

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXI, 35

SECTIO D

1966

Katedra i Zakład Chemii Ogólnej. Wydział Lekarski. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: doc. dr Irena Krzeczowska

Irena KRZECZKOWSKA, Zbigniew CZERNIAK
Stanisław BURZYŃSKI

Zastosowanie fotometrii negatywów chromatogramów do oznaczania ilościowego wolnych aminokwasów we krwi ludzi zdrowych

The Application of the Photometry of Negative Printed Chromatograms
for Quantitative Determination of Free Amino Acids in the Blood
of Healthy People

Określenie poziomu wolnych aminokwasów we krwi ludzkiej było celem wielu prac. Autorzy stosowali różne techniki: mikrobiologiczną (8), chromatografię bibułową (1, 3, 4, 10, 16, 21), oraz chromatografię kolumnową (5, 20). Szczególnie ta ostatnia w modyfikacji Spackmana i wsp. (19) znajduje coraz większe zastosowanie. Jednak wszystkie powyższe metody nie są pozbawione wad.

Metoda mikrobiologiczna jest bardzo mało dokładna i obecnie wychodzi z użycia, chromatografia kolumnowa (19), jakkolwiek dość dokładna ze względu na dobry rozdział substancji (błąd 3%), jest jednak bardzo pracochłonna i kosztowna. Poza tym niektóre aminokwasy bywają w tej metodzie częściowo adsorbowane na kolumnie i wówczas błąd wzrasta. Poziom aminokwasów rozdzielanych metodą chromatografii bibułowej oznaczano na ogół na drodze kolorymetrii eluatów (1, 3, 4), co nie jest dokładne, a zabiera dużo czasu. Dotychczasowe wyniki badań różnych autorów są tak rozbieżne, że każdy autor, zajmujący się zagadnieniem oznaczania poziomu aminokwasów we krwi w różnych schorzeniach, musi opracować przedtem własne normy fizjologiczne (3).

Po opracowaniu przez nas nowej metody oznaczania substancji rozdzielonych chromatograficznie na bibule przy pomocy fotometrii negatywów chromatogramów (11) pojawiła się możliwość zastosowania jej do oznaczania ilościowego wolnych aminokwasów we krwi ludzkiej. Opracowana przez nas metoda ze względu na swą prostotę, dokładność i szybkość wykonania oznaczeń, nadaje się nie tylko do badań naukowych, lecz także do seryjnych badań klinicznych. Sprzyja temu również dobry rozdział oznaczanych przez nas aminokwasów uzyskiwany przy zastosowaniu bibułowej chromatografii wstępującej jednokierunkowej przy użyciu jako jedynego rozpuszczalnika fazy Patridge'a.

W naszej pracy zajęliśmy się oznaczeniem we krwi ludzkiej poziomu dziesięciu aminokwasów: cystyny, argininy, glicyny, kwasu glutaminowego, α -alaniny, tyro-

zyny, kwasu α -aminomasłowego, waliny, fenyloalaniny i leucyny. Aminokwasy te najlepiej rozdzielają się i mają największe znaczenie w patologii. Poziom fenyloalaniny wzrasta znacznie w fenyloketonurii (20), a poziomy leucyny, waliny i tyrozyny zmieniają się w schorzeniach wątroby (7). Podobnie zmiany poziomu innych oznaczanych przez nas aminokwasów odgrywają dużą rolę w różnych jednostkach chorobowych (9, 13, 17).

MATERIAŁY, APARATY, METODY

Badano krew pobraną od 18 zdrowych osobników w wieku od 20 do 26 lat. W grupie tej znajdowało się 9 kobiet i 9 mężczyzn. Próby pobierano na czczo. Rozdział chromatograficzny przeprowadzono na bibule Whatman N 3. Do oznaczeń ilościowych zastosowano standardowe mieszaniny dziesięciu aminokwasów: cystyny, argininy, glicyny, kwasu glutaminowego, α -alaniny, tyrozyny, kwasu α -aminomasłowego, waliny, fenyloalaniny i leucyny o stężeniach 0,5%, 1,0 mg%, 2,0 mg%, 3,0 mg%. Pochodzenie wyżej wymienionych aminokwasów podano w jednej z poprzednich prac (12). Używane odczynniki cz. d. a. pochodziły z Gliwic.

Użyto dwie techniki chromatograficzne: chromatografię krążkową wg Przybylskiej i wsp. (18) do wstępnej analizy jakościowej i orientacyjnego ustalenia stężeń oraz chromatografię wstępującą jednokierunkową według Williamsa i Kirby (22) do oznaczeń ilościowych. W obu wypadkach jako wywoływacza użyto 0,2% acetonowy roztwór ninhydryny. Do oznaczenia ilościowego badanych aminokwasów zastosowano metodę fotometrii negatywów chromatogramów (11). Chromatogramy uzyskane techniką wstępującą fotografowano na mikrofilmie firmy „Foton”, a otrzymane negatywy przesuwano przed obiektywem „Schnellphotometr II” Zeissa. Odczyty ze skali „S” tego aparatu posłużyły do sporządzenia wykresów dla standardowych mieszanin aminokwasów o znanym stężeniu. Na podstawie sporządzonych wykresów obliczono stężenia badanych aminokwasów we krwi ludzkiej.

BADANIA WŁASNE

Przygotowanie krwi. Badania przeprowadzano na krwi pobranej na czczo od 18 osobników (9 kobiet i 9 mężczyzn) w wieku od 20 do 26 lat. Krew pobierano z żyły łokciowej w ilości 10 ml, a następnie mieszano z 1 ml 0,1 M roztworu szczawianu potasu. Po odwirowaniu odciągano 4 ml osocza i odbiańczano dwukrotnie przez dodanie 10 ml 95% alkoholu etylowego. Odwirowane osady dwukrotnie przemywano 95% alkoholem etylowym. Otrzymany roztwór odparowywano do suchości pod promiennikiem, pozostałą suchą masę rozpuszczano w 1 ml wody redestylowanej oraz dodawano kryształek tymolu w celu konserwacji. Osocze przechowywano w temperaturze od 0° do 4°C.

Ze względu na doniesienia licznych autorów (1, 3) o braku istotnych różnic między poziomami aminokwasów we krwi pobieranej kilkakrotnie u tych samych osobników, w obecnej pracy badano krew każdego osobnika jednorazowo. W badaniach nie stosowano odsalania, podobnie jak A t a c h a n o w i C h a r a t j a n (1), ponieważ proces ten znacznie kom-

plikuje metodę i wpływa na dość duże straty aminokwasów. Aminokwasy, które wybraliśmy spośród 26 plam ninhydrinopozytywnych, mogą być dobrze oznaczone bez odsalania.

Analiza jakościowa. Techniki chromatograficzne. W naszej pracy zastosowano dwie techniki chromatograficzne: krążkową według Przybylskiej, Kociałkowskiego i Wiewiórowskiego (18) oraz wstępującą jednokierunkową według Williamsa i Kirby (22).

Chromatografię krążkową stosowano do wstępnej analizy jakościowej aminokwasów oraz w celu przybliżonego określenia ich stężeń. Na krążkach bibuły Whatman N 3 o średnicy 23 cm zakreślano koło o średnicy 23 mm i w różnych odstępach nakraplano na nim pięć próbek odbiałzonego osocza w ilości od 0,014 ml do 0,080 ml oraz jedną sztuczną mieszaninę aminokwasów tzw. „mapkę” w ilości 0,014 ml o stężeniu 1 mg%. Średnica plamy po nakropleniu nie przekraczała 5 mm. Chromatogramy rozwijano dwukrotnie używając rozpuszczalnika w układzie Patridge'a: n-butanol — kwas octowy lodowaty — woda w stosunku objętościowym 4 : 1 : 1 i wywoływano w temperaturze pokojowej przez zanurzenie w 0,2% acetonowym roztworze ninhydryny.

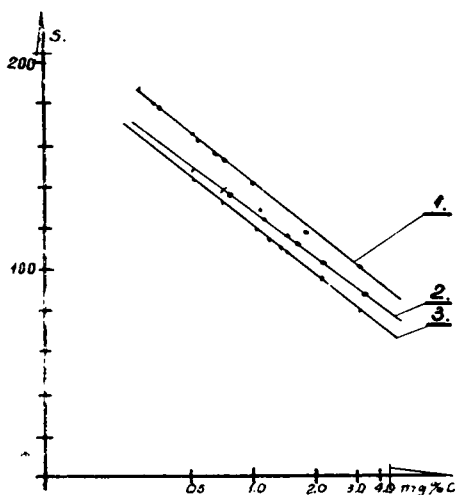
Aminokwasy identyfikowano przy pomocy „mapki”, po identyfikacji zaś chromatogramy ogrzewano przez 3 minuty w temperaturze 85°C w celu wykrycia β -alaniny. Identyfikację aminokwasów, dokonaną na chromatogramach krążkowych, sprawdzano przy pomocy chromatografii wstępującej jednokierunkowej (wg Williamsa i Kirby). Na arkuszach bibuły Whatmana N 3 o wymiarach 45 cm \times 50 cm, nakraplano odbiałzone osocze w postaci pasm o długości 25 mm, przestrzeń wolna między nakropleniami wynosiła 30 mm, a odległość linii startowej od początku arkusza bibuły również 30 mm. Na jednym arkuszu bibuły nakraplano próbki osocza pięciu osobników w ilości 0,080 mm. Mieszanina wzorcowa składała się z aminokwasów: cystyny, argininy, kwasu glutaminowego, α -alaniny, tyrozyny, kwasu α -aminomasłowego, waliny, fenyloalaniny i leucyny w stężeniach 0,5 mg%, 1,0 mg%, 2,0 mg%, 3,0 mg% i była nakraplana w ilości 0,014 ml. Dokładne dane dotyczące wyżej wymienionych aminokwasów znajdują się w jednej z naszych poprzednich prac (12). Chromatogramy rozwijano dwukrotnie (układ i wywoływacz jak przy chromatografii krążkowej). Przy wyborze aminokwasów kierowano się tym, że: 1) występowały one w osoczu w stosunkowo dużych stężeniach, 2) dobry ich rozdział nawet bez odsalania pozwalał na dokładne i łatwe oznaczanie ilościowe oraz 3) mają znaczenie w fizjologii i patologii organizmu człowieka.

Analiza ilościowa. Po ukazaniu się wyraźnych plam barwnych (4—6 godzin po wywołaniu 0,2% acetonowym roztworem ninhydryny) chroma-

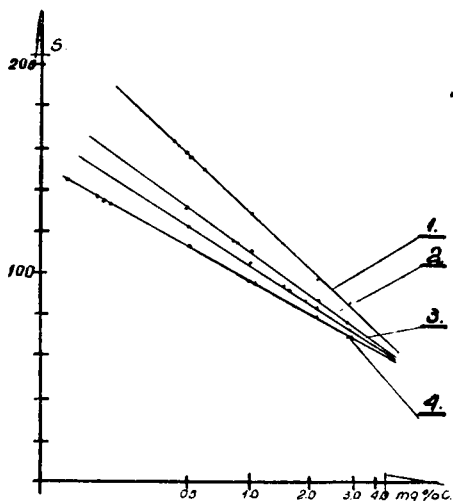
Tab. 1. Steżenia wolnych aminokwasów w mg % we krwi ludzkiej
 Concentrations of free amino acids in mg % in human blood

Osobnicy Aminokwasy	A.P.	T.B.	B.K.	M.C.	S.G.	K.K.	M.L.	Z.C.	M.B.	T.P.	S.B.	K.S.	G.M.	K.O.	M.K.	L.K.	D.B.	K.M.	Wartość średnia	Rozrzut
	cystyna	0,39	0,51	0,37	0,43	0,40	0,50	0,35	0,46	0,54	0,43	0,47	0,56	0,42	0,38	0,37	0,41	0,45	0,40	0,43
arginina	0,53	0,39	0,50	0,42	0,55	0,73	0,73	0,62	0,57	0,60	0,70	0,45	0,46	0,54	0,51	0,70	0,61	0,49	0,56	0,39—0,73
glicyna	0,47	0,48	0,56	0,89	0,47	0,72	0,90	0,49	0,50	0,55	0,60	0,48	0,74	0,67	0,84	0,53	0,51	0,85	0,62	0,47—0,90
kwas glutami- nowy	1,16	0,85	0,87	1,05	0,88	1,11	1,17	0,88	0,90	1,10	1,12	0,89	0,86	1,11	0,85	1,08	1,10	0,87	0,99	0,85—1,17
α-alanina	1,88	1,78	1,07	1,85	1,50	1,53	1,76	1,80	1,45	0,99	1,37	1,78	1,67	0,94	1,58	1,84	1,20	1,49	1,54	0,94—1,88
tyrozyna	0,54	0,47	0,44	0,60	0,51	0,54	0,77	0,72	0,63	0,48	0,53	0,75	0,49	0,70	0,55	0,63	0,52	0,44	0,57	0,44—0,77
kwas α-amino- masłowy	0,20	0,13	0,19	0,18	0,24	0,17	0,28	0,25	0,15	0,17	0,22	0,27	0,14	0,18	0,21	0,27	0,14	0,20	0,20	0,13—0,28
walina	1,55	0,72	1,57	1,32	1,32	0,75	1,55	1,32	0,94	1,43	0,82	0,78	1,40	1,31	1,22	1,05	0,98	0,87	1,13	0,72—1,55
fenyloalanina	0,68	0,74	0,33	0,52	0,36	0,33	0,72	0,35	0,64	0,51	0,49	0,72	0,36	0,39	0,71	0,42	0,50	0,68	0,52	0,33—0,74
leucyna	1,32	0,68	0,79	1,17	1,36	1,09	1,37	0,95	1,24	1,15	1,30	1,07	0,72	0,94	0,80	1,20	0,68	1,24	1,06	0,68—1,37

togramy fotografowano używając mikrofilmów firmy „Foton”. Fotometrię negatywów chromatogramów przeprowadzano w sposób podany przez autorów w jednej z poprzednich prac (11). Na podstawie wartości „S” odczytanych na skali mikrofotometru i stężeń standardowych mieszanin aminokwasów, sporządzano dla każdego aminokwasu wykresy przy pomocy których obliczano stężenia w mg%. Poziomy aminokwasów we krwi ustalano dla każdego osobnika na podstawie trzech replikacji. Uzyskane wyniki stężeń aminokwasów we krwi zestawiono w tab. 1. Wykresy stężeń poszczególnych aminokwasów krwi dla pięciu osobników są podane na ryc. 1, 2 i 3. Na osi rzędnych zaznaczono wartości „S”, a na osi odciętych stężenia aminokwasów w mg% (stosując skalę logarytmiczną).

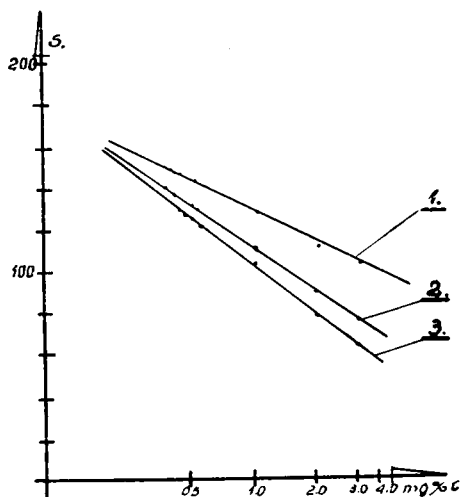


Ryc. 1. Zależność stężeń w mg% (skala logarytmiczna) cystyny (1), argininy (2) i glicyny (3) od wartości „S” odczytanej na skali mikrofotometru
Relation between concentrations, in mg%, (logarithmic scale) of cystine (1), arginine (2), glycine (3) and „S” value from the microphotometer scale



Ryc. 2. Zależność stężeń w mg% (skala logarytmiczna) tyrozyny (1), kwasu glutaminowego (2), α -alaniny (3) i kwasu α -aminomasłowego (4) od wartości „S” odczytanej na skali mikrofotometru
Relation between concentrations, in mg%, (logarithmic scale) of tyrosine (1), glutamic acid (2), α -alanine (3), α -aminobutyric acid (4) and „S” value from the microphotometer scale

Błąd zastosowanej metody wynosi 1,4% (11). Zastosowana metoda będzie mogła być użyta w seryjnych badaniach klinicznych w diagnostyce jednostek chorobowych oraz w badaniu metabolizmu ustrojowego aminokwasów (praca w toku).



Ryc. 3. Zależność stężeń w mg% (skala logarytmiczna) fenyloalaniny (1), waliny (2) i leucyny (3) od wartości „S” odczytanej na skali mikrofotometru

Relation between concentrations, in mg%, (logarithmic scale) of phenylalanine (1), valine (2), leucine (3) and „S” value from the microphotometer scale

OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Na podstawie wykonanych oznaczeń stężeń aminokwasów we krwi 18 osobników obliczono wartości średnie i rozrzut. Z dokonanego zestawienia wynika, że poziomy aminokwasów we krwi osobników zdrowych wahają się w dość dużych granicach, co jest zgodne ze spostrzeżeniami innych autorów. Nie stwierdzono istotnych różnic w stężeniach aminokwasów we krwi kobiet i mężczyzn (różnica z wynikami niektórych autorów (6, 14, 15)). Nie wykryto również zależności między stężeniami aminokwasów we krwi, a grupami krwi w zakresie układu ABO i Rh, jakkolwiek brano pod uwagę taką możliwość, opierając się na wcześniejszych spostrzeżeniach Bettiego (2).

Oznaczanie aminokwasów we krwi było tematem prac wielu badaczy, którzy posługiwali się metodami: chromatografii kolumnowej (5, 20), chromatografii bibułowej (1, 4, 10, 16, 21), kolumnowo-bibułowej (3) i mikrobiologicznymi (8). Wyniki uzyskane przez różnych badaczy wykazują jednak stosunkowo duże rozbieżności, co przedstawia tab. 2. Na powstanie tych rozbieżności może mieć wpływ technika przygotowania krwi do analizy chromatograficznej: odbiaćzanie (21), odsalanie (3),

Tab. 2. Zestawienie stężeń wolnych aminokwasów w osoczu krwi ludzkiej w $\mu\text{g/ml}$ uzyskanych przez różnych autorówA comparison of the amino acids concentrations in human plasma in $\mu\text{g/ml}$, obtained by various authors

	Braun (4)	Knauff (10)	Walker (21)	Mc. Menamy (16)	Harper (8)	Christensen (5)	Stein (20)	Bober (3)	Atachanow (1)	Badania własne
cystyna	23	11,1	—	—	30,2	—	11,8	8,2	—	7,8
arginina	12	11,5	12,2	11,9	22,6	10,5	15,1	8,5	—	10,1
glicyna	19	12,5	16,8	17,7	29,0	31,9	15,4	14,3	21,5	11,2
kwas glutaminowy	9	5,2	19,1	2,9	9,0	5,2	7,0	20,1	26,6	17,9
α -alanina	27	26,2	51,7	28,5	39,0	21,9	34,1	23,1	25,0	27,8
tyrozyna	11	11,3	11,9	12,7	13,0	7,7	10,3	6,9	15,0	10,3
kwas α -aminomasłowy	—	2,5	1,6	2,3	—	2,6	3,0	3,5	—	3,6
walina	22	21,2	22,1	14,9	32,0	—	28,8	14,8	22,5	20,4
fenyloalanina	17	8,8	9,7	9,2	20,0	7,9	8,4	7,3	19,5	9,4
leucyna	23	17,1	25,0	10,4	25,0	13,2	16,9	14,7	23,6	19,2

zagęszczanie; stosowanie niedokładnej metody, jak również opracowywanie wyników na podstawie zbyt małej liczby oznaczeń (5). Wyniki naszej pracy są zbliżone do uzyskanych przez większość badaczy. Dość znacznie natomiast odbiegają od podanych przez Harpera i wsp., którzy otrzymali przeważnie wyższe stężenia aminokwasów we krwi. Szczególnie duże różnice są w poziomach cystyny, glicyny, α -alaniny i waliny. Wyniki uzyskane w obecnych badaniach będą podstawą do dalszych prac nad różnicami w stężeniach aminokwasów w pewnych stanach fizjologicznych i patologicznych.

Wnioski

Przeprowadzone przez nas badania wykazały przydatność metody fotometrii negatywów chromatogramów do oznaczeń ilościowych wolnych aminokwasów w surowicy krwi ludzkiej.

Podaną metodę oznaczania stężenia wolnych aminokwasów we krwi ludzkiej można zastosować nie tylko do badań naukowych, lecz również do seryjnych badań klinicznych.

Oznaczone przez nas stężenia aminokwasów nie odbiegają zbyt od stężeń podanych przez innych autorów i są najbardziej zbliżone do wyników uzyskanych przez Knauffa (10).

Przy badaniach poziomu cystyny, argininy, glicyny, kwasu glutaminowego, α -alaniny, tyrozyny, kwasu α -aminomasłowego, waliny, fenyloalaniny i leucyny we krwi odsalanie nie jest konieczne, ponieważ i bez niego można uzyskać dobry rozdział chromatograficzny tych aminokwasów.

Nie stwierdzono istotnych różnic w zawartości poszczególnych aminokwasów w osoczu osobników męskich i żeńskich oraz zależności pomiędzy stężeniami aminokwasów, a grupami krwi.

PIŚMIENNICTWO

1. Atachanow E. I., Charatjan A. M.: *Lab. Delo*, **7**, 13—18, 1961.
2. Betti R.: *Ann. Fac. Med. Chir. Univ. Studi Perugia*, **51**, 181—193, 1959.
3. Bober S., Dąbrowa R., Iwańska J., Skrzypczyk E.: *Pol. Arch. Med. Wewnętrz.*, **32**, 443—454, 1962.
4. Braun P., Kisfaludy S., Dubsky M.: *Acta Med. Acad. Sci. Hung.*, **7**, 147, 1955.
5. Christensen P. J., Date J. W., Schonheyder F., Velquartz K.: *Scand. J. Clin. Lab. Inves.*, **9**, 54, 1957.
6. Friedberg F., Greenberg D. M.: *J. Biol. Chem.*, **168**, 405, 1947.
7. Giddey C.: *Schweiz. Med. Woch.*, **83**, 331, 1953.
8. Harper H. A., Hutchin M. E., Kimmel J. R.: *Proc. Soc. exp. Biol.*, **80**, 768, 1952.
9. Jonsson E.: *Acta Med. Scand.*, **162**, 163—165, 1958.
10. Knauff H. G., Dieterle P., Zickgraf H.: *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.*, **316**, 186, 1959.
11. Krzeczowska I., Burzyński S., Czerniak Z.: *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, Sec. D*, **20**, 221—229, 1965.
12. Krzeczowska I., Czerniak Z., Burzyński S.: *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, Sec. D*, **19**, 329—336, 1964.
13. Kulonen I. M., Kulonen E.: *Scand. J. Clin. and Lab. Invest.*, **12**, 84—96, 1960.
14. Lacy W. W., Crofford O. B.: *J. Lab. Clin. Med.*, **64**, 828—836, 1964.
15. Landau R. J., Lugibihl K.: *J. Clin. Endocrinol.*, **21**, 1355, 1961.
16. Mc Menamy R. H., Lund C. C., Lawrence J.: *J. Clin. Invest.*, **26**, 1672, 1957.
17. Peissachow B. I.: *Klin. Med.*, **42**, 83—89, 1964.
18. Przybylska J., Kociałkowski Z., Wiewiórowski M.: *Rocz. Nauk Roln.*, **79**, 1—17, 1958.
19. Spackman D. H., Stein W. H., Moore S.: *Anal. Chem.*, **30**, 1190—1205, 1958.
20. Stein W. H., Moore S.: *J. Biol. Chem.*, **211**, 915, 1954.
21. Walker D. G., Prasad A. S., Sadrieh J.: *J. Lab. Clin. Med.*, **59**, 110—117, 1962.
22. Williams R. T., Kirby H.: *Sciences*, **107**, 481—482, 1948.

Применение фотометрии негативов хроматограмм для количественного определения свободных аминокислот в крови здоровых людей

Резюме

Метод определения концентрации аминокислот при помощи негативов хроматограмм (II) был применен для исследования свободных аминокислот в крови здоровых людей. Определялось содержание 10 аминокислот: цистина, аргинина, глицина, глутаминовой кислоты, валина, фенилаланина, лейцина, α -аланина, тирозина и α -аминомасляной кислоты. Не установлено значительной разницы в содержании отдельных аминокислот в плазме мужчин и в плазме женщин, а также не обнаружено зависимости концентрации аминокислот от группы крови.

Применение этого метода возможно при серийных клинических исследованиях, а также при диагностике различных болезней и в исследованиях обмена аминокислот (работы в этом направлении уже ведутся).

Рис. 1. Зависимость концентрации, мг %, (логарифмическая шкала) цистина (1), аргинина (2), глицина (3) от величины „S” шкалы микрофотометра.

Рис. 2. Зависимость концентрации, мг %, (логарифмическая шкала) тирозина (1), глутаминовой кислоты (2), α -аланина (3), α -аминомасляной кислоты (4) от величины „S” шкалы микрофотометра.

Рис. 3. Зависимость концентрации, мг %, (логарифмическая шкала) фенилаланина (1), валина (2), лейцина (3) от величины „S” шкалы микрофотометра.

Табл. 1. Концентрация свободных аминокислот, мг %, в человеческой крови.

Табл. 2. Концентрации свободных аминокислот в плазме человеческой крови, мг/мл, полученные разными авторами.

The Application of the Photometry of Negative Printed Chromatograms for Quantitative Determination of Free Amino Acids in the Blood of Healthy People

Summary

A photometric method of determining the concentration of free amino acids from negative printed chromatograms (11) was used for quantitative determination of amino acids in the blood of healthy people. The levels of 10 amino acids were determined: cystine, arginine, glycine, α -alanine, tyrosine, phenylalanine and leucine. No significant differences in the

content of the amino acids in the plasma of men and women were observed, and no relationship was found between the concentrations of the amino acids and the blood groups.

The above method is useful in serial clinical investigations; it makes diagnosis of some diseases easier and facilitates the study of the metabolism of amino acids. Further studies are being carried out.