

## KOLON KROMATOĞRAFİSİ İLE İDRARDAN 5- METHOXY TRYPTAMİNE İZOLASYONU (x)

Dr. Mustafa ÜNALDI (xx)

Kimya Y.Müh. S. Turhan SOYSAL (xxx)

Dr. Tefrik A. AKSU (xxxx)

Dr. Muzaffer KÜRKCÜOĞLU (xxxxx)

### ÖZET

*İdrardan Kolon Kromatografisi ile 5- Methoxytryptamine izole etmek için bu çalışma yapılmıştır. Kolonda bu madde ile ilgili süzülme alanı tesbit edilmiş ve sistem bundan sonrası için işler seviyeye getirilmiştir. Ayrıca metodun uygulaması sırasında dikkat edilmesi gerekli hususlar tartışılmıştır.*

### GİRİŞ VE GENEL BİLGİ

5- Methoxytryptamine (5- MET), tryptophan metabolizması ara ürünlerinden bir indol bileşiğidir. (1, 2, 3, 4) Normal şahısların idrarında çıkmaz. Mono Amino Oksidaz (MAO) enzimi eksikliği olanların idrarında bulunur. Normal olarak tryptophan'ın serotonin üzerinden yıkımında serotoninden MAO enzimi ile 5- hydroxy indole asetaldehide te-

sekkül ederken, MAO eksikliğinde bu yol işlemez. serotoninin bir başka ürünü olan 5- MET meydana gelir. Ayrıca, 5- MET, MAO enzimi ile 5- methoxy indole acetic acide'e yıkılırken, MAO eksikliğinde bu yıkılma duracağından 5- MET yığılır. Bu iki olay sonucu artan 5- MET idrarla itrah edilir. (Şekil 1).

---

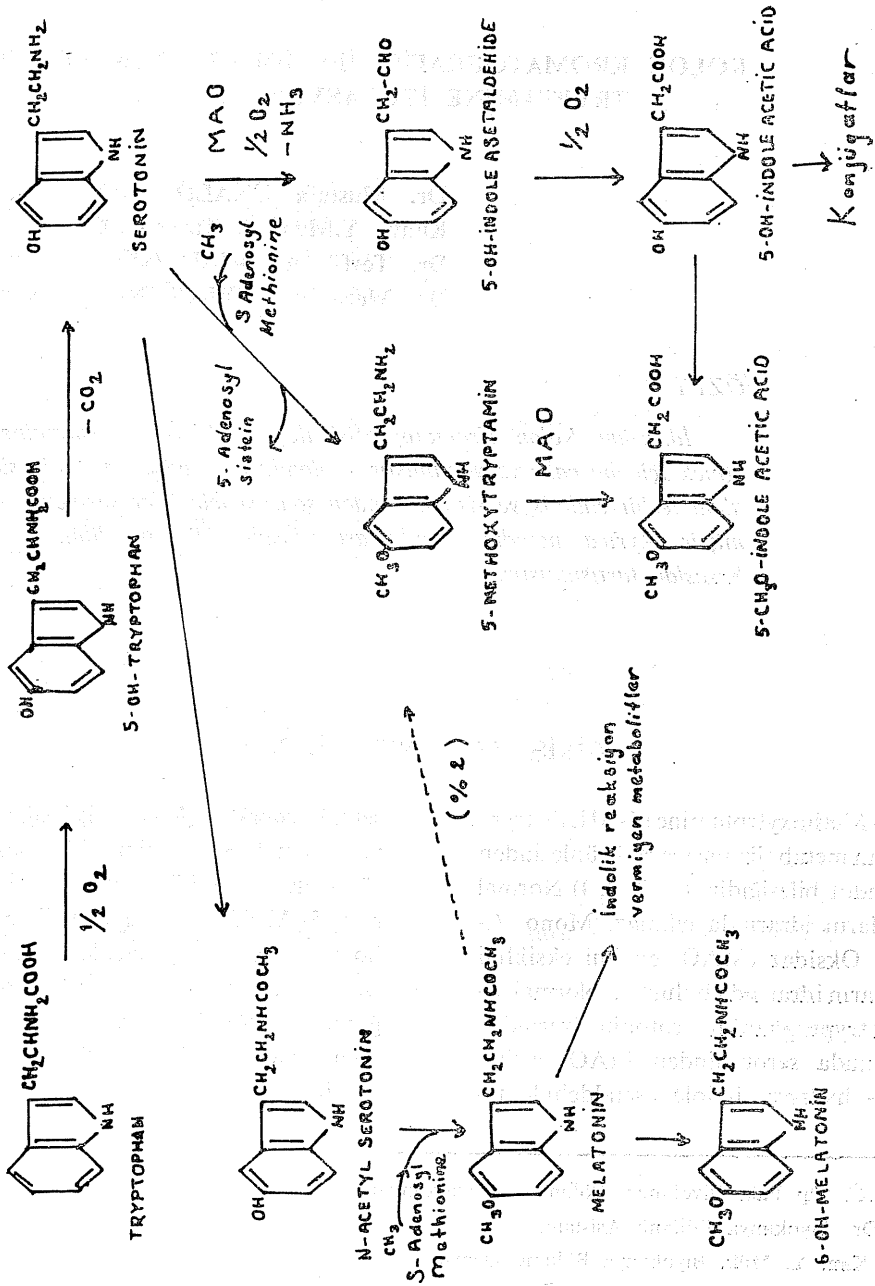
(x) A.Ü. Tıp Fak. Biyokimya Bölümü çalışmalarından.

(xx) Dr. Biyokimya Bölümü Asistanı.

(xxx) Kim. Y. Müh. Biyokimya Bölümü Uzmanı.

(xxxx) Prof. Dr. Biyokimya Bölümü Öğretim Üyesi.

(xxxxx) Prof. Dr. Çocuk Sağ. ve Hastalıkları Kliniği Yöneticisi.



5- MET idrardan izole edildiğinde patolojik durumu tesbit etme imkânı doğmaktadır. Bundan hastaların tanı-

## MATERYAL VE METOD

### A- MATERYAL

Kolona , yalnız standard, standard idrar karışımı ve yalnız idrar şeklinde olmak üzere üç çeşit nümune tatbik edilmiş, bu şekilde 5 şahıs idrarı üzerinde (elüat kesilmesi ile kuru kalan Sephadex'in kontrolü için yapılan 3 çalışma da birlikte) 18 çalışma yapılmıştır.

### B- METOD

Metod ilerde rutin hale getirme arzusuna uygun olarak literatürden modifiye edilmiştir. (1, 5,6).

Çalışmamız, idrardaki çeşitli Maddeler içinden aradığımız maddeyi jel filtrasyonla ayırıp Modifiye Erlich Reaktifi ile renklendirilmesi esasına dayanır. Jel filtrasyon, adsorbsiyon ile nümüne maddelerinin ayrı ayrı hızda kolonu geçmeleri suretiyle ayırımı temin eder.

Jel filtrasyon için, boncuklardan yapılmış jeller kullanılır. Bu boncukların ayırmayı temin eden bazı özellikleri vardır. Bizim kullandığımız SEPHADEX G- 10 boncukları konik boşluklar ihtiva etmektedir. Ayırım, konilerin küçük molekülleri içerilerine düşürüp kolondan çıkmalarını geciktirmeleri suretiyle sağlanır. En büyük moleküller en önce ve sırayla en küçük moleküller en son geçerler. Böylece elüatın toplandığı devreye göre de maddeler değişiklik gösterir.

mında faydalanılabileceği gibi predispoze şahısların tanımında da faydalanılması mümkündür. (2)

**KOLONLAR :** Çalışmalarımızda iki tip kolon kullanıldı.

1- *9mm X 500 mm lik (Ficher) kolon* (şekil 2 A,B) İki kısmı vardır. Sephadex'in doldurulduğu hazne ve plastik vidalarla birinci kısma bağlanan musluk. Orijinalinde üst kısmına bağlanan herhangi bir parçası yoktu. Bir rezervuardan faydalanabilmek için ikinci bir kolonun alt parçasını üst kısma bağliyerek kullandık. Bu kısım Y şeklinde bir cam boruyu birbirine monte edebilmek için delikli bir lastik şişe tapası kullandık. Y borusunun tek ucu şişe tıpasına (kolonla bağlantı temini için) çatal uçlarından biri plastik bir boru ile rezervuara bağlandı. Diğer uca yumuşak bir boru takılarak klemple sıkıştırıldı. Bu uç, kolonun elüatla doldurulması sırasında toplanan havanın boşaltılması için kullanıldı.

2- *10 mm X 300 mm lik (Ficher) kolon* (şekil 2 C) Yekparedir. Alt kısmında kendisinden musluğu vardır. Üstten bir rezervuara bağlamadan damla damla elüat ilave edildi. Bu iş için bir ayırma hunisinden yararlanıldı.

### REAKTİFLER VE DİĞER KİMYASAL MADDELER:

1- *Jel:* Jel olarak Sephadex G-10 dan büyük kolona 10 gr., küçük kolona 5 gr. toz kullanıldı. Kolona doldurmadan önce bir gece 0,1 N HCL de bırakılarak şişirildi.

2- *Elüatlar*: Maddemizi elüe edici olarak 0,1 N HCL, yıkama için de distile su ve 0,02 N NH<sub>4</sub>OH kullanıldı.

3- *Standart*: 2 mg/ml lik 5- MET solusyonu hazırlandı, buz dolabında saklandı.

4- *Renklendirme reaktifi*: Kolondan çıkan elüatta maddemizi aramak için Modifiye Erlich Reaktifi kullanıldı. (7) Bunun için 45 gr. Para Dimetil Amino Benzaldehid 60 ml 12 N HCL de çözüldü, buz dolabında saklandı.

## DENEYİN YAPILIŞI

1- *Kolonun Yerleştirilmesi ve Sephadex ile Doldurulması*: Kolon yatay düzleme dik olarak yerleştirildi. Daha önce şişirilmiş olan Sepnadex G-10, kolon hacmini aşmıyacak kadar 0,1 N HCL ile homojen bir suspansiyon haline getirildikten sonra bir baget yardımıyla yavaş yavaş kolona dolduruldu. Arada hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Sephadex'in yatağında tamamen yerleşmesi beklendi. (Sephadex ile üstte kalan sıvı arasındaki net bir seviye bunu gösterir.) Üst kısımdaki sıvı bir pastör pipeti ile alınıp atıldı. (Musluk açılarak Sephadex'ten süzülmesi de beklenebilir.) Sephadex seviyesi üzerinde sıvı kalmayınca, daha önce hazırlanmış nümune tatbik edildi.

2- *Evaporasyon (İdrar Nümunelerinin Konsantrasyonu)* : İdrardan 100 ml evaporatörün balonuna kondu. Tamamen kuru bakiye kalıncaya kadar vakumla 40°C ısıda uçuruldu. (Isıyı temin için balon aynı sıcaklıktaki banyoya daldırıldı.) Bakiye bir miktar 0,1 HCL ile çözüldü. Balona konulan idrar miktarının, bakiyeyi çözmede kullanı-

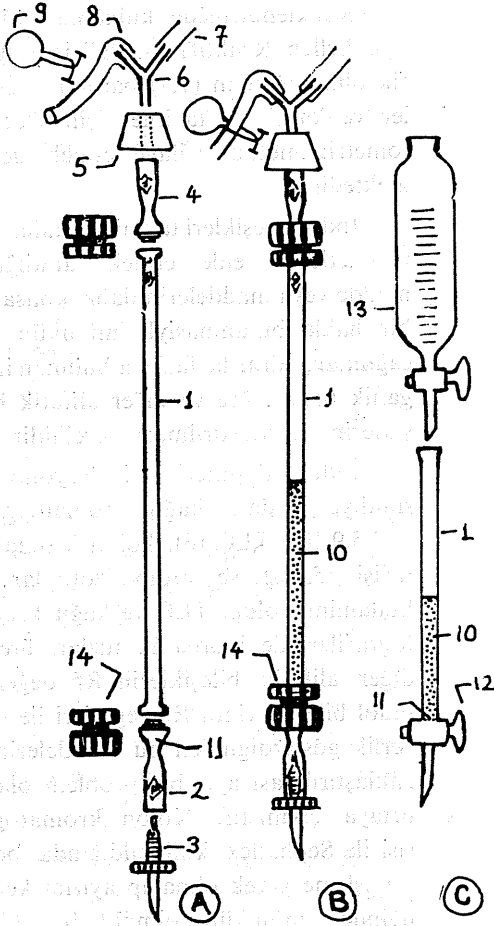
lan HCL ye oranı konsantrasyon nisbetini verir. Bizim kullandığımız idrarlar 100/10, 100/8, 100/6, 100/5, 100/4 defa konsantre edildi.

3- *Nümunenin kolona tatbiki*: Tatbik edilecek nümune (standart veya konsantre idrar veya her ikisinin karışımı) daha önce bir tüpde hazırlandı. Tüpden pastör pipetine alınıp, aynı pipetle kolon cidarına dokundurularak yavaş yavaş ayrı bir seviye yapacak şekilde bırakıldı. Sephadex yüzeyinin bozulmamasına dikkat edildi. (Şekil 3 a,b).

4- *Kolonun Elüat Rezervine Bağlanması*: Tatbik ettiğimiz nümunenin Sephadex içine tamamen girmesinden sonra 1 ml elüat (0,1 N HCL) aynen nümune tatbik eder gibi kolona tatbik edildi. (Şekil 3 c,d) (Bu işlem nümunenin tamamen Sephadex'e girip üstteki elüata karışmaması için yapıldı). Bu da kaybolduktan sonra başlangıcı nümune tatbik eder gibi dikkatli olmak üzere (Şekil 3 e) kolon tamamen dolduruldu. Bundan sonrasında: 9 mm X 500 mm lik kolonda ki çalışmalarda kulon rezervuara bağlandı. 10 mm X 300 mm lik kolonda ise bir ayırma hunisinden eluat damla damla ilave edilerek ihtiyaca göre ayarlandı.

5- *Kolondan Adsorbe Edilen Elüatın toplanması*: Elüatın toplanmasında otomatik fraksiyon kollektör kullanıldı. 20 damlada bir tüp değiştirerek her tüpde madde arandı.

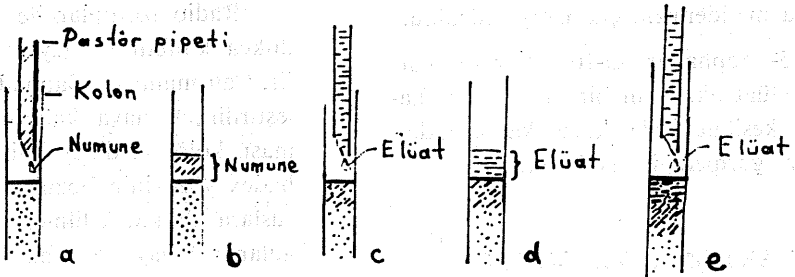
6- *Renklendirme Reaksiyonu*: Bunun için Modifiye Erlich reaktifi kullanıldı. Her tüpden 0,1 ml elüat alınarak 0,5 ml reaktifle muamele edildi. Madde mevcut olduğunda mor-yeşil bir renk verdi.



ŞEKİL - 2

- Ⓐ - 9mm X 500mm lik kolon (Parçaları)
- Ⓑ - 9mm X 500mm lik kolon (Kurulmuş durum)
- Ⓒ - 10mm X 300mm lik kolon

1- Kolon 2- Musluğu tutan alt kısım 3- Vidalı musluk 4- Yedek koldan alınan 2 numaralı kısım 5- Lastik tıpa 6- Y şeklindeki cam boru 7- Rezervuara bağliyan plastik boru 8- Yumuşak lastik boru 9- Klemp 10- Sphadex 11- Süzgeç 12- Musluk 13- Ayırma hunisi 14- Pila- lastik vida



ŞEKİL - 3 Kolona Nümune Tatbiki

7- Kolonun yıkanması ve Yeni De-  
neye Hazırlanması: Çalışmalarımızda  
0,1 N HCL kullanıldı. Maddemizin çık-  
ması kesildikten sonra sıra ile 25 er  
ml 0,1 N HCL, distile su, 0,02 N  
NH<sub>4</sub> OH, distile su, 0,1 N HCL geçi-  
rildi. Böylece yeni bir nümune tatbik  
edilebilecek hale getirildi. Geceleri 0,1  
N HCL e bağlı bırakıldı.

## BULGULAR

1- Standart çalışmaları ile maddenin  
çıkış alanı:

a) 9 mm X 500 mm lik kolonda  
(Nümunenin Sephadex'de kaybolma-  
sından sonra başlayarak -) 66-80 ml ler  
arasında.

b) 10 mm X 300 mm lik kolonda,  
28-49 ml ler arasında bulundu.

2- Sağlam şahıs idrarı ile standard  
karışımı tatbikatında, idrar maddele-  
rinin çıkış alanına tesir etmediği gö-  
rüldü.

3- Yalnız sağlam şahıs idrarı tat-  
bik edildiğinde maddemizin çıktığı tes-  
bit edilemedi.

4- Kolonun yıkanması esnasında  
toplanan distile su ve HN<sub>4</sub>OH elüat-  
larında da kontrol olarak yapılan ara-  
mada maddemizin çıkmadığı görüldü.

5- Sephadex G-10 un rezervuar-  
dan elüat akımının bir ara (8 saat ka-  
dar) kesilmesi ile kuru kalmasından  
zarar görmediği tesbit edildi.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

### 5- MET

Kimyasal özelliği dolayısıyla nötr  
ve alkalik fraksiyonlarda çıkmamakta-

dır. Bu sebepten çalışmaları sadece asit  
elüatla yapmak yeterlidir. Nötr ve al-  
kali elüatlar yalnız yıkama işleminde  
kullanılmaktadır.

Renklendirilmede kullanılan Modi-  
fiye Erlich Reaktifi 5-MET için spesi-  
fik olmadığından (1,7) patolojik tespit-  
ler ve kantitatif tayinler için florofot-  
ometrik metodlar ilave etmek gerek-  
mektedir.

İndol bileşikleri tayininde daha doğ-  
ru neticeler elde etmek, aradığımız  
madde veya maddelerin daha konsantre  
bir halde bulunmasıyla mümkün ola-  
cağından, idrarda fazlaca bulunan inor-  
ganik tuzlar, üre ve diğer alifatik bile-  
şiklerin uzaklaştırılması gereklidir. (6)

İndol bileşiklerinin izolasyonu için  
şimdiye kadar, kağıt tromatografisi  
(1,2,5,9,10), TLC (6), kolon kromatog-  
rafisi (5,6,8) ve radio izotoplar (3)  
kullanılmış olup, TLC ve kağıt kroma-  
tografilerinde inorganik tuzlar, üre ve  
diğer alifatik bileşiklerin Rf değerleri  
indol bileşiklerinin Rf değerleri ile ben-  
zerlik gösterdiğinden bu maddelerin u-  
zaklaştırılması ayrı bir problem olarak  
ortaya çıkmıştır. Kolon kromatogra-  
fisi ile Sephadex kullanıldığında böyle  
bir işleme gerek olmayıp ayırım kendi-  
liğinde mümkün olmaktadır. (6)

Radio izotoplar ile çalışmalar ol-  
dukça külfetli ve gayeye uygun değil-  
dir. Çalışmamızda, Saphadex kolona yer-  
leştirilirken hava kabarcığı bırakılma-  
ması, kolonun dikey bulunması ve Sep-  
hadex yüzeyinin bozulmaması gibi hu-  
suslara dikkat edilmesi kaydıyla, uy-  
gulama kolay ve rahattır.

Çalışmamızın bilhassa memleke-  
timizde kolon kromatografisi ile yapıla-  
cak araştırmalarda yararlı olacağını ü-  
mit ediyoruz.

## SUMMARY

### ISOLATION OF 5- METHOXYTRYPTAMINE FROM URINE BY COLUMN CHROMATOGRAPHY

This study has been undertaken to isolate 5- methoxytryptamine from urine, using the column chromatography. The field of material has been determined, and henceforth, the sys-

tem has been developed to the working level. Furthermore, during the application of the method, the points to be taken into consideration have been discussed.

## KAYNAKLAR

(1) HADDOX, H. C. SASLAW, M. S.: Urinary 5- methoxytryptamine in patients with rheumatic fever, *J. Clin. Invest.* 42 (4): 435, — 41, 1963.

(2) ARITÜRK, S.: Akut asıl romatizmada genetik ve metabolik bozukluklar arasındaki ilişkinin kromatografik metodlarla araştırılması, *Mikrobiyoloji bülteni* 6: 75, 1972.

(3) KEVEDER, S., Mc ISAAC, W. M.: The metabolism of Melatonin (N-Acetyl 5- methoxytryptamine) and 5- methoxytryptamine, *Bio. Chem.* 236 (12): 3214-21, 1965.

(4) WHITE, A., HENDLER, P., SMITH, E. L.: Principles of Biochemistry, Fourth Edition, Mc GRAW-HILL BOOK COMPANY, Tokyo, 1968 P. 590.

(5) RODNIGHT, R.: Separation and Characterization of Urinary Indoles Resembling 5- Hydroxytryptamine and Tryptamine, *Biochemistry*, 64: 621-22, 1956.

(6) CONTRACTOR, F., SOMAIN P.: The Sephadex G-10 in the removal of inorganic salts and urea from rat and human urine prior to chromatography of 5- Hydroxyindole metabolites, *Clin. Chim. Acta*, 14: 535-39, 1966.

(7) KNOWLTON, M., et al.: Use of a Modified Erlich Reagent for Measurement of Indolic Compound, *Analytical chemistry*, 32: 6, 1960.

(8) ANDERSON, J. A.: Fractionation of indole compound on Sephadex G-10, *J. Chromatog.* 33: 536-38, 1968.

(9) ARMSTRONG, M. D., GORTATOWSKI, M. J. and SINGER, H.: The Indole acids of Human urine. Paper chromatography of Indole acids, *J. Biol. Chem.* 232: 17, 1958.

(10) DALGLIESH, C. E.: Two-dimensional paper chromatography of urinary Indoles and related substances, *Biochem.* 64: 481-85 1956.