

Katedra i Zakład Chemii Ogólnej. Wydział Lekarski. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: doc. dr habil. Stanisław Biliński

Jerzy ISKIERKO i Andrzej GORSKI

Wpływ soli zawartych w moczu i osoczu krwi na rozdział chromatograficzny aminokwasów na bibule

Влияние солей, содержащихся в моче и плазме крови, на хроматографическое разделение аминокислот на промокательной бумаге

The Effect of Salts in Urine and Blood Plasma on the Chromatographic Separation of Aminoacids on Filter Paper

Wielu badaczy zwróciło uwagę na wpływ soli i innych substancji w badanym materiale na chromatograficzny rozdział aminokwasów. Sole powodują rozmywanie plam i tworzenie się tak zwanych smug i „ogonów” utrudniających rozdział aminokwasów o zbliżonych R_f (2). Wg Consdena i Gordona (5) stężenie soli w granicach 1–10 mikrograma nie wpływa ujemnie na chromatograficzny rozdział aminokwasów i nie zmienia ich R_f . Opracowano szereg metod odsalania i oczyszczania materiału biologicznego przed analizą chromatograficzną aminokwasów. Często stosuje się do odsalania badanego materiału dializę lub elektrodializę. Ujemną stroną elektrodializy jest zachodząca w jej przebiegu przemiana argininy w ornitynę (8). Consden, Martin i Gordon zwracają uwagę na przechodzenie aminokwasów przez błonę półprzepuszczalną w procesie odsalania materiału za pomocą dializy (5). Odsalanie moczu, płynu rdzenia-mózgowego i innych płynów ustrojowych na kolumnach chromatograficznych wypełnionych jonitami prowadzi do strat tauryny, wypływającej z kolumny wraz z anionami, jak również i argininy, która się nie wymywa z kolumny 0,2 n NH_3 (6). Sole z roztworu zawierającego aminokwasów oczyszcza się również na drodze ekstrakcji absolutnym etanolem, lub acetonem (3), (7). Boulanger zastosował do tego celu jonoforezę (4). Niektórzy badacze do odsalania stosują bibulę impregnowaną roztworami różnych substancji, które zatrzymują sole na bibule w miejscu naniesienia analizowanej próby (2). Przedstawione metody oczyszczania z soli badanego materiału są długie, żmudne i wymagają specjalnej aparatury oraz odczynników. Ponadto prowadzą one do strat jakościowych i ilościowych niektórych aminokwasów. Z wyżej wymienionych względów w przedstawionej pracy podjęto badania wpływu soli oraz niektórych substancji organicznych zawartych w moczu i w osoczu krwi na chromatograficzny rozdział aminokwasów. Określono wpływ soli i innych związków w wymienionych płynach ustrojowych na R_f szeregu aminokwasów, na zawartość powierzchni ich plam na bibule, jak również na wielkość ekstynkcji barwnych eluatów kompleksów „Dyda” z jonami kadmu.

MATERIAŁ I METODY

Do sporządzenia roztworów wzorcowych użyto 14 aminokwasów: 1) alaninę, 2) kwas glutaminowy, 3) serynę, 4) kwas asparaginowy, 5) fenyloalaninę, 6) leucynę, 7) argininę, 8) treoninę, 9) glicynę, 10) tyrozinę, 11) lizynę, 12) metioninę, 13) walinę, 14) cystynę firmy Nutritional Biochemical Corporation Cleveland Ohio USA. Do kompleksowania dwuketo-hydrindylenu-dwuketo-hydrindaminy tak zwanej „Dyda” powstającej w wyniku reakcji aminokwasu z ninhydryną (9), stosowano chemicznie czysty azotan kadmu, NaCl, KCl, Na₂SO₄, NH₄Cl, CaCl₂. Chemicznie czyste: mocznik i kreatynina, aceton, metanol, n-butanol, lodowaty kwas octowy chemicznie czysty produkcji Spółdzielni Farm.-Chem. „Isopharm”. Aminokwasy na bibule wywoływano ninhydryną produkcji Politechniki Śląskiej. Rozdział aminokwasów przeprowadzono na bibule Whatman nr 3 metodą chromatografii bibułowej wstępującej (10) w kamerach szklanych o wymiarach 20 × 40 cm. Chromatogramy rozwijano dwukrotnie układem rozpuszczalników n-butanol, kwas octowy, woda 4 : 1 : 1. Czas jednokrotnego rozwijania chromatogramu wynosił 36 godzin i przebiegał w temperaturze pokojowej. Czerwone kompleksy „Dyda” poszczególnych aminokwasów z jonami kadmu eluowano z bibuły 70% metanolem i ich gęstość optyczną mierzono w fotokolorymetrze Specol firmy Carl Zeiss Jena NRD przy długości fali 510 milimikronów. Grubość warstwy przepuszczającej 1 cm. Powierzchnię plam kompleksów „Dyda” z jonami kadmu mierzono planimetrycznie. Pomiar powierzchni każdej plamy dokonywano trzykrotnie i brano średnią arytmetyczną z dokonanych pomiarów.

BADANIA WŁASNE

W celu określenia wpływu soli nieorganicznych zawartych w osoczu krwi na chromatograficzny rozdział aminokwasów przygotowano roztwór nr 1. Roztwór ten zawierał w swym składzie główne sole występujące w przybliżeniu w takich samych stężeniach jak w osoczu krwi. NaCl 0,81%, NaHCO₃ 0,2%, KCl 0,047%, CaCl₂ 0,030%. Pominięto sole manganu, żelaza i cynku, ponieważ występują one w osoczu tylko w ilościach śladowych. Dla zbadania wpływu soli nieorganicznych i innych związków zawartych w moczu na chromatograficzny rozdział aminokwasów sporządzono roztwór nr 2 o składzie NaCl 0,89%, KCl 0,28%, Na₂SO₄ 0,26%, NH₄Cl 0,118%, CaCl₂ 0,041%, mocznika 2%, kreatyniny 0,1%. Roztwór ten poza kwasem moczowym, amoniakiem i innymi związkami występującymi w małych ilościach odpowiadał swym składem jakościowym i ilościowym składnikom zawartym w moczu ludzkim.

Wzorcowe roztwory aminokwasów o stężeniu 10⁻³ mikromola nanoszono pasmowo na arkusze bibuły o wymiarach 46 × 52 cm. Długość nanoszonego pasma wynosiła 25 mm, a odległość pomiędzy pasmami 30 mm. Obok aminokwasu nie zawierającego soli nakraplano takie samo stężenie danego aminokwasu wraz ze wzrastającą ilością soli nr 1 lub nr 2. 1 pipetka nanoszonego roztworu odpowiadała 0,05 ml roztworu nr 1 lub roztworu nr 2. Ilość nanoszonego roztworu obu soli wahała się w granicach

0,05—0,25 ml. Po każdym naniesieniu roztworu bibułę suszono strumieniem ciepłego powietrza używając suszarki fryzjerskiej tak zwanego „fenu”. Po nakropleniu badanego materiału arkusze bibuły zwijano cylindrycznie i po zeszcyciu umieszczano w szklanej kamerze złożonej z podstawy eksykatora i klosza. Na dnie kamery znajdowała się płytka Petriego z układem rozpuszczalników n-butanol — kwas octowy — woda 4:1:1. Długość drogi przesuwania się czoła rozpuszczalnika wynosiła 43 cm. Chromatogramy suszono w temperaturze pokojowej około 12 godz., a następnie wywoływano 0,25% acetonowym roztworem ninhydryny z dodatkiem azotanu kadmu. Roztwór ninhydryny z kadmem przygotowano wg Barrouliera (1). Po wysuszeniu chromatogramów na bibule pojawiły się różowo-czerwone plamy kompleksów „Dyda” z jonami kadmu. Po obrysowaniu plam, za pomocą planimetru określono ich powierzchnię. Zmierzono Rf aminokwasów rozdzielanych chromatograficznie z roztworów wzorcowych nie zawierających soli, jak również i tych samych aminokwasów o różnym stopniu zasolenia. Następnie wycięte plamy kompleksów cięto na drobne paski, eluowano 70% metanolem i mierzono ich gęstość optyczną w fotokolorymetrze Specol przy długości fali 510 milimikronów.

Tab. 1. Wpływ soli zawartych w osoczu na Rf, powierzchnię plam i ekstynkcje kompleksów „Dyda” aminokwasów z jonami kadmu
Effect of salts in plasma on the Rf, surface of spots and extinction of "Dyda" complexes of amino acids with cadmium ions

Lp.	Aminokwas	Stężenie soli w mikrogramach	Rf	Powierzchnia plam w mm ²	Ekstynkcje ×1000
1.	Leu	000	0,81	750	110
	Leu	500	0,81	805	120
	Leu	1000	0,81	1020	125
	Leu	2500	0,80	1075	135
2.	Arg	000	0,20	705	145
	Arg	500	0,21	500	150
	Arg	1000	0,22	485	100
	Arg	1500	0,22	510	100
	Arg	2500	0,22	540	100
3.	Tyr	000	0,50	1150	200
	Tyr	500	0,51	1450	225
	Tyr	1000	0,52	1810	250
	Tyr	1500	0,53	1990	275
	Tyr	2500	0,53	2000	300

Ciąg dalszy tab. 1

4.	Wal	000	0,68	1010	—
	Wal	500	0,68	1010	—
	Wal	1000	0,67	1120	—
	Wal	1500	0,68	1100	—
5.	Ala	000	0,40	1065	210
	Ala	500	0,40	1300	215
	Ala	1000	0,41	1310	230
	Ala	1500	0,44	1390	230
6.	Ser	000	0,28	755	140
	Ser	500	0,27	925	140
	Ser	1000	0,25	1100	140
	Ser	1500	0,25	1260	140
		2500	0,25	1300	140
7.	Gli	000	0,28	790	165
	Gli	500	0,26	800	140
	Gli	1000	0,24	660	115
	Gli	1500	0,22	630	90
8.	Asp.	000	0,21	—	—
	Asp.	500	0,21	—	—
	Asp.	1000	0,23	—	—
	Asp.	1500	0,25	—	—
	Asp.	2500	0,26	—	—
9.	Tre	000	0,32	—	—
	Tre	500	0,34	—	—
	Tre	1000	0,35	—	—
	Tre	1500	0,37	—	—
10.	Liz	000	0,10	—	—
	Liz	500	0,10	—	—
	Liz	1000	0,12	—	—
	Liz	1500	0,12	—	—
	Liz	2500	0,12	—	—
11.	Met	000	0,61	—	—
	Met	500	0,62	—	—
	Met	1000	0,60	—	—
	Met	1500	0,59	—	—
12.	Cys	000	0,07	—	—
	Cys	500	0,07	—	—
	Cys	1000	0,07	—	—
	Cys	1500	0,07	—	—
	Cys	2500	0,09	—	—

Tab. 2. Wpływ soli i mocznika zawartego w moczu na Rf, powierzchnię plam i ekstynkcje kompleksów „Dyda” aminokwasów z solami kadmu
 Effect of salts and urea in urine on the Rf surface of spots and extinction of "Dyda" complexes of amino acids with cadmium ions

Lp.	Aminokwas	Stężenie soli i mocznika w mikrogramach		Rf	Powierzchnia plam w mm ²	Ekstynkcje ×1000
		soli	mocznika			
1.	Arg	000	000	0,22	720	195
	Arg	800	1000	0,16	660	180
	Arg	1600	2000	0,16	500	165
	Arg	2400	3000	0,16	510	150
	Arg	4000	5000	0,16	470	80
2.	Ala	000	000	0,42	—	—
	Ala	800	1000	0,39	—	—
	Ala	1600	2000	0,39	—	—
	Ala	2400	3000	0,39	—	—
3.	Ser	000	000	0,30	610	—
	Ser	800	1000	0,25	855	—
	Ser	1600	2000	0,23	1000	—
	Ser	2400	3000	0,23	1100	—
	Ser	4000	5000	0,21	1300	—
4.	Cys	000	000	0,09	370	95
	Cys	800	1000	0,07	210	65
	Cys	1600	2000	0,05	200	50
	Cys	2400	3000	0,04	165	35
	Cys	4000	5000	0,03	150	—
5.	Tyr	000	000	0,52	810	155
	Tyr	800	1000	0,50	1035	180
	Tyr	1600	2000	0,48	1075	200
	Tyr	2400	3000	0,50	1180	225
	Tyr	4000	5000	0,50	1300	—
6.	Glu	000	000	0,30	—	—
	Glu	800	1000	0,28	—	—
	Glu	1600	2000	0,28	—	—
	Glu	2400	3000	0,30	—	—
7.	Tre	000	000	0,33	—	—
	Tre	800	1000	0,32	—	—
	Tre	1600	2000	0,31	—	—
	Tre	2400	3000	0,31	—	—

Ciąg dalszy tab. 2

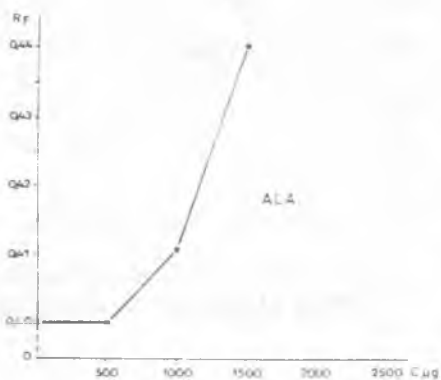
8.	Fen	000	000	0,73	1200	—
	Fen	500	1000	0,73	1080	—
	Fen	1600	2000	0,74	1040	—
	Fen	2400	3000	0,74	1000	—
9.	Leu	000	000	0,81	—	—
	Leu	800	1000	0,80	—	—
	Leu	1600	2000	0,81	—	—
	Leu	2400	3000	0,80	—	—
10.	Asp	000	000	0,27	—	—
	Asp	300	1000	0,26	—	—
	Asp	1600	2000	0,26	—	—
	Asp	2400	3000	0,26	—	—
	Asp	4000	5000	0,26	—	—
11.	Liz	000	000	0,12	—	—
	Liz	800	1000	0,11	—	—
	Liz	1600	2000	0,12	—	—
	Liz	2400	3000	0,13	—	—
12.	Met	000	000	0,70	—	—
	Met	800	1000	0,70	—	—
	Met	1600	2000	0,70	—	—
	Met	2400	3000	0,70	—	—

WYNIKI I WNIOSKI

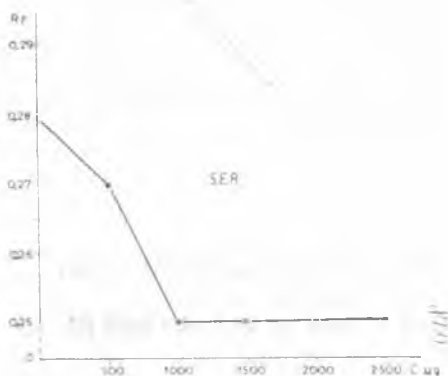
Tab. 1 przedstawia Rf, powierzchnię plam i ekstynkcję kompleksów „Dyda” z jonami kadmu samych aminokwasów i o różnym stopniu ich zasolenia. Do zasolenia użyto soli, które znajdują się w osoczu krwi zwiększając ich stężenie w nanoszonej na bibułę próbce.

Spośród 14 przebadanych aminokwasów wyraźny wpływ soli na zmianę Rf zaobserwowano u 5 aminokwasów to jest 1) alaniny, 2) seryny, 3) kwasu asparaginowego, 4) treoniny i 5) glicyny. Ryciny 1, 2, 3, 4 i 5 obrazują zależność Rf wymienionych aminokwasów od stężenia soli w roztworze badanego aminokwasu. U pozostałych aminokwasów nie zauważono wpływu soli na ich Rf, względnie tylko niewielkie odchylenia nie mające praktycznego znaczenia. Na niektórych chromatogramach z nakroplonymi zasolonymi aminokwasami, zaobserwowano różnice w wielkości powierzchni plam w porównaniu do tych samych aminokwasów o analogicznych stężeniach lecz pozbawionych soli. W tych przypadkach wykonano planimetryczne pomiary powierzchni plam oraz zmierzono optyczną

gęstość ich eluatów. Zmiany powierzchni plam aminokwasów nie zawsze występowały z równoczesną różnicą w wielkości ekstynkcji ich eluatów. Uwidocznilo się to wyraźnie w przypadku seryny.



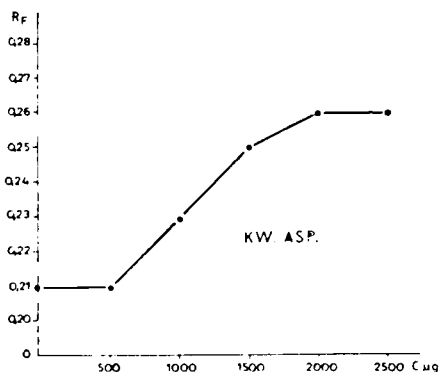
Ryc. 1. Wpływ soli na Rf alaniny
Effect of salts on alanine Rf



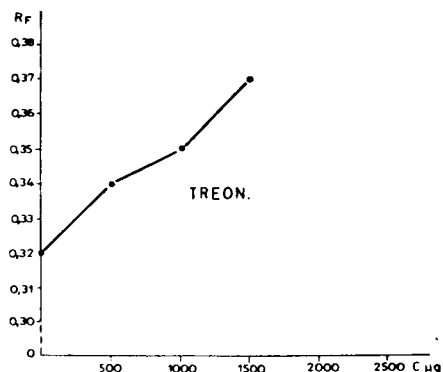
Ryc. 2. Wpływ soli na Rf seryny
Effect of salts on serine Rf

W tab. 2 zestawiono pomiary Rf, powierzchni plam i gęstości optycznej eluatów aminokwasów nie zawierających soli jak również z dodatkiem różnego stężenia substancji zawartych w roztworze nr 2. Roztwór nr 2 w przybliżeniu swym składem jakościowym i ilościowym odpowiada składnikom zawartym w moczu ludzkim. Na Rf, wielkość powierzchni plam i gęstość optyczną eluatów aminokwasów, poza solami nieorganicznymi mogą mieć wpływ substancje organiczne, to jest mocznik i kreatyna. Wyraźny wpływ soli i innych substancji zawartych w roztworze nr 2 na Rf uwidacznia się w przypadku 1) argininy, 2) alaniny, 3) cystyny i 4) seryny. U pozostałych 10 aminokwasów nie zaobserwowano wyraźnych różnic w ich Rf. Należy podkreślić, że w porównaniu do aminokwasów pozbawionych soli, mocznika i kreatyniny, u argininy, alaniny, cystyny i seryny zawierających wymienione substancje nastąpiło obniżenie Rf wymienionych aminokwasów.

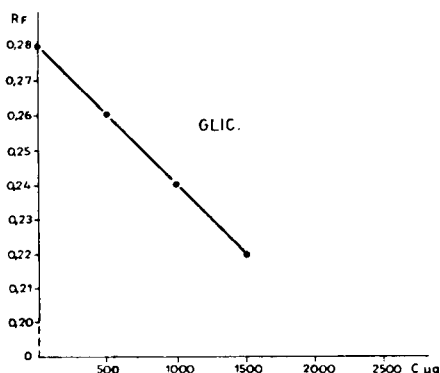
Ryciny 6, 7, 8 i 9 obrazują wpływ substancji zawartych w moczu (roztworze nr 2) na obniżenie Rf czterech wymienionych kwasów. Stosowane do badań roztwory nr 1 i 2 różniły się między sobą składem jakościowym i ilościowym. Roztwór nr 2 poza solami nieorganicznymi posiadał dwa związki organiczne, to jest mocznik i kreatyninę. Różnice w składzie chemicznym roztworów nr 1 i nr 2 mogły być przyczyną niejednakowego ich oddziaływania na Rf tych samych aminokwasów. Związki zawarte w roztworze nr 2 obniżały Rf alaniny, natomiast sole znajdujące się w roztworze nr 1 podwyższały Rf tego aminokwasu. Roztwór



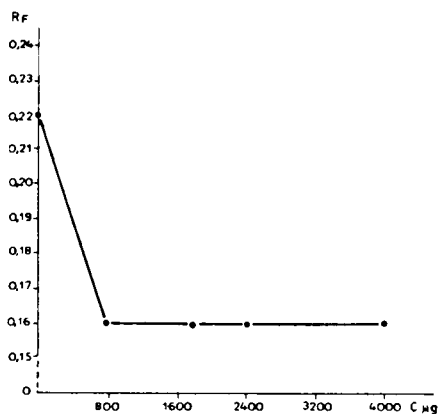
Ryc. 3. Wpływ soli na Rf kwasu asparaginowego
Effect of salts on aspartic acid Rf



Ryc. 4. Wpływ soli na Rf treoniny
Effect of salts on threonine Rf



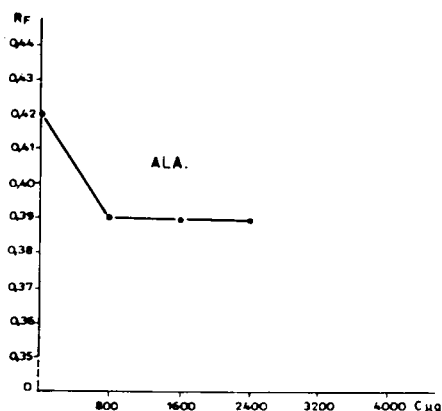
Ryc. 5. Wpływ soli na Rf glicyny
Effect of salts on glycine Rf



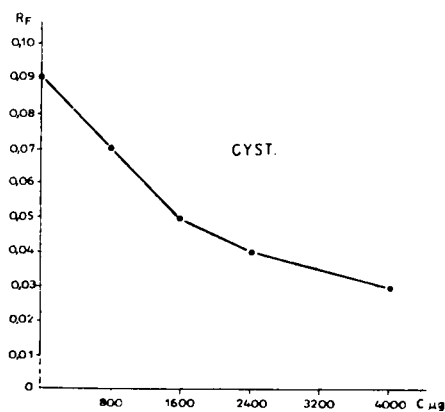
Ryc. 6. Wpływ soli i mocznika zawartych w moczu na Rf argininy
Effect of salts and urea in urine on arginine Rf

nr 1 zmieniał Rf kwasu asparaginowego, treoniny i glicyny, a roztwór nr 2 nie wpływał na Rf wymienionych aminokwasów. Związki zawarte w roztworze nr 2 obniżały Rf argininy i cystyny, a znajdujące się w roztworze nr 1 nie oddziaływały na Rf wymienionych aminokwasów. Na tej podstawie z dużym prawdopodobieństwem można przypuszczać, że sole zawarte w odbiałczonym odczynnikami organicznymi osoczu w inny sposób oddziałują na Rf aminokwasów niż sole i związki organiczne zawarte w moczu. Wg Consdena i Gordona (5), jeśli stężenie soli

w badanym materiale przekracza 10 mikrogramów, to u aminokwasów tworzą się tak zwane „ogony”. Badania własne tego nie potwierdziły. Stosując chromatografię wstępującą przy użyciu bibuły Whatman nr 3 i układu n-butanol, kwas octowy, woda 4:1:1, przy stężeniach soli w granicach od 500—4000 mikrogramów nie zaobserwowano tworzenia się ogonów u badanych aminokwasów. Obecność soli nr 1 i nr 2 w badanym materiale wpływała jedynie na zmianę wielkości powierzchni plam aminokwasów na bibule. Plamy te były jednak dobrze odgraniczone bez smug i „ogonów”.

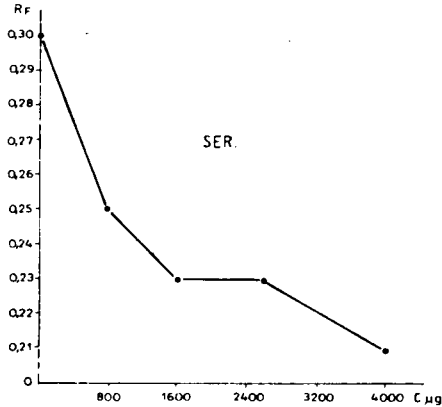


Ryc. 7. Wpływ soli i mocznika zawartych w moczu na Rf alaniny
Effect of salts and urea in urine on alanine Rf



Ryc. 8. Wpływ soli i mocznika zawartych w moczu na Rf cystyny
Effect of salts and urea in urine on cystine Rf

Uzyskane wyniki dowodzą konieczności odsalania osocza, a także moczu i innych płynów ustrojowych przed analizą chromatograficzną zawartych w nich aminokwasów. Sole zawarte w badanym materiale zmieniają Rf niektórych aminokwasów oraz wpływają na zmianę wielkości powierzchni plam aminokwasów na bibule, co posiada zasadnicze znaczenie dla ich analizy ilościowej. Wpływ soli na wielkość powierzchni plam aminokwasów i na zmianę gęstości optycznej ich eluatów z bibuły prowadzi do bardzo dużych błędów w analizie ilościowej planimetrycznej i kolorymetrycznej. Zwartość plam aminokwasów przy dużym stężeniu soli uzyskano prawdopodobnie dzięki własnościom odsalającym zastosowanej grubej bibuły Whatman nr 3. Wydaje się ona korzystniejsza dla analizy chromatograficznej aminokwasów zawierających sole, od powszechnie stosowanej bibuły Whatman nr 1.



Ryc. 9. Wpływ soli i mocznika zawartych w moczu na Rf seryny
Effect of salts and urea in urine on serine Rf

PIŚMIENNICTWO

1. Barroulier J.: *Naturwiss.* **42**, 819, 1955.
2. Blauth-Opieńska J., Waksmundzki A., Kański M.: *Chromatografia PWN*, Warszawa 1957.
3. Boligo B. R., Krishnamurthy K., Rajagopalan R., Giri K. W.: *Indian Inst. Sci. A.*, **37**, 18, 1955.
4. Boulanger P., Biserte G., Geriban R.: *Ann. Nutrition. Alimentation* **5**, 149, 1951.
5. Consden R., Gordon A. H., Martin A. J. P.: *Biochemical J.*, **38**, 224, 1944
6. Gordon A. H., Martin A. J. P.: *Biochem. J.* **41**, 590, 1947.
7. Molpress F. H., Morrison A. B.: *Nature* **164**, 963, 1949.
8. Stein W. H., Moore S.: *J. Biol. Chem.* **190**, 103, 1951.
9. Troll W., Cannen R. K.: *J. Biochem.* **200**, 803, 1953.
10. Williams R. J., Kirby H.: *Science* **107**, 481, 1948.

Otrzymano 26.I.1972.

РЕЗЮМЕ

Исследовали влияние солей, содержащихся в плазме крови, а также солей и соединений, содержащихся в моче, на хроматографическое разделение 14 аминокислот.

Соли, содержащиеся в плазме, повышали Rf аланина, серина, аспарагиновой кислоты, треонина и глицина, зато соли, содержащиеся в моче, понижали Rf аргинина, аланина, цистина и серина. Кроме того, они влияли на размер пятен аминокислот и оптическую плотность элюатов

комплексов „Dyda” с ионами кадмия. При концентрации 500—4000 мкг соли не наблюдали у пятен на бумаге присутствие так называемых хвостов.

S U M M A R Y

The paper deals with the effect of salts in plasma and of the content of salts and compounds in urine on the chromatographic separation of 14 aminoacids.

The plasma salts brought about an increase of Rf of alamine, serine, asparaginic acid, threonine and glycine, whereas the urine salts caused a decrease of Rf of arginine, alanine, cysteine and serine. Besides, they also effected the size of aminoacid spots and the optical density of ellates of the „Dyda” complexes with cadmium ions. The formation of the so-called tails close to the spots of particular aminoacids on the filter paper was not observed at the range of salt concentration from 500 to 4000 meg.

