10). A minket érintő kérdéssel Beck és Ébrey foglalkozott bővebben.

A szerzők szerint egyes aminosavak moláris koncentrációjuktól függően,



4. ábra. Metionin  $S^{35}$  intraperitoniális injeciálása után 24 órán át gyűjtött patkányvizeletből Amberlit I. R. 120 gyantával kivont aminosavak és aminok rádiokromatogramja  
Futtatási feltételek: lásd 1. ábra

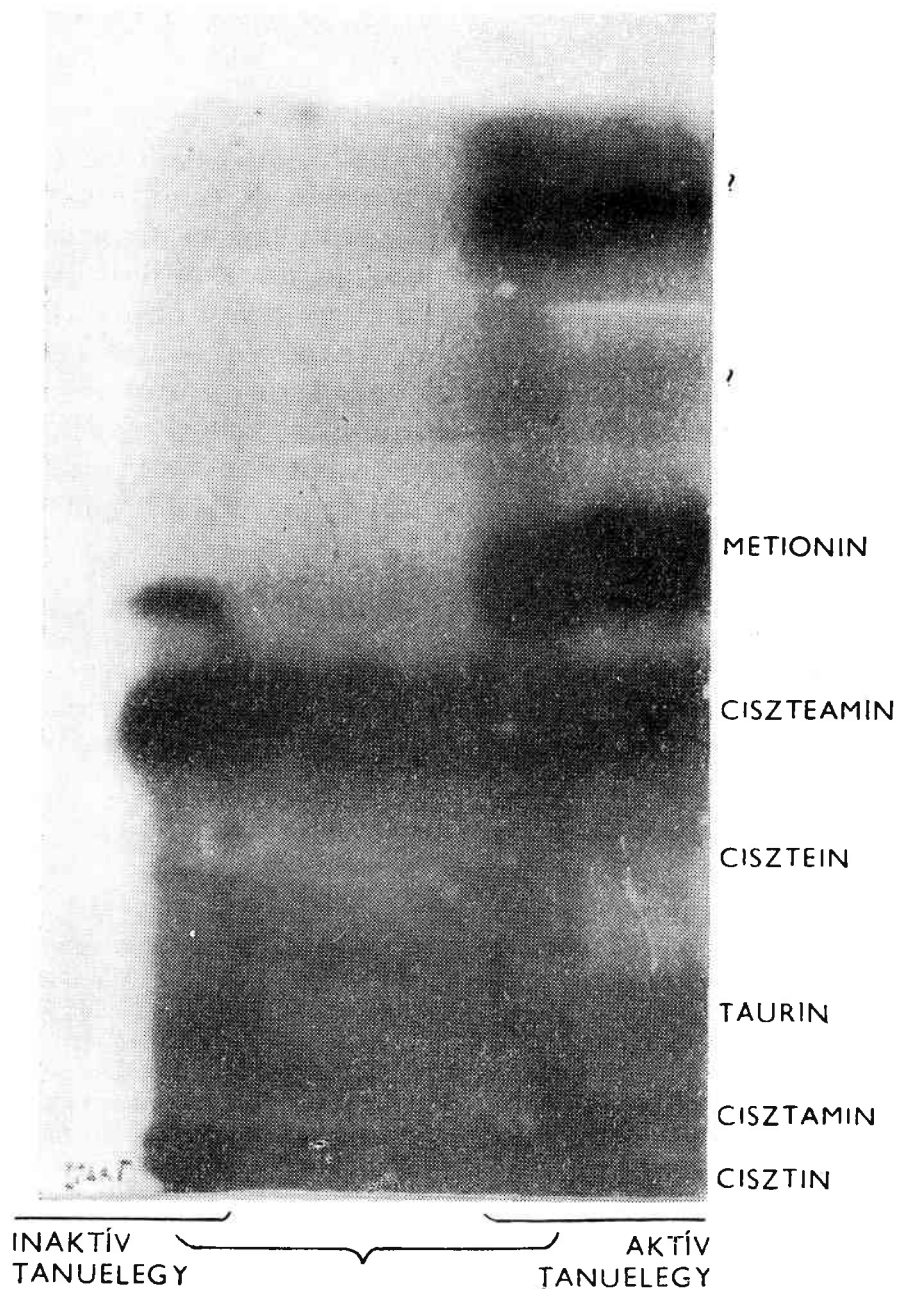
molekula vegyületeket képeznek egymással, és a kromatogrammon az eredeti — de már csökkent mértékben jelenlévő pontok mellett — a jelzett reakcióból származó terméknek megfelelő új foltot kapunk.

Hasonló jelenséggel találkozunk az  $S^{35}$  tartalmú aminosavak, aminek, valamint tioketosavak rádiokromatográfiás analizisének kapcsán (4. és 5. ábra).

A 4. számú autoradiogramot metionin  $S^{35}$  intraperitoniális injeciálása után nyertük 24 órán át gyűjtött patkányvizeletből. Az aminosavakat és a desaminált tioketosavakat előzetesen IRA 410 ioncserélő gyantával kivontuk, majd az amineket Amberlit I. R. 120 gyanta segítségével kötöttük meg. Leoldás után a nyert  $S^{35}$  tartalmú amineket ismert összetételű  $S^{35}$ -t tartalmazó aminosav és amin tanueleggyel hasonlítottuk össze. A kivonatban

egyetlen rádióaktív komponenst találtunk, melynek megfelelőjét a használt tanuelegyen nem találtuk.

Ezzel szemben az ioncserélő gyantával nyert amintartalmú extraktum két inaktív komponense feltételezhetően reakcióba lépett a tanuelegy metioninszulfon (a), valamint metionin (b) komponenseivel. Az ily módon képződött új vegyületek magasabb R<sub>f</sub> értékekkel jellemezhetőek és a kromatogramokról készített autoradiográfián az a' valamint a b' pontban megfelelő feketedést idéznek elő.



5. ábra. Cisztein  $S^{35}$  intraperitoniális injeciálása után 24 órán át gyűjtött patkányvizeletből Amberlit I. R. 120 gyantával kivont  $S^{35}$  tartalmú aminosavak és aminok radiokromatogramja aktív és inaktív kéntartalmú tanueleggyel összehasonlítva. Futtatási feltételek: lásd 1. ábra

Az 5. ábrán látható az az autoradiogramm, melyet 24 órán gyűjtött patkány vizeletből Amberlit I. R. 120 ioncserélő gyanta segítségével kivont aminosav és amin kivonathból nyertünk cisztein  $S^{35}$  intraperitoniális injeciálása után. Az „a”-val jelzett sávon metionint, ciszteint, cisztint, ciszteamint, cisztamint és homociszteint tartalmazó tanuelegyet alkalmaztunk összehasonlítás céljából. Ezen tanuelegy egyik komponense reakcióba lépett az analizált

kivonat kvantitatív meghatározható mennyiségével és a képződött új vegyület Rf értéke az aktív tanuelegy metionin S—35 komponensének Rf értékével azonos.

A S—35-l jelzett kéntartalmú aminosavak és aminek radiokromatográfiás analízisének kapcsán észlelt jelenségek alátámasztják és kétséget kizárólag igazolják az említett szerzők inaktív aminosavakra vonatkozó észleléseit. Hangsúlyoznunk kell, hogy az általunk közölt jelenség nem állandó kísérője az S—35 tartalmú aminosavakból és aminekből készített radiokromatográfiás analíziseknek. A jelenséget okozó közelebbi körülményeket további megfigyelések hivatottak megvilágítani.

### Összefoglalás

A szerzők patkányvizeletből Amberlit I. R. 120 ioncserélő gyantával kivont S<sup>35</sup>-el jelzett metionin és cisztein anyagcseretermékeinek rádiokromatográfiás analízise kapcsán észlelt tapasztalataikról számolnak be.

Leírják a szabad aminosavak aktív és inaktív komponenseinek koncentráció különbségéből adódó jelenségeket, ezzel kapcsolatosan az azonosítási műveleteknél szerzett tapasztalataikat.

Ezenkívül S<sup>35</sup> tartalmú aminosavak radiokromatográfiás analízisével kapcsolatosan észlelt kísérleti eredményeikkel alátámasztják más szerzők inaktív aminosavakkal kapott eredményeit, melyek bizonyos körülmények között új molekula vegyületek képződését bizonyítják.

### Irodalom

1. Beck M., Ébrey G. P.: Magyar Kémiai Folyóirat, 59, 350, 1953. — 2. Blazsek V.: Orvosi Szemle III. 59, 1957. — 3. Consden, R., Gordon, H. H., Martin, A. J. P.: Biochem. J. 38, 224, 1944. — 4. Ébrey G. P., Beck M.: Kísérletes Orvostudomány 10, 145, 1955. — 5. Hais I. M., Macek K.: A papírkromatográfia kézikönyve, Akad. Kiadó Budapest, 1961. — 6. Kostir, J. V., Rabek, V.: Biochim, Biophys. Acta 5, 210, 1950. — 7. Landua, A. J., Fuerst, R., Awapara, J.: Anal. Chem. 23, 163, 1951. — 8. Szántay J.: Lucrările Stiintifice I. M. F. Cluj Vol I. 120, 1957. — 9. Szántay J.: Revista de Chimie : 8, 544, 1957. — 10. Szántay J.: Sesiunea Stiintifica Universitatii Babeş—Bolyai 1962.

С а н т а и, Й., К. А л а н и а, В., У р а и, З.: Данные, полученные на основании радиохроматографического анализа продуктов обмена меченного S<sup>35</sup> метионина.

Авторы рассказывают о своих данных, полученных путём радиохроматографического анализа продуктов обмена меченного S<sup>35</sup> и полученного из мочи крыс при помощи йонообменивающей смолы Amb. I. R. 120 метионина и цистеина. Описывают явления, возникающие в результате разницы концентрации активных и инактивных компонентов свободных аминокислот, в связи с этим указывают на полученные результаты при идентификации аминокислот, а также метод, названный методом идентификации „связывающей свидетельствующей смеси“. Кроме этого авторы своими экспериментальными результатами, полученными при радиохроматографическом анализе аминокислот, содержащих S<sup>35</sup> подтверждают результаты, полученные инактивными аминокислотами другими авторами. Последний факт доказывает образование новых молекул, при определенных обстоятельствах.

J. S z á n t a y, K. V. A l a n i a, Z. U r a y: Erfahrungen anhand der radiochromatographischen Analyse der Stoffwechselprodukte des mit S<sup>35</sup> markierten Methionins.

Die Verfasser berichten über ihre Erfahrungen anhand der radiochromatographischen Analyse der aus Rattenharn mit Amb. I. R. 120 Ionenaustauscherharz extrahierten, mit S<sup>35</sup> markiertem Stoffwechselprodukte des Methionins und Cysteins. Die aus dem Konzentrationsunterschied der aktiven und inaktiven Komponenten der freien Aminosäuren sich ergebenden Erscheinungen, die anhand der Identifizierungsvorgänge gewonnenen Erfahrungen, sowie die Identifizierungsmethode werden beschrieben. Die anhand der radiochromatographischen Analyse von S<sup>35</sup> enthaltenden Aminosäuren gewonnenen experimentellen Resultate unterstützen die mit inaktiven Aminosäuren erhaltenen Ergebnisse anderer Autoren, die unter bestimmten Verhältnissen auf die Bildung neuer Verbindungen weisen.