

DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE BESTIMMUNG VON KREATININ UND KREATIN IM HARN

M. RINK* UND D. KREBBER

Pharmazeutisches Institut der Universität Bonn (Deutschland)

(Eingegangen den 25. März 1966)

Das grosse Interesse an der Bestimmung von Kreatinin und Kreatin in biologischem Material spiegelt sich in der Zahl der Publikationen zu diesem Thema wieder¹⁻². Je nach der Bestimmungsmethode variieren die Ergebnisse, und selbst innerhalb einer einzigen Methode hängen diese von der Zusammensetzung und Konzentration der ausser Kreatinin bzw. Kreatin noch im Harn oder Serum enthaltenden Substanzen ab. Für die klinische Routineanalyse genügt die Bestimmung von Kreatinin im Harn mit Hilfe der JAFFÉ-Reaktion^{3,4}, für Kreatin mit der Diacetyl-Reaktion⁵⁻⁷. In zweifelhaften Fällen ist jedoch eine genaue Bestimmung unerlässlich. Alle bisher benutzten Methoden sind dafür aber nicht geeignet, da sie mit einer Reihe von Mängeln behaftet sind.

Auf Grund unserer guten Ergebnisse bei der qualitativen und quantitativen Bestimmung pathologischer Harnbestandteile auf dünnschichtchromatographischem Wege^{8,9}, hofften wir, mit Hilfe dieses Verfahrens Kreatinin und Kreatin von anderen Harninhaltsstoffen abtrennen und dadurch die JAFFÉ- bzw. Diacetyl-Methode spezifisch gestalten zu können.

Die Abtrennung der Guanidinderivate Kreatinin und Kreatin von dem diese stets begleitenden Glykocyamidin und Glykocyamin gelang durch Verteilungschromatographie auf Kieselgel HF 254 (Merck) und auf Zellulose MN 300 F 254 (Macherey & Nagel). Neben dem von BEYERMANN¹ benutzten Fließmittel *n*-Butanol-Pyridin-Wasser (55:20:25) bewährten sich bei Verwendung von Kieselgel besonders gut die pyridinfreien Gemische *n*-Propanol-Wasser (64:36) und Äthylmethylketon-*n*-Propanol-Wasser (15:10:5) (Tabelle I).

Auf Zelluloseplatten dagegen war der Trenneffekt mit den genannten Fließmitteln schlecht. Auch die Übertragung der in der Literatur aufgeführten Lösungsmittelsysteme der Papierchromatographie auf Zelluloseplatten ergaben für eine quantitative Auswertung zu geringe Fleckenabstände. Zwar gelingt die Trennung von Kreatinin und Kreatin, nicht aber von den diese begleitenden Glykocyamidin und Glykocyamin. So überlappen sich im Fließgemisch Isopropanol-Eisessig-Wasser (20:15:5) Kreatin und Glykocyamidin, im Gemisch *n*-Butanol-Eisessig-Pyridin-Wasser (4:1:1:2) Kreatin und Glykocyamin sowie Kreatinin und Glykocyamidin.

Eine ideale Auftrennung der Guanidinderivate ermöglichte erst das Gemisch Äthanol-0.4 *M* NaCl-Lösung-25 % Ammoniak (80:18:2) auf NaCl-imprägnierten Platten (Tabelle II).

* Frau Prof. M. RINK verstorben am 24. Juli 1965.

TABELLE I

R_F-WERTE FÜR KIESELGEL HF 254

<i>Fliessgemisch</i>	<i>Glykocyamin</i>	<i>Glykocyamidin</i>	<i>Kreatin</i>	<i>Kreatinin</i>
<i>n</i> -Butanol-Pyridin-Wasser	0.30	0.59	0.18	0.45
<i>n</i> -Propanol-Wasser	0.43	0.58	0.33	0.47
Äthylmethylketon- <i>n</i> -Propanol-Wasser	0.32	0.57	0.22	0.48

Zur quantitativen Bestimmung von Kreatinin und Kreatin müssen die betreffenden Substanzen nicht nur von den homologen, sondern auch von allen anderen die Farbreaktion störenden Stoffen abgetrennt werden. Die häufigsten Fehlerquellen bei der Kreatininbestimmung (Glukose, Glucuronsäure, Ascorbinsäure, Aceton u.a.) lassen sich im Fliessgemisch Isopropanol-Eisessig-Wasser beseitigen. Im Fliessgemisch Äthanol-0.4 M NaCl-Lösung-25 % Ammoniak auf NaCl-imprägnierten Platten besteht die Gefahr, dass beim Vorliegen grosser Glukosemengen diese zum Teil miterfasst werden.

Zur quantitativen Bestimmung von Kreatin mit der Diacetyl-Reaktion müssen alle übrigen Guanidinderivate, auch die Lactame, die im alkalischen Milieu aufspalten, abgetrennt werden. Dies gelingt sehr gut mit Hilfe des Fliessgemisches Äthanol-0.4 M NaCl-Lösung-25 % Ammoniak auf NaCl-imprägnierten Platten.

TABELLE II

R_F-WERTE FÜR ZELLULOSE MN 300 F 254

	<i>Isopropanol-Eisessig-Wasser</i>	<i>n-Butanol-Eisessig-Pyridin-Wasser</i>	<i>Äthanol-0.4 M NaCl-Lsg.-NH₃ 25 %</i>
Arginin	0.31		0.16
Guanidin	0.51		0.59
Methylguanidin			0.65
Glykocyamin	0.40	0.43	0.20
Glykocyamidin	0.47	0.56	0.39
Kreatin	0.46		0.29
Kreatinin	0.56	0.58	0.49
Harnstoff			0.50
Ascorbinsäure	0.29		0 bis 0.1
Glukose	0.43		0.38
Glucuronsäure	0.19		0.06

QUANTITATIVE KREATININBESTIMMUNG NACH JAFFÉ

Für die Messungen benutzten wir das Zeiss Spektralphotometer PMQ II. Bei der Überprüfung der in der Literatur vorgeschlagenen Wellenlängen fanden wir ein sehr breites Maximum von 485 bis 505 nm, so dass sich die Wellenlänge von 490 nm zur Bestimmung anbot. Die Fig. 1 zeigt die Extinktion in Abhängigkeit der Wellenlänge für $\lambda = 490, 520$ und 530 nm. Für $\lambda = 490$ nm ist zwar der Blindwert am grössten, die Gerade aber am steilsten. Mit dem Anstieg der Geraden nimmt die Genauigkeit der Bestimmung zu.

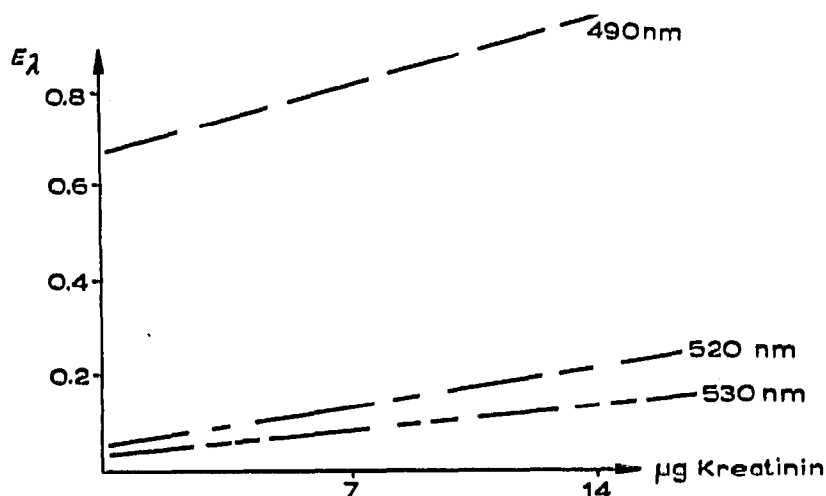


Fig. 1.

Obwohl Kieselgel-Platten eine sehr gute Abtrennung des Kreatinins ermöglichen, eignen sie sich nicht für eine quantitative Bestimmung. Infolge Adsorption von Kreatinin bzw. von Pikraminsäure an das Kieselgel ist die Rückgewinnungsquote für kleinere Kreatininmengen geringer als für grössere, was durch eine Krümmung der Eichgeraden zum Ausdruck kommt (Fig. 2).

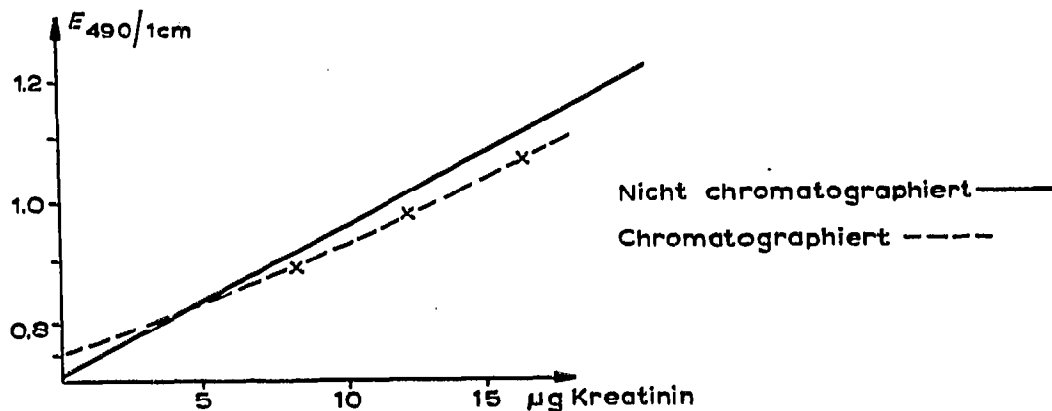


Fig. 2.

Bei Filtration der Reagenzlösung durch Papierfilter werden die Extinktionswerte etwas erhöht, wie Tabelle III zeigt. Im Bereich von 5 bis 60 μg Kreatinin trat bei Verwendung von Zelluloseplatten ein messbarer Fehler durch Adsorption nicht ein, so dass die Extinktionswerte der zugehörigen Kreatininkonzentrationen immer eine Gerade ergaben.

TABELLE III

EINFLUSS VON ZELLULOSE AUF DIE EXTINKTION

	$E_{490}/1\text{ cm}$
Reagenzlösung gegen Wasser	0.671
Reagenzlösung filtriert	0.726
Reagenzlösung + Zellulosepulver filtriert	0.738

Da die Alkalipikrat-Reagenzlösung nicht beständig ist, und der Blindwert sich täglich ändert, muss bei jeder Kreatininserie die Eichgerade neu bestimmt werden. Zur Vermeidung von Korrekturen wurden die Werte der Eichgeraden den gleichen Bedingungen der Chromatographie unterworfen wie die zu bestimmenden Kreatininlösungen.

AUSFÜHRUNG DER KREATININ-BESTIMMUNG

Reagenzlösung. 4 g Natriumhydroxid und 2.5 g Natriumpikrat¹⁰ werden zu 500 ml Wasser gelöst. (Die Lösung ist etwa eine Woche lang haltbar.)

Kreatinin-Standardlösung. 50 mg Kreatinin werden zu 100 ml Wasser gelöst.

Arbeitsvorschrift

Die zu untersuchenden Lösungen (Standardlösung und Harn) werden auf den Zelluloseplatten bandförmig in 3 cm breiten Streifen 1.5 cm vom unteren Plattenrand mit der AGLA-Pipette aufgetragen. Vom Harn werden 6×20 oder $30 \mu\text{l}$, von der Standardlösung je 6×20 , 40 und $60 \mu\text{l}$, entsprechend 10, 20 und $30 \mu\text{g}$ Kreatinin aufgetragen. Die Platten werden im Gemisch Isopropanol-Eisessig-Wasser (20:10:5) bei Kammersättigung chromatographiert. Nach ca. 3.5 Std. ist eine Strecke von 15 cm durchlaufen, und die Platten werden 2 Std. bei 110° getrocknet. Die Kreatinin-zonen werden im U.V. markiert und mit einer Rasierklinge ausgeschabt. Sechs gleich grosse Zelluloseflächen ohne Kreatinin dienen als Blindwerte. Die ausgeschabte Zellulose jeder Zone wird in einem Reagenzglas mit 5 ml Pikratreagenzlösung versetzt und umgeschüttelt. Nach 20 Min. wird durch ein hartes Filter von 7 cm Durchmesser filtriert und nach 60 Min. bei 490 nm im Zeiss Spektralphotometer gemessen. Die Blindwerte werden gegen Wasser, die übrigen Werte gegen das Blindwertmittel bestimmt. Aus dem Mittel der Standardwerte wird die Eichgerade gezeichnet und der Wert des Harnkreatinins aus der Geraden abgelesen und berechnet.

Ergebnisse

Wir ermittelten die Standardabweichung für die Eichgerade mit 2 %, die Abweichung für Harn mit 3 %. Die Untersuchung eines Harns in 7 Serien zu je 6 Be-

TABELLE IV
BESTIMMUNG DER STANDARDABWEICHUNG FÜR HARN

Kreatinin	Einzelfehler	Fehlerquadrat
11.81	18	324
12.11	12	144
12.20	21	441
12.11	12	144
12.41	42	1764
11.70	29	841
11.60	39	1521
11.99		$f^2 = 5179$

$$f_m = \sqrt{\frac{f^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{5179}{6}} = 29.4$$

stimmungen ergab Mittelwerte, die um $\pm 3\%$ um das Mittel von $11.99 \mu\text{g}$ Kreatinin streuten. Zur Bestimmung kamen jeweils $30 \mu\text{l}$ einer 50% igen Harnverdünnung (Tabelle IV).

Das Ergebnis lautet dann: $11.99 \pm 0.294 \mu\text{g}$ Kreatinin. Die Streuung beträgt $\pm 2.5\%$.

Auf Zusatz von $5 \mu\text{g}$ Kreatinin zum gleichen Harn wurden $16.69 \mu\text{g}$ wiedergefunden. Die Abweichung beträgt 1.8% . Ohne chromatographische Trennung resultiert ein Gehalt von $12.5 \mu\text{g}$ ($+5\%$), desgleichen nach Zusatz von 2 Tropfen Aceton zu 100 ml Harn ein Gehalt von $14.0 \mu\text{g}$ Kreatinin ($+15.7\%$).

QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON KREATIN

Die guten Ergebnisse unserer Bestimmungsmethode für Kreatinin legten es nahe, nach dem gleichen Verfahren das Kreatin zu bestimmen, nachdem dieses zuvor in Kreatinin übergeführt wurde. Eine Umwandlung durch Salzsäurebehandlung vor der chromatographischen Trennung ist für normalen Harn ungeeignet, da die aus dem Kreatin entstandene Kreatininmenge nur 2 bis 5% des präformierten Kreatinins beträgt. Diese Menge liegt jedoch in der Fehlergrenze der Kreatininbestimmung. Nur in kreatinreichen pathologischen Harnen mag man so verfahren. Immer sind dann aber zwei Bestimmungen erforderlich, die des präformierten und die des Gesamtkreatinins.

Die andere Möglichkeit, das abgetrennte Kreatin durch Säurebehandlung in Kreatinin umzuwandeln und nach obiger Vorschrift zu bestimmen, lässt sich nicht durchführen, da bei der Säurebehandlung selbst mit Essigsäure die Zellulose in geringem Masse verzuckert wird, was zu Überwerten führt.

Erfolgreich verliefen dagegen Bestimmungen des abgetrennten Kreatins mit der Diacetyl-Reaktion in der von KANIG angegebenen Reagenzienkonzentration⁷. Die Adsorption des Kreatins bzw. des entwickelten Farbstoffs an Zellulose ist nur gering. Die Extinktion der Reagenzlösung nach Filtration durch ein hartes Filter von 7 cm Durchmesser betrug nur 1.5% weniger als ohne Filtration, wie Tabelle V zeigt.

TABELLE V

EINFLUSS DES FILTRIERPAPIERS AUF DIE EXTINKTION

$E_{548}/1 \text{ cm}$	Blindwert geg. H_2O	$10 \mu\text{g}$ Kreatin geg. Blindwert
Nicht filtrierte	0.059	0.198
Filtrierte	0.052	0.195

Aus diesem Grunde konnten wir die Technik der Kreatininbestimmung auch beim Kreatin anwenden, indem wir zur ausgeschabten Zellulose die Reagenzlösung hinzugaben, umschüttelten, filtrierten und nach 45 bis 60 Min. die klare Lösung photometrisch bestimmten. Da Kreatin nicht wie Kreatinin im U.V. absorbiert und daher auf den Platten nicht sichtbar gemacht werden kann, müssen Leitchromatogramme angebracht und durch Besprühen mit einem Farbreagenz detektiert werden.

AUSFÜHRUNG DER KREATIN-BESTIMMUNG

NaCl-imprägnierte Zelluloseplatten. 15 g Zellulosepulver MN 300 werden mit 90 ml 0.2 M NaCl-Lösung 1 Min lang homogenisiert und mit dem Streichgerät (Desaga, Heidelberg) auf 5 Platten 20 × 20 aufgetragen. Die Platten werden an der Luft getrocknet.

Sprühreagenz für Guanidinderivate. Je 1 Raumteil 10 %ige Natronlauge, 10 %ige Nitroprussidnatriumlösung und 10 %ige Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung werden mit 3 Raumteilen Wasser gemischt. Die Lösung wird vor Anwendung mindestens 20 Min. lang bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Reagenzlösung für die quantitative Kreatinbestimmung. (a) 0.5 g α -Naphthol und 1.0 g Natriumhydroxid werden in Wasser zu 50 ml gelöst. (b) 1.0 g einer 1 %igen wässrigen Diacetyl-Lösung wird mit Wasser zu 160 ml verdünnt.

Arbeitsvorschrift

Auf NaCl-imprägnierten Zelluloseplatten werden zwei 3 cm breite Startzonen zwischen drei 1 cm breiten Startzonen für die Leitchromatogramme markiert. Auf je 6 3-cm-Bahnen werden 50 μ l Harn, 20, 40 und 60 μ l einer 50 mg %igen Kreatinstandardlösung aufgetragen, auf die 1-cm-Bahnen ein Gemisch aus je 30 μ g Kreatin, Glykocyamin und Glykocyamidin. Die Chromatogramme werden im Fließmittel Äthanol-0.4 M NaCl-Lösung-Ammoniak 25 % (80:18:2) bei Kammerfüllung chromatographiert. Nach dem Trocknen der Platten bei 110° werden die Leitchromatogramme mit Nitroprussidnatrium-Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung unter Abdecken der übrigen Platte besprüht und die entsprechende Kreatinzone der Hauptchromatogramme ausgeschabt. Zur ausgeschabten Zellulose werden je 1 ml α -Naphthol-Reagenzlösung und 4 ml Diacetylösung zupipettiert, geschüttelt, nach 20 Min. durch ein hartes Filter filtriert und nach 45 bis 60 Min. bei 546 nm gemessen. Die Leerwerte werden gegen Wasser, die übrigen Werte gegen das Leerwertmittel photometriert. Aus der Eichgeraden wird der Kreatinwert für den Harn abgelesen oder berechnet.

Ergebnisse

Im Bereich von 10 μ g Kreatin beträgt die Standardabweichung unter ± 1 % für die Eichgerade und ± 1.3 % für den Harn. Da die Adsorption an Zellulose nur gering ist, macht sich diese nur bei sehr kleinen Mengen Kreatin störend bemerkbar. In diesem Falle ist es günstig, eine bestimmte Menge Kreatin zum Harn zuzusetzen und aus der Gesamtmenge das Harnkreatin zu ermitteln. (So wurden 1.1 μ g Kreatin mit 0.89 μ g, nach Zusatz von 5 μ g mit 6.13 μ g bestimmt, entsprechend einem Kreatin-gehalt von 1.13 μ g/50 μ l.)

Da die Trennung von den anderen Guanidinderivaten sicher erfolgt, erhält man auch bei Anwesenheit hoher Konzentrationen von Glykocyamin und Glykocyamidin sehr gute Kreatinwerte. Nach Zusatz von je 20 mg beider Substanzen zu 100 ml Harn wurden in 40 μ l Harn 6.05 μ g statt 6.13 μ g Kreatin bestimmt (Abweichung 1.3 %).

DANK

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Bereitstellung von Sachmitteln zur Durchführung dieser Arbeit.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine dünnschichtchromatographische Trennung auf Zellulose für Guanidinderivate beschrieben, die es ermöglicht, sowohl Kreatinin als auch Kreatin von störenden Harninhaltsstoffen sicher abzutrennen. Die isolierten Stoffe können mit guter Reproduzierbarkeit quantitativ ermittelt werden. Kreatinin wird nach einer modifizierten Methode nach FOLIN mit einer Genauigkeit von $\pm 3\%$ bestimmt. Für die Kreatinbestimmung wurde die Diacetylreaktion nach KANIG den Erfordernissen der Dünnschicht-Chromatographie entsprechend abgeändert. Hier beträgt die Genauigkeit $\pm 1.3\%$.

SUMMARY

A thin-layer chromatographic separation on cellulose for guanidine derivatives is described. It is possible to completely resolve both creatinine and creatine from interfering urine constituents. The isolated substances can be determined quantitatively with good reproducibility. Creatinine was estimated by a modified FOLIN method with an accuracy of $\pm 3\%$. For the estimation of creatine the diacetyl reaction according to KANIG was modified to make it suitable for thin-layer chromatography. Here the accuracy is $\pm 1.3\%$.

LITERATUR

- 1 K. BEYERMANN, *Z. Anal. Chem.*, 205 (1964) 416. Diverse Literaturzitate.
 - 2 G. PAUMGARTNER, O. KRAUPP UND F. X. FISCHER, *Clin. Chim. Acta*, 8 (1963) 960.
 - 3 M. JAFFÉ, *Z. Physiol. Chem.*, 10 (1886) 391.
 - 4 O. FOLIN, *Z. Physiol. Chem.*, 41 (1904) 223.
 - 5 P. EGGLETON, S. R. ELSDEN UND N. GOUGH, *Biochem. J.*, 37 (1934) 526.
 - 6 J. RAAFLAUB UND J. ABELIN, *Biochem. Z.*, 321 (1950) 158.
 - 7 K. KANIG, *Z. Physiol. Chem.*, 306 (1957) 247.
 - 8 M. RINK UND S. HERRMANN, *J. Chromatog.*, 12 (1963) 249; *ibid.*, 12 (1963) 415.
 - 9 M. RINK UND A. GEHL, *J. Chromatog.*, 20 (1965) 415; *ibid.*, 21 (1966) 143.
 - 10 L. HALLMANN, *Klinische Chemie und Mikroskopie*, 9. Auflage, Thieme, Stuttgart, 1960, S. 571.
- J. Chromatog.*, 25 (1966) 80-86