Dünnschicht-Chromatographie in der Klinik

V. Mitteilung: Eine einfache Methode zur Erkennung pathologischer Ausscheidungen von 3-Methoxy-4-hydroxy-mandelsäure

Von J. DITTMANN — Technische Mitarbeit G. LIEM

Aus der Univ.-Kinderklinik Homburg-Saar u. d. Landeskinderklinik Neunkirchen-Kohlhof (Dir.: Prof. Dr. J.B. Mayer)

(Eingegangen am 8. Dezember 1965)

Zur Prüfung auf pathologische Ausscheidung von 3-Methoxy-4-hydroxy-mandelsäure (I) trägt man je 1000 ml Urin-Tagesausscheidung 2,5 μ l Urin auf Dünnschicht-Cellulose auf und entwickelt mit Essigsäureäthylester/n-Propanol/25-proz. wäbr. NH_3 (30+50+20; v/v). Nach Besprühen mit diazotiertem p-Nitranilin tritt bei pathologischer Ausscheidung von I ein blauer Fleck mit einem R_F -Wert von 0,3 auf. Wird trotz positiven Ausfalls von Kontrollen mit reiner I kein Fleck erhalten, so enthält die untersuchte Urinprobe keinen pathologisch erhöhten Gehalt an I.

In order to test for the pathological excretion of 3-methoxy-4-hydroxy-mandelic acid (I), urine is transferred to thin layer cellulose at the rate of 2.5 μ l per 1000 ml of the daily urine excretion. The thin layer chromatogram is developed with ethyl acetate/n-propanol/25% aqueous NH_3 (30+50+20; v/v) and sprayed with diazotised p-nitraniline. In cases of pathological excretion of I, a blue spot is formed with an R_F value of 0.3. If no spot is obtained, despite positive results with controls of pure I, the urine sample does not contain a pathologically increased level of I.

Die Feststellung erhöhter Ausscheidung von 3-Methoxy-4-hydroxy-mandelsäure (I) im Urin hat Bedeutung für die Diagnose von Tumoren der Nebenniere und des sympathischen Nervensystems (1). Nach recht gut übereinstimmenden Angaben verschiedener Untersucher und Referenten (2; 3; 1. c. 4; 1. c. 5) scheiden gesunde Personen in 24 Stunden 1,5—7 mg I aus. Patienten mit Phaeochromocytom und anderen Neuraltumoren scheiden dagegen in 24 Stunden 10—100 mg I aus (3; 1. c. 5). Die Vor- und Nachteile der verschiedenen analytischen Methoden (6—10) sind bekannt und sollen nur kurz erwähnt werden: Papier- und Dünnschicht-chromatographie benötigen weniger Zeit als konventionelle chemische Methoden und erreichen oft einen höheren Grad von Spezifität; sie lassen jedoch nur qualitative oder höchstens genähert quantitative Bestimmungen zu. Als einfache Vorprüfung auf pathologische I-Ausscheidung ist jedoch die Dünnschicht-Chromatographie gut brauchbar.

Prinzip der Untersuchung: Die untere Grenze der Nachweisbarkeit von I liegt bei etwa 0,025 μ g. Es wird eine solche Urinmenge aufgetragen, daß bei einer Tagesausscheidung von etwa 10 mg I 0,025 μ g I auf die Platte kommen. Ist nach dem Entwickeln und Anfärben kein Fleck sichtbar, so liegt normale I-Ausscheidung vor. Entsteht dagegen ein dicker bzw. intensiv gefärbter Fleck, so besteht pathologische I-Ausscheidung. Durch Auftragen reiner I wird geprüft, ob richtig gearbeitet wurde.

Methodik

Arbeitsvorschrift: 24-Stunden-Urin wird gut umgerührt. Chromatographiert wird an dünner Cellulose-Schicht, deren Herstellung beschrieben wurde (11) (Macherey, Nagel & Co., Düren; MN 300). Pro 1000 ml Urin-Tagesausscheidung werden möglichst genau

2,5 ml Urin aufgetragen (möglichst kleiner Fleck 17 mm vom unteren und 20 mm vom linken Rand der Platte entfernt). Entwickelt wird 2 mal 10 cm mit Essigester/n-Propanol/25-proz. NH_3 (30+50+20; v/v). Zwischen beiden Entwicklungen bleibt die Platte 30 Min. bei Zimmertemperatur waagrecht liegen. Nach der 2. Entwicklung wird wieder 30 Min. bei Zimmertemperatur getrocknet und dann mit diazotiertem p-Nitranilin (12) besprüht (Herstellung der Lösung: 10 Vol. einer kalten Lösung von 1,9 g p-Nitranilinhydrochlorid in 45 ml konz. HCl + 950 ml Wasser werden mit 0,2 Vol. 5-proz. wäbr. NaNO_2 -Lösung und 10 Vol. 10-proz. wäbr. Na_2CO_3 -Lösung versetzt).

I kuppelt mit dem Sprühreagenz zu einem blauen Fleck bei R_F 0,36 $\pm$ 0,01. In Urinen gelöstes und chromatographiertes I hat allerdings mitunter einen kleineren R_F -Wert, die Abtrennung von anderen Urin-Bestandteilen, die mit diazotiertem p-Nitranilin reagieren, gelingt jedoch sehr gut.

Die Sicherheit der Bestimmung kann ohne wesentlichen Arbeitsaufwand durch 3 Maßnahmen beträchtlich gesteigert werden: 1. Man trägt bekannte Mengen reiner I auf, z. B. 0,01; 0,025; 0,05 und 0,1 μ g I, gelöst in 10-proz. Isopropanol/Wasser. Intensität und Größe der nach Anfärben erhaltenen Flecke lassen schätzungsweise Mengenvergleiche mit dem Urin-I zu; außerdem erhält man auf diese Weise Gewißheit, daß bei Entwickeln und Anfärben keine Fehler gemacht wurden. 2. Man trägt auch andere Urinmengen auf, z. B. je 1000 ml Urin-Tagesausscheidung 0,25 und 5 μ l, und kann dann ebenfalls aus Größe und Intensität der Flecke angenähert quantitative Aussagen machen. 3. Man setzt an einer Stelle der normalerweise aufgetragenen Urinmenge 0,025 μ g I zu und erhält auf diese Weise den R_F -Wert von I in Gegenwart von Urinbestandteilen.

Trotz dieser 3 Sicherungen können auf einer Dünnschichtplatte 3 oder 4 Urinproben auf pathologischen I-Gehalt untersucht werden.

Literatur

1. KOPIN, I. J., diese Z. 2, 115 (1964). — 2. RAUEN, H. M. und I. AEBERT, Klin. Wschr. 42, 443 (1964). — 3. RUTHVEN, C. R. J. und M. SANDLER, Analyt. Biochem. (New York) 8, 282 (1964). — 4. DIRSCHERL, I. W. und A. WIRTZFELD, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 336, 81 (1964). — 5. Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 6. Aufl., S. 451/52 Basel (1960). — 6. WEIL-MALHERBE, H., Analyt. Biochem. (New York) 7, 485 (1964). — 7. WEIL-MALHERBE, H., diese Z. 2, 161 (1964). — 8. v. STUDNITZ, W., K. ENGELMAN und A. SJOERDSMA, Clin. chim. Acta (Amsterdam) 9, 224 (1964). — 9. GÖDICKE, W., K. H. BROSIOWSKI, J. Chromatogr. (Amsterdam) 15, 88 (1964). — 10. DE POTTER, W. P., R. F. VOCHTEN, A. F. DE SCHAEFDRIYVER, Experientia (Basel) 21, 482 (1965). — 11. DITTMANN, J., diese Z. 1, 190 (1963). — 12. SMITH, I., Chromatographic Techniques, S. 195, William Heinemann, London (1958).

Dr. rer. nat. Jürgen Dittmann, 665 Homburg-Saar, Universitäts-Kinderklinik