

CHROM. 5519

Quantitative Analyse von Katecholamin- und Serotoninmetaboliten mittels Fluoreszenzlöschung auf der Dünnschichtplatte

Zur Erkennung gewisser hormonproduzierender Tumoren wie Phäochromozytome, Neuroblastome und Karzinoide ist es für den Arzt unerlässlich, die Bestimmung von Katecholamin- bzw. Serotoninabbauprodukten durchzuführen. Es wird eine Methode beschrieben, mit der es gelingt, 3-Methoxy-4-hydroxymandelsäure, 3-Methoxy-4-hydroxyphenylelessigsäure, 4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure und 5-Hydroxyindolessigsäure* aus dem Harn dünn-schichtchromatographisch zu trennen und die einzelnen Fraktionen quantitativ auf automatische Weise auszuwerten. Hierzu wird die von den Komponenten erzeugte Fluoreszenzlöschung auf Kieselgel-F₂₅₄-Platten, Schichtdicke 0.25 mm, der Fa. E. Merck, Darmstadt, mit dem Camag-Scanner¹ in Kombination mit dem Zeiss-Spektralphotometer PMQ II gemessen.

Gegenüber den bisher bekannten Verfahren weist diese Methode wesentliche Vorteile auf. Anstelle der Identifizierung der Substanzen durch Besprühen mit Farb-reagenzien und semiquantitativer Auswertung nach Grösse und Intensität der Flecken im Vergleich mit ebenfalls aufgetragenen Standardlösungen oder durch Abkratzen der Flecken und photometrische Auswertung des Eluates²⁻⁴, zeichnet sich die neue Methode durch eine relativ geringe Standardabweichung von 5 % aus. Da die aufgetragenen Mengen kleiner gehalten werden können als früher, ergibt sich daraus auch eine bessere Trennung.

Methode

Harnaufarbeitung. 1/50 des 24-h-Harnes, auf eine Vorlage von 10 ml konz. Salzsäure gesammelt, wurde auf pH 2 eingestellt, mit NaCl gesättigt und dreimal mit dem 1 1/2-fachen Volumen Äthylazetat oder Diäthyläther ausgeschüttelt⁵. Die vereinigten Extrakte wurden über wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet und im Spitzkölbchen bei 40° zur Trockene eingengt.

Chromatographie. Der Rückstand wurde in 1 ml Äthanol gelöst, davon 2 µl punktförmig mit einer Camag-Mikropipette auf eine Kieselgel-F₂₅₄-Dünnschichtplatte aufgetragen. Auf dieselbe Platte wurden auch die zur quantitativen Auswertung notwendigen Standardlösungen aufgetragen. Als günstigstes Laufmittel erwies sich nach unserer Erfahrung ein Gemisch von *n*-Propanol - Äthylazetat - 25 % Ammoniak (45:30:25) (Ref. 6). Entwickelt wurde in einer Camag-Sandwichkammer, bei einer Laufstrecke von 10 cm. Die Reinsubstanzen erschienen in folgender Reihenfolge: VMS ($R_F = 0.30$), VS ($R_F = 0.31$), HVS ($R_F = 0.38$), 5-HIES ($R_F = 0.50$). Es ist darauf zu achten, dass die R_F -Werte im Chromatogramm eines Harnextraktes etwas erniedrigt erscheinen.

Entnahme der Chromatogramme. Die Anregung des Fluoreszenzindikators erfolgte durch eine Quecksilberlampe mit Quarzkondensator. Die Anregungswellenlänge von 254 nm wurde durch ein entsprechendes UV-Filter ausgesondert. Die optimale Fluoreszenz des Indikators, die nach unseren Messungen bei 500 nm liegt, wurde mittels des Monochromators eingestellt. Die Blendenöffnung des Mono-

*Abkürzungen: 3-Methoxy-4-hydroxymandelsäure (Vanillinmandelsäure = VMS); 3-Methoxy-4-hydroxyphenylelessigsäure (Homovanillinsäure = HVS); 4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure (Vanillinsäure = VS) und 5-Hydroxyindolessigsäure = 5-HIES.

chromators betrug bei allen Messungen 2.0 mm. Vor jeder Messung wird die Skala mittels Verstärker bei geschlossener Blende auf 0% Emission und bei offener Blende eine substanzfreie Zone der DC-Platte auf 100% Emission adjustiert. Der Messbereich am Ausgang des Verstärkers beträgt 5 mV. Die Abmessungen des Lichtbündels auf der DC-Platte waren 12×2 mm. Der Messvorschub des Scanners lag bei 40 mm/min. Bei der automatischen Registrierung ist darauf zu achten, dass in der Laufrichtung des Laufmittels gemessen wird und nicht senkrecht dazu, da nur dann die durch mitaufsteigende Verunreinigungen meist erhöhte Null-Linie richtig erfasst wird (Fig. 1).

Resultate und Diskussion

Fig. 1 gibt das Chromatogramm eines Harnextraktes wieder, wie es durch einen Schreiber, Messbereich 5 mV, Papiervorschub 30 mm/min, unmittelbar aufgezeichnet wurde. Die einzelnen Komponenten gehen aus der Abbildungsunterschrift hervor. Nach unserer Erfahrung ist es kaum möglich im alkalischen Laufmittel VMS und VS zu trennen. Eine bessere Trennung wird erreicht, wenn anschliessend 12–15 cm mit einem sauren Laufmittel, wie z.B. Benzol–Eisessig–Methanol (70:20:10) (Ref. 6) in derselben Laufrichtung entwickelt wird. Zuerst müssen jedoch die an der Luft getrockneten Platten unbedingt durch mindestens zwei- bis dreistündiges Lagern regeneriert werden, um Verzerrungen des Chromatogrammes zu vermeiden.

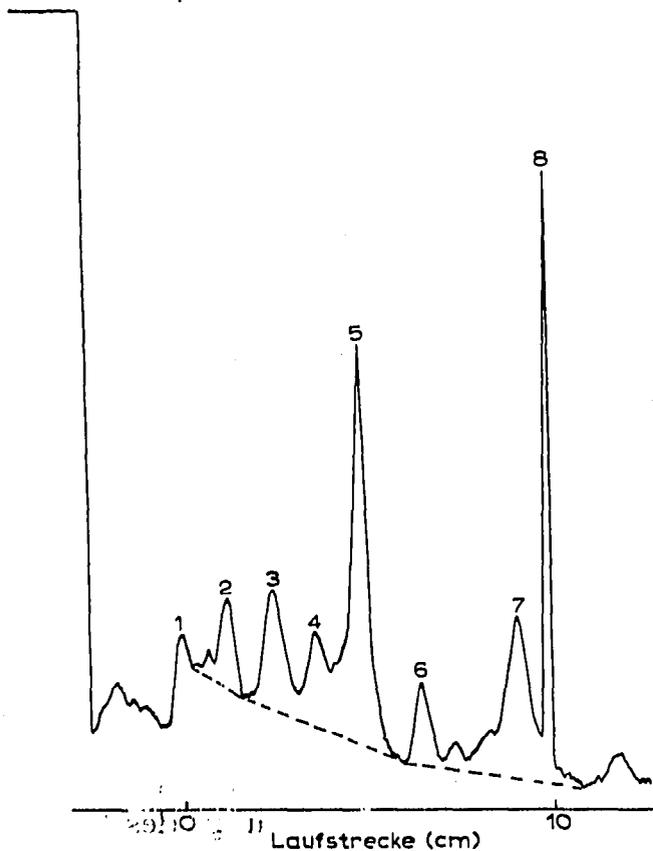


Fig. 1. Chromatogramm eines Harnextraktes bei Fluoreszenzlöschung. 1 = Auftragsstelle; 2 = VMS; 3 = VMS (VS; unmittelbar danach, ist nicht vorhanden); 4 = HVS; 5 = 5-HICS; 6 = unbekannte Substanzen; 7 = Verunreinigungen an der Front; 8 = Front.

Die quantitative Auswertung erfolgt durch Berechnung der Peakflächen über das Produkt aus Höhe und Halbwertsbreite. Die Abhängigkeit der gemessenen Flächen F von den aufgetragenen Mengen m kann bei Absorption und Fluoreszenzlöschung näherungsweise durch folgende quadratische Beziehung wiedergegeben werden^{1,7,8}:

$$F^2 = k \cdot m \quad (1)$$

bzw. nach Einführung der entsprechenden Größen F_{st} und m_{st} eines Standards:

$$m_x = \frac{F_x^2}{F_{st}^2} \cdot m_{st} \quad (2)$$

Fig. 2 zeigt die nach Gl. 1 gefundenen Geraden für VMS, HVS und 5-HIES bei der Auftragung von F^2 gegen m .

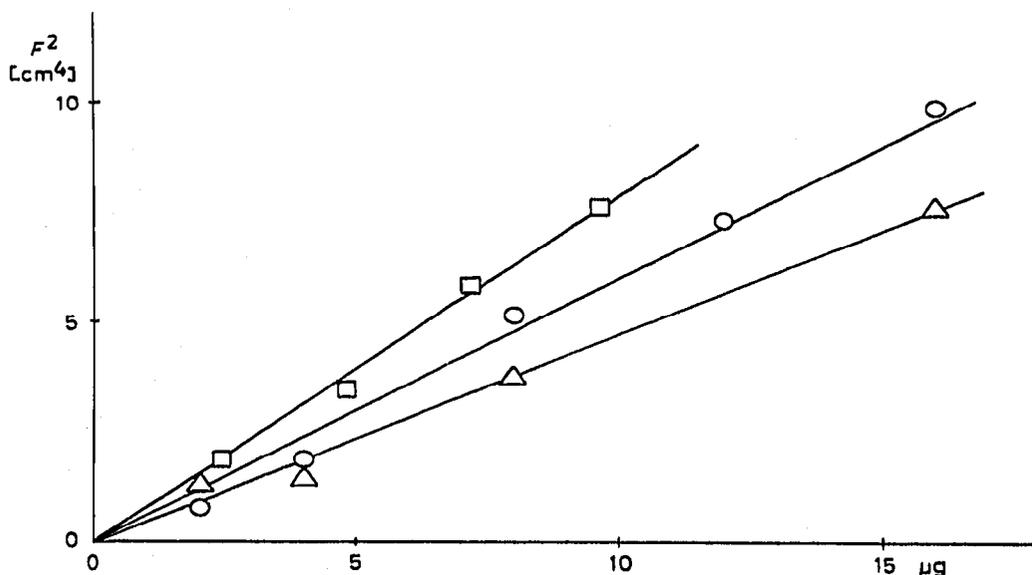


Fig. 2. Eichkurve bei Fluoreszenzlöschung. Δ , HVS; \circ , 5-HIES; \square , — VMS.

Gl. 1 gilt jedoch nur unter der Voraussetzung, dass die Gerade durch den Nullpunkt geht. Diese Bedingung war bei der VS nicht erfüllt, wie Fig. 3 zeigt. In solchen Fällen ist Gl. 1 in folgender modifizierter Form anzuwenden:

$$F^2 = k(m - m_0) \quad (3)$$

bzw. mit Standard:

$$\frac{F_x^2}{F_{st}^2} \cdot (m_{st} - m_0) + m_0 \quad (4)$$

m_0 bezeichnet hier das Korrekturglied, welches sich durch Extrapolation der Geraden mit der Nulllinie ergibt. Es kann als "hypothetische Nachweisgrenze" gedeutet

werden. Um Berechnungen nach Gl. 4 vornehmen zu können, empfehlen wir keine kleineren Mengen als $2 m_0$ auszuwerten.

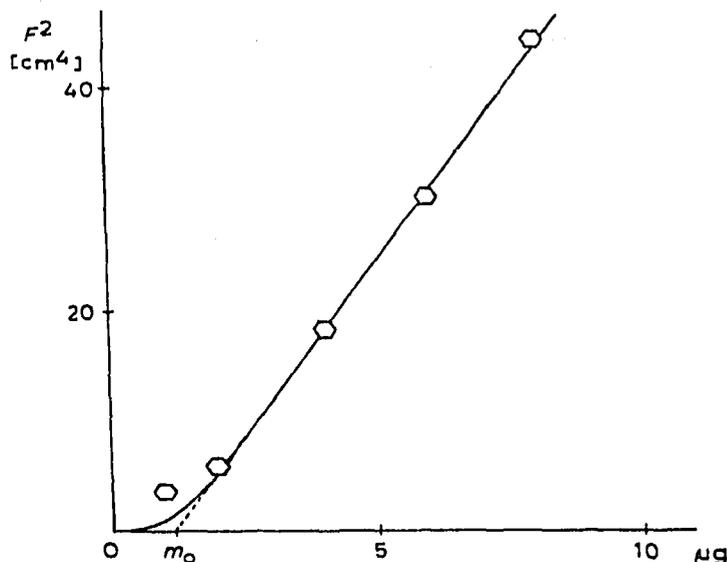


Fig. 3. Eichkurve bei Fluoreszenzlöschung für VS.

Die Ausscheidungsrate der Komponenten wird aus den aliquoten Anteilen der aufgetragenen Mengen und ihrer Wiedergewinnung bei der Extraktion berechnet⁵.

Aus den Steigungen der Geraden in Fig. 2 und 3 kann noch entnommen werden, dass die Konjugation der Carboxylgruppe zum Benzolring bei VS zu einer Zunahme der Empfindlichkeit bzw. der UV-Absorption bei 254 nm um den Faktor $\sqrt{10} = 3.2$ gegenüber HVS führt.

Die beschriebene Methode wird bereits mit Erfolg für die Laboratoriumsdiagnostik der eingangs genannten Krankheitsbilder eingesetzt.

Institut für Allgemeine und Experimentelle
Pathologie, Universität Innsbruck,
6020 Innsbruck (Österreich)

E. DWORZAK
H. HUCK

- 1 H. KEUKER, *Chromatographia*, 4 (1971) 40.
- 2 E. SCHMID UND N. HENNING, *Klin. Wochenschr.*, 41 (1963) 567.
- 3 E. SCHMID UND H. J. KÜSCHKE, *Ergeb. Laboratoriumsmed.*, 2 (1965) 175.
- 4 N. A. TAUTZ, G. VOLTMER UND E. SCHMID, *Klin. Wochenschr.*, 43 (1965) 233.
- 5 A. L. BARTLET UND F. M. GILBERT, *Clin. Chim. Acta*, 30 (1970) 559.
- 6 DR. MÜLLER-PLATHE, *Mitteilungen für den 13. Jahreskongress für Labormedizin, Kassel, 1967*.
- 7 W. SCHUNACK, E. EICH, E. MUTSCHLER UND H. ROCHELMEYER, *Arzneim. Forsch.*, 19 (1969) 1756.
- 8 W. SCHLEMMER, E. KAMMERL UND F. H. KLEMM, *Deut. Apoth. -Ztg.*, 110 (1970) 833.

Eingegangen am 4. Mai 1971

J. Chromatogr., 61 (1971) 162-165

angew.
ES)
(1971)