

## Rapid fully automated determination of gamma-aminobutyric acid by ion exchange chromatography

With the increasing importance that is now being attributed to gamma-aminobutyric acid (GABA) as an inhibitory neurotransmitter in a number of invertebrate and vertebrate species<sup>1</sup> many laboratories are becoming interested in performing a large number of GABA determinations. GABA can be measured by various chromatographic and electrophoretic techniques which separate also other amino acids, and also by specific enzymatic methods (see ref. <sup>2</sup> for review). By micro and sub-micro modifications of the original enzymatic assay GABA concentrations of the order of  $10^{-11}$  and  $10^{-14}$  molar respectively can be detected<sup>3,4</sup>. However, all the methods described in the literature are manual, more or less time-consuming, and permit to handle only a limited number of samples per day.

The system described in the present report permits to perform about 60 fully automated GABA determinations per day by ion exchange chromatography, and may result most useful unless micro or sub-micro amounts of GABA have to be measured. The sensitivity of the method could be increased by introducing some modifications, as in the case of conventional amino acid analysis<sup>5</sup>.

### Methods

The analyses were performed on a Beckman mod. 121 automatic amino acid analyzer. This instrument is provided with a rotary table, holding up to 72 samples which can be refrigerated if necessary. 0.5 ml aliquots are automatically aspirated from the sample coils on the rotary table and injected into the columns. The system employed utilized two

TABLE I  
Program statements and conditions of analysis for GABA determination on a Beckman model 121 automatic amino acid analyzer

Program statements		Program time (min)	
		step time	elapsed time
Equilibration column 1 and 2	column 2 to coil	8	8
Load* sample column 1, equil. column 2	»	2.5	10.5
Inject sample column 1, equil. column 2	»	10	20.5
Regeneration column 1, equil. column 2	column 1 to coil	3	23.5
Equilibration column 1, equil. column 2	»	8	31.5
Load* sample column 2, equil. column 1	»	2.5	34
Inject sample column 2, equil. column 1	»	10	44
Regeneration column 2, equil. column 1	column 2 to coil	3	47
Conditions of analysis			
Resin type: Aminex A 7			
Column size: 15 x 0.9 cm			
Height of resin: 6 cm			
Column flow rate: 50 ml/h			
Temperature: 38°C			
Sodium citrate buffer: pH 4.6, Na conc. 0.38 M.			

\* Includes sample aspiration and measurement of the sample volume.

(\*) La Redazione non si ritiene responsabile delle opinioni espresse dagli Autori nelle Brevi Note.

short columns, one of which was regenerated while the other was in analysis. The program statements and the conditions of analysis are reported in Table I. Peak areas were calculated by the Beckman mod. 125 automatic digital integrator.

### Results

The chromatogram reported in Fig. 1 shows that, in the analytical conditions employed, GABA is completely separated from other amino acids of a standard amino acid mixture.

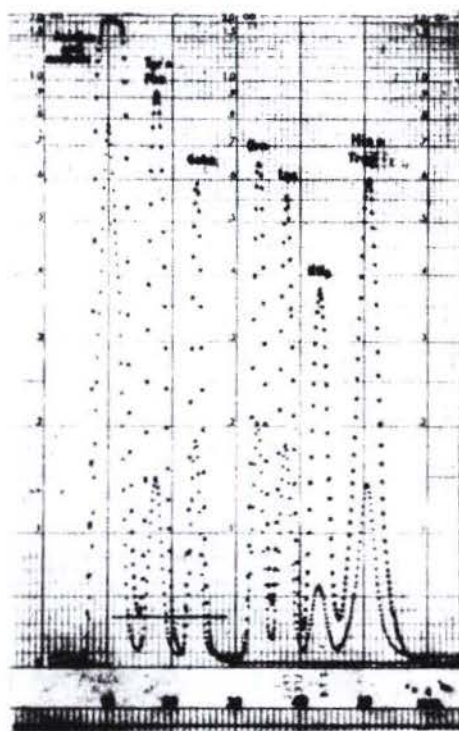


Fig. 1. — Separation of GABA from other amino acids of a standard solution, in the analytical conditions reported in Table I.

Fig. 2 shows a series of chromatograms performed in the conditions reported in Table I as they appear on the recorder chart. It will be noted that only a small part of the chromatogram, including the peak of GABA, is recorded.

Fig. 3 shows that when multiple analyses are performed on a standard solution of GABA at room temperature, the response remains constant for about 8 hours, then decays at a rate of approximately 2.7% hour, probably due to degradation of GABA. This phenomenon was not present when the rotary table containing the sample coils was refrigerated at 8°C. In these conditions, taking as 100 the average of the first 10 of 72 sequential analyses of the same standard solution of GABA (with a S. D. of  $\pm 1.6$ ), the average of the last 10 analyses was  $100 \pm 2.3$ . Table 2 shows the per cent deviation from the mean observed on 100 sequential determinations of a 0.25 mM GABA solution performed under

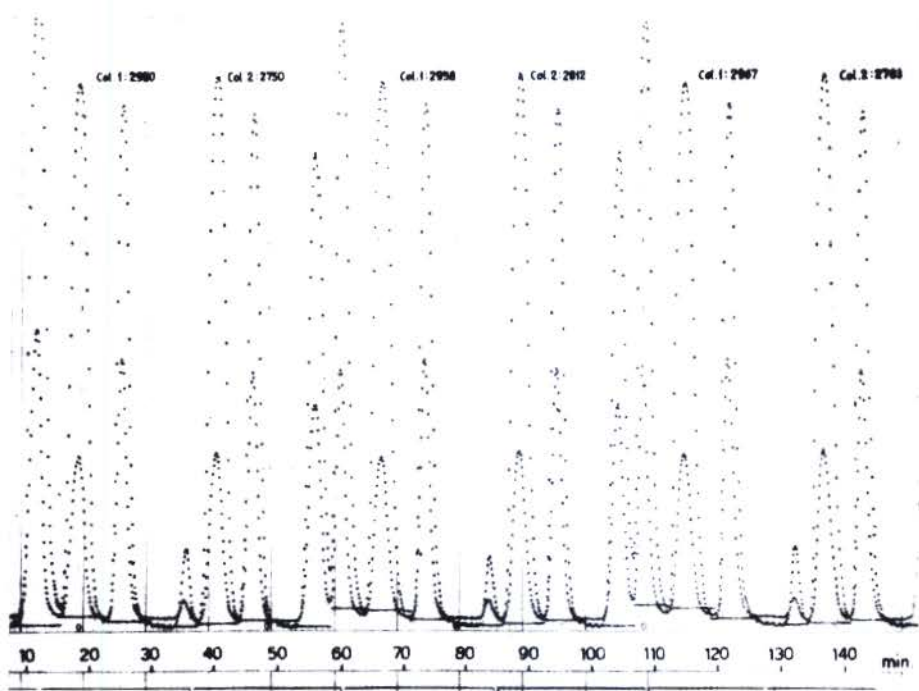


Fig. 2. — Recording of sequential automated GABA analyses, on two chromatographic columns, using the program statements and analytical conditions reported in Table 1. Super-script numbers are those calculated by the digital integrator.

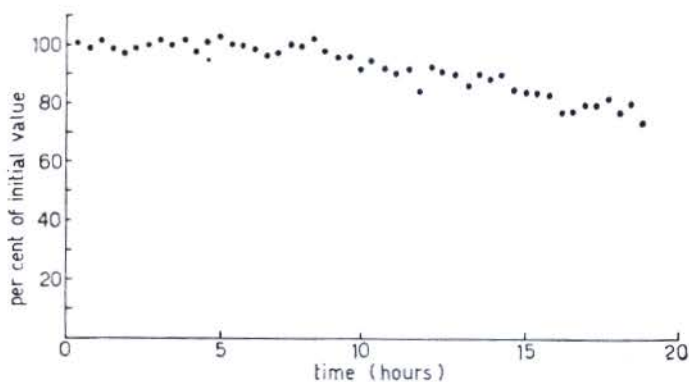


Fig. 3. — Time dependent decay in the response when multiple analyses of the same 0.25 mM GABA solution are performed without refrigerating the sample coils on the rotary table. The average of the values obtained on 10 determinations at time zero (first determinations of 10 series) was taken as 100.

TABLE 2

**Per cent deviation from the mean value of 100 sequential  
automated GABA determinations**

Deviation	Number of determinations
Between 0 and 1 per cent	53
» 1 and 2 »	20
» 2 and 3 »	19
» 3 and 4 »	4
» 4 and 5 »	4
S. D. on 100 determinations: 1.78 %	Total 100

A 0.25 mM standard solution of GABA was used to load the sample coils. The rotary table was kept refrigerated. Peak areas were calculated by an automatic digital integrator.

conditions of refrigeration. The deviation was within 1% in more than half of the analyses and between 3% and 5% in only 9 determinations. No apparent correlation was observed between magnitude of the deviation and time of analysis.

#### Discussion

The system described is based on the short elution time of GABA in the analytical conditions employed and on automatic sampling and column regeneration. In these conditions the time spent by the operator is reduced to a minimum. The system could also be operated manually if an instrument with automatic sampling is not available. In this case approximately 16 determinations could be performed in 8 working hours, and the time spent by the operator would be of about 5 min twice an hour.

It may be useful to stress the importance of refrigerating the rotary table containing the sample coils to avoid deterioration of the preparation, when operating in automated conditions. If GABA is determined on perchloric acid tissue extracts, brought to the correct pH by KOH, care has to be taken to make the pH adjustments and subsequent centrifugation at about 4°C, in order to avoid the precipitation of part of the potassium perchlorate in the refrigerated sample coils. We often noted that perchlorate precipitation taking place when samples are cooled or frozen is accompanied by a significant decrease in the concentration of GABA in the decanted fluid.

It has also to be reminded that the columns should be repacked after the analysis of not more than 144 samples (2 full trays), even when perfectly clear extracts are used.

Received January 4, 1972.

GINO MORISI and GIULIO LEVI

*Laboratori di Chimica Biologica, Istituto Superiore di Sanità  
and Laboratorio di Biologia Cellulare, C.N.R.*

- <sup>1</sup> CURTIS, D. R. & G. A. R. JOHNSTON. In: *Handbook of Neurochemistry*, vol. 4, A. Lajtha Ed., Plenum Press, New York, 1970, p. 115.
- <sup>2</sup> BAXTER, C. F. In: *Handbook of Neurochemistry*, vol. 3, A. Lajtha Ed., Plenum Press, New York, 1970, p. 289.
- <sup>3</sup> GRAHAM, L. T. & M. H. APRISON. *Anal. Biochem.*, **15**, 487 (1966).
- <sup>4</sup> OTSUKA M., K. OBATA, Y. MIYATA & Y. TANAKA. *J. Neurochem.*, **18**, 287 (1971).
- <sup>5</sup> HAMILTON, P. B. In: *Methods in Enzymology*, vol. 11, S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Eds., Academic Press, New York, 1967, p. 15.



## Effetti dell'acido glutammico e di altri amminoacidi somministrati per via parenterale a topini neonati e adulti (\*)

L'acido glutammico viene sempre più frequentemente usato, sotto forma di sale monosodico, come correttivo del sapore. Il glutammato monosodico (GMS) infatti, pur essendo, allo stato puro, praticamente insapore, migliora il gusto dei cibi, esaltando alcuni sapori e sopprimendone altri, con meccanismo non ben chiaro.

In Europa, fino ad alcuni anni fa, il GMS veniva usato essenzialmente nei dadi per brodo; ora, però, se ne sta diffondendo l'uso come sapidizzante in altri alimenti. Il suo impiego è particolarmente diffuso in Estremo Oriente: in Giappone il consumo giornaliero *pro capite* supera i 2 g, contro i 0,35 dell'America e i 0,13 dell'Europa.

Secondo Schaumburg *et al.*<sup>1,2</sup> l'uso del GMS non è scevro da inconvenienti; esso sarebbe il responsabile della «sindrome del ristorante cinese», consistente in vampate di calore, pressione facciale e dolori precordiali, che si riscontra in alcuni individui dopo ingestione, a stomaco vuoto, di una porzione di zuppa cinese contenente circa 5 g di GMS. L'acido l-glutammico libero, come tale o salificato, sarebbe attivo generalmente alla dose di 3-5 g per via orale o di 100-200 mg per via endovenosa. È da pensare che l'ingestione di una dose anche maggiore di acido glutammico combinato nelle proteine non dà disturbi, probabilmente perchè viene immesso in circolo gradualmente, man mano che si libera nell'idrolisi digestiva.

In seguito alla suddetta segnalazione, Olney<sup>3</sup> ha saggiato la tossicità a lungo termine dell'acido glutammico ed ha trovato che topini neonati, iniettati, per via sottocutanea, con forti dosi di GMS per 10 giorni consecutivi, mostravano, dopo alcuni mesi, un peso più elevato e una forma più tozza, un aspetto più torpido e inoltre alterazioni istologiche a carico del fegato, nonché di alcuni distretti endocrini e nervosi. Le modificazioni erano di scarsa entità o nulle nei topini adulti sottoposti allo stesso trattamento.

I risultati di Olney trascendono l'interesse per i danni, reversibili e non gravi, causati dall'acido glutammico in alcuni individui particolarmente sensibili, amanti di certe raffinatezze della cucina cinese. Abbiamo perciò voluto riprendere i suoi esperimenti, estendendoli, per confronto, ad altri amminoacidi.

### Parte sperimentale

Abbiamo usato i seguenti amminoacidi: acido l-glutammico, l-glutammina, acido l-aspartico, l-lisina, glicina, tutti prodotti puri per analisi (C. Erba o Merck).

Cinque gruppi di 10 topini neonati, di ceppo Swiss, furono iniettati per via sottocutanea, dal 2° giorno dopo la nascita per 10 giorni consecutivi, con dosi crescenti dei cinque amminoacidi suddetti, in soluzione acquosa concentrata portata a pH 7-8; le dosi di acido glutam-

(\*) Comunicazione presentata al Congresso delle Società Italiane di Biologia sperimentale, di Fisiologia, di Biochimica e di Nutrizione umana (Palermo, settembre 1971).

mico erano uguali a quelle usate da Olney (crescenti da 2,0 a 4,4 mg/g); quelle degli altri amminoacidi erano molarmente corrispondenti. Gli animali di controllo furono iniettati con soluzione fisiologica.

Altrettanti gruppi di topini adulti, di sesso femminile, furono iniettati per via intraperitoneale, sempre per 10 giorni consecutivi, con 0,82 mmoli al giorno dei cinque amminoacidi; un altro gruppo servi di controllo.

Degli stessi amminoacidi si determinò la  $DL_{50}$ , iniettandoli per via intraperitoneale in topini del peso di 20 g; si prese in considerazione la morte dopo 24 ore.

#### Risultati e discussione

Gli effetti dell'acido glutammico nei topini neonati sono risultati in gran parte coincidenti con quelli descritti da Olney: gli animali erano torpidi e avevano un aspetto piuttosto tozzo; il pelo era arruffato. Per contro, le curve di crescita, seguite per 9 mesi, non hanno mostrato una netta differenza rispetto a quelle dei controlli. Gli animali trattati con gli altri amminoacidi non differivano apprezzabilmente dai controlli. Lo stesso dicasi per gli animali adulti.

Dopo 9 mesi dal trattamento, gli animali furono sacrificati e si allestirono preparati istologici dei fegati, delle ovaie e dei surreni. I fegati dei topini trattati dalla nascita con acido glutammico mostravano, nei preparati colorati con Sudan III, una degenerazione grassa centrolobulare; quelli dei topini adulti trattati con acido glutammico, come pure quelli dei topini trattati dalla nascita con acido aspartico o con lisina, mostravano una degenerazione grassa panlobulare (Fig. 1). Nessuna alterazione epatica era visibile nei topini degli altri gruppi. Le ovaie di alcuni dei topini neonati trattati con lisina mostravano un certo grado di sclerosi. Nulla è risultato a carico dei surreni.

I valori della  $DL_{50}$  sono riportati nella Tab. 1; da essa risulta evidente che la tossicità acuta non dipende dal tenore in azoto.

TABELLA 1

Valori della  $DL_{50}$  espressi in g/kg (con limiti fiduciali per  $P = 0,05$ ), in mmoli/kg e in mgatomi di N/kg

Amminoacido	g/kg	mmoli/kg	mgatomi di N/kg
Acido glutammico . . . . .	4,70 (5,52-4,00)	31,9	31,9
Glutammina . . . . .	21,2 (31,8-14,1)	145	290
Acido aspartico . . . . .	4,75 (5,23-4,31)	35,7	35,7
Lisina . . . . .	7,16 (7,74-6,63)	49,0	98,0
Glicina . . . . .	5,89 (7,15-4,86)	78,5	78,5

Le conclusioni della nostra ricerca si possono così riassumere. L'acido glutammico, iniettato a forti dosi, ha dato, sia in topini neonati che in topini adulti, a lungo termine, alterazioni epatiche. Qualche effetto hanno mostrato anche, ma solo in topini neonati, l'acido aspartico e la lisina. Glutammina e glicina sono risultate innocue.

Si può notare che l'acido glutammico, la cui tossicità, sia acuta che cronica, è decisamente maggiore di quella della glutammina, ha rispetto a questa una maggiore polarità. La stessa osservazione possiamo fare per gli altri amminoacidi da noi saggiati: la maggior tossicità dell'acido aspartico e della lisina rispetto a quella della glicina corrisponde ad una più elevata polarità dei primi due amminoacidi rispetto al terzo.

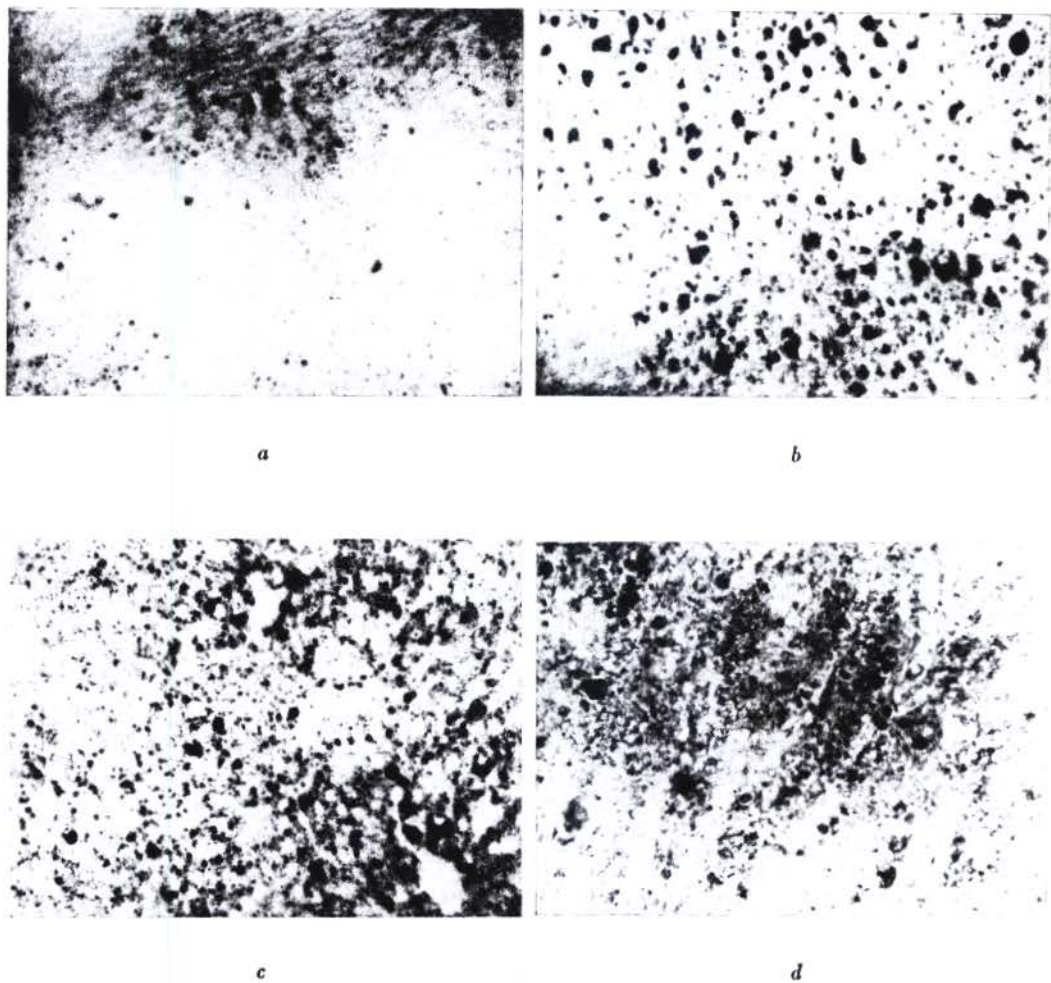


Fig. 1. — Preparati istologici di fegati di topini (X 250; colorazione con Sudan III). a) Controlli; b) Acido glutammico; c) Acido aspartico; d) Lisina (trattamenti dal 2° giorno di vita, per 10 giorni consecutivi: v. 1 testo).



I nostri risultati non sono in contrasto con le più recenti osservazioni sull'argomento, pubblicate mentre i nostri esperimenti erano in corso o appena ultimati. Mentre le lesioni cerebrali segnalate da Olney<sup>3</sup> sono state confermate da alcuni AA.<sup>4</sup> (nel topino), negate da altri<sup>5,6</sup> (nel topino, nel ratto, nel cane), l'aumento di peso corporeo di topini neonati non è stato riscontrato, a 50 giorni dal trattamento, da Prabhu e Oester<sup>7</sup>. Mushahwar e Koeppe<sup>8</sup> hanno osservato convulsioni in ratti neonati iniettati con forti dosi di glutammato o di aspartato, ma non di glicina; la tossicità non è dovuta al sodio, né sembra legata all'azoto.

Quanto alle implicazioni di carattere sanitario che possono avere le manifestazioni osservate, in animali da laboratorio, da noi e da altri, c'è da notare quanto segue:

1) gli effetti osservati sono stati provocati da dosi molto elevate, somministrate per via parenterale;

2) nelle condizioni suddette, l'acido glutammico non è il solo aminoacido capace di effetti indesiderati;

3) gli effetti sono stati assenti o di minor rilievo negli animali adulti.

Per contro c'è da aggiungere che:

1) gli effetti dell'acido glutammico sono stati più evidenti di quelli degli altri aminoacidi saggiati;

2) in base a pubblicazioni di vari AA., alte dosi di acido glutammico, somministrate per via parenterale, hanno dato manifestazioni tossiche nei neonati di diverse specie, dal macaco<sup>9</sup> al pollo<sup>10</sup>.

Riteniamo pertanto che, pur essendo esagerato l'allarmismo sull'uso del GMS come additivo alimentare, bisognerebbe evitarne un uso indiscriminato negli alimenti destinati alla prima infanzia, fino a che un'ulteriore rigorosa sperimentazione non ne abbia appurata l'assoluta innocuità dopo una prolungata e abbondante introduzione per via orale.

Quanto all'uso farmaceutico che si fa, con varie indicazioni, dei cinque aminoacidi, suddetti, non sembrano sussistere controindicazioni all'impiego per via orale; è lecito, invece avanzare qualche riserva sull'uso per via parenterale dell'acido glutammico, dell'acido aspartico e della lisina, in relazione alla posologia, alla durata del trattamento ed all'età dei soggetti.

Ricevuto il 29 gennaio 1972.

ALDO GAUDIANO e MARIA ROSARIA RIVERSO (\*)

Laboratori di Biologia

<sup>1</sup> SCHAUMBURG, H. H. & R. BYCK. *New Engl. J. Med.*, **279**, 105 (1968).

<sup>2</sup> SCHAUMBURG, H. H., R. BYCK, R. GERSTL & J. H. MASHMAN. *Science*, **163**, 826 (1969).

<sup>3</sup> OLNEY, J. W. *Science*, **164**, 719 (1969).

<sup>4</sup> AREES, E. A. & J. MAYER. *Science*, **170**, 549 (1970).

<sup>5</sup> OSER, B. L., S. CARSON, E. E. VOGIN & G. E. COX. *Nature*, **229**, 411 (1971).

<sup>6</sup> ADAMO, N. J. & A. RATNER. *Science*, **169**, 673 (1970).

<sup>7</sup> PRABHU, V. G. & Y. T. OESTER. *Arch. Intern. Pharmacodyn. Thérap.*, **189**, 59 (1971).

<sup>8</sup> MUSHAHWAR, I. K. & R. E. KOEPE. *Biochim. Biophys. Acta*, **244**, 318 (1971).

<sup>9</sup> OLNEY, J. W. *Science*, **165**, 1029 (1969).

<sup>10</sup> FIFKOVA, E. & A. VAN HARREVELD. *Exptl. Neurol.*, **28**, 286 (1970).

(\*) Ospite dei Laboratori di Biologia.