

# KROMATOGRÁFIÁS MÓDSZEREK ALKALMAZÁSA A MEMBRÁN-BIOKÉMIÁBAN\*

CSERHÁTI TIBOR, SZŐGYI MÁRIA\* és KANYÁR BÉLA\*\*

Növényvédelmi Kutató Intézet, \* Semmelweis Orvostudományi Egyetem Biofizikai Intézet,  
\*\* Semmelweis Orvostudományi Egyetem Számítástechnikai Csoport

A kromatográfia — az elválasztási feladatok minden eddiginél tökéletesebb megoldása mellett — bioaktív molekulák asszociációs, disszociációs és komplexképző tulajdonságának vizsgálatára, valamint biokémiai, ill. fizikokémiai jellegű paramétereik meghatározására is alkalmas. Két anyag kölcsönhatásának erőssége (a szolvatációs, ill. az adszorpciós hő) meghatározható gáz-kromatográfias módszerrel abban az esetben, ha egyik anyag sem bomlékony a vizsgálat hőmérsékletén és az egyik anyag illékony, a másik pedig nem.

Egy és többértékű ionok sejtmembránt alkotó foszfolipidek lipofilitására gyakorolt hatása fordított fázisú vékonyréteg-kromatográfias módszerrel tanulmányozható.

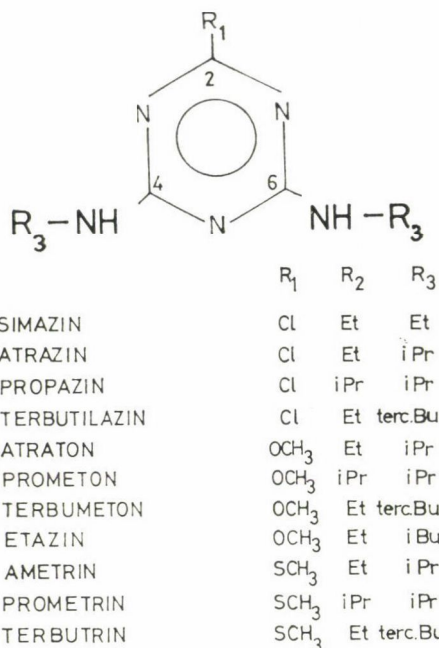
A foszfolipidek és ionok közötti kölcsönhatás vizsgálatánál alkalmazott módszer módosítva alkalmas foszfolipidek és antibiotikumok kölcsönhatásának tanulmányozására.

Egyértékű ionok foszfolipidekhez való kötődésének sorrendje adszorpciós (deszorpciós) sajátságaik alapján az ún. „leszorításos” módszerrel vizsgálható.

## Vizsgálati anyagok és módszerek

Közismert az a tény, hogy felületaktív anyagok jelentős mértékben befolyásolják a hatóanyag biológiai aktivitását, elősegítik a hatóanyag átjutását a membránon, módosítják a sejten belüli eloszlását (VALKENBURG 1973). A hatás oka sok más egyéb tényező mellett a két molekula közötti kölcsönhatás is lehet. Mivel a fenti vegyületek megfelelnek a bevezetésben említett gáz-kromatográfias adszorpciós hő meghatározási módszerrel szemben támasztott követelményeknek, mértük a gyomirtó szerként széles körben alkalmazott triszubsztituált szimmetrikus triazinok (általános képletüket l. l. ábra) és nem-ionos felületaktív anyagok (molekulánként 6 és 23 etilénoxid csoportot tartalmazó nonil-fenil-etilénoxid polimer:  $A_6$  és  $A_{23}$ , valamint molekulánként

\* X. Membrán Transzport Konferencián 1980. május 13–16. között Sümegen elhangzott előadás.



I. ábra. Triszubsztituált szimmetrikus triazinok

4 és 50 etilénoxidesoportot tartalmazó tributil-fenil-etilénoxid polimer: S<sub>4</sub> és S<sub>50</sub>) közötti kölcsönhatás esetén fellépő energiaváltozásokat.

A gázkromatográfiás meghatározás során mért retenciós időből (*t*), a vivőgáz áramlási sebességéből (*F*) és a kromatográfiás oszlop hőmérsékletéből (*T*) az alábbi egyenlet szerint határozható meg az adszorpció hő (*Ross és munkatársai 1962*):

$$\Delta H = R \frac{d[\ln(Ft)]}{d(1/T)}$$

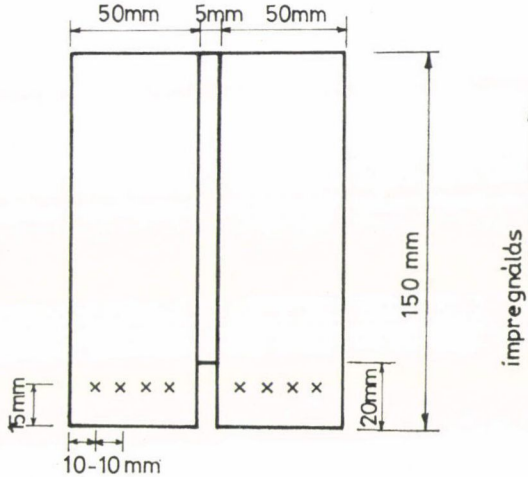
Vizsgálatainkat az alábbi körülmények között végeztük: oszlop: 60 cm × 4 mm belső átmérőjű üveg, hordozó: Chromosorb W 60/80 m, nedvesítő: 2,5% felületaktív anyag, detektor típus: lángionizációs, detektorhőmérséklet: 220 °C, oszlophőmérséklet: 185–200 °C, injektor hőmérséklet: 220 °C, N<sub>2</sub> sebesség: 50 cm<sup>3</sup>/perc, H<sub>2</sub> sebesség: 30 cm<sup>3</sup>/perc, levegő sebesség: 400 cm<sup>3</sup>/perc, oldószer: kloroform. A retenciós időt integrátorral határoztuk meg.

Az egyértékű ionok lecitin lipofilitására gyakorolt hatását a következő módon tanulmányoztuk. Vizsgálatainkhoz Silufol lemezeket használtunk (csehszlovák gyártmány, nagy pórusú, 0,1 mm szilikagél réteg alumínium hordozón). A 15 × 10,5 cm-es lemezeket *n*-hexanban oldott 5%-os paraffinolajjal impregnáltuk felszálló rendszerben a hosszanti irányban. A lemezeket

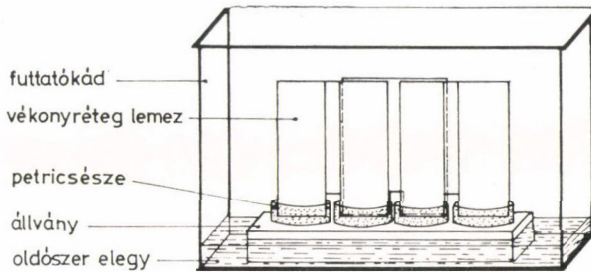
szobahőmérsékleten szárítottuk és a lemez közepéről 5 mm-es szilikagél réteget lekapartunk, a lekapart részből 2 cm-t kivágtunk (l. 2. ábra).

A futtatókád oldószerzőőkkel való telítését a kád aljára öntött 100 cm<sup>3</sup> oldószerkeverékkel biztosítottuk. Az oldószer fölé négy petricsészt helyeztünk el, amelyekbe a telítésre használt oldószerrel azonos, de különböző egyértékű kationokat (Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup>) tartalmazó futtatószeret tettünk. A futtatókádban három kromatográfiás lemezt helyeztünk el, az I. lemez az 1, 2, a II. lemez a 2, 3 és a III. lemez a 3, 4 petricsészebe merült, így egyszerre négy különböző rendszerben történő futtatás vált lehetségessé (l. 3. ábra). A fenti elrendezés segítségével sikerült kiküszöbölnünk az  $R_f$  értékeket legnagyobb mértékben befolyásoló hibákat, mint pl. a különböző lemezen, ill. különböző kádban történő futtatás bizonytalanságát.

Mivel kísérleteink elsődleges célja az egyértékű ionok közötti különbségek kimutatása volt, egy futtatókádon belül csak az ionminőség változott.



2. ábra. Vékonyréteg lemez az egyértékű ionok lecitin lipofilitására gyakorolt hatásának tanulmányozására



3. ábra. Egyértékű ionok lecitin lipofilitására gyakorolt hatásának vizsgálatára összeállított futatórendszer



A különböző futtatásokat más, más víz-etanol aránynál és más ionkoncentrációknál végeztük; az ionkoncentráció 0,03–0,29 N, a víz—etanol arány 3 : 20 és 8 : 20 között változott. A lemezekre 20  $\mu\text{g}$  lecitint vittünk fel, a futtatás után az előhívást jódgőzben végeztük. Itt kívánjuk megjegyezni, hogy a lecitin szennyezései a meghatározást nem zavarják, mivel eltérő lipofilitásuk miatt a kromatográfiás lemezen máshol jelennek meg. Adataink alapján feltételeztük, hogy a lecitin lipofilitását az ionátmérővel jellemzett ionminőség, az ionkoncentráció és a közeg dielektromos állandója egyaránt befolyásolja, ezért a fenti tényezők hatásának mennyiségi értékeléséhez megkerestük azt a legjobban illeszkedő háromváltozós függvényt, amely még fizikokémiai és biológiai megfontolások alapján is elfogadható.

Az antibiotikum—lecitin kölcsönhatás tanulmányozásánál az alábbi kísérleti nehézségekkel kellett szembenéznünk: a lecitin-antibiotikum kölcsönhatás olyan erős, hogy az egyéb körülmények között jól bevált előhívó reagensekkel lecitinfelesleg jelenlétében az antibiotikumok nem mutathatók ki (pl. a polimixin ninhidrinnel nem reagál), a szükségszerűen igen kis mennyiségben jelenlevő antibiotikum viszont nem zavarja a lecitin kimutatását, tehát a detektálás a lecitin reakció árnyékolása révén sem oldható meg. Ezért kénytelenek voltunk olyan másodlagos kromatográfiás elválasztást végezni, amely a vizsgált polimixint és sztreptomocint megbízhatóan elkülöníti a lecitintől. A kísérletet az alábbiak szerint végeztük. A Silufol lemezeket etanolban oldott 0,3%-os lecitinnel impregnáltuk leszálló rendszerben túláramoltatással 16–24 órán át, majd nitrogén áramban megszárazítottuk. A hosszú impregnálási időre a lecitin szilikagél felületen mutatott csekély mozgékonyasága miatt volt szükség. A lemezre 50  $\mu\text{g}$  sztreptomocint és 50  $\mu\text{g}$  polimixint vittünk fel, a futtatást telített vizes LiCl-metanol 1 : 1 arányú keverékével végeztük. A futtatás befejezése és az oldószer elpárologtatása után a lemezről a sztreptomocint és polimixint tartalmazó kb. 5 mm széles csíkot kivágtuk és szilikagéles felével frissen készített (még nedves, képlékeny) hagyományos Kieselgel G lemezre (20  $\times$  20 cm üveg hordozó, 0,25 mm rétegvastagság) fektettük a lemez aljától kb. 2 cm-re, majd óvatosan belenyomtuk a rétegbe. A lemezt megszáradás után n-butanol-piridin-ecetsav-víz 9 : 6 : 1,8 : 1,2 térfogat arányú keverékében futtattuk, majd klór-tolidines reagenssel hívtuk elő (STAHL 1962). A tolidin koncentrációját az érzékenység fokozása érdekében ötszörösére növeltük.

Az egyértékű alkáliionok lecitinhez való kötődését az általunk előzőekben alkalmazott sík felületi modellrendszer mellett (CSERHÁTI, SZÓGYI 1978), a biológiai membránok térbeli struktúráját jobban közelítő liposzómán is tanulmányoztuk. Vékonyréteg kromatográfiásan ellenőrzött lecitinből (Koch—Light gyártmányú tojáslecitin) készítettünk liposzómát ultrahang besugárzással (300 mg lecitint diszpergáltunk 6  $\text{cm}^3$  desztillált vízben hűtés és nitrogén átáramoltatás mellett MSE 150 wattos ultrahang dezintegrátorral). A liposzómához 15 MBq  $^{86}\text{RbCl}$ -t adtunk és egy óra hosszat inkubáltuk az izotóppal.

Előző kísérleteink szerint az egy órás inkubációs idő alatt a  $^{86}\text{Rb}^+$  csak a liposzóma felszínén adszorbeálódik és nem hatol be a liposzómába. Az inkubálás után a liposzómát négy részre osztottuk és négy Sephadex G-50-ből készült kromatográfiás oszlopra vittük fel (60 cm hosszú, 2 cm átmérőjű), amelyeket előzőleg a futtatószerrel egyensúlyba hoztunk. Az első oszlopot 0,001 N NaCl-dal, a másodikat 0,001 N KCl-dal, a harmadikat 0,001 N RbCl-dal, a negyediket pedig 0,001 N CsCl-dal mostuk (átfolyási sebesség: 0,5 cm<sup>3</sup>/perc). Összegyűjtöttük külön-külön mind a négy esetben a liposzóma frakciókat, majd a liposzómához nem kötődött  $^{86}\text{Rb}^+$ -t tartalmazó frakciókat. Szcintillációs detektorral mértük a liposzómához kötődött  $^{86}\text{Rb}^+$ -, valamint a nem kötődött  $^{86}\text{Rb}^+$ -aktivitását. Az egyértékű kationoknak a liposzóma felületén adszorbeált  $^{86}\text{Rb}$ -ionok kötődésére gyakorolt hatását a liposzóma felületén adszorbeálva maradt és a szabad  $^{86}\text{Rb}$ -ionok aktivitásának arányával fejeztük ki.

### Eredmények és értékelésük

A triazinok és nem-ionos tenzidek adszorpciós hőjét az 1. táblázatban közöljük.

Az adszorpciós hő meghatározásának variációs koefficiense 5% alatt volt. A legillékonyabb és leghőérzékenyebb S<sub>4</sub> esetében a variációs koefficiens értéke mintegy 18%. Az adatokból igen érdekes következtetések vonhatók le: azonos szerves-amin csoportok mellett minden esetben az —OCH<sub>3</sub> csoportot tartalmazó vegyület kötődik a leggyengébben, az —SCH<sub>3</sub> csoport a legerősebben. A —Cl közbülső helyet foglal el az adszorpciós sorban. Ebből arra következtethetünk, hogy az adszorpció erősségét döntő módon a fenti három csoport határozza meg. Ezt a megállapításunkat támasztja alá az is, hogy a különböző szerves-amin szubsztituensű triazinok adszorpciós hője között jelentős különbségek nem voltak kimutathatók. A nem-ionos tenzidek esetében azonos triazin molekula adszorpciós hője az etilénoxid tagszám növekedésével nő. Ez azzal a feltételezéssel magyarázható, hogy a vizsgált molekulák az adszorpciós hő döntő módon befolyásoló —SCH<sub>3</sub>, —Cl és —OCH<sub>3</sub> csoportjukkal kötődnek a nem-ionos tenzid etoxi csoportjához.

Az ionátmérővel jellemzett ionminőség, az ionkoncentráció és a közeg dielektromos állandójának a lecitin lipofilitására gyakorolt hatását leíró összefüggéseket a 2. táblázatban foglaljuk össze.

Az adatokból megállapítható, hogy az összefüggés legjobban egy egyszerű lineáris, ill. négyzetes függvénnyel közelíthető. Mindkét függvénykapcsolat 99,9% biztonsági szinten szignifikáns. Annak ellenére, hogy a négyzetes összefüggés *F* értéke nagyobb, a két függvény illeszthetősége között szignifikáns különbség nem volt kimutatható, tehát adataink alapján egyértelműen nem dönthető el, hogy a kapcsolat lineáris vagy négyzetes. Az előző két függ-



## I. táblázat

Nem-ionos felületaktív anyagok és helyettesített szimmetrikus triazinok adszorpció hője (kJoule/mol)

Triazinok	Felületaktív anyag			
	A <sub>4</sub>	A <sub>23</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>23</sub>
Atraton	32,31	34,10	22,19	28,50
Atrazin	33,27	34,73	23,74	29,76
Ametrin	34,90	36,11	25,45	30,64
Prometon	31,14	33,14	23,78	28,34
Propazin	31,76	33,48	24,28	29,67
Prometrin	34,86	36,19	26,20	30,05
Terbumeton	31,22	33,10	25,37	29,63
Terbutilazin	32,77	34,36	26,54	29,80
Terbutrin	34,10	35,19	27,33	31,05
Etazin	34,02	35,57	23,74	29,38

## 2. táblázat

Lecitin lipofilitásának ( $R_M$ ) függése az egyértékű kationok ionsugarától ( $r$ ), az ionkoncentrációtól ( $C$ ) és a közeg dielektromos állandójától ( $D$ )

$$\text{I. } R_M = a + b_1 \cdot r + b_2 \cdot C + b_3 \cdot D$$

$$\text{II. } R_M = a + b_1 \cdot r^2 + b_2 \cdot C^2 + b_3 \cdot D^2$$

	I.	II.
$a$	0,824	0,773
$b_1$	-0,133	-0,057
$b_2$	0,422	1,202
$b_3$	0,002	0,000
$b'_1$	-0,423	-0,438
$b'_2$	0,389	0,360
$b'_3$	0,063	0,130
$F$	7,839	9,231
Szignifikancia szintek %		
$b_1$	99,8	99,9
$b_2$	83,1	89,4
$b_3$	17,9	44,4

vénykapcsolaton kívül próbálkoztunk exponenciálisan változó függvényekkel is. Ez esetben nem tudtunk az előzőeknél szignifikánsan jobb illeszkedést elérni. Mérési adataink értelmezéséhez az egyszerűbb és könnyebben kezelhető nem exponenciális függvényillesztést is elegendőnek tartjuk. A normalizált iránytangens értékek arra utalnak, hogy a lecitin lipofilitását döntő módon az ionminőség, kisebb mértékben az ionkoncentráció és elenyésző módon a közeg dielektromos állandója határozza meg. A fenti megállapítások érvényességéhez feltétlenül hozzá kell tennünk, hogy a kísérlet célja kimondottan az ionminőség hatásának tanulmányozása volt, azaz az ionminőségre vonatkozó adatok pontosságát csak az egy futtatókádon belüli különbségek, a másik két tényező pontosságát a lényegesen nagyobb, különböző futtatások közötti szórások befolyásolták. Megjegyezzük továbbá, hogy a vizsgált antibiotikumokkal összehasonlítva a lecitin ionérzékenysége lényegesen kisebb. Egyéb vizsgálatainkból ismert az a tény, hogy egy vegyületnek a vegyületsorozat alpmolekulájához viszonyított lipofilitását az ionkoncentráció abban az esetben növeli, ha a szubsztituensek Hansch állandója nagy pozitív érték (lipofil szubsztituensek). Az előbbieken alapján a lecitin egészében úgy viselkedik, mintha ionérzékenységet a poláros hidroxil és a quaterner amin határozná meg, az apoláros zsírsav-láncok jelentősége lényegesen kisebb.

A lecitin, polimixin és sztreptomycin elválasztásához alkalmazott futtatószerekben mért  $R_f$  értékeket a 3. táblázatban közöljük.

Az  $R_f$  értékek alapján az elválasztásra a cellulóz-réteg a legmegfelelőbb. A cellulóz lemez készítése azonban magában foglalja a lemez 110 °C hőmérsékleten történő szárítását, ami esetleg jelentős mértékben befolyásolja a lecitin-antibiotikum közötti kölcsönhatást. A fenti megfontolás alapján a gyengébb elválasztású, de hőkezelést nem igénylő Kiesegel G lemezt választottuk. Kísérleteink felhívták figyelmünket arra az igen érdekes és meglehetősen ritka jelenségre, hogy a két különböző típusú rétegen a vizsgált anyagok adszorpciós erőssége megfordul. Ez részben a sztreptomycin cellulóz vagy rokon vegyületekhez való erős kötődésével magyarázható.

A lecitin-antibiotikum kötődés vizsgálatához alkalmazott igen nagy ionkoncentrációjú futtatószer sem volt arra képes, hogy az antibiotikum-lecitin kötést számottevően megbontsa (az antibiotikum molekulák alig moz-

### 3. táblázat

*Lecitin, polimixin és sztreptomycin  $R_f$  értékei Kiesegel G és cellulóz rétegeken n-butanol : piridin ecetsav : víz 9 : 6 : 1,8 : 1,2 térfogatarányú futtatószer rendszerben*

Réteg anyaga	Lecitin	Polimixin	Sztreptomycin
Kiesegel G	0,09	0,18	0,33
Cellulóz	0,90	0,41	0,16

dultak el a felvitel helyéről). Ez a jelenség egyértelműen azt bizonyítja, hogy a lecitin-antibiotikum kötés lényegesen erősebb, mint a lecitin-egyértékű kation között létrejövő kölcsönhatás. A kérdés további tanulmányozásához a futtatási metodika módosítása (túlnyomásos rétegekromatográfia alkalmazása) szükséges.

A lecitinből készült liposzóma felszínéhez kötődött egyértékű alkálíkationokkal végzett kísérleteink tanulságai a következők. A szabad  $^{86}\text{Rb}$ -csúcs alakja alapján arra következtethetünk, hogy a liposzóma felületén a  $^{86}\text{Rb}$ -ionok és a másik egyértékű kationok egyensúlya igen rövid idő alatt beáll. Az egyensúlyi állapot (a leszorítás mértéke) a mosófolyadékban levő ion minőségétől függ, azaz a liposzóma felületén maradó adszorbeált ion mennyiségét befolyásolni tudjuk azzal, ha a mosást különböző egyértékű ionokkal végezzük. Kísérleti eredményeinket az alábbi egyenlet szemlélteti:

$$\text{maradék aktivitás } \% = 125,12 - 27,30 \times \text{ionsugár}$$

$$r = 0,9167, \quad r_{99,9} = 0,8771.$$

A liposzóma felületén mért „leszorítási” sor megegyezik a sík felületi modell alkalmazásánál kapott kötődési sorral, azaz a lecitinhez legerősebben a  $\text{Cs}^+$ , ezt követően a  $\text{Rb}^+$  és a  $\text{K}^+$ , legkevésbé a  $\text{Na}^+$  kötődik.

### Összefoglalás

Triazin herbicidek és nem-ionos felületaktív anyagok kölcsönhatását gáz-kromatográfiai módszerrel vizsgálva meghatároztuk, hogy a kölcsönhatás nagysága 22,19–36,19 kJ/mol között változik a molekulák szerkezetétől függően.

Fordított fázisú vékonyréteg-kromatográfiai módszerrel megállapítottuk, hogy a lecitin lipofilitását az egyértékű kationok közül legjobban a  $\text{Cs}^+$ , legkevésbé a  $\text{Li}^+$  csökkenti, a hatás lényegesen kisebb, mint a membránkárosító antibiotikumok (sztreptomycin, polimixin) esetében. A lecitin lipofilitása és az ionsugár közötti összefüggés lineáris és négyzetes függvényvel egyaránt leírható.

Lecitinnel impregnált vékonyréteg-kromatográfiai lemezen a sztreptomycin és polimixin még telített  $\text{LiCl}$  oldattal sem mozdítható el, tehát a lecitin-antibiotikum kölcsönhatás nagyságrendekkel erősebb, mint a lecitin- $\text{Li}^+$  között létrejövő kötés.

Lecitin liposzóma felületéről az egyértékű kationok annál erősebben szorítják le egymást, minél nagyobb az ionsugaruk.



## IRODALOM

1. CERHÁTI, T., M. SZŐGYI: The interaction of monovalent cations with lecithin studied by a new TLC method CMA Symposium on the Energetic Aspects of Membrane Transport (Abst: 38 p.) (1978).
2. ROSS, S., I. K. SAELENS, P. I. OLIVIER: J. Phys. Chem. **66**, 696. (1962).
3. STAHL, E.: Dünnschicht-Chromatographie Springer-Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg (1962).
4. VALKENBURG, V. W.: Pesticide Formulations Marcel Dekker Inc. New York (1973).