

Journal of Chromatography, 145 (1978) 341—350

Biomedical Applications

© Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam — Printed in The Netherlands

CHROMBIO. 130

GASCHROMATOGRAPHISCHE ANALYSE VON SAUREN URINMETABOLITEN NACH TRENNUNG AUF KIESELGELFERTIGSÄULEN

K. OLEK

Institut für Humangenetik der Universität Bonn, Wilhelmstrasse 31, 5300 Bonn 1 (B.R.D.)

(Eingegangen am 6. September 1977; geänderte Fassung eingegangen am 25. November 1977)

SUMMARY

Gas chromatographic estimation of acidic urinary metabolites after separation on prepacked silica gel columns

The acidic ethylacetate extracts of 24-h urine specimens are evaporated and redissolved in chloroform—methanol—acetic acid. The resulting solution is transferred to a prepacked silica gel column. Elution takes 160 min using a specially designed chloroform—methanol—acetic acid gradient. The eluate is divided into fractions (16 min each) which are evaporated to dryness. The residues are silylated and determined quantitatively by gas chromatography. The capacity of the silica gel column allows analysis of 30% of a 24-h urine specimen. In consequence, metabolites can be quantitated at concentrations less than 1 mg per 24 h. The method is suitable to obtain more detailed metabolic profiles of the carboxylic acids in urine.

EINLEITUNG

Zur Diagnose einer Reihe von erblichen Stoffwechselstörungen wie Phenylketonurie, Tyrosinämie, Ahorn-Sirupkrankheit und zur Diagnose von einigen Tumoren des Nervensystems versucht man eine oder einige wenige organische Säuren aus dem Urin quantitativ zu bestimmen. Im Krankheitsfalle kann man mit extrem erhöhten Konzentrationen rechnen. Dies ermöglicht eine problemlose gaschromatographische (GC) Analyse, der meist eine Extraktion des Urins vorangeht.

Daneben gibt es Stoffwechselsituationen, in denen man nur ganz geringfügige Abweichungen des metabolischen Profils beobachtet, beispielsweise bei varianten Formen der erwähnten Aminosäurenabbaustörungen. Hier erweist es sich als zweckmässig, möglichst viele Metaboliten der betroffenen Aminosäuren quantitativ zu erfassen [1].

Für die GC-Analyse entstehen damit einige Probleme. Man muss äusserst geringe Konzentrationen erfassen (zum Teil < 1 mg/l). Die Vielzahl der Ver-

bindungen lässt selbst die GC mit der Glaskapillare oft an ihre Grenzen stossen. Man steht manchmal vor der Aufgabe subnormale Ausscheidungen im angegebenen Konzentrationsbereich nachzuweisen. Dabei hat man mit allen Schwierigkeiten der Spurenanalyse zu kämpfen. Produkte des Bakterienstoffwechsels schliesslich können das Bild noch komplizierter machen.

Konsequenterweise gehen einige Autoren dazu über, die blosser Extraktion des Urins durch wirkungsvollere Vorreinigungsschritte zu ersetzen, um so die GC zu entlasten. Horrocks et al [2] fraktionieren 5 ml Urinportionen an kleinen Ionenaustauschersäulen. Melchert und Hoffmeister [3] reinigen Essigesterextrakte von Urin auf dem lipophilen Wege LH 20 vor. Diese Arbeit setzt sich mit einem für die Urinanalyse bezeichnenden Problem auseinander: Es soll die Vanillinmandelsäure auch bei Normalpersonen bestimmt werden, deren Ausscheidungswerte liegen um 1 mg/l. Von dieser Substanz ist in keinem GC-System mit ausreichender Sicherheit die Hippursäure zu trennen. Deren Konzentration im Urin beträgt gelegentlich bis zu 1 g/l.

Die hier beschriebene Methode soll ein Beitrag zur Lösung dieser Probleme liefern. Ich habe versucht, die schnelle Vortrennung eines Urinextraktes im Praeparativmasstab zu erreichen (30% eines 24-h-Urins). Durch das gleichzeitige Verwenden zweier chromatographischer Systeme konnte hohe Nachweisempfindlichkeit zusammen mit hoher Trennleistung erreicht werden.

METHODE

Vorbereitung von Eichmessungen

Ungefähr 5 mg jeder Karbonsäure wurden in 60 ml Methanol gelöst. Zur Ermittlung einer Eichkurve wurden jeweils 2 × 8 ml, 5 ml, 4 ml, 3 ml und 2 ml abpipettiert, abgedampft und in 5 ml Methanol wieder aufgenommen. Das ganze Verfahren wurde zweimal durchgeführt.

Vorbereitung von Urinproben

24-Stunden-Urine wurden ohne Zusatz von Konservierungsmitteln gesammelt. Während der 24-h Sammlungsperiode wurden die Urine eingefroren und am folgenden Tag analysiert. Für eine spezielle Fragestellung haben wir insgesamt 40 24-Stunden-Urine analysiert. Es wurde dabei jeweils 30% des Gesamturins wie im folgenden beschrieben extrahiert. Der Urin wird auf pH 1–2 angesäuert; 1:1 mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung versetzt und zweimal mit der doppelten Menge Essigsäureäthylester ausgeschüttelt. Die Lösung wurde über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Als Kontrollbestimmung wurden bei jeder Harnanalyse 5% des Essigesterextraktes entnommen und direkt für die GC vorbereitet. Der Trockenrückstand wurde in einem 100 ml Spitzkolben mit dem unpolaren Anteil des Lösungsmittelsystems (siehe unten) versetzt und unter 2-stündigem Rühren gelöst.

Die Säulenchromatographie

Als eigentliches Trennsystem wurde eine Kieselgelfertigsäule (Grösse B) der Fa. Merck Kieselgel 60 verwendet. Dieser war eine weitere mit Kieselgel 60 (Korngrösse 0.2–0.5 mm; 30–70 mesh ASTM; Merck) gefüllte Säule vorgeschaltet (15 × 1 cm). Das Pumpsystem mit Pulsdämpfung war von der Fa.

CFG Heidelberg. Die Photometereinheit war das Uvicord-System II, der Fraktionssammler vom Typ Ultrarac 7000, beide von der Fa. LKB. Letzterer wurde so modifiziert, dass es möglich war, 10 Fraktionen mit beliebig grossen Volumina aufzufangen. Ich habe wegen der grossen anfallenden Probenzahl in unserem Experiment eine möglichst weit gehende Automatisierung mit dem LKB Gradientenmischer Ultrograd 11300 angestrebt. In einem früherem Stadium habe ich jedoch gleich gute Trennleistung mit einem selbstgebauten einfachen Gradientenmischer aus zwei Gefässen (linearer Gradient) erreicht. Betriebsbedingungen der Fertigsäule: Durchfluss, 5 ml/min; Druck, 4 atm (max); mobile Phase, (unpolarer Anteil) 600 ml Chloroform, 6 ml Methanol, 0.8 ml Essigsäure und (polarer Anteil) 400 ml Chloroform, 75 ml Methanol, 25 ml Essigsäure.

Die Form des Gradienten ist Fig. 1 zu entnehmen. Die Vorsäule ist über einen magnetisch betriebenen Dreiwegehahn mit der Trennsäule verbunden. Nach 100 min wird dieser Hahn vom Ultrograd-Steuergerät umgestellt, so dass die mobile Phase nicht mehr über die Vorsäule sondern direkt auf die Fertigsäule gepumpt wird. Diese wird so auch bei sehr häufigem Gebrauch von starker Verschmutzung frei gehalten. Die Füllung der Vorsäule wird für jede Analyse erneuert.

Aufgabe der Proben

Das Probenvolumen war immer 5 ml. Die Aufgabe erfolgte mit einer 500 μ l SGE-Spritze durch ein handelsübliches Septum für die GC in einen Injektionsblock aus V4A-Stahl.

Vorbereitung der Probe für die Gaschromatographie

Die einzelnen Fraktionen werden in Rundkolben aufgefangen und am Ro-

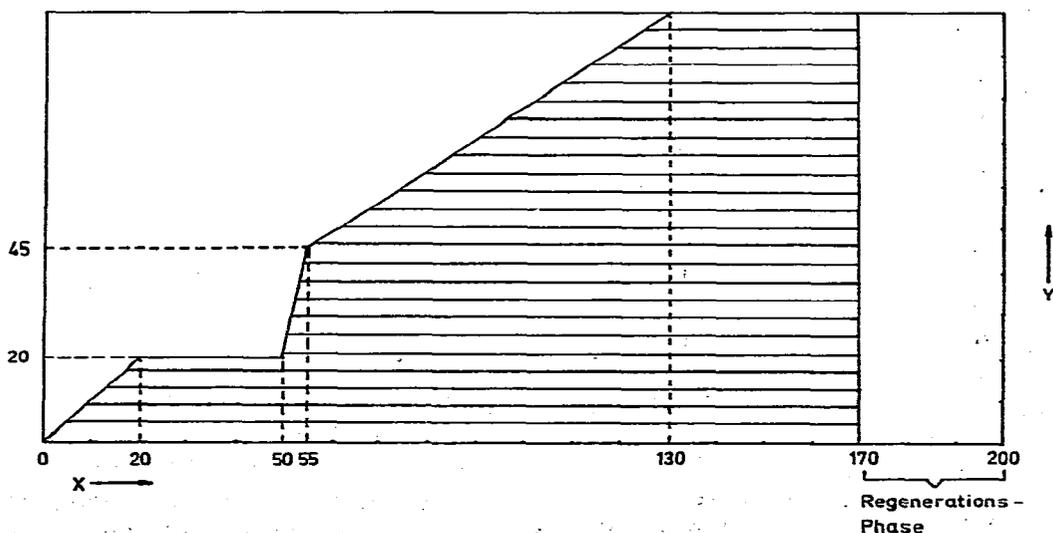


Fig. 1. Programmkarte für den Gradientenmischer. Der Verlauf der Grenzlinie zwischen schraffiertem und nicht schraffiertem Gebiet stellt die Änderung der Konzentration der mobilen Phase in der Zeiteinheit dar. x-Achse: 4 h, y-Achse: 7.5 sec.

tationsverdampfer eingedampft. Durch zwei bis dreimaliges Zusetzen von Essigsäureäthylester und anschliessendes Einrotieren gelingt es, auch Spuren von Essigsäure aus der Probe zu entfernen. Der Trockenrückstand wird mit 1 ml Reaktionslösung versetzt (10 ml Chloroform, 20 ml Acetonitril, 10 ml BSA, 60 μ l Tetradecan). Die Proben wurden 1 h auf 40° erhitzt.

Gaschromatographie

Verwendetes Gerät: Pye Unicam 104, automatischer Probenaufgeber S 4, elektronischer Integrator Vidar Modell 6300. Der Gaschromatograph war mit 2 Glassäulen von 2 m Länge und 2 mm I.D. ausgestattet. Sie waren gepackt mit 3% OV-3 auf Chromosorb W HP (100–200 mesh). Durchfluss Wasserstoff, 28 ml/min; Luft, 700 ml/min; Stickstoff, 12 ml/min. Der Injektionsblock wurde bei 180°, der Detektor bei 300° Zufluss gehalten. Temperatur-Programm: 5 min bei 100°, 4°/min, 5 min bei 250°; Abschwächung, 8×10^2

Behandlung des Kieselgels

Verwendete man das Kieselgel G 60 in der Vorsäule ohne Vorbehandlung, so zeigten alle Substanzen eine erhöhte Retention, darüberhinaus erniedrigte sich die Ausbeute für Benzoesäure, Phenyllessigsäure, Mandelsäure und Vanillinmandelsäure auf rund die Hälfte. Zu den unten angegebenen Ausbeuten kommen wir, wenn wir 200 g Kieselgel G 60 in 1 l des polaren Anteils der mobilen Phase waschen und anschliessend mit der unpolaren Komponente auf den Anfangszustand des Chromatographiesystems einstellen. Um reproduzierbare Trenneigenschaften zu erreichen, mussten wir in ähnlicher Weise für die Hauptsäule eine Desaktivierung vornehmen. Wir pumpten 3 h den polaren Anteil des Elutivmittels durch Säule 10 und stellten dann mit dem unpolaren Anteil den Ausgangszustand her. Die Retentionsvolumina blieben so für 20 Bestimmungen von 24-h-Urinen konstant. Wechsel der Fraktionen erfolgte alle 16 min.

ERGEBNISSE

Tabelle I zeigt die Konstanten m und b der Regressionsgeraden bzw. die Korrelationskoeffizienten r der von uns bearbeiteten aromatischen Karbonsäuren. Es sind für jede Substanz die Variationskoeffizienten von 4 Wiederholungsmessungen bei den beiden angegebenen verschiedenen Konzentrationen gezeigt (VK 1, VK 2). Die angegebenen Wiederfindungsraten sind aus den einzelnen Messpunkten der Eichgeraden errechnet worden. Fig. 2 zeigt das Elutionsdiagramm einer Standardmischung und eines 24-h Urins.

Fig. 3 zeigt die GC der einzelnen Fraktionen im Vergleich zum nicht vorbehandelten Extrakt.

Von den ausgewählten Verbindungen sind in jedem 24-Stunden-Urin einwandfrei messbar: 4-Hydroxyphenyllessigsäure, 3-Hydroxyphenyllessigsäure, 2-Hydroxyphenyllessigsäure, Phenylmilchsäure, Mandelsäure, Vanillinmandelsäure, Homovanillinmandelsäure, wenn man als Identifizierungsparameter das Retentionsvolumen der Kieselgelchromatographie zusammen mit der Retentionszeit der GC heranzieht. Dies sollte natürlich abgesichert werden durch massenspektroskopische Studien, womit dann auch schlüssige Betrachtungen

in Bezug auf die vielen anderen organischen Säuren angestellt werden könnten.

Auf jeden Fall erscheint es uns problematisch, wenn quantitative GC-Messungen von Karbonsäuren aus blossen Extrakten oder aus den die gesamten saure und neutrale Fraktion enthaltenen Ionenaustauschereluateten erstellt werden. Dies sei an der Vanillinmandelsäure erläutert. Diese Substanz wird in der 8. bis 10. Fraktion eluiert (siehe Fig. 3, Peak 17); in der 2. Fraktion wird mit der gleichen Retentionszeit (Peak 17') in etwa 10 mal höherer Konzentration eine Substanz eluiert, bei der es sich natürlich nicht um Vanillinmandelsäure handeln wird. Diese Verhältnisse wiederholen sich in unseren Untersuchungen auch in etwa quantitativ bei allen 24-h-Urinen.

TABELLE I

KONSTANTEN DER EICHGERADE $y = mx + b$ SOWIE KORRELATIONSKOEFFIZIENT r DER EINZELNEN SUBSTANZEN

y , Relative Impulszahl; x , Konzentration in mg pro 2 ml.

Nr.	Substanz	m	b	r	Einwaage 1 (mg)	VK 1	Einwaage 2 (mg)	VK 2	Wieder- findung %	VK-Urin (%)
1	Phenyllessig- säure	39353	- 647	0.997	0.83	7.72	0.21	8.31	92.4	
2	Benzoesäure	29764	-1687	0.944	0.75	10.83	0.19	1.0	85.7	
3	Zimtsäure	53043	-1849	0.992	0.58	3.98	0.15	15.67	102.3	
4	Veratrum- säure	31764	-1480	0.996	0.70	1.90	0.18	10.52	103.3	
5	2-Hydroxy- hippursäure	55040	-5267	0.989	0.60	1.41	0.15	18.76	74.9	
6	Homovanil- linsäure	72361	-4387	0.998	0.65	2.88	0.16	2.29	94.8	5.6
7	2-Hydroxy- phenyllessig- säure	49597	-8797	0.999	0.78	1.39	0.20	1.01	89.1	9.3
8	Ferulasäure				0.66		0.17		67.0	
9	4-Hydroxy- zimtsäure	42147	- 621	0.995	0.82	2.71	0.21	13.24	98.6	
10	3-Hydroxy- zimtsäure	54209	-2312	0.997	0.63	3.61	0.16	1.61	94.1	
11	2,4-Dihydro- xybenzoesäure	45467	- 337	0.997	0.73	2.41	0.18	7.41	83.8	
12	4-Hydroxy- phenyllessig- säure	68741	-2453	0.996	0.61	1.71	0.15	1.24	105.5	4.1
13	3-Hydroxy- phenyllessig- säure	52806	-2318	0.995	0.90	0.30	0.23	2.69	101.9	6.2
14	3-Phenyl- milchsäure	62948	- 412	0.998	0.71	2.44	0.18	2.58	72.4	5.6
15	Mandelsäure	53532	-1023	0.997	0.71	3.45	0.18	1.12	79.2	10.4
16	2,6-Dihydro- xybenzoesäure	54486	-3280	0.997	0.74	2.44	0.19	10.84	83.9	
17	Vanillinman- delsäure	37573	-3231	0.971	0.85	7.51	0.21	9.44	64.7	7.5

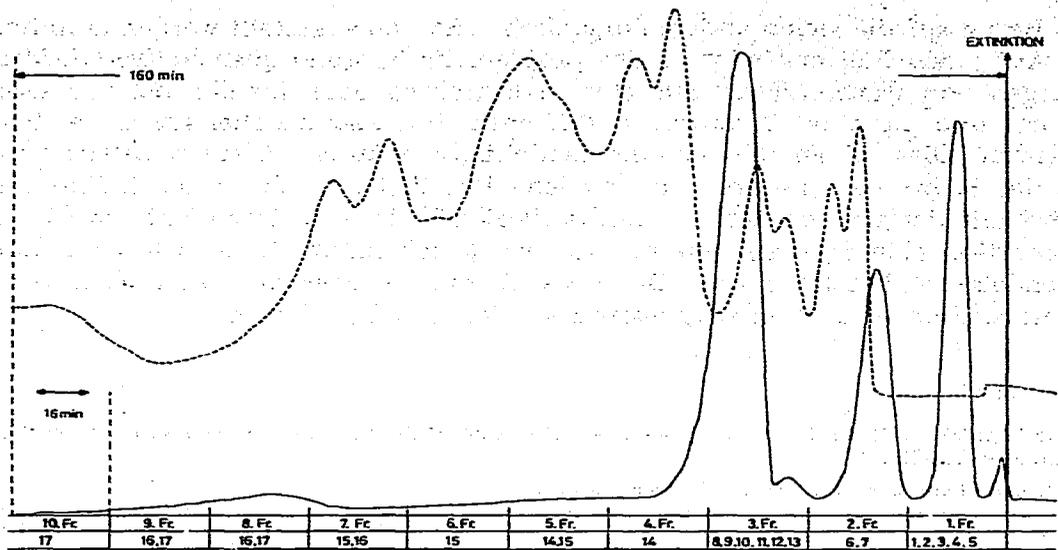


Fig. 2. — Standardgemisch der Substanzen 1—17 (siehe Tabelle I). — 30% eines 24-h-Urins. UV-Elutionsdiagramm bei 280 nm.

Die Wiederholbarkeit wurde nur für die identifizierten Verbindungen im Urin ermittelt, und zwar jeweils aus 20 Doppelbestimmungen von 24-h-Urinen (siehe Tab. I).

DISKUSSION

Durch Herabsetzen der Durchflussgeschwindigkeit erreicht man in den ersten Fraktionen eine erhebliche bessere Trennung. Den gleichen Effekt erzielt man durch Verwenden unpolarer Elutionsmittel. Die Methode erscheint ebenfalls tauglich für die flüchtigeren sauren Komponenten des Urins, wenn man entsprechende GC-Bedingungen wählt. Die Verwendung der Fertigsäule garantiert, dass man immer unter den gleichen Packungsbedingungen arbeitet. Pump- und Detektionssystem sind in dieser oder ähnlicher Ausführung in den meisten Laboratorien vorhanden. Sie sind vergleichsweise billig und technisch völlig unproblematisch. Vergleicht man das vorliegende Verfahren mit von anderen Autoren beschriebenen [2, 3], so bleibt festzustellen, dass der zeitliche Aufwand nicht grösser ist, dass aber entweder die Trennleistung höher ist oder eine vielseitigere Anwendbarkeit gegeben ist. Wegen der nicht sehr spezialisierten Ausrüstung könnte es darüberhinaus eine Alternative zu den Vorschlägen von Alibert und Morot-Gaudry [4—7] darstellen und somit einen Beitrag zur Lösung pflanzenphysiologischer Probleme liefern. Bemerkenswert erscheint weiterhin die für eine Kieselgelsäule durchweg hohe Wiederfindung bei den hier betrachteten Verbindungen.

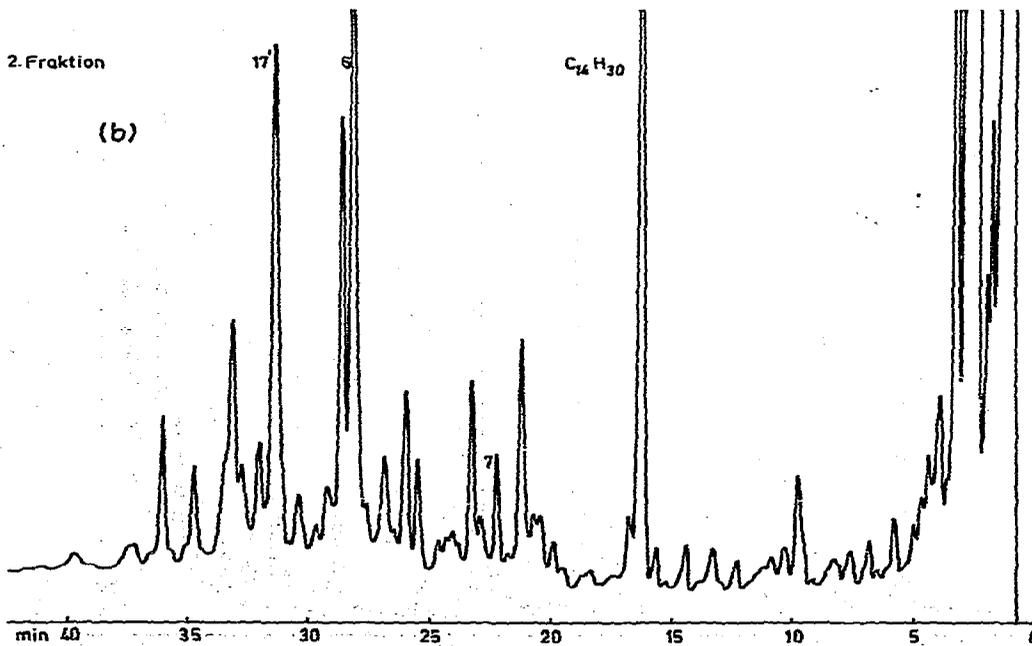
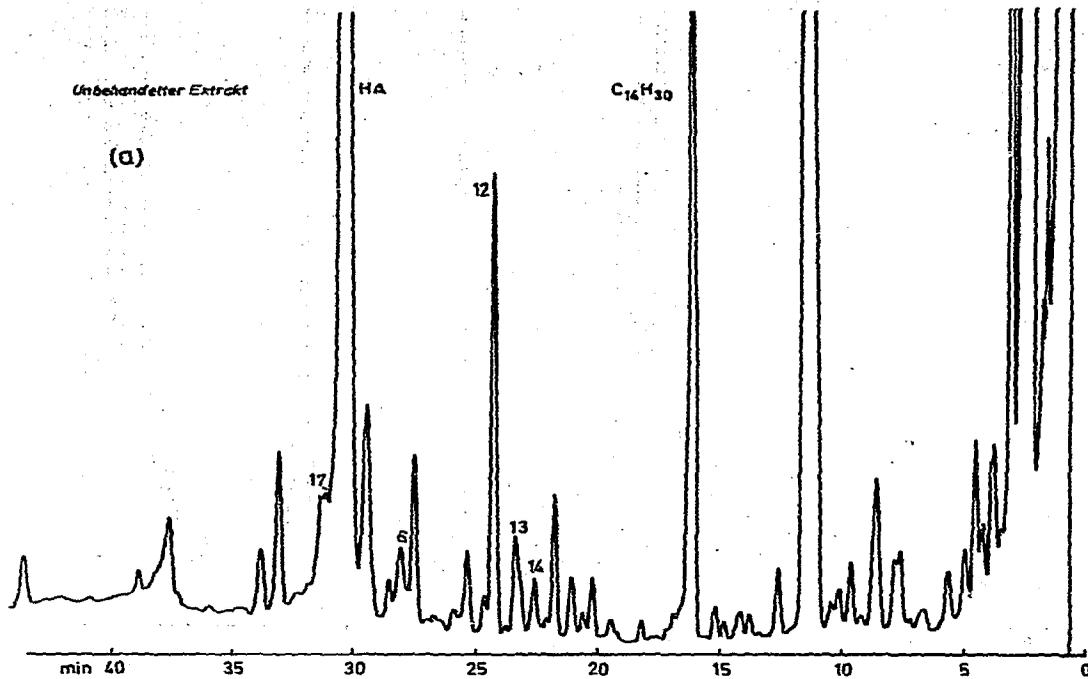


Fig. 3.

(Continued on p. 348)

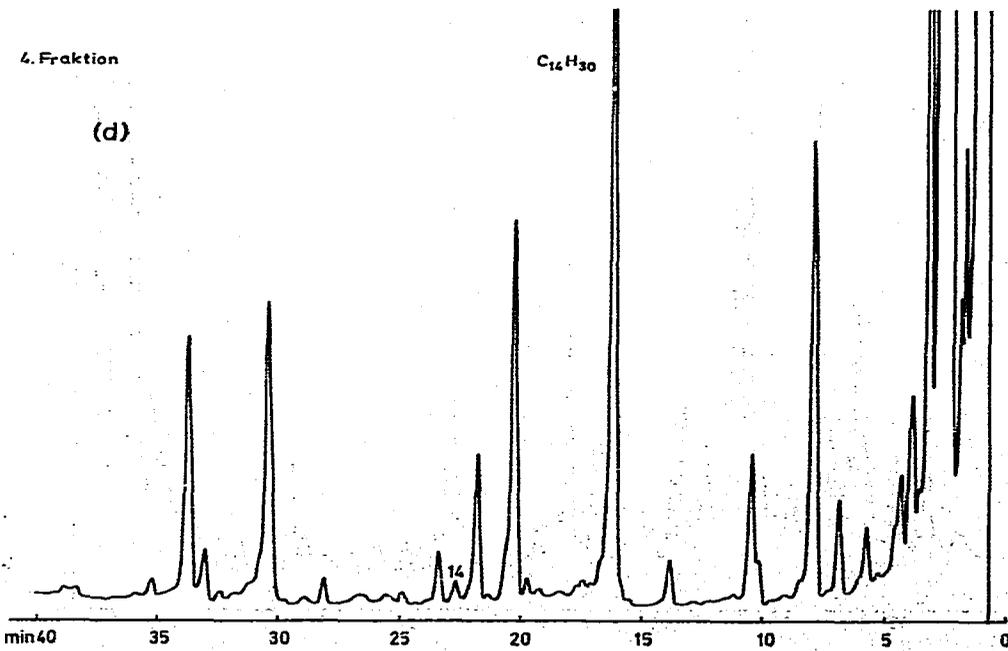
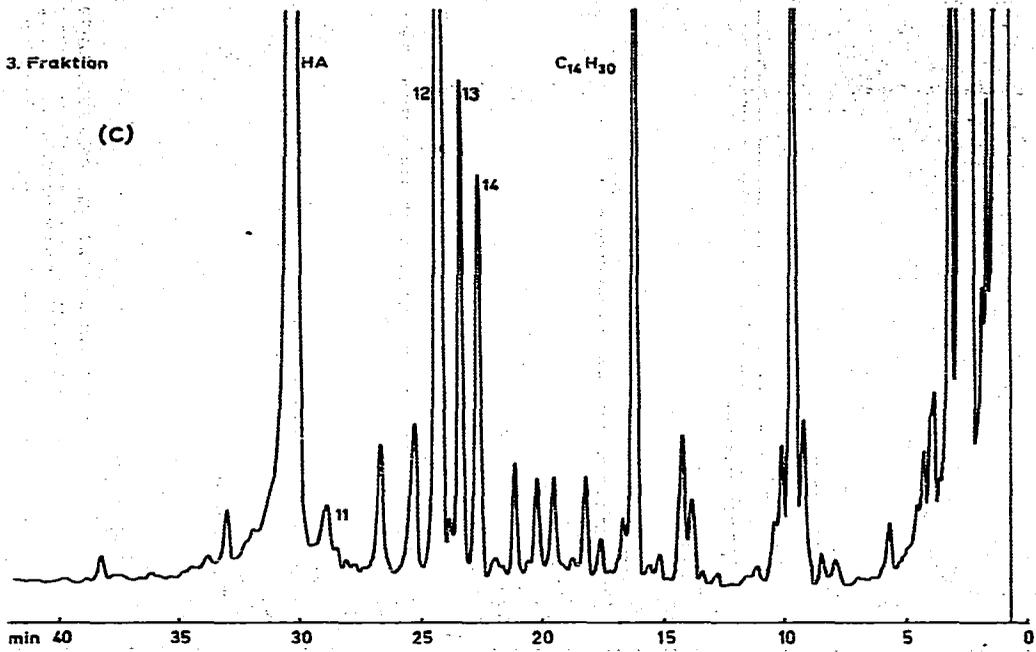


Fig. 3.

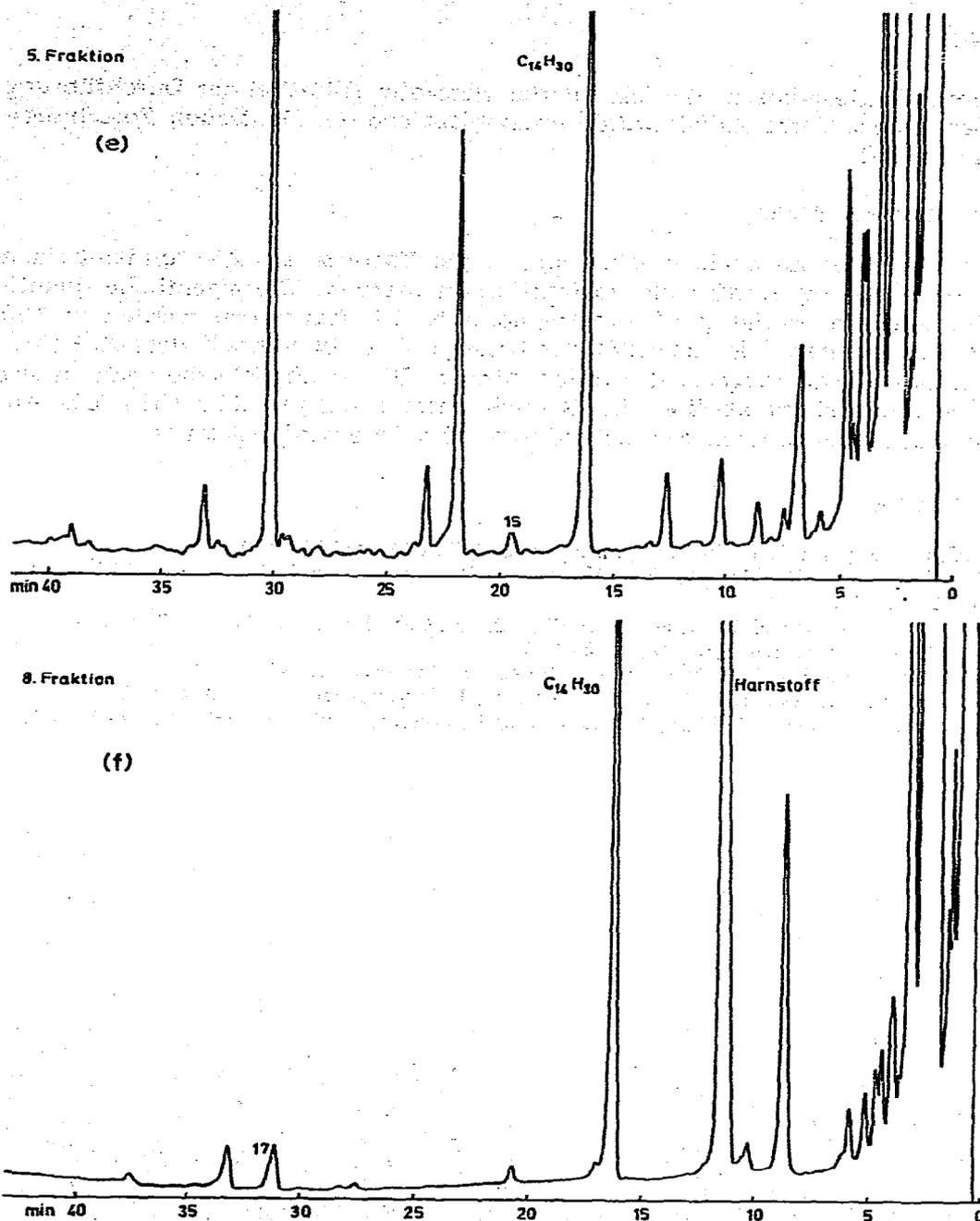


Fig. 3. Gaschromatogramme (a) von nicht vorbehandelten Urinextrakt und (b–f) von 5 Urinfraktionen in denen einige bekannte Abbauprodukte von aromatischen Aminosäuren zu erkennen waren. Die Identifizierung erfolgte nach den Retentionsvolumina der Kieselgel-Chromatographie und der Retentionszeit in der GC. HA = Hippursäure; 6 = Homovanillinsäure; 7 = 2-hydroxyphenylelessigsäure; 11 = 2,4-Dihydroxybenzoesäure; 12 = 4-Hydroxyphenylelessigsäure; 13 = 3-Hydroxyphenylelessigsäure; 14 = 3-Phenylmilchsäure; 15 = Mandelsäure; 17 = Vanillinmandelsäure; 17' = unbekannte Substanzen. 5% des für die Kieselgel-Chromatographie verwendeten Extraktes wurden ohne Vorbehandlung unter den angegebenen Bedingungen gaschromatographisch analysiert.

DANK

Herrn G. Degadjor danke ich für die wertvolle Hilfe bei der Durchführung dieser Arbeit. Diese Arbeit wurde unterstützt von der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine Methode beschrieben, in der Extracte aus 24-Stunden-Urinen auf einer Kieselgelfertigsäule vorfraktioniert werden. Die eigentliche quantitative Analyse erfolgt gaschromatographisch. 10 Fraktionen werden in 160 min abgenommen. Die Kapazität der Kieselgelsäure ist so hoch, dass 30% eines 24-Stunden-Urins aufgegeben werden können. Dies ermöglicht die Bestimmung von sauren Urinmetaboliten im Bereich unter 1 mg pro 24-h-Urin. Die Anwendbarkeit für Studien von metabolischen Profilen wird diskutiert.

LITERATUR

- 1 E.C. Horning und M.G. Horning, *Methods Med. Res.*, 12 (1970) 369.
- 2 R.H. Horrocks, E.J. Hindle, P.A. Lawson, D.H. Drell und A.J. Poole, *Clin. Chim. Acta*, 69 (1976) 93.
- 3 H.U. Melchert und H. Hoffmeister, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 15 (1977) 81.
- 4 G. Alibert, *J. Chromatogr.*, 80 (1973) 173.
- 5 J.F. Morot-Caudry, M.Z. Nicol und E. Jolivet, *J. Chromatogr.*, 87 (1973) 425.
- 6 J.F. Morot-Gaudry, M.Z. Nicol und E. Jolivet, *J. Chromatogr.*, 100 (1974) 200.
- 7 J.F. Morot-Gaudry, V. Fiala, J.C. Huet und E. Jolivet, *J. Chromatogr.*, 117 (1976) 279.