

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 16, 1978, pp. 283–288

Kurzprogramme für die Bestimmung von Aminosäuren in physiologischen Flüssigkeiten

Von K. Olek, S. Uhlhaas und P. Wardenbach¹⁾

Institut für Humangenetik der Universität Bonn

(Eingegangen am 12. September/8. Dezember 1977)

Zusammenfassung: Es werden Kurzprogramme für die Bestimmung von einigen Aminosäuren gezeigt. Die Arbeiten sind mit zwei im Handel befindlichen Ionenaustauscherharzen durchgeführt worden (Durrum DC6A, Phoenix XX 907 OPKU). Alle Programme sind so zusammengestellt, daß sie auch unter ungünstigen Konzentrationsverhältnissen Urinanalysen gestatten. Diskutiert werden Wirtschaftlichkeit und Anwendungsmöglichkeiten für solche Verfahren.

Short programs for the determination of amino acids in physiological fluids

Summary: Short programs for the determination of a few amino acids are described. The studies were performed with two commercially available ion exchange resins (Durrum DC6A, Phoenix XX 907 OPKU). All the programs are constructed so that they are suitable for urine analysis with unfavourable concentration ratios. The economic aspects and the areas of application of these methods are discussed.

Einleitung

Viele klinische Probleme erfordern nicht die quantitative Bestimmung des ganzen Aminosäurespektrums in physiologischen Flüssigkeiten, sondern nur die Analyse einer oder weniger Aminosäuren. Entsprechende Methoden sollten schnell und wirtschaftlich sein, da in den meisten Fällen große Probenzahlen zu bewältigen sind, wie etwa bei Diätkontrollen oder Screening-Untersuchungen. Man hat deswegen schon vor 10 Jahren Programme für die Ionenaustauscherchromatographie entwickelt, die gerade nur die gefragten Aminosäuren zu messen gestatten (1,2). Die verwendeten Geräte sind billiger und unkomplizierter als die sogenannten automatischen Aminosäureanalytoren.

Den bisher in der Literatur erschienenen Systemen haften zwei entscheidende Mängel an:

1. Sie sind meistens für Ionenaustauscherharze entwickelt worden, die keine große Verbreitung mehr haben oder gar nicht mehr produziert werden (3, 5).
2. Die meisten Autoren beschränken sich auf Programme, die offensichtlich nur tauglich sind für Hydrolysat- oder Serumanalysen, nicht aber für den Urin.

Auch in den Systemen von *Shih* (1) und *Benson* (2, 6) sind bei kritischen, schwer zu trennenden Substanzen nur dann sichere Messungen möglich, wenn die interessierenden Aminosäuren in hoher Konzentration vorliegen. Demgegenüber sind die von uns beschriebenen Programme auch bei Normalkonzentrationen für die Urinanalyse anwendbar. Die verwendeten Austauscherharze sind nach unserer Information inzwischen in sehr vielen Laboratorien in Gebrauch.

Methode

Verwendete Apparaturen

Unser Analysator setzte sich aus den folgenden hauptsächlichsten Bausteinen zusammen:

Der Programmgeber BT 5052 von der Firma Biotronik ist normalerweise Teil des von der gleichen Firma vertriebenen Zuckeranalysators.

2 Dosapro Milton Roy Pumpen Modell I 9633,
Ultra-Thermostat K 5 der Firma Colora,
Philips-Schreiber PM 8000,
Photometer BT 6620 mit log-lin Wandler, Firma Biotronik,
Säulen, Ninhydringefäß und Reaktionsbad, Firma Biotronik.

Das Reaktionscoil (30 m Länge) und die Verbindung zum Säulenende besteht aus Teflon-Schlauch mit 0.6 mm i. D. Zur Entfernung des Ammoniaks wurde eine Vorsäule mit dem Durrum-Harz DC3 verwendet.

Integrator: Autolab System I

¹⁾ Diese Arbeit wurde unterstützt vom Bundesministerium für Jugend, Familie und Gesundheit

Ionenaustauscherharze

Durrum DC 6A, Firma Biotronik
Phoenix XX 907 OPKU, Firma Cenco, Haan/Rheinland

Pufferzusammensetzung

Lithiumcitrat kristallin:	Merck 5683
Lithiumchlorid p.a.	Merck 5679
Brij 35	Serva 15230
Thiodiglykol	Serva 36170
Caprylsäure	Merck 193
Lithiumhydroxyd	Merck 5691

1 l Puffer enthielt jeweils 2 ml einer aus 35 g Brij 35 und 100 ml Wasser hergestellten Lösung, 2 ml Thiodiglykol und 0,02 ml Caprylsäure.

Ninhydrinlösung

Ninhydrin	Merck 6768
Zinn-(II)-Chlorid	Merck 7815
Ethylenglykolmonomethyläther	Merck 859

Die Reaktionslösung besteht aus: 3 l Ethylenglykolmonomethyläther, 1 l Natriumacetat-Puffer (9441 g Natriumacetat, 100 ml Eisessig), 80 g Ninhydrin, 2 g Zinn-(II)-Chlorid (pulverisiert).

Der Programmgeber gestattete die Vorwahl eines Puffer-Wechsels, der Regenerationsphase und der Äquilibrierphase. Wurde eine große Anzahl von Bestimmungen nötig, so koppelten wir das Gerät mit dem Probenaufgeber und dem Integrator des automatischen großen Aminosäureanalyzers, da es in solch einem Fall natürlich viel wirtschaftlicher ist, eine Probe zur Vollanalyse von Hand einzugeben und die schnellen Analysen vollständig zu automatisieren.

Probenvorbereitung

Blutplasma wird 1 + 1 mit 100 g/l Sulfosalicylsäure versetzt, vom Niederschlag wird abzentrifugiert, ein Teil des Überstands wird analysiert.

5 ml Urin wurden mit 20 mg Sulfosalicylsäure versetzt, der Rückstand wurde abzentrifugiert, ein Teil des Überstandes wurde nach Maßgabe des Kreatiningehaltes auf die Säule gegeben.

Ergebnisse**System I**

basische Aminosäuren, siehe Abbildung 1 und Tabelle 1.

Die angegebene Packungshöhe scheint optimal zu sein. Säulenlängen um 20 cm bringen viel höhere Elutionszeiten (240 min bis zum Arginin) bei sehr guter Auflösung. Erhöht man den Durchfluß soweit, daß wieder Elutionszeiten von 160 min für Arginin erreicht werden, kommt man auf einen Säulenvordruck von 100 atm. Ging man bei gleichbleibender Harzmenge auf eine 0,9 cm Säule über, so erreichte man auch bei Erniedrigung des Durchflusses keine Verbesserung der Elutionszeit, Peakbreite (Empfindlichkeit) und Trennschärfe. Dies steht in einem gewissen Gegensatz zu den Ergebnissen von *Mondino* (7).

In unseren Händen war das von der Firma Cenco gelieferte Harz etwas weniger tauglich als das DC 6A, was vor allem bei wiederholten Urinalysen deutlich erkennbar war.

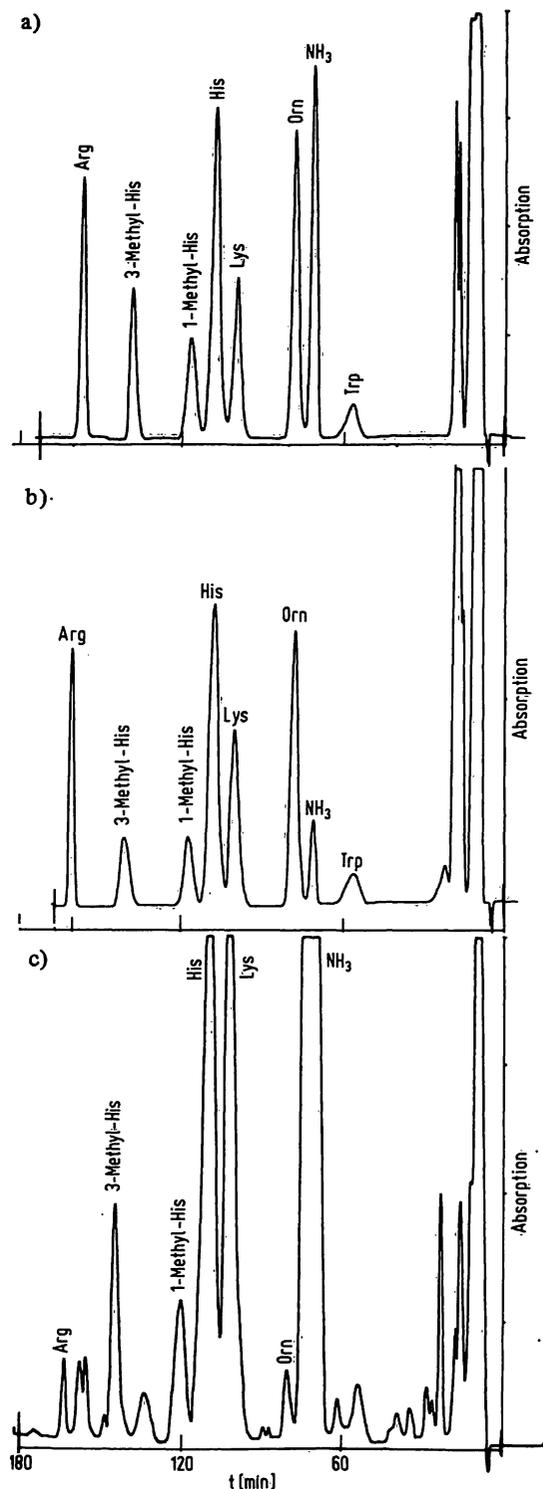


Abb. 1. Aminosäure-Chromatogramme, System I, DC 6A.
a) Standardlösung, 200 μ l, 250 μ mol/l je Aminosäure, Absorptionsbereich: 1
b) Normalserum, 500 μ l, Absorptionsbereich: 1
c) Normalurin, 200 μ l, Absorptionsbereich: 1

System II

Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, 5-Hydroxytryptophan, 4-Aminobuttersäure, siehe Abbildung 2 und Tabelle 1.

Bei diesem Programm stört das Kreatinin die Bestimmung nicht. Es ist nicht nötig, den Ammoniak aus dem Rohurin zu entfernen.

Tab. 1. Chromatographiebedingungen und verwendete Harztypen

	System				
	I	II	III	IV	V
Säulentemperatur in °C	40	65	45	46	50
1. Pufferkonzentration in mol/l Lithium-citrat	0,133	0,167	0,133	0,12	0,066
1. Puffer-pH-Wert	4.08	4.40	3.02	2.50	2.62
2. Puffer-Konzentration in mol/l Lithium-citrat	0,133			0,133	
Lithium-chlorid	0,9				
2. Puffer-pH-Wert	4,50			2,70	
Harztyp	DC6A	XX 907 OPKU	DC6A	DC6A	DC6A
Harzhöhe in cm	16	23,2	22,0	22,0	10,5
Säulendurchmesser in cm	0,6	0,9	0,6	0,6	0,6
Durchfluß ml/h	72	110	40,8	40,8	40,8
Pufferwechsel in Minuten nach Injektion	115	—	—	45	—
Maximaler Säulenvor- druck in atm	55	35	75	65	25

System III

Norleucin (innerer Standard), Leucin, Isoleucin, Methionin, Cystathionin, Valin, siehe Abbildung 3 und Tabelle 1.

Bei höherem pH-Wert verbessert sich die Trennung zwischen Cystathionin und Methionin, bei niedrigerem pH von Valin und Cystathionin. Die Trennung zwischen Isoleucin und Leucin wird bei niedrigerer Temperatur besser.

Das Durrum-Harz zeigte unter allen Bedingungen in kritischen Fällen etwa 10% mehr Auflösung.

System IV

Glycin, Alanin, Citrullin, α -Aminobuttersäure, Valin, Cystin, siehe Abbildung 4 und Tabelle 1.

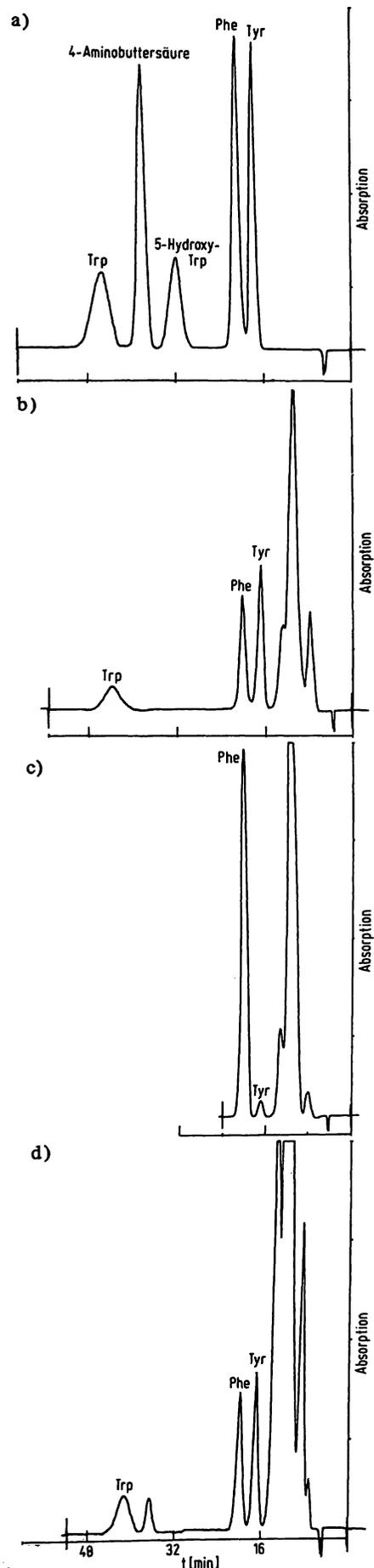


Abb. 2. Aminosäure-Chromatogramme, System II, XX 907-OPKU.
 a) Standardlösung, 200 μ l, 250 μ mol/l je Aminosäure, Absorptionsbereich: 2
 b) Normalserum, 500 μ l, Absorptionsbereich: 1
 c) Phenylketonurie-Serum, 500 μ l, Absorptionsbereich: 2
 d) Normalurine, 200 μ l, Absorptionsbereich: 1

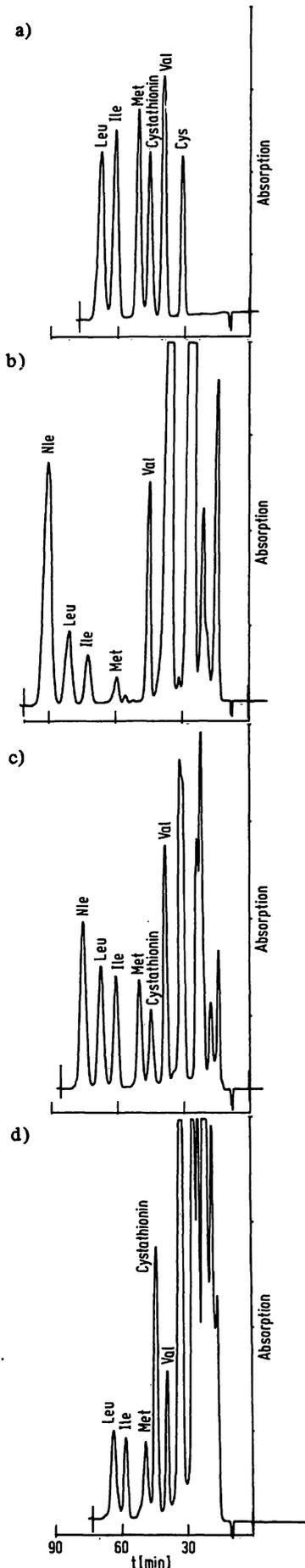


Abb. 3. Aminosäure-Chromatogramme, System III, DC 6A.
 a) Standardlösung, 200 μ l, 250 μ mol/l je Aminosäure, Absorptionsbereich: 1
 b) Normalserum, 500 μ l, Absorptionsbereich: 1
 c) Normalserum und Cystathionin, 500 μ l, Absorptionsbereich: 1
 d) Normalurin, 200 μ l, Absorptionsbereich: 1

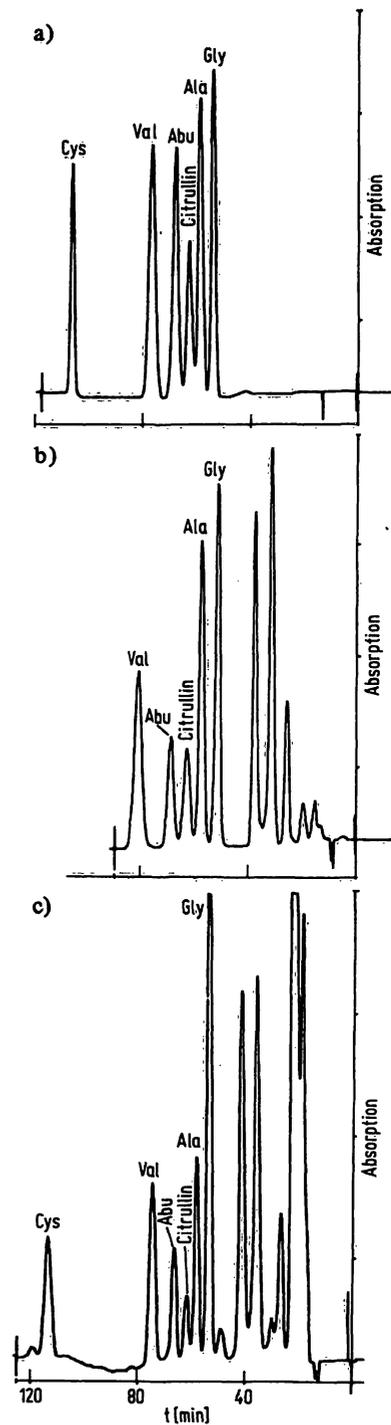


Abb. 4. Aminosäure-Chromatogramme, System IV, DC 6A.
 a) Standardlösung 200 μ l, 250 μ mol/l je Aminosäure, 62,5 μ mol/l Citrullin, Absorptionsbereich: 1
 b) Normalserum, 500 μ l, Absorptionsbereich: 1
 c) Normalurin, 200 μ l, Absorptionsbereich: 1

Mit dem Cenco-Harz war es nicht möglich, Glycin und Alanin vollständig voneinander zu trennen. Bei niedrigerem pH-Wert werden Alanin und Citrullin besser getrennt, bei höherem Citrullin und α -Aminobuttersäure.

System V

Cystin, Homocitrullin, Methionin, Valin, siehe Abbildung 5 und Tabelle 1.

Auch hier erreichten wir bei kritischen Substanzpaaren etwa 10% bessere Auflösung mit dem Durrum-Harz.

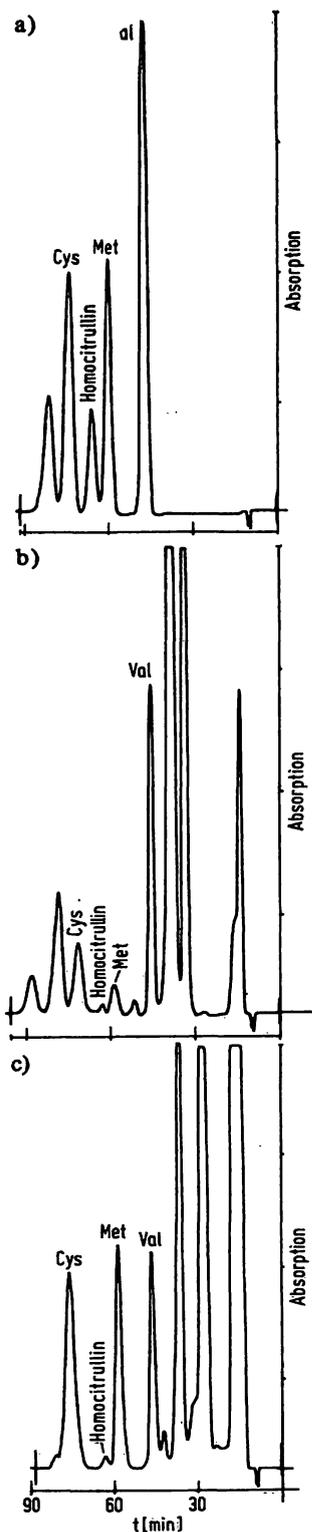


Abb. 5. Aminosäure-Chromatogramme, System V, DC 6A.
 a) Standardlösung, 200 μ l, 250 μ mol/l je Aminosäure, 25 μ mol/l Cystin, Absorptionsbereich: 1
 b) Normalurin, 500 μ l, Absorptionsbereich: 1
 c) Normalurin, 200 μ l, Absorptionsbereich: 1

Die Retentionszeitschwankungen für alle dargestellten Gruppen von Aminosäuren liegen beim ungünstigsten Fall, nämlich dem Urin, zwischen 5 und 10%. Damit ist die automatische Auswertung mit einem elektronischen Integrator immer möglich. Es ist nicht nötig, mit einem internen Standard zu arbeiten. Es ist vielmehr ausreichend, täglich eine Standardlösung zu analysieren. Die Abnahme der Ninhydrinempfindlichkeit beträgt pro Woche 10%. Die Variationskoeffizienten für die einzelnen Bestimmungen liegen zwischen 2 und 10%.

Diskussion

Nach unseren Informationen sind alle in den letzten Jahren publizierten Analysenprogramme für basische Aminosäuren nicht besser als die von *Benson* 1972 vorgeschlagenen, wenn man Trennleistung und Dauer der Bestimmung betrachtet. Demgegenüber bedeuten die von uns angegebenen Bedingungen einen Zeitgewinn von rund 40 Minuten bei gleichbleibender Auflösung. Es sind einige Male schnellere Methoden vorgestellt worden, so von *Vratny et al.* (8) (Arginin etwa 115 Minuten). Urinalysen sind damit aber ausgeschlossen, weil im Chromatogramm kein Platz für 1-Methylhistidin bleibt.

Ein unserem System II in etwa entsprechendes Programm wird von *Mondino* (9) und von *Berridge* (3) et al. gezeigt. Bei ersterem bleibt unklar, wie es sich für physiologische Flüssigkeiten verhält, das zweite dauert bis zur Tryptophanbestimmung 120 Minuten, also 80 Minuten länger als unser System II.

System III bietet die Möglichkeit, die verzweigt-kettigen Aminosäuren und Cystathionin auch im Urin zu bestimmen. Dies ist für ein Kurzprogramm nur von *Shih* (1) beschrieben worden. Dabei wird aber Cystathionin nach 90 Minuten und Leucin nach 110 Minuten eluiert, gegenüber 45 Minuten bzw. 65 Minuten in unserem System.

Ein dem System IV ähnliches Programm findet sich ebenfalls bei *Shih et al.* (1) mit allerdings wesentlich schlechterer Auflösung zwischen Glycin und Alanin; Citrullin und Glutaminsäure werden dort zusammen eluiert. Unser Programm ist tauglich zur Cystinbestimmung bei der Cystinurie, besser ist allerdings System V verwendbar, in dem auch Homocitrullin gut aufgelöst wird.

Literatur

1. Shih, V. E., Efron, M. L. & Mechanic, G. L. (1967), *Anal. Biochem.* **20**, 299–311.
2. Benson, J. V., Cormick, J. & Patterson, J. A. (1967), *Anal. Biochem.* **18**, 481–492.
3. Berridge, B. J., jr., Chao, W. R. & Peters, J. H. (1971), *Anal. Biochem.* **41**, 256–264.
4. Mondino, A. & Bongiovanni, G. (1971), *J. Chromatogr.* **63**, 411.
5. Jeppson, J. O. & Karlsson, J. M. (1972), *J. Chromatogr.* **72**, 93.
6. Benson, J. V. (1972), *Anal. Biochem.* **50**, 477–493.
7. Mondino, A. (1970), *J. Chromatogr.* **50**, 260–273.
8. Vratny, P. & Zbrozek, J. (1973), *J. Chromatogr.* **76**, 482–486.

Dr. rer. nat. Klaus Olek
Institut für Humangenetik
der Universität Bonn
Wilhelmstraße 31
D-5300 Bonn 1