

Stoffwechsels dieser Tiere an die in der Natur weitverbreitete Oxalsäure schließen.

Die Veresterungsmethode ermöglicht eine exakte qualitative und hinreichend quantitative Bestimmung der Oxalsäure, besonders auch des löslichen Anteils, im Urin. Sie kann daher eingesetzt werden, um die Ursachen der Oxalatsteinbildung im tierischen und menschlichen Organismus zu studieren. Einerseits kann man das Problem der exogenen Oxalsäure und die Auswirkung einer extremen Diät und andererseits die Möglichkeiten der endogenen Oxalsäurebildung — modifikativ z. B. als Anomalie des Eiweißstoffwechsels und genotypisch bedingt z. B. als Rassenmerkmal bei Hunden — untersuchen. Wenn der Oxalatgehalt des Harns parallel zu den verschiedensten Stoffwechselfunktionen gemessen würde, wären möglicherweise enzymatische Störungen als Kausalfaktoren endogener Oxalsäure festzustellen. Sowohl therapeutische als auch prophylaktische Maßnahmen könnten an einem durch Züchtung geschaffenen Tiermaterial mit hoher Oxalsäureausscheidung erprobt werden. Falls sich die Bil-

dung von Oxalatsteinen beim Menschen als wenigstens teilweise erblich bedingt erweisen sollte, gilt es in besonderer Weise, durch Diät und medikamentöse Prophylaxe die Entstehung und das Wachstum von Harnkonkrementen zu verhindern.

Wegen der besonderen Bedeutung, die dem löslichen Anteil des Oxalsäuregehaltes unserer Nahrungsmittel zukommt, sollten die entsprechenden Tabellen über die Inhaltsstoffe von Früchten und Gemüsen nicht nur den relativ ungefährlichen Gehalt an Gesamt-oxalat aufzeigen, sondern vorwiegend die *gelöste* Oxalsäure. Die besondere Erhöhung der Oxalsäureausscheidung beim Menschen durch perorale Aufnahme löslichen Oxalats wurde bereits vor Jahren in Diätversuchen beobachtet und mittels der neuen Nachweismethode bestätigt (17). Entsprechend müßten auch die Diätvorschriften für steinkranke oder steingefährdete Personen geändert werden.

Wir danken Frl. RENATE PUFF, Frau SABINE WELL und Herrn W. SZABLEWSKI für ihre Mitarbeit.

Literatur

1. PRIEN, E. L., J. Urol., Baltimore 89, 917 (1963). — 2. SÜCKER, I., Aertzl. Laborat. 9, 260 und 306 (1963). — 3. BOSHAMER, K., Morphologie und Genese der Harnsteine in: Handbuch der Urologie, Bd. X, S. 74. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1961). — 4. v. SENGBUSCH, R. und A. TIMMERMANN, Urol. int. 4, 76 (1957). — 5. DULCE, H. J. und E. TAUPITZ, diese Z. 1, 59 (1963). — 6. FLEISCH, H. und S. BISAZ, Experientia (Basel) 20, 276 (1964). — 7. HINSBERG, K. und K. LANG, Medizinische Chemie. Urban u. Schwarzenberg, München-Berlin-Wien (1957). — 8. v. SENGBUSCH, R. und A. TIMMERMANN, Urol. int. 5, 218 (1957). — 9. ARCHER, H. E., A. E. Dorner, E. F. Scowen und W. A. Watts, Clin. Sc., London 16, 405 (1957). — 10. FLASCHENTRÄGER, B. und B. P. MÜLLER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 251, 52 (1938). — 11. HODGKINSON, A. und P. M. ZAREMSKI, Analyst 86, 16 (1961). — 12. EHEART, J. F. und D. C. HURST, J. Assoc. off. agric. Chemists 45, 98 (1962). — 13. NIEDIECK, B., R. v. SENGBUSCH und A. TIMMERMANN, Urol. int. 7, 309 (1958). — 14. DODDS, E. C. und E. J. GALLIMORE, Biochem. J. 26, 1242 (1932). — 15. LEHMANN, E. und W. GRÜTZ, Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde 61, 77 (1953). — 16. EHRENDORFER, K., Bodenkultur (Wien) Ausg. A. 12, 100 (1961). — 17. v. SENGBUSCH, R. und L. PETERS, Unveröffentlichte Untersuchungen. — 18. EHRENDORFER, K., persönliche Mitteilung (1963).

Professor Dr. R. von Sengbusch
2 Hamburg-Volksdorf
Waldredder 4

Dünnschicht-Chromatographie in der Klinik

III. Mitteilung: Zweidimensionale Trennung von Aminosäuren in biologischen Flüssigkeiten

Von J. DITTMANN

Aus der Universitäts-Kinderklinik Homburg (Saar) und der Landeskinderklinik Neunkirchen/Saar-Kohlhof
(Direktor: Prof. Dr. J. B. Mayer)

(Eingegangen am 22. März 1965)

Zur Trennung von Aminosäuren wird 1 Vol. Urin mit 1 Vol. 0,4 n HCl gemischt. 2 μ l Gemisch werden auf Dünnschicht-Zellulose aufgetragen. Es wird 2 mal mit n-Propanol-Wasser (7 + 3; v/v) und 1 mal senkrecht zur ersten Laufrichtung mit Isopropanol-Wasser (8 + 2; v/v) entwickelt.

For the separation of amino acids, 1 vol. of urine is mixed with 1 vol. of 0.4 n HCl; 2 μ l of this mixture are spotted into thin layers of cellulose. The thin layer chromatogram is developed twice with n-propanol: water (7 + 3, v/v) and once with isopropanol: water (8 + 2, v/v) in the direction perpendicular to the first solvent.

Ein wesentliches Anwendungsgebiet der Dünnschichtchromatographie („DC“) in der Klinik ist der Nachweis von Aminosäuren in Urinen. Die Literatur ist so um-

fangreich, daß sie hier nicht gebracht werden kann. Vor der Analyse von Urinen durch DC sollten jedoch die verfügbaren Methoden gegeneinander abgewogen

werden. Soll lediglich eine *Hyper-* oder *Hypoaminoacidurie* nachgewiesen werden, so ist die Bestimmung des Aminosäure-Stickstoffs (1, 2) völlig ausreichend. Besonders zuverlässige Vergleichswerte erhält man bei Bezug des Aminosäure-Stickstoffs auf den Kreatinin-Stickstoff (3). — Will man eine *vollständige Übersicht* über die Quantität der Ausscheidung bestimmter Aminosäuren erhalten, so ist Säulenchromatographie an Ionenaustauschern (4) unerlässlich. — Papierchromatographie („PC“) (5, 6) und DC (7, 8) sind dann besonders geeignet, wenn die Ausscheidung *bestimmter Aminosäuren* im Urin nachgewiesen werden soll. Die DC ist hier der PC überlegen, weil sie weniger Zeit und Material erfordert. — Hier soll eine Methode beschrieben werden, die besonders unempfindlich gegenüber der Anwesenheit von Salzen und anderen Bestandteilen des Urins ist.

Methode

1 Vol. 24 Stdn.-Urin wird mit 1 Vol. 0,4 *n* HCl versetzt. 2 μ l der Mischung werden auf möglichst kleinem Fleck auf Zellulose-Platten (9) aufgetragen. Die Platten werden in folgender Weise entwickelt: 12 cm mit *n*-Propanol-Wasser (7 + 3; v/v; „Entwicklung 1“); 10 cm senkrecht zur ersten Richtung mit Isopropanol-Wasser (8 + 2; v/v); 12 cm in der ersten Richtung noch einmal Entwicklung 1. Angefärbt wird mit Ninhydrin-Reagenz. Sicherheit und Aussagekraft der Methode können dadurch erhöht werden, daß auf einer zweiten Platte höhere Mengen (3—6 μ l) Urin-HCl-Gemisch aufgetragen werden, oder es werden auf einer dritten Platte zusätzlich zu der Urin-HCl-Mischung gerade nachweisbare Mengen (die Hälfte der in den beiden vorigen Mitteilungen (9, 10) angegebenen Mengen) der besonders interessierenden Aminosäuren aufgetragen.

Ergebnisse

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 1 und 2 veranschaulicht. A ist die Mischung der in (9) chromatographierten Aminosäuren; auf dem anderen Chromatogramm (Abb. 2) wurden zusätzlich zu 1 μ l der Mischung

A 2 μ l Urin-HCl-Gemisch aufgetragen. Aus den beiden Abbildungen ist ersichtlich, daß Gegenwart von Urin-Bestandteilen die R_F -Werte nicht stärker verändert als der normalen Schwankung der R_F -Werte (9, 10) entspricht. Es wurde ein eiweißfreier Urin verwendet, man kann jedoch auch stark eiweißhaltige Urinproben in genau der gleichen Weise chromatographieren, ohne daß die R_F -Werte wesentlich verändert werden. Die gleichen Ergebnisse wurden bei Chromatographie der Gemische B und C (10) mit und ohne Urin erhalten. (Auf den photographischen Abbildungen sind Prolin und Asparagin wegen der gelben bis braunen Farbe ihrer mit Ninhydrin erhaltenen Flecke nicht erkennbar.)

Trägt man auf einer zweiten Platte eine größere Urinmenge auf, so kann man auch Aminosäuren nachweisen, die in sehr geringer Menge vorhanden sind.

Trägt man auf einer dritten Platte reine Lösungen bestimmter Aminosäuren zusätzlich zu der Urinprobe auf, so sieht man, ob diese Aminosäuren mit den im Urin vorkommenden Aminosäuren einen gemeinsamen Fleck ergeben, oder ob man dicht benachbarte Flecke erhält. Im ersteren Fall war die Aminosäure im Urin enthalten, im zweiten Fall war sie nicht enthalten.

Photographie der Platten erfolgt zweckmäßig auf folgende Weise: Beleuchtung durch vier 100 Watt-Lampen in 50 cm Abstand; Dokumentenfilm AGEPAN; BIOMETAR 2,8/80 mit Zwischenring 6 mm; Blende 8, 4 Sek.; Abstand Film—Platte 65 cm; Filter Zeiss Jena „GR 1“; Entwicklung 6 Min. bei 20° mit *Ultrafin*-flüssig 1:10.

Diskussion

In vorliegender Arbeit wurde gezeigt, wie man Aminosäuren in Urinen durch DC ohne Vorbehandlung der Urine trennen und nachweisen kann. Die gleiche Methode ist auch auf Serum, Liquor usw. anwendbar. In einer größeren Untersuchung (11) wurden auch die in bakteriologischen Nährlösungen vorhandenen Aminosäuren nach genau der gleichen Methode getrennt und nachgewiesen.

A

A+Urin

Abb. 1

Abb. 2

Literatur

1. TROLL, W. und R. K. CANNAN, J. *biol. Chemistry* 200, 803 (1953). — 2. MÜTING, D. und E. KAISER, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 332, 276 (1963). — 3. CONSTANTAS, N. S. und C. DANELATOU-ATHANASSIADOU, *Clin. chim. Acta* (Amsterdam) 9, 1 (1964). — 4. BERGER, H., M. BRENNER und H. VETTERLI-BÜCHNER, *Aminoacidurie und Hyperaminoacidurie*, Bibliotheca Paediatrica 71, S. Karger, Basel/New York (1959). — 5. BICKEL, H. und F. SOUCHON, *Die Papierchromatographie in der Kinderheilkunde*, (Beihefte zum Arch. Kinderhk., Stuttgart 31), Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart (1955). — 6. SMITH, J., *Chromatographic Techniques*, William Heinemann, London (1958). — 7. WALZ, D., A. R. FAHMY, G. PATAKI, A. NIEDERWIESER und M. BRENNER, *Experientia* (Basel) 19, 213 (1963). — 8. PATAKI, G., *Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptidchemie*, Walter de Gruyter & Co., Berlin (im Druck). — 9. DITTMANN, J., *diese Z.* 1, 190 (1963). — 10. DITTMANN, J., *diese Z.* 3, 59 (1965). — 11. DITTMANN, J., J. B. MAYER und M. WOLF, *Zschr. Kinderhk.* 94, 130 (1965).

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

Dünnschicht-Chromatographie in der Klinik

IV. Mitteilung: Abtrennung von Phosphoethanolamin

Von J. DITTMANN¹⁾

Aus der Universitäts-Kinderklinik Homburg-Saar und der Landeskinderklinik Neunkirchen/Saar-Kohlhof
(Direktor: Prof. Dr. J. B. Mayer)

(Eingegangen am 22. März 1965)

Aminosäuren können an dünnen Zellosoeschichten durch zweidimensionale Chromatographie mit folgenden Lösungsmitteln getrennt werden: *Lösung a*: Wasser mit 60 Vol% n-Propanol und 20 mMol Tris-[hydroxymethyl]-aminomethan, sowie 17,6 mMol HCl/l; — *Lösung b*: Wasser mit 70 Vol% Isopropanol. — Entwickelt wird 10 cm in jeder Richtung. Phosphoethanolamin wird unter diesen Bedingungen nicht nachweisbar zersetzt.

Amino acids can be separated on thin-layers of cellulose by 2-dimensional chromatography with the following solutions: *solution a*: water with 60 Vol% n-Propanol and 20 mMol Tris-[hydroxymethyl]aminomethane and 17,6 mMol HCl/l; — *solution b*: water with 70 Vol% Isopropanol. — The plates are developed 10 cm in each direction. Under these conditions there is no detectable destruction of phosphoethanolamine.

Der Nachweis von Phosphoethanolamin (I) in Urinproben hat Bedeutung bei der Diagnostik von Hypophosphatasie (1). Chromatographiert man saure Lösungen (2—4), die I enthalten, so erhält man 2 Flecke: I und durch Hydrolyse von I gebildetes Aethanolamin. Aus diesem Grund wurde ein gepuffertes Lösungsmittel-System geprüft, das schonende Abtrennung von I auch bei verschiedener Wasserstoffionen-Konzentration der Analysenlösung ermöglicht.

Methodik

Lösung a

24,2 g Tris[hydroxymethyl]aminomethan werden in Wasser zu 1000 ml gelöst. 250 ml dieser Stammlösung werden mit 440 ml 0,1 n HCl versetzt und mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. — 4 Vol. des vorstehenden Puffers werden mit 6 Vol. n-Propanol vermischt.

Lösung b

3 Vol. Wasser werden mit 7 Vol. Isopropanol vermischt. Dünne Celluloseschichten werden nach beschriebener Methode (2) auf Glasplatten hergestellt. Die Analysenprobe (1 μ l wäßrige Lösung) wird auf möglichst kleinem Fleck 17 mm vom unteren und 20 mm vom linken Rand entfernt aufgetragen. — Entwickelt wird

10 cm mit Lösung a und nach halbstündiger Zwischentrocknung bei Raumtemperatur senkrecht zur ersten Laufrichtung 10 cm mit Lösung b. Nach Lufttrocknung der Platte wird mit Ninhydrin-Reagenz besprüht und 15 bis 30 Min. auf 70° erwärmt.

Ergebnisse

0,2 μ g I sind mit vorstehender Methode auf Dünnschicht-Chromatogrammen gut abtrennbar und nachweisbar. Es wird nur ein Fleck erhalten, dessen R_F -Werte sich von denen des Aethanolamins stark unterscheiden. Auch die Farbe, die man aus I und Ninhydrinreagenz nach Erwärmen erhält, unterscheidet sich von der Farbe der meisten Amine und Aminosäuren durch das Fehlen einer Rot-Komponente im Blau. Eine Verwechslungsmöglichkeit hinsichtlich R_F -Wert und Farbe des I-Flecks besteht nur bei Vorkommen von Asparaginsäure. Zur Prüfung der Leistungsfähigkeit der beschriebenen Methode wurden 5 Mischungen („A, B, C, D, E“) trennbarer Aminosäuren, Amide und Amine in Wasser hergestellt und je 4 mal chromatographiert. Die unteren Grenzen der Nachweisbarkeit und die R_F -Werte sind in nachstehender Tabelle zusammengestellt. Hinter den R_F -Werten ist jeweils die mittlere Streuung der Einzelwerte um den Mittelwert angegeben.

¹⁾ Technische Mitarbeit: G. LIEM.