

Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Aminosäuren im Urin als Beitrag zur klinischen Diagnostik

Von

K. MENZEL, H. KOSLOWSKI, CH. FIEHRING, U. WEDEKIND und G. JUNG

Kinderklinik der Medizinischen Akademie Erfurt

(Eingegangen am 17. Juli 1971)

Der Bedeutung einer Früherkennung von Stoffwechselstörungen entsprechend wird eine Reihe von chromatographischen Methoden beschrieben, die von einem einfachen Suchtest auf Hyperaminoacidurien bis zur qualitativen Identifizierung der Aminosäuren mittels unterschiedlicher zweidimensionaler Verfahren reichen.

Angeborene und erworbene Störungen des Aminosäurestoffwechsels gewinnen seit einigen Jahren zunehmend an Interesse. Unsere Kenntnisse sind innerhalb kurzer Zeit sprunghaft gestiegen: Ca. 40 von mehr als 60 bekannten Defekten im Stoffwechsel der Aminosäuren wurden im Laufe des letzten Jahrzehntes beschrieben [26]. Im gleichen Zeitraum fanden sich Hyperaminoacidurien als Begleitsymptome bei zahlreichen akuten und chronischen Krankheiten [20, 33]. Von der rechtzeitigen Erkennung der Erkrankung und dem Behandlungsbeginn im prä-morbiden Stadium hängen in hohem Maße Gesundheit, normale statische und geistige Entwicklung sowie in Einzelfällen sogar das Leben der Patienten ab.

Durch säulenchromatographische Trennungen ist es gelungen [16], 115 ninhydrinpositive Substanzen im Urin gesunder Probanden nachzuweisen. Durch die Entdeckung neuer

Stoffwechselanomalien wird ihre Zahl weiter ansteigen. Von diesen Substanzen hat jedoch nur ein gewisser Prozentsatz für die Klinik Bedeutung [7, 8].

Um routinemäßige Bestimmungen der Aminosäuren im Urin bei größeren Personenkreisen realisieren zu können, haben sich zunächst einfache und relativ preiswerte Verfahren bewährt [26, 31, 32, 37]. Bei den angewandten chemischen [20, 22], mikrobiologischen [15] und chromatographischen Methoden [7, 11, 13, 19, 23, 25, 38] kommt es primär weniger darauf an, eine vollständige Trennung und sichere Identifizierung aller Komponenten zu gewährleisten als vielmehr Unregelmäßigkeiten jeder Art aufzudecken [26]. Im Gegensatz zu bekannten mikrobiologischen und chemischen Verfahren, die nur einzelne Aminosäuren erfassen, zeigt die chromatographische Auftrennung des Urins Veränderungen des gesamten Aminosäurespektrums an.

Alle bei der eindimensionalen Chromatographie auffälligen Befunde sind mittels zweidimensionaler chromatographischer Verfahren weiter abzuklären [26]. Neben der Papierchromatographie und der Hochspannungselektrophorese [1, 2, 9, 12, 30, 34] stehen dazu insbesondere dünn-schichtchromatographische Arbeitsweisen zur Verfügung: die zweidimensionale Dünnschichtchromatographie [4, 5, 10, 28, 29, 36] und die Kombination von Hochspannungselektrophorese mit aufsteigender Chromatographie [18, 24, 29, 39].

Bei der Auswahl der geeigneten Methoden für das klinische Laboratorium ist der Dünnschichtchromatographie der Vorzug zu geben. Die besten Trennergebnisse werden dabei auf Zellulose-Platten erzielt [3, 35].

Wir können über ein System von chromatographischen Verfahren berichten, das von der screeningmäßigen Erfassung bis zur sicheren Identifizierung der Aminosäuren reicht und nur an geringe technische Voraussetzungen gebunden ist. Dazu verwenden wir selbstgefertigte Zellulose-Platten mit einem Format von 20 × 20 cm. Die wäßrige Suspension des Zellulose-Pulvers FDN des VEB Niederschlagelages wird mittels eines Streichgerätes auf die sorgfältig gereinigten Glasplatten aufgetragen, und es entstehen nach 24-stündiger Lufttrocknung gut haftende Schichten. Das Untersuchungsmaterial tragen wir mit Hilfe einer selbst entwickelten Apparatur [24, 25] punktförmig in einem Durchmesser von maximal 2 mm am gewünschten Startpunkt auf.

1. EINDIMENSIONALE CHROMATOGRAPHIE

(Ausführliche Angaben siehe [25])

Zur screeningmäßigen Untersuchung der Patienten unserer Klinik auf Hyperaminoacidurien verwenden wir ein eindimensionales chromatographisches Verfahren. 2 μ l und 10 μ l einer möglichst frischen Urinprobe werden 2 cm vom Unterrand der Platte entfernt aufgetragen. Der Abstand der Startpunkte voneinander beträgt 1 cm; somit können auf einer Zellulose-Platte vom Format 20 × 20 cm, 9 × 2 Proben gleichzeitig analysiert werden. Die Chromatographie erfolgt aufsteigend 3 × 14 cm hoch mit dem Lösungsmittel

n-Butanol: Azeton: Eisessig: Wasser
35 : 35 : 10 : 20 (V/V)
bei Kammersättigung.

Mit der beschriebenen Arbeitsweise ist es möglich, im Nativurin bis zu 17 Banden von Aminosäuren bzw. Aminosäuregruppen abzugrenzen (Abb. 1). Vergleichsuntersuchungen mit zweidimensionalen Verfahren weisen übereinstimmende Ergebnisse auf und bestätigen damit die Aussagekraft dieser Methode.

Bei einer aufgetragenen Urinmenge von 10 μ l trennen sich vorzugsweise die schnell wandernden Aminosäuren. Im Bereich zwischen den basischen Aminosäuren und Alanin kommt es dagegen nicht selten infolge Überlagerung der Banden zu einer mehr oder weniger homogenen Anfärbung. Bei der Chromatographie von 2 μ l

Urin lassen sich auch hier einzelne Aminosäuren bzw. Aminosäuregruppen eindeutig identifizieren. Sehr gut ist dies auf Abb. 2 zu erkennen.

um den in der beschriebenen Weise aufgearbeiteten Urin eines Patienten mit Cystinurie. Bereits durch die eindimensionale Trennung konnte mit

Aufsteigende Chromatograph, 3 × 14 cm hoch
Lösungsmittelgemisch: n-Butanol:Azeton:Eisessig:Wasser
35 : 35 : 10 : 20

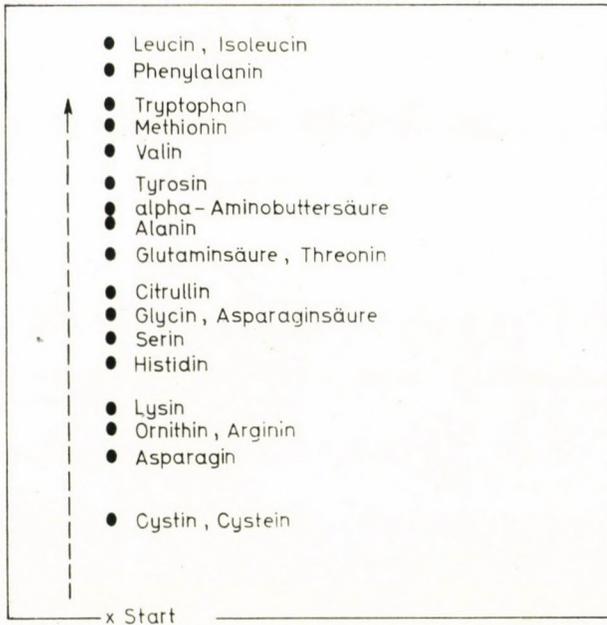


ABB. 1. Fleckenkarte der eindimensionalen aufsteigenden Chromatographie mit dem Lösungsmittel n-Butanol:Azeton:Eisessig:Wasser (35 : 35 : 10 : 20)

Am linken Startpunkt sind jeweils 10 μ l und am rechten 2 μ l der gleichen Urinprobe chromatographiert worden. Während es bei der größeren Substanzmenge im Bereich der Proben II, III, V und VI im unteren und mittleren Bereich zu keiner befriedigenden Trennung kommt, lassen sich eindeutige Banden bei der Verarbeitung von 2 μ l Urin erkennen.

Ein pathologisches Chromatogramm zeigt Abb. 3. Es handelt sich dabei

großer Wahrscheinlichkeit die Diagnose gestellt werden. Sie wurde später durch die Analyse eines entfernten Nierensteines endgültig gesichert.

2. ZWEIDIMENSIONALE CHROMATOGRAPHIE

Zur genauen Identifizierung der ausgeschiedenen Aminosäuren sind zweidimensionale Methoden erforderlich. Wir benutzten dazu die Kombination von Hochspannungselektro-

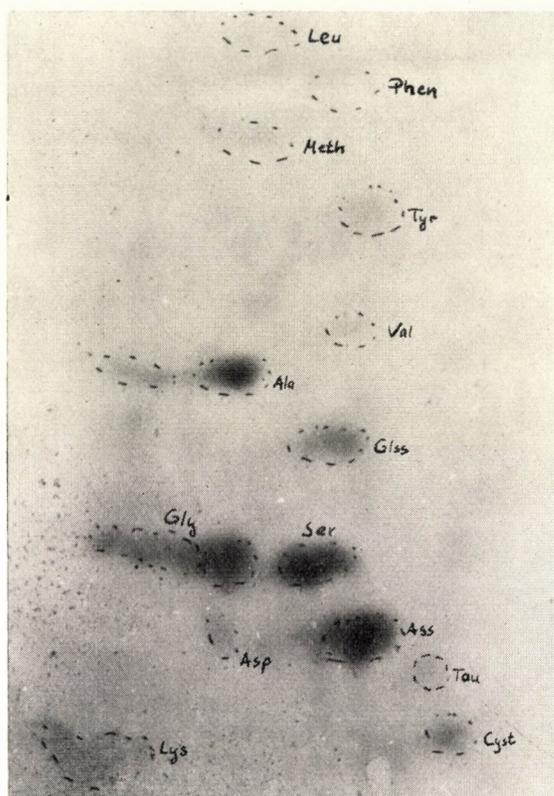


ABB. 2. Eindimensionale Chromatographie von 8 verschiedenen Urinproben.
Erläuterung siehe Text

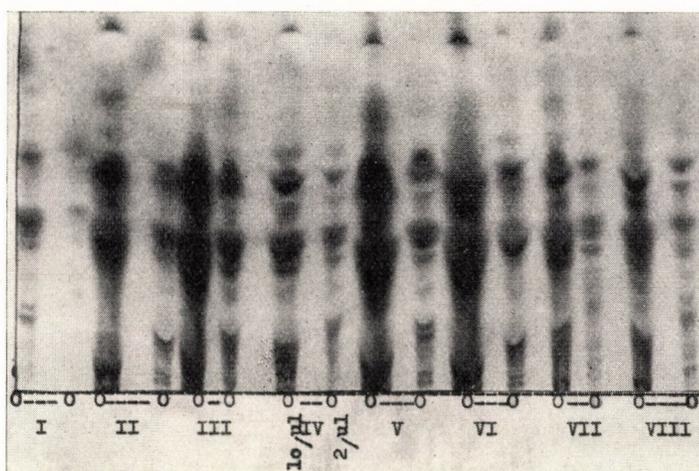


ABB. 3. Eindimensionale Chromatographie des Urins eines Patienten mit Cystinurie

phorese mit aufsteigender Chromatographie sowie die zweidimensionale Lösungsmittelchromatographie.

2.1. Hochspannungselektrophoretisch-chromatographische Trennung der Aminosäuren

(Methodische Einzelheiten siehe [24])

Die Kombination von Hochspannungselektrophorese mit aufsteigender Chromatographie ist zwar an gewisse technische Voraussetzungen gebunden, bietet aber neben sehr guten Trennergebnissen u. a. den Vorteil, daß eine Entsalzung des aufzuarbeitenden Materials nicht erforderlich ist. Im elektrischen Feld werden die Elektrolyte aufgrund ihrer Wanderungsgeschwindigkeit von den höhermolekularen Verbindungen abgetrennt. Aminosäureverluste infolge der üblichen Entsalzungsmethoden werden somit vermieden.

Nach Auftragen der Urinprobe (in der Regel 10 μ l bis 30 μ l) erfolgt die Hochspannungselektrophorese mit einem sauren Puffer (pH 1,6), bestehend aus 85%iger Ameisensäure, Eisessig und Wasser (15 : 15 : 125).

Die Entwicklungsdauer beträgt bei einer Spannung von 50 V/cm (= 1000 V) und einer Stromstärke von 18–20 mA 20 Minuten. In dieser Zeit sind die basischen Aminosäuren vom Startpunkt auf der Anoden-Seite der Platte zum kathoden-nahen Rand gewandert. Spannung und Stromstärke sind so gewählt, daß es bei guter Trennung der Aminosäuren zu einer maximalen Erwärmung der Zellulose-Platte auf 30–40°C kommt.

Unter diesen Bedingungen sind die Ergebnisse ohne erforderliche Kühlung sehr gut reproduzierbar.

Im Anschluß an die Hochspannungselektrophorese erfolgt die aufsteigende Chromatographie mit dem bereits genannten Laufmittel n-Butanol : Azeton : Eisessig : Wasser (35 : 35 : 10 : 20) durch zwei Läufe (jeweils 18 cm hoch).

Durch die Kombination von Hochspannungselektrophorese mit der Lösungsmittelchromatographie konnten wir bisher 28 getestete ninhydrinpositive Substanzen voneinander abtrennen (Fleckenkarte siehe Abb. 4). Besonders erwähnenswert ist die eindeutige Trennung von Cystin und den

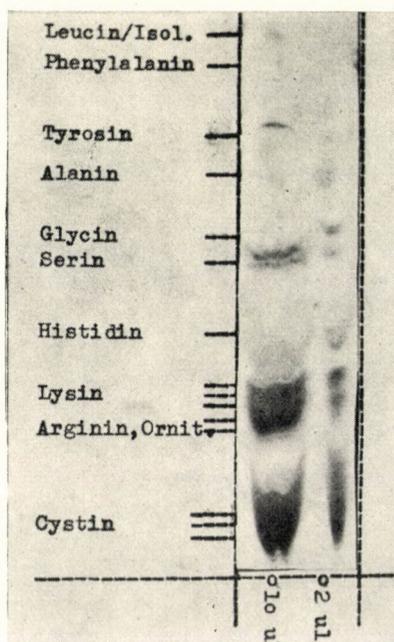


ABB. 4. Fleckenkarte der hochspannungselektrophoretisch-chromatographischen Aminosäuretrennung. 1. Dimension : Hochspannungselektrophorese, 2. Dimension : aufsteigende Chromatographie

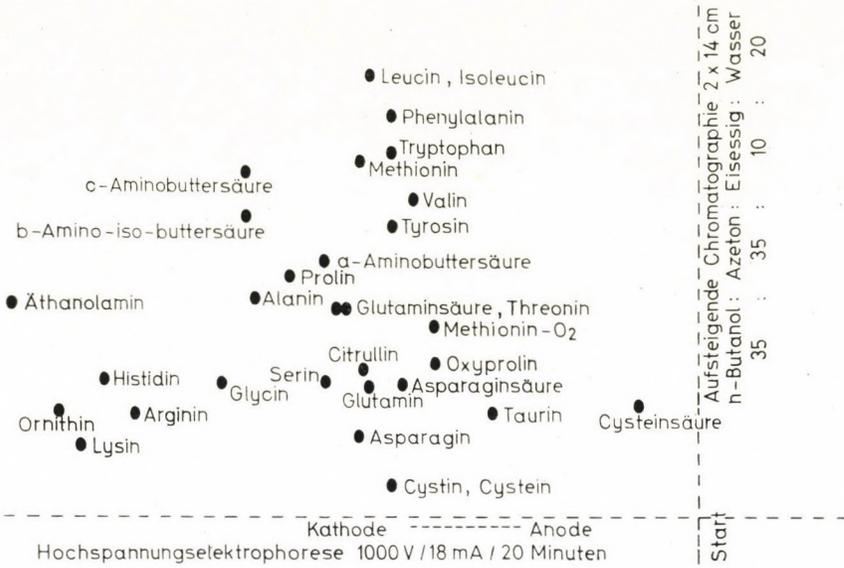


ABB. 5. Hochspannungselektrophoretisch-chromatographische Trennung von 20 µl Urin einer 12jährigen Patientin mit Dermatomyositis

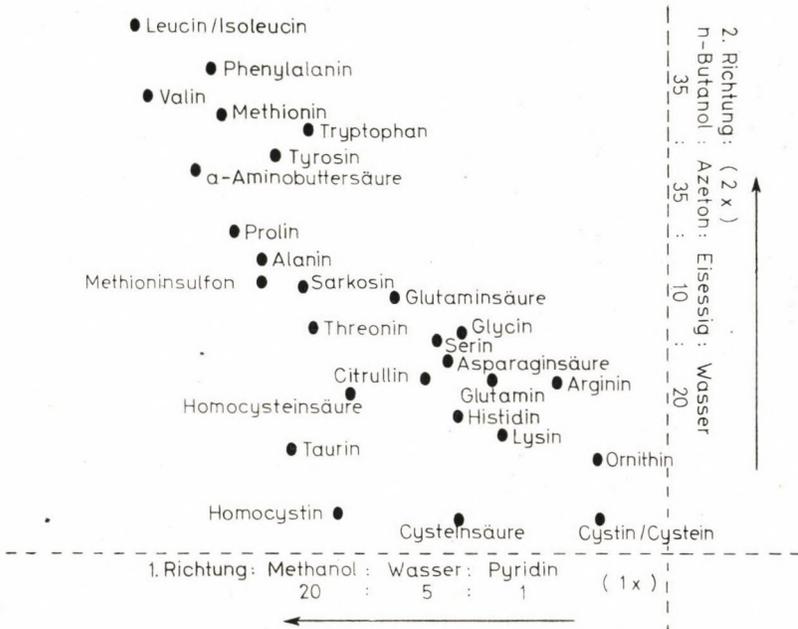


ABB 6. Fleckenkarte der zweidimensionalen Chromatographie

basischen Aminosäuren bzw. von Glycin, Serin (Abb. 5) und Asparaginsäure.

2.2 Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie

Da in der Regel eine Methode nicht ausreicht, um die im Urin ausgeschiedenen ninhydrinpositiven Substanzen sicher einzuordnen, erweist sich ein weiteres Verfahren von grossem Nutzen. Bei uns hat sich hierfür die zweidimensionale aufsteigende Chromatographie mit folgenden Lösungsmittelgemischen bewährt:

1. Dimension:

Methanol : Wasser : Pyridin
(20 : 5 : 1 (V/V)), 1 × 18 cm hoch

2. Dimension:

n-Butanol : Azeton : Eisessig : Wasser
(35 : 35 : 10 : 20) 2 × 16 cm hoch.

Um einwandfreie Trennergebnisse zu erhalten, läßt sich eine vorherige Entsalzung des Urins nicht in allen Fällen vermeiden. Wir benutzen dazu 5 cm lange und 9 mm starke, mit Wofatit KPS (Korngröße 0,1 mm) gefüllte Säulen. Zur Entsalzung werden 5 ml Urin mit einem pH-Wert zwischen 5 und 6 benötigt. Nach Entfernung der Elektrolyte mit 20 ml destilliertem Wasser werden die Aminosäuren mit 20 ml 12,5%iger Ammoniaklösung eluiert. Die Säule steht nach Regenerierung erneut zur Verfügung. Die Fleckenkarte ist in Abb. 6 dargestellt. Es ist ersichtlich, daß sich die meisten der im Urin ausgeschiedenen Aminosäuren gut trennen lassen (siehe Abb. 7, Hyperaminoacid-

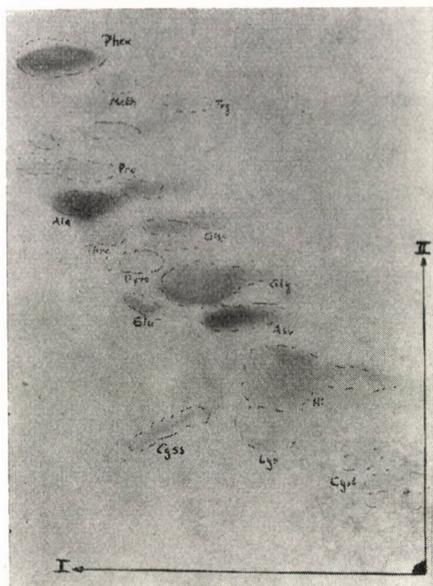


ABB. 7. Zweidimensionale Chromatographie von 20 µl entsalztem Urin eines Säuglings mit Phenylketonurie. 1. Dimension : Methanol : Pyridin : Wasser (20:5:1); 2. Dimension : n-Butanol : Azeton : Eisessig : Wasser (35:35:10:20)

urie bei Phenylketonurie). Während Glycin und Serin bzw. basische Aminosäuren und Cystin hochspannungselektrophoretisch besser zu identifizieren sind, lassen sich mit der beschriebenen zweidimensionalen Chromatographie u. a. Glutaminsäure und Threonin trennen.

DISKUSSION

Dem heutigen Stand unserer Kenntnisse entsprechend muß die Diagnose von Störungen im Aminosäurestoffwechsel bereits im prämorbidem Stadium erfolgen, d. h. zu einem Zeitpunkt, an dem klinische Symptome der Erkrankungen noch nicht manifest sind. Dies ist nur durch eine screeningmäßige Erfassung größerer

Personenkreise, insbesondere sämtlicher Neugeborener möglich.

Auch bei erworbenen akuten und chronischen Krankheiten sind Hyperaminoacidurien keine Seltenheit, und der Nachweis pathologischer Aminosäureausscheidungen kann wesentlich zur Diagnostik der verschiedenen Krankheitsbilder beitragen. Um grössere Personenkreise auf Hyperaminoacidurien untersuchen zu können, ist ein gestaffeltes System von Untersuchungsmethoden erforderlich: Ein zeit- und materialsparender Suchtest wählt die auffälligen Proben aus, und diese werden mittels anderer Verfahren weiter analysiert.

Die besten Voraussetzungen für eine orientierende Untersuchung bietet unseres Erachtens die eindimensionale Dünnschichtchromatographie: Sie ist technisch sehr einfach durchzuführen, einwandfrei reproduzierbar, erfordert keinen Aufwand bei der Vorbereitung des Materials, und die Auswertung der Chromatogramme bereitet nach kurzer Einarbeitungszeit keinerlei Schwierigkeiten. Durch die Analyse von Nativurin werden mit der Entsalzung eintretende Aminosäureverluste vermieden. Im Gegensatz zu den bekannten chemischen [20, 22] und mikrobiologischen Verfahren [15] erfaßt sie das ganze Spektrum der Aminosäuren, und Abweichungen von der Norm sind leicht zu erkennen.

Die von uns zur weiteren Analyse beschriebenen zweidimensionalen Methoden ergänzen sich vorzüglich: Trennungen von Aminosäuren, die mit dem einen Verfahren nur ungenügend zu erreichen sind, lassen sich

mittels des anderen gut realisieren. Dies ist u. a. an den Beispielen von Glycin/Serin, Glutaminsäure/Threonin und Cystin/basische Aminosäuren zu erkennen.

Als Nachteile haften der Hochspannungselektrophorese die erforderlichen apparativen Voraussetzungen und der zweidimensionalen Chromatographie die eventuell notwendige Entsalzung des Materials an. Da letztere bei der Analyse von Neugeborenenurin nicht unbedingt nötig ist, empfiehlt sich diese Methode vorzugsweise zur näheren Abklärung auffälliger eindimensionaler Chromatogramme in diesem Lebensalter.

Die Bedeutung einer routinemäßigen Untersuchung auf Hyperaminoacidurien unterstreichen die Ergebnisse, die wir innerhalb relativ kurzer Zeit bei Untersuchungen von ca. 700 Neuaufnahmen unserer Klinik erzielten. In etwa 30 Fällen fanden sich bei der eindimensionalen Chromatographie abnorme Befunde. Durch weitere Aufarbeitung des entsprechenden Materials konnten wir in 10 Fällen allgemeine Hyperaminoacidurien bei verschiedenen Grundkrankheiten, in 4 Fällen eine betonte Ausscheidung einzelner Aminosäuren im Sinne eines angeborenen Defektes feststellen. Bei 5 Kindern wurden pathologische Befunde durch die Exkretion ninhydrinpositiver Substanzen unter medikamentöser Behandlung vorgetäuscht. In den übrigen Fällen waren mittels zweidimensionaler chromatographischer Analyse keine pathologischen Veränderungen festzustellen.

LITERATUR

1. ANTENER, I.: Biochemische Untersuchungen bei erblichen Aminosäurestoffwechselstörungen in der Pädiatrie. *Z. klin. Chem.* **7**, 427 (1969).
2. ANTENER, I., BURI, J. F.: Electro-phorèse sous haut voltage. *Ann. Biol. clin.* **21**, 427 (1963).
3. ARX, E., NEHER, R.: Eine multidimensionale Technik zur chromatographischen Identifizierung von Aminosäuren. *J. Chromatography* **12**, 329 (1968).
4. BERG, W.: Die Dünnschichtchromatographie von Urin zur Erkennung angeborener Erkrankungen des Aminosäurestoffwechsels. *Mschr. Kinderheilk.* **116**, 425 (1968).
5. BLENNEMANN, H.: Dünnschichtchromatographische Diagnose von Störungen im Aminosäurestoffwechsel. *Pädiat. Prax.* **9**, 99 (1970).
6. BREMER, H. J., MARX, D., NÜTZENADEL, W., BICKEL, H.: Die Dünnschichtchromatographie von Aminosäuren im Urin. *Klin. Wschr.* **48**, 682 (1970).
7. BREMER, H. J., NÜTZENADEL, W., BICKEL, H.: Dünnschichtchromatographische Methoden zur Erkennung von Aminoacidurien, Aminoacidämien sowie der Galaktosämie. *Mschr. Kinderheilk.* **117**, 32 (1969).
8. BUJARD, E. L., MAURON, J.: A two dimensional separation of acid, neutral and basic amino acids by thin layer chromatography on cellulose. *J. Chromatography* **21**, 19 (1966).
9. CLOTTEN, R., CLOTTEN, A.: Hochspannungselektrophorese. Thieme-Verlag, Stuttgart 1962.
10. CRAWHALL, J. C., SAUNDERS, E. P., THOMPSON, C. J.: Heterozygotes for cystinuria. *Ann. hum. Genet.* **29**, 257 (1966).
11. DITTMANN, J.: Phenylketonurie, Nachweis durch Dünnschichtchromatographie von Serumproben. *Arch. Kinderheilk.* **177**, 6 (1968).
12. EFRON, M. L., AMPOLA, M. G.: The aminoacidurias. *Ped. Clin. N. Amer.* **14**, 881 (1967).
13. EFRON, M. L., YOUNG, D., MOSER, H. W., MCCREADY, R. A.: A simple chromatographic screening test for the detection of disorders of amino acid metabolism. *New Engl. J. Med.* **270**, 1387 (1964).
14. FRANKE, R., THIELE, K.: Physikalisch-chemische Methoden im klinischen Laboratorium Bd. I, S. 234 ff., Volk und Gesundheit, Berlin 1969.
15. GUTHRIE, R., SUSI, A.: A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* **32**, 338 (1963).
16. HAMILTON, P. B.: The significance of sensitivity and resolution in ion-exchange chromatographic determination of amino acids in biological fluids. *Clin. Chem.* **14**, 535 (1966).
17. HELLMANN, H.: Ein einfaches zuverlässiges Gerät für aufsteigende und absteigende Papierchromatographie. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **288**, 95 (1951).
18. HONEGGER, C. G.: Dünnschicht-Ionophorese und Dünnschicht-Ionophorese-Chromatographie. *Helv. chim. Acta* **44**, 173 (1961).
19. IRTEL, VON BRENNENDORF, A., HAGGE, W.: Erfahrungen mit einem neuen Aminosäureanalysator für Schnellanalysen. *Mschr. Kinderheilk.* **118**, 417 (1970).
20. KNAPP, A.: Genetische Störungen im Aminosäurestoffwechsel und deren Diagnose. Vortrag auf der Tagung der Gesellschaft f. Pädiatrie der DDR, Erfurt 1969.
21. KRAFFCZYK, F., HELGER, R.: Die Dünnschichtchromatographie der Aminosäuren im Harn auf Zweischichtenplatten. *Z. analyt. Chem.* **243**, 536 (1968).
22. LUBS, L., KNAPP, A.: Siebtestung genetischer Stoffwechselanomalien unter besonderer Berücksichtigung von Störungen im Aminosäurestoffwechsel mit chemischen Methoden. *Z. ärztl. Fortbild.* **64**, 516 (1970).
23. MARKWARDT, H.: Veränderungen im Aminosäurestoffwechsel bei Marinescu-Sjögren-Syndrom. Diss. Leipzig 1964.
24. MENZEL, K., KOSLOWSKI, H., WEDEKIND, U., JUNG, G., FIEHRING, CH.: Hochspannungselektrophoretisch-chromatographische Trennung von Aminosäuren auf Cellulose-Dünnschichtplatten (im Druck).
25. MENZEL, K., KOSLOWSKI, H., WEDEKIND, U., JUNG, G., FIEHRING, CH.: Eindimensionale Dünnschichtchromatographie auf Zellulose-Platten — ein einfacher Suchtest auf Hyperaminoacidurien (im Druck).
26. NIEDERWIESER, A., CURTIUS, H. CH.: Aminosäureanalyse in der klinischen Chemie. *Z. klin. Chem.* **7**, 404 (1969).
27. OEPEN, H., OEPEN, I.: Vergleich der Aminosäurespektren unterschiedlich entweißter Blutseren. *Klin. Wschr.* **41**, 921 (1963).
28. PATAKI, G.: Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptidchemie. Walter de Gruyter, Berlin 1966.

29. PATAKI, G.: Papier-, Dünnschicht- und Elektrophoretographie von Aminosäuren in biologischem Material. *Z. klin. Chem.* **2**, 129 (1964).
30. POSPISIL, R., HRSTKA, V.: Stanovení aminokyselin v dětské stolici vysokovoltovou elektrophoresou a chromatografií. *Cs. Ped.* **23**, 556 (1968).
31. SCRIVER, C. R.: Hereditary aminoaciduria. In: A. G. Steinberg, A. G. Bearn (Herausg.): *Progress in medical genetics*, Grune & Stratton, New York 1968, pp. 83–186.
32. SCRIVER, C. R.: Screening newborns for hereditary metabolic disease. *Ped. Clin. N. Amer.* **12**, 807 (1965).
33. SIEMENS, H., MÖNCH, E.: Hyperaminoacidurie in der Pädiatrie. Ein halbautomatischer Suchtest auf angeborene Stoffwechselkrankheiten. *M Schr. Kinderheilk.* **113**, 145 (1970).
34. SMITH, I.: *Chromatographic and electrophoretic techniques*. Heinemann, London—New York 1960, Vol. I., P. 98.
35. SMITH, I., RIDER, L. J., LERNER, R. P.: Chromatography of amino acids, indoles and imidazoles on thin layer of Avicel and cellulose and on paper. *J. Chromatography* **26**, 449 (1967).
36. STAHL, E.: *Thin-layer chromatography*. Academic Press, New York 1965.
37. THALHAMMER, O.: Testprogramm zur Früherfassung angeborener Stoffwechselerkrankungen. *M Schr. Kinderheilk.* **117**, 37 (1969).
38. TODOROV, J.: *Klinische Laboratoriumsuntersuchungen im Kindesalter*. Volk und Gesundheit, Berlin 1970. S. 175 ff.
39. TROUGHTON, W. D., BROWN, R. ST. CL., TURNER, N. A.: Separation of urinary amino acids by thin layer high voltage electrophoresis and chromatography. *Amer. J. clin. Path.* **46**, 19 (1966).

DR. K. MENZEL
 Am Schwemmbach 32a
 50 Erfurt, DDR