

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
7. Jg., S. 521—524, September 1969

Ein einfacher dünnschichtchromatographischer Suchtest zur Erkennung von Hyperaminacidämien

VON F. KRAFCZYK, R. HELGER UND H. LANG

Biochemische Abteilung, E. Merck AG, Darmstadt

(Eingegangen am 5. Juni 1969)

Es wird ein einfacher dünnschichtchromatographischer Suchtest zur gleichzeitigen Erkennung aller wichtigen Hyperaminacidämien beschrieben. Plasma wird auf Cellulose-Fertigplatten mit dem Laufmittel Butanol/Aceton/Eisessig/Wasser (35:35:10:20, v/v) chromatographiert. Pathologische Konzentrationserhöhungen erkennt man beim Vergleich mit einem auf derselben Platte mitgeführten Standard. Zum Nachweis von Histidinämien verwendet man das Laufmittel tert. Butanol/Äthylmethylketon/25proz. Ammoniak/Diäthylamin/Wasser (50:30:10:0,4:20, v/v).

Durch Verwendung eines fertigen Reagenziensatzes ist die Methode auch in solchen Laboratorien anwendbar, die keine Erfahrung in der Dünnschichtchromatographie haben.

A simple thin layer chromatographic screening test for the detection of hyperaminoacidaemias

A simple TLC screening test for detection of all important types of hyperaminoacidaemia is presented. Plasma is chromatographed on precoated cellulose plates using the eluant butanol/acetone/acetic acid/water (35:35:10:20, v/v). Pathological rises in the concentration of amino acids are detected by comparison with a standard chromatographed on the same plate. Histidinaemia is detected by chromatography with tert. butanol/ethylmethylketone/25% ammonia/diethylamine/water (50:30:10:0.4:20, v/v). With the aid of a reagent set this method can also be used in laboratories which do not have previous experience in thin layer chromatography.

Zur Erkennung von Hyperaminacidämien dienen gegenwärtig mikrobiologische Tests (1) sowie chromatographische Methoden. Die Säulenchromatographie nach MOORE und STEIN (2) liefert quantitative Ergebnisse für alle in Frage kommenden Aminosäuren, ist aber recht aufwendig. Für den Nachweis einer Anomalie genügen halbquantitative Verfahren, wie Papier- und Dünnschichtchromatographie. Die bisher beschriebenen Verfahren (3—10) sind entweder verhältnismäßig zeitraubend, oder sie erfassen nur einige Aminosäuren, oder es mangelt ihnen an Nachweisempfindlichkeit, insbesondere für Phenylalanin.

Wir haben ein chromatographisches System entwickelt, das

1. eine einfache Durchführung des Tests erlaubt,
2. möglichst viele Hyperaminacidämien erfaßt,
3. eine ausreichende Nachweisempfindlichkeit für Phenylalanin aufweist.

Gute Trennungen über den ganzen in Frage kommenden Polaritätsbereich bei sehr kurzer Laufzeit (30 Min. bei 7 cm Laufstrecke) erzielt man bei Zweifachentwicklung mit Aceton/Eisessig/Wasser (70:10:20 v/v) auf mikrokristalliner Cellulose (10). Ein Nachteil dieses Laufmittels ist die geringe Zonenschärfe in Frontnähe. Phenylalanin ist deshalb erst bei Konzentrationen über 5 mg/100 ml zu erkennen. Da die Normalwerte bei 2 mg/100 ml (11) liegen und bei Neugeborenen im Alter von mehr als 4 Tagen Konzentrationen über 4 mg/100 ml bereits als Verdachtsfälle gelten (12), eignet sich das Laufmittel nicht für einen Suchtest für Phenylketonurie bei Neugeborenen.

Auf Cellulose erhält man gute Trennungen bei sehr scharfen Banden mit dem Laufmittel Butanol/Eisessig/

Wasser (60:15:25 v/v). Für die Chromatographie der Plasmaaminosäuren eignet sich dieses System jedoch weniger, da die Trennung der Aminosäuren durch andere Plasmabestandteile gestört wird.

Ergebnisse

Wir fanden, daß eine ausgezeichnete Auftrennung der Plasmaaminosäuren über den ganzen Bereich bei hoher Bandenschärfe auf mikrokristalliner Cellulose mit der mobilen Phase Butanol/Aceton/Eisessig/Wasser (35:35:10:20 v/v) durch Zweifachentwicklung erreicht wird. Die Aminosäuren sind in diesem System über die ganze Laufstrecke verteilt (Abb. 1). Das im Plasma enthaltene Eiweiß bleibt am Start zurück. Die Ausführung der Chromatographie der Plasmaaminosäuren und die Auswertung der Chromatogramme ist relativ einfach. Eine besonders hohe Nachweisempfindlichkeit des Phenylalanins (2,5 mg/100 ml) wird durch die Verwendung spezieller Celluloseplatten mit einer Schichtdicke von 80—100 µm erreicht (1).

Bei der Durchführung des Tests wird nach SHRIVER (4) Blut in heparinisierten Kapillaren aufgenommen und durch Zentrifugieren Plasma gewonnen. Auf eine Platte werden verschiedene Plasmaproben sowie ein geeigneter Standard aufgetragen. Man benutzt dazu Einmal-Mikrokapillaren. Ein Auftragegerät erleichtert das für gute Trennungen vorteilhafte strichförmige Auftragen definierter Lösungsmengen. Die Chromatographie in dem beschriebenen System dauert etwa 90 Min. bei Zweifachentwicklung. Das Anfärben der Aminosäuren erfolgt mit Ninhydrin. Danach wird die Platte mit einer Modifikation von EHRlich's Reagenz behandelt, wobei Prolin und Hydroxyprolin als rote Banden erscheinen,

während die Ninhydrinfärbung der übrigen Aminosäuren verblaßt. Die Auswertung erfolgt durch visuellen Vergleich mit dem Standardgemisch. Die Lokalisation der Aminosäuren in den einzelnen Banden zeigt Abbildung 1.

Treten eine oder mehrere Banden einer Plasmaprobe stärker hervor als die entsprechenden Banden des Standards, so liegt eine Störung des Aminosäurenstoffwechsels vor. In Abbildung 1 sind nur die im normalen

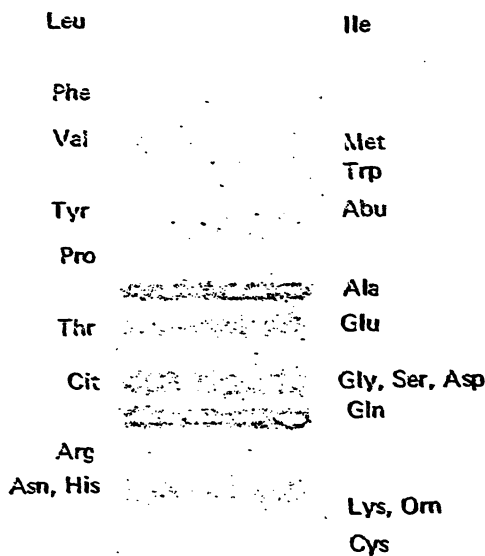


Abb. 1

Dünnschichtchromatogramm. Lokalisation der Aminosäuren in den einzelnen Banden. Angegeben sind nur im normalen Plasma in nennenswerter Menge enthaltene Aminosäuren

Plasma in nennenswerter Menge enthaltenen Aminosäuren aufgeführt. In pathologischen Fällen können auch noch weitere Aminosäuren auftreten, deren Lagen im Chromatogramm aus Abbildung 2 zu entnehmen sind. Die absoluten Steighöhen sind schwer reproduzierbar, jedoch bleibt die Reihenfolge der Aminosäuren stets erhalten. Die Empfindlichkeit des Tests ist nicht für alle Aminosäuren gleich. Grenzkonzentrationen, die mit Sicherheit als Erhöhung wahrgenommen werden, sind aus Abbildung 2 ersichtlich. Im Standard fehlen wegen mangelnder Haltbarkeit bzw. Löslichkeit die Aminosäuren Glutamin, Cystin und Ornithin. Man orientiert sich hinsichtlich der Menge von Glutamin und Cystin an den benachbarten normalen Plasmaproben. Das Fehlen von Ornithin wird durch einen erhöhten Gehalt des Standards an Lysin ausgeglichen. Eine Verstärkung der Glycin/Serin-Bande beruht meist auf einer harmlosen

Durchschnittliche Laufhöhe (cm)	Aminosäure	Konzentration ^{*)} in der Standardlösung (mg/100 ml)	Erhöhung sichtbar ab etwa (mg/100 ml)
5	Leucin	3,1	6
	Isoleucin	1,3	4
	Alloisoleucin	0	2
	Phenylalanin	2,5	4
	Valin	5,0	10
	Methionin	0,5	5
	β-Aminoisobuttersäure	0	6
	Tryptophan	0,6	3
	β-Aminolävulin säure	0	2
	Tyrosin	2,1	4
4	α-Aminobuttersäure	0,3	5
	Prolin	3,0	4**
	Alanin	4,5	10
	Serkosin	0	12
	Glutaminsäure	0	7
	Threonin	5,5	7
	Hydroxyprolin	0	2**
3	Taurin	0,6	30
	Glycin	3,0	5
	Serin	2,0	5
	Asparaginsäure	0	4
	Citrullin	0	6
	Glutamin	0	25
2	Homocystin	0	3
	Asparagin	2,3	12
	Argininobornsteinsäure	0	5
	Arginin	2,2	4
	Lysin	4,5	6
	Histidin	8,5	30
1	Ornithin	0	5
	Cystathionin	—	3
	Cystin	—	4

Abb. 2

Durchschnittliche Laufstrecke von Aminosäuren, die in pathologischen Fällen auftreten können, im Dünnschichtchromatogramm (Entwicklung zweifach, Froat bei 7,5 cm)

* Der Standard ergibt ein Chromatogramm, das visuell etwa dem Chromatogramm eines Plasmas mit Aminosäurenkonzentrationen im oberen Normalbereich 5 Tage alter Neugeborener gleicht. Die einzelnen Werte sind nicht als Normalwerte zu verstehen

** Nach Reaktion mit dem Dimethylaminobenzaldehyd/Phosphorsäure-Reagenz

Erhöhung der Serinkonzentration. Will man die äußerst seltenen Fälle von Glycinämie miterfassen, muß das betreffende Plasma nochmals auf eine Platte aufgetragen und durch Dreifach- oder Vierfach-Entwicklung getrennt werden. Dabei spaltet sich die Glycin/Serin-Bande auf. Die obere Zone entspricht dem Glycin, die untere dem Serin. Anstelle des in der Testpackung¹⁾ enthaltenen Laufmittels kann zur Auftrennung von Serin/Glycin sowie zur Abtrennung von Histidin das Laufmittel tert.-Butanol/Äthylmethylketon/25proz. Ammoniak/Diäthylamin/Wasser (50:30:10:0,4:20, v/v) verwendet werden. Dieses Gemisch ist für die genannten Trennungen besser geeignet (13).

Diskussion

Die in Abbildung 2 in der letzten Spalte aufgeführten Konzentrationen sind Grenzkonzentrationen, ab denen

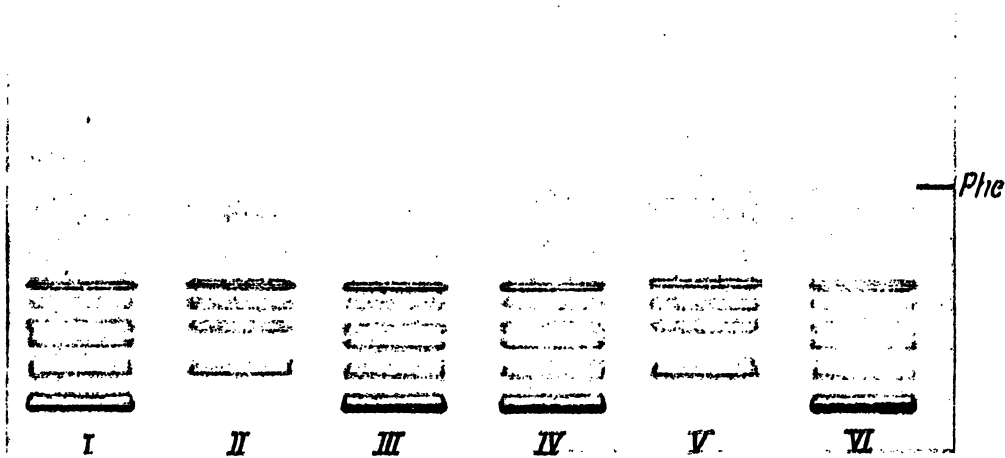


Abb. 3
Dünnschichtchromatogramm,
Konzentrationserhöhung von Phenylalanin.
I, Normales Plasma, II und V Standard, III, IV und VI Phenylalanin erhöht: 5, 8 bzw. 12 mg/100 ml Plasma

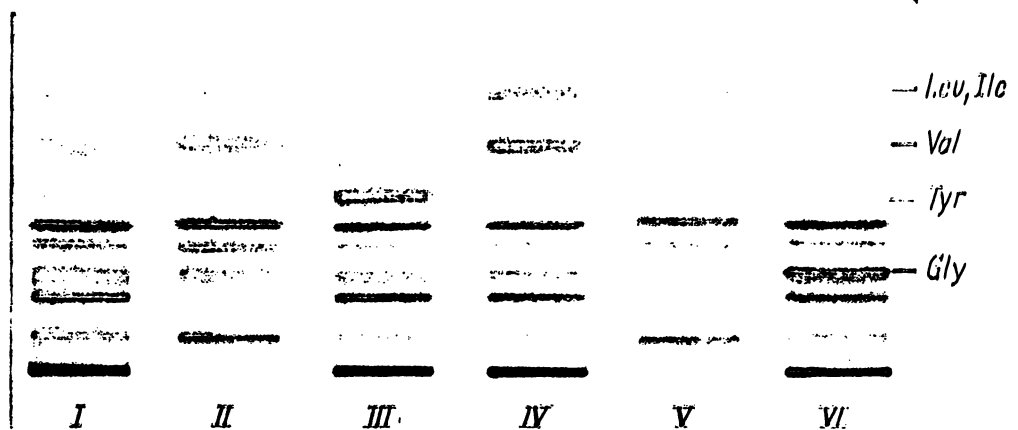


Abb. 4
Dünnschichtchromatogramm,
Konzentrationserhöhung
verschiedener Aminosäuren.
I, Normales Plasma, II und V Standard, III Tyrosin 8 mg/100 ml, IV Leucin 7, Iso-Leucin 3, Valin 12 mg/100 ml, VI Glycin 8 mg/100 ml

eine Plasmaplanke gegenüber dem Standard verstärkt erscheint. Die absoluten Nachweisgrenzen liegen wesentlich niedriger, z. B. für Phenylalanin bei 2,5 mg/100 ml. Die Konzentrationen in der Standardlösung wurden so gewählt, daß einerseits nach Möglichkeit bei allen in Frage kommenden Aminoacidämien die entsprechenden Aminosäurebanden gegenüber dem Standard als verstärkt erscheinen, andererseits möglichst wenig falsch positive Ergebnisse erhalten werden. Die Standardlösung liegt deshalb deutlich über den mittleren Plasmakonzentrationen. Die Abbildungen 3 und 4 zeigen Chromatogramme mit Konzentrationserhöhungen einzelner Aminosäuren. Wichtig ist, daß Phenylalanin bei Plasmakonzentrationen ab 4 mg/100 ml eine deutliche Verstärkung gegenüber dem Standard zeigt. Der Test ist deshalb auch als Suchtest auf Phenylketonurie in der Neugeborenenperiode geeignet. Die Methode vereinigt hohe Nachweisempfindlichkeit im Falle des Phenylalanins mit guter Auftrennung über den gesamten Polaritätsbereich. Daraus ergibt sich eine breite Anwendbarkeit. Nach dem Ergebnis einer Prüfung in verschiedenen Laboratorien sind mit dem Test folgende Anomalien erkennbar (13): Phenylketonurie und Hyperphenylalaninämie, Ahornsirupkrankheit, Hypervalinämie, Hypermethioninämie (bei Homocystinurie und

Tyrosinose), Störungen im Tyrosinstoffwechsel, Hyperprolinämie, Hydroxyprolinämie, Hyperglycinämien verschiedener Genese, Hyperlysinämien, Ornithinämie und — bei höheren Konzentrationen bzw. nach Variation des Laufmittels — Histidinämien.

Der Test erfordert keinen apparativen Aufwand und ist einfach zu handhaben. Auch in Laboratorien, die bisher nicht dünnschichtchromatographisch gearbeitet haben, können einwandfreie Ergebnisse erwartet werden. Eine Person kann täglich etwa 100 Analysen durchführen (13), doch ist der Test auch dann sinnvoll und wirtschaftlich, wenn täglich nur 4—8 Analysen durchgeführt werden. Nach einer Anregung von BICKEL und NÜTZMADDEL (14) kann der Test auch zur Untersuchung von Blut verwendet werden, welches auf Filterpapierkarten adsorbiert ist (15). Dieses Verfahren ist für Institute interessant, die derartig gesammelte Blutproben zur Untersuchung mit dem Guthrietest zugesandt erhalten. Die Blutplättchen werden extrahiert und die Extrakte punktförmig auf die DC-Platte aufgetragen und chromatographiert. Da auf diese Weise nicht mehr genau definierte Plasmaproben zur Untersuchung gelangen, ist der Vergleich mit einem Standard nicht sinnvoll. Es werden die relativen Intensitäten der verschiedenen Aminosäurebanden innerhalb einer Plasmaprobe bewertet.

Methodik

Reagenzien¹⁾

Sorptionsschicht

Cellulose-Fertigplatten

Laufmittel

n-Butanol/Aceton/Eisessig/Wasser (35:35:10:20, v/v). Das fertige Laufmittel ist bei Raumtemperatur 12 Stdn. haltbar.

Ninhydrin-Lösung

0,4M Ninhydrin in n-Butanol/Aceton (50:50, v/v). Die Lösung ist im Kühlschrank mindestens drei Monate haltbar.

Prolinreagenz

0,057M p-Dimethylamino-benzaldehyd in Essigsäureäthylester/85proz. Phosphorsäure/Eisessig/Wasser (50:6:34:10, v/v). Die Lösung ist bei Raumtemperatur mindestens 14 Tage haltbar.

DC der Aminosäuren in Heparin-Plasma

Plasma

Man füllt eine heparinisierte Kapillare mit Blut, schmilzt am blutfreien Ende zu, zentrifugiert und zerschneidet an der Trennlinie zwischen Blutkuchen und Plasma.

Auftragen

Je 2 µl Plasma bzw. Standard werden mit dem Auftragegerät²⁾ und Mikrokapillare entsprechend Abbildung 5 aufgetragen.

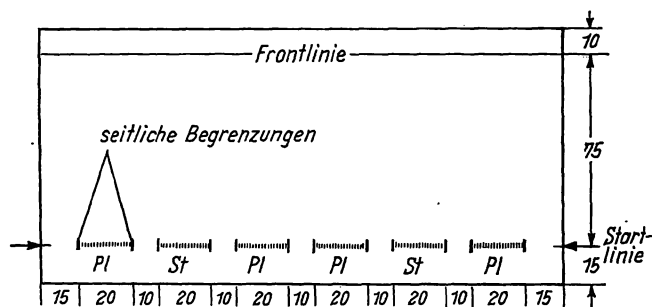


Abb. 5

Schema für das Auftragen von Standard-(St)- und Plasma-(Pl)-Proben auf die DC-Platte (200 x 100). Alle Zahlenangaben in mm

¹⁾ Alle Reagenzien sind in dem Reagensatz Merckotest DC Aminosäuren im Plasma, Art. Nr. 3345 enthalten.

²⁾ Das Auftragegerät ist in der Grundausrüstung für Merckotest DC, Art. Nr. 3346 enthalten.

Entwicklung und Nachweis

Man entwickelt einmal bis zur Frontlinie (etwa 50 Min., keine Kammersättigung!) und trocknet mit dem Heizlüfter. Dann pipettiert man 3 ml Ninhydrinlösung in die Kammer zu dem Laufmittel der ersten Entwicklung und mischt. Die getrocknete Platte wird in dieser Mischung erneut bis zur Frontlinie entwickelt. Zunächst wird mit dem Heizlüfter und anschließend 5 Min. im Trockenschrank bei 80° getrocknet. Die Aminosäuren mit Ausnahme von Prolin und Hydroxyprolin erscheinen als blaue Zonen. Zur Auswertung wird die Platte 5 Min. nach Entnahme aus dem Trockenschrank im Auflicht und im Durchlicht betrachtet.

Nachweis von Prolin und Hydroxyprolin: Ein Pinsel wird mit dem Prolinreagenz so getränkt, daß er gerade nicht tropft. Man bestreicht die bereits mit Ninhydrin behandelte Platte mit einem Pinselstrich parallel zur Lösungsmittelfront in Höhe der Alanin- und Glycin-Zone (vgl. Abb. 1). Die Platte wird drei Minuten lang im Trockenschrank auf 110° erhitzt. Prolin und Hydroxyprolin werden als rote Zonen sichtbar, falls die Konzentrationen dieser Aminosäuren hoch genug sind. Pathologische Erhöhungen in Plasmaproben sind in jedem Fall gut erkennbar. Die Farben verblassen nach einigen Minuten.

DC der Aminosäuren im Serum bei Blutabnahme mit Filterpapierkarten:

Extraktion

Aus den Filterpapierkarten wird ein blutgetränktes Blättchen von 1 cm Durchmesser ausgestanzt oder ausgeschnitten. Das Blättchen wird auf den Boden eines verschließbaren Gefäßes etwa gleichen Bodendurchmessers gelegt (z. B. eine 5-ml-Flasche). Dazu werden 0,1 ml Äthanol/Wasser (70:30, v/v) pipettiert. Es ist darauf zu achten, daß das Extraktionsmittel das Blättchen vollständig bedeckt. Eventuell ist die Lage des Blättchens mit dem Spatel zu korrigieren. Das Gefäß wird verschlossen und 12 bis 24 Stdn. bei Raumtemperatur stehengelassen.

Auftragen

Die Gefäße mit der Extraktionslösung werden kurz umgeschüttelt. Dann trägt man je 2 µl als möglichst kleinen Punkt im Abstand von je 1 cm auf die Startlinie auf. Auf diese Weise gelingt es, 18 Proben auf einer Platte unterzubringen. Standard wird nicht aufgetragen.

Entwicklung, Nachweis und Beurteilung

Entwicklung und Nachweis erfolgen wie beschrieben. Das Verhältnis von Fleckengrößen bzw. Intensitäten der einzelnen Aminosäurezonen einer Serumprobe zueinander ist bei allen normalen Seren gleich. Wird beim Vergleich mit einem normalen Serum eine Verschiebung dieses Verhältnisses sichtbar, liegt der Verdacht einer Aminosäureanomalie nahe.

Herrn ERKENS danken wir für die umsichtige Ausführung der Versuche.

Literatur

- GUTHRIE, R., Birth Defects Original Article Series IV (No 6), Nov. 1968, pub. National Foundation - March of Dimes, S. 92-98.
- STEIN, W. H. und S. MOORE, J. biol. Chemistry 211, 915 (1954).
- EFRON, D. YOUNG, H. W. MOSER und R. A. MCCREARY, New Engl. J. Med. 270, 1378 (1964).
- SCRIVER, C. R., E. DAVIES und A. M. CULLEN, Lancet London 1964/II, 230.
- CAWLEY, L. P., W. L. GOODWIN und P. DIBBERN, Amer. J. Clin. Path. 48, 405 (1967).
- DITTMANN, J., Arch. Kinderhk. 177, 6 (1968).
- NITSCHKÉ, E., diese Z. 6, 208 (1968).
- MELLON, J. P. und A. G. STIVEN, J. Med. Laborat. Tech. 23, 204 (1966).
- MEYER, J., K. DROLL und V. KLINGMÜLLER, Clin. chim. Acta Amsterdam 18, 69 (1967).
- BLÉNEMANN, H., Dtsch. Med. Wschr. 93, 1566 (1968).
- Hsia, D. Y. Y., J. L. BERMAN und M. M. SLATIS, J. Amer. Med. Ass. 188, 203 (1964).
- BICKEL, M., Dtsch. Ärzteblatt 62, 717 (1965).
- BREMER, H. J., W. NÜTZENADEL und H. BICKEL, Mschr. Kinderh. 177, 32 (1969).
- BICKEL, M. und W. NÜTZENADEL, persönliche Mitteilung.
- PLOEHL, E., Clin. chim. Acta Amsterdam 21, 271 (1968).

Dr. H. Lang
E. Merck AG.
61 Darmstadt 2
Postfach 4119