

**Шээс болон цусан дахь амины хүчлийн агууламжийг тодорхойлох  
өндөр үзүүлэлтэт шингэний хроматографийн арга**

*Д.Хишигбуян, Ц.Энхжаргал, П.Гантуяа, Б.Содномцэрэн*

*Нийгмийн Эрүүл Мэндийн Үндэсний Төв*

Email: [khishigbuyan@ncph.gov.mn](mailto:khishigbuyan@ncph.gov.mn)

**Түлхүүр үг:** Амины хүчил (АХ), Өндөр үзүүлэлтэт шингэний хроматографи (ӨҮШХ), цус, шээс, фенилизотиоцианид (PITC), АХ-ийн дериватизаци

**Үндэслэл**

Амины хүчил (АХ)-ийн солилцооны алдагдлаас үүдэлтэй 90 гаруй төрлийн удамшлын эмгэг бүртгэгдсэн байдаг [1]. АХ-ийн солилцооны эмгэг нь тархины хөгжилд шууд нөлөөлдөг. Учир нь АХ уургийн найрлагад оролцох төдийгүй зарим АХ мэдрэлийн дамжуулагчийн үүргийг давхар гүйцэтгэдэг ба тиймээс АХ-ийн солилцооны эмгэгийн үед сэтгэн бодох чадвар буурах буюу оюуны хомсдолтой болох, өсөлт хөгжлийн хэвийн бус байдал илрэх, сохрох, дүлийрэх зэрэг үр дагавартай. Хэрэв АХ-ийн солилцооны удамшлын эмгэгийг эрт оношлон эмчлэхгүй бол цаашид тархины үхжилт үүсэх, саажилттай болох аюултай. Энэхүү эмгэг нь хүүхдэд тохиолдох удамшлын гаралтай өвчний багагүй хувийг эзэлдэг. Дэлхийн ихэнх улс орон АХ-ийн солилцооны эмгэгийн тархалтын түвшинг нарийвчлан тогтоосон байдаг ба нярай хүүхдийн биологийн шингэнд АХ-ийн солилцооны эмгэг байгаа эсэхийг тандалт шинжилгээгээр тогтмол хянаж байдаг байна. Иймээс АХ-үүдийн агууламжийг тодорхойлох нь уургийн хими болон клиник химийн салбарт өргөн хэрэглээтэй байдаг [2]. 1980-аад оны сүүлээр АХ тодорхойлдог сонгодог ион солилцооны хроматографийн аргыг түргэн,

илүү мэдрэмтгий, хямд өртөгтэй өндөр үзүүлэлтэт шингэний хроматографи (ӨҮШХ)-ийн аргаар сольсон [3].

**Зорилго**

Биологийн шингэнд ӨҮШХ-ийн аргаар амины хүчлүүдийг салган тодорхойлох

**Материал, арга зүй**

**Материал:** Бүх урвалж, бодис ӨҮШХ-ийн багажид зориулсан өндөр цэвэршилттэй, урвалж, бодис найруулах усыг Millipore Milli-Q water системийг ашиглаж нэрсэн усыг ионгүйжүүлэн хэрэглэсэн. Шинжилгээнд хэрэглэсэн уусмал, шээс болон цусны ийлдсийг Centrifree micropartition system ашиглаж ультрафильтраци явуулсан.

**Багаж, тоног төхөөрөмж:** Өндөр үзүүлэлтэт шингэний хроматографийн систем (Perkin Elmer, Flexar LC-6000) нь насос, температурын тохируулгатай колонк халаагч, хэт ягаан туяа-үзэгдэх гэрлийн детектор, C18 багана (ZORBAX Eclipse Plus, 3.0x250 мм, 5.0 микрон) болон хамгаалагч багана (ZORBAX Eclipse Plus, Guard Column)-аас тогтсон. Бүх ууршуулалтыг вакум ууршуулагчтай центрифугээр (GRV-m2.0-200) хийж гүйцэтгэсэн.

**Хроматографийн нөхцөл:**

Фенилизотиоцианид (PITC)-аар дериватизаци хийсэн АХ-ийг салгахад хоёр төрлийн градиент уусмал ашигласан. Үүнд: А-фазын уусмал буюу 0.050M натрийн ацетат (pH 5.1), ацетонитрил (98:2)-ын уусмал, Б-фазын

уусмал буюу ус, ацетонитрил (40:60)-ын уусмал [4]. РТС-ийн дериватизацийг салгахдаа (Хүснэгт 1)-д үзүүлсэн градиент уусмалын хамаарлын өгөгдлүүд нэг бүрийн урсгалын хурдыг 1.2 мл/мин байхаар программд тохируулж оруулсан.

**Стандарт уусмал:** АХ-ийн стандартуудыг 5 мМоль концентрацитай байхаар тооцож 1мМоль давсны хүчлийн уусмалд найруулсан. Стандарт уусмалын холимогийг 20, 50, 100, 200, 500, 750 болон 1000 мкл концентрацитай байхаар шингэрүүлсэн ба -80<sup>0</sup>С-т нэг жил хүртэл хадгалж болно. Дотоод стандарт буюу норлейциний уусмалыг 40 мкл концентрацитай байхаар тооцож мөн 1мМоль давсны хүчлийн уусмалд найруулсан.

**Дээж:** Цусны дээж цуглуулах: Хураагуур судаснаас ЭДТА-тай вакуум хуруу шилэнд цусаа цуглуулаад 1500g эргэлтийн хурдтайгаар 10-15 минут центрифугдэж, ялгасан ийлдэснээс 500мкл-ийг центрифугийн хуруу шил (Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter)-энд хийж 1500g эргэлтийн хурдтайгаар 30 минут центрифугдэж, шүүгдэж гарсан ийлдсийг авна. Ийлдсийг -80<sup>0</sup>С-д 1 сар хадгалж болно.

**Шээсний дээж цуглуулах:** Шээсний дээж цуглуулахдаа нэг удаагийн шээсний аяганд 10-30мл шээс аваад, бичил хуруу шилний 2/3 хүртэл байхаар шээсний дээжээс соруулан авч хийнэ. Шээсний дээжийг -80<sup>0</sup>С-д 1 сар хадгална.

**АХ-үүдийн дериватизаци:** Бичил хуруу шилэнд бэлтгэсэн дээж (дээж эсвэл стандарт) болон норлейцины дотоод стандарт уусмалуудаас ижил харьцаатайгаар авч холимог уусмал бэлтгээд, вакуум ууршуулагчтай центрифуг (Speed vac concentrator)-ээр хатаана. Хатаасан холимог дээр 10 мкл метанол-ус-триэтиламин (2:1:1)-

ы уусмалыг нэмж сайтар сэгсрээд, вакуум ууршуулагчтай центрифугт эргүүлэн хатаана. Дараа нь 20 мкл этанол-ус-триэтиламин-РТС (7:1:1:1)-ийн уусмал нэмж АХ-ийн дериватизацийг тасалгааны температурт 20 мин явуулна. Дериватизаци бүрэн явагдаж дууссаны дараа вакуум ууршуулагчтай центрифугээр хатаагаад, үлдэгдлийг 1000 мкл А-фазын (рН=7.5) уусмалд бүрэн уусгана. Уг уусмалыг 0.22 микроны филтрээр шүүж, ӨҮШХ-ийн багажаар шинжилнэ.

### Туршилтын явц, үр дүн

ӨҮШХ-ийн багажаар АХ-үүдийг тодорхойлоход баганын төрөл, хөдөлгөөнт фазын бүтэц, түүний орчин (рН), урсгалын хурд, хугацаа мөн градиент уусмал хамгийн их нөлөөлж байсан ба АХ-үүдийг тодорхойлоход хамгийн тохиромжтой хувилбарыг сонгон авах зорилгоор градиент уусмалын урсгалын хурд 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 ба 1.6 мин/мл гэсэн урсгалын хурдаар, натри ацетатын буфер уусмалын рН 4.8-7.5-ийн хооронд, ус ацетонитрилын холимогийг 42:48, 45:55, 42:58 гэсэн харьцаатайгаар найруулж туршилтууд тавив. Мөн 3 төрлийн багана (C18 ZORBAX Eclipse plus 3\*150мм, 3.5 микрон, pinnacle DB silica 4.6\*150мм, 3 микрон, C18 ZORBAX Eclipse plus 3\*250мм, 5.0 микрон)-ыг ашиглан АХ-ийг салгах туршилтыг явуулахад градиент уусмалын урсгалын хурд, уусмалын орчин, уусмалын харьцаа болон баганын төрлүүд нь өөр өөрийн давуу мөн сул талуудтай байлаа.

Жишээлбэл: Багана C18 ZORBAX Eclipse plus 3\*150мм, 3.5 микрон, Б-фазын уусмалын харьцаа 60:40, урсгалын хурд 1.2 мл/мин, рН=7.5, 0.06М-ийн буферыг хэрэглэхэд фенилаланин, лизин, трионин гурав салалгүй нэг пик болон гарч байхад, багана C18 ZORBAX Eclipse plus 3\*150мм,

3.5 микрон, Б-фазын уусмалын харьцаа 42:58, урсгалын хурд 1.6 мл/мин, рН=7.5, 0.05 М-ийн буферыг хэрэглэхэд лейцин, фенилаланин, триптопан болон лизин салахгүй байсан ба шинжилгээний хугацааг богиносгосноор АХ-үүдийн салгалт муу байлаа.

Дээр дурдсан буфер уусмалуудын орчин болон концентрациудыг харьцуулан туршиж үзээд А-фазын уусмалаар рН=5.1 ба 0.050М-

ийн натрийн ацетатын буферыг орлуулав. Ацетонитрил : натрийн ацетат буфер (2:98) гэсэн бүтэцтэй А-фазын уусмал, ус: ацетонитрил (40:60) гэсэн бүтэцтэй Б-фазын уусмалаас бүрдсэн хөдөлгөөнт үелэлээр 5 төрлийн хуваах градиент үүсгэн туршиж үзэв. Градиент бүр давуу болон сул талтай байсан ба хооронд нь харьцуулсны үндсэн дээр Хүснэгт 1-т тусгасан градиентыг сонголоо.

Хүснэгт 1. РИТС-АХ-ийн пикүүдийг салгах градиент уусмалын схем

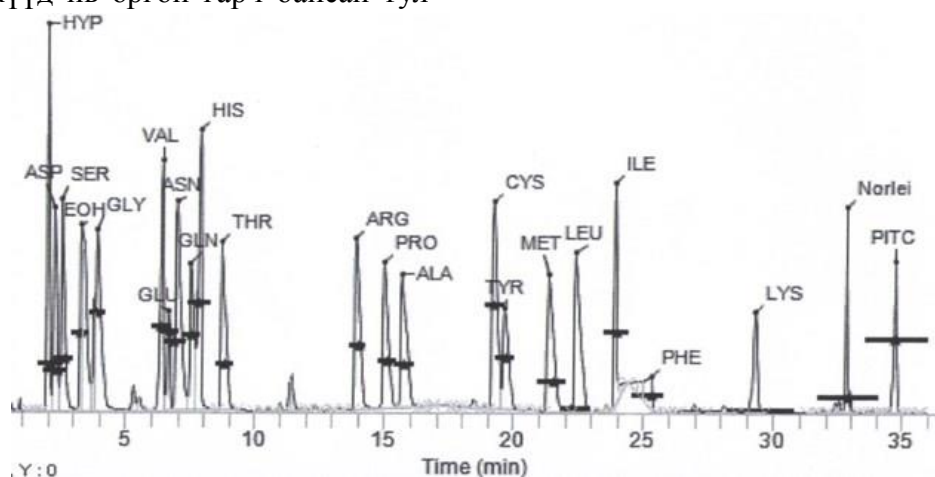
Хугацаа (мин)	А%	В%
5	100	0
29	52	48
31	0	100
44	100	0

Мөн гурван төрлийн багана өөр өөрийн онцлогтой байсан ба хооронд нь харьцуулсны дүнд C18 ZORBAX Eclipse plus 3\*250мм, 5.0 микрон баганыг сонгон шинжилгээнд цааш ашиглав.

Хөдөлгөөнт фазын урсгалын хурдыг 1.2 мл/мин-аас багасгах эсвэл ихэсгэх тохиолдолд АХ-үүд хоорондоо сайн салахгүй, пикүүд нь өргөн гарч байсан тул

цаашид урсгалын хурдыг 1.2 мл/мин дээр тогтоов. Мөн хөдөлгөөнт фазын урсгалын хурдыг ихэсгэх тусам АХ-үүдийн тодорхойлогдох хугацаа багасч байлаа.

Дээжийг РИТС-ээр дериватизаци хийсний дараа дериватизаци бүрэн явсан эсэхийг цаасан хроматографийн аргаар шалгаж байсан.



Зураг 1. 22 АХ (50мМоль) болон норлейцин (40мМоль)-ы стандарт холимогийг РИТС –гээр дериватизаци хийж ӨҮШХ-ийн аргаар тодорхойлсон дүн

Туршилтуудын үндсэн дээр сонгосон аргачлалаар АХ-үүдийг тодорхойлох хугацааг тогтоов (Хүснэгт 2).

Хүснэгт 2. АХ-үүдийг тодорхойлох хугацаа

Амины хүчил	Хугацаа (мин)
Гидропролин	3.64
Аспарагины хүчил	4.23
Серин	4.72
Этаноламин	4.92
Глицин	5.03
Валин	5.54
Глутамины хүчил	7.52
Аспарагин	7.94
Глутамин	8.13
Гистидин	9.20
Треонин	10.37
Аргинин	15.24
Пролин	15.99
Аланин	16.88
Цистеин	19.94
Тирозин	20.47
Метонин	21.08
Лейцин	22.00
Изолейцин	23.05
Фенилаланин	24.72
Триптофан	25.03
Лизин	29.51
Норлейцин	32.88

### Хэлцэмж

Бидний туршиж сонгосон ӨҮШХ-ийн аргаар цус ба шээсэнд 22 АХ-ийг тодорхойлсон нь Ц.Энхжаргал нарын шээс, цусанд АХ тодорхойлсон [2] аргаас даруй 6 АХ илүү тодорхойлж, мөн 22 хүчлийг 35 минутаас хэтрэхгүй хугацаанд тодорхойлж байгаа нь хугацааны хувьд хэмнэлттэй, өндөр мэдрэмжтэй, нарийвчлал сайтай, бусад аргуудтай харьцуулахад өртөг багатай, бодис урвалжийн олдоц сайтай арга болох нь харагдсан. Иймд энэхүү аргыг

манай орны нөхцөлд АХ-ийн эмгэгийг эрт илрүүлэн оношилж, эмчилгээний үр дүнг хянахад ашиглах бүрэн боломжтой юм.

### Ашигласан материал

1. Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism. SSIEM classification of Inborn Errors of Metabolism 2012
2. Ц. Энхжаргал. Биологийн шингэн дэхь амин хүчлийн агууламжийг тодорхойлох өндөр чадалтай шингэний хроматографийн арга. Лаборатори, 2003.03, х.42-43

3. <http://www.biosyn.com/tew/amino-acid-analysis-overview.aspx>
4. M. Hariharan, Sundar Naga and Ted VanNoord. Systematic approach to the development of plasma amino acid analysis by high-performance liquid

chromatography with ultraviolet detection with precolumn derivatization using phenyl isothiocyanate. *Journal of Chromatography*, 621 (1993) 15-22

**Determination of urinary and blood amino acids using high-performance liquid chromatography system**

*D.Khishigbuyan, Ts.Enkhjargal, P.Gantuya, B.Sodnomtseren  
National Centre for Public Health*

---

**Keywords:** amino acids, high-performance liquid chromatography, blood, urine, phenylisocyanate (PITC), derivatization

**Background**

Screening programs for the detection of inherited disorders of amino acid metabolism is mandatory in most countries. Various laboratory methods are used for this purpose. We tested a high-performance liquid chromatography method for the separation of amino acids in blood and urine samples.

**Materials and Methods**

All reagents were of the HPLC grade purity, water used for the analysis was deionized and reagents and samples were ultrafiltrated using a micropartition system.

The analysis was performed using the HPLC system with two pumps, a C18 column and a UV detector. All evaporations were done using a vacuum concentrator.

Amino acids were derivatized using a solution of ethanol, water, triethylamine and phenyl isothiocyanate. The amino acid derivatives were separated using a linear gradient with two solvents: solvent A (sodium acetate : acetonitrile) and solvent B (water : acetonitrile). Amino acid standards of 20, 50, 100, 200, 500, 750 and 1000  $\mu$ M were prepared in 1 mM hydrochloric acid.

The EDTA blood as well as urine samples were spun at 1500 g for 15 min and then ultracentrifuged at 1500 g for 30 min.

**Results**

Experiments with various chromatographic conditions showed that factors which influenced the amino acids separation were the type of columns, mobile phase composition, flow-rate, gradient programs and timings.

After studying the effects of changes in individual parameters of chromatographic conditions, the following method parameters were chosen: pre-column derivatization agent – PITC, separation column – C18, mobile phase – solvent A: sodium acetate : acetonitrile (98:2) and solvent B: water : acetonitrile (40:60), gradient – linear, flow-rate – 1.2 mL/min. With this method 22 amino acids were separated within 35 minutes.

**Conclusion**

The developed method is simple and can be used by medical laboratories for the detection of inborn errors of amino acid metabolism.

*Бүтээлтэй танилцаж, санал өгсөн  
ХУ-ны доктор С.Отгонжаргал*