

ASSANDAN KÂĞIT KROMATOĞRAFİSİ İLE KOMBİNE -YÜKSEK VOLTAJ ELEKTROFOREZ TEKNİĞİNİN AMİNO ASİTLERİN KALİTATİF VE KANTİTATİF ANALİZLERİNDE KULLANILMASI(x)

Dr. Tevfik Aslan AKSU(xx)
Dr. Gökhan TİMURALP (xxx)
Dr. Selma ÇEKİRDEK(xxxx)
Dr. Ediz TEKİN(xxxxx)

ÖZET

Bu çalışmada amino asitler iki fazlı bir ayırma tabii tutulmuşlardır. Birinci fazda yüksek voltaj Elektroforez tekniği kullanılmış ve amino asitler elektriksel yüklerine göre yatay pozisyonda anottan katoda doğru uzanan bir hat üzerinde yer almışlardır. İkinci faz olarak uygulanan assandan kromatografisi ile de amino asitlerin, dikey istikamette çeşitli mesafeleri katetmeleri sağlanmıştır. Ninhidrin ve sabit boya -ile boyanan amino asitler, uygun tekniklerle kalitatif ve kantitatif olarak değerlendirilmişlerdir.

1. Giriş :

Muhtelif vücut sıvılarındaki amino asitlerin kalitatif ve kantitatif olarak analizleri, günümüzde sıklıkla ihtiyaç duyulan laboratuvar muayenelerindedir. Özellikle kolon ve gaz kromatografisi tekniklerinin kullanılması ile

bu gün için amino asitlerin tayinleri çok kolaylaşmıştır. Ancak bu teknikler pahalı ve idamesi güç aletlerin mevcudiyetine ihtiyaç gösterirler. Oysa Ülkemizdeki şartlar nisbeten ucuz, uygulanması kolay ve akademik çalışmalara

(x) Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Bölümü çalışmalarından.

(xx) Çocuk sağlığı ve Hastalıkları Doçenti, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Bölümü Öğretim Üyesi.

(xxx) Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Uzmanı, Biyokimya Asistanı.

(xxxx) Biyokimya Asistanı.

(xxxxx) Biyokimya Uzmanı.

temel teşkil edecek derecede güvenli araştırma metodlarının uygulanmasını gerektirmektedir. Yüksek voltaj elektroforezi ve bununla kombine kromatografi tekniği diğer ülkelerde uzun süredir başarı ile uygulanmaktadır(1). Yazımızda, Ülkemiz şartlarına uygun bulduğumuz bu metodun Bölümümüzde amino asitler için tatbikatı sırasında elde edilen tecrübe ve bulgular takdim edilecektir.

2. Materyel ve Metod :

Bu çalışmada muhtelif kaynaklı (idrar, serum, ön kamera sıvısı) vücut sıvıları analiz edildi.

Amino asitlerin analizi iki fazlı olarak yapıldı.

1. Faz, Yüksek voltaj elektroforezi:

Bu faz için GAMAG Firması tarafından imal edilmiş yüksek elektroferez cihazı kullanıldı(2). Uygulama sırasında kullanılan tampon solüsyonu asit pH'da olup (pH : 1,9).

Formic acid 80 ml.
Asetik acid 320 ml.(A tamponu)
Distile su 4 litre
oluşumunda idi.

2. Faz. Assandan kâğıt kromatografisi:

Bu faz da klâsik assandan kâğıt kromatografisi yapıldı. Kullandığımız solvent

Butanol 180 ml. (B solventi)
Asetik asit 45 ml.
Distile su 75 ml. den meydana gelmişti.

Amino asitler ninhidrinle boyandı.

Bu amaçla 400 mg. ninhidrin 200 ml. aseton içinde çözüldü. Lekelerin sabitleştirilmesi için de :

HNO₃ % 10 luk 0,1 ml.

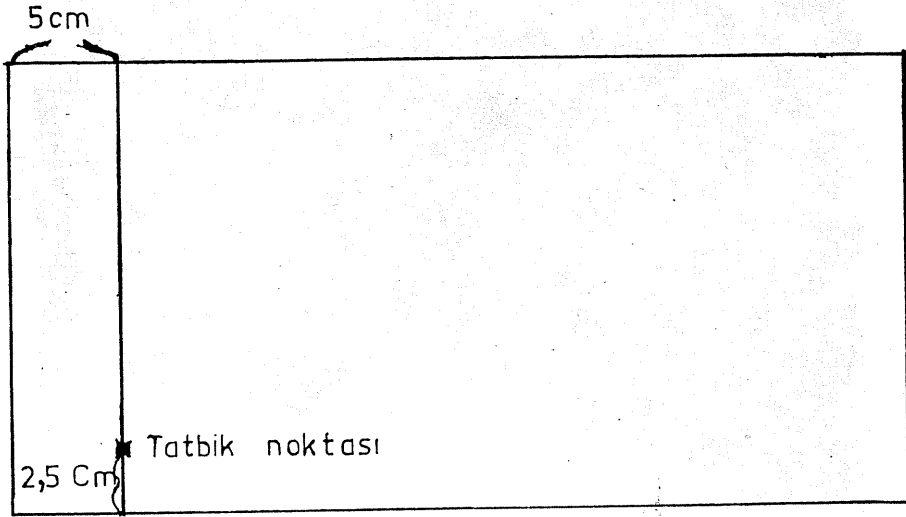
CuNO₃ (Satüre) 1 m. (C. solüsyonu)
Ethanol % 96 lık 100 ml.
kullanıldı.

Uygulama : Biz çalışmalarımızı genellikle idrarla yaptık. İdrar doğrudan doğruya uygulandı. Ancak protein ihtiva eden idrarların ve diğer vücut sıvılarının uygun usullerle deproteinize edilmesi gerekmektedir.

Uygulama için 20 x 40 cm. boyutlarında Schleicher Schuel (2043 B) kromatografi kâğıtları kullanıldı. Kâğıdın, şekil 1 de görüldüğü gibi sol alt köşesine çoklukla 10 mikro litre idrar tatbik edildi. İdrar gayet ufak porsiyonlar halinde (0,5 mikro litre kadar) ve bir sıcak hava kurutucusunun yardımıyla kâğıda halka şeklinde emdirildi. Bundan sonra kromatografi kâğıdı A tamponu ile ıslatıldı ve bu sırada idrarın uygulandığı kısma tamponun gayet yavaş bir şekilde tatbikine dikkat edildi. Fazla tampon filtre kâğıtları arasında emdirilerek alındıktan sonra kromatografi kâğıdı yüksek voltaj elektroferez cihazında 3100 voltta yarım saat tutuldu.

Yüksek voltaj elektroforezini takiben, B solventi içinde 15 saat süreli assandan kâğıt kromatografisi yapıldı. İkinci faz da bu şekilde-tamamlandıktan sonra kâğıt önce ninhidrinle ve bunu katiben C solüsyonu ile boyandı ve değerlendirmeye geçildi.

Değerlendirme : İki kademede yapıldı. Kalitatif değerlendirme için önce 22 ayrı standardın, iki fazlı uygulama sonucu kromatografi kâğıdı üzerindeki yerleri tesbit edildi. Bilinen amino asitler bu şekilde-lokalize edildikten sonra kıyaslama sureti ile örneklerdeki bilinmeyenlerin idantifikasyonu yapıldı.



Kromatografi kâğıdı (20 × 40 cm)

Şekil 1. Numunenin kromatografi kâğıdına tatbik ediliş şekli

Biz kantitatif-değerlendirmeyi normal idrar amino asitlerinde yaptık. Bu iş için metodun tek fazlı olarak uygulanması-yeterli oldu. Zira normal idrarda mevcut amino asitler sadece yüksek voltaj elektroforezinin tatbikati ile saf lekeler vererek ayrıldılar. Bu lekeler bir dansitometrede (Densicord, Photovolt-Corp) değerlendirildi ve uygun standartların yardımıyla miktar tayini yapıldı.

3. Bulgular :

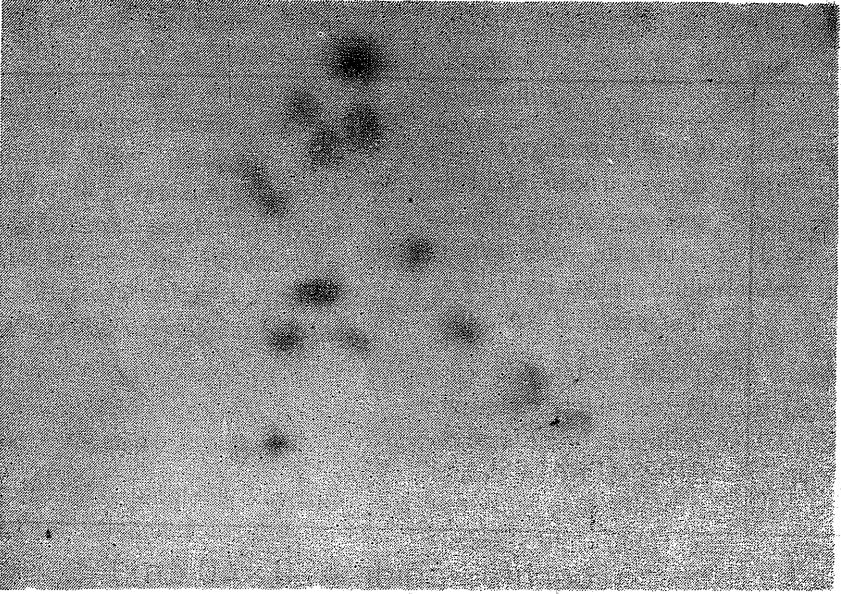
21 amino asit ve 1 glutation standardı ile elde edilen amino asit haritası şekil 2 ve şekil 3 de görülmektedir. 22 değişik standart uygulanmasına rağmen gözle görülebilen leke adedi 16 dır. Bu durum bazı amino asitlerin ninhidrin ile iyi boyanmamaları ve birden fazla amino asidin aynı yerde lokalize olmaları ile ilgilidir. Nitekim sistein,

sitrülin ve hidroksiprolin ninhidrinle iyi bir şekilde boyanmadılar. Ayrıca lösin-isolösin ve aspartik asit-asparagin-glutamin birbirlerine çok yakın olarak leke verdiler.

Amino asitlerin lokalizasyonlarını standardize etmek amacı ile bütün amino asitlerin alanine göre, dikey ve yatay istikamette Rf değerleri hesaplandı ve sonuçlar tablo I de takdim edildi.

4. Tartışma :

Kanımızca assandan kâğıt kromatografisi ile kombine yüksek elektroforezi, amino asitlerin analizi yönünden ucuz ve güvenilir bir methoddur. Yüksek voltaj elektroforez cihazı, dansitometre, kullanılan reaktifler piyasadan kolayca temin edilebilirler. Yüksek voltaj elektroforez cihazı amino asitlerden başka, indollü bileşiklerin, porfirinlerin, karbohidratların, vitaminle-



Şekil 2. 21 amino asit ve glutation'a ait 2 fazlı kromatogram

rin ve pürinlerin separasyonunda başarı ile kullanılabilir. Aletin çok yönlü oluşu, maliyetini daha da ucuza getirebilecek bir niteliğidir.

Bu araştırma metodunda yüksek voltaj elektroforez tekniğinin assandan kromatografiden önce kullanılması, örnekteki inorganik maddelerin ortamdandan uzaklaştırılması (desalting) yönünden çok yararlıdır. Böylelikle cansıkıcı ve zaman alıcı desalting metodlarının kullanılmasına lüzum kalmamıştır.

Metodun süresi yönünden münakaşası yapılırsa; çift faz uygulandığında bir nümunenin analizi 1,5 gün sürmektedir. Ancak modern araştırma merkezlerinde amino asitlerin tayini için uygulanan, kolon veya gaz kromatografisi tekniklerinin de süresi bu metoddaki uygulamadan pek fazla kısadır. Üstelik sadece 1. fazın uygulanması kaydı ile 20x40 cm. ebadındaki bir kromatografi kâğıdında 4 ayrı nümunenin bir arada analizi

mümkündür. Bu usül özellikle tarama çalışmaları için çok yararlıdır. Böylece normal patern gösteren örnekler süratli bir şekilde ayıklanabilir. Anormal özellik gösteren örnekler işe, 2 fazlı çalışma uygulanarak ayrıntılı bir şekilde incelenebilir.

Amino asitlerin lokalizasyonunu standardize etmek gayesi ile muayyen bir aminoaside göre Rf değerlerinin tesbiti kanaatimizce metodun üniversal olabilecek bir yönünü teşkil eder. Nitekim başka araştırmacıların da pH: 1,9 da yaptıkları çalışmalarda alanine göre elde ettikleri Rf değerleri bizimkilerin aynıdır, Tablo II. Şu halde, tampon solüsyonun ve 2. faz solventinin terkiplerinin aynı kalması şartı ile metod hangi değişik şartlarda (farklı kromatografi kâğıdı, farklı gerilim ve süre) tatbik edilirse edilsin alanine göre elde edilen Rf değerleri aynı bulunacaktır.

Kromatogramda beliren lekelerin kantitasyonu, kanımızca en güvenilir olarak elüsyonla yapılabilir. Fakat bi-

21 AMINO ASIT STANDARDI VE GLUTATHION'A AIT KROMATOGRAM

1.faz F/F/AA/Su

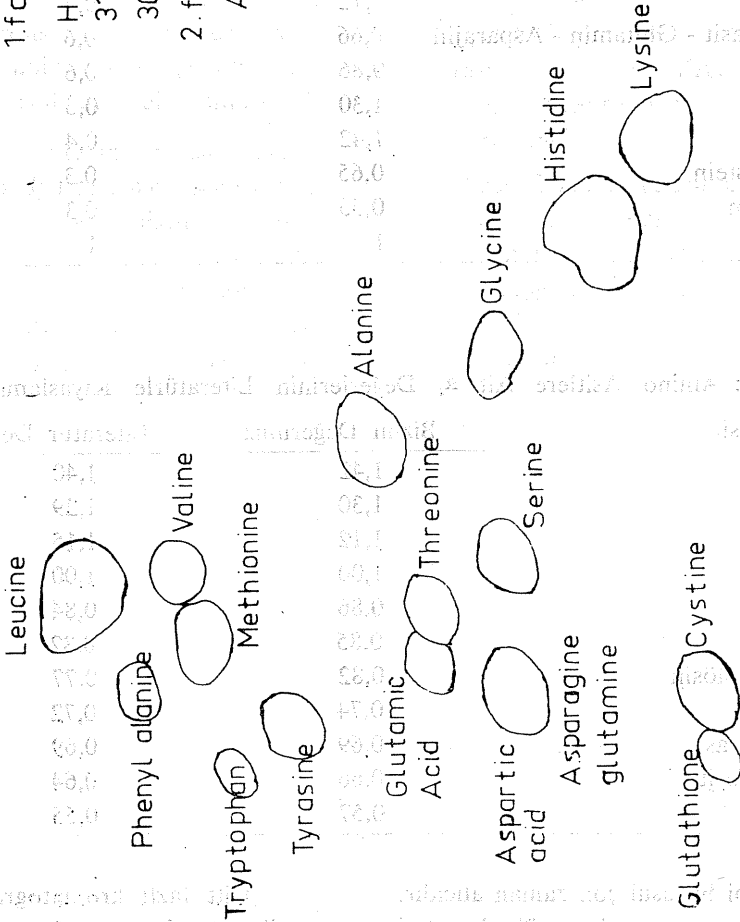
HVE

3100 Volt

30 dakika

2. faz B/AA/Su

Assendan kromatografi



Şekil 3. 21 amino asit standardı ve glutathion'a ait 2. fazlı kromatogram (Orijinal kromatografi kağıdından şematik olarak düzenlenmiştir).

Tablo I: Muhtelif Amino Asitlerin Alanine Göre R_f Değerleri

	Yatay İstikamette	Dikey İstikamette.
Lösün - İzölösün	0,82	1,5
Fenil-alanin	0,67	1,4
Valin	0,86	1,3
Triptofan	0,54	1,2
Metiyonin	0,74	1,3
Tirozin	0,57	1,1
Glutamik asit	0,69	0,8
Tireonin	0,77	0,8
Glisin	1,12	0,7
Aspartik asit - Glutamin - Asparajin	0,66	0,6
Serin	0,86	0,6
Histidin	1,30	0,5
Lizin	1,42	0,4
Sistin, Sistein	0,65	0,3
Glutatiyon	0,55	0,3
Alanin	1	1

Tablo: II: Amino Asitlere Ait R_f Değerlerinin Literatürle Kıyaslaması

Amino Asit	Bizim Değerimiz	Literatür Değeri (1)
Lizin	1,42	1,40
Histidin	1,30	1,29
Glisin	1,12	1,15
Alanin	1,00	1,00
Serin	0,86	0,84
Valin	0,85	0,82
Lösün - İzölösün	0,82	0,77
Metiyonin	0,74	0,72
Glutamik asit	0,69	0,69
Aspartik asit	0,66	0,64
Tirozin	0,57	0,55

İndiği gibi bu usul çok zaman alıcıdır. Biz kantitasyonu, sadece yüksek voltaj elektroforezinin uygulandığı kromatogramlarda, dansitometre ile yaptık. Normal şahıslarda idrarla amino asit ekskresyonu incelemek amacıyla kullandığımız bu usul başarılı sonuç verdi(3).

Çift fazlı kromatogramlarda elde edilen lekeler, tek faza kıyasla daha soluk ve geniş olmalarına rağmen dansitometre ile ölçüme elverişli bulunmuşlardır. Ancak sonuçların daha güvenilir olması için dansitometrede ölçüm şartlarının daha değişik olması gerek-

lidir. Biz bölüm olarak mevcut aletimizi bu yönlü geliştirme çabası içerisindeyiz. Bu itibarla 2. fazdaki lekelerin densitometre ile değerlendirilmesi konusundaki fikrlerimizi bu sahada yeteri kadar çalışma imkânı elde ettikten sonra bildireceğiz.

Summary

The Application of High Voltage Electrophoresis and Ascendent Paper Chromatography on the Qualitatif and Quantitatif Evaluation of Amino Acids.

In this study, amino acids existing in various body fluids have been separated by using a two phase separation method. In first phase high voltage electrophoresis has been used and amino acids have localized horizontally on chromatography paper. As a second

phase, ascendent chromatography has been applied and this time, amino acids moved vertically. After staining with ninhydrin and dipping in fixation solution, a qualitatif and quantitatif evaluation has been made.

Kaynaklar :

1. Clotten, R., Clotten, A.: Hochspannungs Electrophorese. George Thieme Verlag, Stuttgart, 1962.
2. Instruction of CAMAG High Voltage Electrophoresis apparatus, HE-69-E.
3. Aksu, T.A., Timuralp, G., Çekirdek, S.: Üriner aminoasitlerin yüksek voltaj elektroforezi ve kâğıt kromatografisi ile kalitatif ve kantitatif olarak değerlendirilmesi. Neşredilecek.