

CHROM. 6828

QUANTITATIVE ANALYSE DER δ -AMINOLÄVULINSÄURE AUS NATIVEN URINPROBEN MITTELS DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

G. KUFNER und H. SCHLEGEL

Werksärztlicher Dienst, Daimler-Benz AG, Werk Sindelfingen, 7032 Sindelfingen (B.R.D.)

(Eingegangen am 11. Oktober 1972; geänderte Fassung am 18. April 1973)

SUMMARY

Quantitative analysis of δ -aminolaevulinic acid in native urine samples by thin-layer chromatography

A method for the quantitative determination of 5-aminolaevulinic acid in non-pretreated urine samples by means of one-dimensional thin-layer chromatography is described. The free amino acid is transformed by dry heating in the presence of ethyl acetoacetate into the corresponding pyrrole, the isolation of which is carried out in a tetrachloromethane-methanol system. The quantitation is based on the modified Ehrlich reaction according to Mauzerall and Granick. In comparison with their method, there was a correlation coefficient $r=0.986$. The accuracy and precision are well within the 5% range.

EINLEITUNG

Seit der ersten Veröffentlichung von Haeger¹ im Jahre 1957 über das Vorkommen von δ -Aminolävulinsäure (ALA) im Urin —als Zeichen einer durch Blei verursachten Häm-synthesestörung— war der von ihr benützte säulenchromatographische Nachweis, den Mauzerall und Granick² ein Jahr zuvor beschrieben hatten, allgemein als Standardmethode im Gebrauch. Vereinfachende Modifikationen, welche die präventivmedizinische ALA-Bestimmung im Rahmen ausgedehnter Reihenuntersuchungen erleichtern sollten, so vor allem die von Grabecki *et al.*³ ausgearbeitete Reagenzglas-methode, konnten den geforderten Ansprüchen an Spezifität und Richtigkeit nicht genügen, weshalb auch die letztgenannten Autoren im eigenen Laboratorium weiterhin nach der Originalmethode arbeiteten⁴. Andererseits erwies sich die Verwendung vorgefertigter Säulen⁵ als für den Masseneinsatz zu kostspielig. Aus diesem Grunde suchten wir nach einer präparativ einfachen und zugleich methodisch exakten Nachweismöglichkeit für ALA in unbehandelten Urinproben. Wir entwickelten zunächst eine dünn-schichtchromatographische Screeningmethode nach dem im folgenden zu erläuternden Prinzip. Sie gestattet eine semiquantitative Abschätzung des ALA-Gehaltes der Proben mit dem Ziel, unnötig viele quantitative Bestimmungen zu vermeiden⁶. Die nachfolgende Beschreibung der quantitativen Bestimmung soll zugleich die Gültigkeit der Screeningmethode aufzeigen.

METHODIK*

Geräte

Hitzeschrank mit künstlicher Luftumwälzung (Horo 035); Dünnschichtchromatographie-Ausrüstung (Camag); 25- μ l Konstriktionspipette (Eppendorf); Spektral-Photometer (Beckman, Modell DB); Mikroküvetten ($d=2$ cm).

Substanzen

ALA-HCl (Fa. Schuchardt, München, B.R.D.). Nach Umkristallisation aus Diäthyläther-Methanol erwies sich die Substanz chromatographisch rein.

Aminoaceton. Synthese nach Gabriel und Colman⁷ (sehr hygroskopische Kristalle, bereits bei Zimmertemperatur zerfließend). Das Präparat war chromatographisch einheitlich.

Carbäthoxyppyrol. Synthese nach Mauzerall und Granick². Die Verbindung war chromatographisch einheitlich. Schmelzpunkt, 162.5°; Molgewicht, 221.15.

DMAB. p.a. (E. Merck, Darmstadt, B.R.D.).

Kieselgel H (Typ 60). Nach Stahl (E. Merck).

Lösungsmittel. Sämtliche von E. Merck, von p.a. Reinheitsgrad. Butanol-1, AEE, Methanol, Tetrachlorkohlenstoff, Eisessig 99–100%, Perchlorsäure 70%, Salzsäure 36% (etwa 12 N).

Lösungsmittelsysteme. Lösungsmittelsystem 1: Butanol-1–Eisessig (99–100%)–AEE–A.D. (1:1:1:1). Lösungsmittelsystem 2: Tetrachlorkohlenstoff–Methanol (70:30).

Elutionslösung (Essigsäure 15.7 N). A.D. 120 ml, Eisessig 99–100% ad 1000 ml. Überprüfung mittels Titration.

Modifiziertes Reagenz nach Mauzerall und Granick². DMAB (1 g) wird mit 30 ml Elutionslösung gelöst, 17 ml Perchlorsäure 70% hinzugefügt, mit Elutionslösung aufgefüllt ad 100 ml. Das so bereitete Reagenz wird sorgfältig gemischt und in etwa 3-ml Portionen abgefüllt (Tiefgefroren unbeschränkt haltbar). Das Reagenz wird vor Gebrauch auf Zimmertemperatur gebracht. Reste werden nach Gebrauch verworfen.

Sprühreagenz. DMAB (15 g), Salzsäure (6 N) ad 100 ml. (Treibgas: Stickstoff oder Pressluft.)

Stammlösung ($\cong 100$ mg/l ALA). ALA-HCl (12.78 mg), Methanol ad 100 ml oder 100 ml Natriumacetat-Puffer, pH 4.62 (1 M) (Bei 4° mindestens ein Jahr haltbar).

Standardlösung ($\cong 10$ mg/l ALA). Stammlösung (1.0 ml), A.D. ad 10 ml (wird vor Gebrauch frisch bereitet).

Sorptionsschicht. Kieselgel H wird mit A.D. (1:2.4) vermischt und als homogene Suspension auf entfetteten Glasplatten (20×20 cm) ausgestrichen. Schichtdicke: 0.3 mm. Zur Verwendung gelangen aktivierte Schichten (30 min bei 170°)⁸.

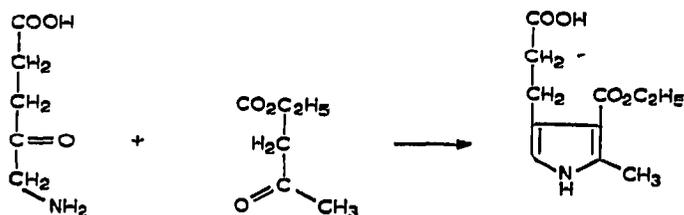
PRINZIP DER METHODE

Knorr-Synthese⁹ und Ehrlich'sche Reaktion

Auf Kieselgel kondensieren in trockener Hitze ALA und AEE zu einem

* Abkürzungen: ALA = δ -Aminolävulinsäure (4-Keto-5-amino-*n*-valeriansäure); ALA-HCl = Hydrochlorid der δ -Aminolävulinsäure; Carbäthoxyppyrol = 2-Methyl-3-carbäthoxy-4-(3-propionsäure)ppyrol; DMAB = *p*-Dimethylaminobenzaldehyd; A.D. = deionisiertes Wasser; AEE = Acetessigsäureäthylester.

Carbäthoxypyrrrol:



In einer wiederholten, eindimensionalen Dünnschichtchromatographie erfolgen Synthese und nachfolgende Abtrennung des Carbäthoxypyrrrols von interferierenden Begleitsubstanzen. Die freie α -Stellung des Pyrrols reagiert in einer typischen Ehrlich'schen Reaktion zu einem roten Farbsalz mit hohem Extinktionskoeffizienten. Diese Umsetzung erfolgt direkt mit dem Sprühreagenz und indirekt —für die quantitative Bestimmung— mit dem modifizierten Mauzerall und Granick-Reagenz.

DURCHFÜHRUNG UND BESTIMMUNG

In die Sorptionsschicht einer beschichteten Glasplatte werden 10 Bahnen à 2 cm eingeritzt (Bleistift), Nr. 1–10 (siehe Fig. 1). Der Auftragepunkt der jeweiligen Bahn ist 2.5 cm vom unteren Plattenrand entfernt. Die Laufstrecke beträgt 11 cm.

Einteilung der Bahnen

Nr. 1 und 10 sind Referenzbahnen; als Referenzprobe kann jede Urinprobe oder die Standardlösung verwendet werden. Je eine Bahn ist für Leerwert und Standard vorgesehen. Die übrigen 6 Bahnen werden für die zu analysierenden Urinproben verwendet.

Technik des Auftragens, der Chromatographie und des Transfers von Kieselgel

Nativer Urin (bzw. Standardlösung) (25 μ l) wird mit der Konstriktionspipette punktförmig in den Startpunkt aufgetragen (Durchmesser der entstandenen Startzone etwa 2 cm). Diese von der üblichen strichförmigen Auftragechnik abweichende Applikation ist hier gerechtfertigt, da diese Zone während den Entwicklungen weitgehend zu einer bandförmigen umgestaltet wird (siehe Fig. 1). Die gut luftgetrockneten Zonen (evtl. Föhn) werden anschliessend 5 min im Lösungsmittelsystem 1 chromatographiert. Die Lösemittelfront überfließt dabei etwa 2.5 cm, gerechnet vom Startpunkt. Des weiteren wird das nasse Chromatogramm 5 min im Hitzeschrank bei 145° exponiert. Das Abkühlen der Glasplatte erfolgt an einem vor direktem Sonnenlicht (UV-Licht) geschützten Ort. Die Handhabung der heissen Platten wird durch ALU-Schalen-Camag sehr erleichtert, zudem erfolgt gute Wärmeableitung; das Abkühlen des Glases wird dadurch beschleunigt.

Die zweite Chromatographie wird bei Raumtemperatur in äquilibrierter Atmosphäre (Filterpapierauskleidung des Entwicklungstanks) durchgeführt; Dauer etwa 40 min.

Nach kurzer Lufttrocknung werden die Bahnen Nr. 2–9 mittels Glasplatte abgedeckt und die Referenzbahnen mit dem Sprühreagenz entwickelt (siehe Fig. 1): Harnstoff erscheint prompt als gelbgefärbte Verbindung (R_F 0.32); etwas verzögert

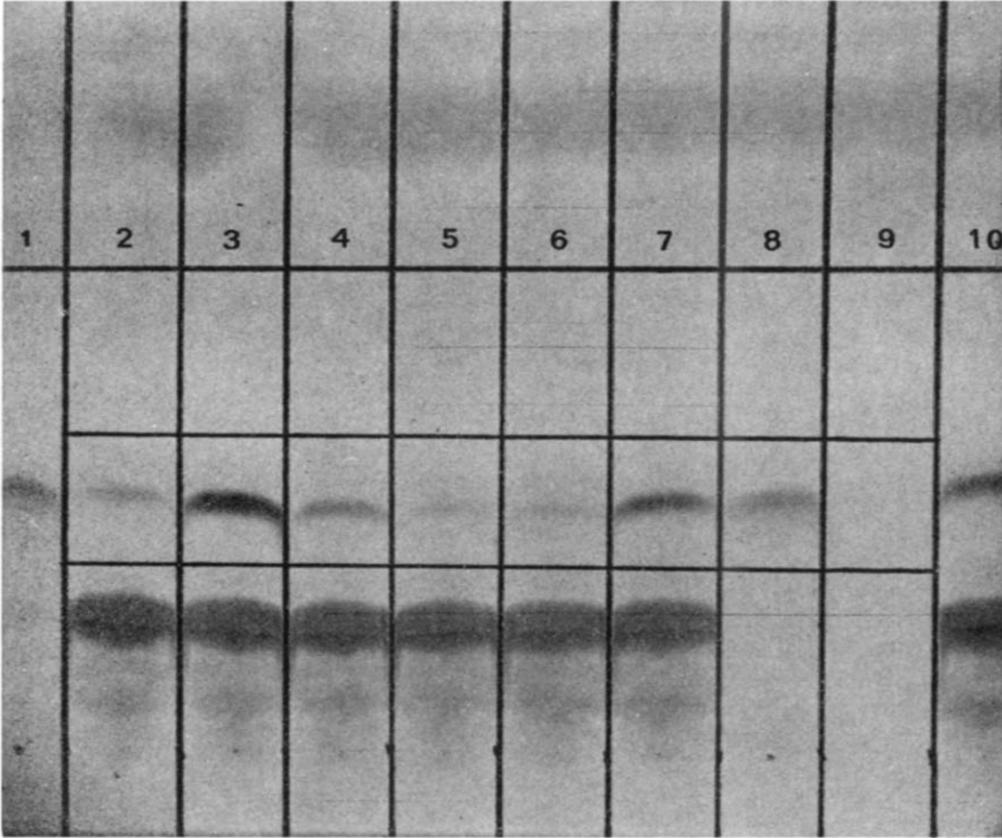


Fig. 1. Typisches Chromatogramm und Bahnenteilung. Abweichend zur Beschreibung wurden hier die Bahnen 2-9 zusätzlich mit dem Sprühreagenz entwickelt. Die quantitative ALA-Bestimmung mittels Dünnschichtchromatographie ergab: Bahn 2, 7.1 mg/l (Urin); Bahn 3, 43.2 mg/l (Urin); Bahn 4, 10.1 mg/l (Urin); Bahn 5, 1.3 mg/l (Urin); Bahn 6, 2.1 mg/l (Urin); Bahn 7, 13.7 mg/l (Urin); Bahn 8, 9.9 mg/l (Standardlösung); Bahn 9, Leerwert. Als Referenz wurden verwendet: Bahn 1, Standardlösung (10.0 mg/l); Bahn 10, Urin (43.2 mg/l).

erfolgt die Darstellung des rot-violett gefärbten Carboxypyrrols (R_f 0.45-0.50). Aufgrund des dargestellten Pyrrols werden im Abstand von etwa 0.8 cm ober- und unterhalb dieser Position die auf gleicher Höhe liegenden Gelbezirke der übrigen Bahnen (Nr. 2-9) durch Einritzen der Schicht (Bleistift) lokalisiert. Diese Technik ist hier problemlos, da unterhalb der Pyrrolzone an den nicht besprühten Bahnen, nach Verflüchtigung des Lösungsmittels, "weisse Zonen" auftreten, die eine zusätzliche Orientierungshilfe bedeuten. Die Überführung dieser Pyrrol-Adsorbate in Zentrifugenröhrchen erfolgt mittels Rasierklinge. Vor diesem Schritt entfernen wir die umgebenden Gelzonen —einschliesslich der Referenzbahnen—, schaben die Adsorbate bis unmittelbar vor den Plattenrand und überführen von hier in "kleinen Schritten" das Gel in das an den Glasrand angelegte Röhrchen. Dadurch wird ein Transfertrichter überflüssig, und es gelingt bei einfacher Technik ein zufriedenstellendes quantitatives Arbeiten. Der Röhrcheninhalt wird mit 1700 μ l Elutionslösung

vermischt und leicht aufgeschüttelt; dabei geht das Pyrrol sofort und quantitativ in Lösung.

Nach 2 min werden 300 μl modifiziertes Reagenz nach Mauzerall und Granick hinzugefügt und durch leichtes Schütteln vermischt. Die Extinktion des Farbsalzes erreicht nach 5 min ihr Optimum und zeigt anschliessend eine abfallende Drift von 0.5% pro Stunde. Nach Hinzufügen des Reagenz wird das Reaktionsgemisch 5 min zentrifugiert ($3000 \times g$). Der Überstand wird in Küvetten ($d=2$ cm) dekantiert und bei 551 (546) nm photometrisch gegen den Reagenzienblindwert bestimmt.

Berechnung

Sie erfolgt entsprechend der Lambert-Beer'schen Beziehung ($I=I_0 \cdot 10^{-\epsilon cd}$; $E = \log I_0/I$) unter Berücksichtigung folgender Bedingungen:

| | |
|---|---|
| Molarer Extinktionskoeffizient (ϵ) | 9.6 · 10 ⁴ cm ² · mol ⁻¹ |
| Schichtdicke der Küvette (d) | 2 cm |
| Molgewicht der ALA | 131.15 |
| Auftragevolumen der Probe | 25 μl |
| Gesamtvolumen (Reaktionslösung) | 2000 μl |
| Standardlösung | 10 mg/l |

Korrigierte Extinktion:

$$(\text{Ext. Probe bzw. Standard} - \text{Ext. Leerwert}) \quad \Delta E$$

Berechnung mittels Standard:

$$\frac{\Delta E_{\text{Probe}}}{\Delta E_{\text{Standard}}} \cdot 10 = \text{mg/l}$$

Berechnung mittels molarem Extinktionskoeffizienten:

$$\frac{\Delta E \cdot 2000 \cdot 10^6}{9.6 \cdot 10^4 \cdot 25 \cdot 2} = \mu\text{mol/l}$$

oder: $\Delta E \cdot 421 = \mu\text{mol/l}$

$$\frac{\Delta E \cdot 2000 \cdot 10^3 \cdot 131.15}{9.6 \cdot 10^4 \cdot 25 \cdot 2} = \text{mg/l}$$

oder: $\Delta E \cdot 54.6 = \text{mg/l}$

Äquivalenz von ALA und Carbäthoxyppyrol: 10 mg/l ALA = 76 $\mu\text{mol/l}$ = 16.9 mg/l Carbäthoxyppyrol; $\Delta E = 0.183$.

Umrechnung von Extinktion in molaren Extinktionskoeffizienten unter Versuchsbedingungen (76 μmol):

$$\frac{\Delta E \cdot 2000 \cdot 10^6}{76 \cdot 25 \cdot 2} = 5.26 \cdot 10^5 \text{ (Umrechnungsfaktor).}$$

VORVERSUCHE

Wahl des β -Ketons

Die von Mauzerall und Granick² angegebenen β -Ketone für die ALA-Analytik sind Acetylaceton und AEE. Nachstehend soll eine Übersicht die Eigenschaften dieser

Ketone und deren Pyrrole am Kieselgel aufzeigen:

| | | |
|---|--------------------------------------|---|
| Eigenfarbe im Lösungsmittelsystem I | <i>Acetylaceton</i> Gelblich | <i>AEE</i> Keine |
| Auftreten von interferierenden Substanzen | Ja | Nein |
| Spotform | <i>Acetylaceton-Pyrrol</i> Diffus | <i>Carbäthoxypyrrol</i> Scharfe Konturen |
| Sichtbare Nachweisgrenze | Etwa 10 mg/l (50 ng) | Etwa 1 mg/l (5 ng) |
| Tailing | Ab 20 mg/l (100 ng) | Keines |

Weil für das Carbäthoxypyrrol aus der Literatur auch ein höherer molarer Extinktionskoeffizient zu erwarten war² und darüber hinaus die für unser Vorhaben günstigeren Eigenschaften aufwies, wurden die weiteren Überlegungen mit AEE durchgeführt.

Wahl des Reagenz für die Ehrlich'sche Reaktion

Das original Ehrlich'sche Reagenz (2% DMAB in 6 N HCl) konnte für die vorliegenden Bedingungen wegen Instabilität des Farbsalzes und Mitreaktion des Kieselgels (hohe Leerwert-Absorption) nicht adaptiert werden. Das original Mauzerall-Granick-Reagenz erwies sich erst geeignet, als das Verhältnis Essigsäure-Perchlorsäure verändert wurde. Der DMAB-Anteil konnte auf das 6-fache gesenkt werden, so dass die Kieselgel-Leerwert-Absorption fast vernachlässigbar wurde.

Endkonzentrationen der Reagenzlösungen in den entsprechenden Reaktionslösungen:

| | <i>Original</i> <i>Mauzerall-Granick-Reagenz</i> | <i>Modifiziertes</i> <i>Reagenz</i> |
|---------------|---|--|
| DMAB | 1.0% | 0.16% |
| Essigsäure | 7.7 N | 15.7 N |
| Perchlorsäure | 1.0 N | 0.3 N |

Ermittlung des molaren Extinktionskoeffizienten

Carbäthoxypyrrol (76 $\mu\text{mol/l}$) wurde in Methanol gelöst und 25 μl davon wurden in Reagenzgläser pipettiert und unter Stickstoff zur Trockne gebracht. Anschliessend wurden 1700 μl Elutionslösung und 300 μl modifiziertes Reagenz hinzugefügt. Aus der gemessenen Extinktion ($E=0.209$) errechnete sich ein $\epsilon=11.0 \cdot 10^4$. Dieser Extinktionskoeffizient ist um 1/2 höher als vergleichsweise der von Mauzerall und Granick für das Carbäthoxypyrrol angegebene ($7.2 \cdot 10^4$).

Temperatur-Optimum-Versuche

Die Bedingungen der Knorr-Synthese wurden am Kieselgel ohne Migration und mit Migration untersucht.

Ohne Migration. ALA (10 mg/l; 76 $\mu\text{mol/l}$) wurden im Lösungsmittelsystem 1 gelöst und 25 μl davon auf 4 cm^2 Kieselgelfläche aufgetragen. Jeder Versuch wurde als Triplewert durchgeführt. Als Veränderliche galt die trockene Lufttemperatur im Hitzeschrank, konstant war die Erhitzungsdauer: 5 min. Die Extinktionen wurden in Extinktionskoeffizienten umgerechnet (siehe Fig. 2, Kurve A).

Mit Migration. ALA wurde in der gleichen Konzentration wie oben angegeben in Methanol gelöst. Durchführung dieses Versuches entspricht der unter Durchführung und Bestimmung angegebenen Vorschrift. Pro Versuch wurden $8 \times 25 \mu\text{l}$ aufgetragen, der Extinktionskoeffizient wurde als Mittelwert und $\pm 1 s$ errechnet (siehe Fig. 2, Kurve B).

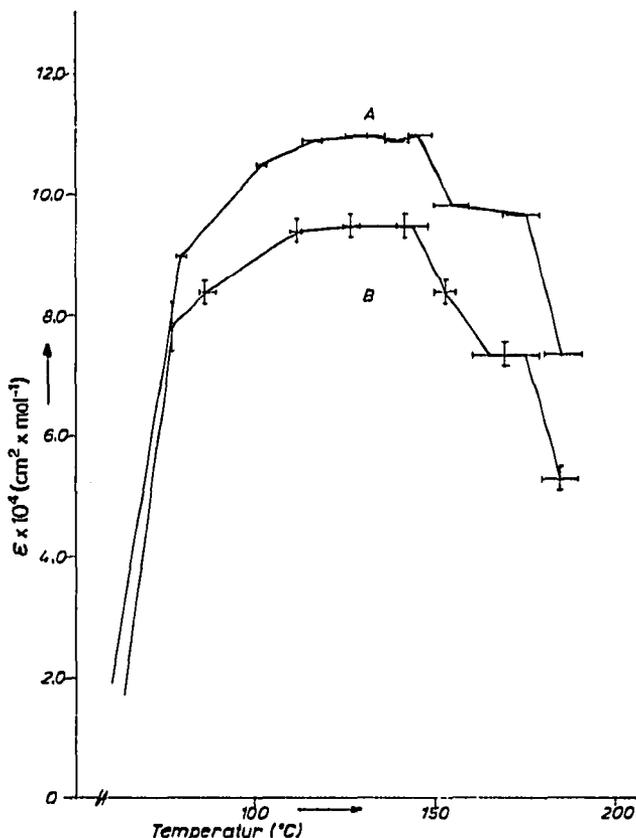


Fig. 2. Ermittlung des günstigsten Temperaturbereiches für die Knorr-Synthese am Kieselgel bei trockener Lufttemperatur (Hitzeschrank). Kurve A: ohne Migration. Kurve B: nach Migration im Lösungsmittelsystem 2. Horizontale Bereichsgrenzen: Temperaturdifferenz (Mittelwert). Vertikale Bereichsgrenzen: $\bar{x} \pm 1 \sigma$.

Die notwendige Aktivierungsenergie setzt bei 80° ein und erreicht mit 125° ein Plateau, das bis 145° reicht. Bei 150° erfolgt Kurvenabfall mit Schulterbildung um 165° (Schmelzpunktbereich). Darüber hinaus kommt es entweder zur Verflüchtigung oder Zersetzung der Pyrrolverbindung.

Der maximale Extinktionskoeffizient stellt sich zwischen 125 und 145° dar: $\epsilon = 11.0 \cdot 10^4$.

Somit herrscht Übereinstimmung äquimolarer Mengen an Carbäthoxypyrrol und der aus ALA und AEE auf Kieselgel kondensierten Verbindung. Aus den Kurvenbildern wird ersichtlich, dass nach Migration (Kurve B) Verluste auftreten. Die Ausbeute verringert sich um 13%. Der resultierende Extinktionskoeffizient fällt von 11.0 auf $9.6 \cdot 10^4$. In einem Bilanzversuch (100 μ g ALA) wurden in der Startzone lediglich 0.35% ALA (als Aminosäure) gefunden. Demnach verläuft die Pyrrol-Synthese mit >99% quantitativ. Der Extinktionsabfall (13%) nach Chromatographie dürfte somit als Migrationsverlust zu verstehen sein.

UNTERSUCHUNGEN MIT URIN

Auftragemenge

Die Trennkapazität der stationären Phase wird mit 35 μ l Urin überschritten. Die im Startbereich befindlichen Substanzen behindern dann die Migration im Lösungsmittelsystem 2. Eine günstige Auftragemenge wurde mit 25 μ l ermittelt. Unterschiedliches spezifisches Gewicht besitzt keinen signifikanten Einfluss auf Migration und quantitatives Ergebnis.

Identität

Die aus Urin (ALA 97 mg/l nach Mauzerall und Granick) isolierte carbäthoxy-pyrrol-ähnliche Verbindung wurde nach präparativer Dünnschichtchromatographie gewonnen und qualitativ mit authentischem Carbäthoxypyrrol verglichen. Übereinstimmung herrschte in den ultraviolett(UV)- und infrarot(IR)-Spektren. Nach Reaktion mit dem modifizierten Reagenz nach Mauzerall und Granick wurde das sichtbare Spektrum beider Verbindungen aufgezeichnet. Die Kurven sind identisch (siehe Fig. 3 und 4).

Spezifität

Durch die Umwandlung der ALA in ein äquivalentes Pyrrol, chromatographische Isolierung sowie nachfolgende Ehrlich'sche Reaktion mit Messung im Extinktionsmaximum des für das Carbäthoxypyrrol typischen Absorptionsspektrums ist die Methode für im Urin vorkommende ALA spezifisch. Aminoaceton und Porphobilinogen haben unterschiedliche R_F -Werte (siehe Fig. 5).

Konzentrationsbereich

Die Lambert-Beer'sche Beziehung gilt bis $E=1.2$ ($\cong 65$ mg/l ALA). Höhere Konzentrationen können entweder durch Probenverdünnung mit A.D., durch geringeres Auftragevolumen oder Verringerung des Lichtweges ($d=1$ cm) erfasst werden. Parallele Bestimmungen verdünnter Lösungen sowie verringertem Auftragevolumen der jeweiligen Urinproben erbrachten übereinstimmende Werte: $r=0.990$ bei 10 Paaren. Der Kieselgel-Leerwert zeigt Absorptionen von $E=0.001$ bis 0.003.

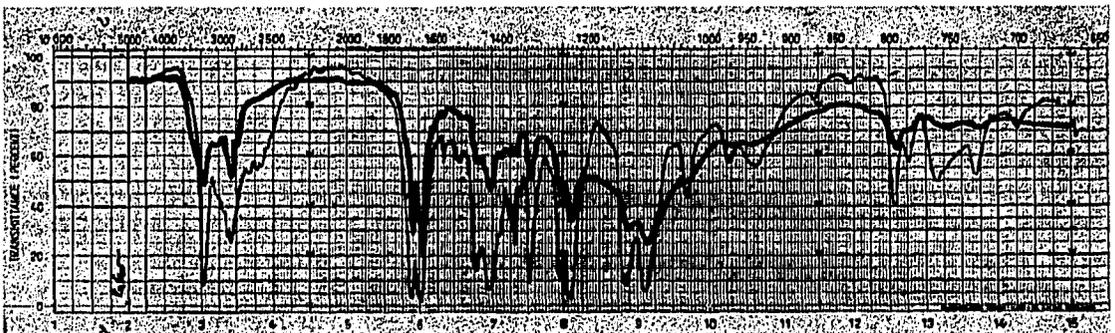


Fig. 3. IR-Spektren. Die stark ausgezogene Kurve entspricht der Verbindung, welche aus Urin (97 mg/l nach Mauzerall und Granick bestimmt) isoliert wurde. Zum Vergleich das Spektrum des authentischen Carbäthoxypyrrols. (Gerät: Perkin-Elmer, Modell Nr. 21, KBr Pressling).

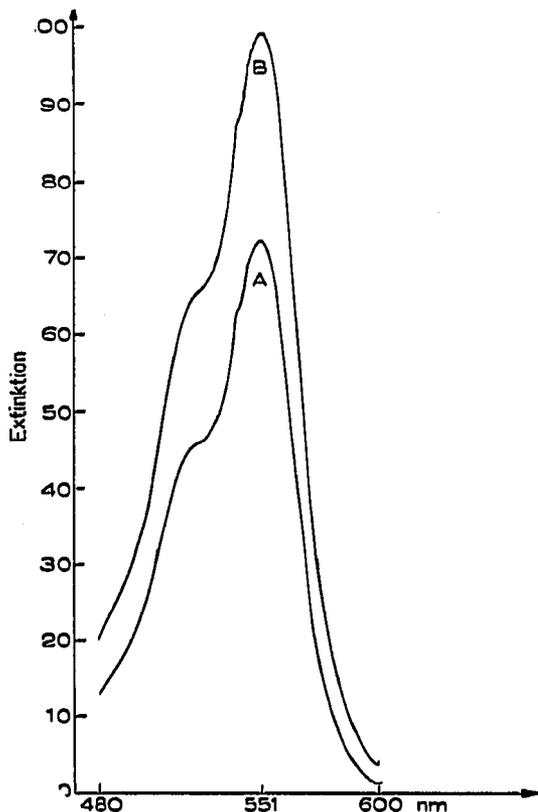


Fig. 4. Sichtbares Spektrum des Carbäthoxypyrrols nach Umsetzung mit modifiziertem Mauzerall-Granick-Reagenz. Kurve A: authentisches Carbäthoxypyrrol ($300 \mu\text{mol/l}$). Kurve B: Verbindung aus dem gleichen (siehe Fig. 3), jedoch verdünnten Urin nach Chromatographie.

Höhere Extinktionen deuten auf Verunreinigungen oder in die Küvette mitverschlepptes Kieselgel hin. Die noch messbare, von Null unterscheidbare ALA-Menge nehmen wir mit 0.60 mg/l an: $\Delta E = 0.010$. Eine Steigerung der Nachweisempfindlichkeit kann erreicht werden, wenn 2 Bahnen identer Urinproben bei der Analyse vereinigt werden. Unter Einhaltung der Standardbedingungen wird die Analyse mit etwa 8 cm^2 Gelfläche limitiert. Grössere Gelflächen müssen vor der Analyse mit Methanol eluiert werden. Analyse erfolgt nach Verflüchtigung des Lösungsmittels.

Richtigkeit

Die Wiederfindung zugefügter ALA beträgt $98\text{--}101\%$ ($n=10$). Desgleichen wurden Mischversuche mit Urinen verschiedener spezifischer Gewichte mit unterschiedlichen ALA-Gehalten durchgeführt. Die errechneten Werte stimmten mit den gefundenen überein: $r=0.993$ bei 10 Paaren. Ein weiterer Beweis wurde in Vergleichsbestimmungen von Urinen mit der Mauzerall und Granick-Methode gesucht (β -Keton: Acetylaceton) $r=0.986$ bei $n=31$ (siehe Fig. 6).

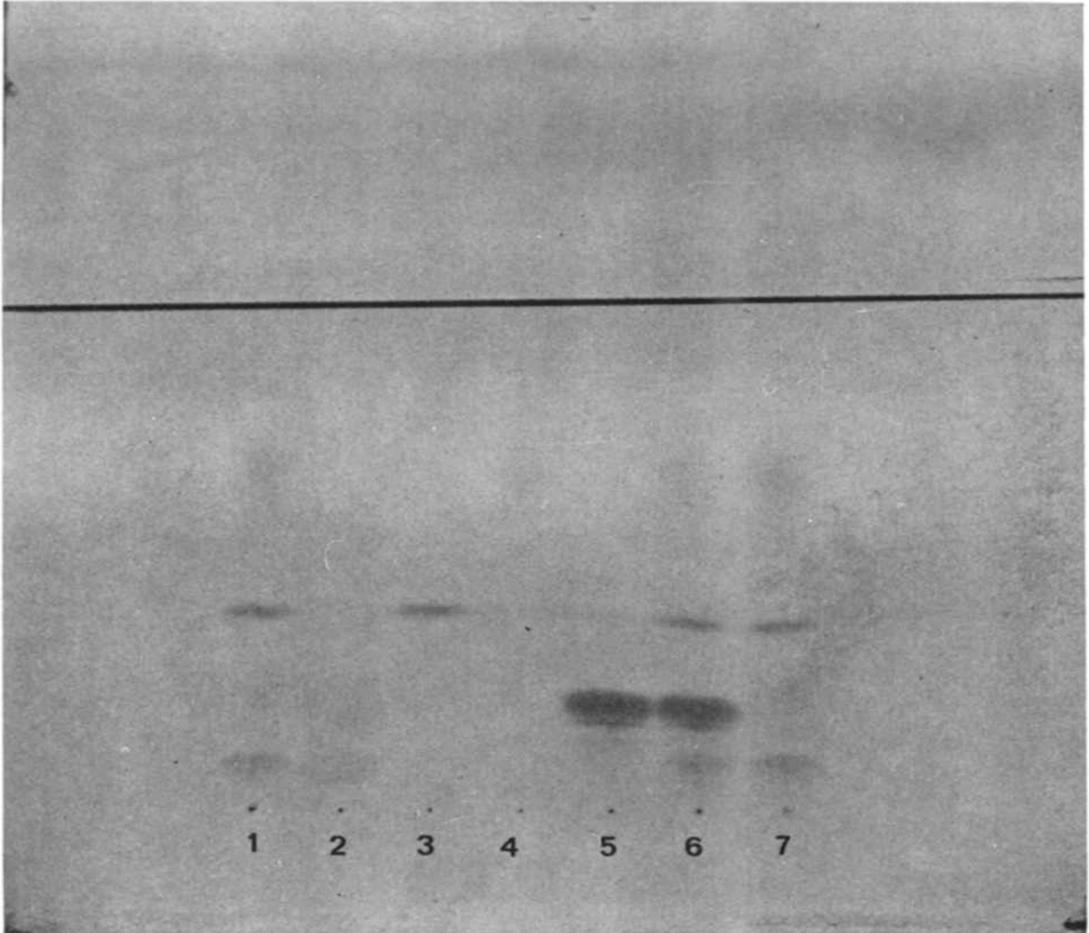


Fig. 5. Qualitative Darstellung der 3 wichtigsten Pyrrol-Verbindungen im Urin mit dem Sprühreagenz nach Chromatographic. Nr. 2: Porphobilinogen, zersetzt sich infolge Hitzeinwirkung in zwei Spots ($\cong 5$ mg/l). Nr. 3: Pyrrol der ALA (Carbäthoxypyrrol) $\cong 10$ mg/l. Nr. 4: Pyrrol des Aminoacetons (2,4-Dimethyl-3-carbäthoxypyrrol); schlecht darstellbar, flüchtig und lichtempfindlich ($\cong 20$ mg/l). Nr. 5: Urin (1.2 mg/l ALA nach Dünnschichtchromatographie). Nr. 6: Urin aus Nr. 5 mit den Verbindungen aus Nr. 2, 3 und 4 vermischt. Nr. 1 und 7: Gemisch der Verbindungen aus Nr. 2, 3 und 4.

Präzision

Ein Urin-Pool mit erhöhtem ALA-Gehalt wurde auf 10 Einzelportionen abgefüllt und tiefgefroren. An zweimal 5 aufeinander folgenden Tagen wurde die aufgetaute Probe zweifach bestimmt. Berechnet wurden Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient (VK):

$$(a) \text{ von Tag zu Tag: } \quad \bar{x} = 25.20 \pm 0.61 \text{ mg ALA} \\ \text{VK} = 2.4\% \quad (n=10)$$

$$(b) \text{ in Serie an 1 Tag: } \quad \bar{x} = 24.92 \pm 0.27 \text{ mg ALA} \\ \text{VK} = 1.1\% \quad (n=8)$$

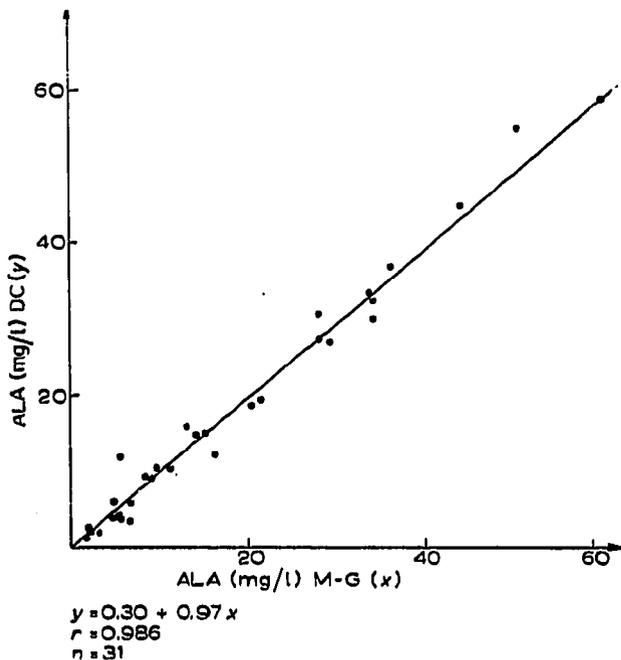


Fig. 6. Korrelationsgerade ermittelt an 31 Urinen, welche nach Mauzerall und Granick (M-G) und dünnschichtchromatographisch (DC) bestimmt wurden.

Normalwerte

Als Stichprobe wurden folgende Klassenbreiten untersucht: 21–30, 31–40, 41–50 Jahre. Pro Klassenbreite: $n=10$. Gesamtuntersuchungen: $n=31$. Die Werte wurden nur bei Männern bestimmt. Die Personen schienen klinisch gesund, regelmäßiger Alkoholkonsum wurde negiert. Ergebnis: $\bar{x}=2.22 \pm 0.61$ (1 s). Verteilungstendenzen konnten nicht erkannt werden, dazu schien die Anzahl der Analysen nicht repräsentativ genug zu sein.

STÖRUNGEN

Die in der Nähe des Pyrrols nach Besprühung mit dem Sprühreagenz bisweilen auftretenden bläulichen Verbindungen (1–2% der Fälle) beeinflussen nicht die quantitative Analyse (Indole?). Stark störend sind hingegen Medikamente auf Nitrofurantoinbasis. Der intensiv gelbe Farbstoff wandert in 2 Fraktionen ober- und unterhalb des Carbäthoxyppyrrols. Wohl herrscht keine R_F -Übereinstimmung, bei der Lokalisierung lässt sich jedoch keine exakte Isolierung durchführen. Die nachfolgende Ehrlich'sche Reaktion führt zur Überfärbung des rot-violetten Farbtons des Carbäthoxyppyrrols. Solche Proben wird man entweder nach Mauzerall und Granick bestimmen oder in der erwähnten Screeningmethode⁶ halbquantitativ aufgrund bekannter ALA-Konzentrationen abschätzen oder densitometrisch auswerten.

Transparenzerscheinungen nach Chromatographie im Lösungsmittelsystem 2, die vorwiegend im R_F -Bereich des Harnstoffes auftreten, verbunden mit schlechter Auftrennung, weisen auf erhöhten Wassereinfluss hin. Dabei kann die Sorptions-

schicht zu "feucht" oder das Lösungsmittelsystem 2 über Methanol wasserhaltig werden.

"Flammenbildungen" des Harnstoffes bis in die Pyrrolzone und gleichzeitiges "heading" der Pyrrolbande sind charakteristisch für eine Desaktivierung der Sorptionsschicht infolge HCl- oder Ammoniak-Dämpfe.

DISKUSSION

Die direkte Bestimmung freier ALA aus nativen Urinproben gelingt kaum auf Kieselgel und wurde unseres Wissens auch noch nicht beschrieben. Der hohe Salzgehalt und die grosse Menge an hydrophilen Begleitsubstanzen (u.a. Aminosäuren) machen eine exakte und zufriedenstellende Trennung auch nach Mehrfachentwicklungen mit unterschiedlichen Laufmittelkombinationen nicht möglich. Selbst elektrophoretische Verfahren müssen zu "selektiven Reagenzien" greifen, um die ALA ausreichend spezifisch erfassen zu können. Ein solches Verfahren, allerdings auf Cellulose, wurde von Samuels und Fisher beschrieben¹⁰. Die von Mauzerall und Granick angegebene Methode² ist eine kombinierte Bestimmung für Porphobilinogen und ALA. Die Isolierung dieser beiden Hämpräkursoren erfolgt über Ionenaustausch-Säulen. Die nachfolgende Knorr-Synthese in wässriger Lösung führt zum entsprechenden Pyrrol, welches Ehrlich'sche Reaktion ergibt. 1966 berichteten Marver und Tschudy¹¹ über die umgekehrte Möglichkeit, gebildete Pyrrole über Säulen zu trennen. Irving und Elliott¹² verwenden hierfür die Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel. Eigene Vorversuche zeigten, dass Kieselgel für die Knorr-Synthese geeignet ist. Die Mobilitätseigenschaften der interessierenden Pyrrole auf dieser stationären Phase ermöglichen deren einwandfreie Isolierung voneinander sowie die Darstellung des Carbäthoxypyrrols von interferierenden Urinsubstanzen. Die grosse reaktive Oberfläche des Kieselgels scheint die Kondensation der ALA zum Carbäthoxypyrrol stark zu begünstigen. Im Vergleich zum Kochprozess in wässriger Lösung², verbunden mit niedrigerer Ausbeute ($\epsilon = 7.2 \cdot 10^4$), reagiert unter den beschriebenen Bedingungen die Derivatbildung in halber Zeit mit einem um etwa 1/2 höheren Extinktionskoeffizienten ($\epsilon = 11.0 \cdot 10^4$).

Das auf Kieselgel adsorbierte oder in Elutionslösung gelöste Carbäthoxypyrrol reagiert empfindlich auf aktinische Einflüsse: Sonnenlicht und grelles Tageslicht vermindern die Ausbeute. Der kritische Wellenlängenbereich dürfte unter 400 nm liegen. Erst das nach Reaktion mit DMAB entstandene rot-violette Farbsalz* ist stabil und unempfindlich gegenüber UV-Licht-Einfluss.

Die Ehrlich'sche Reaktion wird durch das Kieselgel nicht gehemmt. Es scheint im Gegenteil ein Trend höherer Beschleunigung gegenüber der Umwandlung ohne Gel vorhanden zu sein. Dieser Effekt liess sich allerdings infolge methodischer Schwierigkeiten nicht ausreichend statistisch sichern. Der durch Migration bedingte Verlust an Carbäthoxypyrrol ist analytisch tragbar, da er konstant zu sein scheint. Der Extinktionskoeffizient, welcher der Bestimmung zugrunde gelegt wurde ($\epsilon = 9.6 \cdot 10^4$), ist unter konstanten Bedingungen reproduzierbar, wie die Qualitätskontrolle ausweist. Der stets mitlaufende Standard (10 mg/l ALA) dient lediglich der Überprüfung der Reaktionsbedingungen.

* 1 - [p-Dimethylaminophenyl]-2-[2-methyl-3-carbäthoxy-4-(3-propionsäure)-pyrrol]methinperchlorat.

Die notwendige Temperatur für die Knorr-Synthese liegt zwischen 120 und 145°.

Der von uns verwendete Hitzeschrank kompensiert einen Temperaturabfall um 10° —bedingt durch das Einbringen des feuchten Chromatogramms und das Öffnen und Schliessen des Hitzeschrankes— innerhalb 2 min. Ein Temperaturabfall von etwa 20° (145–125°) unter den erwähnten Bedingungen erlaubt bei Einsetzen der Gegenregulation des Gerätes noch eine Berechnung mittels Extinktionskoeffizienten. Ein Hitzeverlust unter diesen Bereich macht die Berechnung per Standardbeziehung notwendig. Für diese Reaktion scheinen allgemein Hitzeschränke ohne Umlufteinrichtung schlecht geeignet zu sein: Die Umwandlung läuft ungleichmässig ab, wie ein erhöhter Variationskoeffizient: 7.8% bei einer Bestimmung an einem Gerät ohne Umlufteinrichtung an 8 identen Proben aufzeigte. Die Normalwerte, allerdings nur bei Männern bestimmt, sind mit den Ergebnissen anderer Autoren, erstellt mit der Mauzerall und Granick-Methode^{13–15}, und der Davis-Variante¹⁶ vergleichbar. Bedeutungsvolle Unterschiede waren nicht erkennbar, was etwas überrascht, weil in deren Werte auch Aminoaceton mit eingeht, eine Verbindung, die immerhin bis zu 80–90% das quantitative Ergebnis eines ALA-Normalwertes (Mauzerall und Granick-Methode) aufstocken soll^{2, 12, 13}.

In einem einzigen Fall (etwa 0.01% der Screeningfälle) beobachteten wir eine Verbindung, die der Knorr-Synthese zugänglich war, Ehrlich-positiv reagierte und nach Mauzerall und Granick einen erhöhten ALA-Befund ergab: 8.2 mg/l. In der Dünnschichtchromatographie wanderte diese Verbindung zwischen Harnstoff und Carbäthoxyppyrol. Die quantitative Bestimmung zeigte an dieser Probe lediglich 2.4 mg/l ALA auf. Die Menge dieser unbekanntes und lagerungsstabilen Verbindung wurde mit 6.0 mg/l als ALA bestimmt. Am selben Probanden war diese später nicht mehr nachweisbar.

Die Ergebnisse der Qualitätskontrolle entsprechen den Anforderungen der klinisch chemischen Analytik¹⁷.

Zur isolierten ALA-Bestimmung ist das beschriebene chromatographische Verfahren, wie wir glauben, der Mauzerall und Granick-Methode bzw. Davis-Variante an Spezifität, Schnelligkeit, Probenverbrauch und Wirtschaftlichkeit überlegen. Nachteilig empfinden wir lediglich die UV-Labilität des Carbäthoxyppyrols, die sich durch eine entsprechende Arbeitsweise ausgleichen lässt.

DANK

H. Dipl. Chem. P. Becher (Abteilung: Werkstoffprüfung) sind wir für Synthese von Aminoaceton und 2-Methyl-3-carbäthoxy-(3-propionsäure)pyrrol und der Durchführung der IR-Spektren sehr zu Dank verpflichtet. H. Dr. G. Müller (Isotopenlaboratorium der Abteilung für Chemie und Geologie der Universität Stuttgart) stellte uns dankenswerterweise Porphobilinogen (aus Zellkulturen von *Propioni shermanii*) zur Verfügung.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine Methode für die quantitative Bestimmung der δ -Aminolävulinsäure aus unbehandelten Urinproben mittels eindimensionaler Dünnschichtchroma-

tographie beschrieben. Die freie Aminosäure wird durch trockene Erhitzung in Anwesenheit von Acetessigsäureäthylester in das entsprechende Pyrrol umgewandelt, dessen Isolierung in einem Lösemittelsystem bestehend aus Tetrachlorkohlenstoff-Methanol durchgeführt wird. Die quantitative Bestimmung beruht auf der modifizierten Ehrlich'schen Reaktion nach Mauzerall and Granick. Im Vergleich mit deren Methode ergab sich ein Korrelationskoeffizient von $r=0.986$. Richtigkeit und Genauigkeit liegen innerhalb des 5%-Bereiches.

LITERATUR

- 1 B. Haeger, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 9 (1957) 211.
- 2 D. Mauzerall und S. Granick, *J. Biol. Chem.*, 219 (1956) 435.
- 3 I. Grabecki, T. Haduch und H. Urbanowicz, *Arch. Gewerbepathol. Gewerbehyg.*, 23 (1967) 226.
- 4 H. Urbanowicz, persönliche Mitteilung.
- 5 I. Davis und S. Andelman, *Arch. Environ. Health*, 15 (1967) 35.
- 6 G. Kufner, H. Schlegel und K. Burian, *Arbeitsmed. Sozialmed. Arbeitshyg.*, 8 (1971) 214.
- 7 S. Gabriel und I. Colman, *Ber. Deut. Chem. Ges.*, 35 (1902) 3805.
- 8 E. Stahl (Herausgeber), *Dünnschichtchromatographie*, Springer, Berlin, 2. Aufl., 1967.
- 9 B. Knorr, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 236 (1886) 290.
- 10 St. Samuels und L. Fisher, *Arch. Environ. Health*, 21 (1970) 728.
- 11 H. Marver und P. Tschudy, *Anal. Biochem.*, 14 (1966) 53.
- 12 E. Irving und W. H. Elliott, *J. Biol. Chem.*, 244 (1969) 60.
- 13 B. Haeger-Aronson, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 14 (1962) 397.
- 14 L. Heilmeyer, *Störungen der Hämsynthese*, Georg Thieme, Stuttgart, 1964.
- 15 D. A. Malooly, H. A. Peters, W. Stich und L. Goreczky, zit. von L. Goreczky und L. Roth, *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, 6 (1968) 490.
- 16 M. Doss und A. Schmidt, *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, 9 (1971) 99.
- 17 *Quality Control in Clinical Chemistry, Transactions of the IVth International Symposium, Genf, 1971.*