

3

1963

# STUDIA

## UNIVERSITATIS BABEŞ-BOLYAI

SERIES CHEMIA

FASCICULUS 1

1963

SEPARATUM

C L U J

# UTILIZAREA RĂȘINILOR SCHIMBĂTOARE DE IONI ȘI A RADIO-CROMATOGRAFIEI, ÎN CERCETĂRI DE CHIMIE BIOLOGICĂ (II)

Modificările  $R_f$ -urilor aminoacizilor și aminelor sulfurate  $S^{35}$ , sub influența compușilor aminici inactivi, extrași din lichide biologice cu Amberlit

I.R.120.

de

I. SZÁNTAI, V. KOVÁCS, Z. URAY, M. FĂRCĂȘANU

Identificarea aminoacizilor pe cromatogramă, după dezvoltarea cu ninhidrină sau cu un alt reactiv general pentru aminoacizi, a constituit întotdeauna o problemă dificilă, deoarece, așa cum arată și Dent [4], valorile  $R_f$  pot să aibă variații chiar de 15% și atunci când cromatogramele au fost obținute în aceeași cameră de cromatografie, cu același dizolvant.

Astfel, din cauza oscilațiilor  $R_f$ , pentru identificarea aminoacizilor pe cromatograme, după dezvoltare, în afara determinării acestora, s-a recurs la o serie de procedee, care pot fi grupate în două grupuri mari [6]:

1. Aplicarea probelor etalon în paralel sau împreună cu soluția cercetată.

2. Introducerea diferitelor reacții specifice de recunoaștere.

Consd en și colab. [3], au indicat 7 factori care influențează valorile  $R_f$ , determinate cu același sistem de dizolvant și anume: a) calitatea hîrtiei; b) temperatura; c) cantitatea de substanță analizată; d) impuritățile amestecului de analizat; e) gradul de saturație; f) modul de alimentare cu dizolvanți și g) distanța între linia de start și sursa de dizolvanți.

Atunci când amestecul de aminoacizi care urmează să fie identificat pe cromatogramele unidimensionale, este lipsit de impurități și cantitatea aminoacizilor puși pe cromatogramă nu diferă în mod sensibil de cantitatea aminoacizilor din soluția etalon, cu alte cuvinte atunci când factorii c și d sînt inoperanți, pentru identificarea aminoacizilor este suficientă aplicarea probelor de etalon paralele.

Procedeul identificării devine mult mai dificil în momentul când la modificarea  $R_f$  intervin și factorii c și d. Această situație este frecvent întîlnită la analiza aminoacizilor din diferite lichide biologice, când cu metodele chimice și fizico-chimice uzuale, pe lîngă aminoacizi, se extrag încă o serie de substanțe, în funcție de metoda întrebuintată.

Utilizarea metodei cromatogramelor mixte, adică aplicarea probei etalon direct pe amestecul de aminoacizi analizat, este impusă de factorii  $c$  și  $d$ ., adică de influența cantității substanței analizate și a impurităților asupra valorii  $R_f$ .

În cazul impurităților prezente în amestecul de aminoacizi analizați, utilizarea probelor etalon mixte a fost subliniată și de L a n d u a [8], ca și de observațiile lui K o s t î r și R a b e k [7], care au arătat că sub influența impurităților, se poate produce chiar și inversarea  $R_f$  substanțelor analizate, față de etaloane pure. Importanța acestei metode este accentuată și de cercetările lui Z i m m e r m a n n [10], ale lui B e c k și E b r e y [1], care subliniază modificarea  $R_f$  în funcție de concentrația acestora, în proba de analizat.

Metoda cromatogramelor mixte, impusă de modificarea  $R_f$  sub influența impurităților și a concentrațiilor diferite, necesită repetarea cromatogramelor de fiecare dată cu alt aminoacid și nu permite întrebuițarea amestecurilor de etalon. Impedimentul apare și în cazul analizelor cantitative [6].

Pentru a simplifica procedeele de identificare a aminoacizilor din diferite lichide biologice, extrași în general pe cromatograme unidimensionale și în special pe radiocromatograme ale aminoacizilor marcați și obținuți prin aceeași tehnică, am încercat punerea la punct a metodei amestecului de etalon parțial suprapus.

Trebuie să relevăm situația specială care există în cazul cercetării metabolismului aminoacizilor marcați cu radioizotopi. Administrarea unei activități ridicate de aminoacizi marcați, în scopul cercetărilor metabolismului, este limitată de acțiunea radiobiologică a acestor substanțe radiante [5]. În schimb, obținerea extraselor de aminoacizi marcați din lichide biologice, care permite efectuarea radiocromatogramelor acceptabile, necesită administrarea unei activități cât mai ridicate.

Pentru rezolvarea acestei contradicții, unica soluție este de a aplica pe cromatogramă, cantități mai mari de aminoacizi extrași, decât sînt necesare pentru obținerea unei cromatograme obișnuite, cu separarea netă. Acest lucru însemnează că atît concentrația mai mare a aminoacizilor marcați și nemarcați, cît și nivelul mai crescut al impurităților (cationi prezenți în urma extracției cu cationit), vor influența în mod simțitor  $R_f$  aminoacizilor.

În sensul acesta, nici măsurarea  $R_f$ , nici aplicarea etaloanelor paralele nu permit identificarea aminoacizilor marcați. Avînd în vedere laboriozitatea și inconvenientele cromatogramelor mixte, obținute prin etaloane separate, puse pe amestecul de analizat, care nu permit efectuarea simultană a analizei cantitative, noi am încercat să elaborăm o nouă metodă, aceea a amestecului de etalon parțial suprapus.

#### Metoda de lucru.

După marcarea prealabilă a animalelor de experiență cu 0,5 microCurie/gram-corp de metionină  $S^{35}$ , iar la om 2 microCurie/kilogram-corp, aminoacizii liberi s-au extras din lichidele biologice și extractele de organe,

Utilizarea metodei cromatogramelor mixte, adică aplicarea probei etalon direct pe amestecul de aminoacizi analizat, este impusă de factorii  $c$  și  $d$ ., adică de influența cantității substanței analizate și a impurităților asupra valorii  $R_f$ .

În cazul impurităților prezente în amestecul de aminoacizi analizați, utilizarea probelor etalon mixte a fost subliniată și de L a n d u a [8], ca și de observațiile lui K o s t î r și R a b e k [7], care au arătat că sub influența impurităților, se poate produce chiar și inversarea  $R_f$  substanțelor analizate, față de etaloane pure. Importanța acestei metode este accentuată și de cercetările lui Z i m m e r m a n n [10], ale lui B e c k și E b r e y [1], care subliniază modificarea  $R_f$  în funcție de concentrația acestora, în proba de analizat.

Metoda cromatogramelor mixte, impusă de modificarea  $R_f$  sub influența impurităților și a concentrațiilor diferite, necesită repetarea cromatogramelor de fiecare dată cu alt aminoacid și nu permite întrebuințarea amestecurilor de etalon. Impedimentul apare și în cazul analizelor cantitative [6].

Pentru a simplifica procedeele de identificare a aminoacizilor din diferite lichide biologice, extrași în general pe cromatograme unidimensionale și în special pe radiocromatograme ale aminoacizilor marcați și obținuți prin aceeași tehnică, am încercat punerea la punct a metodei amestecului de etalon parțial suprapus.

Trebuie să relevăm situația specială care există în cazul cercetării metabolismului aminoacizilor marcați cu radioizotopi. Administrarea unei activități ridicate de aminoacizi marcați, în scopul cercetărilor metabolismului, este limitată de acțiunea radiobiologică a acestor substanțe radiante [5]. În schimb, obținerea extraselor de aminoacizi marcați din lichide biologice, care permite efectuarea radiocromatogramelor acceptabile, necesită administrarea unei activități cât mai ridicate.

Pentru rezolvarea acestei contradicții, unica soluție este de a aplica pe cromatogramă, cantități mai mari de aminoacizi extrași, decât sînt necesare pentru obținerea unei cromatograme obișnuite, cu separarea netă. Acest lucru însemnează că atît concentrația mai mare a aminoacizilor marcați și nemarcați, cît și nivelul mai crescut al impurităților (cationi prezenți în urma extracției cu cationit), vor influența în mod simțitor  $R_f$  aminoacizilor.

În sensul acesta, nici măsurarea  $R_f$ , nici aplicarea etaloanelor paralele nu permit identificarea aminoacizilor marcați. Avînd în vedere laboriozitatea și inconvenientele cromatogramelor mixte, obținute prin etaloane separate, puse pe amestecul de analizat, care nu permit efectuarea simultană a analizei cantitative, noi am încercat să elaborăm o nouă metodă, aceea a amestecului de etalon parțial suprapus.

#### Metoda de lucru.

După marcarea prealabilă a animalelor de experiență cu 0,5 microCurie/gram-corp de metionină  $S^{35}$ , iar la om 2 microCurie/kilogram-corp, aminoacizii liberi s-au extras din lichidele biologice și extractele de organe,

cu cationul Amberlit I.R.120 [2]. Reziduul uscat s-a dizolvat în 0,5 ml. apă distilată, din care s-a aplicat pe cromatogramă (hîrtie Whatman nr.1) în funcție de activitate, 0,04-0,12 ml, după schema alăturată (vezi fig. nr. 1),

Pentru asigurarea obținerii radiocromatogramelor acceptabile, activitatea aminoacizilor marcați analizați, măsurată în contact cu contorul VAZ 320, trebuie să fie între 600-5000 impulsuri/minut. În scopul reducerii timpului de expunere în contact cu filmul radiologic, este necesară aplicarea pe cromatogramă a unei activități cît mai ridicate. Acest fapt mai este necesar și pentru ca substanțele cu o concentrație redusă să impresioneze filmul.

Irigarea cromatogramelor s-a efectuat cu metoda ascendentă, cu ajutorul dizolvantului alcool butilic + apă distilată + acid formic + alcool etilic (40 ; 40 ; 10 ; 2). [9]. După uscare, cromatogramele au fost puse în contact cu filme radiologice, în casete obișnuite de radiologie. În funcție de activitatea aplicată pe cromatogramă, filmele s-au dezvoltat după 2—4 săptămîni.

Identificarea fracțiunilor aminate s-a efectuat cu ajutorul amestecului de etaloane, analizat cromatografic în prealabil și aplicat împreună cu amestecul de analizat.

În cele ce urmează, redăm cîteva radiocromatograme, efectuate cu metoda propusă de noi, din extrase de aminoacizi și amine marcate din urină și din organe. (Figurile nr. 2, 3, 4 și 5). (154, 155, 156, 157)

Din radiocromatogramele de mai sus, se poate constata că  $R_f$  aminoacizilor extrași cu Amberlit I.R.120 sînt considerabil scăzute față de  $R_f$  amestecului de etalon, așa cum arată tabelul 1.

Tabelul nr. 1

Aminoacizi	Soluția de metionină marcată cu S 35, injectată	Metaboliți urinari ai metioninei extrași cu Amb IR 120 din urină de șobolan	Diferența de $R_f$ între soluția injectată și aminoacizii extrași
	$R_f$	$R_f$	$R_f$
1. Cistina	0,05	0,03	-0,02
2. Cistamina	0,09	0,07	-0,02
3. Metioninsulfon + taurină	0,19	0,14	-0,05
4. Glutation	0,28	0,21	-0,07
5. Cisteina	0,38	0,20	-0,10
6. Neidentificat	—	0,41	—
7. Cistamina	0,46	0,43	-0,03
8. Metionina	0,61	0,56	-0,05



Fig. 3 Analiza aminoacizilor iodați, extrași din urina bolnavilor marcați cu I<sup>131</sup>, cu metoda matorului parțial suprapus.

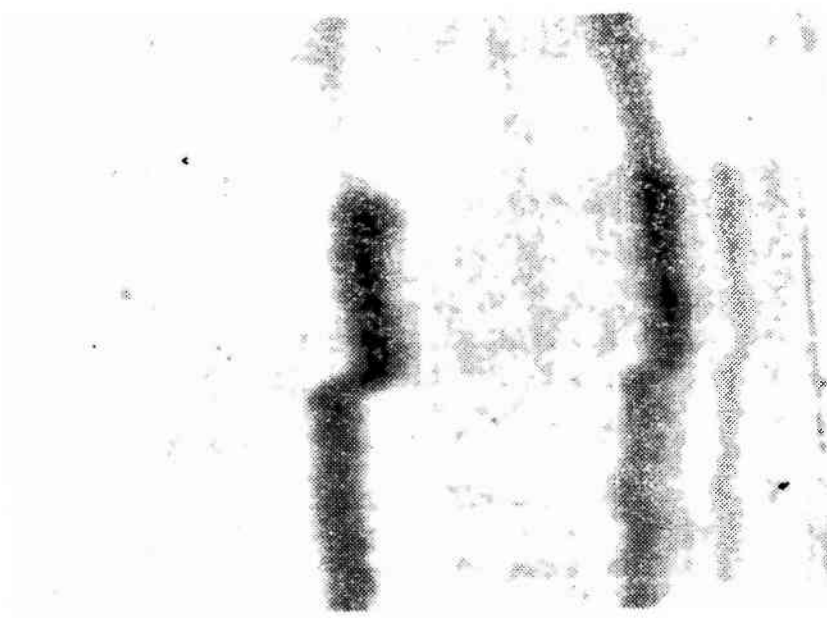


Fig. 2 Aminele și aminoacizii marcați cu S<sup>35</sup>, extrași din urina șobolanilor și analizate cu amestecul de etaloane prin metoda matorului parțial suprapus.

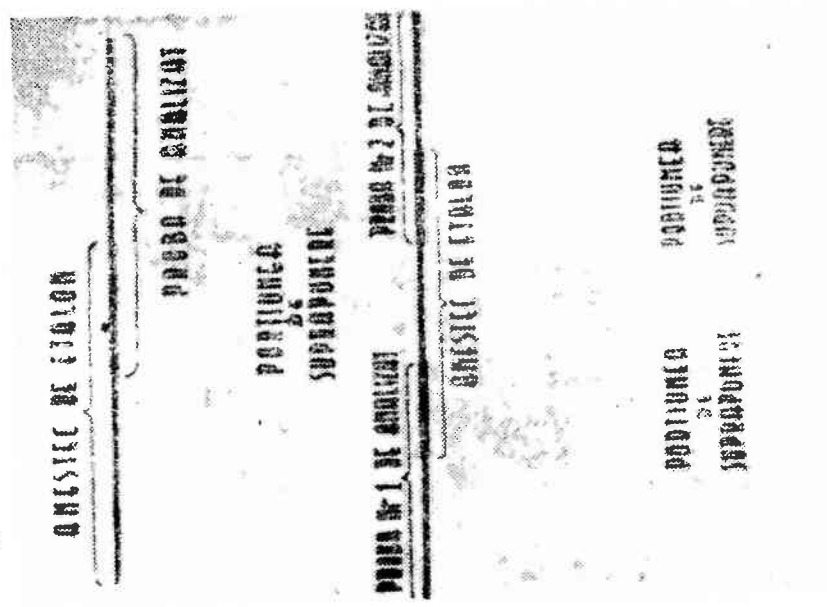


Fig. 1. Schema aplicării amestecului de etaloane și a probelor de analizat, cu metoda matorului parțial suprapus.

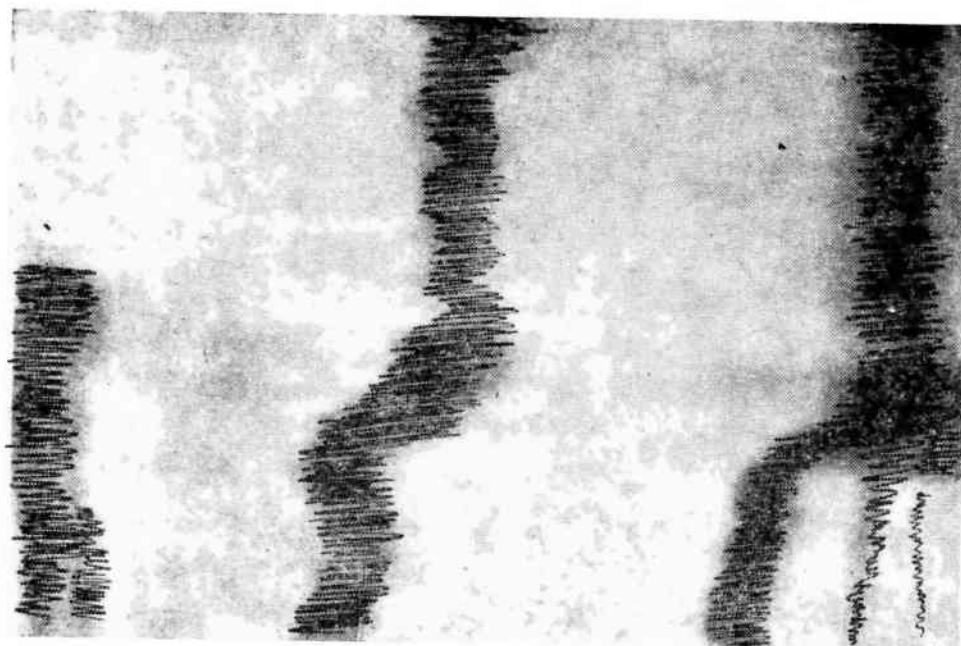


Fig. 5. Aminoacizi și amine marcate cu  $S^{35}$ , extrase din urina bolnavilor cu diagnosticul de hepatită cronică, analizate cu metoda matorului parțial suprapus.

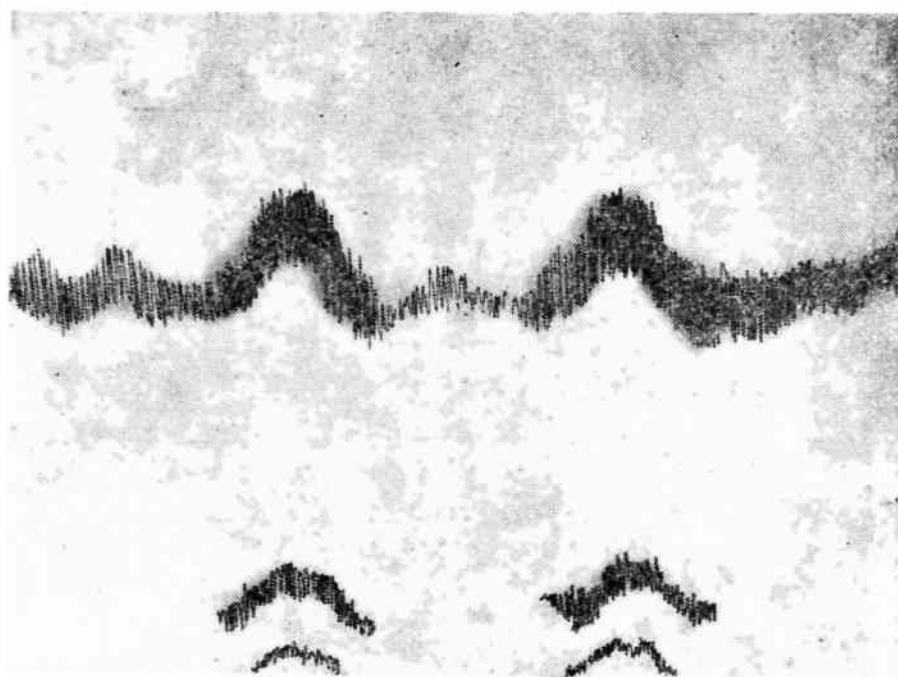


Fig. 4. Aminoacizi sulfurati, obținuți prin hidroliza proteinelor hepatice ale șobolanului marcat cu metionină  $S^{35}$ .

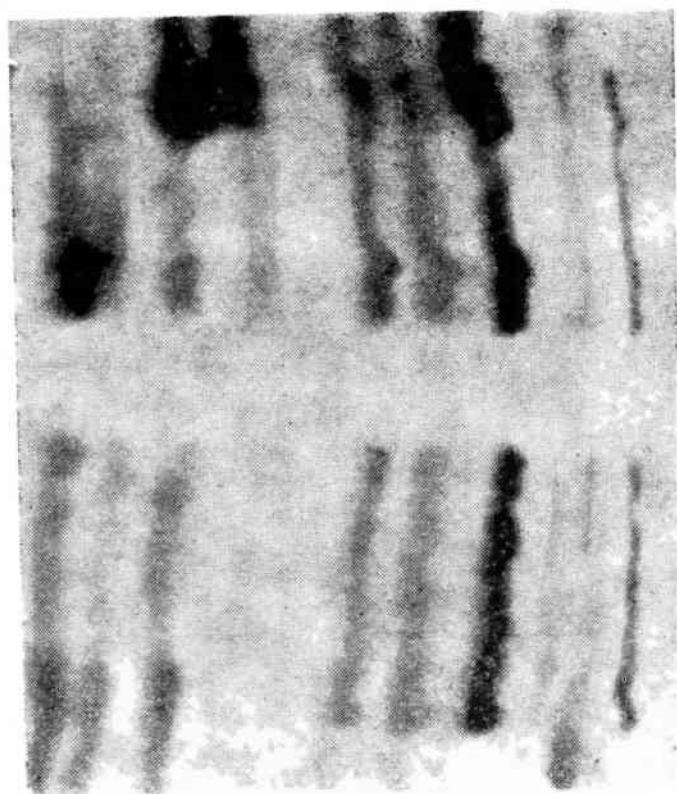
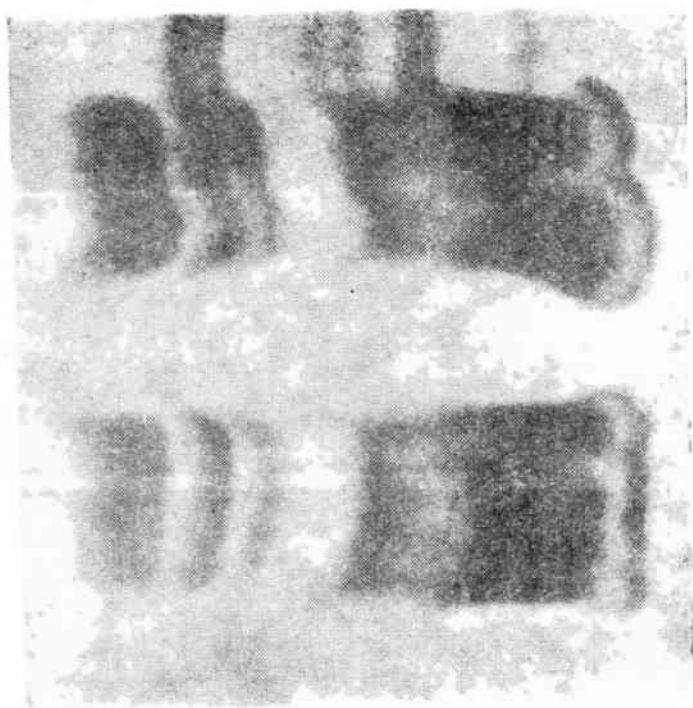


Fig 6-7 Analiza aminoacizilor liberi, nemarcați, extrași din pielea de șobolan și analiza  
prin metoda matorului parțial suprapus



Totuși, identificarea lor, pe baza amestecului de etaloane parțial suprapuse este ușoară, de oarece fracțiunile identice ale amestecului de etaloane și a substanței de analizat sînt legate între ele prin continuitate.

Metoda propusă de noi poate să fie aplicată și la analiza aminoacizilor nemarcați, întrebunțînd amestec de etaloane nemarcate (fig. nr. 6 și 7).

Analiza cantitativă a radiocromatogramelor obținute prin metoda amestecului parțial suprapus, se efectuează pe porțiunea liberă, fără amestec de etaloane, ale radiocromatogramelor, prin fotometrare directă (fig. nr. 8).

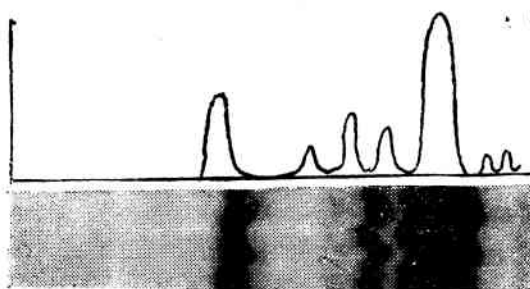


Fig. 8. Evaluarea fotometrică a radiocromatogramelor, obținute prin metoda matorului parțial suprapus.

#### Concluzii.

Identificarea pe cromatograme uni-dimensionale a aminoacizilor liberi, extrași cu cationiți sau cu alte metode de extracție, poate fi sigur și cu multă ușurință realizată prin metoda propusă de autori, prin suprapunerea parțială a amestecului de etaloane.

Această metodă poate fi aplicată atît în cazul cromatogramelor de aminoacizi inactivi, cît și în cazul celor de aminoacizi radioactivi permițînd totodată și analiza cantitativă a acestora.

*Secția de medicină nucleară Cluj*

*și*

*Universitatea „Babeș—Bolyai” Cluj*

#### BIBLIOGRAFIE

1. M. Beck, G. P. Ebrey, „Magyar Kémiai Folyóirat”, **59**, 350 [1953].
2. V. Blazsek, „Orvosi Szemle”, **3**, 59 [1957].
3. R. Conden, H. H. Gordon, A. J. P. Martin, „Biochem. J.”, **38**, 224 [1944].
4. C. E. Dent, „Biochem. J.”, **43**, 1969 [1949].
5. V. I. Feokistov, *Osnovă medicînskoî radiologhii*, Medghiz, Leningrad, 1960.
6. I. M. Hais, K. Macek, *A papirkromatogrăfia kézikönyve*, Akad. Kiadó, Budapest, 1961, p. 176.
7. J. V. Kostir, V. Rabek, „Biochim. Biophys. Acta”, **5**, 210 [1950].
8. A. J. Landua, R. Fuerst, J. Awapara, „Anal. Chem.”, **23**, 163 [1951].
9. I. Szántai, *Lucrările științifice I.M.F. Cluj*, 1957.
10. G. Zimmermann, „Z. Anal. Chem.”, **138**, 321 [1953].

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИОНООБМЕННЫХ СМОЛ И РАДИОХРОМАТОГРАФИИ В ИССЛЕДОВАНИЯХ ПО БИОХИМИИ (II)

*Изменения Rf серосодержащих S<sup>35</sup> аминокислот и амидов под действием аминокислотных неактивных соединений, выделенных из биологических жидкостей на Amberlit IR-120*

(Резюме)

Для хроматографического определения серосодержащих S<sup>35</sup> аминокислот и аминов, извлечённых из биологических жидкостей после введения метионина S<sup>35</sup> при помощи ионообменных смол, авторы предлагают метод „полунанесённых стандартов“, при помощи которых определение серосодержащих аминокислот может быть проведено с большой лёгкостью. Метод может быть применён и для хроматографического анализа смеси неактивных аминокислот, выделенных на ионообменных смолах

## L'UTILISATION DES RÉSINES ÉCHANGEUSES D'IONS ET DE LA RADIOCHROMATOGRAPHIE DANS LES RECHERCHES DE CHIMIE BIOLOGIQUE (II)

*Les modifications des Rf des aminoacides et des amines sulfurées S<sup>35</sup> sous l'influence des composés aminiques inactifs extraits de liquides biologiques avec l'Amberlite I R 120*

(Résumé)

Pour identifier ces extraits de liquides biologiques et après administration de méthionine S<sup>35</sup> à l'aide de résines échangeuses d'ions par voie radiochromatographique, les auteurs proposent la méthode du „témoin partiel superposé“ : cette méthode permet l'identification commode des aminoacides sulfurés, on mentionne qu'elle est applicable également à l'analyse chromatographique des extraits d'aminocides inactifs, obtenus avec des résines échangeuses d'ions