

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 15, 1977, pp. 657-662

Quantitative gaschromatographische Bestimmung von aromatischen Carbonsäuren mit Hilfe von Glas-Kapillarsäulen

Von K. Olek und P. Wardenbach¹⁾

Institut für Humangenetik, Universität Bonn

(Eingegangen am 25. November 1976/26. Mai 1977)

Zusammenfassung: Am Beispiel von 20, möglicherweise im Urin vorkommender aromatischer Carbonsäuren wird gezeigt, daß die Trennung mit einer Glas-Kapillarsäule, verglichen mit einer gepackten Säule, eine wesentlich höhere Trennleistung bei verkürzter Analysenzeit bietet. Trotz der Verwendung eines Splitsystems sind Reproduzierbarkeit und Linearität der quantitativen Bestimmung mit der mit gepackten Säule vergleichbar. Es wird eine größere Nachweisempfindlichkeit erreicht. Die Vorteile bei der Anwendung auf die Probleme der Diagnostik angeborener Stoffwechselanomalien werden an Urinanalysen von Phenylketonurie-Patienten gezeigt.

Quantitative determination of aromatic carboxylic acids with glass-capillary-columns

Summary: With a glass-capillary column 20 aromatic acids, probably present in urine, were analysed quantitatively. In comparison with a packed column the capillary column offers several advantages: a higher resolution; a greatly reduced analysis time, an increased sensitivity. Though a split system is used, repeatability and linearity are suitable for quantitative analysis. The advantages are best recognized by the analysis of urine specimens of patients with a metabolic disorder (phenylketonuria).

Einleitung

In den letzten Jahren gewinnt die Diagnose angeborener Stoffwechselerkrankungen aufgrund von Urinuntersuchungen zunehmend an Bedeutung. Wegen ihrer verhältnismäßig hohen Frequenz besitzen die Störungen im Stoffwechsel der aromatischen Aminosäuren eine herausragende Stellung. Beim Vorliegen von Homozygotie ist eine quantitative Bestimmung der durch den Defekt betroffenen Metaboliten mit gepackten Säulen meist problemlos. Daß eine gepackte Säule nicht in der Lage ist, alle vorhandenen Substanzen vollständig zu trennen, wird erst dann bedeutsam, wenn man geringfügige metabolische Abweichungen untersuchen will, wie etwa die Heterozygotie rezessiver Anomalien oder variante Formen der Hyperphenylalaninämie. Als Ausweg bietet sich die Kombination verschiedener chromatographischer Prinzipien, die Anwendung hochspezifischer Detektionssysteme oder die Verwendung eines hochauflösenden Trennsystems an, wie es die Glas-Kapillare darstellt. Im Folgenden wird die qualitative und quantitative Analyse einiger Harnmetaboliten mit einer Glas-Kapillare beschrieben.

¹⁾ Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Methodik

Aufstellen der Standardkurven

Jeweils 10 mg der Standardsubstanzen werden abgewogen und in 100 ml Methanol gelöst. Nach dem Abpipettieren von 1, 3, 5, 10, 15, 20 und 25 ml werden diese Lösungen am Rotationsverdampfer unterhalb 40 °C bis zur Trockene eingedampft, in 1 ml Reaktionslösung, bestehend aus N, O-Bis-trimethylsilylacetamid, Chloroform und Acetonitril im Volumenverhältnis 1 + 1 + 2, aufgenommen und 1 Stunde zur Vervollständigung der Silylierung auf 40 °C erwärmt (Reacti-Therm, Pierce). Die Silylierungslösung enthält 1 µl/ml *n*-Tetradecan als inneren Standard. Jeweils 0,5 µl der erhaltenen Lösung werden injiziert. Dieser Vorgang wird zur Ausschaltung zufälliger Fehler 5 mal wiederholt. Die vom Integrator ausgedruckten Impulszahlen werden durch die Impulszahlen des inneren Standards dividiert, um den Einspritzfehler auszuschalten. Die so erhaltenen relativen Impulszahlen werden mit Hilfe des *Nalimow*-Tests (1) von Ausreißern befreit. Die Standardgerade wird durch eine lineare Regressionsanalyse (2) ermittelt, wobei die Zielgröße oder abhängige Variable die relative Impulszahl darstellt und die Einflußgröße (unabhängige Variable) durch die in 1 ml Reaktionslösung enthaltene Substanzmenge gegeben ist.

Extraktion von Urinproben

20 ml Urin werden mit 5 ml halbkonzentrierter Salzsäure versetzt. 20 ml dieser Lösung (entspricht 16 ml Urin) werden auf eine Kieselgel-Fertigsäule (Extrelut; Fa. Merck, Darmstadt) pipettiert. Nach dem Einziehen der wäßrigen Phase werden die lipophilen Substanzen mit 40 ml Essigsäureethylester eluiert. Die Essigsäureethylester-Lösung wird dann am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingedampft und der Rückstand in

Tab. 1. Extraktionsverlust der Phenylalanin-Metaboliten.

Substanz	Einwaage (mg)	wiedergefunden (mg)	Bereich (mg)	Variations- koeffizient (%)	n
Phenyllessigsäure	0,82	0,92 (112,2%)	0,81 – 0,99	5,08	9
Mandelsäure	0,85	0,77 (90,6%)	0,71 – 0,81	4,09	9
<i>o</i> -Hydroxyphenyllessigsäure	0,90	0,81 (90,0%)	0,78 – 0,84	2,49	7
3-Phenylmilchsäure	0,84	0,93 (110,7%)	0,85 – 1,01	5,88	9
<i>p</i> -Hydroxyphenyllessigsäure	1,06	1,04 (98,1%)	0,92 – 1,16	7,55	7
Phenylbrenztraubensäure	0,86	0,57 (66,3%)	0,54 – 0,60	3,81	7

1 ml Silylierungslösung (siehe oben) aufgenommen. Nachdem die Mischung 1 Stunde auf 40 °C erhitzt worden ist, werden 0,5 µl der erhaltenen Lösung injiziert.

Bestimmung des Extraktionsverlustes

20 ml Urin werden wie oben beschrieben aufbereitet und gaschromatographisch analysiert. Diese Daten ergeben die Leerwerte. Dann wird in 20 ml des gleichen Urins eine definierte Menge Standardsubstanzen gelöst. Nach der Aufarbeitung wird die Probe quantitativ vermessen. Von den Peakflächen (Impulszahlen) der einzelnen Standardsubstanzen werden die entsprechenden Leerwerte abgezogen. Diese Differenz wird mit der zu erwartenden Impulszahl (aus der Standardkurve) verglichen und daraus der Extraktionsverlust berechnet (Tab. 1).

Gaschromatographie

Chromatographie mit der gepackten Säule

Gerät: Ein Pye 104 Doppelsäulengerät mit beheiztem Flammenionisationsdetektor, Einlaßheizung und Unicam S4 Probenaufgabeautomatik; Glassäule 9 ft × 2 mm i. d., gefüllt mit 3% OV-3 auf Chromosorb WHP 100–120 mesh; Temperaturprogramm: Anfangsisotheime 5 min 100 °C; Steigerungsrate 4 °C pro Minute bis 250 °C; Endisotheime 5 min 250 °C. Der Detektor wurde auf 300 °C, die Einlaßheizung auf 190 °C gehalten. Gasströme: Wasserstoff 28 ml/min, Luft 700 ml/min; Stickstoff 12 ml/min. Verstärkung 8×10^2 . Retentionszeiten und Impulszahlen lieferte ein elektronischer Integrator (Vidar Mod 6300); Registrierung der Chromatogramme erfolgte mit dem Unicam AR-25 bei einem Papiervorschub von 90 s/cm.

Chromatographie mit der Glaskapillare

Es wurde ein Pye Unicam 104 Gaschromatograph mit unbeheiztem Flammenionisationsdetektor verwendet. Die Trennung erfolgte auf einer 25 m × 0,23 mm Glaskapillare, belegt mit OV-101. Die Glaskapillare und der vorgeschaltete Allglas-Injektions-Splitter, entgegen den werkseitigen Vorschlägen nicht mit einer Füllung versehen, wurden von LKB-Instruments, Schweden, bezogen. Versuche, die silylierten Carbonsäuren auf Glaskapillaren anderer Hersteller zu vermessen, schlugen bisher fehl. Um einen konstanten Säulenvordruck aufrecht zu erhalten, wurde der serienmäßige Durchflußregler durch einen Präzisions-Druckregler ersetzt (R/182 N, Negretti und Zambra). Die Zuführung von 40 ml „make-up“-Gases am Ende der Trennkapillare mit Hilfe eines T-Stücks steigerte die Detektorempfindlichkeit um über 100%. Alle in den Detektor einströmenden Gase, Wasserstoff (43 ml/min), Luft (700 ml/min) und „make-up“-Gas (40 ml/min) wurden zur Erzielung einer stabilen Basislinie mit Hilfe von Molekularsieb (Hydro-Purge-Gas-Filter, Applied Science Laboratories) von organischen Verunreinigungen befreit. Folgende Trennsäulenbedingungen kamen zur Anwendung; Trägergasstrom 0,78 ml/min, Stickstoff bei einem Säulenvordruck von 0,8 bar bei 100 °C (Optimum der Trenn-

stufenzahl); Einspritzblocktemperatur 250 °C; Anfangsisotheime 1 min 100 °C; Steigerungsrate 10 °C pro Minute bis 250 °C Endisotheime 5 Minuten 250 °C; Splitterverhältnis 1:46,91, Verstärkung 1×10^2 . Die Chromatogramme wurden bei einem Papiervorschub von 48 s/cm aufgenommen; Retentionszeiten und Impulszahlen lieferte ein elektronischer Integrator (Vidar, Modell 6300).

Ergebnisse

Abbildung 1 und 2 zeigen die Gaschromatogramme von silylierten aromatischen Carbonsäuren, die mit der gepackten (Abb. 1), bzw. der Glas-Kapillarsäule (Abb. 2), unter den im experimentellen Teil erwähnten Bedingungen erhalten wurden. Die verbesserte Trennqualität der Glaskapillare zeigt sich daran, daß mit ihr *o*-Hydroxyphenyllessigsäure, 3-Phenylmilchsäure und *m*-Hydroxyphenyllessigsäure zu 100% aufgelöst werden, während auf der gepackten Säule nur eine Auflösung von ungefähr 90% erzielt wird. Weiterhin sind auf der gepackten Säule Vanillinsäure und *o*-Hydroxyhippursäure nur als Schulter von 2,6-Dihydroxybenzoesäure bzw. Ferulasäure zu erkennen; 2,4-Dihydroxybenzoesäure und *o*-Hydroxyzimtsäure erscheinen als ein verbreiteter Peak (Abb. 1). In allen Fällen zeigt die Kapillarsäule eine Auflösung von weit über 90%. Der Gewinn an Trennqualität wird noch besser erkennbar beim Vergleich von Urinchromatogrammen (Abb. 3–6), die auch die gesteigerte Nachweisempfindlichkeit deutlich machen. Ein weiterer Vorteil besteht in der um 15 Minuten verkürzten Analysenzeit.

Zur Demonstration der erzielten Reproduzierbarkeit von relativen Retentionszeiten (n -Tetradecan = 1,00), wesentlich für die gaschromatographische Identifizierung von Substanzen in biologischen Proben, sei eine Substanz mit kurzer (Mandelsäure) und eine mit langer Retentionszeit (*m*-Hydroxyzimtsäure) herausgegriffen:

R_t (Mandelsäure):

$$\bar{x} = 1,110 \quad s = 0,002 \quad n = 20$$

R_t (*m*-Hydroxyzimtsäure):

$$\bar{x} = 1,689 \quad s = 0,006 \quad n = 20$$

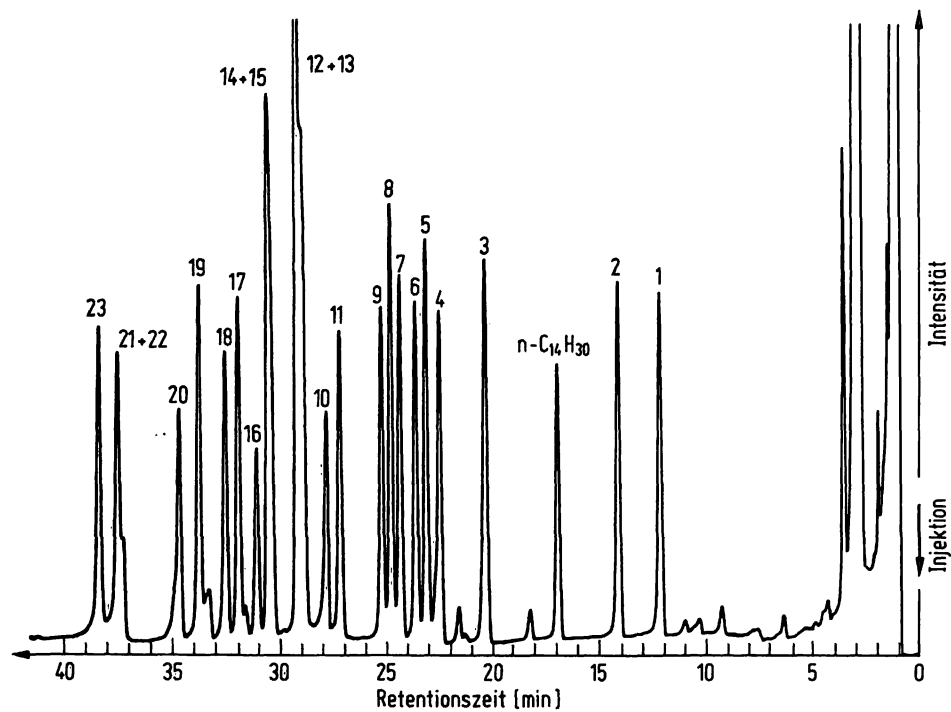


Abb. 1. Trennung silylierter aromatischer Carbonsäuren mit der gepackten Säule; chromatographische Bedingungen siehe Text; Verstärkung 8×10^2 .

1 Benzoesäure; 2 Phenyllessigsäure; 3 Mandelsäure; 4 Zimtsäure; 5 *o*-Hydroxyphenylelessigsäure; 6 3-Phenylmilchsäure, 7 *m*-Hydroxyphenylelessigsäure; 8 *p*-Hydroxybenzoesäure; 9 *p*-Hydroxyphenylelessigsäure, 10 Veratrumssäure; 11 Phenylbrenztraubensäure, 12 Vanillinsäure; 13 2,6-Dihydroxybenzoesäure; 14 *o*-Hydroxyzimtsäure; 15 2,4-Dihydroxybenzoesäure; 16 Homogentisinsäure; 17 *m*-Hydroxyzimtsäure; 18 Vanillinmandelsäure; 19 *p*-Hydroxyzimtsäure; 20 Indol-3-essigsäure; 21 *o*-Hydroxyhippursäure, 22 Ferulasäure; 23 3,4-Dihydroxyzimtsäure.

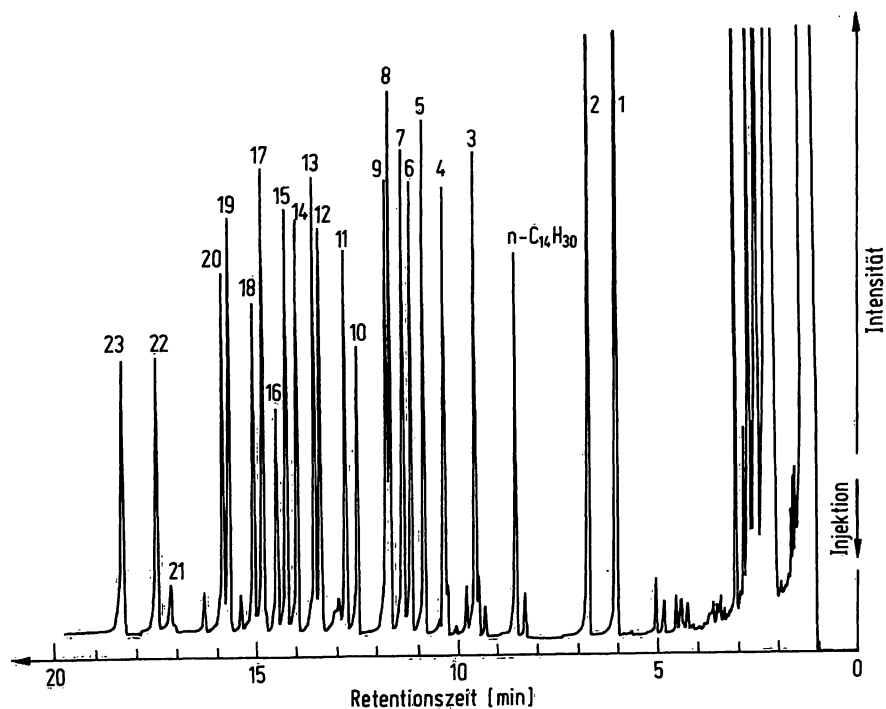


Abb. 2. Kapillarchromatogramm der gleichen Probe wie in Abb. 1; chromatographische Bedingungen siehe Text; Substanzbezeichnung wie Abb. 1, Verstärkung 1×10^2 .

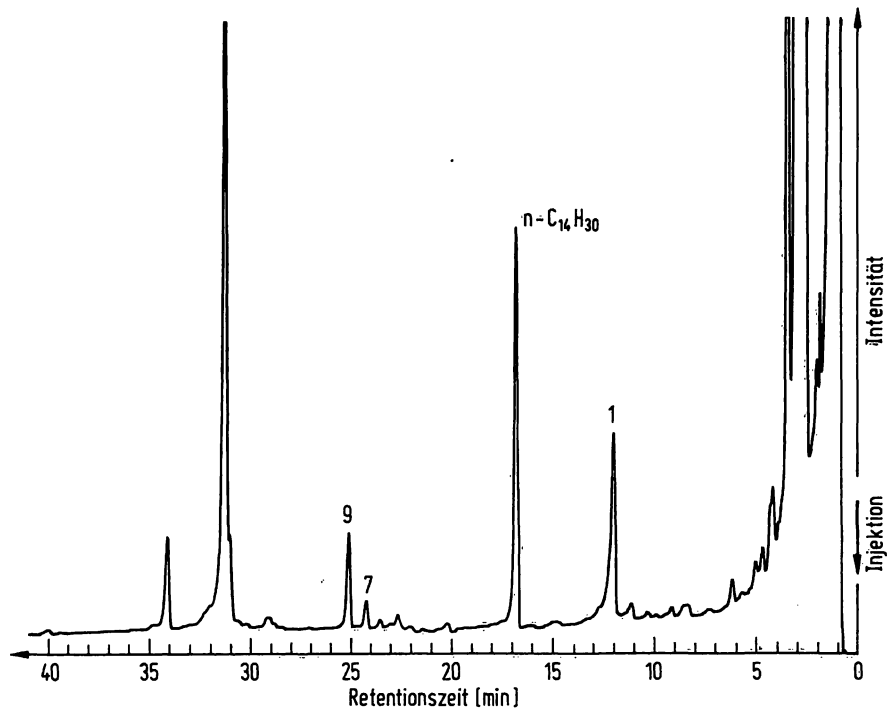


Abb. 3. Chromatogramm eines 24-h-Normalurins; gepackte Säule; chromatographische Bedingungen siehe Text; Substanzbezeichnung wie Abb. 1; Verstärkung 8×10^2 .

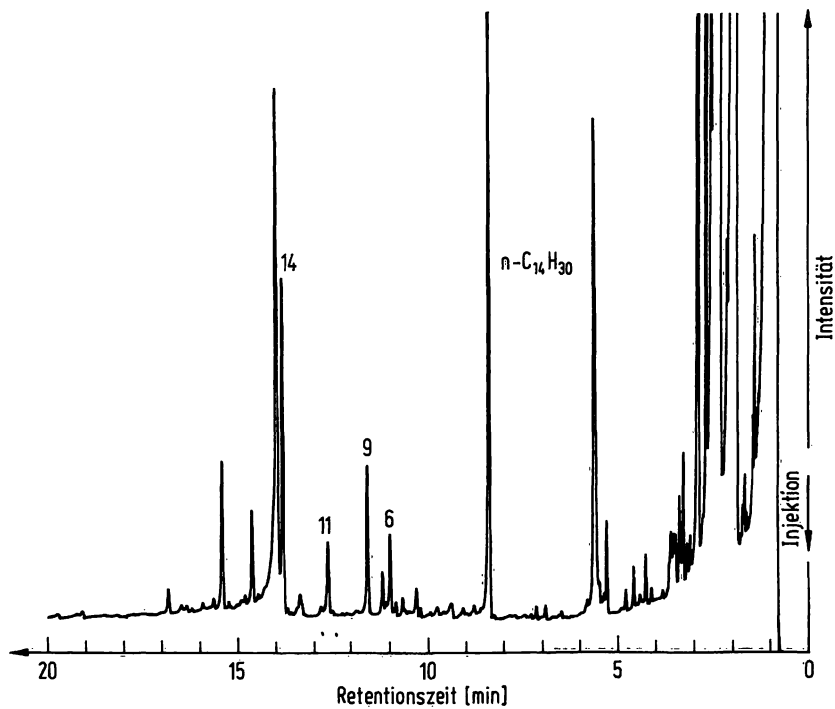


Abb. 4. Kapillarchromatogramm der gleichen Probe wie in Abb. 3; chromatographische Bedingungen siehe Text; Substanzbezeichnung wie in Abb. 1; Verstärkung 1×10^2 . Bemerkenswert ist der Peak 11 mit der Retentionszeit von Phenylbrenztraubensäure. Eine sichere Identifizierung war jedoch nicht möglich, da keine GC-MS-Koppelung zur Verfügung steht.

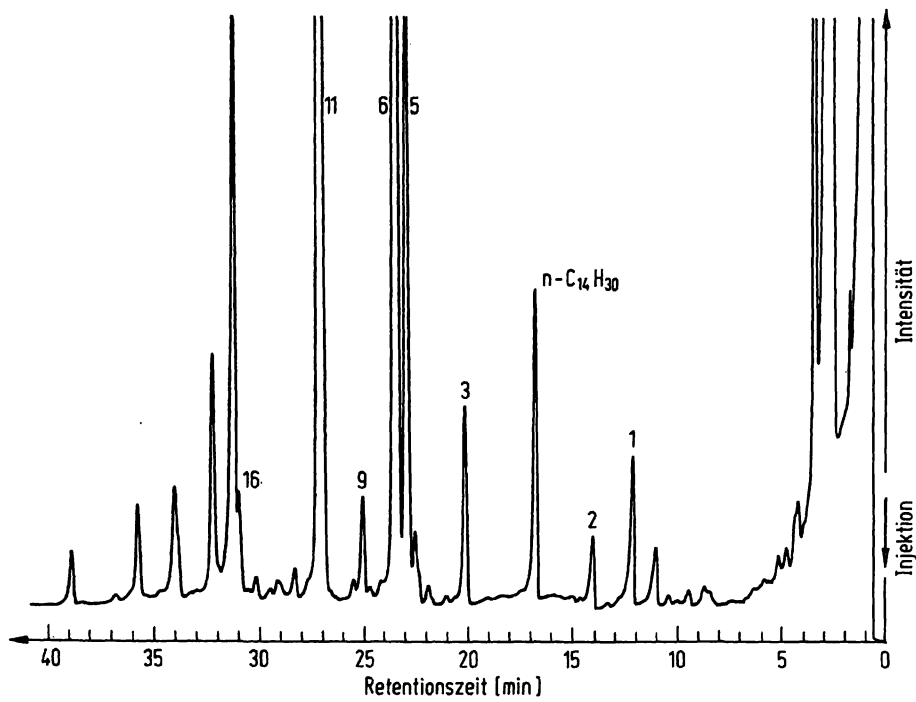


Abb. 5. Chromatogramm eines 24-h-Phenylketonurie-Urins; chromatographische Bedingungen siehe Text; Substanzbezeichnungen wie Abb. 1; Verstärkung 8×10^2 .

Unter den gewählten Bedingungen werden Benzoesäure (Peak 1) und Harnstoff nicht getrennt. Bei Harnchromatogrammen ist dieser Sachverhalt meist an der unsymmetrischen Peakform ("heading") zu erkennen.

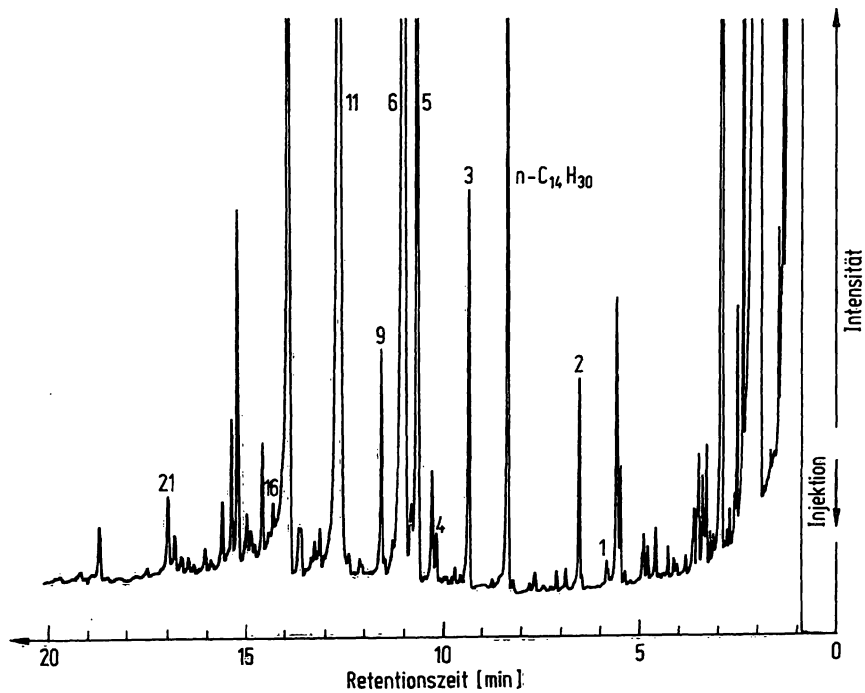


Abb. 6. Kapillarchromatogramm der gleichen Probe wie in Abb. 5; chromatographische Bedingungen siehe Text; Substanzbezeichnungen wie in Abb. 1; Verstärkung 1×10^2 .

Verglichen mit Abb. 5 wird für Benzoesäure (Peak 1) ein wesentlich kleinerer Peak gefunden, was auf die Trennschwierigkeit von Benzoesäure und Harnstoff mit der gepackten Säule zurückgeführt werden kann.

Die quantitative Analyse zeigte, daß die Standardgeraden im betrachteten Konzentrationsbereich (0,1 g/l – 2,5 g/l) linear verlaufen ($r \approx 1$). Tabelle 2 gibt die mit Hilfe einer linearen Regressionsanalyse ermittelten Werte des Korrelationskoeffizienten r , sowie Achsenabschnitt b und Steigung m der Standardgeraden der einzelnen Substanzen wieder.

Tab. 2. Konstanten der Standardgerade $y = mx + b$ sowie Korrelationskoeffizient r der einzelnen Substanzen. (y = relative Impulszahl, x = Konzentration in g/l; n = Anzahl der Messungen).

Substanz	r	m	b	n
Benzoessäure	0,998	0,937	0,000	34
Phenylelessigsäure	0,997	0,833	-0,016	34
Mandelsäure	0,999	1,039	-0,027	34
Zimtsäure	0,995	0,991	0,002	34
<i>o</i> -Hydroxyphenylelessigsäure	0,998	0,964	-0,020	34
3-Phenylmilchsäure	0,995	0,905	-0,045	34
<i>m</i> -Hydroxyphenylelessigsäure	0,996	0,913	-0,045	26
<i>p</i> -Hydroxybenzoessäure	0,997	1,121	-0,015	34
<i>p</i> -Hydroxy-phenylmilchsäure	0,993	0,825	-0,045	33
Veratrumssäure	0,972	0,589	0,026	33
Phenylbrenztraubensäure	0,988	0,886	0,062	21
Vanillinsäure	0,997	0,911	-0,026	34
2,6-Dihydroxybenzoessäure	0,994	0,987	-0,014	34
<i>o</i> -Cumarsäure	0,997	0,936	-0,103	34
<i>o, p</i> -Hydroxybenzoessäure	0,987	0,975	0,008	33
Homogentisinsäure	0,956	0,884	0,012	20
<i>m</i> -Cumarsäure	0,991	1,105	-0,013	34
Vanillinmandelsäure	0,984	0,882	-0,078	27
<i>p</i> -Cumarsäure	0,996	1,012	-0,080	34
Ferulasäure	0,995	0,739	-0,093	31
<i>m, p</i> -Dihydroxyzimtsäure	0,988	0,881	-0,072	31

Die Anwendbarkeit der beschriebenen Methode möge durch die quantitative Analyse der Phenylalaninmetaboliten im Urin von vier erwachsenen Phenylketonurie-Patienten demonstriert werden (Tab. 3).

Literatur

1. Gottschalk, G. (1966), Einführung in die Grundlagen der chemischen Materialprüfung, S. Hirzel-Verlag, Stuttgart.
2. Weber, E. (1967), Grundriß der biologischen Statistik; Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

Tab. 3. Konzentration aromatischer Carbonsäuren im 24-h-Urin erwachsener Phenylketonurie-Patienten; Konzentration in mg/g Kreatinin.

	Patienten			
	H. Fi	H. S.	H. Fö.	S. h.
Phenylelessigsäure	22,83	25,81	25,01	28,07
Mandelsäure	25,92	25,59	34,45	27,10
<i>o</i> -Hydroxyphenylelessigsäure	71,76	59,84	89,86	68,79
3-Phenylmilchsäure	317,73	169,67	168,56	360,16
<i>p</i> -Hydroxyphenylelessigsäure	34,28	47,98	31,24	30,08
Phenylbrenztraubensäure	654,48	420,48	507,15	313,67
Phenylalanin im Serum (mg/l)	163	239	218	199

Die im Urin dieser Homozygoten gefundenen Konzentrationen an 3-Phenylmilchsäure und Phenylbrenztraubensäure sind 2–3 mal so hoch, wie die höchste für die Standardkurve verwandte Konzentration. Ein separat durchgeführter Versuch zeigte, daß die Standardgeraden der Tabelle 2 auch in diesem Konzentrationsbereich gültig sind. Wie aus Tabelle 3 weiterhin zu entnehmen, liegen die gefundenen Konzentrationen an *o*-Hydroxyphenylelessigsäure, 3-Phenylmilchsäure und Phenylbrenztraubensäure um 50–60% unter den Literaturwerten eines entsprechenden Patientenkollektivs (3). Dies ist wahrscheinlich auf die niedrigeren Phenylalaninwerte im Serum unserer Patienten zurückzuführen.

Danksagung

Wir danken Frau D. Schmitt für die wertvolle technische Hilfe bei der Durchführung dieser Arbeit.

Dr. P. Wardenbach
Institut für Humangenetik
Wilhelmstraße 31
5300 Bonn