

CHROM. 6264

QUANTITATIVE ANALYSE VON KATECHOLAMIN- UND
SEROTONINMETABOLITEN AUF DER DÜNNSCHICHTPLATTE2. MITT. REMISSIONSMESSUNG NACH EINER SPEZIFISCHEN
PHOTOCHEMISCHEN REAKTION

H. HUCK UND E. DWORZAK*

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

(Eingegangen am 17. Juli 1972)

SUMMARY

*Quantitative analysis of catecholamine and serotonin metabolites on thin-layer plates.
II. Reflectance measurements after a specific photochemical reaction*

Urinary vanillylmandelic acid, homovanillic acid, vanillic acid and 5-hydroxy-indole-3-acetic acid were determined on silica gel layers by reflectance spectroscopy at 400 μm . After development with the solvent system benzene-glacial acetic acid-methanol (70:20:10) the plates were kept in diffuse daylight for two days to obtain yellow spots for the otherwise colourless substances. By this photochemical reaction aromatic carboxylic acids with (3-OCH₃, 4-OH)- and (3-OH, 4-OH)- substitution and indole-3-acetic acids were detected. The lower limit of detection was about 0.05 μg .

EINLEITUNG

In einer früheren Arbeit¹ beschrieben wir die dünnschichtchromatographische (DC) Bestimmung von Vanillylmandelsäure (VMS), Homovanillinsäure (HVS), Vanillinsäure (VS) und 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIES) aus dem Urin durch Messung der von den Komponenten auf Kieselgel-F₂₅₄-Platten erzeugten Fluoreszenzlöschung. Routineuntersuchungen zeigten jedoch, dass sowohl bei der Fluoreszenzlöschung (Anregung bei 254 $m\mu$, Emission bei 500 $m\mu$) als auch bei der UV-Remission bei 280 $m\mu$, die einander sehr ähnliche Chromatogramme ergeben, Störungen durch Überlagerung mit anderen Substanzen vorkamen. Da es nicht möglich ist, durch DC-Trennung die Vielzahl der im Urin vorkommenden Substanzen zu separieren, ergab sich die Notwendigkeit, die unspezifische Fluoreszenzlöschung bzw. UV-Remission durch eine spezifische Reaktion zu ersetzen.

* Gegenwärtige Adresse: Institut für Biochemie und Experimentelle Krebsforschung, Universität Innsbruck, Österreich.

Als geeignet erwies sich eine photochemische Reaktion, die beim Lagern der DC-Platten im Tageslicht auftrat, wobei die genannten Säuren in gelbe Verbindungen übergeführt werden. Eine ähnliche Umwandlung wurde auch von KNOLL *et al.*² bei UV-Remissionsmessungen von HVS durch die Zunahme des Absorptionskoeffizienten beobachtet. Da diese Reaktion bei Anwesenheit von 2-Mercaptoäthanol als Antioxydationsmittel nicht stattfand, wurde sie als Photooxydation gedeutet.

Von einer weiteren Möglichkeit der DC-Direktauswertung nach Anfärbung von VMS, HVS, VS und 5-HIES durch Sprühreagenzien^{3,4} wurde in dieser Arbeit kein Gebrauch gemacht.

Es wurden ausschliesslich saure Laufmittel verwendet, da die ammoniakalischen Laufmittel, die sich für die Papierchromatographie von Phenolsäuren und Indole bewähren⁵, bei der Eluierung von 5-HIES auf Kieselgel zu lang ausgezogenen Tailings führen und daher ungeeignet sind.

DIE PHOTOCHEMISCHE REAKTION

Die mit je 2 μg VMS, HVS, VS und 5-HIES durchgeführten qualitativen Untersuchungen ergaben, dass bei der photochemischen Reaktion immer nur ein Reaktionsprodukt gebildet wurde. Die R_F -Werte waren gegenüber den Ausgangssubstanzen kaum verändert. Sie betragen auf DC-Fertigplatten von Kieselgel F₂₅₄ (Merck), Schichtdicke 0.25 mm, mit Benzol-Eisessig-Methanol (70:20:10) (Laufmittel A)¹ für VMS, 5-HIES, HVS und VS vor der Oxydation 0.20, 0.44, 0.67 und 0.74, nach der Oxydation 0.22, 0.51, 0.69 und 0.73. Das Dimere von HVS, welches durch Oxydation mit $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ erhalten wurde⁶, hatte vergleichsweise einen R_F -Wert von 0.47. Es liegt demnach nicht vor.

Nicht umgesetzt wurden die O-Acetylderivate der genannten Phenolsäuren, ein Hinweis dafür, dass die phenolischen OH-Gruppen an der Reaktion beteiligt sind.

Zur Überprüfung der Selektivität wurden die in Tabelle I mit zunehmenden R_F -Wert aufgeführten Säuren untersucht. Von den im Urin vorkommenden Säuren reagieren demnach die Benzyl- und Phenylcarbonsäuren mit einer (3-OCH₃, 4-OH)- oder einer (3-OH, 4-OH)-Substitution. Alleinige 3-OH- oder 4-OH-Substitution führt zu keiner Reaktion. Eine analoge Reaktion zeigten auch die entsprechenden Phenole

TABELLE I

R_F -WERTE UND FARBREAKTION EINIGER PHENOL- UND INDOLCARBONSÄUREN AUS DEM URIN
Schicht: Kieselgel F₂₅₄ (Merck). Laufmittel: Benzol-Eisessig-Methanol (70:20:10).

Substanz	R_F -Wert	Farbe nach Belichtung
4-Hydroxymandelsäure	0.17	—
Vanillylmandelsäure	0.20	gelb
3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure	0.35	gelb
5-Hydroxyindolessigsäure	0.44	gelb
4-Hydroxyphenylelessigsäure	0.60	—
3-Hydroxybenzoesäure	0.65	—
Homovanillinsäure	0.67	gelb
Indolessigsäure	0.72	orange
Vanillinsäure	0.74	gelb
Ferulasäure	0.77	gelb-orange

Guajacol und Brenzcatechin. Keine Reaktion gaben *o*- und *p*-Kresol. Daraus geht hervor, dass zur phenolischen OH-Gruppe eine weitere OH- oder OCH₃-Gruppe benachbart sein muss. Neben diesen Katecholaminmetaboliten geben auch die Indolcarbonsäuren, deren wichtigster Vertreter 5-HIES als Metabolit des Serotonins ist einen positiven Reaktion. Die Zeitdauer der Reaktion ist mengenabhängig. Bei Aufgaben bis zu 2 μg wurden im diffusen Tageslicht maximale Intensitäten der Gelbfärbung nach zwei Tagen erreicht. Eine Auswertung bei geringerer Intensität nach nur eintägigem Lagern der Platten war nicht möglich, da die Streuung der Werte wegen unterschiedlicher Anlaufzeiten der Reaktion noch gross ist. Die Absorptionsmaxima der gelben Reaktionsprodukte sind gegenüber den Ausgangssubstanzen in den längerwelligen UV-Bereich verschoben. Um Interferenzen mit anderen Substanzen möglichst zu vermeiden, wurden sämtliche Remissionsmessungen bei nur wenig verminderter Empfindlichkeit im beginnenden sichtbaren Bereich bei 400 $m\mu$ durchgeführt. Fig. 1 zeigt die für Remissionsmessungen typischen Eichkurven von VMS, HVS und 5-HIES. VS hat fast denselben Verlauf wie HVS. Es wurden jeweils 2 μl verschiedener konzentrierter äthanolischer Lösungen aufgetragen und danach wie unter Analysenbedingungen verfahren. Ausgewertet wurde die Peakfläche F als Höhe mal Halbwertsbreite, die bis zu etwa 1.5 μg proportional mit der Menge m zunimmt. Auch die Peakhöhen nehmen in diesem Bereich unter der Voraussetzung gleicher Aufgabevolumina proportional mit der Menge zu, mit der Ausnahme von VMS, da deren Peaks asymmetrisch sind. Bei der Durchführung von quantitativen Analysen beschränkten wir uns auf den analytisch interessanten Bereich von 0.1–1 μg . Auf die Anwendung

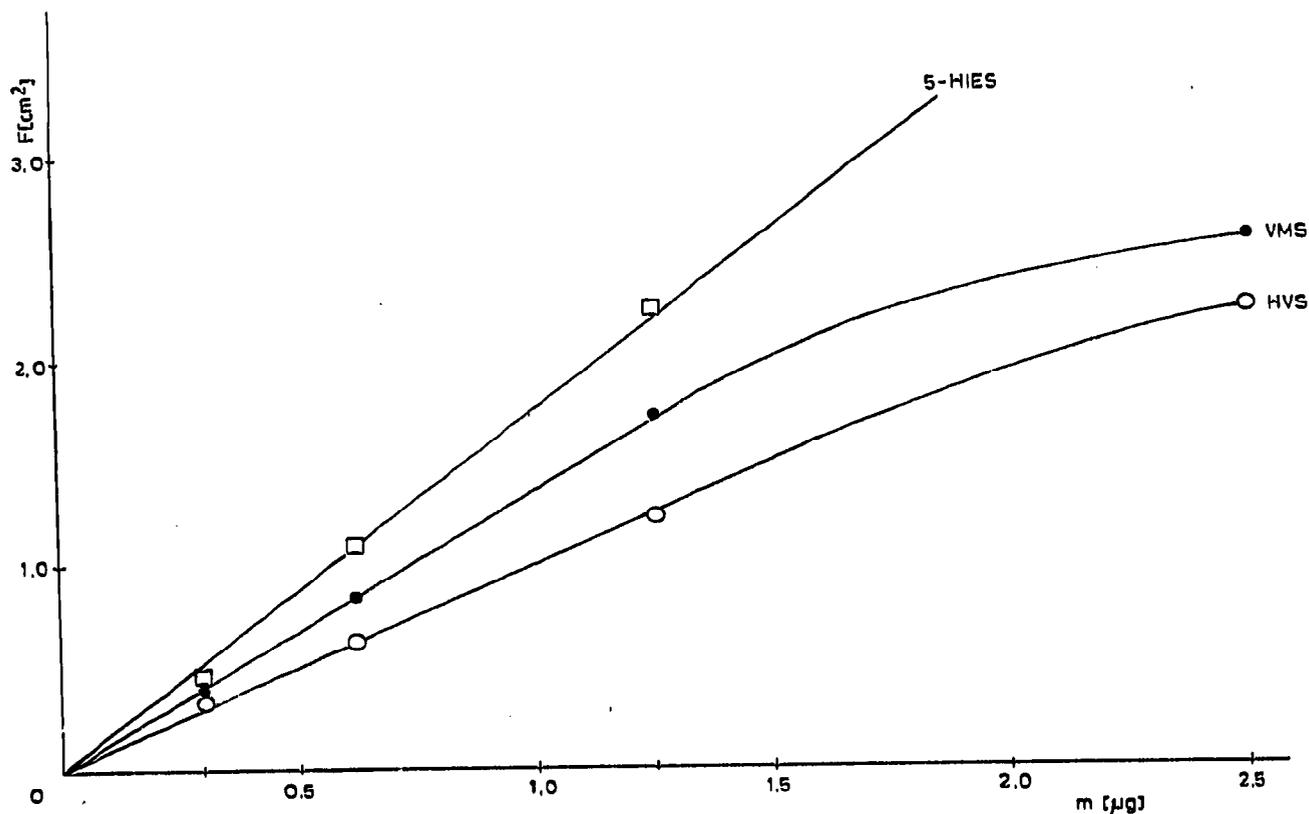


Fig. 1. Eichkurve der Remissionsmessung als Peakfläche gegen Menge.

von Näherungsformeln konnten wir daher verzichten. Die des öfteren angewandten Auftragungen von F^2/m und F/\sqrt{m} haben den Nachteil, vielfach nicht durch den Koordinatennullpunkt zu gehen. Ausserdem wird F^2/m erst bei grösseren Probenmengen ($> 1 \mu\text{g}$) linear, die sich jedoch nachteilig für die Trennung auswirken.

ANWENDUNG DER METHODE

Die beschriebene Methode wurde zur Routinebestimmung von VMS und 5-HIES aus dem Urin herangezogen. Hierzu wurden 1/50 des 24-Std.-Harnes, der unter Zugabe von 10 ml konz. HCl gesammelt worden war, mit konz. HCl auf pH 2 eingestellt, mit NaCl gesättigt und dreimal mit dem 1.5-fachen Volumen Äthylacetat ausgeschüttelt. Die vereinigten Extrakte wurden über Na_2SO_4 getrocknet und im Spitzkölblein bei 40° im Vakuumtrockenschrank zur Trockene eingeengt.

Als Vergleichsgemisch diente eine äthanolische Lösung mit 0.5 mg/ml je Komponente. Hiervon wurden 1 ml als innerer Standard zu einem Normalharn gegeben, der wie beschrieben aufgearbeitet wurde. Die Trockenrückstände wurden in 1 ml Äthanol gelöst, davon $4 \mu\text{l}$ ($2 \times 2 \mu\text{l}$) bzw. $2 \mu\text{l}$ der Standardlösung punktförmig auf eine Kieselgelplatte aufgetragen und in einer Trogkammer mit dem Laufmittel A nahezu bis zum oberen Plattenrand entwickelt. Zur Aufnahme diente wie bei früheren Messungen¹ ein Camag-Z-Scanner in Kombination mit einem Zeiss-Spektralphotometer PMQ II. Die Geräteeinstellung war folgende: Wellenlänge $400 \text{ m}\mu$, Blendenöffnung des Monochromators und des Scanners je 1 mm, ausgeblendete Bandbreite auf der DC-Platte 10 mm, Messvorschub 40 mm/min , Papiervorschub 30 mm/min , Schreiberbereich 5 mV. Die elektrische Anzeige der Remission einer substanzfreien Zone wurde durch den Nullpunktsabgleich des Schreibers soweit wie möglich kompensiert, um die maximal mögliche Verstärkung zu erzielen. Gegenüber der sonst üblichen Null- bzw. 100%-Einstellung konnte hiermit die Empfindlichkeit auf das Doppelte gesteigert werden.

Die erforderlichen Messbahnen wurden unter der UV-Lampe eingestellt. Wir möchten hier darauf aufmerksam machen, dass keiner der zahlreichen durch Fluoreszenzlöschung angezeigten dunklen Flecken den hier zu bestimmenden Substanzen zugeordnet werden kann. Diese werden erst durch die Gelbfärbung sichtbar.

ERGEBNISSE

Chromatogramme

Der obere Kurvenzug von Fig. 2 gibt ein Chromatogramm eines Harnextraktes wieder, welches durch Remissionsmessung bei $280 \text{ m}\mu$ erhalten wurde. Darunter befindet sich das Chromatogramm der gelben Reaktionsprodukte, gemessen bei $400 \text{ m}\mu$ und gleicher Empfindlichkeitseinstellung. Die starke Überlagerung bei UV-Remission erkennt man bei der Gegenüberstellung der beiden Chromatogramme. So tritt beispielsweise 5-HIES im oberen Chromatogramm nur als kleine Schulter eines wesentlich grösseren Peaks auf. Das untere Chromatogramm hingegen zeigt eine vollständige Trennung an. Die Peakhöhe von 13 mm entspricht einer Aufgabemenge von $0.4 \mu\text{g}$, entsprechend einem Normalwert von 5 mg/24 Std. Die R_F -Werte der Vergleichssubstanzen und der aus dem Urinextrakt isolierten Substanzen stimmen überein. Bei einigen wenigen Proben trat auch nach der Gelbfärbung eine Überlagerung

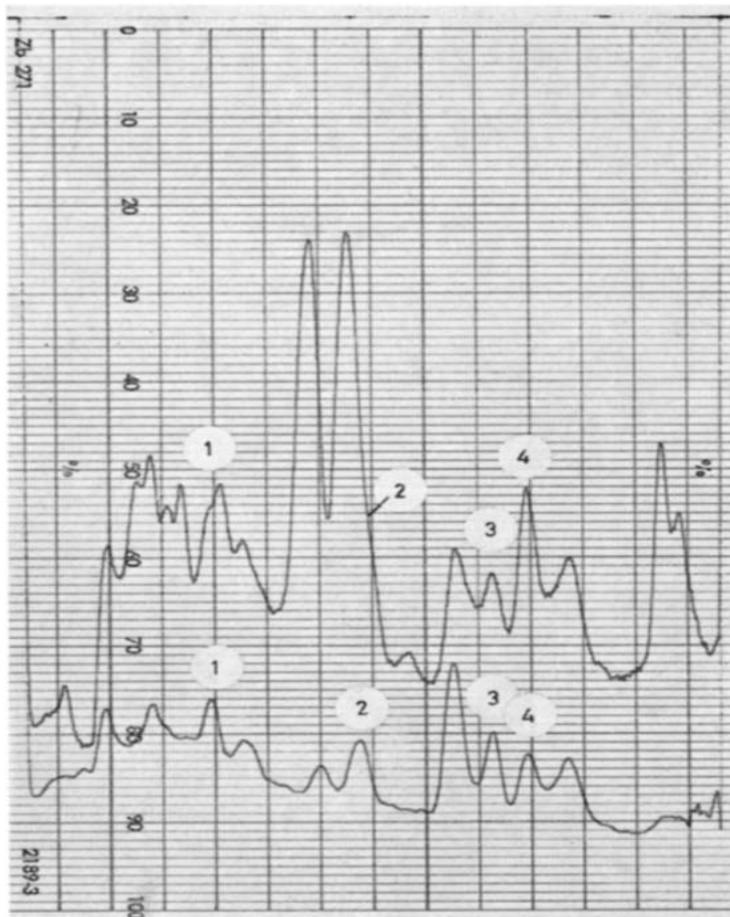


Fig. 2. Chromatogramme eines Harnextraktes durch Remissionsmessung bei 280 m μ (oberer Teil) und 400 m μ (unterer Teil). Laufmittel A. 1 = VMS; 2 = 5-HIES; 3 = HVS; 4 = VS.

von 5-HIES auf (Fig. 3). Durch Subtraktion der links vom Maximum liegenden Peakhälfte von der rechten überlagerten Peakhälfte nach dem Planimetrieren derselben wurde wieder ein im Normalbereich liegender Wert erhalten. Zuverlässigere Werte werden in solchen Fällen jedoch durch Rechromatographie mit dem Laufmittel B, Diisopropyläther-Eisessig (95:5), erhalten. Fig. 4 zeigt die erfolgte Abtrennung der störenden Begleitsubstanz, die nun relativ zu 5-HIES einen höheren R_F -Wert hat und unmittelbar nach HVS erscheint. Die quantitative Bestimmung ergab einen Normalwert von 5.7 mg/24 Std. Aus Fig. 4 geht noch hervor, dass hier auch die UV-Remission bei 280 m μ 5-HIES ohne Überlagerung wiedergab. Mit dem Laufmittel B wurden auf Kieselgel folgende R_F -Werte ermittelt: VMS, 0.02; 5-HIES, 0.27; HVS, 0.36; VS, 0.54.

Auswertung

Da im proportionalen Bereich der Remissions/Konzentrations-Kurve (Kubelka-Munk-Funktion) gearbeitet wurde, konnte die Aufgabemenge nach folgender einfacher Formel berechnet werden

$$m_X = m_{st} F_X / (F_{st} - F_X)$$

wobei m_X die Menge der aufgegebenen Substanz X darstellt, F_X deren Peakfläche,

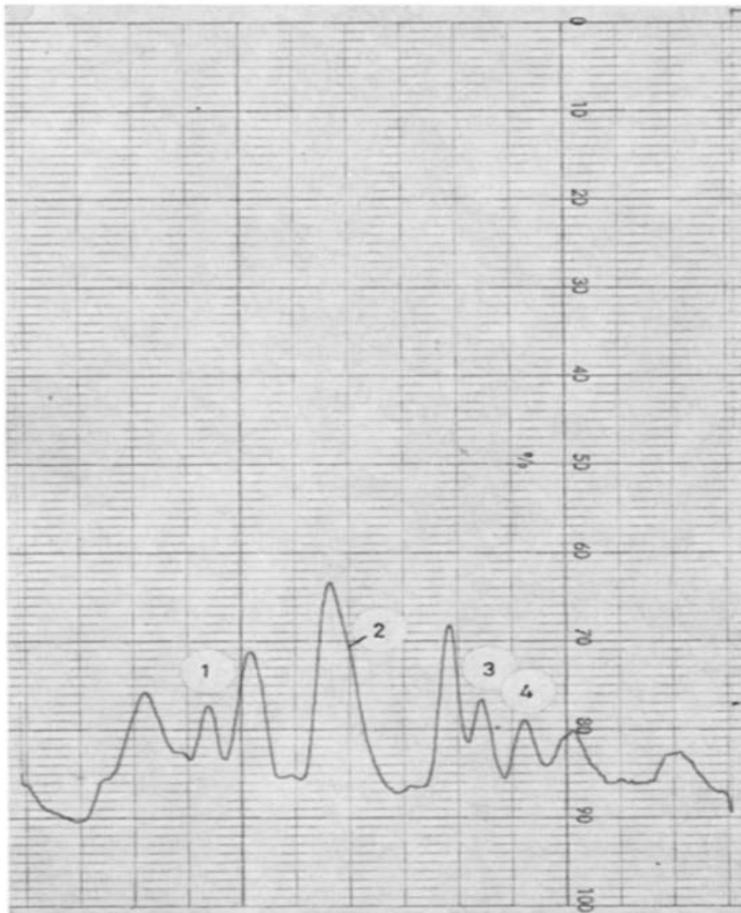


Fig. 3. Chromatogramm eines Harnextraktes durch Remissionsmessung bei $400\text{ m}\mu$. Laufmittel A. 1 = VMS; 2 = 5-HIES; 3 = HVS; 4 = VS.

F_{st} und m_{st} die entsprechenden Grössen für deren inneren Standard sind. F_{st} und F_x beziehen sich auf gleiche Aufgabevolumina. Die Ausscheidungsrate wird aus den aliquoten Anteilen der aufgetragenen Mengen berechnet. Bei symmetrischen Peaks und gleichen Aufgabevolumina für Standard und Probe können anstelle der Peakflächen auch die Peakhöhen eingesetzt werden.

Richtigkeit

Die Wiederfindung wurde aus dem Verhältnis der Peakflächen von inneren und äusseren Standards bestimmt. Es wurden hierzu für VMS, HVS, VS und 5-HIES je eine Doppelbestimmung mit einer Aufgabemenge von $1\ \mu\text{g}$ durchgeführt. Die Wiederfindung aller Säuren lag bei durchschnittlich $76 \pm 3\%$. Da die Auswertung jedoch auf innere Standards bezogen wurde, geht die Wiederfindung nicht in die Rechnung ein.

Die Reproduzierbarkeit der Remissionsmessung betrug für die Reinsubstanzen $\pm 4.7\%$ bei $1\ \mu\text{g}$ und $\pm 6.3\%$ bei $0.3\ \mu\text{g}$ Aufgabe. Zur Bestimmung der Gesamtstreuung des vollständigen Analysenganges wurde von Urinproben mit inneren Standards ausgegangen und je $1\ \mu\text{g}$ Substanz aufgetragen. Die Standardabweichung betrug dann $\pm 8.6\%$, sie war demnach gegenüber den Reinsubstanzen um $\pm 3.7\%$ erhöht.

Als Nachweisgrenze kann bei 5-HIES etwa $0.05\ \mu\text{g}/\text{Fleck}$ angegeben werden,

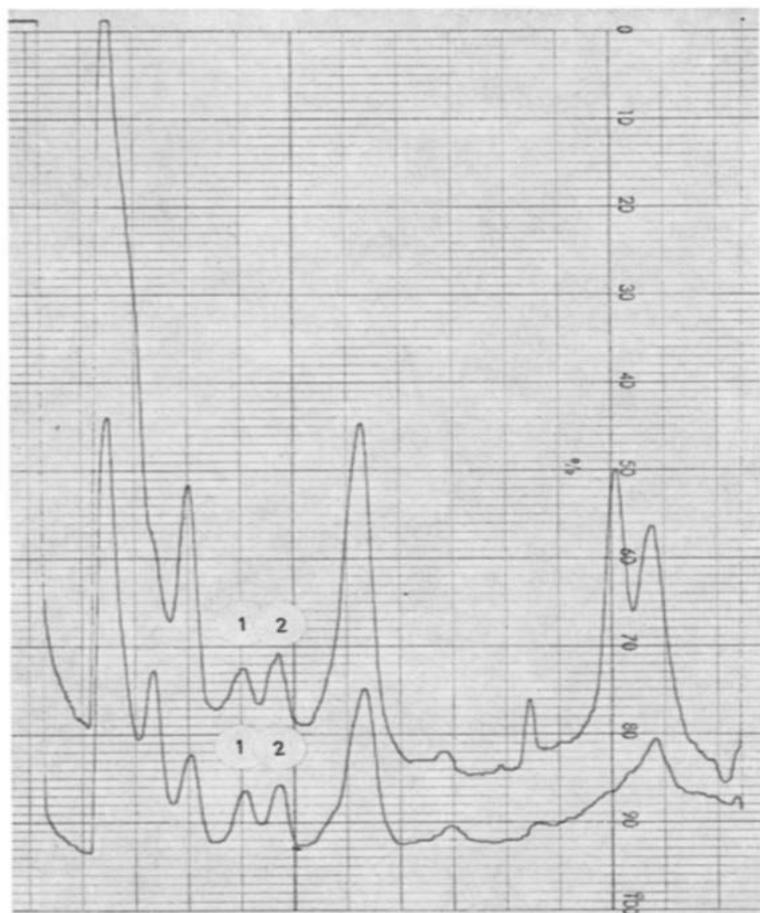


Fig. 4. Rechromatographie des Harnextraktes der Fig. 3 mit dem Laufmittel B. Remissionsmessungen bei 280 $m\mu$ (oberer Teil) und 400 $m\mu$ (unterer Teil). 1 = 5-HIES; 2 = HVS.

was bei der beschriebenen Arbeitsweise 0.6 mg/l Urin entspricht. Die Phenolcarbonsäuren werden mit etwas geringerer Empfindlichkeit angezeigt.

DISKUSSION

Als Nachteil der beschriebenen photochemischen Reaktion ist ihre geringe Reaktionsgeschwindigkeit anzusehen. Demgegenüber steht ihre gute Spezifität und die relativ geringe Aufwendigkeit der Methode. Bei über 100 an Normalpersonen durchgeführten Bestimmungen von VMS und 5-HIES wurden immer die bekannten Normalwerte gefunden. Diese betragen im einzelnen^{7,8}: VMS < 10, HVS 3-8, VS < 5 und 5-HIES 2-10 mg/24 Std. Auch treten keine zusätzlichen Nullinienschwankungen auf, wie bei der Anwendung von Sprühreagenzien. Die Stabilität der Nulllinie und die Empfindlichkeit können durch eine leere DC-Platte als Hintergrund noch verbessert werden⁹.

Eine weitere Möglichkeit der Anfärbung ohne Sprühreagenzien besteht darin, die DC-Platte im Trog Stickoxyden auszusetzen. Innerhalb weniger Sekunden entstehen gelbe Produkte. Da diese Reaktion aber weniger selektiv ist als die Luftoxydation, wurde sie nicht verwendet.

Die Qualität der Chromatogramme konnte noch gesteigert werden, wenn der Urin mit NaHCO_3 alkalisiert und die Neutralsubstanzen und Phenole dreimal mit dem gleichen Volumen Essigester ausgeschüttelt wurden⁵. Die Carbonsäuren wurden anschliessend bei pH 2 aus dem Urin extrahiert wie beschrieben.

Hohe Feuchtigkeitsgehalte der Luft im Sommer stören die DC-Trennung im Trog, da sie eine irreguläre Entmischung der mobilen Phase hervorrufen. In solchen Fällen bewährte sich der Einsatz einer Camag Vario-KS-Kammer¹⁰. Hierzu wurde der Konditioniereinsatz mit dem hygroskopischen Fließmittel gefüllt und die Platte vorbedampft, um ihr die schädliche Feuchtigkeit zu entziehen. Die notwendige Vorbedampfungszeit richtet sich nach dem Feuchtigkeitsgehalt der Luft. Bei einer eingestellten relativen Feuchte von 86% bei 20° betrug die erforderliche Vorbedampfungszeit 20 min. Bereits bei 56% relativer Feuchte konnte ohne Vorbedampfung bei offenem Schieber zwischen Konditioniereinsatz und Platte entwickelt werden. Es werden dann Chromatogramme erhalten, die jenen aus dem Trog bei niedrigen Feuchtigkeitsgehalten entsprechen. Das Entwickeln unter dem Einfluss der Konditionierflüssigkeit verhindert auch die Ausbildung einer störenden β -Front.

DANK

Wir danken Frl. J. HERMSEN für die Durchführung der Analysen.

ZUSAMMENFASSUNG

Aus dem Urin wurden Vanillylmandelsäure, Homovanillinsäure, Vanillinsäure und 5-Hydroxyindolessigsäure durch dünn-schichtchromatographische Remissionsmessung bei 400 μm bestimmt. Nach der Entwicklung mit dem Laufmittelgemisch Benzol-Eisessig-Methanol (70:20:10) wurden die Kieselgelplatten zwei Tage im diffusen Tageslicht aufbewahrt, wobei sich die sonst farblosen Substanzen gelb verfärbten. Bei dieser photochemischen Reaktion werden aromatische Carbonsäuren mit (3-OCH₃, 4-OH)- und (3-OH, 4-OH)-Substitution und Indol-3-Essigsäuren angezeigt. Die Nachweisgrenze lag bei etwa 0.05 μg .

LITERATUR

- 1 E. DWORZAK UND H. HUCK, *J. Chromatogr.*, 61 (1971) 162.
- 2 E. KNOLL, H. WISSER UND D. STAMM, *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, 9 (1971) 478.
- 3 E. STAHL, *Dünn-schichtchromatographie*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1967.
- 4 *DC-Trennung von Katecholamin- und Serotoninmetaboliten im Harn*, E. Merck AG, Darmstadt, Druckschrift Nr. 5970/2/1069.
- 5 W. BORSCHEL, F. HARTMANN, V. HEIMSOOTH UND W. RUGE, *Klin. Wochenschr.*, 42 (1964) 927.
- 6 H. CORRODI UND B. WERDINIUS, *Acta Chem. Scand.*, 19 (1965) 1854.
- 7 *Documente Geigy, Wissenschaftliche Tabellen*, 7. Aufl., Ciba-Geigy AG, Basel, 1968.
- 8 *Klinisches Labor, II. Auflage der medizinisch-chemischen Untersuchungsmethoden*, E. Merck AG, Darmstadt, 1970.
- 9 R. W. FREI, *J. Chromatogr.*, 64 (1972) 285.
- 10 F. GEISS UND H. SCHLITT, *Chromatographia*, 1 (1968) 387, 392.

J. Chromatogr., 74 (1972) 303-310